

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa



Casa abierta al tiempo

**AISLAMIENTO, CARACTERIZACION Y SELECCION DE BACTERIAS LACTICAS
 PARA LA CONSERVACION DE PULPA DE CAFE POR ENSILAJE**

**Tesis para obtener el grado de
 MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA**

Presenta:

ARACELI SUZUKI LOPEZ

Sustentada el 10 de diciembre de 1999 ante el jurado formado por:

Dra. Amelia Farrés González Sarabia, Profesora de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Dra. Isabelle Gaime-Perraud, Investigadora del Instituto de Investigación para el Desarrollo (IRD), Francia.

Dr. Christopher Augur, Investigador del Instituto de Investigación para el Desarrollo (IRD).

Dr. Gerardo Saucedo Castañeda, Profesor de la Universidad Autónoma Metropolitana.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Posgrado en Biotecnología

Diciembre 10, 1999.

DR. GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA
P R E S E N T E .

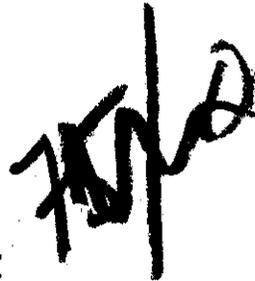
Por medio de este conducto, la **Comisión del Posgrado en Biotecnología**, le agradece su participación como Presidente en el examen de grado de Maestría de la alumna **ARACELI SUZUKI LÓPEZ**, quien defendió y expuso la tesis "**Aislamiento y selección de bacterias lácticas para la conservación de pulpa de café por ensilaje**" a los 10 días del mes de diciembre de mil novecientos noventa y nueve.

Así mismo, le agradece su participación como Tutor durante el desarrollo de la misma.

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E .
"CASA ABIERTA AL TIEMPO"


DR. JAVIER BARRIOS GONZÁLEZ
COORDINADOR





UNIDAD IZTAPALAPA

Av. Michoacán y La Purísima, Col. Vicentina, México, D.F. 09340, Tels: (5) 723-63-51 (5) 724-49-99, Fax: (5) 724-47-12,
e-mail: psgbt@xanum.uam.mx internet: <http://v.ww.iztapalapa.uam.mx/iztapala.www/division.cbs/biotecnolo/inicio.htm>

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres y a Germán por demostrarme siempre su amor, comprensión y paciencia.

A mis directores de tesis, Dra. Isabelle Gaime y Dr. Gerardo Saucedo, por la confianza y el apoyo brindado todo el tiempo.

A CONACyT, porque gracias a la beca que recibí, logré obtener el grado de Maestro en Biotecnología.

Al proyecto Biopulca de la Comunidad Económica Europea (IC18*CT970185) y al Instituto de Investigación para el Desarrollo (IRD), por el apoyo económico brindado para hacer posible mi estancia en Montpellier, Francia.

Al Dr. Maurice Raimbault por su dirección y apoyo durante mi estancia en Montpellier.

Al Ing. Miguel Cervantes por su amabilidad y cooperación al proporcionarnos la materia prima para los experimentos.

Mi gratitud a los Dres. Sergio Huerta, Mariano Gutierrez, Ernesto Favela, Arely Prado, así como a todos mis compañeros de la PP4, Cristobal, Gerardito, Alex Tellez, Rosario, Tania, Romano, Oscar, Lupita, Fátima, Nachito, Erika, Ildefonso, a la Sra. Ma. Elena y al resto de los integrantes de la Planta.

INDICE

INDICE.....	I
INDICE DE TABLAS.....	V
INDICE DE FIGURAS.....	VI
1. INTRODUCCION.....	1
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.....	4
2.1 El café.....	4
2.1.1 El fruto.....	7
2.1.2 Localización y producción del café mundial y nacional.....	9
2.1.3 Industrialización del café.....	12
2.1.3.1 Proceso húmedo.....	13
2.1.3.2 Proceso seco.....	16
2.1.4 Residuos del tratamiento del café.....	17
2.2 Pulpa de café.....	17
2.2.1 Composición química de la pulpa de café.....	18
2.2.2 Factores antifisiológicos y antinutricionales presentes en la pulpa de café.....	21
2.2.2.1 Cafeína.....	22
2.2.2.2 Compuestos fenólicos.....	23
2.2.3 Aprovechamiento de la pulpa de café por vía biotecnológica.....	23
2.2.4 Alternativas para la conservación de pulpa de café.....	24
2.3 El ensilaje.....	25
2.3.1 Proceso de ensilaje y los factores que en él intervienen.....	26
2.3.2 Utilización de aditivos.....	29

2.3.3 Silos.....	32
2.3.4 Conservación de residuos frutales y vegetales por ensilaje.....	32
2.3.5 Ensilaje de pulpa de café.....	33
2.3.5.1 Cambios químicos y biológicos que ocurren en la pulpa de café durante el proceso de ensilaje.....	34
2.3.5.2 Valor alimenticio del ensilaje de pulpa de café.....	35
2.4 Bacterias lácticas.....	35
2.4.1 Caracteres principales y métodos de estudio.....	39
A) Caracteres cito-morfológicos.....	39
B) Caracteres fisiológicos.....	40
C) Caracteres bioquímicos.....	40
2.4.2 Cultivo de bacterias lácticas.....	41
2.4.3 Papel de las bacterias lácticas en el proceso de ensilaje.....	42
2.4.4 Bacterias lácticas como inoculantes y sus efectos en la fermentación.....	43
2.4.5 Efecto de inoculantes de bacterias lácticas en la nutrición animal.....	44
2.4.6 Métodos modernos usados para la identificación y clasificación de bacterias lácticas.....	45
3. OBJETIVOS.....	46
3.1 Objetivo general	
3.2 Objetivos particulares	
4. MATERIAL Y METODOS.....	47
4.1 Sustrato sólido utilizado para el ensilaje.....	47
4.2 Origen de las bacterias lácticas.....	47
4.3 Medios de cultivo.....	47

4.3.1 Medio usado para el aislamiento y propagación de cepas de bacterias lácticas..	47
4.3.2 Medios usados para la caracterización fenotípica de cepas de bacterias lácticas	48
4.3.3 Conservación de cepas de bacterias lácticas.....	48
4.4 Condiciones de cultivo.....	48
4.4.1 Preparación del inóculo de bacterias lácticas para pruebas bioquímicas.....	48
4.4.2 Propagación del inóculo para ensilaje de pulpa de café fresca.....	49
4.4.2.1 Microsilos.....	49
4.5 Tratamiento de muestras de pulpa de café ensilada.....	50
4.6 Técnicas analíticas.....	51
4.6.1 Aislamiento de cepas de bacterias lácticas.....	51
4.6.2 Tinción Gram.....	51
4.6.3 Prueba de la catalasa.....	52
4.6.4 Prueba de motilidad.....	53
4.6.5 Fermentación de glucosa (Acidificación).....	53
4.6.6 Gas de glucosa.....	53
4.6.7 Determinación de la biomasa de cepas de bacterias lácticas.....	54
4.6.8 Crecimiento de cepas de bacterias lácticas en medios MRS pectina y MRS ácido tánico usados como fuente de carbono.....	54
4.6.9 Fermentación de carbohidratos por el sistema API 50 CH.....	55
4.6.10 Análisis de enzimas por el sistema APIZYM.....	55
4.6.11 Restricción del DNA (RFLP) de cepas de bacterias lácticas.....	55
4.6.12 Determinación de productos por HPLC y por ensayos enzimáticos (YSI).....	56
4.6.13 Evaluación de la microflora.....	58
4.6.14 Materia seca, humedad.....	59
4.6.15 pH.....	59
4.6.16 Expresión de resultados.....	59

5. RESULTADOS Y DISCUSION	61
5.1 Aislamiento, caracterización e identificación de cepas de bacterias lácticas provenientes de ensilajes de pulpa de café.....	61
5.1.1 Crecimiento de bacterias lácticas en pectina y ácido tánico.....	64
5.1.2 Perfil fermentativo y crecimiento de bacterias lácticas.....	65
5.1.3 Análisis enzimático de ácido L-láctico y glucosa residual.....	69
5.1.4 Pruebas enzimáticas por el sistema APIZYM.....	71
5.1.5 Perfiles de la fermentación de carbohidratos por el sistema API 50 CH.....	72
5.1.6 Análisis de los perfiles de restricción (RFLP) de cepas de bacterias lácticas.....	75
5.2 Aplicación de inoculantes de bacterias lácticas en la conservación de pulpa de café por el proceso de ensilaje.....	78
5.2.1 Parámetros físico-químicos de los ensilajes naturales e inoculados.....	78
5.2.1.1 Evolución de los azúcares totales.....	78
5.2.1.2 Evolución del pH.....	81
5.2.1.3 Producción de ácido láctico.....	82
5.2.1.4 Producción de etanol.....	87
5.2.1.5 Evolución de la humedad.....	89
5.2.1.6 La pérdida de materia seca.....	91
5.2.1.7 Evolución de la microflora de los ensilajes naturales e inoculados.....	94
6. CONCLUSIONES	99
7. BIBLIOGRAFÍA	102
8. ANEXOS	132

INDICE DE TABLAS

Capítulo 2.

Tabla 2.1 Producción mundial de café del período 1975-76 a 1995-96.....	10
Tabla 2.2 Composición química de pulpa de café fresca y deshidratada.....	18
Tabla 2.3 Composición química de pulpa de café <i>C. arábica</i> variedad Mundo Novo y variedad Bourbon.....	19
Tabla 2.4 Contenido de azúcares presentes en pulpa de café.....	20
Tabla 2.5 Contenido de cenizas y minerales en pulpa de café.....	20
Tabla 2.6 Composición química de pulpa de café sometida a diferentes procesos.....	21
Tabla 2.7 Cambios en la composición química de un ensilaje de pulpa de café sin aditivos....	34
Tabla 2.8 Principales productos de metabolismo de los azúcares por bacterias lácticas.....	38

Capítulo 5.

Tabla 5.1 Descripción morfológica de las colonias en medio MRS en caja de Petri.....	61
Tabla 5.2 Pruebas bioquímicas realizadas a cepas aisladas de ensilados de pulpa de café.....	63
Tabla 5.3 Forma, tamaño y crecimiento de las cepas en el medio MRS pectina y MRS ácido tánico como fuentes de carbono.....	64
Tabla 5.4 Resultados obtenidos en las pruebas por el sistema APIZYM.....	71
Tabla 5.5 Perfiles de la fermentación de carbohidratos por el sistema API 50 CH.....	74
Tabla 5.6 Tasa de producción de ácido DL láctico de los ensilajes naturales e inoculados.....	85
Tabla 5.7 Recuperación de carbono de los ensilajes naturales e inoculados.....	93
Tabla 5.8 Velocidad de crecimiento de bacterias y levaduras en los medios MRS y PCA.....	97

INDICE DE FIGURAS

Capítulo 2.

Figura 2.1 Cerezas de café de <i>C. arábica</i>	4
Figura 2.2 Planta adulta de <i>C. arábica</i>	5
Figura 2.3 Flores de <i>C. arábica</i>	6
Figura 2.4 Corte longitudinal de una cereza de café.....	8
Figura 2.5 México dentro de la producción mundial de café.....	11
Figura 2.6 Principales superficies cafetaleras de México.....	11
Figura 2.7 Estructura química de la cafeína (1,3,7-trimetilxantina).....	22

Capítulo 4.

Figura 4.1 Tratamientos aplicados a las diferentes muestras de pulpa de café ensilada.....	50
Figura 4.2 Representación de la técnica de inoculación por punto para determinar las diluciones óptimas.....	58

Capítulo 5.

Figura 5.1 Producción de ácido DL láctico de cepas de bacterias lácticas.....	66
Figura 5.2 Rendimiento de biomasa contra sustrato consumido.....	67
Figura 5.3 Índice de homofermentación de bacterias lácticas.....	69
Figura 5.4 Producción de ácido L-láctico y glucosa residual.....	70
Figura 5.5 Perfiles de restricción del DNA de cepas de bacterias lácticas.....	76
Figura 5.6 Cambios en el contenido de azúcares totales de los ensilajes de pulpa de café.....	79
Figura 5.7 Cambios en el pH.....	81
Figura 5.8 Producción de ácido DL láctico de los ensilajes naturales e inoculados.....	83

Figura 5.9 Rendimiento de ácido DL láctico contra sustrato consumido a las 240 h de fermentación de los ensilajes.....	85
Figura 5.10 Producción de etanol en el transcurso de los ensilajes de pulpa de café.....	87
Figura 5.11 Rendimiento de etanol contra sustrato consumido a las 240 h de fermentación en los ensilajes naturales e inoculados.....	88
Figura 5.12 Evolución del contenido de humedad de los ensilajes de pulpa de café.....	90
Figura 5.13 Pérdida de materia seca de los ensilajes naturales e inoculados.....	91
Figura 5.14 Evolución de bacterias y levaduras anaerobias de los ensilajes naturales e inoculados.....	94
Figura 5.15 Evolución de bacterias y levaduras anaerobias de los ensilados naturales e inoculados.....	98

1. INTRODUCCION

La producción de café alrededor del mundo es un factor económicamente importante para más de cincuenta países en desarrollo de América, Asia y Africa, localizados en el área entre los Trópicos de Cancer y Capricornio, (Bressani, 1979). Su cosecha y procesamiento rinden una cantidad importante de subproductos tradicionalmente considerados como desperdicios; solo en América Tropical siete millones de toneladas son producidas cada año, (Rolz y col., 1980; Regalado, 1996) incluyendo materiales tales como pulpa de café, mucilago y jugo de la pulpa. Estos subproductos son ricos en hidratos de carbono y proteínas por lo cual pueden y deben ser considerados como importantes fuentes de materia prima para el desarrollo de nuevas agroindustrias.

Por ejemplo, la pulpa de café puede ser usada directamente para producir composta, biogas, etanol, como alimento para animales, como fertilizante orgánico, como substrato para la producción de enzimas, como substrato para cultivo de lombrices, y también puede ser empleado como sustrato para la producción de hongos comestibles (*Pleurotus*), así como para la producción de biomasa de microorganismos tales como levaduras, y para la posible extracción de pectina y otros compuestos químicos como cafeína, (De León y col., 1980; Martínez-Carrera, 1989; Antier y col., 1993).

La producción estacionaria, la composición química, la microflora endógena y la elevada humedad de la pulpa de café implican serios problemas de disponibilidad de éste subproducto. Para el mejor aprovechamiento de la pulpa de café es necesario emplear métodos de procesamiento que puedan ser aplicados independientemente del beneficiado del café y que, a la vez, mantengan o mejoren el valor nutritivo de la pulpa para alimentación animal, sin aumentar excesivamente el costo del producto final.

El proceso de ensilaje con bacterias lácticas, es una alternativa sencilla y comercialmente disponible que ofrece grandes perspectivas de poder ser aplicado con éxito, para conservar la pulpa y después aprovecharla.

Este proceso es ampliamente conocido y utilizado para la conservación de forrajes estacionales en fincas ganaderas. Consiste en la preservación de los forrajes, en su estado succulento, por medio de fermentaciones (Weinberg y col., 1993). La fermentación es producida por bacterias lácticas en ausencia de aire, que actúan principalmente sobre los carbohidratos solubles que contienen las células vegetales. Durante el proceso de fermentación se producen ácidos, principalmente ácido láctico, que disminuyen el pH del material ensilado a niveles que impiden el desarrollo de nuevas bacterias. En años pasados se ha renovado el interés en la inoculación de forrajes cosechados para ensilaje con cepas seleccionadas de bacterias lácticas que predominan en la microflora indígena, la cual es menos eficiente para fermentar los azúcares a ácido láctico, (McDonald, 1981; Woolford 1984). De esta forma se previene la descomposición adicional del material, el cual puede preservarse así por periodos largos de tiempo, (Barnett, 1954; Watson y Smith, 1984; Weinberg y Muck, 1996; Rutherford, 1998).

El aumento en la práctica de conservar forrajes por ensilaje como alimento para ganado vacuno en el invierno ha sido uno de los grandes desarrollos en la agricultura en las décadas pasadas. Bajo condiciones naturales, el ensilaje es un proceso sujeto a muchas variables las cuales inevitablemente conducen a un producto de calidad fluctuante (Seale, 1986).

La conservación de la pulpa de café por ensilaje ha sido utilizada por Murillo (1978), que ha estudiado el efecto de diferentes aditivos sobre la conservación y la calidad nutricional de los productos obtenidos para alimentar rumiantes. Gaime-Perraud (1995) estudió el ensilaje de pulpa de café desde un punto de vista bioquímico y microbiológico.

La aparición al mercado de grandes volúmenes de subproductos de origen agroindustrial, durante periodos de tiempo muy cortos, provocan serios problemas de contaminación ambiental por la inadecuada disposición de los mismos. Tal es el caso de la pulpa de café fresca, siendo el primer subproducto que resulta del beneficio del café, la cual representa un 40 % del peso, en base fresca de la cereza café.

Actualmente México ocupa el 5to lugar a nivel mundial como productor de café, con una producción de 4.9 millones de sacos de 60 kg. Debido a la gran cantidad obtenida de este subproducto y a su composición química, rica en carbohidratos y otros compuestos de interés nutricional, exige, por tanto, un proceso de conservación que permita su almacenamiento, como lo es el ensilaje inoculado con bacterias lácticas, y la utilización durante periodos más extensos, ya que los subproductos de origen agroindustrial, van tomando día a día mayor importancia en la alimentación animal.

Por lo anterior, en este trabajo se aislaron cepas de bacterias lácticas de pulpa de café ensilada naturalmente, de las cuales se estudiaron los perfiles fermentativos de las cepas y se sometieron a diversas pruebas bioquímicas para su posterior caracterización e identificación mediante el uso de sistemas comerciales, así como por electroforesis del DNA. Se llevó a cabo la selección de cepas para probarlas como inoculantes en el ensilaje de pulpa de café fresca en los que se siguió la evolución de diferentes parámetros físico-químicos envueltos en el proceso.

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

2.1 El café

El cafeto es originario de Africa Oriental, de las montañas de Etiopía; su comercialización comenzó en Europa entre los siglos XV y XVI; alrededor de 1720 se trajo a América, donde se establecieron las primeras plantaciones en las Guayanas Francesa y Holandesa.

El café se introdujo a México por tres regiones diferentes: en el año de 1796 de la Isla de Cuba a la región de Córdoba, Veracruz; en 1823 proveniente de Mokka, Arabia, se introdujo a Uruapan, Michoacán; y en 1847 de Guatemala a Tuxtla Chico, Chiapas (Villaseñor, 1982).

La cereza de café (Figura 2.1) es el fruto del cafetal que pertenece a la familia Rubiaceae y al género *Coffea* (Coste, 1989). La planta es un arbusto que puede medir de 7 hasta 10 m de altura en estado silvestre, aunque en las plantaciones de café se poda alrededor de los 3 m para facilitar la cosecha (Smith, 1985), su forma es cónica o irregular y en condiciones normales de crecimiento, se desarrolla con un solo eje (CATIE, 1984).



Figura 2.1 Cerezas de café de *C. arábica*

El sistema radicular es superficial estando el 60 % en los primeros 30 cm de profundidad, y la raíz pivotante puede llegar a más de 1 m (Regalado, 1996).

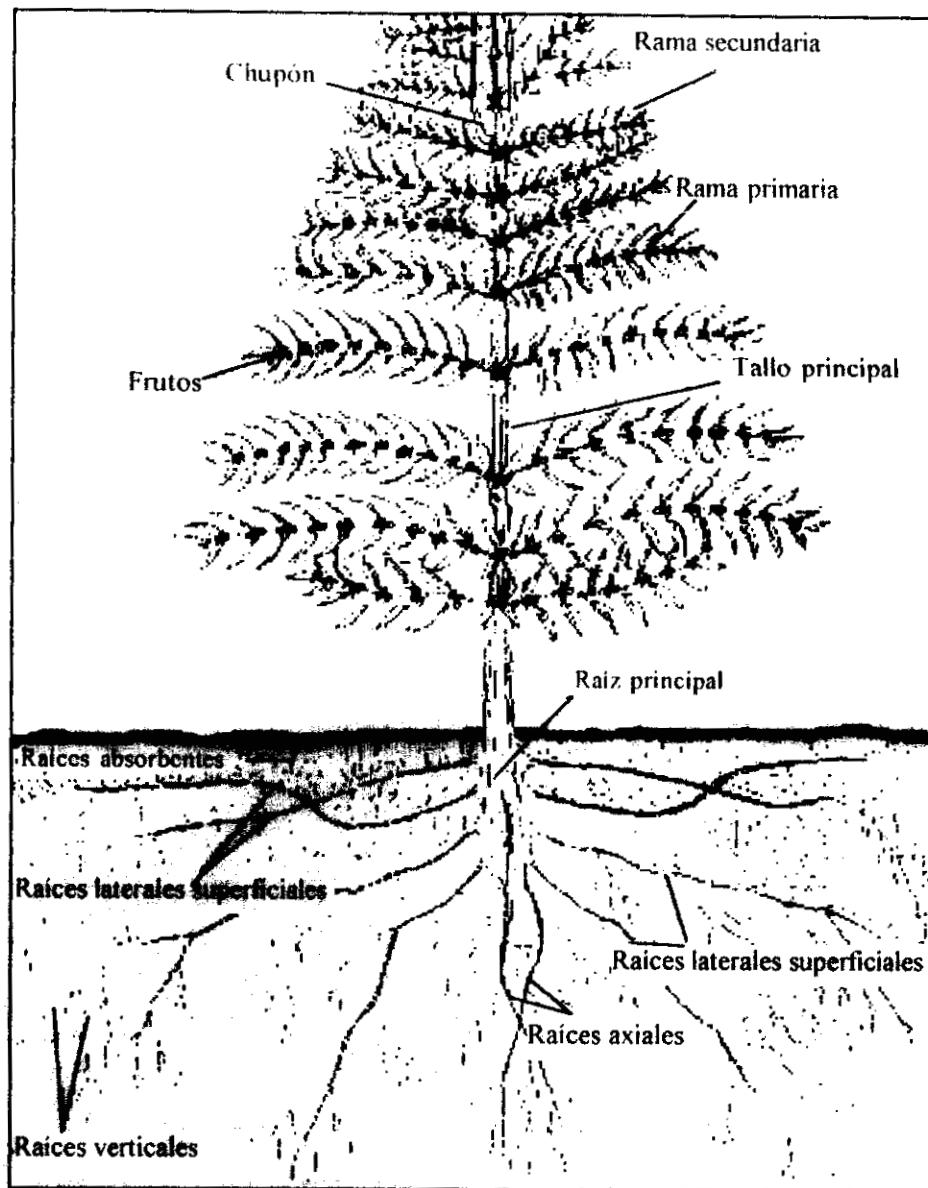


Figura 2.2 Planta adulta de *C. arábica*.

En la Figura 2.2 se pueden observar las características de una planta de café, que presenta dos tipos de crecimiento: Vertical u ortotrópico, es un tallo central con pocas ramificaciones verticales, a menos que reciba algún tipo de poda de formación, para estimular la producción de un mayor número de ejes (Castillo y col., 1996). El otro crecimiento es el lateral o plagiotrópico, representado por las llamadas bandas o ramas primarias, las cuales pueden originar ramas secundarias y éstas a su vez terciarias. Estas poseen nudos y son el asiento

único de fructificación del cafeto; las primarias son opuestas, largas, flexibles y forman ángulos de 45° a 60°, con respecto al tallo central (Sánchez, 1991).

Las hojas son opuestas y alternas en el tallo ortotrópico y en ramas plagiotrópicas son opuestas. Son de color verde oscuro y brillante en la parte superior y verde claro en el interior, son ovales, terminan en punta y sus bordes son ondulados.



Las flores se localizan en las axilas de las hojas de las ramas plagiotrópicas. En la Figura 2.3 se pueden apreciar las flores de una planta de la variedad *C. arábica*, la corola es blanca y formada por cinco pétalos fusionados en su base, dando origen al tubo

Figura 2.3 Flores de *C. arábica*

de la corola; el cual se encuentra inserto en la parte superior del ovario. El ovario, normalmente con dos lóculos, contiene un óvulo por lóculo. Tiene cinco estambres con anteras lineales que se abren longitudinalmente. El estilo es largo, de color blanco y bifurcado en el estigma (Regalado, 1996).

El género *Coffea* incluye por lo menos 70 especies, de las que sólo resaltan por su valor comercial: *C. arábica* Linneo y *C. canephora* Pierre (Coste, 1986).

- *Coffea arabica* Linneo, originario de las montañas del sur de Etiopía, contiene poca cafeína representa las tres cuartas partes de la producción mundial y se desarrolla más particularmente sobre las altas mesetas.

- *Coffea canephora* Pierre, descubierta en el Congo, donde la variedad más difundida es *Coffea robusta*, que representa el 25 % de la producción mundial. Esta variedad se aclimata bien a altitudes menores, tolera temperaturas más altas, resiste más a enfermedades y contiene 2 veces más cafeína que la variedad *C. arabica*.

Los requerimientos ecológicos óptimos para el cafeto son: temperaturas promedio anuales de 18° a 22°C, sin riesgo de heladas; altitudes entre 900 y 1200 m sobre el nivel del mar; precipitación entre 1400 a 2300 mm, bien distribuidas en el año; suelos con más de 1 m de profundidad, de textura franca a migajón-arcilloso; contenido de materia orgánica arriba del 7 %; y un pH de 4.5 a 5.5. En México se cultiva primordialmente *C. arábica* L., que es la de mayor importancia comercial y en muy pequeña escala *C. canephora* (Castillo y col., 1996).

2.1.1 El fruto

El fruto es una drupa de superficie lisa y brillante, de pulpa delgada fácilmente desprendible del pergamino. El color del fruto maduro varía de rojo a amarillo según la variedad y la exposición al sol. En ocasiones sólo uno de los óvulos se fecunda y se desarrolla originando una semilla de forma redonda que se le conoce como café caracol. La época de la floración varía según la región, la latitud y la especie.

El fruto del cafetal tiene el mismo aspecto exterior que el de una cereza, es por esto que se denomina igualmente "cereza café". La talla varía poco según las variedades, en promedio: 10 mm de longitud, 6-7 mm de ancho y 3-4 mm de espesor (Wilboux, 1956; CATIE, 1984).

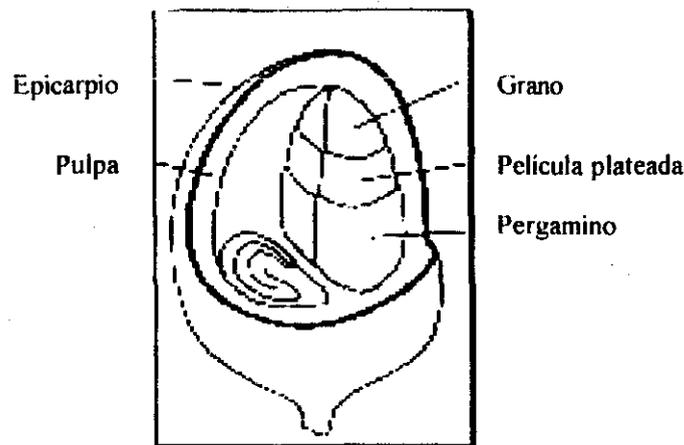


Figura 2.4 Corte longitudinal de una cereza de café.

El corte longitudinal de este fruto (Figura 2.4) muestra las diferentes capas tisulares. La pulpa está formada por el epicarpio (epidermis o cáscara o pellejo correspondiendo al 46 % del fruto), el cual está constituido de una capa de células poligonales gigantes, su consistencia varía con la especie, y el mesocarpio o mucílago miel, capa gruesa de tejido esponjoso de cinco milímetros de espesor, rica en azúcares y en pectinas (pulpa), carnoso blanco-amarillento, corresponde al 17-18 %, se encuentra rodeando dos granos unidos por su lado plano. El color de la epidermis varía de verde (clorofilas) a rojo (antocianinas), incluso a rojo oscuro, a veces hasta violeta o negro cuando las cerezas están muy maduras. Los frutos rojos son comercialmente más apreciados por considerarse de mejor calidad.

Los granos están revestidos de una doble membrana, la primera comunmente llamada café pergamino. Es un endocarpio delgado o mucílago, de color amarillo pálido y de consistencia dura y frágil que representa el 18-20 %. La segunda mucho más fina que la precedente y adherida al grano (albumen), es llamada película plateada o espermodermo, representa el 0.2 % y el café verde representa el 17-18 % del fruto. Los granos están compuestos de un endospermo, de un cotiledón y de un embrión situado en la base del grano sobre el lado interno (Castillo y col., 1996; Regalado, 1996).

2.1.2 Localización y producción del café mundial y nacional

Las áreas del mundo en las cuales el café puede crecer están limitadas, principalmente por la temperatura, ya que la planta puede ser dañada seriamente por las heladas así como por temperaturas cercanas a los 30°C y en condiciones de baja humedad, razones por las que el cultivo del café (principalmente las dos especies más cultivadas: *C. arábica* y *C. canephora*) se extiende entre el Trópico de Cancer y el Trópico de Capricornio (Jobin, 1982; Marshall, 1983; Coste, 1989), por lo que la altitud, precipitaciones, tipo de suelo y la cercanía al ecuador, son factores preponderantes en el cultivo de este fruto. La población natural de la especie *C. arábica* se sitúa sobre un clima tropical templado por la altitud. En las regiones intertropicales, esta especie no puede prosperar ya que la conjugación del relieve y la latitud son factores desfavorables. Mientras que la especie *C. canephora* se desarrolla sobre un clima húmedo tropical (Smith, 1985).

Del periodo 1975-1976 a 1994-1995 la producción mundial de café pasó de 73 109 000 de sacos de 60 Kg, a 91 500 000. Resalta la producción de la cosecha 1987-1988 con 103 336, poco más de 6.2 millones de toneladas (Tabla 2.1), mientras que en 1989-1990, la producción fue del orden de 5.5 millones de toneladas, 70 a 75 % de café arábica y el resto de café robusta (anónimo, 1991). La cantidad de pulpa producida fue de cerca de 2.8 millones de toneladas. El café verde representa el 52 % en peso seco del fruto y la pulpa 29 % peso de materia seca (Aguirre, 1966; Bressani y col., 1972; Zuluaga, 1989). Dicho de otro modo, la producción de una tonelada de café verde genera 500 Kg de residuos de café (Roussos y col., 1989). En los últimos 20 años el promedio de la producción ha sido 88 000 000 en ese período, México ha participado en promedio anualmente con 4 487 000 sacos de 60 Kg. lo que representa el 5.1 % de la producción mundial, ocupando el 5to lugar entre los países productores de café.

Tabla 2.1 Producción mundial de café del período 1975-76 a 1995-96 (Regalado, 1996).

Ciclo	Miles de sacos de 60 Kg.
1975-76	73,109
1976-77	60,907
1977-78	70,850
1978-79	78,941
1979-80	81,861
1980-81	86,354
1981-82	98,189
1982-83	82,778
1983-84	90,049
1984-85	90,357
1985-86	95,829
1986-87	79,164
1987-88	103,336
1988-89	92,080
1989-90	97,300
1990-91	98,400
1991-92	102,700
1992-93	93,100
1993-94	93,100
1994-95	91,500
1995-96	91,200

Los principales países productores y exportadores de café se presentan en la Figura 2.5. Actualmente México ocupa el quinto lugar a nivel mundial como productor de café, después de Brasil, Colombia, Indonesia y Vietnam. La variedad que produce es la "arábica", y dentro de ésta, se clasifica en el grupo de "otros suaves".

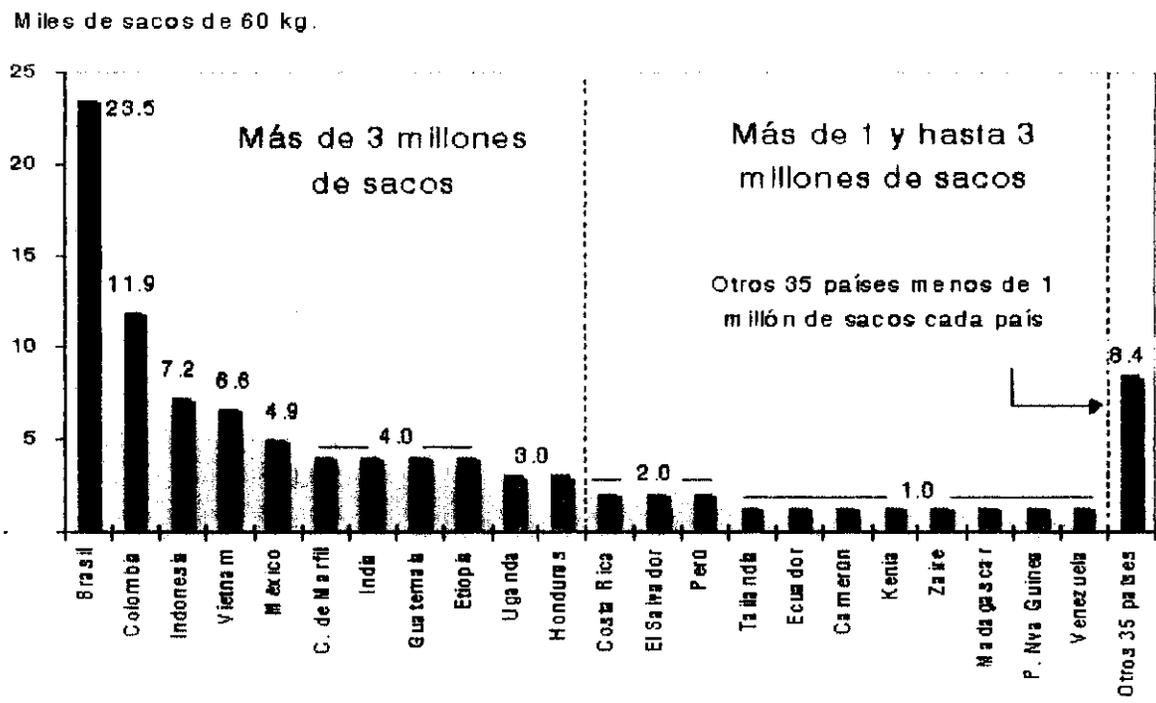


Figura 2.5 México dentro de la producción mundial de café (SAGAR, 1999)

El café se produce sobre una superficie de 690 mil hectáreas, en doce estados de la República Mexicana, situados en la parte centro-sur del país. Estos estados son Colima, Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tabasco y Veracruz (Figura 2.6).

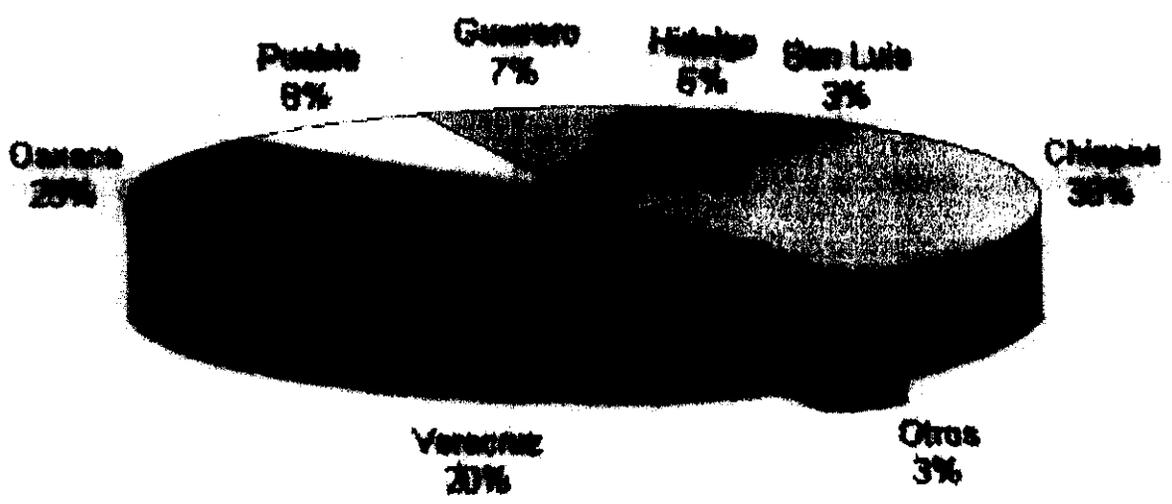


Figura 2.6 Principales superficies cafetaleras de México (SAGAR, 1999)

México produce café de excelente calidad, ya que en su topografía, altura, climas y suelos, le permiten cultivar y producir variedades clasificadas como las mejores del mundo. Ejemplo de esto son las variedades Coatepec, Pluma Hidalgo, Jaltenango, Marago y Natural de Atoyac, sólo por citar algunos. A este respecto, México es el primer productor mundial de café orgánico, y uno de los primeros en cafés "Gourmets".

