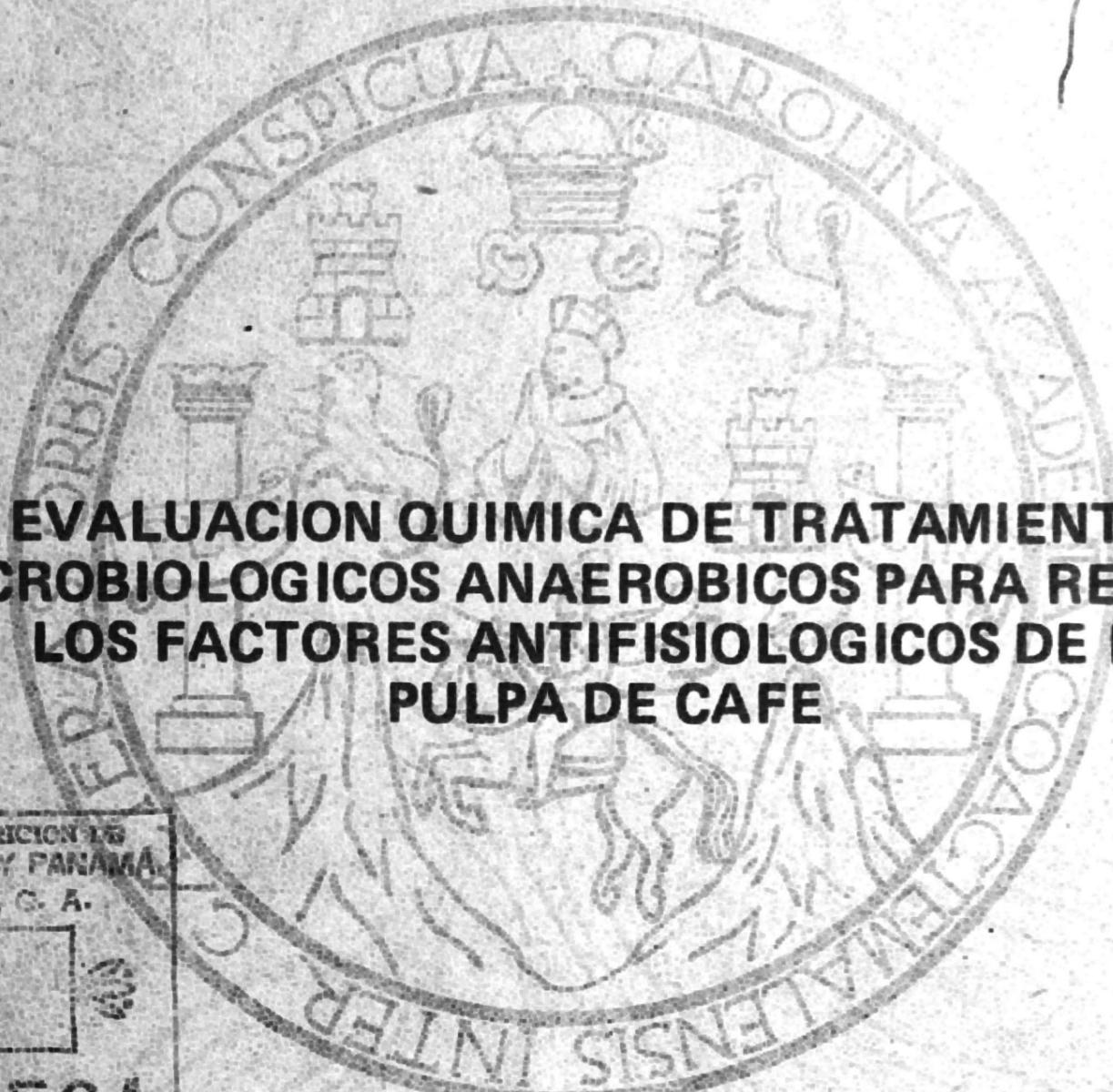


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**



**EVALUACION QUIMICA DE TRATAMIENTOS  
MICROBIOLOGICOS ANAEROBICOS PARA REDUCIR  
LOS FACTORES ANTIFISIOLOGICOS DE LA  
PULPA DE CAFE**

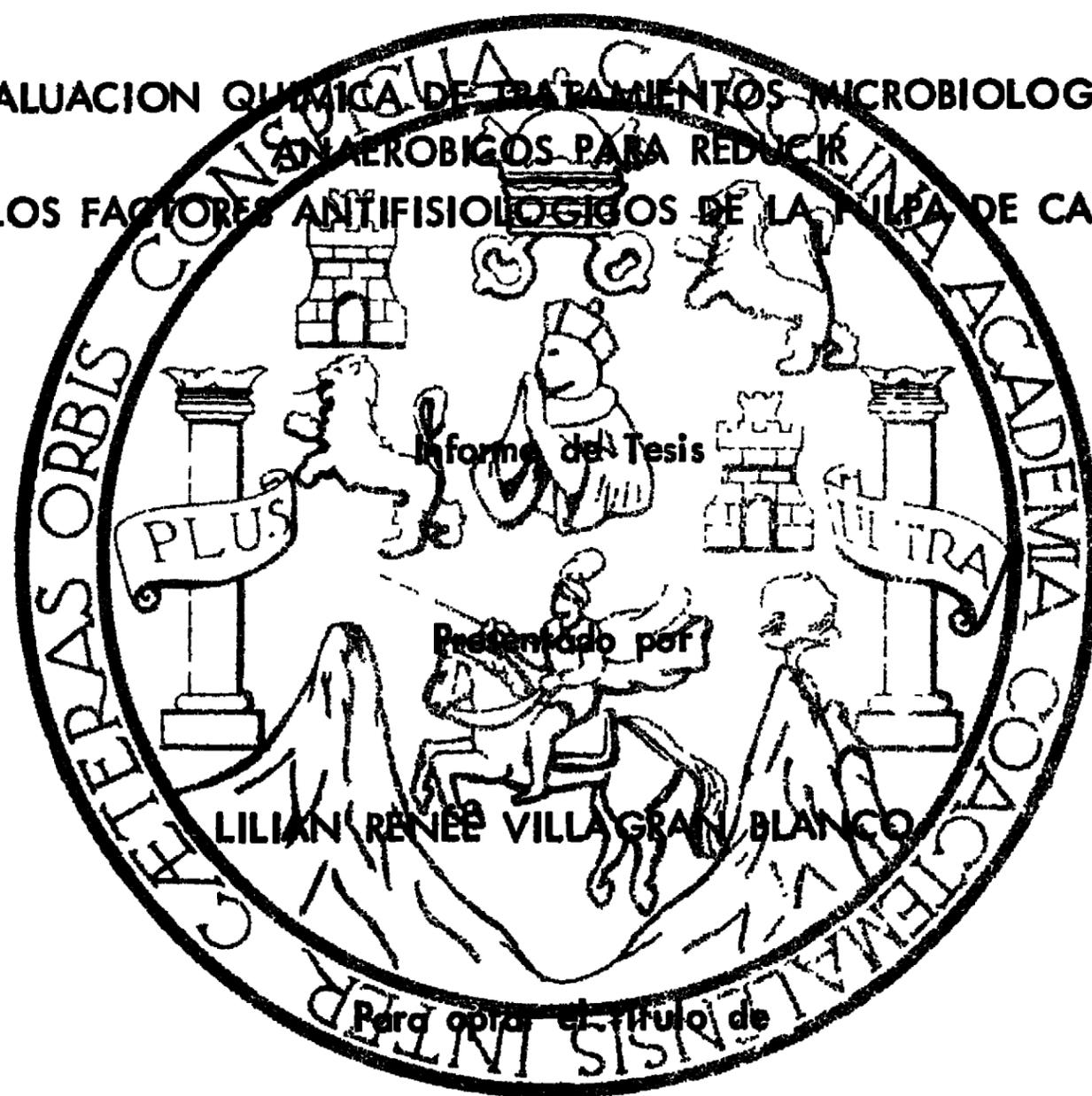
INSTITUTO DE NUTRICION EN  
CENTRO AMERICA Y PANAMA  
GUATEMALA, G. A.  
  
**BIBLIOTECA**

**LILIAN RENEE VILLAGRAN BLANCO**

**GUATEMALA, SEPTIEMBRE DE 1981**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

**EVALUACION QUIMICA DE TRATAMIENTOS MICROBIOLÓGICOS  
ANAEROBÍGOS PARA REDUCIR  
LOS FACTORES ANTIFISIOLÓGICOS DE LA PULPA DE CAFE**



**QUIMICO BIOLOGO**

**INCAP T-337**

**Guatemala,  
septiembre de 1981**

**JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE  
CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

**DECANO: LIC. LEONEL CARRILLO REEVES**

**SECRETARIO: LIC. CARLOS AUGUSTO POSADAS VASQUEZ**

**VOCAL 1º: DR. JOSE HECTOR AGUILAR ARREOLA**

**VOCAL 2º: LIC. ENRIQUE BLANCO SALGUERO (QEPD)**

**VOCAL 3º: LIC. JUSTO COMAS FUXET**

**VOCAL 4º: BR. GUIDO VINICIO ARREOLA SMITH**

**VOCAL 5º: BR. ERICK ESTUARDO JUAREZ VARGAS**

**DEDICO ESTA TESIS**

**A MI MADRE**

**A MI PADRE**

**A MI ESOSO**

**A MI HIJA**

**A MIS HERMANOS**

## **AGRADECIMIENTO**

**Al Dr. Mario Roberto Molina por la asesoría recibida en el presente trabajo.**

**A la Licda. Beatriz Murillo por su valiosa colaboración en el diseño y realización de este trabajo.**

**Al Dr. Ramiro Batres por su continua orientación y ayuda.**

**Al Lic. Ricardo Sibrián por su orientación en el análisis estadístico.**

**A los profesionales y personal técnico de la División de Ciencias Agrícolas y Alimentos del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá; especialmente a Marco Antonio Baten por su continua colaboración en el desarrollo de este estudio.**

## **RECONOCIMIENTO**

**A la Universidad de San Carlos de Guatemala**

**A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia**

**Al Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá**

## INDICE

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCION	4
III.	ANTECEDENTES	5
IV.	OBJETIVOS	22
V.	HIPOTESIS	23
VI.	JUSTIFICACIONES	24
VII.	ASPECTOS METODOLOGICOS	25
VIII.	RESULTADOS	31
IX.	DISCUSION	40
X.	CONCLUSIONES	46
XI.	RECOMENDACIONES	47
XII.	BIBLIOGRAFIA	48
XIII.	ANEXOS	60

## LISTA DE CUADROS

- |                  |  |
|------------------|--|
| <b>CUADRO 1</b>  | <b>RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS PRUEBAS DE FERMENTACION DE AZUCARES</b>   |
| <b>CUADRO 2</b>  | <b>RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS PRUEBAS DE ASIMILACION DE AZUCARES</b>  |
| <b>CUADRO 3</b>  | <b>PROMEDIO DE LOS VALORES DE pH EN EL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE CON Y SIN INOCULO DE DOS LEVADURAS</b>  |
| <b>CUADRO 4</b>  | <b>PROMEDIOS DEL CONTENIDO DE ACIDO LACTICO EN EL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE CON Y SIN INOCULO DE DOS LEVADURAS</b>   |
| <b>CUADRO 5</b>  | <b>PROMEDIOS DEL CONTENIDO DE ACIDO ACETICO EN EL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE CON Y SIN INOCULO DE DOS LEVADURAS</b>   |
| <b>CUADRO 6</b>  | <b>PROMEDIOS DEL CONTENIDO DE METANOS EN EL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE CON Y SIN INOCULO DE DOS LEVADURAS</b>   |
| <b>CUADRO 7</b>  | <b>PROMEDIOS DEL CONTENIDO DE ETANOL EN EL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE CON Y SIN INOCULO DE DOS LEVADURAS</b>  |
| <b>CUADRO 8</b>  | <b>PROMEDIOS DE LA POBLACION MICROBIANA TOTAL EN EL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE CON Y SIN INOCULO DE DOS LEVADURAS</b>   |
| <b>CUADRO 9</b>  | <b>PROMEDIOS DE LOS RECUENTOS DE LEVADURAS CAPACES DE USAR CAFEINA COMO UNICA FUENTE DE NITROGENO EN EL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE CON Y SIN INOCULO DE DOS LEVADURAS</b> |
| <b>CUADRO 10</b> | <b>PROMEDIOS DEL CONTENIDO DE HUMEDAD EN EL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE CON Y SIN INOCULO DE DOS LEVADURAS</b>   |