La producción total de la cosecha 1996-1997 fue de 6,652,173 quintales, que equivalen a 5,100,000 sacos de 60 kilos, en lo que se refiere a la exportación, éstas ascendieron en el ciclo 1996-1997 a 4,384,363 sacos de 60 kilos y se exportó a 58 países del mundo. Para la cosecha 97-98 las cifras finales al mes de septiembre registran una producción de 4,800,900 sacos de 60 Kilos y se han exportado 3,881,902 sacos de 60 kilos a 52 países (Consejo Mexicano del Café, SAGAR, 1999).

2.1.3 Industrialización del café

En México la recolección de la cosecha se hace a mano y en forma selectiva, es decir recogiendo de las ramas una a una las cerezas maduras. La cereza está lista para cosecharse cuando tiene una coloración rojo brillante. La maduración no se realiza uniformemente por eso es necesario hacer varias recolecciones (de 3 a 4) durante la época de cosecha, a fin de cortar sólo los granos en plena madurez; el exceso de frutos verdes o amarillos hace deficiente el beneficiado, lo que trae como consecuencia pérdidas en el rendimiento y baja calidad del grano (Castillo y col., 1996; Regalado, 1996).

En ciertos países de Africa y en Brasil, las cerezas de café son cosechadas rama por rama ("strip picking"). El porcentaje de inmaduras es por lo tanto elevado, y se perjudica la calidad de la bebida (Wilboux, 1956; Bressani, 1978a; Sivetz y Desrosier, 1979; Coste, 1989). Los frutos maduros de los cafetales son tratados en el lugar de producción. Ciertas operaciones se llevan a cabo con el objeto de sacar los granos de sus envolturas

(pulpa, mucílago, pergamino, película), de secarlos para conservarlos así como de mejorar su presentación. Los métodos o sistemas para el beneficio de café son dos: el beneficio húmedo y el beneficio seco. El beneficio húmedo es para el café arábica "suaves finos" de América Central, de Colombia y de Kenia. Este método confiere a los granos un aspecto agradable que valoriza los lotes y mejora la calidad a la taza. El café tratado por el proceso húmedo es llamado "lavado". El café tratado por el beneficio seco, calificado de "natural" está constituido por 80 % de café arábica de Brasil y casi todo el café robusta.

2.1.3.1 Proceso húmedo

El beneficio del café comprende el proceso industrial que transforma en producto comercial de la cereza o café "capulín" o "bola". El tratamiento por vía húmeda consiste en transformar la cereza en café pergamino con 12 % de humedad, la cual se efectúa en el centro de despulpado. Las cerezas recolectadas son llevadas al centro de tratamiento, en donde se llevan a cabo las siguientes operaciones tecnológicas:

Recepción de cereza: La entrega de la cereza al beneficio se hace, por lo general, en las últimas horas de la tarde; de ahí que convenga tener un lugar apropiado para recibir la recolección de la cosecha diaria de manera que pueda conservarse sin fermentar hasta el momento de ser despulpada. Las cerezas son vertidas en las tolvas de recibo a las que se conoce con el nombre de sifones. Las cerezas flotantes, que representan aproximadamente el 15 % del lote, se recuperan y son tratadas separadamente por vía seca. Las cerezas más pesadas, pasan por el sifón, son transferidas a un gusano despulpador en una corriente de agua.

Despulpe: esta operación se lleva a cabo con el fin de remover el epicarpio y la mayor parte de la sustancia azucarada de los granos de café comúnmente llamada pulpa. Las cerezas frescas y limpias (separadas de residuos vegetales y de material extraño colectado en el

momento de la cosecha), se pasan al despulpador que puede ser de discos o cilindros, provisto de asperezas, que despedazan la pulpa y separan los granos. Una corriente de agua facilita la evacuación de la pulpa. Se estima en 40 m³/t de café comercial, la cantidad de agua necesaria para la recepción, el transporte hidráulico de las cerezas al despulpador, el despulpado, la evacuación de la pulpa, la selección y el repaso de las cerezas no despulpadas (Bressani, 1978a). Aunque en la actualidad los nuevos equipos necesitan cantidades de agua entre 0.2 a 0.8 m³/t (SAGAR, 1999). Las aguas procedentes de este tratamiento arrastran cerca de 30 % de la materia orgánica de la pulpa y su carga contaminante corresponde a una demanda química en oxígeno comprendida entre 9 y 15 g/l.

Remoción del mucílago: Para separar el mucílago que se encuentra adherido al pergamino del café, se utilizan procedimientos que tienen como base acciones bioquímicas o de fermentación, acciones químicas, acciones mecánicas y acciones químico-mecánicas.

Fermentación: Es el procedimiento natural de solubilidad o de digestión de dicha sustancia y es el más empleado desde que se inicia el beneficiado. El tiempo en este proceso es muy variable y depende de varios factores como la temperatura ambiente, la ubicación, profundidad e higiene de las pilas o tanques, el estado de madurez de la cereza, la calidad del agua que se utiliza en su despulpe, el tiempo transcurrido entre el corte y la operación de despulpe entre otros.

Para algunas regiones cafetaleras de México puede tomarse como promedio el siguiente horario para la fermentación: a) Rápida o excelente con un tiempo de 18 a 20 horas; b) Normal de 20 a 24 horas; c) Lenta o muy lenta de 24 a 48 horas; d) Anormal y perjudicial con un tiempo mayor de 48 horas. Para este efecto son usadas distintas acciones para llevar a cabo esta fermentación como son: la acción bioquímica, que consiste en hidrolizar la pectina, acelerando la fermentación a través del uso de enzimas pectinolíticas, endógenas del fruto y de la microflora, en ácido pectínico, que conduce a la eliminación de las propiedades

gelificantes de la pectina. La acción química comprende el uso de productos químicos que debidamente dosificados se aplican en las pilas de fermentación. La acción mecánica, por máquinas demucilagadoras que necesitan de grandes cantidades de agua y energía. La acción química-mecánica, consiste en la remoción del mucílago usando la asociación de un agitador mecánico y compuesto químico o base de ácidos débiles y agua.

La vía de la acción bioquímica es el método más ampliamente utilizado. Esta operación se conduce generalmente en una cuba de cemento donde el café es traído por transporte hidráulico ó mecánico. La duración del tratamiento varía según las condiciones locales. La hidrólisis del mucílago es provocada por las pectinasas presentes en el fruto, y acelerada por la presencia de microorganismos. En el transcurso de la fermentación, el pH disminuye de 6.5-6.8 a 4.5-4.8. La extracción de los compuestos fenólicos, en particular de diterpenos, permite una disminución de la dureza y de la amargura. La fermentación aporta al producto final más acidez, esto es, hasta cierto umbral, un criterio de calidad.

Lavado del café: Para el lavado se necesita llenar dos requisitos: primero que se cuente con el agua necesaria, aproximadamente 400 l por quintal (60 Kg) y segundo que el agua sea limpia para no dar al café ningún olor extraño y desagradable, que redundaría en su perjuicio. En esta parte se eliminan los productos formados en el transcurso de la fermentación, los restos de mucílago, una parte de compuestos fenólicos, etc. El café es impulsado y mezclado a contracorriente en los lavadores, o tratado en grandes centrifugas. Las aguas residuales de este lavado representan los volúmenes más importantes y contienen una demanda química de oxígeno de 5 a 6 g/l.

El secado del café: Esta práctica consiste en quitarle aproximadamente del 43 al 48 % de agua con relación al peso total del café lavado y recién escurrido. El secado se puede hacer de manera natural por exposición al sol en patio, o con sombra en patio cubierto, o artificialmente empleando aire caliente en máquinas secadoras horizontales o verticales. El

método más generalizado para secar café es el patio, conocido también como asoleadero o planilla. La práctica consiste en exponer el café a los rayos directos del sol por capas delgadas de 5 cm. A medida que progresa el secado se remueven dichas capas con rastrillo de madera, se cubren durante la noche y en periodo de lluvia (Coste, 1989). El encargado de vigilar el secado, debe conocer cuando el café pergamino se encuentra en los dos estados principales de secado, que son el punto de bodega y el punto de trilla, que corresponden respectivamente, al 14 y 12 % en contenido de humedad que aún conserva el grano. Las técnicas de secado solar o artificial son igualmente utilizadas en el tratamiento por vía seca. Sin embargo, en el caso de secado artificial, es indispensable secar el café pergamino en las condiciones bastantes siguientes: la temperatura del aire secante debe ser cercana a 60°C y la velocidad del aire inferior a 1 m/s. Así se limita la formación de productos indeseables (Gaime-Perraud, 1995).

2.1.3.2 Proceso seco

Se utiliza en la obtención de cafés no lavados como café “capulín” o “bola” y la parte complementaria de los cafés lavados en su fase de pergamino a café oro o verde. Tiene la finalidad de preparar el grano de café para su tostado y consumo. El procedimiento de beneficio seco pasa por las fases de: maduración del café pergamino, limpieza del pergamino, morteoado o trillado, clasificación del grano, catadoras, desmanche, pesado y envasado.

La maduración del café pergamino consiste en amontonar o almacenarlo en silos o tolvas hasta una humedad entre 11 y 13 %. Después se pasa a la limpieza, que tiene la finalidad de eliminar impurezas como clavos, basura, piedras, tuercas, pedazos de metal, trozos de ramas, hojas, etc. El morteoado o trillado del grano se refiere a quitar el pergamino o endocarpio. La clasificación se hace por forma y tamaño, en donde se toma como base el grosor, ancho y largo según se trate del tipo de café. Las catadoras eliminan granos defectuosos, limpian el café y complementan el trabajo de las clasificadoras. El desmanche

2.1.4 Residuos del tratamiento del café

Los subproductos o desperdicios del café están considerados como un gran problema dentro del sector cafetalero, por el gran volumen de materia dispuesta y por la dificultad de su manejo para controlar la contaminación que causa en el medio ambiente (Calle, 1977; Bressani, 1978b; Braham y Bressani, 1978; Claude, 1979; Adams y Dougan, 1981; Rolz y col., 1982; Vernet, 1987; Zuluaga, 1989). La vía húmeda produce grandes volúmenes de desechos, donde los más importantes son: la pulpa, 39 % de peso fresco de la cereza y el mucílago, 22 % (Zuluaga, 1981). Estos subproductos pueden ser transformados y aprovechados como productos agrícolas, pecuarios e industriales.

2.2 Pulpa de café

Entre el epicarpio o cáscara y los granos, se encuentra la pulpa de café que es la parte carnosa llamada también mesocarpio, está formada por una capa de células esponjosas y tiene un espesor aproximado de 5 mm (Zuluaga, 1989). La pulpa proviene de la primera operación mecánica del beneficio, que consiste en despojar la pulpa de la parte restante del fruto, mediante máquinas desgarradoras conocidas como despulpadoras, siendo el primer producto que resulta del procesamiento del café con una humedad de 80 a 85 % (Bressani y col., 1972), la cual en época de cosecha es frecuentemente arrojada en los ríos localizados cerca del lugar de procesamiento, constituyendo residuos que contaminan el medio ambiente (Zuluaga, 1981; Gaimé-Perraud, 1995). La pulpa de café representa aproximadamente un 40% del peso en base fresca de la cereza del café (Tauk, 1986) y un 26% en base seca.

2.2.1 Composición química de la pulpa de café

La composición química de la pulpa de café ha sido estudiada por Zuluaga (1981). Es importante resaltar que en la pulpa de café se encuentran sustancias químicas de interés en la alimentación animal (azúcares libres, proteínas, hemicelulosa, celulosa, minerales); dichas sustancias están ligadas a varios factores antifisiológicos (potasio, cafeína) y antinutricionales (taninos y fenoles) que limitan el uso de la pulpa de café en la alimentación monogástrica (puercos y pollos) y de rumiantes (ganado). Entre estas, las características de su fracción lignocelulósica son importantes, (Braham y Bressani, 1979; Adams y Dougan, 1981; Rolz y col., 1988).

La composición química de pulpa de café en forma fresca y deshidratada está representada en la Tabla 2.2, donde es notable el gran porcentaje de humedad de la pulpa fresca, seguida por la materia seca y los hidratos de carbono, así como el contenido de fibra cruda, proteína, cenizas y extracto etéreo, los valores de la composición de la pulpa también difieren de acuerdo a la variedad. En la pulpa deshidratada es apreciable la diferencia en las determinaciones debido a la deshidratación, probablemente provocada por el aumento en la cantidad de materia seca.

Tabla 2.2 Composición química de pulpa de café fresca y deshidratada (Elías, 1978)

Determinación	Pulpa fresca %	Pulpa deshidratada %
Humedad	76.7	12.6
Materia seca	23.3	87.4
Extracto etéreo	0.48	2.5
Fibra cruda	3.4	21.0
Proteína cruda (N x 6.25)	2.1	11.2
Cenizas	1.5	8.3
Hidratos de carbono	15.8	44.4

Otros compuestos presentes en pulpa de café, como son: taninos, cafeína, ácido clorogénico, sustancias pécticas y ácido cafeico, se muestran en la Tabla 2.3, donde se observa que las

concentraciones a las que se encuentran los compuestos antes mencionados no son despreciables y son responsables de la toxicidad de la pulpa de café (Bressani, 1978c).

Tabla 2.3 Composición química de pulpa de café *C. arábica* variedad Mundo Novo (Braham y Bressani, 1979) y variedad Bourbon (Zuluaga y Tabacchi, 1980).

Determinación	Mundo Novo (% PMS)	Bourbon (% PMS)
Humedad	12.6	6.9
Extracto etéreo	2.9	2.7
Fibra bruta	24.0	16.2
Proteínas brutas	12.8	8.9
Cenizas	9.5	8.7
Extracto libre de nitrógeno	50.8	63.5
Taninos	8.6	3.7
Sustancias pécticas totales	6.5	-
Azúcares reductores	12.4	-
Azúcares no reductores	2.0	-
Cafeína	1.3	0.75
Acidos clorogénicos	2.6	-
Acido caféico total	1.6	-

Zuluaga (1981) determinó los azúcares de pulpa de café secada al sol y por liofilización, usando cromatografía líquida. Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla 2.4, donde se muestra que el 22.65 % corresponde a los azúcares libres. La diferencia de un 4 % más de azúcares en la pulpa secada al sol y la pulpa liofilizada, se puede explicar por el efecto de la hidrólisis de glucosidos y polisacáridos durante el secado al sol. El 50 % de azúcares libres corresponde a la D-fructosa, la cual aumenta cuando es secada al sol, el 30 % del total de pulpa liofilizada, lo constituye la D-glucosa que es el segundo azúcar más importante. El 20 % restante son sacarosa y galactosa, en donde la concentración de la sacarosa disminuye a la mitad por el secado al sol. El inositol es prácticamente despreciable.

Tabla 2.4 Contenido de azúcares presentes en pulpa de café (Zuluaga, 1981).

Azúcares	Pulpa liofilizada		Pulpa secada al sol	
	mg/100mg	% total	mg/100mg	% total
$\alpha + \beta$ -D-Fructosa	9.92	43.8	15.20	57.1
D-Galactosa	2.40	10.6	1.58	7.0
α -D-Glucosa	3.42	15.1	4.52	17.0
β -D-Glucosa	3.42	15.1	3.11	11.7
Inositol	0.28	1.2	0.10	0.4
Sacarosa	3.21	14.2	1.83	6.8
TOTAL	22.65	100	26.64	100

En la Tabla 2.5 está representado el porcentaje en materia seca de las cenizas y minerales que se encuentran en pulpa de café, en donde se aprecia notablemente que el elemento que presenta una concentración elevada es el potasio, al cual se considera como un factor antinutricional en alimentación animal (Jarquin y col., 1973; Campabadal, 1987).

Tabla 2.5 Contenido de cenizas y minerales en pulpa de café (Blanes, 1982)

Determinación		Contenido
Cenizas	%MS	9.0
P	%MS	0.21
K	%MS	3.07
Ca	%MS	0.39
Mg	%MS	0.11
Na	%MS	0.04
Fe	ppm	135
Zn	ppm	34
Cu	ppm	74
Mn	ppm	160
B	ppm	27

Delgado-Vidal (1999) también estudio la composición química de pulpa de café sometida a diferentes procesos: fresca, secada al sol, secada al vacío, ensilada y ensilada y fermentada (Tabla 2.6). Se aprecia que los resultados obtenidos para las pulpas frescas y ensilada son muy similares con excepción de los azúcares totales se ven disminuídos en la pulpa ensilada por el efecto de las bacterias lácticas. Así mismo se observan resultados similares para las

pulpas secadas al sol y al vacío, en donde las diferencias son insignificantes en casi todas las determinaciones. Mientras que la pulpa ensilada y fermentada fue la que presenta grandes diferencias con respecto a las otras. Se observa que el contenido de materia seca se ve disminuído, así como también los azúcares totales, probablemente debido al consumo de las bacterias lácticas, pero en comparación con la pulpa ensilada estos se encuentran en mayor proporción. Es interesante que en este sustrato se encontró un 19.6 % de proteína y una degradación de la cafeína por el efecto causado en la fermentación por el hongo *Penicillium commune*.

Tabla 2.6 Composición química de pulpa de café sometida a diferentes procesos (Delgado-Vidal, 1999).

Determinación	Pulpa fresca % MS	Pulpa seca al sol % MS	Pulp. seca al vacío % MS	Pulpa ens. % MS	Pulpa ens. y ferm. % MS
Humedad	81.4	12.9	12.3	83.1	87.2
Materia seca	18.6	87.1	87.7	16.9	12.8
Cenizas	8.3	6.7	7.4	7.9	10.4
Azúcares totales	38.4	33.2	33.5	9.3	13.6
Proteína N*6.25	12.7	15.1	13.2	18.4	19.6
Cenizas	0.68	0.65	0.62	0.68	0.06

2.2.2 Factores antifisiológicos y antinutricionales presentes en la pulpa de café

La pulpa de café presenta ciertas desventajas para usarla en alimentación animal, tales como la presencia de factores antifisiológicos y antinutricionales, a los que se les ha responsabilizado de causar un efecto adverso en los animales que la consumen. Entre estos compuestos se encuentran: la cafeína (0.6 a 0.13 % MS) los fenoles libres (ácido clorogénico: 0.18 a 3.16 % MS; el ácido caféico: 0.28 a 2.58 % MS; el ácido tánico: 2.30 a 5.5 % MS) y otros compuestos fenólicos. Ello da como resultado un bajo consumo de alimento y baja ganancia de peso a medida que se incrementa el porcentaje de pulpa en la ración. (Bressani, 1978c; Gómez-Brenes y col., 1985).

2.2.2.1 Cafeína

1,3,7-trimetilxantina, mejor conocida como cafeína, es una purina que se encuentra en el té (1 a 4 % en hojas), café (0.6 a 2,7 % MS en granos y hojas) y el cacao, entre otras 50 especies vegetales (Coste, 1989). La cafeína es una sustancia cristalina, sin aroma, con sabor ligeramente amargo. Cuando es obtenida por cristalización de una solución acuosa, la cafeína es obtenida como un hidrato, del cual recientemente se pensaba que contenía una molécula de agua a cada molécula de cafeína. Es la única xantina alcaloide presente en el café (Clarke y Macrae, 1985), la fórmula química es: $C_8H_{10}N_4O_2$ y su peso molecular es de 194.2 g/mol (Windholz y col., 1983).

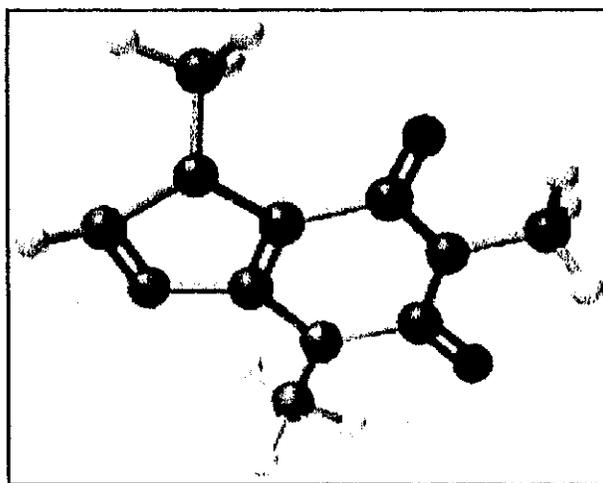


Figura 2.7 Estructura química de la cafeína (1,3,7-trimetilxantina). Los átomos de color rojo representan al oxígeno, los blancos al hidrógeno, los azules al nitrógeno y los grises al carbono.

La concentración de cafeína en la pulpa de café varía de 0.6 a 1.3 % en materia seca (Bressani y col., 1972). Los efectos de la cafeína en la nutrición animal han sido estudiados por numerosos autores (Braham y col., 1973; Jarquin y col., 1973; Vargas, 1974; Cabezas y col., 1974; Flores Recinos, 1976). El consumo de grandes cantidades de pulpa de café por

rumiantes provoca disfunciones fisiológicas tales como: timpanismo, inflamación de las extremidades, caída de pelo, problemas de piel, así como un aumento en la secreción urinaria.

2.2.2.2 Compuestos fenólicos

Los polifenoles, son constituyentes naturales de muchas plantas, los cuales en presencia de oxígeno, son oxidados a quinonas. Esto puede ocurrir en un medio alcalino, o a través de la acción de polifenoloxidasas a pH cercano a la neutralidad. Estas quinonas pueden polimerizar en pigmentos color café de gran tamaño o pueden reaccionar con residuos de ciertos aminoácidos. En el último caso puede haber condensación entre quinonas, residuos de lisina y cisteína, y/o pueden ocurrir reacciones de oxidación con residuos de metionina o posiblemente con residuos de cisteína y triptófano (Fenema, 1985). La digestión de los rumiantes puede estar limitada debido a la asociación de compuestos aromáticos, como los compuestos fenólicos, con las paredes celulares (Hartley, 1972). Muchos estudios se han investigado para conocer el potencial inhibitorio de los compuestos fenólicos en la digestión de fibras de los forrajes. Jung (1988) reportó que los compuestos fenólicos liberados durante la fermentación de ensilajes de alfalfa (*Medicago sativa L.*), heno, hierba suave (*Bromus inermis*) y maíz (*Zea mays*), inhibe la fermentación de azúcares estructurales. Theodorou y col., (1987) observaron inhibición de la desaparición de materia seca con extractos fenólicos de células de tallo de maíz. Los compuestos fenólicos extraídos de sorgo (*Sorghum bicolor L. Moench*) y alfalfa también inhibieron la digestión de la fibra *in vitro* (Cherney y col., 1993).

2.2.3 Aprovechamiento de la pulpa de café por vía biotecnológica

Casi toda la pulpa producida en el proceso del beneficiado del café por vía húmeda, es comúnmente desechada en las calles, terrenos de cultivo y ríos localizados cerca de los sitios de procesamiento del café, y es considerada el material contaminante más abundante de

aguas, suelos y aire (Zuluaga y col., 1975; Elias, 1978), para evitar esto se han hecho grandes esfuerzos en investigación sobre la utilización de la pulpa de café dirigidos principalmente en nutrición animal. Esto se debe a que dicho material posee ciertas características nutricionales deseables, tales como su contenido de carbohidratos, proteínas, patrón de aminoácidos, fibra cruda y digestibilidad, propiedades que la hacen potencialmente aceptable en nutrición animal. Se han propuesto diversos usos para la pulpa de café entre otros para: abono orgánico (Gómez, 1978a, 1978b; Arcila, 1979; Peñaloza, 1981; Tauk, 1986), biogas (Calle, 1957; Hutchinson, 1958; Calle, 1974a; Morales y Chacón, 1981; Blanes, 1982), cultivo de hongos comestibles (Guzmán y Martínez-Carrera, 1985; Rolz y col., 1988b; Martínez-Carrera, 1989; Martínez-Carrera y col., 1999), cultivo de lombrices (Dávila y Arango, 1991; Salazar y Mestre, 1991; Aranda y Barois, 1999). También se han propuesto diversas alternativas como posibilidades de uso en la producción de microorganismos (Calle, 1977; Peñaloza, 1981), producción de enzimas (Roussos, 1985; Favela y col., 1989; Boccas y col., 1994) y para alimentación animal (Bressani y col., 1973; García y Baynes, 1974; Cabezas y col., 1976; Jarquin y Bressani, 1977; Cabezas y col., 1978; Gómez-Brenes, 1978; Christensen, 1981).

2.2.4 Alternativas para la conservación de pulpa de café

En muchas áreas productivas de los trópicos, la producción estacional de pulpa de café es uno de los mayores desperdicios agroindustriales producidos durante las operaciones de pulpeo de la cereza de café para obtener los granos (Zuluaga, 1981). La pulpa tiene una alta humedad y una importante presencia de microflora endógena lo que implica problemas para evitar su descomposición y por lo tanto la contaminación ambiental (Gaim-Perraud y col., 1993; Roussos y col., 1993a). Ya que es un subproducto fácilmente putrescible, la pulpa necesita un tratamiento rápido (Bressani, 1978) por los grandes volúmenes a tratar por día (Zuluaga, 1989). Hasta el momento se carece de procesos mecánicos para deshidratar eficientemente las grandes cantidades de pulpa que se producen

en los beneficios, por otra parte, no es posible durante esa época utilizar los patios de secado de café para deshidratar la pulpa por acción de la radiación solar, ya que al beneficiador le interesa mucho más secar el grano de café (Murillo, 1978). Con el fin de poder utilizar todo el año pulpa de café de buena calidad y en cantidades comercialmente interesantes, es necesario emplear métodos que se apliquen independientemente del tratamiento del grano de café, manteniendo y mejorando la calidad nutricional de la pulpa para alimentación animal sin aumentar excesivamente el costo del producto final. Los procesos de secado artificial en tambores horizontales o verticales, así como la liofilización, serían 2 alternativas posibles, pero económicamente no viables por el alto costo que implicaría el poder tratar toneladas de pulpa de café fresca, independiente del costo del transporte y mano de obra. Para esto se necesita un proceso comercial simple y económicamente rentable, y la técnica de conservación que ofrece las mejores perspectivas, de acuerdo a las exigencias descritas con anterioridad, es el ensilaje. Esta técnica es simple, ya que puede ser aplicada con relativa facilidad por los industriales del café y los ganaderos. Este procedimiento permite almacenar la pulpa durante el periodo de tratamiento del café (Gaime-Perraud, 1995).

2.3 El ensilaje

El ensilaje es un método de preservación de forrajes húmedos (Weinberg y col., 1993), el cual es ampliamente usado en todo el mundo, anualmente se almacenan más de 200 millones de toneladas de materia seca en el oeste de Europa y los Estados Unidos (Murillo, 1978; Wilkinson, 1988; USDA, 1991). El método se basa en una fermentación natural producida por bacterias en ausencia de aire, que actúan sobre los carbohidratos solubles que contienen las células vegetales. Durante el proceso de fermentación se producen ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico. Como resultado, hay un decremento en el pH, inhibición de los anaerobios que descomponen el forraje y así este es preservado con pérdidas mínimas (Weinberg y Muck, 1996; Rutherford y col., 1998).

2.3.1 Proceso de ensilaje y los factores que en él intervienen

Un ensilaje de alta calidad requiere de un manejo sensato y de prácticas implementadas antes, durante y después del periodo de ensilaje. La atención a los detalles tales como velocidad del cosechamiento, contenido de humedad, trituración, distribución y compactación, tienen una gran influencia en el proceso de fermentación y las pérdidas durante el almacenamiento. Una eficiente fermentación generalmente asegura un material más digerible y una buena palatabilidad. Esto promueve un máximo consumo de materia seca por el ganado que usualmente resulta en un mejoramiento en la ganancia en peso y/o en la producción de leche (Mahanna, 1996).

En un ensilaje ideal todos los nutrientes presentes en la cosecha son preservados, pero en la práctica esto no es posible y algunas pérdidas son inevitables. La composición química del material afecta el éxito de la fermentación, por lo que el contenido de los carbohidratos solubles y de materia seca son particularmente importantes, así como la anaerobiosis y la predominancia de las bacterias lácticas homofermentativas, son factores esenciales para un ensilaje exitoso (Whittenbury, 1961; McCullough, 1977; Pitt y col., 1985; Bertin, 1986; Brookes y Buckle, 1992).

El ensilaje comprende muchos procesos bioquímicos y microbiológicos desde el momento de la cosecha hasta eventualmente alimentar al ganado. Una visión superficial de la fermentación principia con la respiración aerobia inmediatamente después de la cosecha del cultivo. Durante esta fase, los carbohidratos solubles son convertidos a CO₂, calor y humedad por las células vegetales y por los microorganismos aeróbicos. Este proceso puede continuar hasta que el oxígeno se agota o los carbohidratos solubles de las células vegetales se consumen. Bajo condiciones ideales de humedad, troceado y compactación, la fase respiratoria puede durar solo unas pocas horas (Woolford, 1984).

La anaerobiosis es un factor muy importante en la evolución y éxito del ensilaje, ya que si esta condición no es alcanzada rápidamente, ocurre una oxidación de los azúcares por lo que estos no estarían disponibles para una fermentación láctica (Ruxton y McDonald, 1974). Una vez que las condiciones de anaerobiosis se han establecido, las bacterias anaeróbicas proliferan en la masa ensilada. Dentro de estos microorganismos se encuentran las bacterias productoras de ácido láctico (lo cual se detalla en la sección 2.4.3 de este capítulo) y solo se esperaría que en las capas superficiales del ensilado se encontrasen hongos y levaduras debido a que estos se desarrollan mejor en presencia de oxígeno (Watson y Smith, 1984). Estas bacterias fermentan los carbohidratos a productos finales como ácido láctico, ácido acético, etanol y CO₂. La producción de ácido causa un descenso en el pH alrededor de 4 (Tomes y Cummings, 1991; Mahanna, 1996; Rutherford y col., 1998), lo que hace que se preserve la cosecha. El descenso del pH empieza cuando hay aproximadamente 100 millones (10⁸) de bacterias lácticas por gramo de forraje. Muchos nutrientes son conservados en el ensilaje cuando la fermentación es rápidamente completada. El ácido láctico es el más fuerte y efectivo ácido orgánico del ensilaje por la rápida reducción de pH debido a su valor de pK (3.85). Por lo tanto, un ensilaje de calidad generalmente tiene láctico como el ácido dominante, a niveles arriba de 6-8 % de la materia seca del ensilaje. La velocidad y el nivel del pH final en el forraje ensilado, depende en gran parte del tipo y humedad del forraje que ha sido ensilado, así como del contenido en azúcares. Una concentración de azúcares de 12 a 13 % MS es necesario para obtener un ensilaje de buena calidad (Demarquilly, 1985; Gouet 1994). La aptitud del vegetal a ensilar, está ligada por consecuencia, a su contenido en azúcares fermentables, ya que influyen directamente en la fermentación (Pettersson y Lindgren, 1990) y se transforman en ácido láctico que permite alcanzar valores de pH de 4 (Bertin y col., 1994). Las legumbres con un bajo contenido en carbohidratos solubles (4-6 %) y una alta capacidad amortiguadora, generalmente pueden llegar a un pH terminal cercano a 4.5. Los ensilajes de maíz con alto contenido de carbohidratos solubles (6-8 %) y baja capacidad amortiguadora, pueden terminar en valores de pH cercanos a 4.0. Los ensilajes húmedos fermentan más que los ensilajes de forrajes marchitos, ya que se requiere

de altos niveles de carbohidratos solubles y un bajo pH para la estabilidad. El pH del forraje únicamente no es un buen indicador de la velocidad ni de la calidad de la fermentación que está ocurriendo (Mahanna, 1996).

Cuando se ha alcanzado un pH final de alrededor de 4, para inhibir completamente la fermentación de clostridios (Muck, 1988), el forraje se encuentra en un "estado preservado". No son promovidos procesos destructivos, ya que el oxígeno está ausente de la masa ensilada y los microorganismos endógenos que causan descomposición (levaduras) no elevan el pH porque metabolizan los ácidos de la fermentación. En este punto, el ensilaje puede permanecer relativamente estable durante todo el periodo de almacenamiento (McDonald y col., 1991; Mahanna, 1996).

El ensilaje siempre está en un estado dinámico dependiendo de: la extensión de las condiciones anaerobias (por ejemplo la extensión de la penetración del aire); del nivel residual del sustrato fermentable; de la cantidad y tipo de microorganismos (aerobios, levaduras y hongos) presentes en el forraje a ensilar; del nivel y tipos de ácidos de fermentación presentes en el ensilaje y de la apariencia del ensilaje durante el manejo de la descarga vertical de los silos subterráneos.

Una fase de post-fermentación, es la fase de salida, cuando el ensilaje es sacado de la estructura de almacenamiento. La microflora del ensilaje o los contaminantes aerobios, entre los más comunes que causan descomposición se encuentran las Enterobacterias y también los Clostridios, comienzan a oxidar los ácidos presentes (Bruyneel y Verstraete, 1986; Brookes y Buckle, 1992). Esta oxidación causa una pérdida en la materia seca del pienso de hasta cerca del 50 % y esto a su vez causa pérdidas en la alimentación. En resumen, el pH resultante y la temperatura se incrementan, resultando en un alimento insatisfactorio en términos de valor nutricional, palatabilidad, o ambos, lo que es un inconveniente para los animales ya que rechazan el alimento antes de empezar a comerlo. La materia seca se

considera como uno de los elementos determinantes del ensilaje (McDonald y col., 1991). Un contenido de 30 a 40 % de materia seca del forraje a ensilar es considerado como excelente, ya que los ensilados ricos en materia seca son nutricionalmente más interesantes (Nicholson y col., 1991 y 1992), dando lugar a que el apetito de los animales se vea estimulado (Gouet, 1994).

La incidencia de la inestabilidad aeróbica observada, depende en la práctica, de la velocidad con la cual es removido el material del silo y la extensión del tiempo que haya estado ensilado antes de abrirlo. Si el ensilaje es descargado lentamente, entonces más tiempo está expuesta la superficie del ensilaje abierto para que ocurra la deterioración del mismo. Tiempos más largos de ensilaje generalmente producen ensilados más estables por las altas concentraciones de ácidos y así toda la población microbiana tiende a decrecer. Así el ensilaje debe ser estable al menos 5 días después de abierto, tiempo adecuado para permitir que el ensilado sea removido (Tomes y Cummings, 1991; Rutherford y col., 1998).

2.3.2 Utilización de aditivos

Con el propósito de mejorar los procesos de ensilaje se han desarrollado muchos aditivos químicos y biológicos para promover adecuados modelos de fermentación (McCullough, 1984; Soderlund, 1988; Harrison, 1989; Pitt, 1990; Rust y Mader, 1991; Muck y Bolsen, 1991), ya que este proceso ofrece grandes perspectivas de poder ser aplicado exitosamente.

Existe un amplio rango de ácidos que pueden ser usados para reducir rápidamente el pH, más su efectividad no se basa en la reducción de esta variable, pero sí en la inhibición selectiva de ciertos microorganismos indeseables. Los ácidos fórmico y sulfúrico son usados con frecuencia; los ácidos acético y propiónico son menos populares y más caros. Una mezcla de ácido fórmico más formaldehído también es efectivo y particularmente populares

en Europa (Brown y Valentine, 1972; Thomas, 1988; Muck y Bolsen, 1991). Sin embargo, el uso de ácidos es limitante por lo peligroso del manejo y porque son corrosivos, lo cual puede acortar la vida del equipo para ensilar.

En el presente son preferidos los aditivos biológicos a los químicos, porque la forma de uso es conveniente, no son tóxicos, no son corrosivos de la maquinaria agrícola, no presentan riesgos ambientales y son considerados como productos naturales, (Weinberg y col., 1993). Dentro de los aditivos enzimáticos, los más usados son las celulasas y hemicelulasas o una mezcla de las dos. Muchas son subproductos de actividad enzimática microbiana de *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*. Estos microorganismos producen varias enzimas que además de la celulasa incluyen amilasa, glucoamilasa y proteasa. En otros preparados de enzimas para ensilajes también se encuentran glucanohidrolasas, glucano maltohidrolasas, beta-glucanasas y beta-glucosidasa (Soderlund, 1988). Hay agregados que rompen las células vegetales y liberan los carbohidratos solubles y fomenta el incremento en las velocidades de la fermentación natural. Muchos trabajos se han llevado a cabo para mejorar la eficiencia y fiabilidad de estos productos, los cuales se usan comunmente combinados con carbohidratos e inoculantes (Brookes y Buckle, 1992).

Los productores de ensilajes están conscientes que es conveniente incrementar la probabilidad de producir un ensilaje apetitoso y de buen valor nutricional, razones por las que están considerando el uso de aditivos efectivos. Se han observado efectos positivos de los aditivos para ensilaje en la industria y en estudios de universidades que presentan las siguientes características: bajo pH, gran contenido de ácido láctico, contenidos menores de ácido acético y butírico, gran recuperación de materia seca, mejoramiento en la digestibilidad y ganancia de peso en animales, y mejoramiento en la estabilidad del material ensilado cuando éste es expuesto al aire (Harrison, 1989).

Existen muchos factores que necesitan ser considerados en la selección de un inoculante bacteriano. La cantidad de bacterias lácticas es de 10^5 células por gramo de vegetal fresco (Bertin y Hellings, 1985; Rauramaa y col., 1987). Muchos de los primeros productos comerciales agregaban solo 10^2 - 10^3 ufc/g (Henderson, 1988) lo cual era insuficiente para competir con la microflora natural. La selección de un microorganismo conveniente no solo requiere el entendimiento del rol de las bacterias lácticas sino también el conocimiento de las propiedades de supervivencia del microorganismo en una formulación en polvo. En las secciones 2.4.4 y 2.4.5 de este capítulo, se describe con más detalle los efectos de las bacterias lácticas en la fermentación, así como los efectos en la nutrición animal.

Los criterios de un microorganismo para usarse como aditivo para ensilaje han sido definidos en muchas ocasiones (McDonald, 1981; Seale, 1986; Henderson, 1988) y son descritos como sigue: deben mostrar rápido crecimiento y competencia exitosa con la microflora natural; deben ser capaces de homofermentar los azúcares y producir rápidamente ácido láctico; deben ser tolerantes a condiciones ácidas generadas durante el ensilaje (pH 4.0 aproximadamente); deberán fermentar un amplio rango de hexosas y pentosas; no debería producirse dextrano de sacarosa ya que representa una fuente de carbono indisponible para fermentación ácida; no deben producir manitol a partir de fructosa dado que este azúcar se transforma a un compuesto neutro y no ácido; no deben utilizar los ácidos orgánicos; las temperaturas del silo son muy variables especialmente durante el inicio del proceso de ensilaje, por lo tanto el microorganismo debe ser capaz de crecer y sobrevivir arriba de 50°C ; deben ser capaces de crecer bien en pastos marchitos que pueden tener un bajo contenido de humedad; debe ser posible prepararse en forma de polvo/granulados y el producto debe permanecer estable durante el almacenamiento.

2.3.3 Silos

El silo es el lugar donde se lleva a cabo el ensilaje, y es el que determina en gran medida la naturaleza y calidad del producto final. Esto es comprensible, puesto que la cantidad de aire que tiene libre acceso hasta el material durante el proceso de ensilaje, es el primer factor de importancia que gobierna los cambios que se realizan.

El silo-pozo o silo-trinchera fué el primer depósito usado para obtener ensilaje, actualmente es el más popular. El silo se va llenando y apisonando gradualmente en capas, para asegurar una adecuada compactación y exclusión del aire (Gonzalez, 1973). Como la mayor parte del material conservado se sedimentará en la fosa por debajo del nivel del suelo, la oportunidad de que penetre el aire por los lados se reduce al mínimo.

La diferencia entre el silo-pozo y el silo-trinchera consiste únicamente en el tamaño, siendo lo usual que el segundo sea más largo que ancho. Para simplificar su caracterización a ambos se les conoce con el nombre de silos-fosa. La fosa se excava en cualquier suelo sano y la profundidad sobrepasa casi siempre los 90 cm. Existen también otros silos entre los que se encuentran: los silos almiar, silo-depósito o cuba, pozo revestido, trincheras o silos sobre tierra, silos-torre, silos temporales y silos portátiles (Watson y Smith, 1984).

2.3.4 Conservación de residuos frutales y vegetales por ensilaje

Una gran variedad de subproductos del procesamiento industrial de frutas y vegetales son preservados por ensilaje con el propósito de usarlo para alimentación animal. La utilización de estos subproductos en la alimentación animal, va tomando día a día mayor importancia, tanto por su cuantía como por sus características nutritivas, al resultar aptos para su empleo en la dieta de rumiantes (Martínez y Medina, 1982). Los residuos de fibras que resultan de la extracción de azúcar de remolacha, de la caña de azúcar y de las papas crudas y cocidas,

son los mayores productos para este tipo de fermentación (Woolford, 1984; Celanie, 1982; Roussos, 1985; McDonald, 1991). La fermentación por ensilaje también se reporta para preservación de desperdicios vegetales como chicharos de punto negro, ejotes, cáscaras de naranja, plátanos (Le Dividish y col., 1976; Moon, 1981 a, b; Asbell y Lisker, 1987; Megías y col., 1992, 1993b), de yuca (Saucedo, 1987), de sorgo (Dickerson, 1986; Meeske y col., 1993), de alcachofa (Megías y col., 1993a) de subproductos de jardinería como el clavel (Cerón y col., 1996) y de pulpa de café (Murillo, 1978).

2.3.5 Ensilaje de pulpa de café

Los factores que hacen de la pulpa de café fresca un subproducto atractivo para conservarla por ensilaje, son por una parte su composición química y la posibilidad de usarla en alimentación animal (Gómez-Brenes y col., 1985).

El principal problema es su aparición al mercado en volúmenes muy abundantes durante períodos de tiempo muy cortos, exigiendo, por tanto, un proceso de conservación que permita su almacenamiento y la utilización durante períodos más extensos. Esto con el fin de evitar la contaminación ambiental generada por las grandes cantidades de este residuo, lo cual se ve afectado aún más por la elevada humedad y la producción estacional.

Los estudios sobre el ensilaje de pulpa de café han sido enfocados principalmente en la construcción de silos, los cambios químicos y los efectos nutricionales (Rubio y Pineda, 1973; Bohkenfor y Fonseca, 1974; Cabezas y col., 1976; Murillo y col., 1976; Calle, 1977; Carrizales y Ferrer, 1974; Buitrago, 1987; Porres y col., 1993) y más recientemente desde el punto de vista microbiológico y bioquímico por Gaime-Perraud (1995).

2.3.5.1 Cambios químicos y biológicos que ocurren en la pulpa de café durante el proceso de ensilaje

La conservación de una cosecha por medio del ensilaje comienza con el hacinamiento del producto en un depósito de cierta forma, pero es de importancia manifiesta que el procedimiento deberá ser de tal naturaleza que los cambios químicos y biológicos (producidos por: la respiración, las enzimas, los microorganismos, y la materia mineral, entre otros) puedan ser regulados (Watson y Smith, 1984).

Carrizales y Gonzalez (1984) estudiaron los cambios químicos en un ensilaje de 5 Kg de pulpa de café realizados en bolsas de plástico durante 99 días, los resultados se muestran en la Tabla 2.7.

Tabla 2.7 Cambios en la composición química de un ensilaje de pulpa de café sin aditivos (Carrizales y Gonzalez, 1984).

Determinación	Pulpa fresca (% MS)	Pulpa ensilada (% MS)
pH	4.30	3.60
Proteínas (N x 6.25)	11.57	13.55
Fibras	15.24	17.16
Lípidos	5.00	2.17
Cenizas	6.67	8.08
Carbohidratos	61.21	58.50
Cafeína	0.95	0.83

Se observa un incremento en las proteínas, las fibras y las cenizas en el transcurso del ensilaje. Este incremento en las proteínas es debido al crecimiento microbiano a partir de carbohidratos y nitrógeno mineral contenido en la pulpa.

2.3.5.2 Valor alimenticio del ensilaje de pulpa de café

En la pulpa de café se encuentran sustancias químicas de interés en la alimentación animal, tales como: azúcares libres, proteínas, hemicelulosa, celulosa, minerales (Braham y Bressani, 1979; Adams y Dougan, 1981; Rolz y col., 1988).

Cabezas y col. (1976) encontraron que el valor nutritivo de la pulpa de café ensilada induce mejor comportamiento en terneros, tanto en aumento de peso como en eficiencia alimenticia, que cuando son alimentados con pulpa de café deshidratada al sol. Estudios realizados en ratas por Bendaña (1977), demostraron que la pulpa ensilada es superior a la pulpa deshidratada, con base en mortalidad, aumento en peso, consumo de alimento y eficiencia alimenticia. Gómez-Brenes y colaboradores (1985) determinaron los efectos que la pulpa de café fresca o ensilada y deshidratada ejerce en los animales monogástricos, la pulpa ensilada acusó mejor valor nutritivo, menor toxicidad y mayor digestibilidad que la pulpa fresca, y un mejor comportamiento en los animales que consumieron pulpa ensilada que en los que recibieron pulpa fresca. La utilización de pulpa de café ensilada es aceptable en una proporción de 20 % de la ración de alimentos para rumiantes y puercos (Bressani y col., 1974; Cabezas y col., 1978; Jarquin, 1978).

2.4 Bacterias lácticas

Estas bacterias se caracterizan como Gram-positivas, comunmente no móviles, no esporuladas, catalasa negativa, que producen ácido láctico como un producto principal o único del metabolismo fermentativo. Los miembros de este grupo carecen de porfirinas y citocromos, no realizan fosforilación por transporte de electrones y de ahí que reciban su energía sólo por fosforilación a nivel de sustrato. Todas las bacterias ácido lácticas crecen de manera anaeróbica. Sin embargo, a diferencia de muchos, la mayor parte de ellas no son sensibles a O₂ y pueden crecer en su presencia o ausencia; por tanto, son anaerobios

Lactococcus, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus*. Las clasificaciones fundadas en esta propiedad derivan de los trabajos fundamentales de Orla-Jensen (1919). El Bergey's Manual se ha inspirado en ellos y ha aumentado el cuadro para hacer entrar las especies parásitas que Orla-Jensen no había estudiado; el conjunto constituye la familia de las *Lactobacteriaceae* (Axelsson, 1990).

En la clasificación de Prévot, que tiene mucho más en cuenta los caracteres morfológicos, esta familia se haya disociada. Las bacterias lácticas esféricas se encuentran en la familia de las Micrococaceae, y las bacterias lácticas en forma de bacilos, en la de las Bacteriaceae; se relacionan así con las bacterias que producen poco ácido láctico o que no fermentan los azúcares. La clasificación de las bacterias lácticas dentro de diferentes géneros está basada en gran parte en su morfología (cocos o bacilos, formación de tétradas), forma de fermentar la glucosa (homofermentativo o heterofermentativo), crecimiento a diferentes temperaturas (10°C y 45°C), configuración del ácido láctico producido (D, L, o ambos) habilidad para crecer en altas concentraciones de sal y tolerancia a ácidos o alkalis.

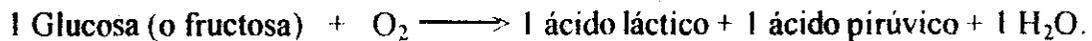
Una diferencia importante entre los subgrupos de las bacterias lácticas se basa en la naturaleza de los productos que se forman en la fermentación de los azúcares. Existen 2 tipos de fermentación láctica: homofermentativa y heterofermentativa, en la primera las bacterias lácticas degradan la glucosa por medio del ciclo de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), casi exclusivamente en el producto final, 1.8 moles de ácido láctico por mol de glucosa consumida, con trazas de otros productos finales. La mayor ruta de oxidación y fermentación de azúcares por bacterias ácido lácticas se presenta en la Tabla 2.8. Las fermentadoras heterolácticas, a las que en ocasiones se denomina fermentadoras del ácido láctico mixtas, pueden catabolizar la glucosa por medio de uno a tres ciclos de degradación (Embden-Meyerhof, derivación pentosa, o proceso de Entner-Doudoroff) para dar productos finales característicos: 1 mol ácido láctico, 1 mol de alcohol etílico, 1 mol de CO₂ y a veces glicerol, por mol de glucosa fermentada (Doelle, 1975; McCullough, 1977;

MacFaddin, 1993). La ruta heterofermentativa para fructosa produce 1 mol de cada ácido láctico y acético, 1 mol de CO₂ y 2 moles de manitol de 3 moles de fructosa. Una ruta heterofermentativa adicional por miembros del complejo *Lactobacillus brevis-buchneri* que involucra la fermentación de 2 moles de fructosa y 1 mol de glucosa a 1 mol de cada ácido (láctico y acético) y CO₂ y 2 moles de manitol. La ruta homofermentativa para fermentación de azúcar es más deseable en algunos procesos como el ensilaje, que la ruta heterofermentativa porque es más eficiente para producir ácido láctico. McDonald (1981) ha listado algunas de las especies de bacterias ácido lácticas. De los géneros de bacterias ácido lácticas, *Streptococcus* y *Pediococcus* son homofermentativos, *Leuconostoc* es heterofermentativo y *Lactobacillus*, dependiendo de las especies es homo o heterofermentativo.

Tabla 2.8 Principales productos de metabolismo de los azúcares por bacterias lácticas
(Alais, 1991).

A. Rutas aerobias

I. Homofermentativa



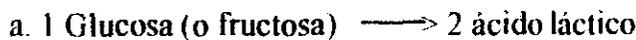
(El ácido pirúvico es más oxidativo que la -, ácido acético, ácido fórmico y CO₂).

II. Heterofermentativa

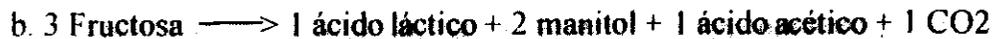


B. Rutas fermentativas anaerobias

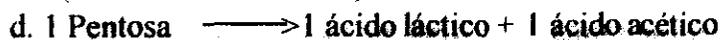
I. Homofermentativa



II. Heterofermentativa



(*Lactobacillus brevis*)



La importancia práctica de las bacterias pertenecientes a esta familia es considerable por varias razones: producción de ácido y descenso del pH (es la principal razón); protección de las sustancias alimenticias debida a la inhibición de las bacterias de la putrefacción en medio ácido; establecimiento de las condiciones físico-químicas favorables a diversas transformaciones; propiedades higiénicas resultantes de la acción antiséptica del ácido láctico en el intestino.

Otras actividades que pueden tener efectos útiles o perjudiciales: producción de enzimas que intervienen en la degradación de las proteínas; producción de sustancias inhibitoras responsables de la selección de especies; poder patógeno desarrollado por determinadas especies; valoración microbiológica de las vitaminas y aminoácidos, aprovechando las exigencias nutritivas de las bacterias lácticas.

2.4.1 Caracteres principales y métodos de estudio

A) Caracteres cito-morfológicos

Los dos grandes grupos de bacterias lácticas ("tribus", según el Bergey's Manual) se distinguen principalmente por la forma de la célula; la de los estreptococos es esférica y la de los lactobacilos es alargada. Pueden observarse algunos aspectos característicos de las cepas, sin embargo, el aspecto microscópico por sí solo no permite la identificación. Los lactobacilos tienen formas diversas, desde el cocobacilo (bastoncito muy corto, casi ovalado) hasta el filamento largo; la presencia eventual de granulaciones en el citoplasma, tras coloración por el azul de metileno, ayuda a la diferenciación de algunas especies. Existen dos causas principales de error: a) Modificación de la forma de las células como consecuencia de un cambio importante en las condiciones del medio; por ejemplo, pase de un medio sólido a un medio líquido. b) Efectos de coloración; algunas bacterias alargadas, especialmente de los *Corynebacterium* y de los bastoncitos encapsulados, pueden parecer estreptococos.

B) Caracteres fisiológicos

a) Los efectos de la influencia de la temperatura permiten obtener datos precisos para la clasificación. De interés especial es la posibilidad de cultivo a temperaturas relativamente bajas (10°-15°) o relativamente altas (45°).

b) La inhibición por el cloruro de sodio a concentraciones de hasta 6.5%, es un caracter importante, sobre todo para los estreptococos. El Teepol (a 10.4%) es otro agente de inhibición que se utiliza para la diferenciación de los lactobacilos. Las cepas pertenecientes a ciertas especies se desarrollan abundantemente en presencia de estos inhibidores, mientras que las otras no se multiplican.

c) Las exigencias nutricionales no son las mismas para todos los lactobacilos. Las relativas a los factores de crecimiento (vitaminas del grupo B), determinadas en condiciones óptimas estandarizadas, constituyen caracteres auxiliares que permiten precisar la clasificación (Alais, 1991).

C) Caracteres bioquímicos

a) La producción de gas carbónico (fermentación gaseosa de los azúcares) permite distinguir las especies heterofermentativas. Se pone de manifiesto mediante cultivo de un medio artificial gelificado con gelatina, encima del cual se vierte un "tapón" de gelosa; el gas se acumula entre las dos capas.

b) La actividad proteolítica suele ser limitada en las bacterias lácticas. Una reacción de degradación de los aminoácidos resulta útil para la determinación de las especies; se trata de la hidrólisis de la arginina con producción de amoníaco (desaminación), que se pone de manifiesto con el reactivo de Messler.

c) La fermentación de los hidratos de carbono es una de las propiedades más importantes para la clasificación. Es preciso realizar la prueba en condiciones bien definidas, ya que es una de las más sensibles a las condiciones experimentales; la composición del medio de cultivo y el pH, en especial, tienen una gran influencia. Un pH cercano a 6, en un medio tamponado, es favorable a la fermentación de los azúcares. La fermentación se indica por el viraje de un indicador como el rojo de clorofenol.

d) Reacciones diversas:

La producción de acetoina (o acetilmetilcarbinol) está limitada a algunas cepas de estreptococos: en general, es lenta; este cuerpo se pone de manifiesto (bajo su forma oxidada, el diacetilo) gracias a reacciones coloreadas muy simples, especialmente la de Voges-Proskauer, (producción de una coloración roja debida a la reacción del diacetilo sobre un grupo guanidínico, en medio alcalino). La hidrólisis de la esculina (heteróxido vegetal) permite distinguir a los lactobacilos; se pone de manifiesto por la formación de un precipitado negro en un medio que contenga citrato de hierro amoniacal (Alais, 1991).

2.4.2 Cultivo de las bacterias lácticas

Dado que se trata de especies muy exigentes nutricionalmente, los medios utilizados para su cultivo deben ser ricos en vitaminas, aminoácidos y sales minerales. Se han empleado diversos medios, concebidos especialmente para los lactobacilos: caldo con jugo de tomate (de Briggs, medio APTG (autolisado de levadura, peptona, triptona y glucosa de Raibaud), caldo MRS (Man y col., 1960). La fuente glucosídica es, en general, la glucosa (20 g/l), la fuente nitrogenada está asegurada por el extracto de carne, peptona, etc.; los factores de crecimiento se aportan principalmente con el extracto de levadura. Los trabajos más recientes sobre la clasificación de los lactobacilos se han realizado con el caldo MRS. Que se caracteriza por la presencia de sales en cantidades relativamente importantes, especialmente

sulfato de magnesio; se ha comprobado que este metal estimula considerablemente el crecimiento de las estreptobacterias y de las betabacterias.

Cuando el medio de cultivo se utiliza para el aislamiento de bacterias lácticas a partir de cepas fuertemente contaminadas, es bueno añadir una sustancia que inhiba a las bacterias Gram-negativas, especialmente a *Escherichia coli* y otras especies cercanas, así como diversas especies de *Pseudomonas*, *Achromobacteriaceae*, *Bacillus*, etc. Existen sustancias con una acción selectiva acusada; el acetato de talio (al 0.1%) parece ser el de resultados más satisfactorios. En el medio MRS reseñado, el acetato de sodio en proporción bastante elevada y la sustancia tensioactiva "tween-80", tienen una acción selectiva; el ajuste del pH a un valor inferior a 7 refuerza esta acción. Es preciso hacer notar que las bacterias lácticas dan colonias pequeñas en los medios gelificados. Las de estreptococos son corrientemente difíciles de observar; aparecen como cabezas de alfiler o de pequeñas lentejuelas (Alais, 1991). Las colonias se forman con frecuencia más cómodamente en la parte profunda que en la superficie. En los lactobacilos, pueden observarse colonias de dos tipos:

- Tipo S ("smooth"): pequeñas colonias lenticulares;
- Tipo R ("rough"); grandes colonias arborescentes.

2.4.3 Papel de las bacterias lácticas en el proceso de ensilaje

Los microorganismos más importantes del proceso de ensilaje, son las bacterias, y dentro de éstas los lactobacilos. Estas bacterias desempeñan un papel principal en la conservación de una cosecha por la característica de que pueden tolerar una acidez mucho mayor que otros microorganismos. De esta forma cuando se ensila un cultivo, las bacterias lácticas fermentan los azúcares presentes en el material vegetal, y producen tal cantidad de ácido láctico que los microorganismos que causan descomposición no pueden crecer (Watson y Smith, 1984; Wood, 1992) debido a una importante disminución del pH (Carpintero y col., 1979; Flores

y col., 1985; Rooke y col., 1985; Lindgren y col., 1988; Weinberg y col., 1988; Saucedo-Castañeda y col., 1990a; Meeske y col., 1993; Selmer-Olsen, 1993) y a la forma no disociada del ácido, la cual puede penetrar la pared celular microbiana e interferir con funciones metabólicas esenciales como las translocaciones de sustrato y la fosforilación oxidativa, reduciendo el pH intracelular (Baird-Parker, 1980; Smulders y col., 1986).

2.4.4 Bacterias lácticas como inoculantes y sus efectos en la fermentación

Muchos inoculantes de bacterias para ensilaje consisten en cultivos viables de bacterias homofermentativas que producen ácido láctico y que no producen gas. Los géneros a que pertenecen estas bacterias son: *Lactobacillus*, *Streptococcus* o *Pediococcus*. Estas bacterias fermentan eficientemente los azúcares (principalmente glucosa y fructosa) en su mayor parte a ácido láctico. El ácido láctico es el producto más eficiente de la ruta de fermentación, resultando mínimas pérdidas en cantidad de materia seca. Existen inoculantes selectivos para ensilaje que se han presentado para apresurar el proceso de fermentación, reducir la pérdida de nutrientes, mejorar la digestibilidad de la fibra y reducir la degradación de la proteína, lo cual produce un ensilaje con alto valor nutricional. Muchos estudios de fermentaciones a escala de laboratorio y en granjas, se han conducido para evaluar los efectos de inoculantes en la fermentación de varios forrajes (Woolford y Sawezye, 1984b; Henderson y McDonald, 1984; Silley y Damoglou, 1985; Bruyneel y Verstraete, 1986; Done, 1986; Bolsen y col., 1987; Heron y col., 1988; Rooke y col., 1988). En general, se han notado mejoramientos favorables en la velocidad de disminución del pH, así como incrementos en los niveles de ácido láctico con ensilajes de legumbres, pastos y cereales (Soderlund, 1988).

La efectividad de los inoculantes para ensilaje depende de: la existencia de poblaciones microbianas epificas en el forraje, del contenido de carbohidratos solubles del forraje, de la capacidad amortiguadora del forraje y de la calidad (velocidad de crecimiento y adaptabilidad

al ambiente) y cantidad (unidades formadoras de colonias viables/g de forraje) de los microorganismos inoculantes.

Bruyneel y Verstraete (1986), encontraron que para obtener una fermentación exitosa, en un medio simulando condiciones adversas de ensilaje, se necesitaba una densidad inicial de *Lactobacillus plantarum* de al menos dos veces que la de *Enterobacter cloacae*. En 1988, la aplicación recomendada para velocidad y aseguramiento de las bacterias, era de un mínimo de 10^5 ufc/g (Desarrollo agrícola y servicios consultivos, 1988), mientras que datos del Centro de Investigación de Forrajes lecheros en Wisconsin, indican que para ser económicamente efectivos, los inoculantes de bacterias lácticas deben ser agregados a niveles de al menos 10 veces del conteo epifítico (Muck y Bolsen, 1991).

2.4.5 Efecto de inoculantes de bacterias lácticas en la nutrición animal

La inoculación ha tenido un efecto sorprendente en el desarrollo de animales. La causa del mejoramiento en el desarrollo animal es confusa. En 1993 Muck reportó un alto grado de correlación entre efectos de digestibilidad de materia seca y desarrollo animal. También notó que la digestibilidad de la fibra fue mejorada un 30 %. Spoelstra (1991), encontró en una revisión de literatura, en la que el promedio de respuesta de crecimiento a inoculantes en 22 pruebas con crecimiento del ganado, fue del 7 %, mientras que aprovechamiento sólo se incrementó 2 %. Heron y Owen (1991) notaron en experimentos con un inoculante patentado, que la digestibilidad de la materia orgánica se incrementó 3 %. Resultados similares se han observado con otros inoculantes (Fisher y col., 1984; Froetschel y col., 1991). Charmley y col., (1996), encontraron que la aplicación de inoculantes mejora la ingesta en un régimen de ensilaje de hierbas y su aplicación en ensilajes de trigo, mejora la eficiencia de utilización como alimento.

2.4.6 Métodos modernos usados para identificación y clasificación de bacterias lácticas

La aplicación de métodos bioquímicos y moleculares modernos, han mostrado que los esquemas de identificación tradicionales para las bacterias lácticas no están de acuerdo con sus relaciones filogenéticas. Hoy en día estas técnicas muestran una creciente fiabilidad en los esquemas de clasificación.

Algunas de estas técnicas se mencionan a continuación: morfología (Schleifer y col., 1985), fisiología (Hammes y col., 1991), modelos de fermentación de carbohidratos (Kandler y Weiss, 1986; Hammes y col., 1991; Willems y col., 1991, 1992) composición de la pared celular (Fischer y col., 1983; Kandler y Weiss, 1986), movilidad electroforética de ácido láctico deshidrogenasas (Dicks y van Vuuren, 1990; Le Bras y Garel, 1991; Fujisawa y col., 1992), serología (Sharpe, 1955, 1970, 1981; Kandler y Weiss, 1986), marcadores quimiotaxonómicos (O'Leary y Wilkinson, 1988; Pompei y col., 1992), relaciones inmunológicas y estructurales de ácido láctico deshidrogenasas y otras enzimas (London y Chace, 1983; Schleifer y col., 1985), composición de bases DNA y estudios de hibridización DNA:DNA (Lauer y col., 1980; Dellaglio y Torriani, 1986), hibridización DNA:rRNA (Garvie, 1981; Schillinger y col., 1989), cataloguing 16S rRNA (Stackebrandt y col., 1983; Ludwig y col., 1985), análisis comparativo de secuencias de 16S/23S rRNA (Wallbanks y col., 1990; Williams y col., 1990; Bentley y col., 1991; Collins y col., 1991).

De entre varias técnicas moleculares desarrolladas, el análisis de restricción por endonucleasa del genoma bacteriano ó RFLP, ha mostrado ser una herramienta útil para la diferenciación de bacterias. Por este método simple y rápido, es posible observar diferencias reproducibles entre cepas (Le Bourgeois y col., 1993).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar la conservación de pulpa de café fresca, por el proceso de ensilaje controlado usando bacterias lácticas seleccionadas.

3.2 Objetivos particulares

1. Aislar, caracterizar, identificar y seleccionar bacterias lácticas de ensilajes de pulpa de café.
2. Conservar la pulpa de café fresca por el proceso de ensilaje con inoculación de bacterias lácticas previamente seleccionadas.

4. MATERIALY METODOS

4.1 Sustrato sólido utilizado para el ensilaje

Como sustrato para el ensilaje se usó pulpa de café (*Coffea arabica*) fresca, en donde las cerezas de café fueron despulpadas por la vía húmeda, en la cual se utiliza un despulpador mecánico tipo Penagos, en el que se necesita poca agua. El lote de pulpa fue traído del beneficio propiedad del Sr. Miguel Cervantes localizado en Coatepec (Veracruz), la pulpa presentó una humedad inicial de alrededor del 80% y un pH de 4.80. Se utilizó un solo lote de pulpa de aproximadamente 20 Kg, el cual se conservó por congelación (-20° C) en bolsas de polietileno.

4.2 Origen de las bacterias lácticas

Las bacterias lácticas se aislaron de muestras de ensilados de pulpa de café de 2 Kg por ensilaje natural y de pulpa de café inoculada (% P:P) con un pie de cuba de un ensilado natural de pulpa de café de 2 meses, de donde se tomaron muestras del centro del ensilado, ambos con un tiempo de ensilaje de 3 meses los cuales provienen de un beneficio de café arábica que se localiza en Coatepec (Veracruz).

4.3 Medios de cultivo

4.3.1 Medio usado para el aislamiento y propagación de cepas de bacterias lácticas.

El medio de cultivo usado para el aislamiento y propagación, así como para la conservación fue el Lactobacilli MRS (Difco ®) a una concentración de 55 g/l (Man y col., 1960) la composición se indica en el Anexo 1. La preparación del medio se llevó a cabo según las indicaciones descritas en el envase del medio.

4.3.2 Medios usados para la caracterización fenotípica de cepas de bacterias lácticas.

Se usaron distintos medios para la caracterización fenotípica de las bacterias lácticas (Anexo 1), estos se prepararon pesando los componentes en una balanza analítica (Ohaus modelo Galaxy 200), vaciándolos a un matraz erlenmeyer con agua destilada, agitándolos magnéticamente con calor (Thermolyne Cimarec 2) hasta quedar bien mezclado. El medio se esterilizó a 121°C durante 15 minutos. Una vez que el medio quedó a una temperatura soportable para las manos, éste se vació en cajas de Petri estériles de 90 mm de diámetro a razón de 20 ml por caja en una campana de flujo laminar (Holten modelo HH48).

4.3.3 Conservación de cepas de bacterias lácticas

Las cepas se conservaron en refrigeración (4°C) en medio MRS sólido y líquido, haciendo resiembras de las colonias de las cepas cada 30 días aproximadamente. En la etapa de la identificación, las cepas de 24 h incubadas a 30°C, se conservaron en medio MRS líquido con glicerol a una concentración de 30 % a una temperatura de -80°C, reactivándose en medio MRS líquido. En estas condiciones las cepas pueden conservarse durante mucho tiempo, ya que el glicerol es crioprotector.

4.4 Condiciones de cultivo

4.4.1 Preparación de inóculo de bacterias lácticas

El inóculo de bacterias usado para el aislamiento fue tomado de cultivos sólidos de medio MRS conservado en refrigeración, del cual se inocularon por asada cajas con 20 ml del mismo medio incubándose a 30°C durante 24 a 48 h.

Para la caracterización e identificación de las cepas se usaron cajas de Petri con 20 ml de medio MRS sólido inoculados por asada y tubos con 9 ml de medio MRS líquido a los cuales se inoculó 1 ml de cultivo líquido de bacterias lácticas conservado en refrigeración. Los cultivos se incubaron 24 h a 30°C. Posteriormente los cultivos líquidos se centrifugaron (Hettich Universal) a 5000 rpm durante 20 minutos, el sobrenadante se filtró (Millipore 0.45µm) para después realizar los análisis de productos y azúcares por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) así como en un analizador enzimático YSI, mientras que a los cultivos en sólido se les sometió a diferentes pruebas bioquímicas.

4.4.2 Propagación del inóculo para ensilaje de pulpa de café fresca

Cuatro días antes de empezar el ensilaje se inocularon 0.5 ml de cultivo de las bacterias lácticas de interés en tubos con 4.5 ml de medio MRS líquido, se incubaron a 30°C durante 24 h. Estos se inocularon en frascos con 45 ml del mismo medio, se incubaron los frascos en las mismas condiciones y finalmente estos cultivos se inocularon en frascos con 450 ml de medio MRS líquido los cuales se incubaron a 30°C durante 48 h.

Con 20 Kg de pulpa de café fresca (aproximadamente) se prepararon dos tipos de ensilados, dos naturales y tres que se inocularon con cultivos de bacterias lácticas de 48 h, dos a una concentración del 3%, uno con la cepa B29 y otro con la B18, y uno al 10 % (V:P) con la cepa B18.

4.4.2.1 Microsilos

La pulpa de café natural e inoculada se ensiló en recipientes de plástico de 7 cm de diámetro por 10.50 cm de altura, los cuales fueron sellados con cinta teflón (Dupont ®) para evitar la entrada de aire así como el derramamiento del líquido. El microsilos también se selló por fuera con parafilm. Posteriormente estos se introdujeron boca abajo en envases de 1 l de capacidad

y se taparon para después incubarlos en un cuarto a temperatura controlada a 30°C. La humedad inicial de la pulpa de café fue de 80%, a un pH de 4.80 y se incubaron hasta 336 y 360 h tomando muestras regularmente.

4.5 Tratamiento de muestras de pulpa de café ensilada

Las muestras incubadas se trataron de acuerdo al diagrama de flujo de la Figura 4.1.

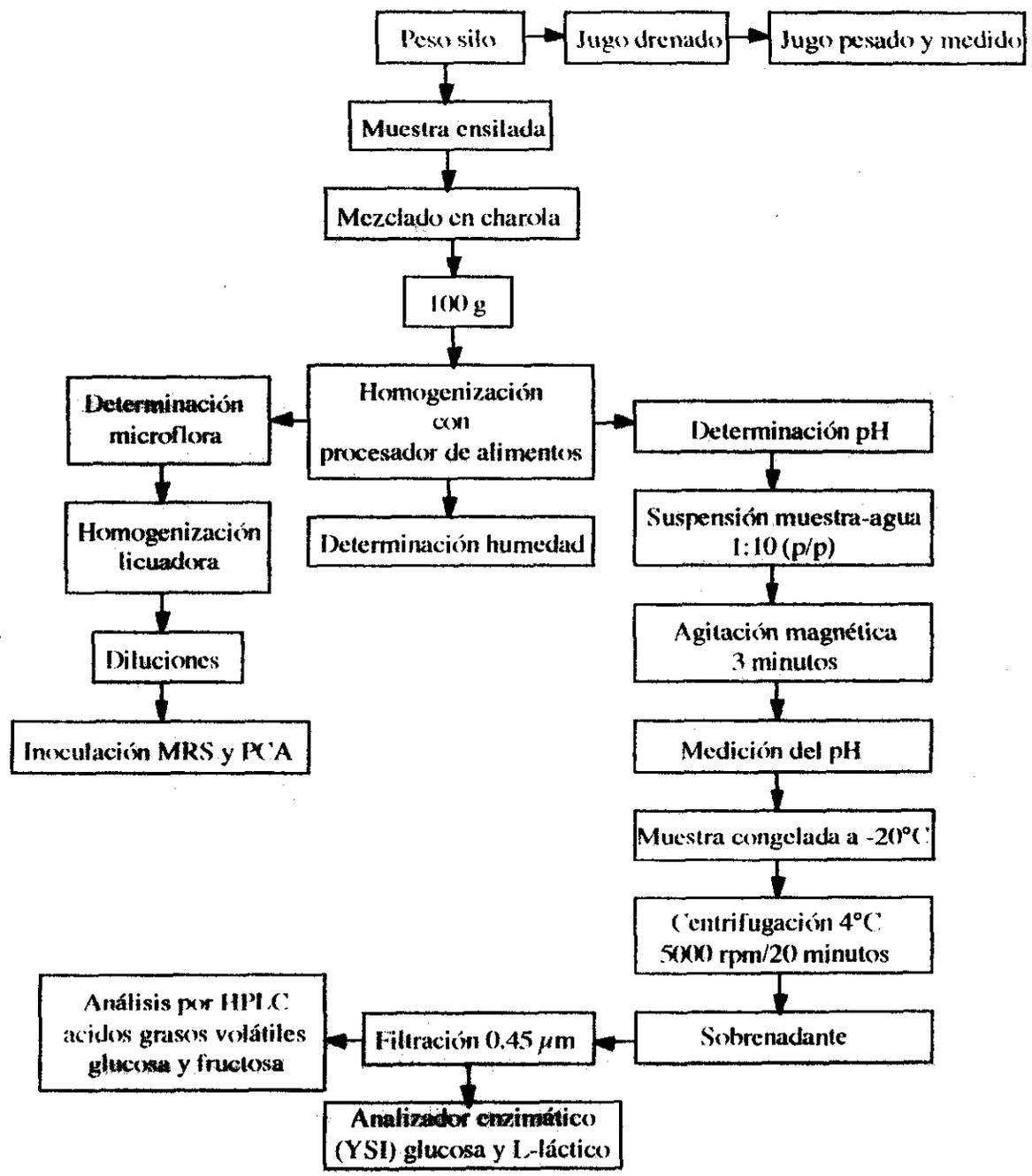


Figura 4.1 Tratamientos aplicados a las diferentes muestras de pulpa de café ensilada

4.6 Técnicas analíticas

4.6.1 Aislamiento de cepas de bacterias lácticas

Se tomaron de 20 a 30 g de muestra de pulpa de café ensilada 3 meses, la cual se suspendió en 90 ml de agua destilada estéril con un tensoactivo (Tween 80, 1 ml/l) en frascos de 500 ml, y se homogeneizó en una licuadora (Sunbeam). A partir de esta suspensión se hicieron diluciones decimales en tubos de vidrio con 9 ml de agua destilada estéril con Tween 80 (Gaime-Perraud, 1995). Posteriormente se inocularon por triplicado 0.2 ml de las suspensiones diluidas y se dispersaron con una varilla de vidrio triangular en cajas de Petri con 20 ml medio MRS. Estas se incubaron a 30°C durante 48 h en atmósfera anaerobia mediante un sistema Anaerocult A (Merck ®).