- CUADRO 11**      **PROMEDIOS DEL CONTENIDO DE PROTEINA CRUDA (N x 6.25) EN EL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE CON Y SIN INOCULO DE DOS LEVADURAS**
- CUADRO 12**      **PROMEDIOS DEL CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES EN EL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE CON Y SIN INOCULO DE DOS LEVADURAS**
- CUADRO 13**      **PROMEDIOS DEL CONTENIDO DE CAFEINA EN EL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE CON Y SIN INOCULO DE DOS LEVADURAS**
- CUADRO 14**      **COMPOSICION QUIMICA DE LA PULPA DE CAFE**
- CUADRO 15**      **CONTENIDO DE AMINOACIDOS EN LA PULPA DE CAFE**
- CUADRO 16**      **CONTENIDO DE CENIZAS Y DE ALGUNOS MINERALES EN LA PULPA DE CAFE**
- CUADRO 17**      **CAMBIOS EN LA COMPOSICION QUIMICA DE LA PULPA DE CAFE ENSILADA EN SILOS DE FOSO**
- CUADRO 18**      **COSTO POR TONELADA DEL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE SIN INCLUIR TRANSPORTE**

## LISTA DE GRAFICAS

- GRAFICA 1** LINEAS DE REGRESION QUE DESCRIBEN LOS CAMBIOS DE ACIDEZ EN EL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE
- GRAFICA 2** LINEAS DE REGRESION QUE DESCRIBEN LOS CAMBIOS DE CONCENTRACION DE ACIDO LACTICO EN EL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE
- GRAFICA 3** LINEAS DE REGRESION QUE DESCRIBEN LOS CAMBIOS EN CONCENTRACION DE ACIDO ACETICO DURANTE EL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE
- GRAFICA 4** LINEAS DE REGRESION QUE DESCRIBEN LOS CAMBIOS EN CONCENTRACION DE METANOL EN EL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE
- GRAFICA 5** LINEAS DE REGRESION QUE DESCRIBEN LOS CAMBIOS EN CONCENTRACION DE ETANOL EN EL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE
- GRAFICA 6** LINEAS DE REGRESION QUE DESCRIBEN EL CRECIMIENTO MICROBIOLOGICO EN EL ENSILAJE DE LA PULPA DE CAFE
- GRAFICA 7** LINEAS DE REGRESION QUE DESCRIBEN EL CRECIMIENTO DE LEVADURAS CAPACES DE USAR CAFEINA COMO UNICA FUENTE DE NITROGENO DURANTE EL ENSILAJE DE LA PULPA DE CAFE
- GRAFICA 8** LINEAS DE REGRESION QUE DESCRIBEN LOS CAMBIOS DE HUMEDAD OBSERVADOS EN EL ENSILAJE DE LA PULPA DE CAFE
- GRAFICA 9** LINEAS DE REGRESION QUE DESCRIBEN LOS CAMBIOS DE CONCENTRACION DE PROTEINA EN EL ENSILAJE DE LA PULPA DE CAFE

- GRAFICA 10** LINEAS DE REGRESION QUE DESCRIBEN LOS CAMBIOS EN CONCENTRACION DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES EN EL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE
- GRAFICA 11** LINEAS DE REGRESION QUE DESCRIBEN LOS CAMBIOS EN CONCENTRACION DE CAFEINA EN EL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE
- GRAFICA 12** LINEAS DE REGRESION QUE DESCRIBEN LA RELACION QUE EXISTE ENTRE EL CRECIMIENTO DE LEVADURAS CAPACES DE USAR CAFEINA COMO UNICA FUENTE DE NITROGENO Y LA CONCENTRACION DE CAFEINA EN LOS SILOS

## I. RESUMEN

Con el propósito de aislar levaduras capaces de usar cafeína como única fuente de nitrógeno, se prepararon medios de cultivo que contienen este alcaloide como única fuente de nitrógeno. Dichos medios fueron luego inoculados con una suspensión de pulpa de café e incubados en microaerofilia durante 48 horas a 25, 30 y 37°C. A través de tal técnica fue posible aislar dos cepas de levaduras identificadas como Saccharomyces sp. y Schizosaccharomyces sp. las cuales por trasposos sucesivos, mostraron su capacidad de crecer a 25 ó 30°C en el medio y condiciones citados, tanto microaerofílica como aeróbicamente. Posteriormente se preparó un lote mayor, por cultivo, en un fermentador para obtener un inóculo de 31.7 gramos (base seca) de cada una de las levaduras y ser inoculadas en 30 Kg. de pulpa de café (82 % de humedad).

Cada porción de pulpa inoculada fue luego dividida en lotes de 1 Kg., los cuales fueron adicionados de 3% de melaza y ensilados en condiciones de laboratorio. Otra porción de pulpa (30 Kg.) no inoculada fue ensilada en forma similar y tomada como control. Los silos se abrieron en triplicado al 0, 1, 3, 4, 7, 15, 30, 45 y 60 días de ensilaje. Los resultados señalaron que el número total de levaduras capaces de usar cafeína como única fuente de nitrógeno, fue siempre significativamente mayor ( $P < 0.01$ ) en aquellas muestras inoculadas que en las no inoculadas. En el caso del grupo inoculado con Saccharomyces sp. y el grupo control, la fase de crecimiento logarítmico terminó después del cuarto día de ensilaje, y en el grupo inoculado con Schizosaccharomyces sp. después del quinto día. Los tres grupos terminaron la fase de aceleración negativa después del día 15 y entraron en la fase estacionaria. Cabe mencionar que el mismo patrón de curva de crecimiento se encontró en el caso del recuento total de microorganismos por gramo en todos los casos, en cada tiempo de conteo. Por los cambios en composición química observados en los diferentes tiempos evaluados correspondientes a cada fase de crecimiento, se puede observar que el término de la etapa de crecimiento logarítmico coincidió con una franca caída en azúcares solubles totales, que resultó ser altamente significativa. Al final de la etapa de crecimiento de aceleración negativa se lograron concentraciones más bajas de azúcares solubles totales y una franca caída del pH, acompañada de una elevación altamente significativa ( $P < 0.01$ ) en los valores de ácido láctico. Sin embargo, al final de esta etapa la concentración de cafeína,

expresada porcentualmente, permaneció muy similar a la encontrada al final de la etapa de crecimiento logarítmico, señalando posiblemente una mínima utilización por parte de los microorganismos.

Se encontró una correlación significativa ( $P < 0.05$ ) entre el crecimiento de levaduras capaces de usar cafeína como fuente de nitrógeno y la disminución de la concentración de cafeína en los silos inoculados con Saccharomyces sp.

La concentración de proteína cruda ( $N \times 6.25$ ) aumentó significativamente ( $P < 0.01$ ) a través del tiempo de ensilaje en los tres grupos estudiados.

## II. INTRODUCCION

En Guatemala existen grandes cantidades de pulpa de café, las cuales han llegado a constituir un serio problema de contaminación ambiental, por ser descartadas en los ríos y de esta manera contaminan el agua debido al abundante crecimiento de hongos y bacterias que se lleva a cabo en la pulpa.

Se han estudiado varias alternativas que permiten el aprovechamiento de este desecho agrícola. Una de éstas la constituye el uso de pulpa de café como alimento para animales, ya que su contenido de proteínas es relativamente alto. Para este propósito se han realizado numerosos estudios tendientes a mejorar su calidad. Uno de los procesos que ha dado resultados promisorios es el ensilaje de la pulpa, y se considera que existe la posibilidad de que durante este proceso fermentativo se puedan degradar microbiológicamente los compuestos hasta ahora identificados como limitantes en la pulpa de café, que son la cafeína y los polifenoles o taninos.

El presente trabajo se propone evaluar el efecto que puede tener el inóculo, al momento de ensilaje, de microorganismos capaces de usar cafeína como fuente de nitrógeno, y así poder reducir este agente antifisiológico presente en la pulpa de café. También se pretenden evaluar otros cambios en su composición química que puedan contribuir a mejorar la calidad de la misma.

### III. ANTECEDENTES

#### A. Pulpa de café: generalidades y características químicas

La pulpa de café es un desecho agrícola que existe en grandes cantidades en los países productores de café. Con base en la producción total de café, se estima que América Latina dispone anualmente de  $1.5 \times 10^6$  toneladas métricas de pulpa (13). Ésta provoca grandes problemas de contaminación ambiental, por lo que se han realizado numerosos estudios que tratan de aprovecharla. Previo a describir las diferentes formas en que ha sido usada se hará un resumen sobre su potencial como fuente de nutrientes y de otros compuestos que pueden ser utilizados para diferentes fines.

La pulpa de café, en relación al café en cereza, representa alrededor del 20% y la pulpa seca, también en relación al café en cereza, representa un 10% (10). En la pulpa de café fresca, destaca su alto contenido de agua. Bressani y col. (10) encontraron valores de humedad hasta de 76.7%, lo cual ha representado un problema para el manejo y transporte de este material. En base seca, la pulpa de café tiene un contenido relativamente alto de fibra cruda y proteína. A este respecto, los valores informados también por Bressani y col. (10), alcanzan cifras de 21% y 11.2% respectivamente (Cuadro 1). Es también de interés mencionar los niveles de aminoácidos presentes en la pulpa de café (Cuadro 2), los cuales son comparables o superiores a los que poseen las harinas de algodón y de soya. Asimismo, la pulpa de café contiene, en general, mayores concentraciones de aminoácidos que el maíz. En cuanto a su contenido de minerales, como puede observarse en el Cuadro 3, se hace evidente el alto contenido de potasio cuyo valor está cerca de 1,765 mg.%. En lo que se refiere a la concentración de carbohidratos, Jaffé y Ortiz (33) encontraron valores de 43%, mientras que Aguirre y col. (2) informan variaciones desde 57.5% hasta 61.1%.

Otros compuestos orgánicos presentes en la pulpa de café que han sido descritos como limitantes para el uso de la pulpa como alimento de animales, por considerárseles responsables de la toxicidad de la misma, son la cafeína

y los taninos. Los valores encontrados en la literatura, son variables. Jaffé y Ortiz (33) informaron concentraciones de cafeína de 0.51% en base seca, mientras que Bressani y col. (10) han indicado valores de 1.3% también en base seca. Los valores de taninos también son variables. Molina y col. (41) informaron valores de 2.4%; Jaffé y Ortiz (33) de 1.44% y Aguirre (2) de 4.5%. Estas dos sustancias se describirán detalladamente más adelante.

### B. Usos que se le han dado a la pulpa de café

Se han propuesto distintas formas de utilizar la pulpa de café, entre las que se pueden mencionar las siguientes:

1. Como abono: la pulpa de café posee un alto contenido de materia orgánica. Estudios realizados señalan que 100 libras de pulpa de café, seca, equivalen a 10 libras de un fertilizante orgánico (57). La pulpa también se compara ventajosamente con el abono de establo y con el estiércol de gallina en cuanto a su contenido de nutrientes, especialmente potasio (1).
2. Como medio de cultivo de microorganismos: un filtrado de pulpa de café que contenga 0.5% de fosfato de amonio y 1.2% de azúcar, permite el crecimiento de la levadura Torulopsis utilis (17). Otros resultados sugieren que la pulpa puede servir también como sustrato para Saccharomices cereviciae (18).
3. Como medio para producir gas combustible: la producción de gas metano se lleva a cabo a partir de pulpa de café y estiércol de vaca (20), y se ha informado de la producción de 670 litros de metano a partir de 30 kilogramos de pulpa de café (19).

4. En la preparación de raciones para animales: un estudio realizado por Bressani y col. en 1972 (10), sugirió que dada la concentración de proteína de la pulpa de café, ésta bien podría reemplazar al maíz usado en la preparación de raciones para animales, siempre que puedan suplirse los niveles de carbohidratos solubles del cereal. Estudios realizados con pollos de carne, mostraron que niveles de 10% de pulpa en las dietas, dieron buenos resultados en la alimentación de éstos (12). En el ganado bovino, se observó que los animales debían consumir un nivel mínimo de pulpa de café para propiciar un proceso de adaptación que gradualmente los capacitara para ingerir y utilizar cantidades cada vez mayores (14), y se ha encontrado que niveles hasta de 29% de pulpa de café podían incorporarse en las raciones (36).

### C. Factores antinutricionales presentes en la pulpa de café

Se ha observado que cantidades mayores de 20% de pulpa de café en las raciones para animales rumiantes ocasionan efectos depresores en el desarrollo de éstos (36). Existe también cierta tendencia a una disminución del consumo de alimento a medida que el porcentaje de pulpa se incrementa en la ración (37). Esto se manifiesta con un aumento de peso en relación inversa al contenido de pulpa en la dieta (37,35). Algunos autores atribuyen esta baja ingesta de las dietas que contienen pulpa de café a la palatabilidad de la misma, lo que puede corregirse, al menos parcialmente, con la adición de melaza de caña de azúcar, mezclando la pulpa con pasto o ensilándola (9). Estudios realizados por Cabezas y col. en 1974, y Vargas y col., en 1977, (15,57), muestran que la presencia de pulpa de café a niveles de 40 y 60% en las raciones, ocasiona una disminución en la absorción de nitrógeno, aumento en la excreción de nitrógeno urinario y fecal y aumento en la excreción de orina y el consumo de agua por los terneros. También se ha observado que al consumir pulpa de café durante un período de tiempo prolongado, los terneros muestran mayor actividad física (45).