Se aislaron las bacterias que de acuerdo a la morfología en caja, correspondían a las características de bacterias lácticas, por lo que se hicieron resiembras en medio MRS sólido (caja de Petri) y líquido (tubo) para verificar la pureza.

La distinción entre bacterias y levaduras se realizó observando al microscopio frotis en estado fresco, lo que permitió apreciar la forma y la disposición de las bacterias.

Con el fin de caracterizar fenotípicamente a las cepas aisladas, se realizaron los siguientes procedimientos:

4.6.2 Tinción Gram

Esta coloración diferencial permite demostrar las propiedades tintoriales de todos los tipos de bacterias, en donde las bacterias gram+ retienen el cristal violeta tras la decoloración y se

contracoloran de rojo con la safranina (Koneman y col., 1992). La preparación de las soluciones para la tinción se encuentran en el Anexo 3.

La tinción se realizó con cultivo en placa de cepas de bacterias lácticas de 24 h. Se colocó sobre un portaobjetos una gota de agua estéril, con la que se preparó un extendido fino del cultivo de interés y se dejó secar al aire. Ya seco, se fijó el material al portaobjetos pasándolo 3 a 4 veces por la llama de un mechero. Se colocó el preparado sobre un soporte de tinción y se cubrió la superficie con solución de cristal violeta, luego de 1 minuto de exposición al cristal violeta, se lavó bien con agua destilada. Después se cubrió el preparado con iodo de gram durante 1 minuto y se lavó nuevamente con agua destilada. Luego se bañó la superficie con unas gotas de decolorante hasta no arrastrar más colorante violeta, se lavó con agua corriente y se cubrió la superficie con contracolor safranina durante 1 minuto. Se lavó con agua corriente y se dejó escurrir el exceso de agua, se secó. La determinación se llevó a cabo bajo microscopio (Zeiss) en objetivo 100 X utilizando aceite de inmersión, en el que las bacterias gram positivas fueron aquellas que retuvieron el cristal violeta y quedaron teñidas de un color azul oscuro.

4.6.3 Prueba de la catalasa

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y agua. El peróxido de hidrógeno se forma como uno de los productos finales del metabolismo oxidativo o aeróbico de los hidratos de carbono (Koneman y col., 1992). La prueba se realizó a partir de cultivos en placa de cepas de bacterias lácticas de 24 h, que se llevó a cabo tomando el asa con la cual se recogió el centro de una colonia pura y se colocó sobre un portaobjetos de vidrio limpio, posteriormente con la ayuda de una pipeta Pasteur se agregó una gota de H_2O_2 al 3%. La prueba fue negativa para las cepas de bacterias lácticas, es decir no se formaron burbujas (no se forma O_2 molecular) pues la enzima catalasa no está presente.

4.6.4 Prueba de motilidad

La movilidad bacteriana es otra característica importante en la identificación de las bacterias, ya que éstas se mueven por medio de flagelos, cuyo número y ubicación varía en las diferentes especies (MacFaddin, 1993). Se realizó a partir de cultivo en placa de cepas de bacterias lácticas para verificar la inmovilidad de estos cultivos, recogiendo con un asa el centro de una colonia pura de 24 h, posteriormente se colocó el tubo con el medio solidificado en posición vertical y se inoculó por punción (dejando sin inocular 1 cm aproximadamente del fondo del tubo). Se incubó a 30°C durante 24 h. La prueba se interpreta realizando un examen macroscópico del medio para observar si se presenta una zona de desarrollo difuso que parte de la línea de inoculación.

4.6.5 Fermentación de glucosa (Acidificación)

Las bacterias utilizan hidratos de carbono mediante lo que se llama una "fermentación ácida", en la cual se producen ácidos orgánicos que derivan del ácido pirúvico. Las bacterias difieren en los hidratos de carbono que pueden utilizar y en los tipos y cantidades de ácidos producidos (Koneman y col., 1992; MacFaddin, 1993). La prueba se realizó con cultivos en medio líquido de cepas de bacterias lácticas de 24 h, en tubos vacíos previamente esterilizados se agregaron 10 µl de un cultivo líquido de 24 h posteriormente se agregaron 5 ml del medio basal más glucosa (Anexo 1), se agitaron y se dejó solidificar el medio en el tubo en posición vertical. Cuando el medio con el inoculó solidificó se incubó a 30°C durante 24 - 48 h. Con el virre del color del medio de púrpura a amarillo se comprobó la acidificación.

4.6.6 Gas de glucosa

El gas formado por bacterias es principalmente una mezcla de hidrógeno y dióxido de carbono que proviene de la degradación de ácido fórmico. Una regla empírica aceptada es que

cualquier bacteria que forma gas produce primero ácido. Para comprobar la existencia o no de gas, se realizó la prueba a partir de cultivos en medio líquido de cepas de bacterias lácticas de 24 h, se agregó 1 ml de agar bacteriológico al tubo con el medio basal y glucosa ya solidificado (prueba de la fermentación de glucosa). Se colocó en posición vertical hasta que el tapón de agar quedara solidificado y se incubó a 30°C durante 24 - 48 h, la prueba se considera negativa cuando el tapón de agar se encuentra intacto una vez transcurrido el tiempo de incubación (Meraz Rodriguez, 1991).

4.6.7 Determinación de la biomasa de cepas de bacterias lácticas

En tubos con 9 ml de medio MRS líquido (Difco ®) se inoculó 1 ml de cultivos de cepas de bacterias lácticas y se incubaron a 30°C durante 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación los cultivos se agitaron y se vació el contenido a tubos para centrifuga previamente lavados y secados hasta peso constante en una estufa a 60°C (Felisa) y tarados (Ohaus modelo Galaxy 200). Se centrifugó (Hettich Universal) durante 20 minutos a 5000 rpm, se desechó el sobrenadante y la pastilla de bacterias se resuspendió en 5 ml de agua destilada por cada tubo, se centrifugó nuevamente durante 20 minutos a 5000 rpm, se desechó el sobrenadante y se resuspendió nuevamente en 5 ml de agua destilada. Se leyó la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro (Shimadzu modelo UV-160A) a una longitud de onda de 660 nm. Se centrifugó la muestra, se desechó el sobrenadante y los tubos se secaron hasta peso constante. La biomasa se determinó por diferencia de peso (Gutiérrez-Sanchez, 1997).

4.6.8 Crecimiento de cepas de bacterias lácticas en medios MRS pectina y MRS ácido tánico usados como fuente de carbono

Las cepas de bacterias lácticas se inocularon por punción en cajas de Petri de 90 mm de diámetro con 20 ml de medio MRS sólido al cual se le cambió la fuente de carbono original (glucosa) por pectina y por ácido tánico a una concentración de 5 g/l.

4.6.9 Fermentación de carbohidratos por el sistema API 50 CH

El uso del Sistema API 50 CH (BioMérieux ®) permite realizar el estudio del metabolismo de los carbohidratos de los microorganismos, está compuesto por 50 microtubos, cada uno con una zona de anaerobiosis (el tubo), para los estudios de fermentación y una zona de aerobiosis (la cúpula), para los estudios de oxidación y asimilación, que junto con el medio API 50 CHL (BioMérieux ®) permite el estudio de fermentación de los 49 azúcares del sistema API 50 CH. El microorganismo es puesto en suspensión en el medio, después se inocula cada tubo del sistema. Durante la incubación el catabolismo de los glúcidos conduce a ácidos orgánicos que provocan el viraje del indicador de pH. Los resultados obtenidos constituyen el perfil bioquímico de la cepa y sirven para su identificación o su tipaje, mismos que se analizan con el programa APILAB-PLUS V 3.2.2 de BioMérieux ®, para determinar la identificación de las cepas (Chede Yéhinou, 1996; Agati y col., 1998). El procedimiento es explicado en el Anexo 2.

4.6.10 Análisis de enzimas por el sistema API ZYM

El uso del sistema comercial API ZYM (BioMérieux ®) permite la detección de varias enzimas constitutivas de las diferentes cepas ensayadas. Este sistema es una herramienta de investigación para la diferenciación de grupos de bacterias. Consta de 20 cúpulas en los que se encuentran sustratos deshidratados, que al ser inoculados con el microorganismo en suspensión, se lleva a cabo una reacción enzimática sólo unas pocas horas después de la inoculación. El procedimiento es descrito en el Anexo 2.

4.6.11 Restricción del DNA (RFLP) de cepas de bacterias lácticas

El perfil de restricción del DNA de las cepas, permite conocer la pertenencia de 2 colonias de bacterias lácticas a una misma cepa. Si este es el caso, los fragmentos de DNA obtenidos migran al mismo lugar. Esta se realizó en un equipo Bio Rad de acuerdo con la técnica usada por Agati y col., (1998), en el cual se llevó a cabo la electroforesis del DNA de cepas de bacterias lácticas bajo las siguientes condiciones:

Voltaje: 120 V; Intensidad: 560 A; Tiempo: 17 h.

El procedimiento es detallado en el Anexo 2, y las soluciones usadas para la electroforesis en el Anexo 3.

4.6.12 Determinación de productos por HPLC y por ensayos enzimáticos (YSI)

En tubos con 9 ml de medio MRS se inoculó 1 ml de cultivo de cepas de bacterias lácticas, los cuales se incubaron durante 24 h a una temperatura de 30°C. Transcurrido este tiempo los tubos se centrifugaron (Hettich Universal) durante 20 minutos a 5000 rpm, posteriormente se tomó con una jeringa 1.5 ml del sobrenadante y se filtró (membrana 0.45 µm) y se congelaron a -20°C. Las muestras de los ensilados de pulpa de café, se descongelaron a temperatura ambiente y se centrifugó (Beckman J2 MI) a 4°C durante 20 minutos a 5000 rpm. Del sobrenadante se tomó con una jeringa 1.5 ml y se filtró (membrana 0.45 µm). Los análisis de los productos de fermentación de los cultivos de bacterias lácticas, así como de los ensilajes de pulpa de café, se efectuaron por cromatografía líquida de alta resolución o también conocida como HPLC, según la técnica empleada por Gaim-Perraud en 1995. La cromatografía líquida de alta resolución, permite separar y cuantificar productos de fermentación como los ácidos grasos, etanol, así como también glucosa y fructosa residuales. El volumen inyectado fue de 20 µl de muestra previamente centrifugada y filtrada, usando como estándares ácidos láctico, acético, propiónico, butírico, etanol, fructosa y glucosa (J.T. Baker ®), en concentraciones de 2 y 5 g/l. El HPLC se usó en las siguientes condiciones de operación:

Fase móvil: H₂SO₄ 30 mM

Flujo: 0.6 ml/min

Volumen inyectado: 20 µl

Temperatura del horno: 50°C

Presión: 390-400 Psi

Características del HPLC:

Bomba: Binary LC pump 250 Perkin Elmer

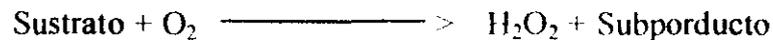
Columna: Rezek Organic Acid de Phenomenex

Detector de Índice de Refracción: LC-30 Perkin Elmer

Horno: Eppendorf CH-30 column heater

Un volumen de 30 µl de muestras previamente centrifugadas y filtradas de los cultivos de bacterias lácticas, así como de las muestras de los ensilajes de pulpa de café, se analizaron en un equipo enzimático YSI modelo 2700 Select, para determinar L-láctico y glucosa residual, usando como solución amortiguadora el YSI 2357 Buffer concentrate (el contenido del sobre diluido en 450 ml de agua desionizada) y el estándar YSI 2776 Standard D-Glucose 2.50 g/l, L-Lactate 0.5 g/l, con las membranas YSI 2329 L-Lactate Oxidase e YSI 2365 Glucose Oxidase (YSI Incorporated ®). Este equipo tiene una tecnología que emplea una o más enzimas catalizadoras de reacciones produciendo finalmente H₂O₂. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) es electroquímicamente oxidado en el ánodo de platino del electrodo. En enzimología, los términos sustrato y producto son comúnmente usados para describir una reacción. Una enzima es una molécula de proteína con gran especificidad, que cataliza la conversión de uno o más sustratos, en uno o más productos. En esta tecnología, una enzima oxidasa siempre se ve envuelta desde que el producto de una reacción oxidasa es el peróxido de hidrógeno. El sustrato, como la glucosa, entra en la cámara de muestra, es agitada y diluida. El sustrato entonces se difunde a través de una membrana de policarbonato. La velocidad de la reacción química mostrada más abajo es limitada principalmente por difusión. Una vez que pasa la

membrana de policarbonato, el sustrato encuentra una fina capa de la enzima oxidasa apropiada y ocurre la siguiente reacción:



Aunque el oxígeno es consumido en esta reacción, en la solución amortiguadora no se agota el oxígeno, ni la velocidad de la reacción enzimática es muy sensible a pequeños cambios en la concentración de oxígeno. Por lo tanto, no es necesario medir o controlar el contenido de oxígeno en la cámara de muestra.

4.6.13 Evaluación de la microflora

Se tomaron y pesaron por duplicado 10 g de muestra de pulpa de café la cual se suspendió en 90 ml de agua destilada estéril con un tensoactivo (Tween 80, 1 ml/l) y se homogeneizó en una licuadora (Sunbeam) durante 3 minutos a temperatura ambiente. A partir de esta suspensión, se hicieron diluciones decimales en tubos de vidrio con 9 ml de agua destilada estéril con Tween 80. Con el fin de limitar el número de cajas inoculadas, se usó una técnica que consiste en depositar 20 μl de cada dilución por triplicado en cajas de Petri de medio MRS y PCA (Gaime-Perraud, 1995) como se indica en la Figura 5.2:

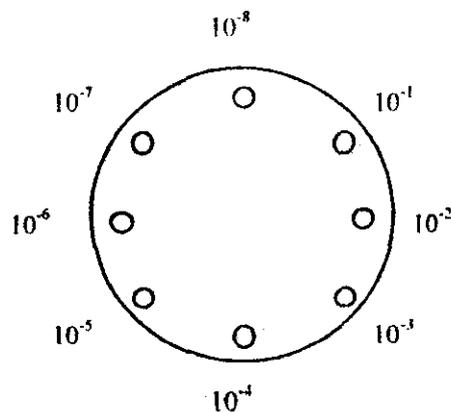


Figura 5.2 Representación de la técnica de inoculación por punto para determinar las diluciones óptimas.

Las cajas de Petri con medio MRS se incubaron a 30°C durante 48 h en atmósfera anaerobia mediante un sistema Anaerocult A (Merck ®).

La distinción entre bacterias y levaduras se realizó observando al microscopio frotis en estado fresco.

5.6.14 Materia seca, humedad

Para la determinación de la humedad se muestreó por duplicado (A y B) pesando alrededor de 10 g por cada muestra (Gaime-Perraud, 1995), se secaron en una estufa a 100°C (Felisa) hasta peso constante. Una vez seco se dejó enfriar en un desecador y se pesó en una balanza analítica (Ohaus modelo Galaxy 200).

4.6.15 pH

Se tomaron aproximadamente 5 g de pulpa de café ensilada, a los cuales se les hizo una dilución en peso con agua destilada hasta 50 g (dilución 1:10 p/p), se agitó en una parrilla durante 3 a 4 minutos se midió el pH en un potenciómetro marca Conductronic modelo pH 20, después las muestras se congelaron a -20°C para análisis posteriores de ácidos grasos volátiles, glucosa y fructosa (Gaime-Perraud, 1995).

La calibración del aparato se realizó con soluciones amortiguadoras de referencia de Ftalato ácido de potasio a pH 4.01 ± 0.01 y solución de fosfatos de sodio y potasio (Sigma®) a pH 7.00 ± 0.01 a temperatura ambiente.

4.6.16 Expresión de resultados

Los resultados de los análisis de ácidos y azúcares fueron expresados en g/l y convertidos a porcentaje de materia seca por la siguiente fórmula:

$$\frac{X \times 100}{D \times P \times \% \text{ MS}}$$

donde:

X es la concentración de ácido o azúcar obtenido (g/l),

D es el factor de dilución,

P es la cantidad de muestra húmeda analizada (g),

% MS es el contenido de materia seca de la muestra (%).

Los resultados obtenidos en la evaluación de la microflora están expresados como el log de las unidades formadoras de colonias por gramo de pulpa de café seca, calculado con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Número de colonias}}{D \times P \times \% \text{ MS}}$$

donde:

D es el factor de dilución,

P es la cantidad de muestra tomada (g),

% MS es el contenido de materia seca de la muestra (%).

5. RESULTADOS Y DISCUSION

En el presente capítulo se encuentran los resultados obtenidos en las pruebas realizadas a las cepas de bacterias, las cuales fueron aisladas de ensilados de pulpa de café, con el fin de caracterizarlas fenotípicamente, para después llegar a la posible identificación de las mismas. En una segunda parte (sección 5.2) se presentan los resultados obtenidos en los ensayos de ensilajes realizados en pulpa de café, para conocer el efecto de éste método de conservación en la pulpa de café fresca.

5.1 Aislamiento, caracterización e identificación de cepas de bacterias lácticas provenientes de ensilajes de pulpa de café.

Un total de 50 cepas de bacterias fueron aisladas de 4 ensilajes de 3 meses, los naturales 1 y 5, y los pie de cuba 3 y 4, mediante el proceso descrito en la sección 4.6.1 del capítulo 4. Las cepas aisladas fueron agrupadas de acuerdo a la descripción macroscópica de las colonias en caja de Petri con medio MRS. En la Tabla 5.1, se encuentran representados los 10 grupos de bacterias, en donde se describe la forma, la elevación, el margen, el color, la superficie, la densidad y la consistencia de las colonias de cada grupo.

Tabla 5.1 Descripción morfológica de las colonias en medio MRS en caja de Petri.

Grupo	Forma	Elevación	Margen	Color	Superficie	Densidad	Consistencia
I	Circular	Convexa	Entero	Crema	Lisa	Opaca	Viscosa
II	Irregular	Pulvinada	Ondulado	Hueso	Rugosa	*Lig Trans	Quebradiza
III	Circular	Plana	Entero	Crema	Lisa	*Lig Trans	Viscosa
IV	Circular	Convexa	Entero	Blanco	Lisa	Opaca	Viscosa
V	Irregular	Convexa	Ondulado	Blanco	Lisa	*Lig Trans	Viscosa
VI	Irregular	Umbonada	Ondulado	Blanco	Lisa	*Lig Trans	Viscosa
VII	Irregular	Umbonada	Ondulado	Hueso	Lisa	Translúcida	Viscosa
VIII	Circular	Convexa	Entero	Hueso	Lisa	Translúcida	Viscosa
IX	Circular	Pulvinada	Entero	Blanco	Lisa	Opaca	Viscosa
X	Circular	Convexa	Entero	Ambar	Lisa	Translúcida	Viscosa

*Lig trans = Ligeramente translúcida

Estas cepas fueron sometidas a pruebas de tinción de Gram, catalasa, motilidad, acidificación y gas de glucosa. En la Tabla 5.2, se encuentran agrupadas las bacterias aisladas de acuerdo a la descripción de la morfología de las colonias en caja de Petri en medio MRS, así como los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas realizadas a dichas cepas.

Sólo 31 cepas, pertenecientes a los grupos I, III, IV, V, VI y IX, fueron las que presentaron el mayor número de características de las bacterias lácticas: gram positivas, catalasa negativa, inmóviles, con forma de bacilos, dispuestas en cadenas y por pares, que fermentan carbohidratos, no productoras de gas, anaeróbicas, pero aerotolerantes, acidotolerantes entre otras (Seppo y Wright, 1993; De Vuyst y Vandamme, 1994), razón por la cual se consideró que correspondían a bacterias lácticas, y fueron usadas para continuar los estudios sobre la caracterización.

Tabla 5.2 Pruebas bioquímicas realizadas a cepas aisladas de ensilados de pulpa de café.

Grupo	Cepa	Clave nueva	Gram	Catalasa	Motilidad	Acidificación	Gas de glucosa
I	AS'13	B 1	+	-	-	+	-
	AS'11	B 2	+	-	-	+	-
	AS'9	B 3	+	-	-	+	-
	SL'18GC	B 4	+	-	-	+	-
	SL'18MC	B 5	+	-	-	+	-
	AS6	B 6	+	-	-	+	-
	SL18MC	B 7	+	-	-	+	-
	SL19	B 8	+	-	-	+	-
	AS2	B 9	+	-	-	+	-
	SL18GC	B10	+	-	-	+	-
II	AS8	B11	-	-	-	+	-
	SL2	B12	-	-	-	+	-
	SL'16MB	B13	-	-	-	+	-
	AS3	B14	-	-	-	+	-
	SL14	B15	-	-	-	+	-
	AS'6	B16	-	-	-	+	-
	SL'5	B17	-	-	-	+	-
III	AS10GC	B18	+	-	-	+	-
	AS10MA	B19	+	-	-	+	-
	AS''3	B20	+	-	-	+	-
	SL16MG	B21	+	-	-	+	-
	SL'20	B22	+	-	-	+	-
IV	AS'14	B23	+	-	-	+	-
	AS4	B24	+	-	-	+	-
	AS'15	B25	+	-	-	+	-
	AS'7	B26	+	-	-	+	-
	SL'21	B27	+	-	-	+	-
V	SL'16#	B28	+	-	-	+	-
	SL'7	B29	+	-	-	+	-
	SL9	B30	+	-	-	+	-
	SL'2	B31	+	-	-	+	-
VI	SL'14	B32	+	-	-	+	-
	AS'2	B33	+	-	-	+	-
	SL'6	B34	+	-	-	+	-
VII	SL20	B35	+	-	-	+	-
	SL16CH	B36	+	-	-	+	-
VIII	SL5	B37	-	-	-	+	-
	AS'10	B38	-	-	-	+	-
VIII	SL12	B39	-	-	-	+	-
	AS5	B40	-	-	-	+	-
	SL'3	B41	-	-	-	+	-
	SL4	B42	-	-	-	+	-
	SL6	B43	-	-	-	+	-
	AS1	B44	-	-	-	Nd	-
VIII	*SL5	B45	-	-	-	Nd	-
	*SL1	B46	-	-	-	Nd	-
IX	SL8	B47	+	-	-	+	-
	SL'19	B48	+	-	-	+	-
X	SL17	B49	-	+	-	+	-
	AS10	B50	-	+	-	+	-

AS: Aislada del ensilaje natural 1; AS': Aislada del ensilaje natural 5; SL': Aislada del pie de cuba 3; SL: Aislada del pie de cuba 4; Nd: No determinado; B: Nueva nomenclatura.

5.1.1 Crecimiento de bacterias lácticas en pectina y ácido tánico

De las 31 cepas que presentaron características de bacterias lácticas, se trabajó con un grupo de 19 cepas, por razones prácticas de manipulación no se trabajó con el resto de las cepas. En la Tabla 5.3 se encuentra descrita la forma, tamaño y el crecimiento de las cepas en ácido tánico y pectina usados como fuentes de carbono diferentes a la glucosa, con el propósito de saber si son capaces de crecer en presencia de estos compuestos.

Tabla 5.3 Forma, tamaño y crecimiento de las cepas en el medio MRS pectina y MRS ácido tánico como fuentes de carbono.

Cepas	Origen	Dilución	Forma	Tamaño (µm)	Pectina	Acido tánico
B1	N 5	SM	Bacilo	1.25	+	+
B4	PC 3	10 ⁻¹	Bacilo	1.25	-	-
B5	PC 3	10 ⁻¹	Bacilo	1.25	-	-
B6	N 1	10 ⁻²	Bacilo	1.25	-	-
B8	PC 4	SM	Bacilo	1.75	+	+
B9	N 1	10 ⁻³	Bacilo	1.62	+	+
B10	PC 4	SM	Bacilo	1.25	-	-
B18	N 1	SM	Bacilo	1.25	+	+
B19	N 1	SM	Bacilo	1.25	+	+
B21	PC 4	SM	Bacilo	1.25	-	-
B22	PC 4	SM	Bacilo	1.75	-	-
B24	N 1	10 ⁻²	Bacilo	1.25	-	-
B25	N 5	SM	Bacilo	2	+	+
B26	N 5	10 ⁻²	Bacilo	1.5	+	+
B28	PC 3	10 ⁻²	Bacilo	2	+	-
B29	PC 3	10 ⁻³	Bacilo	2.5	+	+
B30	PC 4	10 ⁻³	Bacilo	2.5	+	+
B35	PC 3	10 ⁻¹	Bacilo	1.25	-	-
B48	PC 3	10 ⁻¹	Bacilo	2	+	+

Bi: Nueva nomenclatura; **N:** Aislada del natural lote 1 ó 5; **PC:** Aislada del pie de cuba lote 3 ó 4; **SM:** Proveniente de la solución madre; **10⁻¹:** Proveniente de la dilución 1,2 ó 3.

Se aprecia que las 19 cepas son bacilos, y el tamaño de éstos varía entre 1.25 y 2.5 μm aproximadamente, lo cual mostró homogeneidad en algunos grupos, con excepciones como el caso de las cepas B8 y B9 del grupo I, la cepa B22 del grupo III, éstas tienen un tamaño mayor a las del resto del grupo. Mientras que para el grupo IV, las cepas B25 y B28 presentan el mismo tamaño y el resto son menores. Las cepas del grupo V son del mismo tamaño. La dilución ayudó a conocer la permanencia de las cepas dentro de la masa ensilada, donde se puede observar que las cepas que se encontraron en diluciones más pequeñas, son la B9 que pertenece al grupo I, así como B29 y B30, ámbas del grupo V.

El origen determinó la procedencia de un ensilaje natural o por pie de cuba, lo que indica en este caso que al provenir una cepa láctica de un ensilaje natural, las bacterias lácticas de la microflora epifítica dominaron la fermentación. En este caso se observa que poco más de las bacterias aisladas provienen de pies de cuba. También se observa que 10 de las 19 cepas fueron capaces de crecer en el medio MRS sólido con pectina y MRS sólido con ácido tánico, lo cual indica que estas cepas pueden crecer en pectina, la cual es un polímero de difícil asimilación, y que son resistentes al ácido tánico, que es un compuesto tóxico.

De Menezes (1993) demostró que en medio líquido las bacterias lácticas son capaces de degradar los taninos, que de acuerdo a trabajos realizados por Braham y Bressani (1979), Zuluaga y Tabacchi (1980) los taninos de la pulpa de café (*C. arábica*) de las variedades Mundo Novo y Bourbon, se encuentran en 8.6 y 3.7 % MS, respectivamente. Mientras que las sustancias pécticas se encuentran en 6.50 % MS (Bressani y col., 1972).

5.1.2 Perfil fermentativo y crecimiento de bacterias lácticas

El grupo de 19 bacterias, se hicieron crecer en medio MRS líquido para análisis en HPLC y así conocer el perfil fermentativo de cada cepa. Los resultados de la producción de ácido DL láctico se observan en la Figura 5.1, donde las bacterias del grupo I se encuentran representadas en color

azul fuerte, grupo III en amarillo, grupo IV en rosa, grupo V en azul claro, grupo VI en verde y grupo IX en rojo. Se aprecia que las 19 cepas producen una cantidad de láctico por arriba de los 10 g/l. Algunas presentaron una producción entre los 8 y 12 g/l (la concentración inicial de glucosa en el medio MRS líquido, fue de 19 g/l). Mientras que otras se situaron entre los 13 y 16 g/l, resaltando que las cepas que presentaron una mayor producción de ácido fueron la B18 y la B21 que pertenecen al grupo III, con una producción media 16.58 ± 2 g/l y 16.61 ± 1.51 g/l, respectivamente. El error en las mediciones está expresado como la media \pm el coeficiente de variación (CV). Este representa el porcentaje de la media, y se define como: $CV = (\text{desviación estándar} / \text{media}) \times 100$.

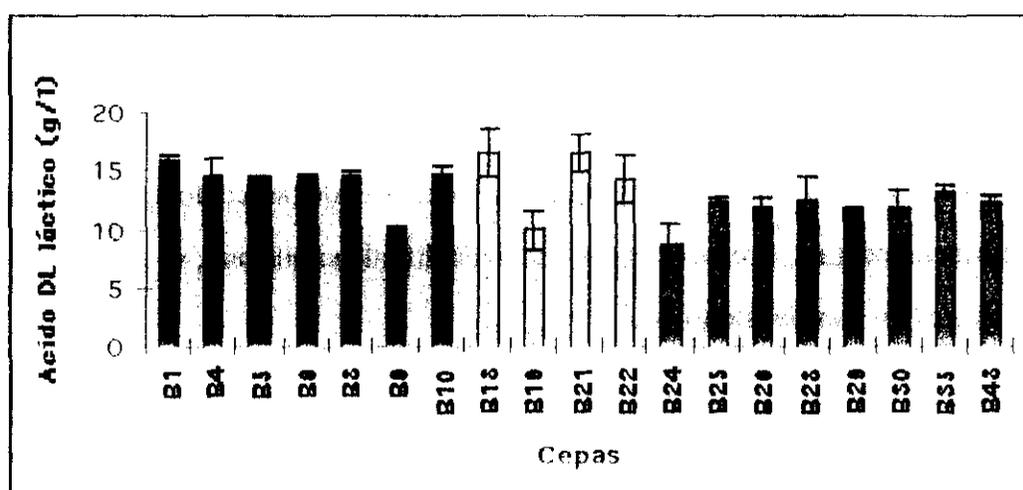


Figura 5.1 Producción de ácido DL láctico de cepas de bacterias lácticas. Grupo I, azul fuerte; grupo III, amarillo; grupo IV, rosa; grupo V, azul claro; grupo VI, verde; grupo IX, rojo.

Cabe resaltar que en el grupo I, a excepción de la cepa B9 que presentó una menor producción de ácido DL láctico, todas las cepas presentaron perfiles similares en cuanto a producción de láctico. En el grupo III, las cepas B18 y B21 fueron similares, mientras que, las cepas B19 y B22, fueron diferentes en cuanto a producción. Para el grupo IV, la cepa B24 tuvo menor producción, y el resto fueron perfiles similares. Las cepas del grupo V presentaron un perfil de producción muy similar.

El mayor metabolito de las bacterias lácticas es el ácido láctico, el cual es responsable de los cambios de pH en su ambiente de crecimiento, suficiente para inhibir muchos microorganismos. Además del efecto del pH, como con otros ácidos grasos de cadena corta, la forma no disociada de la molécula interviene en el efecto antimicrobiano colapsando el gradiente electroquímico (Eklund, 1989) causando bacteriostasis y eventualmente la muerte de las bacterias susceptibles. Esto es debido a que, las formas no disociadas del ácido pueden penetrar la membrana celular microbiana e interferir con funciones metabólicas esenciales como translocaciones del sustrato y fosforilación oxidativa, reduciendo el pH intracelular (Baird-Parker, 1980).

En la Figura 5.2 se muestra el rendimiento de biomasa contra sustrato consumido, de las cepas analizadas. Se aprecia que 16 cepas de los diferentes grupos, presentan un rendimiento mayor o igual a 0.15 g biomasa/ g de glucosa o bien 27 g de bacterias/ mol de glucosa, dentro de las que destacan son las cepas B19 y B22 que pertenecen al grupo III, las cuales presentaron un rendimiento mayor de 0.2 g de biomasa/ g de glucosa (36 g de bacterias/ mol de glucosa). Las 3 cepas restantes se encontraron con rendimientos menores a 0.15 g de biomasa/ g de glucosa, de las que, 2 cepas pertenecen al grupo I y 1 al grupo V.

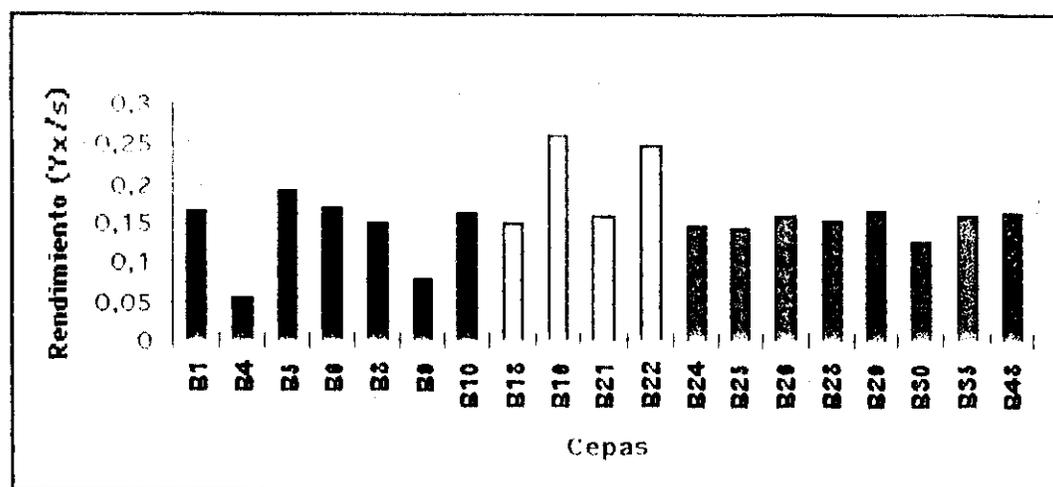


Figura 5.2 Rendimiento de biomasa contra sustrato consumido. Grupo I, azul fuerte; grupo III, amarillo; grupo IV, rosa; grupo V, azul claro; grupo VI, verde; grupo IX, rojo.

El crecimiento y la formación de productos por microorganismos, son procesos de bioconversión en los cuales los nutrientes químicos son asimilados en la fermentación y son convertidos en masa celular y metabolitos. Estas conversiones pueden ser cuantificadas por un coeficiente de rendimiento expresado como la masa de células formadas por unidad de masa de nutriente consumido $Y_{x/s}$ (Wang, 1979). En la fermentación homoláctica se reportan como buenos rendimientos los que se encuentran en 0.1 g de biomasa/ g de glucosa o bien 18 g de bacterias/ mol de glucosa fermentada, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este estudio.

Con la bacteria láctica *Streptococcus faecalis*, Bauchop y Elsdén (1960) determinaron un rendimiento de 22 g de *S. faecalis*/ mol de glucosa (0.12 g de biomasa/ g de glucosa). Cuando las bacterias lácticas aerotolerantes crecen en aire, el rendimiento es usualmente más alto que bajo condiciones de anaerobiosis. Para *S. faecalis* los rendimientos se incrementan de 22 a 52 g de *S. faecalis*/ mol de glucosa, o bien 0.28 g de biomasa/ g de glucosa (Gottschalk, 1979). Hayashi y Kozaki (1980), encontraron un rendimiento para *S. bovis* de 36 g/ mol de glucosa fermentada (0.2 g de biomasa/ g de glucosa).

El metabolismo de tipo homofermentativo y heterofermentativo de cepas de bacterias aisladas puede ser fácilmente distinguible por análisis en HPLC (Figura 5.3). Las cepas que sólo producen ácido láctico por medio del ciclo de Embden-Meyerhof-Parnas (MacFaddin, 1993), 1.8 moles a partir de 1 mol glucosa, se califican como homofermentativas obligadas.

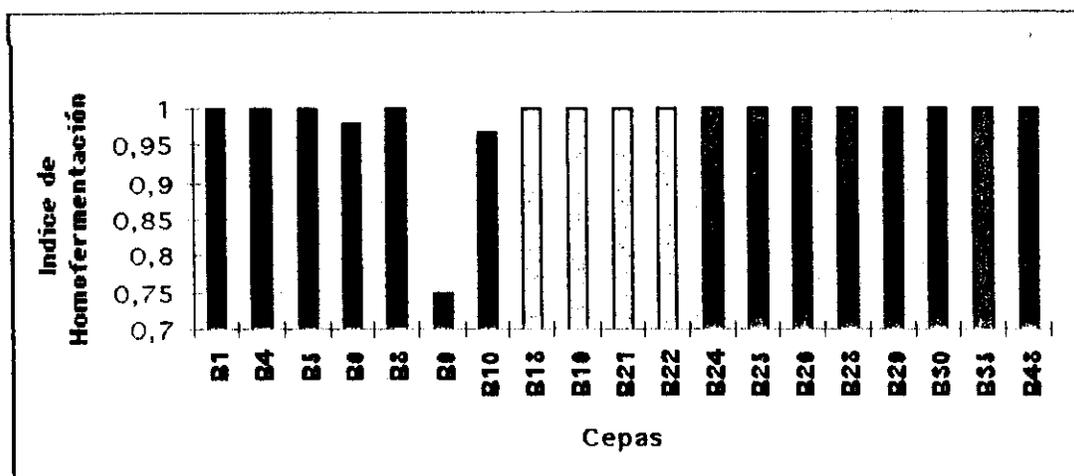


Figura 5.3 Índice de homofermentación de bacterias lácticas. Grupo I, azul fuerte; grupo III, amarillo; grupo IV, rosa; grupo V, azul claro; grupo VI, verde; grupo IX, rojo.

De las 19 cepas pertenecientes a los diferentes grupos, 16 presentaron un perfil homofermentativo estricto, con un índice de 100 % de homofermentación, el cual está expresado como la fracción de ácido láctico producido / total de productos. De las 3 restantes, que pertenecen al grupo I, B6 y B10 presentaron perfil heterofermentativo facultativo por la formación adicional de ácido acético además del ácido láctico (McDonald y col., 1991). Las que producen ácido láctico, ácido acético y/o etanol, se califican como heterofermentativas obligadas (Johansson y col., 1995). El caso de la cepa B9, presentó un metabolismo de tipo heterofermentativo obligado, ya que además del láctico, produjo ácido acético, ácido propiónico y etanol (Doelle, 1975; McCullough, 1977; Dellaolio y col., 1994).

5.1.3 Análisis enzimático de ácido L-láctico y glucosa residual

En la Figura 5.4 se observan los resultados en la producción de ácido láctico en su forma L, así como la glucosa residual, medidos en el analizador enzimático YSI. En el caso de 7 cepas pertenecientes a los grupos IV, V, VI y IX, la producción de L-láctico está por arriba de los 14 g/L entre las cuales, la cepa B30 (grupo V) consume toda la glucosa.

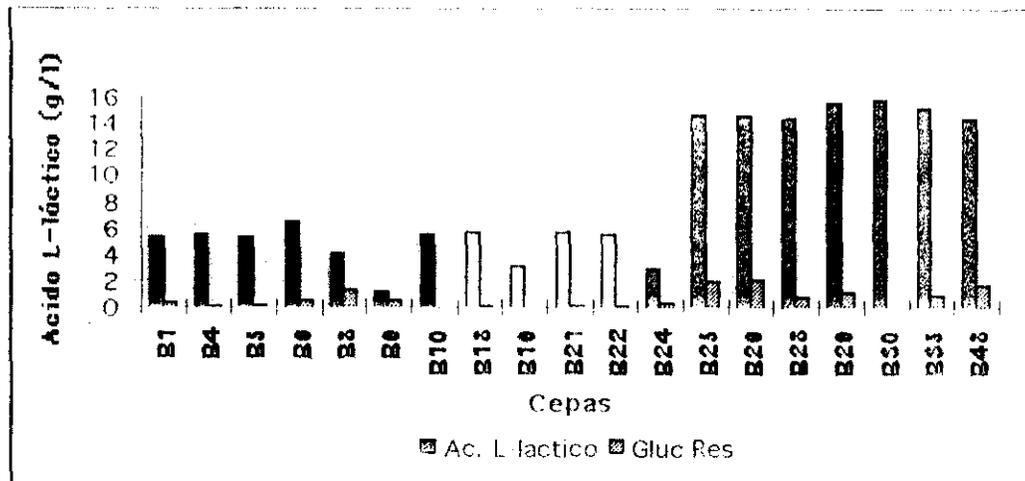


Figura 5.4 Producción de ácido L-láctico y glucosa residual. Grupo I, azul fuerte; grupo III, amarillo; grupo IV, rosa; grupo V, azul claro; grupo VI, verde; grupo IX, rojo.

Las otras 6 presentaron un consumo de glucosa superior al 88 %. De las 12 cepas restantes, 9 se situaron alrededor de los 5 y 6 g/l de ácido L-láctico producido, con un consumo de glucosa superior al 94 %; mientras que 3 cepas no pasan de los 4 g/l de L-láctico, con un consumo de glucosa superior al 95 %. La concentración inicial de glucosa y de ácido L-láctico en el medio MRS líquido, fue de 17 y 0.8 g/l, respectivamente.

Durante la fermentación de azúcares, diferentes especies de bacterias lácticas producen exclusivamente L- o D-láctico, aproximadamente en iguales cantidades de ambos o predominantemente una forma, pero en ciertas cantidades el otro (Garvie, 1980; Kandler y Weiss, 1986; Schleifer, 1986). Esto depende de la presencia de lactato deshidrogenasas específicas NAD⁺-dependientes (mlDII) y sus respectivas actividades. Pocas especies como *Lb. curvatus* y *Lb. sakei*, producen una enzima, la racemasa, que convierte L-láctico a D-láctico. En este caso, el ácido L-láctico inicialmente producido induce la racemasa, lo que resulta en una mezcla de ácido D y L-láctico (Garvie, 1980).

5.1.4 Pruebas enzimáticas por el sistema APIZYM

Para llevar a cabo esta prueba, así como la de API 50 CH y la restricción del DNA, se seleccionaron las 10 cepas que crecieron en medio MRS sólido usando como fuente de carbono ácido tánico, que es un compuesto tóxico y MRS con pectina, que es un polímero de difícil asimilación (Tabla 5.3). Los resultados obtenidos en las pruebas de APIZYM, de la Tabla 5.4, muestran que las cepas de bacterias lácticas presentan varias enzimas constitutivas. Las lecturas de la galería se tomaron con referencia a una tabla colorimétrica incluida en la misma. Se tomó en cuenta la intensidad del color de acuerdo a los números descritos a continuación: 0 = Negativo; 1 = 5 nmol; 2 = 10 nmol; 3 = 20 nmol; 4 = 30 nmol; 5 = Positivo \geq 40 nmol.

Tabla 5.4 Resultados obtenidos en las pruebas por el sistema APIZYM.

Apizym	B1	B8	B9	B18	B19	B25a	B25b	B26	B29	B30	B48
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fosfatasa alcalina	0.5	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Esterasa (C4)	2	1	2	1	1	2	3	3	3	4	3
Esterasa lipasa (C8)	2	1	1	1	0.5	1	3	3	4	4	4
Lipasa (C14)	0.5	0.5	0	0.5	0	0	0	0	1	0.5	0.5
Leucina arilamidasa	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5
Valina arilamidasa	4	5	4	3	4	3	5	5	5	5	5
Cisteina arilamidasa	0.5	0.5	1	0.5	1	0.5	1	1	1	1	1
Tripsina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α -chymotripsina	0	0	0	0	0	0	0.5	0.5	1	0.5	0.5
Fosfatasa ácida	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
Naftol-AS-BI-fosfo	3	2	2	0.5	2	2	2	2	2	4	1
α -Galactosidasa	5	2	1	0	1	2	0.5	0.5	1	1	0
β -Galactosidasa	5	5	5	5	5	5	3	2	3	5	3
β -Glucuronidasa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α -Glucosidasa	4	4	3	0.5	1.5	4	3	2	5	5	5
β -Glucosidasa	5	5	4	4	5	5	2	1.5	3	2	2
N-acetil- β -glucoamidasa	5	5	5	4	5	5	0	0	0	0	0
α -manosidasa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α -fucosidasa	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.5	0.5

Estas cepas fueron incapaces de producir tripsina, β -Glucuronidasa y α -manosidasa, aunque se aprecia que para enzimas como leucina arilamidasa, valina arilamidasa, β -galactosidasa, α y β

glucosidasa, las cepas mostraron muy buena actividad catalítica. Las bacterias lácticas son exigentes y para su desarrollo necesitan de varios aminoácidos y vitaminas, ya que su presencia permite activar la multiplicación celular de las bacterias. Para su crecimiento son indispensables aminoácidos como la leucina, la valina, el ácido glutámico, la arginina, la tirosina y el triptofano; vitaminas como el pantotenato y la niacina, así como cantidades no despreciables de Mn^{2+} y de Fe^{2+} (Ledezma y col., 1977). Esto comprueba porque las cepas fueron capaces de mostrar una actividad enzimática para las enzimas antes mencionadas.

También es importante señalar que en el metabolismo homofermentativo, la β -galactosidasa tiene un papel preponderante cuando la lactosa es usada como fuente de carbono, esta es tomada del medio por una permeasa ATP-dependiente (muchos lactobacilos y *Streptococcus thermophilus*), es primero convertida en glucosa y galactosa por la β -galactosidasa, o cuando es tomada del medio por la acción del sistema fosfoenolpiruvato-dependiente fosfotransferasa (PEP-PTS), es hidrolizada en glucosa y galactosa 6-fosfato por la fosfo- β -galactosidasa. La galactosa libre es primero fosforilada y después metabolizada a glucosa 6-fosfato por la ruta Leloir y finalmente a lactato por la ruta glucolítica, la galactosa 6-fosfato es utilizada a través de la ruta tagatosa 6-fosfato resultando en la producción adicional de ácido láctico (Kandler, 1983). El uso de este sistema permitió conocer la actividad enzimática de las bacterias lácticas, lo que sumado al resto de las pruebas realizadas completó la caracterización de estas cepas.

5.1.5 Perfiles de la fermentación de carbohidratos por el Sistema API50 CH

En la tabla 5.5 se muestran los perfiles de la fermentación de carbohidratos por el sistema API 50 CH. De acuerdo con estos perfiles, las cepas B9, B19, B25a, B48, B1 y B8 corresponden a la especie *Lactobacillus plantarum*. De estas cepas, B48 mostró un perfil dudoso y B1 mostró un perfil bueno, mientras que el resto mostraron perfiles de identificación muy buenos. Cabe señalar que en las pruebas realizadas en HPLC, la cepa B9 reunió todas las características de una bacteria láctica heterofermentativa (formación adicional de ácido acético, ácido propiónico y

etanol), lo cual no concuerda con los resultados del perfil de identificación generado por el sistema API 50 CH.

Estudios previos han mostrado que las pruebas fenotípicas analizadas por este sistema, pueden dar relativamente amplias variaciones en los perfiles de fermentación entre las mismas especies (Molin y col., 1992, 1993), lo cual puede conducir a confusiones en los resultados de la identificación. Las cepas B18 y B26 corresponden a *Lactobacillus plantarum* 1, la primera mostró un perfil con una excelente identificación y la segunda con un perfil dudoso. La cepa B29 corresponde a *Lactobacillus paracasei* 1, la cual mostró una excelente identificación, mientras que la cepa B30 corresponde a *Lactobacillus paracasei paracasei*, que mostró un perfil de identificación dudoso. La cepa B25b mostró un perfil inaceptable probablemente porque la cepa provenía de una colonia impura.

Cabe señalar que ninguna de estas cepas fue capaz de fermentar carbohidratos tales como: Glicerol, Eritritol, D-arabinosa, L-xilosa, α -metil-D-glucosido, Almidón, Glucógeno, Xilitol, D-lixosa, D y L fucosa, D y L arabitol, 2 y 5 ceto-gluconato. Es importante señalar que autores como Agati y col. (1998) usaron el sistema API 50 CH para determinar el perfil fermentativo de carbohidratos de 12 aislados de maíz fermentado (ogi y mawè) para confirmar los resultados obtenidos por la técnica de restricción de DNA (RFLP) y la posterior identificación de las cepas, encontrando con ello 2 nuevas cepas de bacterias amilolíticas.

Johansson y col. (1995) aislaron cepas de ogi, junto con otras cepas de referencia y las clasificaron fenotípicamente de acuerdo a la habilidad para fermentar los 49 carbohidratos del sistema, encontrando 7 grandes grupos con un nivel de similitud de 82 %. Figueroa y col. (1995) también usaron el sistema para la caracterización de 3 colecciones de cepas aisladas de la fermentación de yuca agria, encontrando que muchas pertenecen a diferentes especies de *Lactobacillus*.

Tabla 5.5 Perfiles de la fermentación de carbohidratos por el sistema API 50 CH.

API 50 CH	B1	B8	B9	B18	B19	B25a	B25b	B26	B29	B30	B48
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabinosa	+	+	+	+	+	+	-	?	-	+	+
Ribosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-xilosa	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
L-xilosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
β-metil-xilosido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-fructosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorbosa	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-
Ramnosa	?	?	?	-	-	?	-	-	-	-	?
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α-metil-D-manosido	+	+	+	+	+	+	-	-	-	?	-
α-metil-D-glucosido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N acetil-glucosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amigdalina	+	+	+	+	+	+	?	+	+	+	+
Arbutina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicilina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melobiosa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Trealosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Melezitosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-rafinosa	+	+	+	?	+	+	+	+	-	-	+
Almidón	-	-	-	-	-	-	?	-	-	-	-
Glucogeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-gentibiosa	+	+	+	+	+	?	?	+	+	+	+
D-turanosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-lixosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-tagatosa	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
D-fucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-fucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabitol	-	-	?	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconato	+	?	+	?	?	?	?	+	+	?	+
2-ceto-gluconato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-ceto-gluconato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Conclusión API	Lbpl	Lbpl	Lbpl	Lbpl1	Lbpl	Lbpl	?	Lbpl1	Lbpa1	Lbpp	Lbpl
Comentario	B1	MB1	MB1	Ex Id	MB1	MB1	Inac	Du Id	Ex Id	Du Id	Du Id
% Identificación	0.998	0.992	0.999	0.999	0.963	0.999	?	0.995	0.999	0.994	0.998

Bi: Bacteria; **Lbpa1:** *Lactobacillus paracasei* 1; **Lbpp:** *Lactobacillus paracasei paracasei*; **Lbpl:** *Lactobacillus plantarum*; **Lbpl1:** *Lactobacillus plantarum* 1; **Ex Id:** Excelente Identificación; **MBI:** Muy Buena Identificación; **BI:** Buena Identificación; **Du Id:** Dudosa Identificación; **Inac:** Inaceptable; **?:** Resultado confuso.

5.1.6 Análisis de los perfiles de restricción (RFLP) de cepas de bacterias lácticas

Entre los procedimientos clásicos para la clasificación de cepas, las pruebas bioquímicas o las características nutricionales, no son suficientes para distinguir cepas de las mismas especies. De entre varias técnicas moleculares desarrolladas, el análisis de restricción por endonucleasa del genoma bacteriano ha mostrado ser una herramienta útil para la diferenciación de bacterias. Por éste método simple y rápido, es posible observar diferencias reproducibles entre cepas (Le Bourgeois y col., 1993).

Se presentaron claras diferencias en los perfiles de las cepas de bacterias lácticas. En la Figura 5.5 se observan los perfiles de 9 de las 10 cepas sometidas a esta prueba, el carril 1 corresponde al marcador. Se aprecia que, las cepas B29, B48 y B26 son similares, lo que da indicios de pertenecer a la misma cepa. En los resultados arrojados con el sistema API 50 CH, el perfil de la fermentación de carbohidratos es diferente para cada una de ellas, aunque el perfil de las cepas B48 (*Lactobacillus plantarum*) y B26 (*Lactobacillus plantarum* 1) fueron dudosos, mientras que el perfil de la cepa B29 (*Lactobacillus paracasei* 1) mostró una excelente identificación.

El otro grupo con características similares entre sí, son las cepas B18 y B19, así como el grupo de las cepas B9 y B1 (por el sistema API 50 CH, ambas resultaron ser *Lactobacillus plantarum*, con perfiles de identificación muy bueno y bueno, respectivamente). La cepa B30 (*Lactobacillus paracasei paracasei*) resultó ser diferente a los tres grupos anteriores, mientras que la cepa B8 (por API 50 CH mostró un perfil de identificación muy bueno para *Lactobacillus plantarum*) fue diferente a los tres grupos anteriores, así como también resultó ser diferente de la cepa B30. Esta

técnica ha sido empleada por autores tales como Agati y col., (1998), que aislaron 12 cepas de bacterias lácticas amilolíticas heterofermentativas de procesos fermentativos de masa agria de maiz (conocida como ogi y mawè). Estas cepas fueron sometidas a perfiles de restricción de DNA y comparadas con perfiles de fermentación de carbohidratos. Con la técnica de restricción fue posible la discriminación de cepas entre los 12 aislados presentados y con la ayuda de los perfiles de fermentación se encontraron 2 nuevas cepas de bacterias lácticas amilolíticas, Ogi E1 y Mw2. Villani y col. (1997) encontraron diferencias en los perfiles de restricción de cepas de *Leucomostoc mesenteroides* aisladas de pasto del campo, suero de leche y leche de bufalo, mientras que Díaz (1999) encontró 13 perfiles de restricción diferentes en cepas aisladas del pozol.

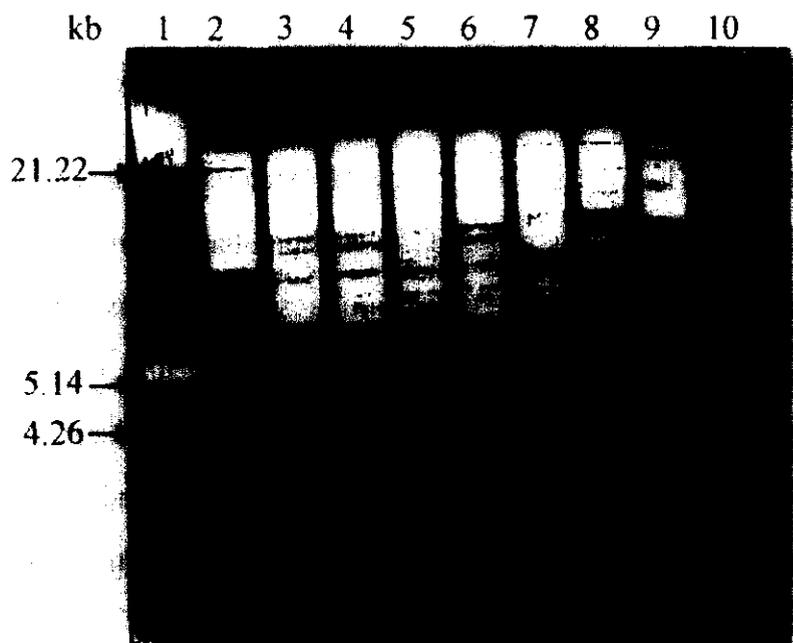


Figura 5.5 Perfiles de restricción del DNA de cepas de bacterias lácticas. En el carril 1 se encuentra el marcador, en el 2 la cepa B29, en el 3 la B9, en el 4 la B18, en el 5 la 30, en el 6 la B19, en el 7 la B48, en el 8 la B26, en el 9 la B1 y en el 10 la B8.

La selección de las bacterias usadas como inóculo en el proceso de ensilaje para la conservación de pulpa de café fue como se menciona a continuación: se aislaron 50 cepas de bacterias, las cuales se sometieron a distintas pruebas bioquímicas, de las que 31 cepas mostraron todas las características de las bacterias lácticas.

Por razones prácticas, se trabajó sólo con 19 cepas, a las que se les realizaron perfiles de fermentación, rendimiento, así como también se hicieron crecer en medios con MRS pectina y MRS tánico, de las cuales 10 cepas pudieron crecer en presencia de estos compuestos, razón por la cual se seleccionaron para realizarles análisis de enzimas por el sistema APIZYM, el perfil de carbohidratos por el sistema API 50 CH y el perfil restricción del DNA.

De acuerdo con estos resultados, y al resto que se había obtenido con anterioridad, se decidió aplicar como inóculo a la pulpa de café, a las cepas B18 y B29 por la excelente identificación que se obtuvo por el sistema API 50 CH, así como por los resultados del índice de homofermentación, rendimiento, por su crecimiento en presencia de pectina y en ácido tánico, así como por el resto de los resultados de las otras pruebas.

5.2 Aplicación de inoculantes de bacterias lácticas en la conservación de pulpa de café por el proceso de ensilaje

Como se mencionó en la sección 4.4.2 del capítulo 4, se utilizaron como inóculo para el ensilaje, dos cepas de bacterias lácticas, la B29 y B18, con el fin de acelerar la fermentación y por lo tanto conservar la pulpa. Estas cepas fueron aisladas de ensilajes de pulpa de café, y fueron seleccionadas para usarse como inóculo, por haber obtenido una excelente identificación en los perfiles de fermentación de carbohidratos, así como por los buenos resultados obtenidos en la caracterización fenotípica a las que fueron sometidas dichas cepas. Se utilizó como sustrato pulpa de café fresca, el proceso se describe en la sección 5.1 del capítulo 4 de Material y Métodos.

5.2.1 Parámetros físico-químicos de los ensilajes naturales e inoculados

Diferentes parámetros tales como: el pH, la producción de ácido láctico y de ácidos grasos volátiles, la humedad, los azúcares totales, el etanol y la pérdida de materia seca, se siguieron en el transcurso de la fermentación. En cada una de las cinéticas se encuentran representados los perfiles de los parámetros de los 5 diferentes ensilajes llevados a cabo; natural 1 (NA1) y natural 2 (NA2), que fueron los controles, inoculado al 3 % con la cepa B29 (B293), inoculados al 3 y 10 % con la cepa B18 (B183 y B1810, respectivamente).

5.2.1.1 Evolución de los azúcares totales

Los principales azúcares presentes en la pulpa de café son la fructosa, que constituye aproximadamente el 50 % de los azúcares libres, la glucosa que representa el 30 %, y el 20 % restante son sacarosa y galactosa (Zuluaga, 1981). En la Figura 5.6, se observan los perfiles de los azúcares en el transcurso del ensilaje. Se aprecia que los azúcares libres se encuentran entre un 25 y 40 % MS, y son consumidos casi en su totalidad al final de la fermentación, la glucosa se agota primero por ser la que se encuentra en menor cantidad.

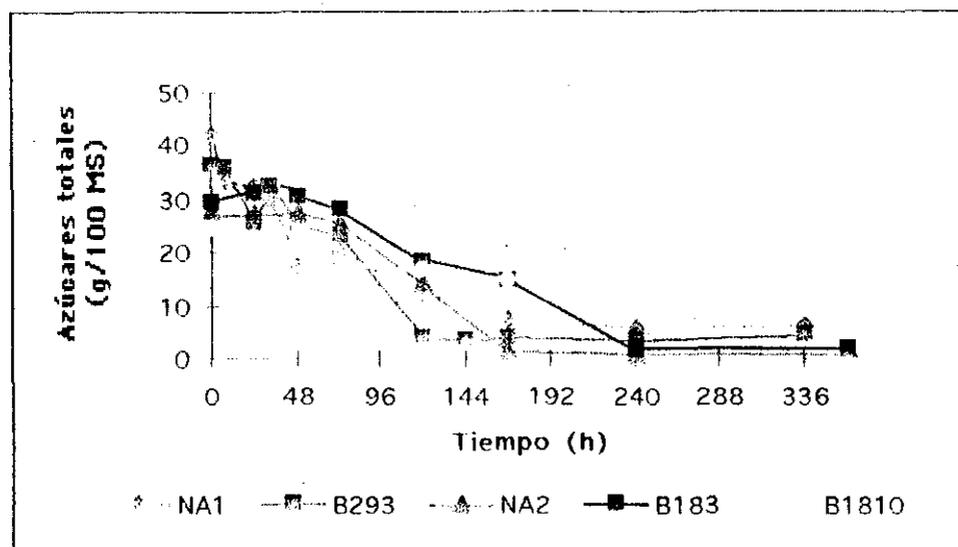


Figura 5.6 Cambios en el contenido de azúcares totales de los ensilajes de pulpa de café.

Donde: NA1: Testigo para ensayo con la cepa B29; NA2: Testigo para ensayos con la cepa B18; B293: Ensayo con la cepa B29 inoculando al 3 % (V:P); B183: Ensayo con la cepa B18 inoculando al 3 % (V:P); B1810: Ensayo con la cepa B18 inoculando al 10 % (V:P).

Durante las primeras 72 h se observa una disminución de los azúcares en todos los ensilajes. El perfil del ensilaje natural 1 presentó una concentración inicial de 42.1 % MS, 27.1 de fructosa y 15 de glucosa, a las 72 h disminuyó a 20.1 % MS, de los que 12.3 % eran fructosa y 7.8 % glucosa, en las horas posteriores la glucosa se agotó totalmente a las 240 h quedando una concentración final de fructosa de 6.5 % MS. En el natural 2 los azúcares se consumen lentamente hasta las 72 h, donde se observó un marcado descenso que llegó a las 168 h a una cantidad de 1.5 % MS de los que 0.1 % eran glucosa, la cual se agotó en las horas posteriores y quedó 1.9 % MS de fructosa al final de la fermentación.

El ensilaje inoculado al 3 % con la cepa B29 presentó una concentración inicial de azúcares totales de 36.1 % MS en el que 21.6 % correspondían a fructosa y 14.5 % a glucosa. Hasta las 72 h disminuyeron a una cantidad de 22.9 % MS (13.6 % fructosa y 9.4 % glucosa), y se presentó una

gran disminución a las 120 h donde llegó a una cantidad de 4 % MS, de los que 1.4 % eran glucosa, la cual se agotó a las 144 h para quedar al final de la fermentación una concentración de fructosa de 4.3 % MS.

En los ensilajes inoculados al 3 y 10 % con la cepa B18, los azúcares presentaron el mismo perfil que el natural 2 durante las primeras 72 h, los que se ven consumidos lentamente, el del 3 % presentó una cantidad de azúcares inicial de 29.3 % MS (16.8 % fructosa y 12.5 % glucosa). A las 240 h la glucosa fue consumida por completo quedando al final 1.9 % MS de fructosa, mientras que el del 10 %, presentó una concentración inicial de azúcares totales de 24.5 % MS (15 % fructosa y 9.5 % glucosa), donde los azúcares no se agotaron en su totalidad, ya que finalizaron en 7.1 % MS (3.3 % fructosa y 3.8 % glucosa), probablemente debido al retardo en la aparición de las levaduras por el efecto de la inoculación. El hecho de que menos carbohidratos fueran consumidos en el ensilaje inoculado al 10 % con la cepa B18, comparado con los ensilajes naturales e incluso con los otros inoculados, puede indicar una fermentación más eficiente (Rooke y col., 1985; Weinberg y col., 1988).

El gran contenido en azúcares influye directamente en la evolución de la fermentación láctica (Pettersson y Lindgren, 1990). De acuerdo con lo mencionado en bibliografía una concentración de azúcares entre 12 y 13 % MS es necesario para obtener un ensilaje de buena calidad (Demarquilly, 1985; Gouet, 1994). En estos resultados, se aprecia que la cantidad inicial de azúcares presentes en los ensilajes de pulpa de café fresca es elevada (de 25 a 40 % MS) sobrepasando en algunos casos la cantidad reportada por Zuluaga (1981). Gaime-Perraud (1995) encontró que en pulpa de café secada al sol, las concentraciones iniciales de glucosa más fructosa estaban alrededor del 5 % MS, mientras que Delgado-Vidal (1999) encontró en pulpa secada al sol una concentración de azúcares de 33.2 % MS y en pulpa fresca 38.4 % MS, este último valor coincide con los resultados obtenidos para ensilajes de pulpa de café fresca en el presente trabajo.

5.2.1.2 Evolución del pH

La pulpa de café es un subproducto con un pH de 4.8 (Ramírez-Martínez y Clifford, 1990) por lo que se considera un material naturalmente ácido. En la cinética de pH que se presenta en la Figura 5.7, se observan los perfiles de los 5 ensilajes, donde se aprecia que en el caso del ensilaje que fue inoculado con la cepa B29 presentó una caída de pH más rápida durante las primeras 48 h (pH 3.42), el cambio fue más notable que en los demás casos, debido probablemente a que se inoculó con la cepa identificada como *Lactobacillus paracasei*, que alcanzó valores menores de pH, los cuales se mantuvieron alrededor de 3.26 y 3.40.

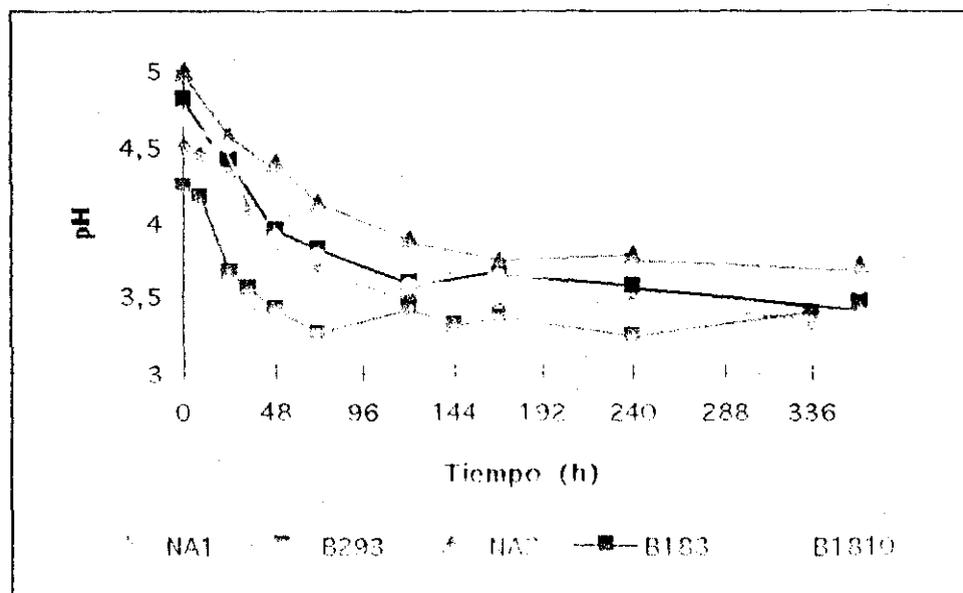


Figura 5.7 Cambios en el pH.

Donde: NA1: Testigo para ensayo con la cepa B29; NA2: Testigo para ensayos con la cepa B18; B293: Ensayo con la cepa B29 inoculando al 3 % (V:P); B183: Ensayo con la cepa B18 inoculando al 3 % (V:P); B1810: Ensayo con la cepa B18 inoculando al 10 % (V:P).

En los casos naturales 1 y 2, se observó una diferencia entre ellos, ya que el natural 1 presentó un pH inicial menor (4.49) que el del natural 2, que presentó un pH inicial de 5, los cuales en el transcurso de la fermentación disminuyeron presentando pH finales de 3.35 y 3.71 respectivamente. En los ensilajes inoculados al 3 y 10 % con la cepa B18, identificada como un *Lactobacillus plantarum*, no se presentaron diferencias a pesar de que el segundo fue inoculado a un mayor porcentaje. Al inicio de la fermentación el inoculado al 3 %, presentó un pH de 4.81, mientras que el pH del inoculado al 10 % fue ligeramente menor (4.69). En el transcurso del ensilaje el pH de ambos disminuyó presentando un perfil muy parecido, excepto que a las 240 h el inoculado al 10 % presentó un ligero incremento para terminar a las 360 h en un pH de 3.56 que es mayor al que presentó el inoculado al 3 % que terminó con un pH de 3.47.

Los valores de pH se sitúan dentro de lo reportado en bibliografía (Brookes y Buckle, 1992; Weinberg y col., 1995; Mahanna, 1996; Rutherford, 1998), donde se llegó incluso a valores de pH menores que los presentados por Gaime-Perraud (1995) con ensilajes de pulpa de café secada al sol (pH alrededor de 3.9), así como en los obtenidos por Delgado-Vidal en pulpa ensilada (pH de 3.9).

5.2.1.3 Producción de ácido láctico

La formación de ácido láctico es un indicador de la fermentación láctica y por lo tanto del éxito del ensilaje (Megias y col., 1993b). La producción de ácido láctico fue más evidente en los casos en los que hubo inoculación, ya que ésta aumentó desde el inicio de la fermentación (Figura 5.8).

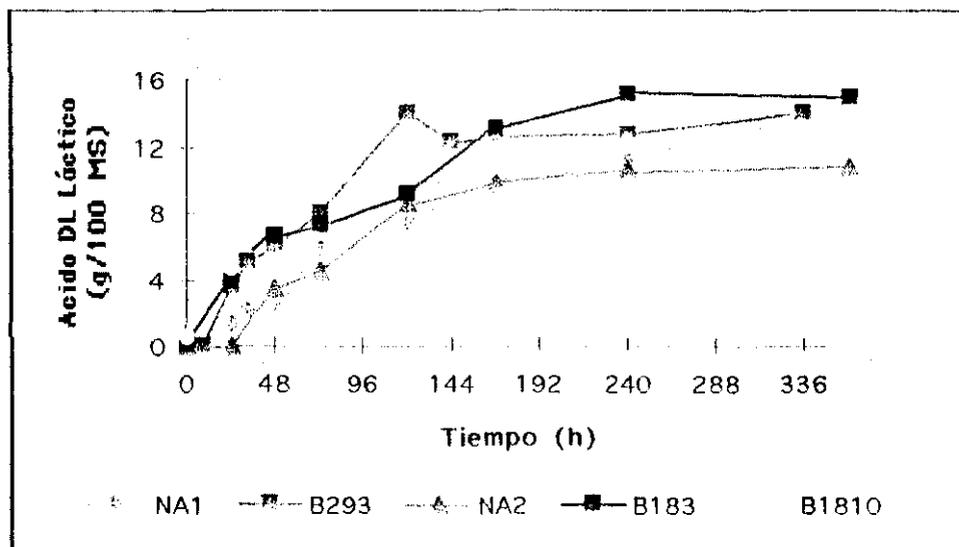


Figura 5.8 Producción de ácido DL láctico de los ensilajes naturales e inoculados.

Donde: NA1: Testigo para ensayo con la cepa B29; NA2: Testigo para ensayos con la cepa B18; B293: Ensayo con la cepa B29 inoculando al 3 % (V:P); B183: Ensayo con la cepa B18 inoculando al 3 % (V:P); B1810: Ensayo con la cepa B18 inoculando al 10 % (V:P).

A las 72 h, el inoculado al 10 % con la cepa B18 presentó una producción de 9,5 % MS, el ácido L-láctico en una proporción de 3,8 %, incrementándose en las horas siguientes para finalizar a las 360 h con un nivel de láctico total de 12,4 % MS y 5,2 % MS de L-láctico.

En el inoculado al 3 % con la cepa B29, se llegó a un 8 % MS a las 72 h, y L-láctico de 4,8 % MS, pero a las 120 h presentó un importante incremento de casi el doble, que llegó a 14 % MS (L-láctico de 7,42), la producción se mantuvo con variaciones para finalizar con 13,9 % MS láctico total y L-láctico de 6,5 % MS.

Otro ensilado en el que hubo un importante incremento a las 168 h, fue en el inoculado al 3 % con la cepa B18, en el que la producción de láctico llegó a 13,1 % MS y L-láctico de 5,1 % MS.

incrementándose hacia el final de la fermentación hasta niveles de 15.1 y 15 % MS, a las 240 y 360 h respectivamente, mientras que la producción de L-láctico finalizó en 5.5 % MS.