Estudios en cerdos muestran que la cafeína agregada a las dietas a niveles de 1.5 gramos por kilogramo de la ración aumenta en un 7.9% la retención de nitrógeno, así como la adición de 3 gramos de cafeína por kilogramo de alimento provocó dermatitis y paraqueratosis en los animales (23). La cafeína también produce un aumento en la concentración de ácidos grasos libres en el suero sanguíneo de humanos y ganado lechero (6,31). Asimismo, se han elaborado dietas que contienen cafeína y taninos químicamente puros a

niveles que pueden ser encontrados en las raciones con más de 20% de pulpa de café, y se ha demostrado que la cafeína por sí sola puede constituir un factor adverso, mientras que el ácido tánico por sí solo no lo es (16). Se cree que la interacción entre ambos sí puede provocar una disminución en la tasa de crecimiento, como resultado de un menor consumo y eficiencia de la conversión del alimento (27, 33, 49, 55).

Con base en lo anterior, se considera que la presencia de cafeína y taninos son los posibles causantes de los efectos adversos que la pulpa de café tiene sobre los animales que la consumen.

#### D. Posibles sistemas de detoxificación de la pulpa de café

Debido a la gran utilidad que puede tener la pulpa de café como alimento para animales, se han realizado numerosos estudios tendientes a mejorar su valor nutritivo, su palatabilidad y la consistencia de la misma, así como a disminuir su contenido de cafeína y taninos.

Se sabe que la pulpa de café contiene cantidades relativamente altas de compuestos fenólicos y compuestos de bajo peso molecular, los cuales, después de la oxidación por las enzimas polifenoloxidasas, forman productos que contienen grupos quinona que pueden combinarse con las proteínas modificando sus propiedades biológicas. De la misma manera, los compuestos fenólicos de más alto peso molecular llamados taninos, pueden formar complejos insolubles con las proteínas (44). Murillo y col. (43) realizaron un estudio en el cual usaron pulpa de café fresca, la que fue tratada con 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0% de metabisulfito de sodio previo a su deshidratación. El objeto de la adición de este agente reductor fue, por una parte, detener la oxidación de los compuestos fenólicos libres, y, por otra, bloquear la formación de complejos tanino-proteína. Los resultados obtenidos muestran que el metabisulfito sí fue efectivo a este respecto, ya que la concentración de taninos en la pulpa tratada fue mayor que en la que no recibió metabisulfito. Con respecto a la concentración de cafeína, se observó una disminución de ésta en la pulpa tratada, independientemente del sistema de secado.

Molina y col. (40) usaron ratas como animal experimental, y encontraron que cuando la pulpa de café se trataba con percolación a 94° C, los niveles de cafeína, taninos, azúcares totales y los ácidos cafeico y clorogénico disminuían. En la evaluación biológica, se observó una mejora en la ganancia de peso, consumo y eficiencia de la alimentación con el tratamiento de decafeinización. A pesar de esto, la ganancia de peso fue siempre superior en las ratas que se alimentaron con las dietas sin pulpa de café.

Otros estudios realizados por Bendaña (7) y Gómez-Brenes (28) en los cuales aplicaron tratamientos alcalinos con hidróxido de calcio a la pulpa de café por la técnica de remojo, demostraron una disminución en la concentración de taninos en la pulpa de café, no siendo así para el contenido de cafeína y ácidos clorogénico y cafeico. En tratamientos combinados como deshidratación de la pulpa y posterior remojo con hidróxido de sodio, se observó una disminución en su contenido de taninos. Otro proceso combinado es el evaluado por Jarquín y col. (34) en el cual ensilaron pulpa de café adicionándole metabisulfito de sodio. Los resultados obtenidos mostraron una elevación en la concentración de taninos libres y cafeína, y se apreció un menor consumo de alimento por los animales.

#### E. El proceso de ensilaje

El ensilaje, describe Barnett (5), es un proceso utilizado en la conservación de forrajes producidos estacionalmente en fincas ganaderas; consiste en la preservación de éstos en su estado succulento por medio de fermentaciones parciales, y mantienen condiciones anaeróbicas que permiten la proliferación de lactobacilos que producen ácido láctico y otros ácidos orgánicos como acético y propiónico que son los responsables del sabor y olor característico de un buen ensilaje.

La fermentación en el ensilaje: el objetivo en el proceso de ensilaje, es llegar a alcanzar una concentración suficiente de ácido láctico, el cual es producido por microorganismos presentes en el material, para inhibir otras formas de actividad microbiana y así preservar el material el tiempo requerido. En un material bien ensilado, los cambios que ocurren son los siguientes:

**Fase 1:**

La respiración continuada de las plantas, da por resultado la producción de dióxido de carbono, utilización de carbohidratos simples y flujo de agua de la masa debido a los sucesos bioquímicos y a la compresión mecánica del material. Estos eventos están acompañados por cambios de temperatura (5).

**Fase 2:**

Producción de pequeñas cantidades de ácido acético por organismos del grupo coliforme y otros. Esta fase es de corta duración (5).

**Fase 3:**

Iniciación de la fermentación láctica dependiente de organismos ácido-lácticos, lactobacilos y estreptococos (5).

**Fase 4:**

Éste es un estado de reposo en el cual la producción de ácido láctico llega a un máximo y permanece constante entre 1 y 1.5% del material fresco. El pH permanece por debajo de 4.2 (5).

Estas cuatro fases toman de 17 a 21 días para completarse, pero las primeras tres se completan en cerca de tres días.

**Fase 5:**

Ataque por organismos productores de ácido butírico a los carbohidratos solubles residuales y al ácido láctico que ya ha sido formado (5). Esto es

acompañado, en el extremo de los casos, por desaminación de aminoácidos con la formación de aminas y dióxido de carbono.

## F. Cambios bioquímicos durante el proceso de ensilaje

Cuando un cultivo se ensila, la respiración aeróbica continúa un cierto tiempo en las células vivas, por cuya razón se producen agua y dióxido de carbono y gran cantidad de calor. El aumento de la temperatura dependerá de la cantidad de oxígeno disponible, es decir, del grado de compactación de la masa ensilada. La respiración disminuirá si la compactación impide la entrada de aire, con lo cual se acumulará el dióxido de carbono. Esta respiración termina al morir las células y continúa la oxidación parcial o respiración anaeróbica. Cuando los carbohidratos experimentan los efectos de la respiración anaeróbica dan origen, entre otras sustancias, a ácidos orgánicos. Los ácidos orgánicos comúnmente encontrados en el ensilaje, son el acético, propiónico, butírico y láctico. El ácido acético es el responsable del sabor y olor a vinagre, y el ácido propiónico tiene propiedades similares; el ácido butírico posee olor desagradable. El ácido láctico se encuentra en la leche agria y posee sabor ácido pero agradable. Al hacer un ensilaje, es conveniente que se produzca una cantidad considerable de ácidos, pero también es deseable que predomine el láctico, o cuando menos, que el butírico esté ausente (58).

### 1. Acido láctico

Las bacterias que producen ácido láctico a partir de los carbohidratos, son los lactobacilos. Las especies aisladas de los ensilajes se desarrollan entre 20 y 45°C y lo hacen mejor a bajas concentraciones de oxígeno, o en su ausencia. El ácido láctico es producido a partir de la glucosa y otros azúcares. La característica más importante de los lactobacilos desde el punto de vista de preservación de una cosecha, es que pueden soportar una acidez mayor que otros microorganismos, de modo que cuando un cultivo se ensila, las bacterias del ácido láctico comienzan a proliferar casi inmediatamente sobre los azúcares fermentables de la savia vegetal, y produce tal cantidad de ácido que las bacterias indeseables no pueden desarrollarse (58).

## 2. Acido butírico

Entre las bacterias perjudiciales se incluye el grupo de las que producen ácido butírico. Las enzimas proteolíticas de las bacterias formadoras de ácido butírico, producen amoníaco y compuestos amoniacales a partir de las proteínas. Tales sustancias, de carácter básico, son de dudoso valor nutritivo para los animales e inclusive, algunas pueden ser dañinas, y como neutralizan los ácidos producidos, favorecen el desarrollo de las bacterias del ácido butírico. También son responsables de los malos olores que recuerdan a los de la materia animal putrefacta. De hecho, se verifica una putrefacción asociada a la formación de ácido butírico (48).

No es raro, entonces, que el ensilaje mal hecho tenga un olor parecido a una mezcla de mantequilla rancia y a pescado descompuesto, porque las bacterias del ácido butírico han tenido la oportunidad de fermentar los carbohidratos y atacar las proteínas (48).

La razón más lógica que explica la falta de acidez en un ensilaje es la cantidad escasa de azúcares fácilmente fermentables en la cosecha, ya que de esta manera la formación de ácido láctico se hace lenta lo que favorece el crecimiento de las bacterias productoras de ácido butírico. Esto puede evitarse si se añaden azúcares a una cosecha rica en proteínas (48).

## 3. Acido acético

Se produce durante la fermentación, y normalmente abunda en un ensilaje bien hecho. En ciertos casos las cantidades de ácidos acético y láctico son equivalentes (48).

## 4. Alcohol

Es una de las sustancias intermedias que se producen durante la fermentación de los carbohidratos. Esto sucede cuando el azúcar es atacado por

las enzimas de las levaduras. La cantidad de alcohol no llega al 1% porque casi siempre se combina con los ácidos orgánicos formando ésteres de olor agradable (48).

### G. Ensilaje de pulpa de café

Es un estudio realizado por Murillo y col. (44). Se ensiló pulpa de café junto con melaza y forrajes. El ensilaje se llevó a cabo en silos de laboratorio y con una duración de 141 días, y se evaluó después de este período los cambios químicos ocurridos. Los cambios observados, se muestran en el Cuadro 4. La comparación de los valores iniciales con los finales, revela disminuciones de materia seca, contenidos celulares y carbohidratos solubles, así como aumentos de los componentes estructurales y de proteína, todo lo cual indica la actividad y el crecimiento de los microorganismos anaeróbicos.

Al ensilar pulpa de café en silos de laboratorio sin aditivo, con 10% de melaza, con solución al 10% de ácido clorhídrico y sulfúrico siguiendo la metodología de Virtanen y con la mezcla de ácido más 10% de melaza, Murillo (45) encontró que el porcentaje de pérdida en el silo era de 26.8% cuando se le adicionó la mezcla de ácidos a la pulpa de café. La proteína cruda fue mayor para la pulpa sola y para la pulpa más ácido. El contenido de taninos del ensilaje no se alteró con los aditivos. El pH fue menor para los ensilajes que incluyeron la mezcla de ácidos.

Estudios realizados por Jaffé y Ortiz en 1952 y Bressani y col. en 1972 (33,10) para evaluar la composición química de la pulpa de café fermentada, muestran una disminución en el contenido de cafeína producida por la fermentación aeróbica.

### H. Costos del ensilaje de pulpa de café

Se han hecho evaluaciones que contemplan los costos del ensilaje de pulpa de café (42) las cuales se muestran en el Cuadro 5. Como puede observarse,

aun cuando no se incluye el costo de transporte, por ser una variable difícil de calcular, es obvio que debido al alto contenido de agua de la pulpa, el transporte de este material de un beneficio a una finca, resultaría alto, y llegaría a ser prohibitivo cuando se trata de distancias muy largas. Teniendo esto en cuenta, lo recomendado es ensilar la pulpa en lugares cercanos a los beneficios, en donde posteriormente el ensilaje puede ser empleado directamente en alimentar al ganado, o bien ser deshidratado.

Con base en lo anterior, se tiene que el ensilaje de pulpa de café es un método sencillo y barato que ha sido usado muy eficazmente para lograr una deshidratación parcial de la pulpa y mantener, e inclusive mejorar, el valor nutritivo de ésta y facilitar, asimismo, su manejo y transporte.

#### I. Microorganismos capaces de usar cafeína como fuente de nitrógeno

Hasta la fecha no existen muchos estudios acerca de decafeinización por métodos biológicos, como tampoco se han encontrado microorganismos anaeróbicos o microaereofílicos capaces de usar cafeína como fuente de nitrógeno.

Schwimmer y col. (53) usaron el hongo Penicillium crustosum que es capaz de usar cafeína como única fuente de nitrógeno; informaron que, en presencia de azúcar, esta especie de Penicillium puede remover la cafeína de infusiones de café comercial tan efectivamente como de un medio sintético. Otro hongo que ha sido estudiado y que es eficaz, es el Penicillium roqueforti, el cual es capaz de remover completamente la cafeína en medios que contienen hasta 0.01 M del alcaloide (52).