Los ensilajes naturales 1 y 2, presentaron perfiles muy parecidos, con excepción de que al final de la fermentación del natural 1 se presentó un incremento en la producción de láctico finalizando en 13.8 % MS, siendo 5.6 % de L-láctico. El natural 2 finalizó con un nivel de DL láctico de 10.9 % MS (L-láctico de 4 % MS). Cabe mencionar que en el natural 1, también se detectó la presencia de ácido acético a las 168 h en una cantidad de 1.1 % MS finalizando en 1.6 % MS. Sin embargo, no se encontró ningún aparente efecto inhibitorio en las levaduras presentes, a partir de que el ácido acético fue detectado, por lo que no concuerda con lo mencionado por Moon (1983) y Weinberg y Muck (1996). No se detectó la presencia de ácido propiónico, así como tampoco de ácido butírico en ninguno de los ensilados, lo cual indica que, a excepción del ensilaje natural 1, los demás ensilados presentaron fermentaciones homolácticas.

En la Tabla 5.6 se observan las tasas de acidificación de los diferentes ensilajes, donde se aprecia que el que obtuvo una acidificación más rápida es el ensilaje inoculado al 10 % con la cepa B18, seguido por el inoculado con la cepa B29 al 3 %. Entre los ensilajes natural 2 e inoculado al 3 % con la cepa B18 no hay diferencias en la tasa de acidificación, más si las hay en la cantidad de láctico producido, ya que en el inoculado la cantidad de ácido láctico producido es mayor que en el natural 2. También se aprecia que el ensilaje que acidificó más lento fue el natural 1. Esto indica que el efecto de la inoculación en la tasa de acidificación fue positivo, sobre todo en el ensilaje inoculado con la cepa B18 al 10 %, en el que la tasa de inoculación fue un factor preponderante en la acidificación.

Tabla 5.6 Tasa de producción de ácido DL láctico de los ensilajes naturales e inoculados.

Ensilaje	Tasa de acidificación (g de láctico/100 MS.h)
Natural 1	0.05
Natural 2	0.06
Inoculado con la cepa B29 al 3 %	0.11
Inoculado con la cepa B18 al 3 %	0.06
Inoculado con la cepa B18 al 10 %	0.13

En la Figura 5.9 se muestra el rendimiento de producto contra sustrato consumido de los diferentes ensilajes, a las 240 h de fermentación. Se aprecia que el ensilaje que presentó mayor rendimiento fue el inoculado al 10 % con la cepa B18, con 0.98 g de ácido DL láctico / g de sustrato consumido (glucosa más fructosa).

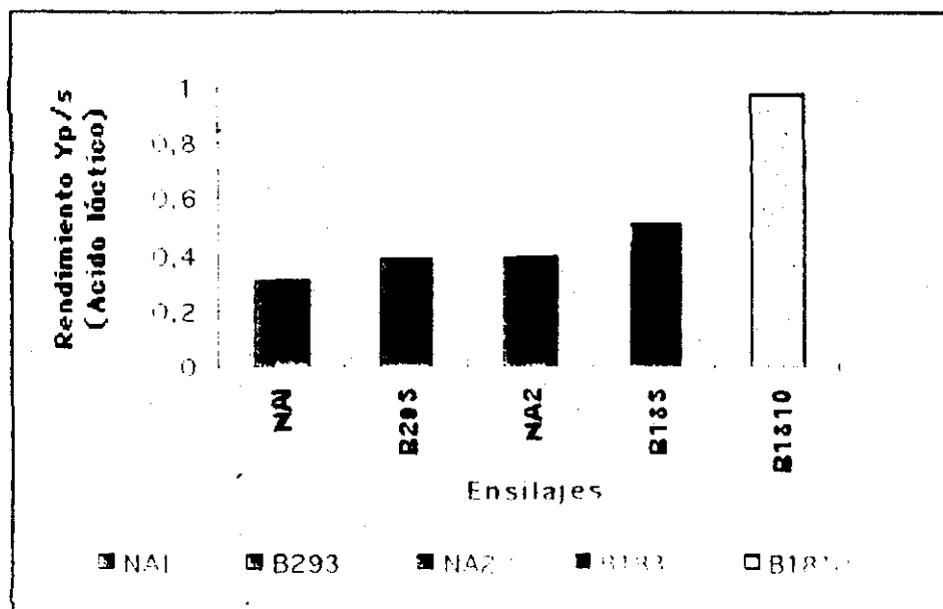


Figura 5.9 Rendimiento de ácido DL láctico contra sustrato consumido, a las 240 h de fermentación de los ensilajes.

Donde: NAI: Testigo para ensayo con la cepa B29; NA2: Testigo para ensayos con la cepa B18; B293: Ensayo con la cepa B29 inoculando al 3 % (V:P); B183: Ensayo con la cepa B18 inoculando al 3 % (V:P); B1810: Ensayo con la cepa B18 inoculando al 10 % (V:P).

Para el ensilaje inoculado al 3 % con la cepa B18, el rendimiento fue de 0.51 g de ácido DL láctico/ g de sustrato. Mientras que para el inoculado con la cepa B29 al 3 %, el rendimiento fue de 0.39 g de ácido DL láctico/ g de sustrato. Para los ensilajes naturales 1 y 2, los rendimientos fueron de 0.31 y 0.40 g de ácido DL láctico/ g de sustrato, respectivamente. Esto indica que, el efecto que tuvo la inoculación del 10 % con la cepa B18, fue notable por el buen rendimiento que presentó sobre los demás ensilajes.

Catchpoole y Henzel (1971), mencionan que los niveles de ácido láctico descritos como óptimos, se encuentran en una concentración comprendida entre 3 y 13 %. Por otro lado, Mahanna (1996), menciona que un ensilaje a mejor calidad es aquel en el que generalmente domina el ácido láctico a niveles entre 6 y 10 % de la materia seca del forraje. Los resultados obtenidos en la producción de ácido láctico coinciden con lo descrito por Luis y Ramirez (1985), así como por los de Megias y col., (1993a), en los que encontraron un alto desarrollo de bacterias lácticas durante los primeros días del ensilaje, llegando a una concentración máxima de ácido láctico en el sexto día y una subsecuente estabilización.

En estudios recientes realizados por Delgado-Vidal (1999), se encontró una cantidad de láctico a un nivel de 9.7 % MS, además de haber detectado una importante cantidad de ácido acético, 6.4 % MS, así como una concentración de ácido propiónico de 2.8 % MS, lo cual indica que este ensilaje fue dominado por bacterias lácticas heterofermentativas obligadas. En el presente trabajo los ensilajes inoculados alcanzaron niveles de ácido láctico alrededor de 7 % MS a las 48 horas, que se incrementaron en las horas siguientes, llegando en algunos casos a poco más del doble. Estos datos sobrepasan las cantidades en la producción de láctico recomendadas en bibliografía para un buen ensilaje.

5.2.1.4 Producción de etanol

Se presentó una producción de etanol en todos los ensilados (Figura 5.10). En el inoculado al 3% con la cepa B29 se detectó a las 72 h, llegando a una producción de 11.9% MS a las 120 h, poco más abajo que su producción en láctico, manteniéndose casi las mismas proporciones hasta el final del ensilaje.

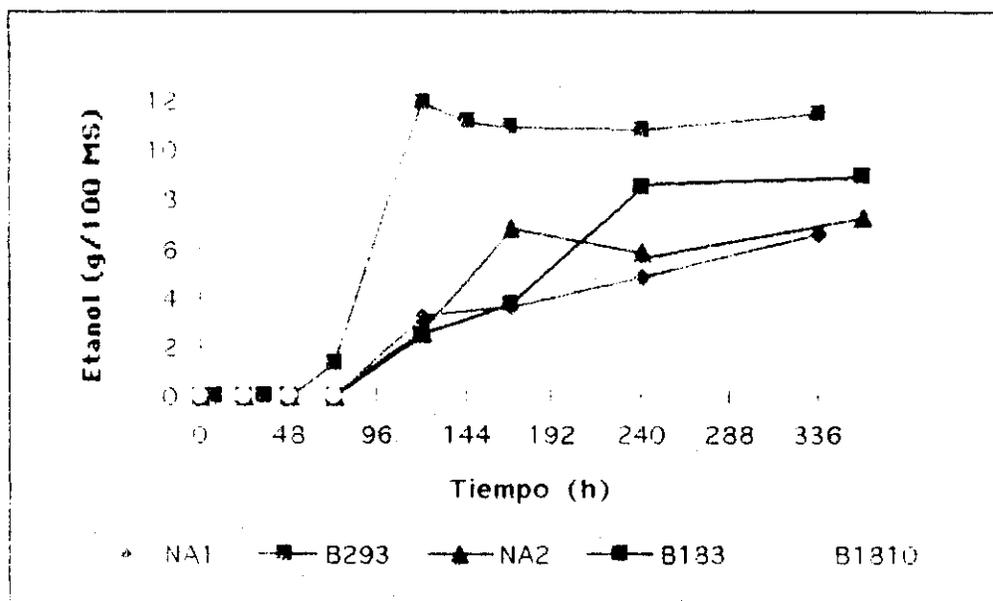


Figura 5.10 Producción de etanol en el transcurso de los ensilajes de pulpa de caté.

Donde: NA1: Testigo para ensayo con la cepa B29; NA2: Testigo para ensayos con la cepa B18; B293: Ensayo con la cepa B29 inoculando al 3% (V:P); B183: Ensayo con la cepa B18 inoculando al 3% (V:P); B1810: Ensayo con la cepa B18 inoculando al 10% (V:P).

En el inoculado al 3% con la cepa B18, la producción de etanol se presentó a partir de las 120 h, alcanzando un máximo de 8.5% MS a las 240 h, manteniéndose casi el mismo nivel a las 360 h. En el caso del inoculado al 10% con la cepa B18, cabe resaltar que se observa un retardo en la aparición del etanol, éste aparece hasta las 240 h, con un nivel de 1.3% MS, y se incrementa poco

más del doble (2.8 % MS) a las 360 h. En los ensilajes naturales 1 y 2, la aparición del etanol se observa a las 120 h, con algunas variaciones durante el resto de la fermentación en el natural 2, para llegar a una producción final de 7.3 % MS, mientras que en el natural 1 la producción de etanol aumentó hasta llegar a un final de 6.5 % MS.

En la Figura 5.11 se muestra el rendimiento de producto (etanol) contra sustrato consumido a las 240 h de fermentación en los diferentes ensilajes. Se observa que el inoculado al 3 % con la cepa B29, fue el ensilaje que presentó un mayor rendimiento (33 g de etanol / g de sustrato consumido). En el inoculado con la cepa B18 al 3 %, se presentó un rendimiento de 0.29 g de etanol / g de sustrato. Para los ensilajes naturales 1 y 2, los rendimientos fueron de 0.14 y 0.22 g de etanol / g de sustrato consumido. Mientras que, el ensilaje que presentó menor rendimiento fue el inoculado al 10 % con la cepa B18, con 0.11 g de etanol / g de sustrato consumido.

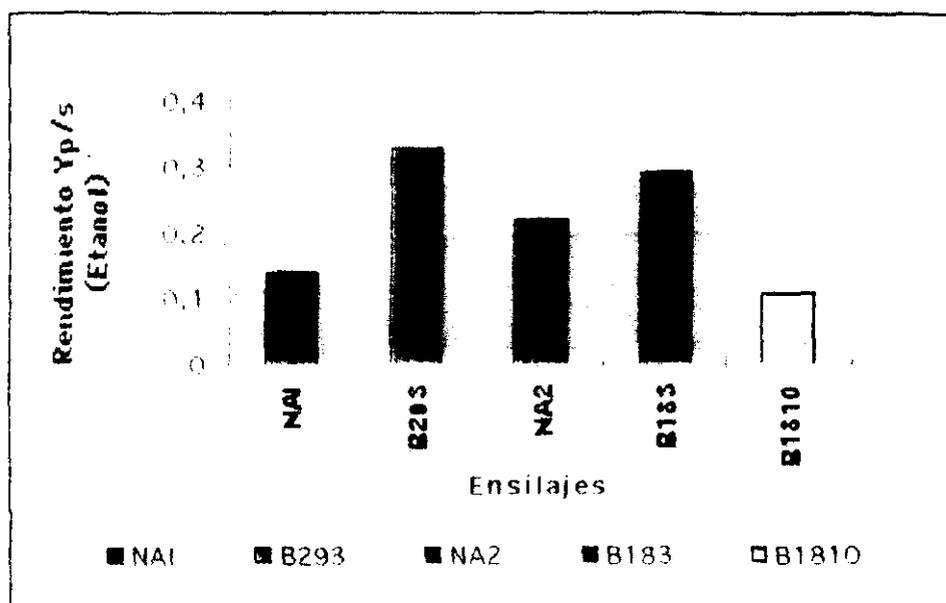


Figura 5.11 Rendimiento de etanol contra sustrato consumido, a las 240 h de fermentación en los ensilajes naturales e inoculados.

Donde: **NA1**: Testigo para ensayo con la cepa B29; **NA2**: Testigo para ensayos con la cepa B18; **B293**: Ensayo con la cepa B29 inoculando al 3 % (V:P); **B183**: Ensayo con la cepa B18 inoculando al 3 % (V:P); **B1810**: Ensayo con la cepa B18 inoculando al 10 % (V:P).

Estos resultados indican que la inoculación de los ensilajes al 3 %, con las cepas B29 y B18, así como el inoculado al 10 % con la cepa B18, no muestran resultados diferentes a los obtenidos en los ensilajes naturales, ya que ni aún el ensilaje con inóculo más fuerte logró frenar el desarrollo de levaduras y por tanto la aparición de etanol. Estas concentraciones indican que son debidas al crecimiento de levaduras o a una intensa actividad heterofermentativa (Weinberg y col., 1988), aunque esto último solo podría aplicarse al ensilaje natural 1, ya que fue en el único caso en que se detectó ácido acético.

5.2.1.5 Evolución de la humedad

Subproductos con alto contenido de humedad fermentan muy rápido, perdiendo parte de su valor nutricional durante la primera semana de ensilaje debido a la liberación de gases y al crecimiento de levaduras en el ensilaje (Ashbell y Lisker, 1987; Megías y col., 1993). El contenido de humedad de la pulpa de café al inicio de la fermentación, se encontró entre 80 y 82 % (Bressani y col., 1972) para los diferentes ensilados, lo cual se observa en la Figura 5.12.

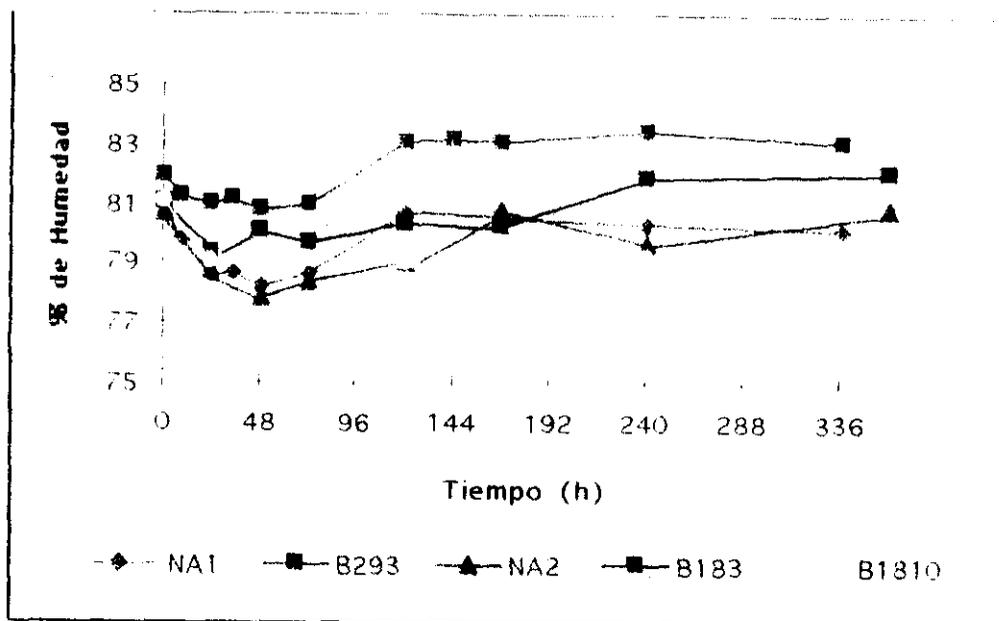


Figura 5.12 Evolución del contenido de humedad de los ensilajes de pulpa de café.

Donde: NA1: Testigo para ensayo con la cepa B29; NA2: Testigo para ensayos con la cepa B18; B293: Ensayo con la cepa B29 inoculando al 3 % (V:P); B183: Ensayo con la cepa B18 inoculando al 3 % (V:P); B1810: Ensayo con la cepa B18 inoculando al 10 % (V:P).

Estos porcentajes variaron durante los primeros 3 días, disminuyendo alrededor de 78 % en los naturales 1 y 2, y 81 % en el inoculado al 3 % con la cepa B29. Este porcentaje aumentó hasta 2 al quinto día en el natural 1 y el inoculado al 3 % con la cepa B29, manteniéndose estables a partir de este momento, mientras que el natural 2 presentó este mismo incremento hasta las 168 h. En los inoculados con la cepa B18, en el caso del 10 %, la humedad se mantuvo estable a partir del primer día con 79 % de humedad, con un ligero incremento a casi 80 % hacia el final de la fermentación, mientras que el inoculado al 3 %, se mantuvo estable a partir del primer día con una humedad alrededor de 79 %, con ligeras variaciones hasta las 168 h, incrementándose al final hasta un 81 % de humedad.

La humedad obtenida es muy similar a la reportada por Delgado-Vidal (1999), ella obtuvo una humedad de 81.4 % MS en pulpa fresca, mientras que en pulpa ensilada obtuvo 83.1 %. En silos con un alto contenido de humedad, el nivel de pH debe ser más bajo del usual, lo que explica el hecho de una subsecuente estabilización del proceso (Whittenbury y col., 1967). En este estudio, el ensilaje inoculado con la cepa B18 al 10 % logró una fácil estabilización, a pesar del gran contenido de humedad que mostró el ensilaje, lo cual presenta algunas dificultades en el proceso de preservación.

5.2.1.6 La pérdida de materia seca

En la Figura 5.13 se observa el perfil de la pérdida de materia seca. El caso del inoculado al 3 % con la cepa B29 fue el que presentó mayor pérdida.

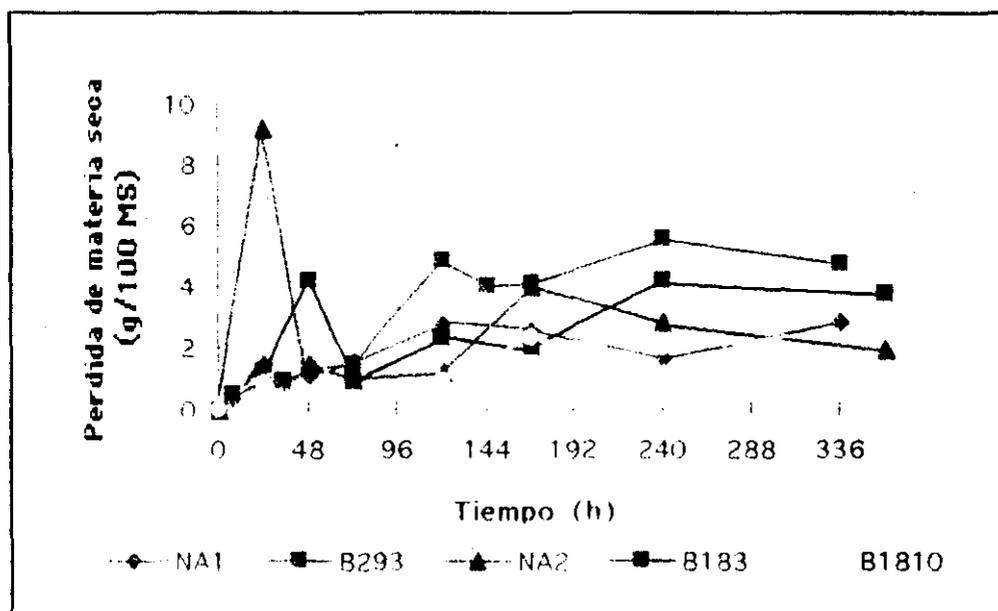


Figura 5.13 Pérdida de materia seca de los ensilajes naturales e inoculados.

Donde: **NA1**: Testigo para ensayo con la cepa B29; **NA2**: Testigo para ensayos con la cepa B18; **B293**: Ensayo con la cepa B29 inoculando al 3 % (V:P); **B183**: Ensayo con la cepa B18 inoculando al 3 % (V:P); **B1810**: Ensayo con la cepa B18 inoculando al 10 % (V:P).

Durante las primeras 72 h de la fermentación llegó alrededor del 2 % PMS. Este se estabilizó, más a las 120 h la pérdida se incrementó hasta 4.8 % y se mantuvo con variaciones para terminar en 4.7 % PMS. Este incremento se debió probablemente al desarrollo de levaduras, que al consumir los azúcares presentes en el sustrato provocaron una pérdida de materia seca de casi 5 %. En el inoculado al 3 % con la cepa B18, a las 48 h la PMS llega a 4.2 %, en las horas posteriores el porcentaje se mantuvo alrededor de ± 2 , volviendo a incrementarse a las 240 h por arriba de 4 para terminar en 3.8 %. En el natural 1 se mantuvo alrededor del 2 % PMS (valores entre 0.4 y 2.8) durante toda la fermentación. En el caso del ensilado natural 2, la muestra de las 24 h presentó una pérdida de 9.2 % (lo cual probablemente se deba a que esta muestra fue mal ensilada), de las 48 h hasta las 120 h el porcentaje se mantuvo alrededor de 1.5, aumentando a 4 % a las 168 h para terminar con 1.9 % al final de la fermentación.

El inoculado al 10 % con la cepa B18, el porcentaje de pérdida de materia seca se mantuvo durante toda la fermentación entre 0.9 y 2.8, por lo que fue uno de los ensilajes que presentó menos pérdida, debido a que el nivel de inóculo más alto retardó la aparición de las levaduras, por lo tanto menor consumo de los azúcares y en consecuencia menor porcentaje de pérdida de materia seca.

El otro ensilaje que presentó menos pérdida fue el natural 1, el cual presentó un perfil bastante similar al del inoculado al 10 % con la cepa B18, en cuanto a PMS. De acuerdo con lo reportado por Weinberg y Muck (1996), el inoculante pudo haber dominado la fermentación en los ensilajes tratados, pero el ensilaje control, en este caso el natural 1, fue similar. Por lo tanto, no se detectan efectos significativos del inoculante. Tal explicación no puede ser documentada, pero se ha sugerido que en ensilajes de maíz, por ejemplo, presenta naturalmente una alta proporción de

lactato:acetato, lo cual puede explicar la igualdad de resultados entre un ensilaje inoculado y un control.

Lin y col., (1992) han estudiado las bacterias lácticas epifíticas en ensilajes de maíz y alfalfa, concluyendo que el conocimiento del número y especies de bacterias lácticas, no predice el resultado de la fermentación del ensilaje, por lo tanto, la caracterización de las cepas de bacterias lácticas epifíticas y la composición química del forraje a ensilar, particularmente el perfil de los carbohidratos solubles y la capacidad amortiguadora. Esto no coincide con Pahlow (1991), quien menciona que el conocimiento del número y la naturaleza de la microflora láctica endógena inicial es necesaria para comprender el efecto y orientar la inoculación.

El porcentaje de recuperación de carbono se observa en la Tabla 5.7, donde se aprecia que para los ensilajes inoculados la recuperación de carbono al final de la fermentación fue casi total. Cabe mencionar que no se consideró el carbono de la pérdida de materia seca por tomarse como CO₂. El ensilaje inoculado con la cepa B29 al 3 %, presentó una recuperación de 91 % de carbono, correspondiendo 44 % al carbono del ácido láctico y 47 % al de etanol.

Tabla 5.7 Recuperación de carbono de los ensilajes naturales e inoculados.

Ensilajes	% de Recuperación de carbono
Natural 1	67
Natural 2	79
Inoculado con la cepa B29 al 3 %	91
Inoculado con la cepa B18 al 3 %	91
Inoculado con la cepa B18 al 10 %	89

Para el inoculado al 3 % con la cepa B18, la recuperación de carbono también es de 91 % (51 % de láctico y 40 % de etanol). El porcentaje de recuperación para el inoculado al 10 % con la cepa B18, fue de 89 % de carbono, de los cuales 68 % corresponde a láctico y 21 % a etanol. Mientras que, en el natural 2 se recuperó el 79 % (42 % a láctico y 37 % a etanol). En el natural 1 se

recupero el 67 % de carbono, correspondiendo 39 % a láctico, 24 % a etanol y 4 % a ácido acético. Cabe mencionar que no se tomó en cuenta el carbono de biomasa, ya que ésta no fue determinada.

5.2.1.7 Evolución de la microflora de los ensilajes naturales e inoculados

La microflora de bacterias y levaduras está representada en la Figura 5.14, donde se aprecia que las bacterias anaerobias de los ensilados naturales 1 y 2 se encontraron al inicio de la fermentación en 10^6 y 10^5 bacterias/g MS, respectivamente. Esta diferencia tal vez se deba a que el lote de pulpa con el que se ensiló el ensilado 2, se mantuvo congelado por más de 1 año, hecho que probablemente inhibió parte de la microflora natural de la pulpa fresca. Los perfiles de ambos fueron muy similares a partir de las 48 h, donde alcanzaron hasta 10^9 bacterias/g MS y se mantuvieron hasta 168 h, después empezaron a disminuir terminando en 10^8 y 10^7 bacterias/g MS respectivamente.

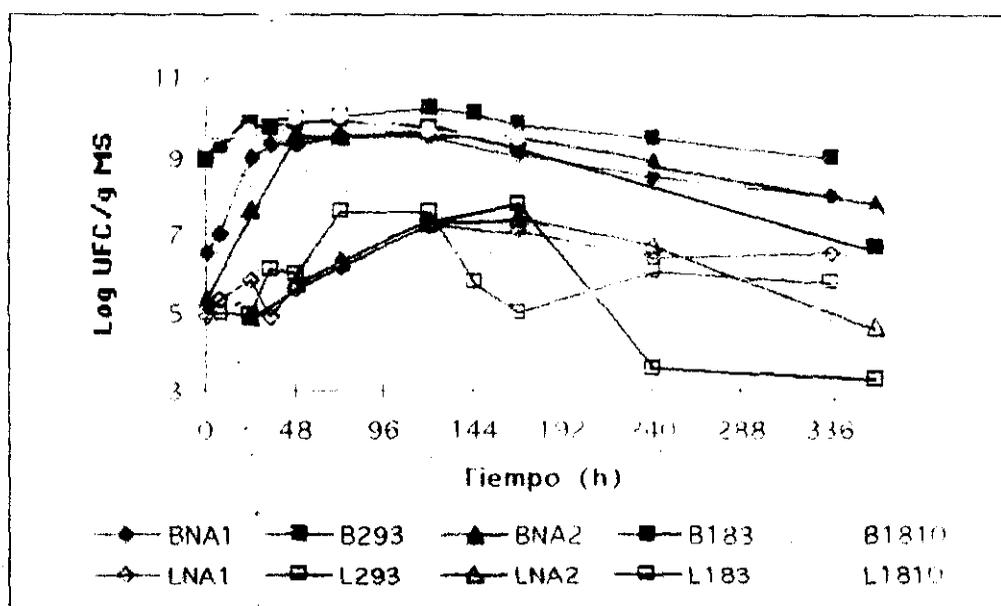


Figura 5.14 Evolución de bacterias y levaduras anaerobias de los ensilados naturales e inoculados.

Donde **BNA1**: Testigo para ensayo con la cepa B29; **BNA2**: Testigo para ensayos con la cepa B18; **B293**: Ensayo con la cepa B29 inoculando al 3 % (V:P); **B183**: Ensayo con la cepa B18 inoculando al 3 % (V:P); **B1810**: Ensayo con la cepa B18 inoculando al 10 % (V:P). La letra **L** es para diferenciar las levaduras de las bacterias.

En el caso de los inoculados con las cepas B29 y B18 (la primera al 3 % y la segunda al 3 y 10 %), todos los ensilajes se encontraron al inicio de la fermentación alrededor de 10^9 bacterias/ g MS, incrementándose hasta 10^{10} a las 72 h en los tres casos, lo cual indica la viabilidad de los inoculantes agregados. A partir de este momento los inoculados al 3 y 10 % con la cepa B18 se comportaron de la misma manera y se mantienen, excepto que al final de la fermentación el número de bacterias del inoculado al 10 % fue de 10^7 y el del inoculado al 3 % de 10^6 bacterias/ g MS, mientras que en el caso del inoculado al 3 % con la cepa B29 el número de bacterias se mantuvo casi constante hasta las 144 h y disminuyó para terminar en 10^8 bacterias/ g MS. Esto podría indicar que al haberse consumido el sustrato, las bacterias no se siguen multiplicando, pero se mantienen a pesar de ello.

En el caso de las levaduras anaerobias, estas se encontraron presentes desde el inicio de la fermentación en una proporción de 10^5 levaduras/ g MS en los 2 ensilajes naturales, así como en el inoculado al 3 % con la cepa B29. Hasta las 48 h las levaduras se mantuvieron alrededor de 10^5 / g MS en el natural 1, a partir de este momento se incrementaron a un nivel de 10^7 levaduras/ g MS a las 120 h para finalizar en 10^6 . A diferencia del natural 1, en el 2, las levaduras no presentaron variaciones las primeras 48 h, sino que se mantuvieron en un nivel de poco menos 10^5 levaduras/ g MS, aunque a partir de este tiempo, estas se incrementaron presentando un perfil muy similar al del natural 1, llegando incluso a las mismas proporciones, excepto que al final de la fermentación se presentó una disminución en el natural 2 que llegó a 10^4 levaduras/ g MS, mientras que en el natural 1 las levaduras se mantuvieron alrededor de 10^6 / g MS hacia el final de la fermentación.

En el inoculado al 3 % con la cepa B29, las levaduras se mantuvieron en 10^5 / g MS hasta las 24 h. en las horas posteriores se incrementaron de tal manera que a las 72 h ya habían alcanzado 10^7 , lo cual se vio reflejado en la producción de etanol, en el consumo de los azúcares, y en la pérdida de materia seca. A las 144 h se observa una disminución que continúa hasta las 168 h llegando a un nivel de 10^4 levaduras/ g MS, que al final de la fermentación alcanzó nuevamente 10^5 , esta disminución se debió probablemente al agotamiento de los azúcares del sustrato.

En los casos inoculados con la cepa B18 al 3 y 10 %, las levaduras aparecieron a las 120 h en una proporción de 10^7 y 10^6 levaduras/ g MS, respectivamente, lo cual indica que la cantidad de inóculo mostró un efecto inhibitorio sobre las levaduras al inicio de la fermentación, pero no lo suficiente como para inhibirlas totalmente y durante todo el tiempo del ensilaje. Haines y Harmon (1973) encontraron que el ácido láctico inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus* solo en la etapa temprana, pero no en la etapa avanzada de crecimiento, por lo que se piensa que estas levaduras son tolerantes a condiciones ácidas y a bajo pH (Baird Parker, 1980). En el inoculado al 3 % se observa un ligero incremento a las 168 h que se mantuvo alrededor de 10^7 , que se correlacionó con la producción de etanol, el consumo de azúcares del sustrato y el incremento en el porcentaje de la pérdida de materia seca. Hacia el final de la fermentación ocurrió el mismo fenómeno que en el inoculado con la cepa B29, ya que las levaduras disminuyeron hasta niveles de 10^3 por la falta de nutrientes en el sustrato. En el inoculado al 10 % con la cepa B018 las levaduras también se presentaron a las 120 h pero en una proporción menor que en el inoculado al 3 %, y se mantuvieron alrededor de 10^6 levaduras/ g MS, disminuyendo a las 240 h hasta 10^4 para finalizar la fermentación en 10^5 levaduras/ g MS que se correlacionó con la producción de etanol y el consumo de azúcares del sustrato.

La velocidad de crecimiento de bacterias y levaduras se encuentra representada en la Tabla 5.8. En ella se aprecia que en los ensilajes inoculados, las velocidades de crecimiento para bacterias son iguales en ambos medios (MRS y PCA). Lo mismo para los ensilajes naturales, pero se observa

una marcada diferencia en las velocidades de crecimiento para bacterias entre los naturales y los inoculados, siendo más rápido el crecimiento de las bacterias de la microflora natural.

Es importante mencionar que en los naturales, y el inoculado al 3 % con la cepa B29, las levaduras crecieron, incluso más rápido que las bacterias en los inoculados con la cepa B18 al 3 y 10 %, mientras que en estos ensilajes también se detectaron levaduras, solo que no se pudo determinar su velocidad porque como se puede observar el grafico, estas se ven inhibidas por el efecto de la inoculación en el caso del inoculado al 3 % con la cepa B18, mientras que en el inoculado al 10 % se observa un retardo en la aparición de estas, lo que no permitió calcular la velocidad de crecimiento, por el hecho de que se detectaron casi al final del tiempo de la fermentación.

Tabla 5.8 Velocidad de crecimiento de bacterias y levaduras en los medios MRS y PCA.

Ensilaje	VCBMRS (Log UFC/g MS.h)	VCBPCA (Log UFC/g MS.h)	VCLMRS (Log UFC/g MS.h)	VCLPCA (Log UFC/g MS.h)
Natural 1	0.07	0.06	0.02	0.02
Natural 2	0.06	0.06	0.02	0.02
Inoculado con la cepa B29 al 3 %	0.01	0.01	0.03	0.02
Inoculado con la cepa B18 al 3 %	0.01	0.01	Nd	Nd
Inoculado con la cepa B18 al 10 %	0.01	0.01	Nd	Nd

VCBMRS: Velocidad de crecimiento de bacterias en MRS; **VCBPCA:** Velocidad de crecimiento de bacterias en PCA; **VCLMRS:** Velocidad de crecimiento de levaduras en MRS; **VCLPCA:** Velocidad de crecimiento de levaduras en PCA; **Nd:** No determinado.

En la cinética de las bacterias y levaduras aerobias (Figura 5.15), se encuentran representados los perfiles de ámbas. Estos se observan muy similares a los perfiles de las bacterias y levaduras anaerobias (Figura 5.14), con excepción de que las levaduras anaerobias se presentaron primero (120 h) en el inoculado al 10 % con la cepa B18. Mientras que en el caso del inoculado al 3 % con la misma cepa, las levaduras aerobias aparecieron primero (48 h).

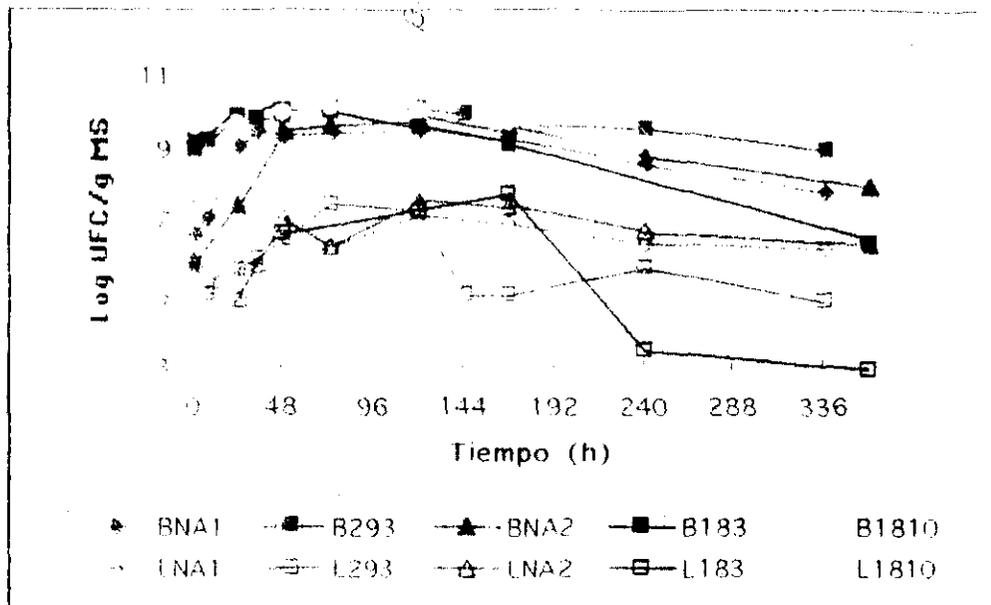


Figura 5.15 Evolución de bacterias y levaduras aerobias de los ensilados naturales e inoculados

Donde BNA1: Testigo para ensayo con la cepa B29; BNA2: Testigo para ensayos con la cepa B18; B293: Ensayo con la cepa B29 inoculando al 3 % (V:P); B183: Ensayo con la cepa B18 inoculando al 3 % (V:P); B1810: Ensayo con la cepa B18 inoculando al 10 % (V:P). La letra L es para diferenciar las levaduras de las bacterias.