#### **IV. OBJETIVOS**

- 1. Aislar e identificar microorganismos presentes en la pulpa de café y capaces de utilizar la cafeína como única fuente de nitrógeno.**
- 2. Determinar la posibilidad de producción de los microorganismos presentes en la pulpa de café y capaces de utilizar la cafeína como única fuente de nitrógeno.**
- 3. Determinar los cambios químicos y microbiológicos que puede sufrir la pulpa de café al ser inoculada con microorganismos capaces de usar cafeína como única fuente de nitrógeno, y ensilada en sistemas de bolsas plásticas.**

## V. HIPOTESIS

**Al ensilar la pulpa de café con un inóculo de microorganismos capaces de usar cafeína como única fuente de nitrógeno, éstos usarán el alcaloide contenido en la pulpa y, de esta manera, al final del ensilaje se observará una disminución de este agente antifisiológico en el material original.**

## **VI. JUSTIFICACIONES**

**Debido a los problemas de contaminación ambiental que ocasiona la pulpa de café en los países productores y a la necesidad de proteínas, se hace necesario llevar a cabo estudios que diseñen sistemas para reducir los agentes antifisiológicos presentes en la pulpa de café, y así permitir el uso de niveles mayores de este subproducto en la alimentación animal.**

## VII. ASPECTOS METODOLOGICOS

### A. Universo de trabajo

Para la realización del presente trabajo se obtuvo un lote de pulpa de café proveniente de la finca y beneficio "La Azotea" que se encuentra ubicada en la ciudad de Antigua, Guatemala. De este lote de pulpa se tomó una pequeña porción, de la cual se aislaron, por métodos auxanográficos, dos levaduras capaces de usar cafeína como única fuente de nitrógeno, identificadas como de los géneros Saccharomyces y Schizosaccharomyces.

### B. Procedimiento

#### 1. Aislamiento de microorganismos capaces de usar cafeína como única fuente de nitrógeno

La pulpa de café se homogenizó con agua destilada estéril en una licuadora corriente; se tomó una alícuota, la cual se cultivó por la técnica de vaciado en placa (21) en medios para auxanograma (22) con cafeína USP como única fuente de nitrógeno. Estos medios se incubaron en condiciones microaerofílicas a 25, 30 y 37° C por 48 y 72 horas.

#### 2. Identificación de las cepas aisladas

Las cepas aisladas se identificaron como levaduras pertenecientes a los géneros Saccharomyces y Schizosaccharomyces. Se hicieron observaciones microscópicas (39) así como también pruebas de asimilación y de fermentación de azúcares como los descritos por Davenport (25).

### 3. Cultivo de las cepas capaces de utilizar cafeína como única fuente de nitrógeno

Las levaduras aisladas se cultivaron y traspararon sucesivamente en medio con base de carbono y con cafeína como única fuente de nitrógeno. Las levaduras se produjeron en un fermentador (Microferm Fermentor, New Brunswick Scientific Co.) a una temperatura de 27° C, con una agitación a 400 rpm, a una presión de 6 libras y con una cantidad de aireación de 2,000 a 3,000 cc/min. Para este cultivo se usó el medio llamado "Sea Water" (3) el cual es especial para la producción de levaduras. Las levaduras se separaron del medio de cultivo por centrifugación, comprobándose luego su pureza usando medio con cafeína como única fuente de nitrógeno.

### 4. Ensilaje de la pulpa de café

Previo al ensilaje de la pulpa de café, ésta se homogenizó en una mezcladora horizontal (Crofts Engineers, Ltda. Bradford 3 England) con melaza al 3% y el inóculo de los microorganismos. La preparación de cada lote de pulpa se hizo de la forma siguiente: se prepararon tres porciones de pulpa de café, una conteniendo 30 Kg. de pulpa fresca con inóculo de levadura del género Saccharomyces y otra porción de 21 Kg. de la misma pulpa con inóculo de Schizosaccharomyces. En ambos casos el inóculo fue a razón de 31.7 g. (base seca) de levadura por 30 Kg. de pulpa. Cada porción de pulpa inoculada fue luego dividida en 30 lotes para la pulpa inoculada con Saccharomyces y en 21 lotes para la inoculada con Schizosaccharomyces, conteniendo 1 Kg. de pulpa de café, los cuales fueron ensilados en condiciones de laboratorio (11) conteniendo la melaza. Una porción de 30 Kg. no inoculada, fue ensilada en forma similar y tomada como control. Se abrieron tres silos al 0, 1o., 2o., 3o., 4o., 7o., 15o., 30o., 45o., y 60 días de ensilaje en el caso de los grupos inoculados con Saccharomyces y el control, y al 1o., 4o., 7o., 15o., 30o., 45o., y 60o. en el grupo inoculado con Schizosaccharomyces.

## 5. Análisis químicos

- a) **Determinación de humedad:** la determinación de humedad en la pulpa se realizó de acuerdo al método propuesto por la AOAC (3).
- b) **Determinación de pH:** se pesaron 50 gramos de pulpa fresca, se agregaron 100 ml. de agua destilada, luego se licuó y filtró y al filtrado se le determinó el pH usando para ello un potenciómetro marca Griffin.
- c) **Determinación de cafeína:** este análisis se realizó en la pulpa secada a 60°C y molida a 40 mallas de acuerdo al método propuesto por Ishler y col. (32).
- d) **Determinación de proteína:** este análisis se hizo de acuerdo al método de Kjeldahl en la pulpa seca y molida (3).
- e) **Determinación de carbohidratos solubles:** se realizó de acuerdo con el método propuesto por Johnson y col (38) en la pulpa seca y molida.
- f) **Dosificación del ácido láctico:** se procedió de la siguiente forma: se pesaron 100 gramos de pulpa fresca y se licuaron con 300 ml. de agua destilada; luego se filtró por gasa y papel filtro; se tomó una alícuota de 5 ml. del filtrado y se le adicionaron 5 ml. de solución de ácido tricloroacético; luego la muestra se procesó siguiendo el método propuesto por Barker y col (4).
- g) **Dosificación de ácido acético, etanol y metanol:** las muestras se procesaron en la siguiente forma: se tomaron

50 ml. de filtrado de pulpa de café; se agregaron 0.5 ml. de HgCl al 7% y luego se centrifugó; del sobrenadante se tomaron 5 ml. y se adicionó 1 ml. de ácido fosfórico al 20%; se centrifugó y el sobrenadante se utilizó en la dosificación, la cual se hizo por cromatografía de gas usando un cromatógrafo Packard Becher 420 equipado con detector de ionización de llama, utilizándose una columna de vidrio en forma de U, empacada con una mezcla de 10% SP-1200/1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> en 80/100 Chromosorb waw (FFAP). Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: temperatura del inyector 225°C; temperatura del detector 235°C; flujo de gas (Argón) 38 ml./min. La cantidad inyectada fue de 3  $\mu$ l.

## 6. Análisis Microbiológicos

Se hicieron recuentos de microorganismos por el método de vaciado en caja (21). Se usaron medios de cultivo que contenían cafeína como única fuente de nitrógeno (YCB) y un medio nutritivo (Agar Nutritivo), para establecer comparaciones en el número de microorganismos. Éstos se cultivaron en condiciones aeróbicas.

## 7. Análisis de datos

Los resultados del presente trabajo se evaluaron por un análisis de covarianza (54).

## VIII. RESULTADOS

### A. Microorganismos microaerofílicos aislados capaces de utilizar cafeína como única fuente de nitrógeno

Los microorganismos aislados de pulpa con capacidad de usar cafeína como única fuente de nitrógeno, fueron dos levaduras pertenecientes a los géneros de Saccharomyces y Schizosaccharomyces, las cuales se identificaron de acuerdo a las técnicas seguidas por Lodder y Davenport (39, 24, 25, 26). Los resultados obtenidos de las pruebas de asimilación y fermentación de azúcares, se sumarizan en los Cuadros 6 y 7.

Los resultados de las observaciones microscópicas y de las pruebas de asimilación y fermentación de azúcares, se confirmaron con las pruebas de asimilación de Nitrato las que fueron negativas en ambos casos.

En adelante se llamará Levadura 1 y Levadura 2 a los lotes de pulpa inoculados con los géneros Saccharomyces y Schizosaccharomyces respectivamente, y control al lote de pulpa preparado sin inóculo de levaduras.

### B. Calidad del ensilaje de pulpa de café con y sin inóculo de levaduras

#### 1. Acidez

Los cambios de pH observados en los silos se presentan en el Cuadro 8. La acidez en los silos aumentó significativamente ( $P < 0.01$ ) en los tres grupos estudiados (Control, Levadura 1 y Levadura 2). En la Gráfica 1 se aprecia que hubo una marcada caída del pH en el transcurso de los primeros días de ensilaje, para luego mantenerse relativamente constante hasta el día sesenta. No se encontró diferencia estadísticamente significativa al comparar la disminución del pH de los grupos ( $P < 0.44$ ).

## 2. Acido láctico

Los resultados obtenidos para concentración de ácido láctico en los silos de los tres grupos, se presentan en el Cuadro 9 ; se observa que la concentración de este ácido aumentó significativamente ( $P < 0.01$ ) durante el período de ensilaje.

En la Gráfica 2 se describen los cambios en concentración de ácido láctico en los tres grupos estudiados. Al hacer comparaciones entre el control y los grupos inoculados con las levaduras 1 y 2, se encontró que no hay diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.6$ ) en el aumento del ácido láctico en ambos grupos. Tampoco se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.7$ ) entre el grupo inoculado con la levadura 1 y el tratado con la levadura 2.

## 3. Acido acético

La concentración de ácido acético aumentó significativamente ( $P < 0.01$ ) a través del tiempo de ensilaje en los tres grupos estudiados. Los cambios en concentración ocurridos se sumarizan en el Cuadro 10, las líneas de regresión en la Gráfica 3. Al hacer comparaciones entre el grupo control y los grupos tratados con las levaduras 1 y 2, se encontró que en el grupo control el aumento en la concentración de ácido acético fue significativamente mayor ( $P < 0.01$ ). Al comparar las 2 levaduras entre sí, se encontró que las diferencias entre el aumento de ambas no fueron estadísticamente significativas ( $P < 0.08$ ).

## 4. Metanol

El Cuadro 11 y la Gráfica 4 presentan los resultados obtenidos de los cambios de concentración de metanol a través del tiempo de ensilaje. Como se observa, hubo cambios de concentración de este alcohol, los cuales fueron en aumento estadísticamente significativo ( $P < 0.01$ ) en los tres grupos

estudiados. Se encontró que en los grupos inoculados con la levadura 1 y la levadura 2 el aumento fue significativamente mayor ( $P < 0.01$ ) que en el grupo que no recibió inóculo de levaduras. El aumento de este alcohol fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) en el grupo tratado en la levadura 2 que en el tratado con la levadura 1.

## 5. Etanol

Los cambios en concentración de etanol se presentan en el Cuadro 12 y en la Gráfica 5. Se observa que la concentración de este alcohol, a través del tiempo aumentó significativamente tanto en el grupo control ( $P < 0.01$ ) como en el grupo inoculado con la levadura 1 ( $P < 0.05$ ) y en el inoculado con la levadura 2 ( $P < 0.01$ ). Al comparar el control contra los grupos tratados con levaduras, se encontró que el aumento en aquél fue significativamente mayor ( $P < 0.01$ ) que en los últimos. En las comparaciones hechas entre los grupos inoculados con levaduras, se encontró que el aumento fue significativamente mayor ( $P < 0.01$ ) en el grupo inoculado con la levadura 2.

### C. Aspectos microbiológicos del ensilaje de pulpa de café con y sin inóculo de levaduras

#### 1. Población microbiana total

Al hacer los recuentos microbiológicos totales a diferentes tiempos de ensilaje (Cuadro 13), se encontró que éste aumentó significativamente ( $P < 0.01$ ) en los tres grupos de silos. En la Gráfica 6 se presentan las líneas de regresión que describen el crecimiento microbiológico en los tres grupos. Al comparar el grupo control con los grupos inoculados con levaduras se encontró que el crecimiento microbiológico fue significativamente mayor ( $P < 0.01$ ) en los grupos tratados o inoculados con las levaduras 1 y 2. En las comparaciones hechas entre las levaduras 1 y 2, se encontró que no hubo diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.12$ ) en el conteo microbiológico viable a diferentes tiempos para ambos grupos.

## 2. Recuento de levaduras capaces de usar cafeína como única fuente de nitrógeno

En la Gráfica 7 y en el Cuadro 14 se presentan las líneas de regresión y los resultados obtenidos de los recuentos de levaduras en los tres grupos (Control, Levadura 1 y Levadura 2). Éstos señalan que el número de levaduras capaces de usar cafeína como fuente de nitrógeno aumentó significativamente ( $P < 0.01$ ) tanto en los grupos inoculados con las levaduras 1 y 2 como en el grupo que no recibió inóculo. Sin embargo, en los grupos inoculados, este aumento fue significativamente mayor ( $P < 0.01$ ) que en el grupo control. Al comparar las levaduras entre sí, se encontró que el aumento fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) en el grupo inoculado con la levadura 2.

## D. Cambios químico-nutricionales en el ensilaje de pulpa de café con y sin inóculo de levaduras

### 1. Humedad

Los resultados indicaron que no hubo cambios significativos en el contenido de humedad del ensilaje de pulpa de café con y sin inóculo de levaduras (Cuadro 15). Sin embargo, como se observa en la Gráfica 8, la humedad en el grupo control tendió a aumentar, mientras que en los grupos tratados con las levaduras la tendencia de ésta fue a disminuir. Al comparar los grupos inoculados entre sí, se encontró que la disminución fue significativamente mayor ( $P < 0.01$ ) en el grupo tratado con la levadura 1.

### 2. Proteína

Los cambios observados en concentración de proteína a través del tiempo de ensilaje de pulpa de café, se sumarizan en el Cuadro 16; las regresiones que describen estos cambios se presentan en la Gráfica 9. Como puede observarse, la concentración de proteína cruda ( $N \times 6.25$ ) aumentó significativamente ( $P < 0.01$ ) en los tres grupos de silos. Este aumento fue

significativamente mayor ( $P < 0.01$ ) en el grupo que no recibió inóculo de levadura, lo cual se debió principalmente a que en el caso del grupo control la concentración de proteína disminuyó en los días 1o., 2o., 3o. y 4o. de ensilaje, lo que dio origen a que, al aumentar la concentración de ésta, la pendiente fuera mayor a la observada en los grupos de silos que sí recibieron inóculo de levaduras, en los cuales la concentración de proteína fue siempre mayor y el aumento fue constante a través del tiempo de ensilaje. Al comparar los tratamientos entre sí, se encontró que el aumento en concentración de proteína fue significativamente mayor ( $P < 0.01$ ) que en el grupo tratado con la levadura 1.

### 3. Carbohidratos solubles

El Cuadro 17 y la Gráfica 10 presentan los resultados obtenidos en los cambios de concentración de carbohidratos solubles a través del tiempo en el ensilaje de la pulpa de café. Como puede observarse, su concentración disminuyó significativamente ( $P < 0.01$ ) durante este período, observándose los máximos descensos en los primeros cuatro días de ensilaje. No se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.16$ ) al comparar el grupo control con los grupos inoculados, pero al comparar la levadura 1 con la 2, se encontró que la disminución de los carbohidratos solubles fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) en el grupo tratado con la levadura 1.

### 4. Cafeína

Al evaluar la concentración de cafeína en los silos a través del tiempo de ensilaje, no se encontraron cambios estadísticamente significativos ( $P < 0.4$ ) (Cuadro 18, Gráfica 11). Sin embargo, el grupo sin inocular con levaduras, mostró un ligero aumento en la concentración de cafeína con respecto al tiempo, mientras que los grupos inoculados mostraron una disminución en la concentración de este alcaloide sin llegar a ser estadísticamente significativa ( $P < 0.38$ ). El aumento observado en el grupo control pudo deberse a la variabilidad observada en la concentración de cafeína al final del ensilaje que hacen que la pendiente de la línea de regresión sea positiva y muy pequeña.

Por lo tanto este aumento no puede considerarse representativo. Al comparar entre sí los grupos inoculados se encontró que la disminución de la concentración de cafeína fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) en el grupo de silos tratados con la levadura 1, no siendo así para los tratados con la levadura 2 y para el control (Gráfica 12).

## IX. DISCUSION

### A. Microorganismos capaces de usar cafeína como única fuente de nitrógeno

Los microorganismos capaces de usar cafeína como única fuente de nitrógeno que se aislaron de la pulpa de café, muestran diferencias en cuanto a sus capacidades de asimilar y fermentar azúcares. La levadura identificada como del género Saccharomyces fue capaz de fermentar mayor número de azúcares mientras que aquélla identificada como Schizosaccharomyces fermentó menos. Las pruebas de asimilación de nitrato (24) fueron negativas en ambos casos, lo que indica que estos microorganismos no pueden usar dicha fuente de nitrógeno inorgánico (22).

No existen en la literatura informes que indiquen que existan levaduras capaces de usar cafeína como única fuente de nitrógeno, únicamente están señalados los hongos Penicillium crustosum (53) y Penicillium roqueforti (52), los cuales se han usado en procesos de decafeinización industrial.

Por otra parte, se ha encontrado (22) que las levaduras asimilan el nitrógeno que se encuentra en forma de amonio y de óxidos de nitrógeno. Al observar la fórmula estructural de la cafeína (29), puede notarse que ésta corresponde a la 1, 3, 7 trimetil xantina y no posee nitrógeno en forma de amonio, por lo que podría pensarse que las levaduras para poder usar el nitrógeno proveniente de este alcaloide sería necesario que tuvieran el sistema enzimático para una demetilación del alcaloide y una subsiguiente hidrogenación del nitrógeno, para de esa manera poder hacerlo disponible para su asimilación.

B. Calidad del ensilaje de pulpa de café con y sin inóculo de levaduras

Los valores de pH observados en los tres grupos de silos estudiados coinciden con los descritos por Watson y Smith (58) para un buen ensilaje, ya que éstos no excedieron el valor límite de 4.2 al final de tal período. Dichos valores coinciden también con los informados por Murillo y col. (44) en el ensilaje de pulpa de café por 141 días, en el cual el valor mínimo de pH fue también de 4.2. Los tres grupos no mostraron diferencia en cuanto a acidez, lo que hace pensar que el inóculo de levaduras no afecta tal parámetro.

La disminución del pH se debe principalmente al aumento en la concentración de ácido láctico, el cual coincide con el crecimiento logarítmico de los microorganismos, ya que se puede observar que en los primeros días de ensilaje el aumento de éste fue suficiente para llevar el pH a sus valores mínimos en los silos. Este aumento en la concentración de ácido láctico y, por ende, la disminución del pH impiden el desarrollo de microorganismos nocivos a los ensilajes como lo son los hongos y bacilos butíricos (42). El aumento en concentración de ácido láctico se debe principalmente a la presencia de bacterias productoras de este ácido como lo son las de los géneros Lactobacillus, Streptococcus y Leuconostoc (47), ya que éstos son capaces de producirlo por fermentación de azúcares como glucosa, sucrosa y lactosa, así como también pueden hidrolizar almidón para luego usar sus productos como material fermentable (47).

El aumento en concentración de ácido acético en los silos de los tres grupos evaluados fue significativo ( $P < 0.01$ ), aunque es de interés señalar que su concentración fue relativamente baja ya que éste es producido por algunos Lactobacillus heterofermentativos como L. gayonii, L. lycopersicu así como por Leuconostoc mesenteroides, como productos adicionales de la fermentación láctica (47).

El aumento en la acidez, manifestada como una franca caída del pH, el aumento en la concentración de ácido láctico, así como el aumento en la

concentración de ácido acético en los silos durante el tiempo de ensilaje en los tres grupos evaluados, fue de beneficio al ensilaje ya que éstos son los responsables del sabor, olor y apariencia de un ensilaje de buena calidad (43), así como también son muestra de una fermentación anaeróbica adecuada (45).

La concentración de alcoholes como etanol y metanol aumentó también en los tres grupos de silos, aunque su concentración es muy baja. La producción de éstos puede deberse a otro tipo de fermentación llevado a cabo principalmente por levaduras (22) en el cual el producto final es básicamente alcohol (22).

### C. Cambios químico-nutricionales en ensilaje de pulpa de café

#### 1. Proteína

La concentración de proteína aumentó significativamente ( $P < 0.01$ ) en los tres grupos. Este aumento puede deberse principalmente al crecimiento de la población microbiana a través del tiempo de ensilaje, ya que como se dijo anteriormente ésta aumentó significativamente, tanto en el caso de la población microbiana total, como en el de las levaduras capaces de usar cafeína como fuente de nitrógeno. El aumento en la concentración de proteína puede ser beneficioso para el uso de la pulpa de café como alimento para animales, ya que se ha demostrado que a mayor concentración de ésta se logra la disminución de la toxicidad de la cafeína para los animales (9).

#### 2. Cafeína

Como pudo observarse en la Gráfica 12, al relacionar la concentración de cafeína con el crecimiento de la población de levaduras capaces de usar este alcaloide como fuente de nitrógeno, se encontró que al aumentar el número de éstas, la concentración de cafeína disminuye a través del tiempo. Esto sucedió en el caso del grupo de silos inoculados con levaduras

identificadas como del género Saccharomyces, no siendo así en el caso de los silos inoculados con las del género Schizosaccharomyces y en el grupo que no recibió inóculo de levaduras. Lo anterior hace pensar que las levaduras identificadas como del género Schizosaccharomyces al ser inoculadas en la pulpa de café ya no usaron la cafeína como fuente de nitrógeno, sino que posiblemente usaron otro compuesto que fuera más fácil de asimilar por ellas.

En el caso del grupo inoculado con las del género Sacchromyces, podría lograrse un mayor efecto sobre la concentración de cafeína si se usaran inóculos mayores de éstas, ya que por el efecto Pasteur observado en este caso (47), el crecimiento de las levaduras se hace mucho menor en condiciones de anaerobiosis como es el caso del ensilaje.

El beneficio obtenido con inóculos mayores de levaduras sería en dos sentidos: 1) al lograr una mayor disminución de cafeína se podrían usar porcentajes mayores de pulpa de café en las raciones preparadas para alimento de animales; y 2) al haber mayor cantidad de levaduras en los silos la concentración de proteína sería mayor disminuyéndose así la toxicidad de la cafeína (9).

Parte del hecho de no encontrar una disminución significativa en cafeína puede deberse a que los datos se expresan porcentualmente; esto es debido a que al bajar las cantidades en peso de otros componentes como carbohidratos solubles y humedad es lógico que se incrementen las de aquellos compuestos utilizados a un menor grado.

## X. CONCLUSIONES

1. Se aislaron de pulpa de café dos levaduras capaces de usar cafeína como única fuente de nitrógeno, las cuales pertenecen a los géneros Saccharomyces y Schizosaccharomyces, respectivamente.
2. Las levaduras pertenecientes al género Saccharomyces mostraron un crecimiento que se relaciona inversa y significativamente ( $P < 0.05$ ) con la concentración de cafeína en el ensilaje de pulpa de café.
3. Las levaduras pertenecientes al género Schizosaccharomyces no mostraron dicha relación, indicando que posiblemente usan cafeína como única fuente de nitrógeno con menor eficiencia que la Saccharomyces sp.
4. Los análisis químicos mostraron que el inóculo de microorganismos capaces de usar cafeína como única fuente de nitrógeno (en este caso de levaduras) no afecta la calidad del ensilaje ya que éste se mantuvo en sus condiciones óptimas.
5. Los mayores cambios observados en el ensilaje de pulpa de café se produjeron en los primeros veinte días, con lo que se puede inferir que si se acorta el tiempo de ensilaje, los resultados serían los mismos.

## **XI. RECOMENDACIONES**

- 1. Para obtener mejores resultados en el caso de la levadura del género Saccharomyces, el inóculo inicial de levaduras deberá ser mayor que el usado en este trabajo.**
- 2. Evaluar estas levaduras para fermentaciones aeróbicas de manera que el crecimiento de éstas se vea favorecido y así obtener un efecto mayor sobre la concentración de cafeína.**
- 3. Lograr la identificación completa de estas levaduras para así tener más conocimientos acerca de sus requerimientos y condiciones óptimas de crecimiento.**
- 4. Investigar, en estas levaduras, la utilización de carbohidratos y otros nutrientes.**
- 5. Hacer un balance de masa total para evaluar la efectividad del inóculo de estas levaduras sobre la concentración de cafeína en el ensilaje de pulpa de café.**
- 6. Efectuar pruebas biológicas para determinar la calidad nutricional de la pulpa ensilada con tales microorganismos.**

## VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Aguilar, Cortés, J. "La pulpa de café como abono". A. G. A. (Asociación General de Agricultores) Guatemala, 3:7-14. 1961.
2. Aguirre, B.F. La utilización industrial del grano de café y de sus subproductos. Guatemala, Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial- (Investigaciones Tecnológicas del ICAITI, N° 1) 1966.
3. Association of Official Agricultural Chemists, Washington, D.C. Official methods of analysis of de A. O. A. C. 12th ed. Washington, D.C., 1975.
4. Barker, S.B. y W.H. Summerson. "The colorimetric determination of lactic acid in biological material". J. Biol. Chem., 138: 535-554. 1974.
5. Barnet, A. J. G. Silage Fermentation. New York, Academic Press Inc., 1954.
6. Bellet, S.; A. Kershbaum y J. Aspe. "The effect of caffeine on free fatty acids". Arch. Intern. Med., 116:750-752. 1970.
7. Bendaña, G. "Efecto de tratamientos alcalinos por remojo y contacto sobre el valor nutritivo y composición química de la pulpa de café fresca o ensilada". Tesis (Magister Scientifical) CESNA/ INCAP Guatemala, 1977.
8. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, by R.E. Buchanan y N.E. Gibbons, co-editors. 8a. ed. Baltimore, the Wilkins Company. 1974.
9. Braham, J.E. y R. Bressani, editores. Pulpa de Café; Composición tecnología y utilización. International Development Research Centre, [Ottawa, Canadá, 1978] 152p., IDRC - 108.