El conteo de las bacterias lácticas de los ensilajes de pulpa de café fresca, mostraron altos niveles en los inoculados que en los naturales. Aunque la velocidad de crecimiento fue mayor en los ensilajes naturales, esto no mostró beneficio alguno, ya que las levaduras se detectaron durante todo el tiempo del ensilaje, lo que indica que en los ensilados naturales, las bacterias lácticas de la microflora propia de la pulpa no dominaron la fermentación. Mientras que para los ensilajes inoculados, en especial el inoculado al 10 % con la cepa B18, se encontraron buenas velocidades de acidificación debido a que la inoculación fue exitosa al incrementarse el número de bacterias (Charmley y col., 1996), ya que cuando se encuentran aproximadamente 100 millones (10^8) de bacterias lácticas g de forraje, el pH disminuye y así el material es preservado (Mahanna, 1996).

6. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, se encontró que los grupos de bacterias presentan claras diferencias en cuanto a la morfología de las colonias en caja de Petri, predominando las características que deben reunir las colonias de bacterias lácticas. Las pruebas bioquímicas a las cuales fueron sometidas las cepas de bacterias aisladas ayudaron en la caracterización fenotípica de las bacterias encontrando que, 31 aislados (62 %) correspondió a bacterias lácticas, dentro de las cuales, solo se trabajó con 19 aislados (38 %).

16 bacterias lácticas (32 %) presentaron un metabolismo de tipo homofermentativo estricto, mientras que 2 de las cepas (4 %) presentó un metabolismo de tipo heterofermentativo facultativo y 1 de las bacterias (2 %) presentó metabolismo heterofermentativo obligado. Con una producción de ácido DL láctico por encima de los 10 g/l y un rendimiento elevado (valores entre 0.15 y 0.20). Entre estas cepas, 7 (14 %) producen una cantidad de ácido L-láctico alrededor de los 14 g/l, lo cual indicaría que producen exclusivamente L-láctico. Todas las cepas presentaron un elevado consumo de glucosa (>88 %).

Es importante mencionar que el 20 % de las cepas, fueron capaces de crecer en medio MRS pectina y MRS ácido tánico, lo cual indica que en presencia de estos compuestos, las bacterias tal vez puedan tomar a la pectina como fuente de carbono, que es un polímero de difícil asimilación, y que son resistentes al ácido tánico que es un compuesto fenólico tóxico. Al mismo tiempo mostraron muy buena actividad catalítica en el caso de varias enzimas como en el caso de la β -galactosidasa, que es una enzima importante en el metabolismo homofermentativo.

El perfil de carbohidratos así como la restricción del DNA de las cepas de bacterias lácticas, fueron análisis importantes en la distinción de las cepas de bacterias lácticas aisladas, en los que se encontraron diversos perfiles. Estos resultados indican la relevancia de las bacterias lácticas en el proceso fermentativo y en la microflora propia de la pulpa, por lo que mediante la integración de

ésta información, se logró una buena caracterización de las cepas de bacterias lácticas aisladas de ensilajes de pulpa de café.

Los resultados de los ensayos sobre la inoculación con bacterias lácticas seleccionadas, en la conservación de pulpa de café fresca a nivel laboratorio, indicaron resultados parcialmente satisfactorios.

El contenido de azúcares totales inicial para todos los ensilajes, fué similar a los reportados en bibliografía. El ensilaje que presentó menos consumo de carbohidratos fué el inoculado al 10 % con la cepa B18, por lo que esto indicó una fermentación más eficiente. Todos los ensilajes presentaron una importante producción de ácido DL láctico, por lo que todos los ensilajes presentaron bajos valores de pH, llegando a valores incluso más bajos que los reportados por otros autores. Aunque la producción de láctico fué más evidente en los casos en los que se inoculó, el ensilaje que presentó una velocidad de acidificación más rápida fue el caso del inoculado al 10 %, con un notable rendimiento en ácido láctico.

Se detectó la formación de etanol en los ensilajes naturales como en los inoculados, sobre todo en el ensilaje inoculado con la cepa B29 al 3 % donde la producción de etanol fué poco menos que su producción en láctico, con un rendimiento elevado, debido al desarrollo de levaduras que al parecer fueron acidotolerantes, ya que ni aún el ensilaje con inóculo más fuerte fue capaz de frenar el desarrollo de levaduras y por lo tanto la aparición de etanol. La aparición de las levaduras también se vió reflejada en la pérdida de materia seca, en la que se presentaron pérdidas hasta del 5 % para el inoculado con la cepa B29, e incrementos en la humedad de hasta el 2 %.

La recuperación de carbono al final de la fermentación fue elevada, sobretodo en aquellos ensilajes en los que se inoculó, es importante señalar que en el ensilaje inoculado con la cepa B18 al 10 % la mayor parte de la recuperación de carbono correspondió a láctico y no a etanol como sucedió en

los otros ensilajes inoculados, en los que, aproximadamente la mitad de la recuperación de carbono, corresponde a láctico y la otra mitad a etanol.

El conteo de las bacterias lácticas en los diferentes ensilajes mostró altos niveles en los inoculados. Aunque las velocidades de crecimiento fueron más rápidas para los naturales, esto no mostró ningún beneficio, ya que éstas no lograron dominar la fermentación al punto de inhibir las levaduras presentes en el ensilaje desde el inicio del mismo. Por todo lo anterior se concluye que el ensilaje que presentó mejores resultados en todos los parámetros evaluados, es el inoculado al 10 % con la cepa B18, la cual fue identificada como un *Lactobacillus plantarum*, presentó ventajas como las de acidificar la pulpa rápidamente y llegar a un pH bajo, retardando el desarrollo de las levaduras.

7. BIBLIOGRAFIA

Adams, M.R., Dougan, J., (1981) Biological management of coffee processing wastes. *Tropical Sciences*, 23 (3), 177-196 p.

Agati, V., Guyot, J.P., Morlon-Guyot, J., Talamond, P., Hounhouigan, D.J., (1998) Isolation and characterization of new amylolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize doughs (mawè and ogi) from Benin. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 512-520 p.

Aguirre, B.F., (1966) Utilización industrial del grano del café y de sus subproductos. *Investigaciones tecnológicas del ICAITI, Guatemala*, 1, 43 p.

Agricultural Development and Advisory Service (1988) Silage Additives. The ADAS guide to choice value and application. *Farmers Weekly, Supplement*, 19th February.

Alais, C., (1991) Ciencia de la leche, principios de técnica lechera. CECSA 8va reimpresión. 12, 268-302 p.

Antier, P., Minjares, A., Roussos, S., Raimbault, M., Viniegra-González, G., (1993) Pectinase-hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid-state fermentation of coffee pulp. *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 254-260 p.

Aranda, E., Barois, I., (1999) Lombricompostaje de la pulpa de café en México. *en* Memorias III Sem. Intern. Biotecnol. Agroindust. Café (III SIBAC), Curitiba, PR, Brasil.

Arcila, F., (1979) Investigaciones de CENICAFE sobre el uso y tratamiento de los residuos del beneficio del café. *Publicación CENICAFE*, Bogota.

Ashbell, G., Lisker, N., (1987) Chemical and microbial changes occurring in orange peels and in the seepage during ensiling. *Biological Wastes*, 31, 213-220 p.

Axelsson, L., (1990) *Lactobacillus reuteri*, a member of the gut bacterial flora. Studies on antagonism, metabolism and genetics, Ph. D. thesis, Swedish University of Agricultural Sciences.

Baird-Parker, A.C., (1980) Organic acids. In *Microbial Ecology of Foods*, ed. J.H. Silliker, R.P. Elliot, A.C. Baird-Parker, F.L. Bryan, J.H.B. Christian, D.S. Clark, J.C. Olson, Jr. & T.R. Roberts. Academic Press, New York, 126-135 p.

Barnet, A. J. G., (1954) *Silage Fermentation*. New York, Academic Press Inc.

Bauchop, T., Elsdon, S.R., (1960) The growth of microorganisms in relation to their energy supply. *J. Gen. Microbiol.*, 23, 457-469 p.

Bendaña, G.G., (1977) Efecto de tratamientos alcalinos por remojo o por contacto sobre el valor nutritivo y composición química de la pulpa de café fresca o ensilada. Tesis Maestría CESNA/INCAP, Guatemala.

Bentley, R.W., Leigh, J.A., Collins, M.D., (1991) Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41, 487-494 p.

Bertin, G., Hellings, P.H., (1985) en: Symposium " L'ensilage, nouveaux aspects biologiques ", Paris 18 janvier, p. 59.

Bertin, G. (1986) Utilization des enzymes polysaccharolytiques dans les milieux d'ensilage. Moyen de sélection et résultats pratiques. Thèse d'Etat en Sciences. Université Paul Sabatier, Toulouse, France, 209 p.

Bertin, G., Laduron, M., Hellings, P., Vanbelle, M., (1994) Utilisation D'enzymes dans L'ensilage des fourrages. *in* Bactéries Lactiques, De Roissart H., Luquet F.M. (Eds), Loriga, Grenoble, France, 2, 271-292 p.

Bianes, R., (1982) Fermentation anaérobie de la pulpe de café avec production de méthane. Thèse de Doctorat es Science, USTL, Université de Montpellier, France. 121 p.

Boccas, F., Roussos, S., Gutiérrez, M., Serrano, L., Viniegra, G.G., (1994) Production of pectinase from coffee pulp in solid state fermentation system: selection of wild fungal isolate of high potency by a simple three-step screening technique. *Journal of Food Science and Technology*, 31, (1), 22-26 p.

Bohkenfor, B., Fonseca, H., (1974) Calidad de ensilado con pulpa de café conteniendo diferentes niveles de humedad y varios aditivos. En Primera Reunion Internacional sobre la Utilización de Supproductos del Café en la Alimentación Animal y otras Aplicaciones Agrícolas e Industriales. CATIE, Turrialba, Costa Rica, 41 p.

Bolsen, K., Fung, D., Ilg, H., Laytimi, A., Hart, R., Chain, V., Nuzback, L., (1987) Effect of commercial inoculants on the fermentation of Alfalfa, Corn, Forage Sorghum, and Triticale Silages. In Kansas State University Report, KS, USA, 107-120 p.

Braham, J.E., Bressani, R., (1978) Pulpa de café: composición, tecnología y utilización. Braham J.E. & Bressani R. (Eds), INCAP.

Braham, J.E., Bressani, R., (1979) Coffee pulp: composition, technology and utilization, IDRC, 95 p.

Braham, J.E., Jarquin, R., Gonzalez, J.M., Bressani, R., (1973) Pulpa y pergamino de café. 3. Utilización de la pulpa de café en la alimentación de rumiantes. Turrialba, 23, 41-47 p.

Bressani, R., Estrada, E., Jarquin, R., (1972) Pulpa y pergamino de café. 1. Composición química y contenido de aminoácidos de la proteína de la pulpa. Turrialba, 22 (3), 299-304 p.

Bressani, R., Estrada, E., Elías, G., Jarquin, R., De Valle, L.U., (1973) Pulpa y pergamino de café. 4. Efecto de la pulpa de café deshidratada en la dieta de ratas y pollos. Turrialba, 23, 403-409 p.

Bressani, R., Cabezas, M.T., Jarquin, R., Murillo, B., (1974) The use of coffee processing waste as animal feed. In Proceedings Conf. Anim. Feeds Trop. Subtrop. Orig., London: Tropical Products Institute, 107-117 p.

Bressani, R., (1978a) Subproductos del fruto de café. in Pulpa de café: composición, tecnología y utilización, Braham J.E. & Bressani R. (Eds), INCAP, 9-17 p.

Bressani, R., (1978b) Posibles usos de los subproductos del grano de café. en Pulpa de café: composición, tecnología y utilización, Braham J.E. & Bressani R. (Eds), INCAP, 31-43 p.

Bressani, R., (1978c) Factores antifisiológicos en la pulpa de café. en Pulpa de café: composición, tecnología y utilización, Braham J.E. & Bressani R. (Eds), INCAP, 143-152 p.

Bressani, R., (1979) Subproductos del fruto del café. *en* Pulpa de café: composición, tecnología y utilización, Braham J.E. & Bressani R. (Eds), CIID, Bogotá.

Brock, T.D., Madigan, M.T., (1991) Microbiología. Prentice Hall Hispanoamericana S.A. 6a edición, 19, 754-857 p.

Brookes, R.M., Buckle, A.E., (1992) Lactic acid bacteria in plant silage. *in*: The lactic acid bacteria in health and disease. Brian J.B. Wood (Ed). The lactic acid bacteria. vol. 1. 485 p. Elsevier Applied Sciences, London.

Brown, D.C., Valentine, S.C., (1972) Formaldehyde As A Silage Additive. Aust. J. Agric. Res. 23: 1093-1100.

Bruyneel, B., Verstraete, W., (1986) Influence of the inoculum size of *Lactobacillus plantarum* on the competition with *Enterobacter cloacae*. Biotechnology Letters, vol. 8, No. 9, 629-634 p.

Buitrago, (1987) Evaluación del tratamiento de la pulpa de café por fermentación en estado sólido. Tesis, Universidad de Colombia, 171 p.

Cabezas, M.T., Estrada, E., Murillo, B., Gonzalez, J.M., Bressani, R., (1976) Pulpa y pergamino de café. 12. Efecto del almacenamiento sobre el valor nutritivo de la pulpa de café para terneros. Archivos Latinoamericanos de nutrición, 26 (2), 203-215 p.

Cabezas, M.T., Flores, A., Egana, J.E., (1978) Uso de pulpa de café en alimentación de rumiantes. *en* Pulpa de café: composición, tecnología y utilización, Braham J.E. & Bressani R. (Eds), INCAP, 45-57 p.

Cabezas, M.T., Gonzalez, J.M., Bressani, R., (1974) Pulpa y pergamino de café. 5. Absorción y retención de nitrógeno en terneros alimentados con raciones elaboradas con pulpa de café. Turrialba, 24, 90-94 p.

Calle, V.H., (1957) Combustible methane gas from coffee pulp. Indian Coffee, 21 (7), 208-209 p.

Calle, V.H., (1974a) Como producir gas combustible con pulpa de café. Boletín Técnico, CENICAFE, 3, 11 p.

Calle, V.H., (1977) Sub-productos del café. Boletín Técnico, Cenicafé, 6, 84 p.

Campabadal, C., (1987) Utilización de la pulpa de café en la alimentación de animales. 3 Simposio Internacional sobre utilización integral de los subproductos del café. Guatemala.

Carpintero, C.M., Henderson, A.R., McDonald, P., (1979) The effect of some pretreatments on proteolysis during the ensiling of herbage. Grass and Forage Science, 34, 311-315 p.

Carrizales, V., Ferrer, J., (1984) Recycling agroindustrial waste by lactic fermentations: Coffee pulp silage. Symposium International "Las fermentaciones lácticas en la industria alimentaria", 21-29 nov., México. 26 p.

Carrizales, V., Gonzalez, J., (1984) Aprovechamiento de la pulpa de café. Estudio experimental. Reporte final. Fundación CIEPE, San Felipe, Venezuela.

Castillo, P.G., Contreras, J.A., Fernández, R.A., Holguín, M.F., Méndez, L.I., Vázquez, M.M., Zamarripa, C.A., (1996) Tecnología para la producción de café en México. Instituto

Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP). Folleto Técnico Núm. 8, la reimpresión, 88 p.

Catchpoole, V.R., Henzell, E.F., (1971) Silage and silage making from tropical herbage species. *Herb. Abstr.*, 41 (3) 213-221 p.

CATIE., (1984) Curso fundamentos de la caficultura moderna. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica, 47 p.

Celanie, E., (1982) Etude de l'évolution microbiologique et des caractéristiques fermentaires des ensilages de canne, de sorgho et de pangola en climat tropical humide. Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences, Université Pierre et Marie Curie, 57 p.

Ceron, J.J., Hernández, F., Madrid, J., Gutiérrez, C., (1996) Chemical composition and nutritive value of fresh and ensiled carnation (*Dianthus caryophyllus*) by-product. *Small Ruminant Research*, 20, 109-112 p.

Charmley, E., Winter, K.A., McRae, K.B., Fillmore, A.E., (1996) Effect of inoculation on silage quality and performance of steers fed grass and cereal silages either alone or in combination. *Canadian Journal of Animal Science*, 76, 571-577 p.

Chede-Yèhinou, A.,(1996) Les pâtes de maïs fermentées au Benin: Isolement et caractérisation des bactéries lactiques amylolytiques en vue de leur utilisation comme inoculum dans les fermentations. Mémoire présenté pour l'obtention du Diplôme d'Etudes Supérieures Spécialisées. Academie de Montpellier, Université de Montpellier II.

Cherney, D.J.R., Cherney, J.H., Vonelec, J.J., (1993) Structural carbohydrate fermentation inhibition by cellulase filtrates of alfalfa. *J. Appl. Anim. Res.*, 3: 19-30.

Christensen, M.S., (1981) Preliminary tests on the suitability of coffee pulp in the diets of Common Carp (*Cyprinus carpio* L) and Catfish (*Clarias mossambicus* peters). *Aquaculture*, 25, 235-242 p.

Clarke, R.J., Macrae, R., (1985) *Coffee Chemistry* vol. 1. Elsevier Applied Science Publishers.

Claude, B., (1979) Utilization des sous-produits du café. *Café Cacao Thé*, 23 (2), 146-152 p.

Collins, M.D., Rodriguez, U.M., Ash, C., Aguirre, M., Farrow, J.A.E., Martínez-Murcia, A., Phillips, B.A., Williams, A.M., Wallbanks, S., (1991) Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.*, 77, 5-12 p.

Coste, R., (1986). *El café*. Ed. Blume. Barcelona, España. 277 p.

Coste, R., (1989) *Caféiers et Cafés*. Maisonneuve et Larose et A.C.C.T. (Eds), Paris, 373 p.

Dávila, A., Arango, B., (1991) Producción de lombrices sobre pulpa de café. *en* Memorias II Sem. Intern. Biotecnol. Agroindust. Café (II SIBAC). Manizales, Colombia.

De Leon, R., Calzada, F., Herrera, R., Rolz, C., (1980) Fungal biomass production from coffee pulp juice. *Journal of Fermentation and Technology*, 58 (6), 579-582 p.

Delgado-Vidal, F.K., (1999) Variación de la composición química de la pulpa de café sometida a procesos fermentativos. Tesis para obtener el título de Químico. Facultad de ciencias químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla., 56 p.

Dellaglio, F., Torriani, S., (1986) DNA:DNA homology, physiological characteristics and distribution of lactic acid bacteria isolated from maiza silage. *J. Appl. Bacteriol.*, 60, 83-92 p.

Dellaglio, F., De Roissart, H., Torriani, S., Curk, M.C., Janssens, D., (1994) Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In *Bactéries Lactiques*, de Roissart H., Luquet F.M. (Eds), Loriga, Grenoble, France, 1, 25-116 p.

Demarquilly, C., (1985) in Symposium "L'ensilage: nouveaux aspects biologiques", Paris 18 janvier, p 23.

De Menezes, H.C., Samaan, F.S., Clifford, M.N., Adams, M.R., (1993) The fermentation of fresh coffee pulp for use in animal feed. Association Scientifique Internationale du Café (ASIC), 15ème Colloque, Montpellier.

De Vuyst, L., Vandamme, E.J., (1994) Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Microbiology, Genetics and Applications*. Chapman & Hall, Wester Cleddens Road, Bishoptorriggs, Glasgow.

Díaz, G., Ruiz, F., Morlon-Guyot, J., Wachter, C., (1999) Diversidad de bacterias lácticas amilolíticas del pozol. En: *Memorias del VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería*. P.I.9.

Dickerson, J.T., (1986) Yield, composition and nutritive value of forage sorghum silages: hybrid and stage of maturity effects. M. Sc. Thesis, Kansas State University, Manhattan, KS.

Dicks, L.M.T., van Vuuren, H.J.J., Dellaglio, F., (1990) Taxonomy of *Leuconostoc* species, particularly *Leuconostoc oenos*, as revealed by numerical analysis of total soluble cell protein patterns, DNA base compositions, and DNA-DNA hybridizations, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 40, 83-91 p.

Doelle, H.W., (1975) *Bacterial Metabolism*. 2nd ed., Academic Press, New York.

Done, D.L., (1986) Silage inoculants. A review of experimental work. *Research and Development in Agriculture*, 3 (2), 83-87 p.

Eklund, T., (1989) Organic acids and esters. In *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures*. ed. G.W. Gould. Elsevier Scientific Publishers, London, UK, 161-200 p.

Ellas, L.G., (1978) Composición química de la pulpa de café y otros subproductos. *en Pulpa de café: composición, tecnología y utilización*, Braham J.E. & Bressani R. (Eds), INCAP, 19-29 p.

Favela, E., Huerta, S., Roussos, S., Olivares, G., Nava, G., Viniegra, G.G., Gutiérrez, M., (1989) Producción de enzimas a partir de pulpa de café y su aplicación en el beneficio húmedo. *en Memorias I Sem. Intern. Biotecnol. Agroindust. Café (I SIBAC)*, Roussos, Licony y Gutiérrez (Eds), Xalapa, Veracruz, México, 145-151 p.

Fenema, O.R., (1985) *Food chemistry*. Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 991 p.

Figueroa, C., Davila, A. M., Pourquié, J., (1995) Lactic acid bacteria of the sour cassava starch fermentation. *Letters in Applied Microbiology*, 21, 126-130 p.

Fischer, W., Koch, H.U., Haas, R., (1983) Improved preparation of Lipoteichoic acids. *Europ. J. Biochem.*, 133, 523-530 p.

Fisher, L.J., Pennell, G.C., Shelford, J.A., (1984) The effect of the additive "Silogen" on the intake and digestibility of grass silage. *Can. J. Anim. Sci.*, 64, 709-715 p.

Flores, R.A., Glatz, , Bern, C.J., Van Fossen, L.D., (1985) Preservation of high moisture corn by microbial fermentation. *Journal of Food Protection*, 48 (5), 407-411 p.

Flores Recinos, F., (1976) Uso de la pulpa de café en la alimentación de bovinos de carne y leche. *CENTAMAG, EL Salvador*, 27 p.

Froetschel, M.A., Ely, L.O., Amos, H.E., (1991) Effects of additives and growth environment on preservation and digestibility of wheat silage fed to Holstein heifers. *J. Dairy Sci.*, 74, 546-556 p.

Fujisawa, T., Benno, Y., Yaeshima, T., Mitsuoka, T., (1992) Taxonomic study of the *Lactobacillus acidophilus* group, with recognition of *Lactobacillus gallinarum* sp. nov. and *Lactobacillus jonhsonii* sp. nov. and synonymy of *Lactobacillus acidophilus* group $\Delta 3$ (Johnson et al., 1980) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura 1981). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42, 487-491 p.

Gaime-Perraud, I., Roussos, S., Martínez-Carrera, D., (1993) Natural microorganisms of the fresh coffee pulp. *Micologia Neotropical Aplicada*, 6, 95-103 p.

Gaime-Perraud, I., (1995) Cultures mixtes en milieu solide de bactéries lactiques et de champignons filamenteux pour la conservation et la décaféination de la pulpe de café. Thèse de Doctorat, Université Montpellier II, 210 p.

Garcia, R.C., Baynes, D.R., (1974) Cultivo de *Tilapia aurea* (Staindachner) en corrales de 100 m², alimentada artificialmente con gallinazas y un alimento preparado con 30 % de pulpa de café. Ministerio de Agricultura y Ganaderia, Dir. Gen. de Recursos Nat. Ren., El Salvador, 23 p.

Garvie, E. I., (1980) Bacterial lactate dehydrogenases, *Microbiol. Rev.*, 44, 106-139 p.

Garvie, E.I., (1981) Sub-divisions within the genus *Leuconostoc* as shown by RNA/DNA hybridization. *J. Gen. Microbiol.*, 127, 209-212 p.

Gomez, F.R., (1978a) Evaluación sobre el aprovechamiento de la pulpa de café en la dieta de alimentos balanceados para animales y abono organico en agricultura. Dirección adjunta de Recepción e Industrialización de Café. Gerencia de Producción Industrial, 3, 75-79 p.

Gomez, F.R., (1978b) Planeamiento general en el manejo, tratamiento y aprovechamiento de residuos de café. Documento INMECAFE.

Gómez-Brenes, R.A., (1978) Procesamiento de pulpa de café: tratamientos químicos. *en* Pulpa de café: composición, tecnología y utilización, Braham J.E. & Bressani R. (Eds), INCAP, 125-142 p.

Gómez-Brenes, R.A., Bendaña, G., González, J.M., Braham, J.E., Bressani, R., (1985) Relación entre los niveles de inclusión de pulpa de café y contenido proteínico en raciones para animales monogástricos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 35 (3), 422-437 p.

González, J.M., (1973) VIII. Preparación de ensilaje de pulpa de café. Boletín informativo de la División de Ciencias Agrícolas y de Alimentos del INCAP. AGA, 16-19 p.

Gottschalk, G., (1979) Bacterial metabolism. Springer-Verlag New York Inc. 359 p.

Gouet, P., (1994) Bactériologie des ensilages. *in* Bactéries Lactiques, De Roissart H., Luquet F.M. (Eds), Loriga, Grenoble, France, 2, 257-270 p.

Gutiérrez Sanchez, G., (1997) Evaluación *in vitro* de un probiótico fúngico utilizando un consorcio de microorganismos ruminales de borregos. Reporte de Servicio Social. Ciencias Biológicas de la Salud, UAM-Iztapalapa.

Guzmán, G., Martínez-Carrera, D., (1985) Planta productora de hongos comestibles sobre pulpa de café. Ciencia y Desarrollo, 65, 41-48 p.

Haines, W.C., Harmon, L.G., (1973) Effect of selected lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus* and production of enterotoxin. Appl. Microbiol., 25, 436-444 p.

Hammes, W.P., Weiss, N., Holzappel, W.P., (1991) The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In The Prokariotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation Identification, Applications. ed. A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer. Springer, New York, 1535-1594 p.

Harrison, J.H., (1989) Use of Silage Additives and Their Effect on Animal Productivity. Proceedings of 24th Annual Pacific Northwest Animal Nutrition Conference. Boise, Idaho. Oct./ 24 - 26 /1989.

Hartley, R.D., (1972) Chemistry of lignocellulosic plants materials and non-microbial processes for increasing their value for ruminant. In: Improved utilization of lignocellulosic materials in animal feed. Organization for Economic Cooperation and Development. Paris, pp. 10-30.

Hayashi, T., Kozaki, M., (1980) Growth yield of an orange-colored *Streptococcus bovis* No. 148. J. Gen. Appl. Microbiol., 26, 245-253 p.

Henderson, A.R., McDonald, P., (1984) The effect of a range of commercial inoculants on the biochemical changes during the ensilage of grass in laboratory studies. Research and Development in Agriculture, 1 (3), 171-176 p.

Henderson, N., (1988) Silage inoculants: For 20 years, a continuing story of improvement. In Biotechnology in the Feed Industry. Proceedings of Alltech's Fourth Annual Symposium, ed. T.P. Lyons. Alltech Technical Publications, Nicholasville, Kentucky, USA. 337-358 p.

Heron, S.J.E., Edwards, R.A., McDonald, P., (1988) The effects of inoculation, addition of glucose and mincing on fermentation and proteolysis in ryegrass ensiled in laboratory silos. Animal Feed Science and Technology, 19, 85-96 p.

Heron, S.J.E., Owen, T.R., (1991) Review of the effects of "Ecosyl" silage inoculant on in vivo digestibilities and metabolizable energy of grass silages. Page 3 in C. S. Mayne, ed. Management issues for the grassland farmer in the 1990's. Occasional Symposium No. 25, British Grassland Society, Hurley, UK.

Hutchinson, R.M., (1958) How gas help coffee growers. Indian Coffee, 22, 411-412 p.

Jarquin, R., Gonzalez, J.M., Braham, J.E., Bressani, R., (1973) Pulpa y pergamino de café. 2. Utilización de la pulpa en la alimentación de rumiantes. Turrialba, 23, 41-47 p.

Jarquin, R., Bressani, R., (1977) Evaluación nutricional en cerdos de la pulpa de café sometida a varios procesos de almacenamiento. Turrialba, 27, 385-391 p.

Jarquin, R., (1978) Pulpa de café en la alimentación de cerdos. En Pulpa de café: composición, tecnología y utilización, Braham J.E. & Bressani R. (Eds.), INCAP, 69-87 p.

Jobin, P., (1982) The coffees produced throughout the world, 4th edn. Jobin, Le Havre.

Johansson, M-L., Sanni, A., Löfner, C., Molin, G., (1995) Phenotypically based taxonomy using API 50CH of lactobacilli from Nigerian ogi, and the occurrence of starch fermenting strains. Int. Journal of Food Microbiology, 25, 159-168 p.

Jung, H.G., (1988) Inhibitory potential of phenolic-carbohydrate complexes released during ruminal fermentation. J. Agric. Food Chem., 36: 782-788 p.

Kandler, O., (1983) Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 49, 209-224 p.

Kandler, A., Weiss, N., (1986) Regular, non-sporing gram-positive rods, in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, (P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe y J. G. Holt, eds.), Williams and Wilkins, Baltimore, 2, 1208-1234 p.

Koneman, E.W., Allen, S.D., Dowell, V.R., Janda, W.M., Sommers, H.M., Winn, W.C., (1992) Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana, S.A., Buenos Aires, Argentina, 907 p.

Lauer, E., Helming, C., Kandler, O., (1980) Heterogeneity of the species *Lactobacillus acidophilus* (Moro) Hansen and Moquot as revealed by biochemical characteristics and DNA/DNA hybridization. Zentralbl. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten, Hygiene, I. Abteilung, Originalreihe C 1, 150-68 p.

Le Bourgeois, P., Lautier, M., Ritzenthaler, P., (1993) Chromosome mapping in lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews, 12, 109-124 p.

Le Bras, G., Garel, J.R. (1991) Properties of D-Lactate dehydrogenase from *Lactobacillus bulgaricus*: a possible different evolutionary origin for the D- and L-Lactate dehydrogenases. FEMS Microbiol. Lett., 79, 89-94 p.

Ledezma, O.V., De Ruiz Holgado, A.P., Olivier, G., (1977) A synthetic medium for comparative nutritional studies of Lactobacilli. Journal of Applied Bacteriology, 42, 123-133 p.

Le Dividish, J., Seve, B., Geoffroy, F., (1976) Banana silage in animal feeding. Annales Zootechnologie, 25, 313-323 p.

Lin, C., Bolsen, K.K., Brent, B.E., Fung, D.Y.C., (1992) Epiphytic lactic acid bacteria succession during pre-ensiling and ensiling periods of alfalfa and maize. J. Appl. Bacteriol., 73, 375-387 p.

Lindgreen, S., Bromander, A., Pettersson, K., (1988) Evaluation of silage additives using scale-model silos. Swedish Journal of Agricultural Research, 18, 41-49 p.

London, J., Chace, N.M., (1983) Relationship among lactic acid bacteria demonstrated with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as an evolutionary probe, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 33, 723-737 p.

Ludwig, W., Seewaldtm E., Kilpper-Bälzm R., Schleifer, K.H., Magrum, L., Woese, C.R., Fox, G.E., Stackebrandt, E., (1985) The phylogenetic position of *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Gen. Microbiol.*, 131, 543-551 p.

Luis, L., Ramírez, M., (1985) Estudio de los principales grupos de microorganismos presentes en los ensilados de pasto de estrella de jamaicano (*Cynodon nlemfuensis*). Silos y su relación con parámetros bioquímicos. *Pastos y Forrajes*, 8 (1), 141-155 p.

MacFaddin, J.F., (1993) Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Medica Panamericana, 2da reimpression, 301 p.

Mahana, W.C., (1996) Silage fermentation and additive use in North America. Ph.D. Dairy Nutrition and Forage Specialist and Inoculant/Forages Product Manager Pioneer Hi-Bred International, Inc. 4445 Corporate Drive West Des Moines, Iowa 50266, U.S.

Man, J.C., de Rogosa, M., Sharpe, M.E., (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130-135 p.

Marshall, C.E., (1983) The world coffee trade, Woodhead-Faulkner, Cambridge, UK.

Martinez, A., Medina, M., (1982) Contribución al estudio de subproductos de la industria conservera de Murcia en la alimentación animal. *Arch. Zootec.* 31 (120), 155-169 p.

Martínez-Carrera, D., Morales, P., Sobal., M., (1989) Producción de hongos comestibles sobre pulpa de café a nivel comercial. *en* Memorias I Sem. Intern. Biotecnol. Agroindust. Café (I SIBAC), Roussos, Licon y Gutiérrez (Eds), Xalapa, Veracruz, México, 177-184 p.

Martínez-Carrera, D., Aguilar, A., Martínez, W., Morales, P., Sobal., M., Bonilla, M., (1999) A strategy for production and marketing of edible mushrooms (*Pleurotus*), cultivated on coffee pulp, in México. *en* Memorias III Sem. Intern. Biotecnol. Agroindust. Café (III SIBAC), Curitiba, PR, Brasil.

McCullough, M.E., (1977) Silage and silage fermentation. *Feedstuffs*, 49-52 p.

McCullough, M.E., (1984) Feeding Quality Silage. *Animal Nutrition and Health Magazine*. 30-35 p.

McDonald, P., (1981) *The Biochemistry of Silage*. John Wiley & Sons. Moon, N.J. (1984). A short review of the role of lactobacilli in silage fermentation. *Food Microbiology*, 1, 333-338 p.

McDonald, P., Henderson, A.R., Heron, S.J.F., (1991) Additives. *In: The Biochemistry of Silage*, 2nd. Edn. Chalcombe Publications, Aberystwyth, UK.

Meeske, R., Ashbell, G., Weinberg, Z.G., Kipnis, T., (1993) Ensiling forage sorghum at two stages of maturity with the addition of lactic acid bacterial inoculants. *Animal Feed Science and Technology*, 43, 165-175 p.

Megías, M.A., Martínez-Teruel, A., Gallego, J.A., Domenech, V., (1990) Estudio comparativo de ensilado del subproducto de alcachofa (*Cynara scolymus* L.) con diferentes aditivos. *AN. VET. (Murcia)*, 6-7 p.

Megías, M.A., Gallego, J.A., Martínez-Teruel, A., Sanchez-Rodriguez, M., (1992) Estudio comparativo de diferentes aditivos en el ensilado del subproducto de naranja. *Arch. Zootec.*, 41, 179-182 p.

Megías, M.A., Martínez-Teruel, A., Gallego, J.A., Oliver, P., (1993a) Fermentative and nutritive changes during artichoke (*Cynara scolymus* L.) by-product ensilage. *Bioresource Technology*, 43, 237-239 p.

Megías, M.A., Martínez-Teruel, A., Gallego, J.A., Núñez, J.M., (1993b) Chemical changes during the ensiling of orange peel. *Animal Feed Science and Technology*, 43, 269-274 p.

Meraz Rodriguez, M., (1991) Contribución al estudio de la fermentación tradicional del gari. Tesis de Maestría en Ciencia de Alimentos (Ingeniería de Alimentos), Facultad de Química, UNAM.

Molin, G., Johansson, M-L., Stahl, M., Ahrné, S., Andersson, R., Jeppsson, B., Bengmark, S., (1992) Systematics of the *Lactobacillus* population on rat intestinal mucosa with special reference to *Lactobacillus reuteri*. *Antoine van Leeuwenhoek* 61, 175-183 p.