10. Bressani, R.; E. Estrada y R. Jarquín. "Pulpa y pergamino de café. I. Composición química y contenido de aminoácidos de la proteína de la pulpa". Turrialba, 22:299-304. 1972.
11. \_\_\_\_\_; J.E. Braham y J.M. Gonzáles. Cambios químicos en pulpa de café ensilada con diferentes aditivos. En: Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP). Informe Anual 1° de enero-31 de diciembre de 1978. Guatemala, 1979.
12. \_\_\_\_\_ y J.M. Gonzáles. "Evaluación de la pulpa de café como posible sustituto del maíz en raciones para pollos de carne". Arch. Latinoam. Nut., 28:208-221. 1978.
13. \_\_\_\_\_. "Pulpa y pergamino de café como posibles alimentos para el consumo animal". En: VII Reunión Interamericana sobre el Control de la Fiebre Aftosa y otras Zoonosis. Puerto España, Trinidad Tobago, 17-20 abril, 1974. Washington, D.C. Oficina Panamericana de la Salud, 1975, pp 91-106 (OPS Publicación Científica N° 295).
14. Cabezas, M.T.; B. Murillo, R. Jarquín, J.M. Gonzáles, E. Estrada y R. Bressani. "Pulpa y pergamino de café. VI. Adaptación del ganado bovino a la pulpa de café". Turrialba, 24:160-167.174.
15. \_\_\_\_\_; J.M. Gonzáles y R. Bressani. "Pulpa y pergamino de café. V. Absorción y retención de nitrógeno en terneros alimentados con raciones elaboradas con pulpa de café". Turrialba, 24:90-94. 1974.
16. \_\_\_\_\_; E. Estrada, B. Murillo, J.M. Gonzáles y R. Bressani. "Respuesta de terneros a pulpa de café, cafeína y ácido tánico en la ración". A.L.P.A. Mem., 12:15-21. 1977.
17. Calle, V.H. "Ensayo sobre cultivo de levaduras alimentarias en pulpa de café". Chinchiná, Colombia. Boletín Informativo. 2:33-36. 1951.

18. \_\_\_\_\_ . "Proceso industrial para propagación de levaduras".  
Federación de Cafetaleros de Colombia. Centro Nacional  
de Investigaciones de Café. Chinchiná, Caldas, Colombia.  
junio 1974.
19. \_\_\_\_\_ . "Producción de gas combustible por fermentación metá-  
nica de la pulpa de café". Boletín Informativo CENICAFE,  
Chinchiná), 6:198-205. 1955.
20. \_\_\_\_\_ . "Cómo producir gas combustible con pulpa de café".  
Federación Nacional de Cafetaleros de Colombia. Centro  
Nacional de Investigaciones de Café. Sección Química In-  
dustrial. Chinchiná, Caldas. Boletín Técnico N° 3, 1974.
21. Collins, C.H. y P.M. Lyne. Microbiological Methods. 4th. ed.  
London, Butterworths and Co. Pub., 1976.
22. Cook, A.H. The Chemistry and Biology of Yeast New York,  
Academic Press, Inc., 1958.
23. Cunningham, M.H. "Effect of caffeine on nitrogen retention,  
carcass composition, fat mobilization and the oxidation of C<sup>14</sup>-  
labeled body fat in pigs". J. Anim. Sci., 27:424-430. 1968.
24. Davenport, R. Laboratory Procedures for Yeasts and Yeast Like  
Organisms. Bristol, University of Bristol, 1978.
25. \_\_\_\_\_ . Manual of Yeasts and Yeast Like Organisms. Bristol  
University of Bristol, 1978.
26. \_\_\_\_\_ . Yeasts and Yeast Like Organisms in Beverages and Foods  
with Special Application to their Significance and Simple  
Identification. Bristol, University of Bristol, 1978.
27. Echavarría, G. "La pulpa de café como alimento para el ganado".  
Revista Cafetalera de Colombia, 8:3310-3313. 1947.
28. Gómez-Brenes, R.A.; G. Bendaña, C.E. Amézquita, J.E. Braham  
y R. Bressani. "Estudio comparativo entre pulpa de café fres-  
ca y ensilada y efecto de tratamientos alcalinos con hidróxido

de calcio sobre el valor nutritivo y composición química de la pulpa de café". En: Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP). Informe Anual. 10 enero-31 diciembre 1976. Guatemala, 1977.

29. Goodman, L.S. y Alfred Gilman. The Pharmacological Basis of Therapeutics. Third Edition, New York Mcmillan Co. 1968.
30. Gray, W.; D. Patrick, V.C. Pinto y S.G. Pathak. "Growth of fungi in sea water medium". Appl. Microbiol., 11:501-505. 1963.
31. Hawkins, G.E. y W.E. Davis. "Changes in plasma free fatty acids and triglycerides in dairy cattle after dosing with coffee or caffeine". J. Dairy Sci., 53:52-55. 1970.
32. Ishler, N.H.; T.P. Finucane y E. Bolker. "Rapid spectrophotometric determination of caffeine". Anal. Chem., 20:1162-1166. 1948.
33. Jaffé, W. y D.S. Ortiz. "Notas sobre el valor alimenticio de la pulpa de café". A.G.R.O., 23:31-37. 1952.
34. Jarquín, R. y R. Bressani. "Evaluación nutricional, en cerdos, de la pulpa de café sometida a varios procesos de almacenamiento". Turrialba, 27:385-291. 1977.
35. \_\_\_\_\_; R.A. Gómez-Brenes, L. Berducido y R. Bressani. "Efecto de los niveles proteínicos de la pulpa de café en raciones para cerdos criollos". Turrialba, 27:179-185. 1977.
36. \_\_\_\_\_; J.M. Gonzáles, J.E. Braham y R. Bressani. "Pulpa y pergamino de café. II. Utilización de la pulpa de café en la alimentación de rumiantes". Turrialba, 23:41-47. 1973.
37. \_\_\_\_\_; F.A. Rosales, J.M. Gonzáles, J.E. Braham y R. Bressani. "Pulpa y pergamino de café. IX. Uso de la pulpa de café en la alimentación de cerdos en la fase de crecimiento y acabado". Turrialba, 24:41-46. 1974.

38. Johnson, R.; L. Tikam, L. Balwani, L.J. Johnson, K.E. Mc Clure y B.A. Dehorite. "Corn plant maturity. II. Effect on "in vitro" cellulose digestibility and soluble carbohydrate content". J. Anim. Sci., 25:617-623. 1966.
39. Lodder, C. y Kreger van Rij. The Yeasts. A Taxonomy Study. 2nd. ed. Amsterdam, North Holland. 1967.
40. Molina, M.R.; G. de la Fuente, M.A. Baten y R. Bressani. "Decaffeination. A proces to detoxify coffe pulp". J. Agric. Food Chem., 22:1055-1059. 1974
41. \_\_\_\_\_; G. de la Fuente, H. Gudiel y R. Bressani. "Pulpa y pergamino de café. VIII. Estudios básicos sobre la deshidratación de la pulpa de café". Turrialba, 24:280-284. 1974.
42. Murillo, B. Metodología y costos de ensilaje de pulpa de café. En: La utilización de la pulpa de café en la alimentación de bovinos. Textos de las conferencias presentadas en el curso sobre ganado bovino de la XV Exposición Pecuaria del Istmo Centroamericano. San Salvador, 2 al 10 de mayo de 1976, Soyapabgo, El Salvador, Dirección General de Ganadería (1976) 12p. (INCAP E 907).
43. \_\_\_\_\_; M.T. Cabezas, R. Jarquín y R. Bressani. Effect of bisulfite addition on the chemical composition and cellular content fractions of dehydrated coffee pulp". J. Agric. Food Chem., 25:1090-1092. 1977.
44. \_\_\_\_\_; L. Daqui, M.T. Cabezas y R. Bressani. "Pulpa y pergamino de café. XI. Características químicas de la pulpa de café ensilada con pasto Napier (*Penisetum purpureum*) y planta de maíz (*Zea mays*)". Arch. Latinoam. Nut., 26:33-45. 1967.
45. \_\_\_\_\_. Composición química y fraccionamiento de los componentes celulares de la pulpa de café ensilada con aditivos. En: Reunión Internacional sobre la Utilización de Subproductos del Café en la Alimentación Animal y otras Aplicaciones Agrícolas e Industriales. 1a. Turrialba, Costa Rica, 11-14 de junio. 1974.

46. Osegueda, J.; R.A. Quiteño, R.A. Martínez y M. Rodríguez. "Uso de la pulpa de café seca en el engorde de novillos en confinamiento". *Agricultura en El Salvador*, Año 10 N° 1 mayo/junio 1970 p 3-9. Ministerio de Agricultura y Ganadería. San Salvador, El Salvador, C.A. 1970.
47. Prescott, S.C. and Cecil G. Dunn. Microbiología Industrial. 3a. ed. Trad. Joaquín Oscon García y Vicente Villar Palasi. Madrid, Aguilar, 1962.
48. Reed, G. and H.J. Pepler. Yeast Technology. Wesport, Conneticut, The AVI Publishing Co., Inc., 1973.
49. Rogerson, A. "Nutritive value of coffe hulls". East African Agricultural Journal, 20: 254-255. 1955. (c.f. Nutrition Abstract 5761). Saunders Company. 1957.
50. Sollman, T. Manual of Pharmacology Eight Edition. Philadelphia W.B.
51. Schwimmer, S.R.; H. Kurtzman y E. Hefftman. "Caffeine metabolism by Penicillium roqueforti". Arch. Biochem. Biophy., 147:109-113. 1971
52. \_\_\_\_\_ y H. Kurtzman. "Fungal decaffeination of roast coffee infusions". J. Food Sci., 37:921. 1972.
53. Snedecor, G.W. y W.G. Cochran. Statistical methods. 6th. ed. Iowa, The Iowa State University Press, 1967/..
54. Squibb, R.L. "El ensilaje de la pulpa de café en el engorde de los becerros". La Hacienda, 40:438-441. 1945.
55. Suárez de Castro F. "Valor de la pulpa de café como abono". Boletín informativo. Suplemento N° 5, Instituto Salvadoreño de Investigaciones del Café. Santa Tecla, El Salvador, C.A. Diciembre 1960.
56. Vargas, E.; M.T. Cabezas y R. Bressani. "Pulpa de café en la alimentación de rumiantes. II Absorción y retención de

nitrógeno en novillos alimentados con concentrados elaborados con pulpa de café deshidratada". Agron. Costar. 1:101-106. 1977.

57. Watson, S.J. y A.M. Smith, El Ensilaje. Compañía Editorial Continental, S. A. México D. F. 1955.

**XIII    A N E X O S**

**CUADRO 1**  
**COMPOSICION QUIMICA DE LA PULPA DE CAFE**

	Fresca %	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 (Nx6.25)	2.1	11.2
Cenizas	1.5	8.3
Extracto libre de nitrógeno	15.8	44.4

Fuente: Bressani y col. Turrialba, 22:299, 1972

**CUADRO 2****CONTENIDO DE AMINOACIDOS EN LA PULPA DE CAFE**

<b>Aminoácido</b>	<b>g/16gN</b>
<b>Lisina</b>	<b>6.8</b>
<b>Histidina</b>	<b>3.9</b>
<b>Arginina</b>	<b>4.9</b>
<b>Treonina</b>	<b>4.6</b>
<b>Cistina</b>	<b>1.0</b>
<b>Metionina</b>	<b>1.3</b>
<b>Valina</b>	<b>7.4</b>
<b>Isoleucina</b>	<b>4.2</b>
<b>Leucina</b>	<b>7.7</b>
<b>Tirosina</b>	<b>3.6</b>
<b>Fenilalanina</b>	<b>4.9</b>
<b>Hidroxiprolina</b>	<b>0.5</b>
<b>Acido aspártico</b>	<b>8.7</b>
<b>Serina</b>	<b>6.3</b>
<b>Acido glutámico</b>	<b>10.3</b>
<b>Prolina</b>	<b>6.1</b>
<b>Glicina</b>	<b>6.7</b>
<b>Alanina</b>	<b>5.4</b>

**Fuente: Bressani y col. Turrialba 22:299, 1972**

CUADRO 3

CONTENIDO DE CENIZAS Y DE ALGUNOS MINERALES  
EN LA PULPA DE CAFE

---

<b>Componente</b>	
Ceniza, g%	8.3
Calcio, mg%	554
Fósforo, mg%	116
Hierro, mg%	15
Sodio, mg%	100
Potasio, mg%	1765
Magnesio	trazas
Zn, ppm	4
Cu, ppm	5
Mn, ppm	6.25
B ppm	26

---

Fuente: Bressani y col. Turrialba 22:299, 1972

CUADRO 4

CAMBIOS EN LA COMPOSICION QUIMICA  
DE LA PULPA DE CAFE ENSILADA EN SILOS DE FOSO

	<u>Pulpa original</u>	<u>Pulpa ensilada</u>
	<u>% de la materia seca</u>	
<b>Materia seca</b>	17.4	19.7
<b>Paredes celulares</b>	48.0	55.2
<b>Proteína cruda</b>	12.2	13.9
<b>Proteína lignificada</b>	4.5	6.1
<b>Cafeína</b>	0.9	0.6
<b>Taninos</b>	1.6	1.3
<b>pH</b>	5.6	4.2

**CUADRO 5**

**COSTO POR TONELADA DEL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE  
SIN INCLUIR TRANSPORTE**

---

<b>Costo por tonelada</b>	
<b>Materia prima</b>	<b>1.20</b>
<b>procesado</b>	<b>1.30</b>
<b>total</b>	<b>2.50</b>

---

## CUADRO 6

### RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS PRUEBAS DE FERMENTACION DE AZUCARES

Azúcar	Levadura 1	Levadura 2
Sucrosa	+	+
Rafinosa	+	+
Maltosa	+	+
Galactosa	+	-
Trehalosa	+	-
Celobiosa	-	-
Melibiosa	±	-
Melizitosa	+	-
Lactosa	-	-
Almidón soluble	+	-
Glucosa	+	+

## CUADRO 7

### RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS PRUEBAS DE ASIMILACION DE AZUCARES

Azúcar	Levadura 1	Levadura 2
Sucrosa	+	+
Rafinosa	-	+
Maltosa	+	+
Galactosa	+	-
Lactosa	-	-
Glucosa	+	+

CUADRO 8

PROMEDIO DE LOS VALORES DE pH EN EL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE  
CON Y SIN INOCULO DE DOS LEVADURAS

Tratamiento	Tiempo de Ensilaje (días)									
	0	1	2	3	4	7	15	30	45	60
Control	5.4 * ± 0.05	5.3 ± 0.0	4.7 ± 0.05	4.4 ± 0.0	4.2 ± 0.0	4.0 ± 0.11	4.4 ± 0.0	3.9 ± 0.05	4.0 ± 0.05	4.0 ± 0.06
Levadura 1	5.5 ± 0.05	5.3 ± 0.0	4.9 ± 0.05	4.4 ± 0.06	4.2 ± 0.05	4.0 ± 0.05	4.5 ± 0.0	3.9 ± 0.05	3.9 ± 0.0	4.0 ± 0.06
Levadura 2		5.4 ± 0.05			4.1 ± 0.0	4.0 ± 0.06	4.4 ± 0.05	3.9 ± 1.0	4.0 ± 0.05	4.0 ± 0.0

\* Promedio ± desviación estandard

CUADRO 9

PROMEDIOS DEL CONTENIDO DE ACIDO LACTICO EN EL ENSILAJE  
DE PULPA DE CAFE CON Y SIN INOCULO DE DOS LEVADURAS

Tratamiento	Tiempo de ensilaje (días)									
	0	1	2	3	4	7	15	30	45	60
Control	0.35 * ± 0.04	0.85 ± 0.04	0.33 ± 0.2	0.43 ± 0.05	0.8 ± 0.06	1.37 ± 0.14	1.32 ± 0.12	2.25 ± 0.62	2.30 ± 0.06	1.83 ± 0.14
Levadura 1	0.37 ± 0.06	0.98 ± 0.12	0.62 ± 0.36	1.68 ± 0.38	0.52 ± 0.04	2.49 ± 0.49	2.02 ± 0.33	2.12 ± 0.16	3.07 ± 0.24	2.39 ± 0.27
Levadura 2		0.38 ± 0.02			0.79 ± 0.35	1.81 ± 0.09	1.43 ± 0.15	2.15 ± 0.62	2.32 ± 0.51	1.95 ± 0.33

\* Promedio ± desviación estandard

CUADRO 10

PROMEDIOS DEL CONTENIDO DE ACIDO ACETICO EN EL ENSILAJE  
DE PULPA DE CAFE CON Y SIN INOCULO DE DOS LEVADURAS

Tratamiento	Tiempo de ensilaje (días)									
	0	1	2	3	4	7	15	30	45	60
Control	0.1 * ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.24 ± 0.01	0.31 ± 0.02	0.38 ± 0.01
Levadura 1	0.11 ± 0.02	0.1 ± 0.04	0.12 ± 0.007	0.1 ± 0.01	0.13 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.18 ± 0.007	0.27 ± 0.03	0.32 ± 0.02	0.36 ± 0.01
Levadura 2		0.09 ± 0.01			0.13 ± 0.007	0.1 ± 0.007	0.18 ± 0.04	0.27 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.31 ± 0.05

\* Promedio ± desviación estandard

CUADRO 11

PROMEDIOS DEL CONTENIDO DE METANOL EN EL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE  
CON Y SIN INOCULO DE DOS LEVADURAS

Tratamiento	Tiempo de ensilaje (días)									
	0	1	2	3	4	7	15	30	45	60
Control	0.0003* ± 0.0	0.0071 ± 0.006	0.016 ± 0.01	0.014 ± 0.0006	0.015 ± 0.007	0.01 ± 0.001	0.023 ± 0.001	0.03 ± 0.001	0.03 ± 0.0008	0.02 ± 0.005
Levadura 1	0.0003 ± 0.0001	0.0021 ± 0.003	0.015 ± 0.01	0.006 ± 0.004	0.008 ± 0.001	0.007 ± 0.001	0.014 ± 0.004	0.02 ± 0.008	0.02 ± 0.002	0.02 ± 0.007
Levadura 2		0.0005 ± 0.0002			0.008 ± 0.001	0.002 ± 0.0001	0.02 ± 0.001	0.04 ± 0.006	0.03 ± 0.001	0.02 ± 0.001

\* Promedio ± desviación estándar

CUADRO 12

PROMEDIOS DEL CONTENIDO DE ETANOL EN EL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE  
CON Y SIN INOCULO DE DOS LEVADURAS

Tratamiento	Tiempo de ensilaje (días)									
	0	1	2	3	4	7	15	30	45	60
Control	0.067 ± 0.007	0.1 ± 0.03	0.13 ± 0.007	0.19 ± 0.007	0.21 ± 0.04	0.17 ± 0.09	0.27 ± 0.01	0.28 ± 0.006	0.28 ± 0.001	0.26 ± 0.01
Levadura 1	0.07 ± 0.001	0.07 ± 0.004	0.2 ± 0.04	0.19 ± 0.03	0.16 ± 0.07	0.11 ± 0.05	0.17 ± 0.02	0.2 ± 0.04	0.16 ± 0.01	0.17 ± 0.02
Levadura 2		0.06 ± 0.006			0.15 ± 0.02	0.1 ± 0.02	0.23 ± 0.2	0.28 ± 0.007	0.27 ± 0.03	0.16 ± 0.05

\* Promedio ± desviación estandard

CUADRO 13

PROMEDIOS DE LA POBLACION MICROBIANA TOTAL EN EL ENSILAJE  
DE PULPA DE CAFE CON Y SIN INOCULO DE DOS LEVADURAS

(  $\times 10^5$  )

Tratamiento	Tiempo de ensilaje (días)									
	0	1	2	3	4	7	15	30	45	60
Control	1.55 * $\pm 0.13$	1.36 $\pm 0.11$	14 $\pm 0.87$	15.9 $\pm 1.8$	20.9 $\pm 1.1$	47.5 $\pm 3.9$	63.6 $\pm 1.4$	59.1 $\pm 5.3$	56.8 $\pm 4.9$	71 $\pm 8.0$
Levadura 1	1.35 $\pm 0.16$	3.45 $\pm 0.4$	27 $\pm 3.0$	22.4 $\pm 0.5$	50.2 $\pm 1.2$	71 $\pm 1.2$	77.1 $\pm 2.8$	78.1 $\pm 3.8$	87.2 $\pm 3.0$	100.1 $\pm 1.2$
Levadura 2		1.51 $\pm 0.2$			47.9 $\pm 3.5$	96 $\pm 3.1$	87.8 $\pm 1.5$	88.4 $\pm 2.0$	88.8 $\pm 3.4$	101 $\pm 7.9$

\* Promedio  $\pm$  desviación est andard

PROMEDIOS DE LOS RECUENTOS DE LEVADURAS CAPACES DE USAR CAFEINA  
 COMO UNICA FUENTE DE NITROGENO EN EL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE  
 CON Y SIN INOCULO DE DOS LEVADURAS  
 (  $\times 10^6$  )

Tratamiento	Tiempo de ensilaje (días)									
	0	1	2	3	4	7	15	30	45	60
Control	0.038 * <u>± 0.005</u>	0.068 <u>± 0.004</u>	0.51 <u>+ 0.07</u>	0.82 <u>± 0.02</u>	0.89 <u>± 0.01</u>	1.01 <u>± 0.1</u>	0.87 <u>± 0.09</u>	0.72 <u>± 0.06</u>	0.72 <u>± 0.07</u>	0.65 <u>± 0.04</u>
Levadura 1	0.091 <u>± 0.002</u>	0.126 <u>± 0.01</u>	0.64 <u>± 0.04</u>	0.89 <u>± 0.02</u>	1.0 <u>± 0.03</u>	1.39 <u>± 0.1</u>	0.9 <u>± 0.05</u>	0.72 <u>± 0.03</u>	0.78 <u>± 0.01</u>	0.86 <u>± 0.04</u>
Levadura 2		0.054 <u>± 0.04</u>			1.07 <u>± 0.04</u>	1.04 <u>± 0.04</u>	0.93 <u>± 0.06</u>	0.79 <u>± 0.1</u>	0.99 <u>± 0.05</u>	1.38 <u>± 0.2</u>

\* Promedio ± desviación estandard

CUADRO 15

PROMEDIOS DEL CONTENIDO DE HUMEDAD EN EL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE  
CON Y SIN INOCULO DE DOS LEVADURAS

Tratamiento	Tiempo de ensilaje (días)									
	0	1	2	3	4	7	15	30	45	60
Control	82 <sup>*</sup> ± 0.5	80 ± 0.0	80 ± 1.5	80 ± 0.5	80 ± 0.5	81 ± 0.0	81 ± 0.5	81 ± 1.0	81 ± 0.0	81 ± 0.5
Levadura 1	80 ± 1.5	77 ± 0.5	78 ± 0.5	77 ± 0.5	76 ± 2.08	78 ± 0.5	77 ± 0.5	77 ± 1.0	77 ± 0.0	78 ± 1.0
Levadura 2		81 ± 1.5			80 ± 1.0	80 ± 1.0	80 ± 0.0	81 ± 1.1	81 ± 1.5	79 ± 0.5

\* Promedio ± desviación estandard

CUADRO 16

PROMEDIOS DEL CONTENIDO DE PROTEINA CRUDA ( N x 6.25 )  
EN EL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE  
CON Y SIN INOCULO DE DOS LEVADURAS

Tratamiento	Tiempo de ensilaje (días)									
	0	1	2	3	4	7	15	30	45	60
Control	11.64 * ± 0.04	11.0 ± 0.28	11.31 ± 0.43	10.90 ± 0.18	11.35 ± 0.17	11.57 ± 0.15	12.37 ± 0.0	11.78 ± 0.48	12.04 ± 0.36	12.12 ± 0.22
Levadura 1	11.64 ± 0.04	11.62 ± 0.06	12.0 ± 0.28	12.58 ± 0.09	11.85 ± 0.40	12.35 ± 0.15	12.87 ± 0.0	12.98 ± 0.09	12.96 ± 0.25	12.41 ± 0.07
Levadura 2		11.64 ± 0.04			11.58 ± 0.09	12.17 ± 0.21	12.0 ± 0.16	12.12 ± 0.18	12.58 ± 0.09	12.48 ± 0.35

\* Promedio ± desviación estándar

CUADRO 17

PROMEDIOS DEL CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES EN EL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE CON Y SIN INOCULO DE DOS LEVADURAS

Tratamiento	Tiempo de ensilaje (días)									
	0	1	2	3	4	7	15	30	45	60
Control	6.13 * ± 0.65	5.58 ± 0.37	1.50 ± 0.47	1.45 ± 0.02	1.63 ± 0.44	0.46 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.40 ± 0.06	0.39 ± 0.06
Levadura 1	6.34 ± 0.13	7.63 ± 2.33	2.55 ± 0.061	1.49 ± 0.15	0.68 ± 0.09	0.39 ± 0.07	0.27 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.29 ± 0.006	0.28 ± 0.02
Levadura 2		6.33 ± 0.51			0.90 ± 0.11	0.88 ± 0.09	0.25 ± 0.14	0.20 ± 0.01	0.32 ± 0.04	0.38 ± 0.02