Molin, G., Jeppsson, B., Johansson, M-L., Ahrné, S., Nobaek, S., Stahl, M., Bengmark, S., (1993) Numerical taxonomy of *Lactobacillus* spp. associated with healthy and disease mucosa of the human intestines. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 314-323 p.

Moon, N.J., (1981a) Development of microbial populations in fermented wastes from frozen vegetable processing. *Journal of Food Protection*, 44, 288-293 p.

Moon, N.J., (1981b) Effect of inoculation of vegetable processing wastes with *Lactobacillus plantarum* on silage fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 32, 675-683 p.

Morales, A.I., Chacón, G., (1981) Producción de Biogas a partir de pulpa de café. Documento CICAPE, San José, Costa Rica, 1-13 p.

Muck, R.E., (1988) Factors influencing silage quality and their implications for management. *J. Dairy Sci.* 71, 2992-3002 p.

Muck, R.E., Bolsen, K.K., (1991) Silage Preservation and Silage Additives Products. NFIA Field Guide for Hay and Silage Management in North America. NFIA, West Des Moines, IA 50265. 105-126 p.

Murillo, B., (1978). Ensilaje de pulpa de café. *en* Pulpa de café: composición, tecnología y utilización, Braham & Bressani R. (Eds), INCAP, 97-110 p.

Murillo, B., Daqui, I., Cabezas, M.T., Bressani, R. (1976) Pulpa y pergamino de café. II. Características químicas de la pulpa de café ensilada con pasto napier y planta de maíz. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 26, 33-45 p.

Nicholson, J.W.G., McQueen, R.E., Chamrley, E., Bush, R.S., (1991) Forage conservation in round bales or silage bags: effect on ensiling characteristics and animal performance. *Canadian Journal of Animal Science*, 71, 1167-1180 p.

Nicholson, J.W.G., Chamrley, E., Bush, R.S., (1992) Effect of moisture level on ensiling characteristics of alfalfa in big bales or chopped and compacted in plastic tubes. *Canadian Journal of Animal Science*, 72, 347-357 p.

O'Leary, W.M., Wilkinson, S.G., (1988) Gram positive bacteria. In Microbiol. Lipids, vol. 1, eds C. Ratledge & S.G. Wilkinson, Academic Press, London.

Orla-Jensen, S., (1919) The lactic acid bacteria. Copenhagen: Andr. Fred Host and Son. Mém. Acad. Roy. Sci., Danemark, Sect. Sci., 8 Sér., 5, 81-197 p.

Pahlow, G., (1991) Microbiology of inoculants, crops and silages. Proceedings of Eurobac Symposium, Uppsala, 1986, 9-18 p.

Peñaloza, W., (1981) Alimentación sólida de la pulpa de café. Tesis del Centro de Estudios Superiores en Nutrición y Ciencias de Alimentos (CESNA). Universidad de San Carlos, Guatemala. 51 p.

Petterson, K.L., Lindgreen, S., (1990) The influence of the carbohydrate fraction and additives on silage quality. Grass and Forage Science, 45, 223-233 p

Pitt, R.E., Muck, R.E., Leibensperger, R.Y., (1985) A quantitative model of the ensilage process in lactate silages. Grass and Forage Science, 40, 279-303 p.

Pitt, R.E., (1990) Silage and Hay Preservation. Northeast Regional Agricultural Engineering Service Publication No. 5. 152 Riley-Robb Hall, Cornell Univ., Ithaca, NY. 14853.

Pompei, R., Thaller, M.C., Pittaluga, F., Flore, O., Satta, G., (1992) Analysis of bacteriolytic activity patterns, a novel approach to the taxonomy of enterococci, Int. J. Syst. Bacteriol., 42, 37-43 p.

Porres, C., Alvarez, D., Calzada, J., (1993) Caffeine reduction in coffee pulp through silage. Biotechnology Advances, 11, 519-523 p.

Ramírez-Martínez, J.R., Clifford M.N., (1990) Acidos fenólicos en pulpa de café, ASIC, 13ème Colloque, Paris, 205-210 p.

Rauramaa, A., Setälä, J., Moisio, T., Sivelä, S., (1987) The effect of inoculants and cellulase on the fermentation and microbiological changes in the silages. Journal of Agricultural Science in Finland, 59, 371-377 p.

Regalado, O.A., (1996) Manual para la cafeticultura mexicana. Programa café 1995-2000. INCA RURAL, 156 p.

Rolz, C., Menchu, J.F., de Arriola, M.C., de Micheo, F., (1980) Agric. Wastes, 2,

Rolz, C., Menchu, J.F., Calzada, F., De Leon, R., Garcia, R., (1982) Biotechnology in washed coffee processing. Process Biochemistry, 17 (2), 8-10 p.

Rolz, C., De Leon, R., De Arriola, M.C., (1988a) Solid substrate growth of white rot fungi on coffee pulp. Acta Biotechnology, 13, 211-223 p.

Rolz, C., De Leon, R., De Arriola, M.C., (1988b) Biological pretreatment of coffee pulp. Biological Wastes. 26, 97-114 p.

Rooke, J.A., Bell, S.L., Armstrong, D.G., (1985) The chemical composition of grass silages prepared with and without pre-treatment with inoculants containing *Lactobacillus plantarum*. Animal Feed Science and Technology, 13, 269-279 p.

Rooke, J.A., Maya, F.M., Arnold, J.A., Armstrong, D.G., (1988) The chemical composition and nutritive value of grass silages prepared with no additive or with the

application of additives containing either *Lactobacillus plantarum* or formic acid. Grass and Forage Science, 43, 87-95 p.

Roussos, S., (1985) Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide: physiologie, sporulation et production de cellulases. Thèse Doctorat ès Sciences, Université de Provence, France, 193 p.

Roussos, S., Aquiahuatl, A., Cassaigne, J., Favela, E., Gutiérrez, M., Hannibal, L., Huerta, S., Nava, G., Raimbault, M., Rodriguez, W., Salas, J.A., Sanchez, R., Trejo, M., Viniegra-Gonzalez, G., (1989) Detoxificación de la pulpa de café por fermentación sólida. en Memorias I Seminario Internacional Biotecnol. Agroindust. Café (I SIBAC). Roussos, Licona y Gutiérrez (Eds), Xalapa, Veracruz, México, 121-143 p.

Roussos, S., Gaime, I., Denis, S., Marin, B., Marakis, S., Viniegra, G., (1993) Biotechnological advances on coffee byproducts utilization. en IFCON, 7-12 Septiembre, 17 p.

Rubio, J., Pineda, J., (1973) Composición química y digestibilidad *in vitro* de la pulpa de café. CENICAFE, 24. 61-76 p.

Rust, S., Mader., T., (1991) Silage Additives: Do They Work. 1991 Proceedings Nebraska Forage And Grassland Council.

Rutherford, W.M., Hinds, M.A., Dennis, S.M., (1998) Bacterial treatment for silage. Pioneer Hi-Bred International, Inc., Des Moines, Iowa, U.S.

Ruxton, I.B., McDonald, P., (1974) The influence of oxygen on ensilage. I. Laboratory studies. Journal of the Science of Food and Agriculture, 25, 107-115 p.

SAGAR (1999) Secretaría de Agricultura, Ganadería y Recursos. www.sagar.gob.mx.

Salazar, A.J., Mestre, M.A., (1991) Utilización del humus de lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*, Sav.), obtenido a partir de pulpa de café como sustrato para almácigos de café. en Memorias II Sem. Intern. Biotecnol. Agroindust. Café (II SIBAC), Manizales, Colombia.

Sánchez, C.J.C., (1991) Caficultura moderna. Serie Comunicación Agrícola. Editorial Impresas Industriales. 3a. Ed. Guatemala. 183 p.

Saucedo-Castañeda, G., (1987) Contribución al estudio de la fermentación sólida: Enriquecimiento proteico y conservación por ensilaje, Tesis de Maestría en Ciencias Ingeniería Química, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México, 169 p.

Saucedo-Castañeda, G., Gonzalez, P.B., Revah, S., Viniegra, G., Raimbault, M., (1990) Effect of lactobacilli inoculation on Casava (*Manihot esculenta*) Silage: fermentation pattern and kinetic analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 50, 467-477 p.

Sharpe, M.E., (1955) A serological classification of lactobacilli. *J. Gen. Microbiol.*, 12, 107-122 p.

Sharpe, M.E., (1970) Cell wall and cell membrane antigens used in the classification of lactobacilli. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 20, 509-518 p.

Sharpe, M.E., (1981) Identification of the lactic acid bacteria. In *Identification Methods for Bacteriologists*. Society for applied Bacteriology Technical Series No. 14, 2nd ed. Ed. Skinner and Lovelock. Academic Press, London, 233-259 p.

Schillinger, U., Holzapfel, W., Kandler, O., (1989) Nucleic acid hybridization studies on *Leuconostoc* and heterofermentative lactobacilli and description of *Leuconostoc amelibiosum* sp. nov. Syst. Appl. Microbiol., 12, 48-55 p.

Schleifer, K. H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins, M.D., Fischer, W., (1985) Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. Syst. Appl. Microbiol., 6, 183-195 p.

Schleifer, K. H., (1986) Gram-positive cocci, in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, (P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe y J. G. Holt, eds.), Williams and Wilkins, Baltimore, 2, 999-1103 p.

Seale, D.R., (1986) Bacterial inoculants as silage additives. In Microorganisms in Agriculture, Society for Applied Bacteriology Symposium Series no. 15, ed. M. Bateson, C.L. Benham & F.A. Skinner. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 9-26 p.

Selmer-Olsen, I., (1993) Assessment of silage additives using fresh or freeze-dried silage crops. Norwegian Journal of Agricultural Sciences, 7, 41-53 p.

Seppo, S.Y., Von Wright, A., (1993) Lactic Acid Bacteria. Marcel Dekker, Inc. New York. 1, 1-64 p.

Silley, P., Damoglou, A.P., (1985) The effect of three commercial silage additives on numbers of lactobacilli entering the silo at the onset of fermentation. FEMS Microbiology Letters, 30, 107-110 p.

Sivetz, M., Desrosier, N.W., (1979) Coffee technology. AVI Publishing Company, 715 p.

Smith, A.W., (1985) Introduction. *in* Coffe: Chemistry, vol. I. Clarke R.J. & Macrae R. (Eds). Elsevier Applied Science Publishers.

Soderlund, S., (1988a) Pioneer brand 1174 Silage inoculant: The new Generation of Silage Inoculants. Proceedings of Second Forage Symposium by Microbial Genetics - A Division of Pioneer Hi-Bred Int'l, Inc., 215-228 p.

Soderlund, S., (1988b) Silage Additive Use in the U.S. Proceedings of 11th Annual Virginia Forage and Grassland Council Meeting. Staunton, V.A. Feb./25/1988.

Spoelstra, S.F., (1991) Chemical and biological additives in forage conservation. In Forage conservation towards 2000. Braunschweig 1991.

Stackebrandt, E., Fowler, V.J., Woese, C.R., (1983) A phylogenetics analysis of lactobacilli, *Pediococcus pentosaceus* and *Leuconostoc mesenteroides*. Syst. Appl. Microbiol., 4, 326-337 p.

Tauk, S.M., (1986) Estudo da decomposiçao da polpa de café a 45°C através do uso de microorganismos isolados da polpa. Turrialba, 36 (3), 271-280 p.

Theodorou, M.K., Gascoyne, D.J., Akin, D.F., Hartley, R.D., (1987) Effect of phenolic acids from plant cell walls on rumen like fermentation in consecutive batch culture. Appl. Environ. Microbiol., 53: 1046-1050.

Thomas, J.W., (1988) The Role Of Additives and Other Management Techniques in Optimization of Forage Quality. Proceedings of Southwest Nutrition and Management Conference. Tempe, AZ. Feb./4-5/1988, 22-29 p.

Tomes, N.J., Cummings, I.A., (1991) Bacterial treatment to preserve silage. Pioneer Hi-Bred International, Inc., Des Moines, Iowa, U.S.

USDA. (1991) Agricultural Statistics 1991. U. S. Government Printing Office, Washington, DC.

Vargas, E., (1974) Valor nutritivo de la pulpa de café. Tesis de maestría, Universidad de San Carlos, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Guatemala, 74 p.

Vernet, M., (1987) Les résidus de traitement du café: Analyse chimique et tentatives de valorisation. Mémoire Bibliographique. Maîtrise de Sciences et Techniques de Biologie Appliquées aux I.I.A., Brest, 38 p.

Villani, F., Moschetti, G., Blaiotta, G., Coppola, S., (1997) Characterization of strains of *Leuconostoc mesenteroides* by analysis of soluble whole-cell protein pattern, DNA fingerprinting and restriction of ribosomal DNA. *Journal of Applied Microbiology*, 82, 578-588 p.

Villaseñor, L.A., (1982) Problemática de la cafeticultura mexicana y estrategia para superarla. Instituto Mexicano del Café. Xalapa, Veracruz, México. 221 p.

Wallbanks, S., Martínez-Murcia, A.J., Fryer, J.L., Phillips, B.A., Collins, M.D., (1990) 16S rRNA sequence determination for members of the genus *Carnobacterium* and related lactic acid bacteria and description of *Vagococcus salmoninarum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 40, 224-230 p.

Wang, D.I.C., Cooney, C.L., Demain, A.L., Dunnill, P., Humphrey, A.E., Lilly, M.D., (1979) Fermentation and enzyme technology. John Wiley & Sons, Inc. 374 p.

Watson, S.J., Smith, A.M., (1984) Silage. Crosby Lockwood & Son LTD., London

Weinberg, Z.G., Ashbell, G., Azrieli, A., (1988) The effect of applying lactic acid bacteria at ensilage on the chemical and microbiological composition of vetch, wheat and alfalfa silages. Journal of Applied Bacteriology, 64, 1-7 p.

Weinberg, Z.G., Ashbell, G., Hen, Y., Azrieli, A., (1993) The effect of applying lactic acid bacteria at ensiling on the aerobic stability of silages. Journal of Applied Bacteriology, 75, 512-518 p.

Weinberg, Z.G., Ashbell, G., Bolsen, K.K., Pahlow, G., Hen, Y., Azrieli, A., (1995) The effect of a propionic acid bacterial inoculant applied at ensiling, with or without lactic acid bacteria, on the aerobic stability of pearl millet and maize silages. J. Appl. Bacteriol., 78, 430-436 p.

Weinberg, Z.G., Muck, R.E., (1996) New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. FEMS Microbiology Reviews, 19, 53-68 p.

Whittenbury, R., (1961) An investigation of the lactic acid bacteria, Ph. D. Thesis, University of Edinburgh.

Whittenbury, R., McDonald, P., Bryan-Jones, D.G., (1967) A short review of some biochemical and microbiological aspects of ensilage. J. Sci. Food Agric., 18, 441-444 p.

Wilbaux, R., (1956) Les caféiers au Congo Belge. Technologie du café, Arabica et Robusta. Publication de la direction de l'agriculture, des forêts et de l'élevage. Bruxelles, 213 p.

Wilkinson, J.M., (1988) Silage and health. In: *Silage and Health* (Stark, B.A. and Wilkinson, J.M., Eds.), Chalcombe Publications, Aberystwyth, UK 1-6 p.

Willems, A., Pot, B., Falsen, E., Vandamme, P., Gillis, M., Kersters, K., De Ley, J., (1991) Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Comamonas*: relationship to *Aquaspirillum aquaticum*, E. Falsen Group 10, and other clinical isolates. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41, 427-444 p.

Willems, A., Goor, M., Thielemans, S., Gillis, M., Kersters, K., De Ley, J., (1992) Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42, 107-119 p.

Williams, A.M., Fryer, J.L., Collins, M.D., (1990) *Lactococcus piscium* sp. nov. a new *Lactococcus* species from salmonid fish. *FEMS Microbiol. Lett.*, 68, 109-114 p.

Windholz, M., Budavari, S., Blumetti, R.F., Otterbein, E.S., (1983) *The Merck Index*. Merck & Co (Eds), Rahway, N.J., USA. 10a edition.

Wood, B.J.B., (1985) *Microbiology of Fermented Foods*. Elsevier Applied Science Publishers, London, U.K., vol. 1 and 2.

Woolford, M.K., (1984) *The silage fermentation*. Marcel Dekker, Inc. NY, NY.

Woolford, M.K., Sawezye, M.K., (1984) An investigation into the effect of cultures of lactic acid bacteria on fermentation in silage. 1. Strain selection. *Grass and Forage Science*, 39 (2), 139-148 p.

Zuluaga, J., Bonilla, C., Quijano, R.M., (1975) Contribución al estudio y utilización de la pulpa de café. 7 Col. Intern. Quem. Café, Hamburg, ASIC Ed, Paris, 233-242 p.

Zuluaga, V.J., Tabacchi, R., (1980) Contribution a l'étude de la composition chimique de la pulpe de café. Association Scientifique Internationale du Café (ASIC), 9ème Colloque, Londres, 335-344 p.

Zuluaga, J., (1981) Contribution à l'étude de la composition chimique de la pulpe de café (Coffea arabica L.). Thèse de Doctorat es Science, Faculté des Sciences, Université de Neuchatel, Suisse. 93 p.

Zuluaga, J., (1989) Utilización integral de los subproductos del café. en Memorias I Seminario Internacional Biotecnol. Agroindust. Café (I SIBAC), Roussos, Licono y Gutiérrez (Eds), Xalapa, Veracruz, México, 63-76 p.

8. ANEXOS

Anexo 1.- Medios para el aislamiento y caracterización de cepas de bacterias lácticas.

Medio para el aislamiento y conservación de cepas

El medio MRS (Difco) a una concentración de 55 g/l. fue el medio con el que se trabajó en todos los experimentos, su composición en g/l es la siguiente:

Polipeptona	10
Extracto de carne	10
Extracto de levadura	10
Glucosa	20
Tween 80	1.08
Fosfato dipotásico	2
Acetato de sodio	5
Citrato de amonio	2
Sulfato de magnesio	0.2
Sulfato de manganeso	0.05
Agar bacteriológico	15

Medio para evaluación de microflora total

Para la microflora total (bacterias y levaduras aerobias) se usó el medio Plate Count Agar (PCA Bioxon) a una concentración de 23.5 g/l, su composición en g/l es la siguiente:

Peptona de caseína	5
Extracto de levadura	2.5
Dextrosa	1
Agar	15

Medio para la determinación de motilidad (g/l)

Extracto de carne	3
Peptona	10
NaCl	5
Agar bacteriológico	4

Medio para fermentación de glucosa (acidificación) g/l

Extracto de carne	1
Peptona	10
NaCl	5
Púrpura de bromocresol	0.018
Agar bacteriológico	15
Glucosa	10

Anexo 2.- Procedimiento para el uso de las técnicas para la identificación de cepas de bacterias lácticas.

Procedimiento para el uso del Sistema API 50 CH

En la realización de las galerías API 50 CH se necesitaron tubos con 5 ml de solución fisiológica (Agua destilada más NaCl 8.5 g/l), así como también aceite de parafina, puntas y pipetas todos estériles. Además se prepararon en un frasco 150 ml de solución fisiológica, para 10 tubos con cultivo, se necesitaron 10 ml por tubo para un primer lavado y 2 ml más por tubo para resuspensión de la placa de bacterias. El experimento se llevó a cabo de la siguiente manera:

Para la preparación del inóculo se cultivaron las bacterias en tubos (9 ml de medio MRS Difco más 1 ml de cultivo) durante 24 hr a 30°C. Los cultivos se centrifugaron 10 min a 5000 rpm. Se vació el sobrenadante del tubo en condiciones estériles y se resuspendió la pastilla de bacterias en

en 2 ml de solución fisiológica.

Para medir la densidad de cada cepa, se agregaron gotas del cultivo lavado en 5 ml de solución fisiológica. Contando las gotas y observando, hasta obtener la misma densidad que el tubo número 2 de Mc Farland. Se agregó el doble del número de gotas contadas previamente en un tubo de medio 50 CHL. Se homogeneizó suavemente evitando derramar el líquido, se preparó la galería de cada cepa, poniendo la caja de incubación (fondo y cubierta), se llenaron los pozos del fondo con agua destilada y se colocaron las galerías en el fondo de la caja de incubación.

Para inocular las galerías, se inclinó la caja de incubación colocándola sobre la cubierta de la misma. Se llenaron las cúpulas con el medio 50 CHL inoculado utilizando una pipeta Pasteur, tomando la precaución de verterlo por una de las paredes para evitar la formación de burbujas, y se sellaron las cúpulas con parafina estéril. Se incubó la caja a 30°C, se tomaron las lecturas a las 24 hr y se confirmaron a las 48 hr de acuerdo al siguiente criterio:

- 0 Azul fuerte = Negativo
- 1 Violeta menos fuerte
- 2 Violeta mas claro (verdoso)
- 3 Verde fuerte
- 4 Verde claro (amarillento)
- 5 Amarillo = Positivo

Procedimiento para el uso del Sistema APIZYM

para lo cual se prepararon 130 ml de solución fisiológica (Agua destilada más NaCl 8.5 g/l) para 10 tubos con cultivo en el que se usaron 10 ml por tubo para el lavado.

Puntas y pipetas estériles. El procedimiento fué el siguiente:

La preparación del inóculo se llevó a cabo cultivando las bacterias en tubos (9 ml de medio MRS Difco más 1 ml de cultivo) incubando 24 hr a 30°C. Se centrifugaron los cultivos 10 min a 5000 rpm, se vació el sobrenadante del tubo en condiciones estériles y se resuspendió la pastilla de bacterias en 10 ml de sln. fisiológica (8.5 g/l NaCl), se centrifugó nuevamente y se resuspendió la pastilla de bacterias en 2 ml de un medio en suspensión el cual venía con el kit.

Para medir la densidad de cada cepa se agregaron gotas del cultivo lavado en 2 ml de un medio en suspensión, de manera que al agregarlas y agitar suavemente el tubo se observara la misma densidad del tubo número 5 - 6 de Mc Farland. Se homogeneizó suavemente y se preparó la galería de cada cepa, colocando la caja de incubación (fondo y cubierta), se llenaron los pozos del fondo de la caja de incubación con agua destilada, para después colocar las galerías.

Para inocular las galerías se inclinó la caja de incubación colocándola sobre la cubierta de la misma, llenando las cúpulas a razón de 65 µl por cúpula, con la muestra de 2 ml del medio en suspensión, se colocó la cubierta y se incubó a 30°C durante 4 hr.

Transcurridas 4 hr las galerías se sacaron de la incubadora y bajo la campana de flujo laminar se agregó a cada cúpula una gota de reactivo zym A y una gota de reactivo zym B. Las coloraciones se desarrollaron durante 5 minutos.

Se expusieron las galerías a la luz (1000 W), a una distancia de 10 cm durante 10 segundos, se tomaron las lecturas con una tabla colorimétrica del kit en donde se tomó en cuenta la intensidad del color de acuerdo a los números abajo descritos.

0 = Negativo

1 = 5 nmol

2 = 10 nmol

3 = 20 nmol

4 = 30 nmol

5 = Positivo \geq 40 nmol.

Procedimiento para la electroforesis del DNA de cepas de bacterias lácticas:

En 10 ml de medio MRS (Difco) estéril se inoculó 1 ml de cultivo de bacterias lácticas, se incubó a 30°C durante 24 h. Transcurridas las 24 h se tomó 1 ml del cultivo y se inoculó en 10 ml de medio MRS, se incubó a 30°C durante 4 h. Se centrifugó 10 minutos a 4°C a 5000 rpm, se vació el sobrenadante y se resuspendió la pastilla de bacterias con 1 ml de solución amortiguadora T. Posteriormente se ajustó a 10 ml agregando 9 ml de solución amortiguadora T, y se centrifugó nuevamente, después de la 2da centrifugación se vació el sobrenadante y se resuspendió la pastilla con 1 ml de solución amortiguadora T. Durante la 2da centrifugación se prepararon las curvas espectrofotométricas, para esto se prepararon 2 celdas por cepa y 1 celda para el testigo, en las que se agregó 2 ml de agua agregando 20 μ l de suspensión de bacterias. Se midió la DO a 600 nm.

De cada cepa se preparó una suspensión de un volumen de 250 μ l con solución amortiguadora T más bacterias, y se midió DO a 600 nm hasta obtener una densidad óptica comprendida entre 0.07 y 0.09, esto con el fin de obtener una cantidad suficiente de DNA. En tubos eppendorf previamente rotulados con el nombre de las cepas, se tomó los 250 μ l y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Durante este tiempo se pesaron en tubos 250 mg de lisozima que se disolvieron en 2.6 ml de solución amortiguadora TS, 45 mg de incert agarosa, y 20 mg de proteinasa K, tomando en cuenta que eran 250 μ l por cepa.

De la solución de lisozima más solución amortiguadora TS se agregaron 250 μ l a la pasta que quedó en cada tubo eppendorf después de vaciar el sobrenadante, al mismo tiempo se agregaron 20 μ l de mutanolizima, se agitó bien y posteriormente se incubó 1 h a 37°C. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 5000 rpm 5 minutos a temperatura ambiente, durante este tiempo se agregaron 10 ml de solución de lisis a los 20 mg de proteinasa K. Se vació el sobrenadante de los tubos eppendorf con cuidado de no maltratar la placa de bacterias y se resuspendió en 250 μ l de solución amortiguadora SE por tubo. Posteriormente se pusieron los tubos en baño maría a 37°C durante 1 h. Durante este tiempo se le agregaron 3 ml de solución amortiguadora Agarosa al tubo con los 45 mg de incert agarosa (concentración final de 1.5 %), poniendo el tubo destapado a baño maría en el microondas, calentando minuto a minuto, y agitando suavemente entre cada calentamiento cuidando que no se formaran burbujas hasta que el líquido quedara cristalino. Posteriormente se tapó el tubo y se sujetó con cinta scotch en una de las paredes del recipiente del baño maría.

Se prepararon los moldes donde se forman los bloques, colocándoles por un lado una tira de cinta scotch, rotulándolos con el nombre de la cepa y el número del bloque. Después se prepararon los tubos donde se iban a conservar estos bloques con 1 ml de solución de lisis y proteinasa K por tubo. Posteriormente se retiraron los tubos eppendorf de la incubadora agitándolos bien, y se colocaron en una gradilla dentro del recipiente del baño maría. Luego se tomó una micropipeta de 1 ml, la cual se introdujo al tubo que contenía la solución de agarosa en el baño maría, mezclando de tal forma que la punta de la micropipeta se calentara. Posteriormente se tomaron 250 μ l de agarosa, se depositaron en uno de los tubos eppendorf que contenía la suspensión de bacterias y se homogeneizó. Con la misma micropipeta se llenó cada pozo del molde para formar los bloques, inclinándolo un poco para llenarlo correctamente y sin formación de burbujas. Para cada cepa se repitió la misma operación siempre cambiando de punta.

Se dejaron los moldes de 1 a 2 minutos en congelación para después empujar los bloques delicadamente con una espátula de plástico y dejarlos caer en el tubo el cual contenía 1 ml de

solución de lisis más proteinasa K, posteriormente estos tubos se incubaron en baño maría a 50°C durante 48 h. después se limpió el material con etanol al 70 %, se lavaron los moldes y las espátulas y se dejaron con agua miliQ toda la noche, al siguiente día se secaron sobre papel filtro. Transcurridas las 48 h se reemplazó la solución de lisis más proteinasa K por 1 ml de solución de lisis sin proteinasa K y se guardó a 4°C durante la noche.

RESTRICCIÓN DEL DNA

Se retiró de los tubos la sln. de lisis y a continuación se agregaron aproximadamente 2 ml de solución amortiguadora TE pH 8 estéril, y se dejaron agitando los tubos 15 minutos a temperatura ambiente, luego con una micropipeta de 1 ml se vació la solución amortiguadora TE teniendo mucho cuidado de no ir hasta el fondo del tubo para que no se dañaran los bloques. Posteriormente se añadió solución amortiguadora TE directamente de la botella evitando que ésta tocara el tubo, se agitaron los tubos durante 2 h a temperatura ambiente. Estos lavados se repitieron de la misma forma 2 veces más, con 2 h de agitación entre cada lavado.

De cada tubo se vació la solución amortiguadora TE pH 8, la cual se reemplazó por 2 ml de solución amortiguadora TE pH 7.5 más 20 µl de PMSF (fenilmetilsulfonil fluoride 1 mM en alcohol isopropílico) para después ponerlos en una estufa a 37°C durante 2 h, luego se vació el líquido y se agregó nuevamente 2 ml de solución amortiguadora TE más PMSF mezclando suavemente con la mano de tal forma que no se rompieran los bloques. Se guardaron a 4°C durante la noche. En la mañana del siguiente día, sobre una caja de Petri, con una espátula limpia se retiraron los bloques de cada cepa y se colocaron en un tubo eppendorf, a los cuales se agregó 500 µl de solución amortiguadora TE pH 7.5, cuidando no tocar la boca de cada tubo eppendorf con la punta de la micropipeta, esto se realizó una vez más, y se dejó en la solución amortiguadora durante 2 h a 37°C. Posteriormente se incubó cada bloque con 200 µl (180 µl de agua desionizada y 20 µl de solución amortiguadora de restricción concentrada 10 veces) de solución amortiguadora de restricción provista con la enzima, la cual se mezcló y usó inmediatamente después de sacarla

del congelador. Luego, cada tubo se golpeó suavemente con la mano para mezclar bien la solución amortiguadora con el bloque y se conservaron en un baño con hielo durante 2 h. Transcurrido el tiempo se retiró la solución amortiguadora de restricción y se añadieron 219 μ l de agua destilada, 1 mg/ml de enzima BSA acetilada, 25 μ l de solución amortiguadora de restricción concentrada 10 veces, 6 μ l de enzima Eco RI a 12 U/ μ l (es decir, aproximadamente 25 U por bloque), la cual se sacó del congelador a -20°C , se mezcló con una micropipeta y se añadió a los tubos eppendorf, para después golpearlos suavemente con la mano. Se incubaron durante la noche a 37°C .

Para la conservación de los bloques después de la restricción, se aspiró con una micropipeta la solución amortiguadora de restricción de DNA y se agregaron 300 μ l de solución amortiguadora ES (EDTA 0.5 M pH 8, Sarcosyl 1 %), y se dejó 2 h a 50°C . Se retiró la solución y se agregó 500 μ l de solución amortiguadora ESP (EDTA 0.5 M, Sarcosyl 1 %, Proteinasa K1 mg/ml= 50 μ l de proteinasa Ka 20 mg/ml de solución amortiguadora ESP) y se refrigeró (4°C).

Para hacer la electroforesis, primero se lavó la placa de electroforesis lavando el molde, por lo que después se niveló y se colocó el peine sujetándolo con unas pinzas. Para preparar el gel de 400 ml de agarosa Fast Lane a 1 % en TAE 1X, se pesaron 4 g de agarosa Fast Lane en un matraz erlenmeyer y se le agregaron 400 ml de solución amortiguadora TAE 1X, se taró el matraz y se introdujo en un horno microondas para calentarlo a razón de un minuto por cada 100 ml, agitando suavemente entre cada calentamiento cuidando que no se formaran burbujas, y así hasta que el líquido quedó cristalino. Luego se pesó de nuevo el matraz para determinar la evaporación por el calentamiento en el microondas y con agua de la llave se enfrió el matraz, hasta que éste no quemara las manos. Después se vertió rápidamente el gel en el molde para electroforesis procurando no formar burbujas y se dejó solidificar a temperatura ambiente.

Antes de introducir los bloques se les vació la solución amortiguadora y se enjuagaron en 500 μ l de solución amortiguadora TE durante 30 minutos y después en 500 μ l de solución amortiguadora

TAE IX durante 30 minutos. El gel se dejó en el molde con 2 l de la solución amortiguadora TAE IX de tal forma que ésta solución lo cubriera totalmente. Se sacó el gel de la solución amortiguadora y se colocó en una bandeja con papel absorbente. Se vaciaron los tubos eppendorf de la solución amortiguadora usando una micropipeta, y con la ayuda de 2 espátulas de plástico lavadas con alcohol al 70 % se hizo caer el bloque en una espátula y con la ayuda de la otra se deslizó el bloque en uno de los pozos del gel, y así para cada bloque de las cepas. Posteriormente se llevó la placa al molde conteniendo la solución amortiguadora TAE IX y se introdujo en él. Después con una micropipeta se introdujo la solución amortiguadora de carga (marcador de 100 bp) a razón de 15 µl. Se conectó el aparato verificando la posición de la migración (el DNA cargado negativamente migra hacia el lado +) y el nivel de la solución amortiguadora

Condiciones de electroforesis:

Voltaje: 120 V

Intensidad: 560 A

Tiempo: 17 h

Anexo 3.- Soluciones para la tinción de Gram y soluciones amortiguadoras usadas en la electroforesis.

Soluciones para tinción de Gram

Cristal de violeta

Cristal violeta 2 g

Alcohol etílico 95 % 20 ml

Oxalato de NH₄ 0.8 g

H₂O destilada 100 ml

Iodo de Gram

Ioduro de Potasio 2 g

Cristales de Iodo 1 g

H₂O destilada 100 ml

Decolorante

Acetona 50 ml

Alcohol etílico 95 % 50 ml

Contratinción

Safranina O 2.5 g

Alcohol etílico 95 % 100 ml

Agregar 10 ml a H₂O destilada

Soluciones de electroforesis.

Todas las soluciones fueron preparadas con agua desionizada filtrada y esterilizadas a 121°C.

Solución amortiguadora T (Para lavar células)

Tris Hcl 20 mM pH 8.2

Para 500 ml: 5 ml Tris Hcl 2 M pH 8.2 en 495 ml H₂O.

Solución amortiguadora TS (La sacarosa es un protector osmótico, mantiene una tensión osmótica normal entre las células)

Tris Hcl 50 mM pH 7.5

Sacarosa al 25 %

Para 100 ml: 5 ml de Tris Hcl 1 M pH 7.5, 25 g de sacarosa en 95 ml de H₂O.

Solución amortiguadora SE (Lavado antes de la acción de las enzimas de restricción)

Para 100 ml: 1.5 ml de NaCl 5 M, 5 ml de EDTA 0.5 M y 93.5 ml de H₂O.

Solución amortiguadora ESP

Agregar 1 mg de proteinasa K por ml de solución amortiguadora ES (50 µl de proteinasa K a 20 mg/ml en 1 ml de amortiguador ES).

Solución de lisis

Para 250 ml: 2.5 g de N lurylsulfonil (inhibe la proteinasa)

25 µl EDTA 0.5 M pH 8 en 250 ml de H₂O.

Solución para agarosa

Para 250 ml: 2.5 ml Tris Hcl 1 M pH 8, 0.20 g MgCl₂ 6H₂O, 2 ml de EDTA 0.5 M pH 8, QSP 250 ml de H₂O.

Solución amortiguadora TE pH 8

Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8

Para 100 ml: 1 ml Tris 1 M pH 8, 200 µl EDTA 0.5 M pH 8 en 98.8 ml de H₂O.

Solución amortiguadora TE pH 7.5

Para 100 ml: 1 ml Tris 1 M pH 7.5, 200 µl EDTA 0.5 M pH 8 en 98.8 ml de H₂O.

Solución amortiguadora TEP: solución amortiguadora TE con 1 mM PMSF

PMSF (fenilmetilsulfonil fluoride) estable en alcohol isopropílico.

Solución 0.1 M de PMSF: 0.017 g en 1 ml de alcohol isopropílico. Para 2 ml de solución pH 7.5 agregar 20 µl de PMSF 1 M.

Solución amortiguadora ES

EDTA 0.5 M pH 8

Sarcosil 1 %

Para 100 ml: 100 ml de EDTA 0,5 M pH 8, 1 g de sarcosil.

Solución amortiguadora ESP

EDTA 0.5 M pH 8

Sarcosil 1 %

Proteínasa K 1 mg/ml (50 μ l de proteínasa K a 20 mg/ml de solución ES)

Solución amortiguadora TBE 0.5 X

Solución amortiguadora TAE 1X

Es equivalente a la anterior, solo que esta puede conservarse a razón de 50 X, es decir concentrada 50 veces.