\* Promedio ± desviación standard

CUADRO 18

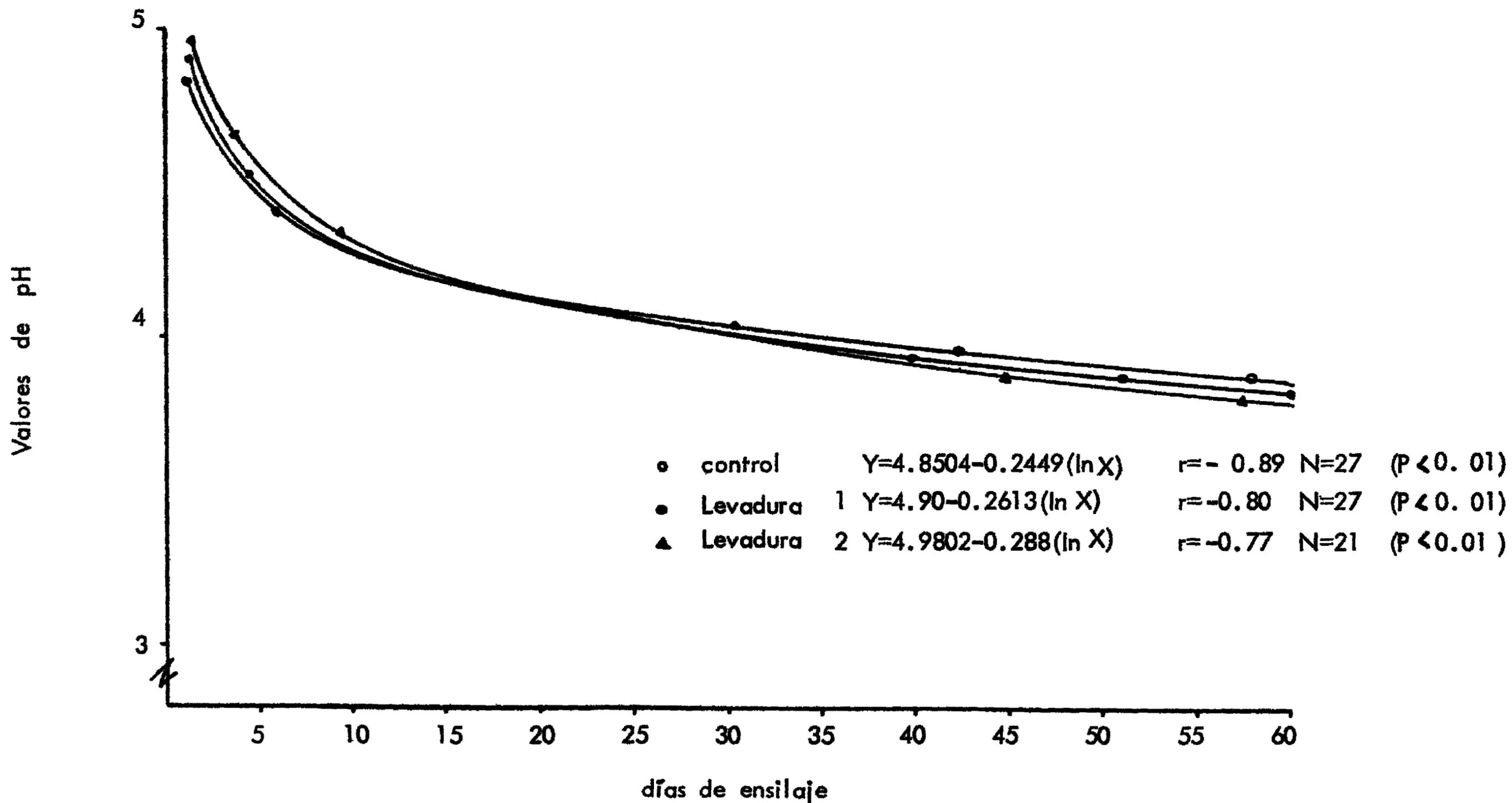
PROMEDIOS DEL CONTENIDO DE CAFEINA EN EL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE  
CON Y SIN INOCULO DE DOS LEVADURAS

Tratamiento	Tiempo de ensilaje (días)									
	0	1	2	3	4	7	15	30	45	60
Control	0.72* ± 0.007	0.71 ± 0.023	0.64 ± 0.015	0.66 ± 0.023	0.67 ± 0.007	0.68 ± 0.032	0.68 ± 0.032	0.65 ± 0.017	0.70 ± 0.025	0.69 ± 0.036
Levadura 1	0.72 ± 0.007	0.71 ± 0.015	0.66 ± 0.035	0.64 ± 0.012	0.69 ± 0.032	0.62 ± 0.015	0.71 ± 0.017	0.64 ± 0.015	0.65 ± 0.034	0.68 ± 0.015
Levadura 2		0.72 ± 0.0			0.70 ± 0.036	0.66 ± 0.021	0.70 ± 0.029	0.67 ± 0.07	0.69 ± 0.034	0.70 ± 0.015

\* Promedio ± desviación estandard

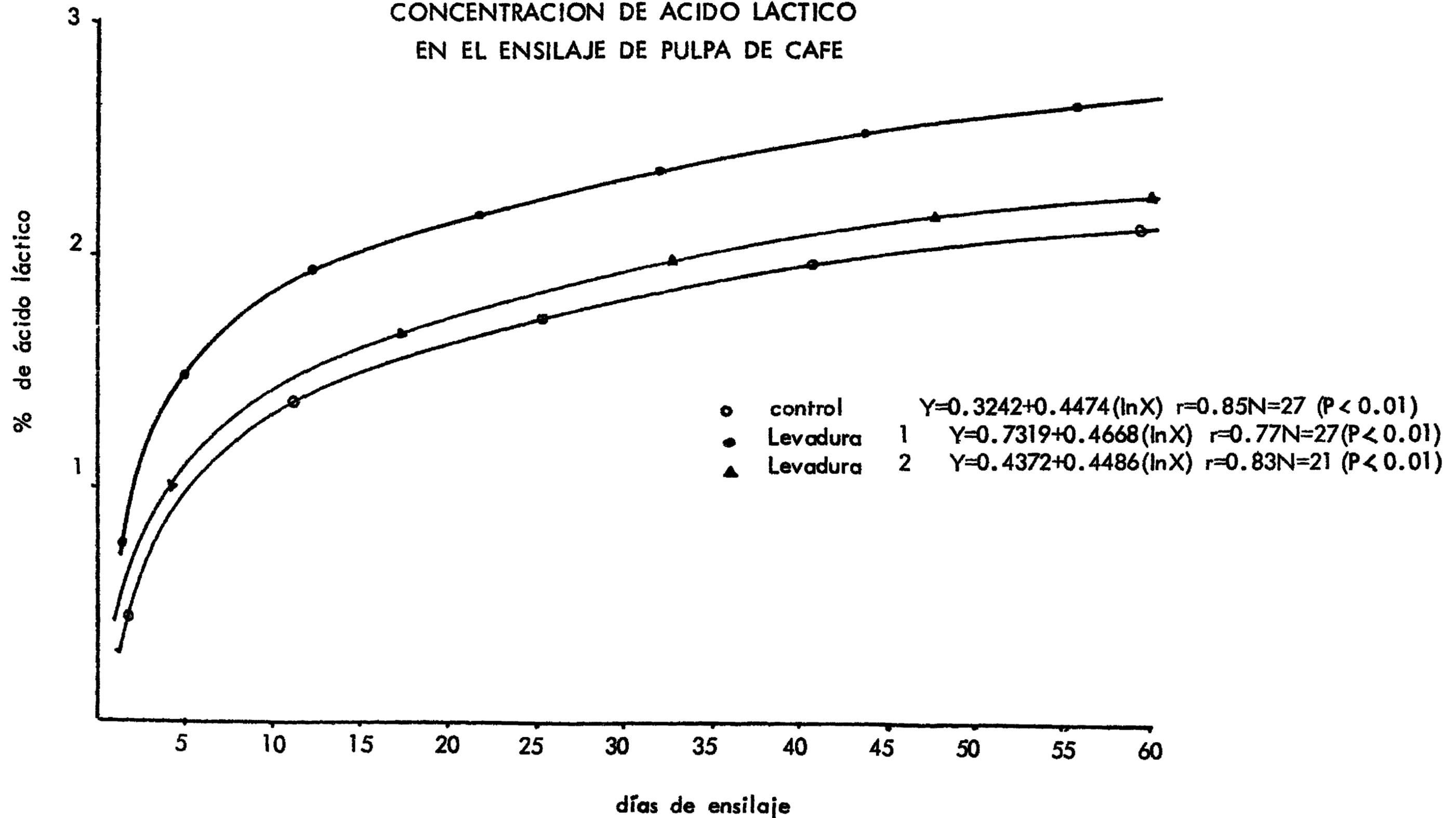
# GRAFICA 1

## LÍNEAS DE REGRESION QUE DESCRIBEN LOS CAMBIOS DE ACIDEZ EN EL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE



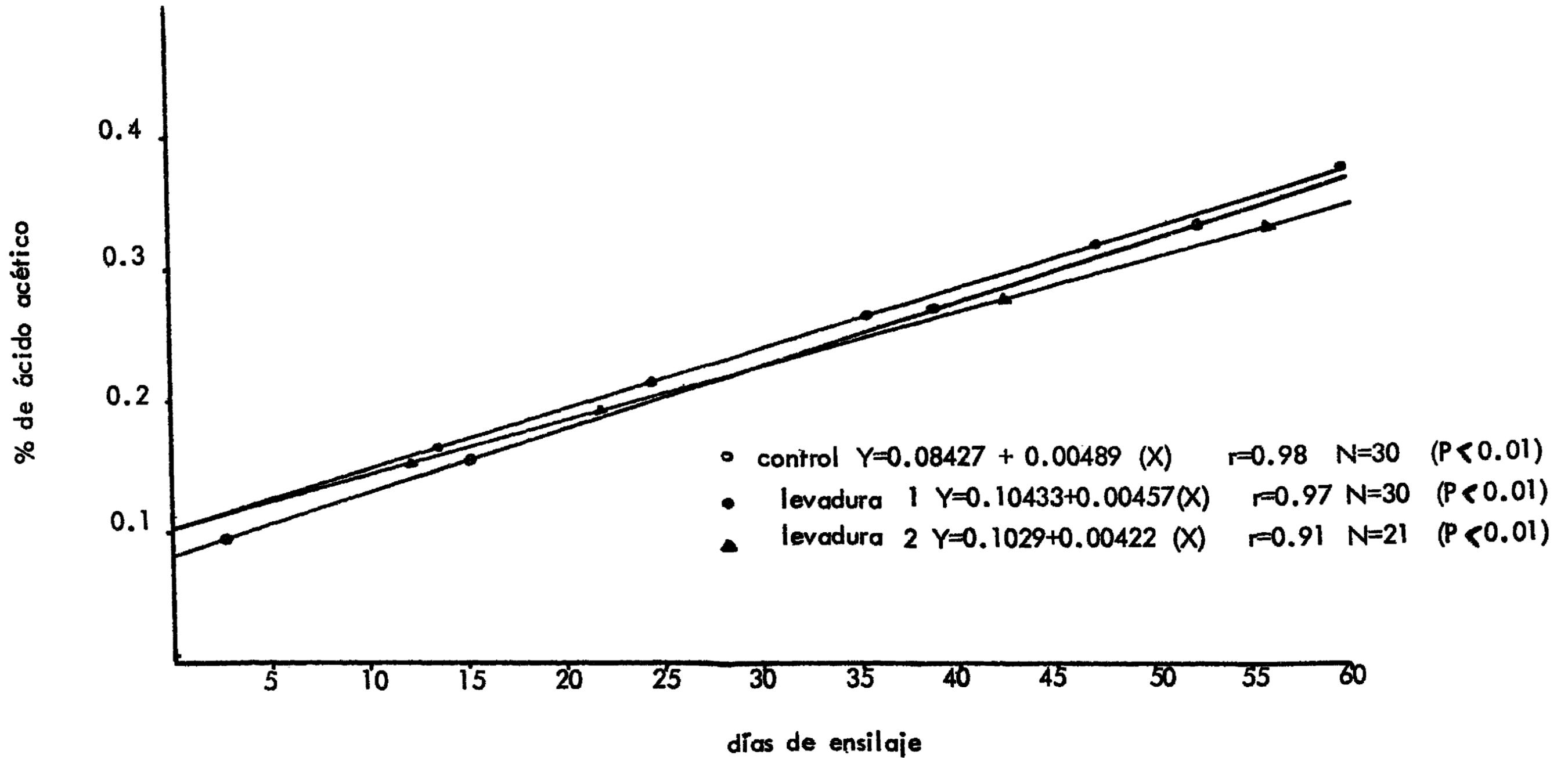
## GRAFICA 2

LINEAS DE REGRESION QUE DESCRIBEN LOS CAMBIOS DE  
CONCENTRACION DE ACIDO LACTICO  
EN EL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE

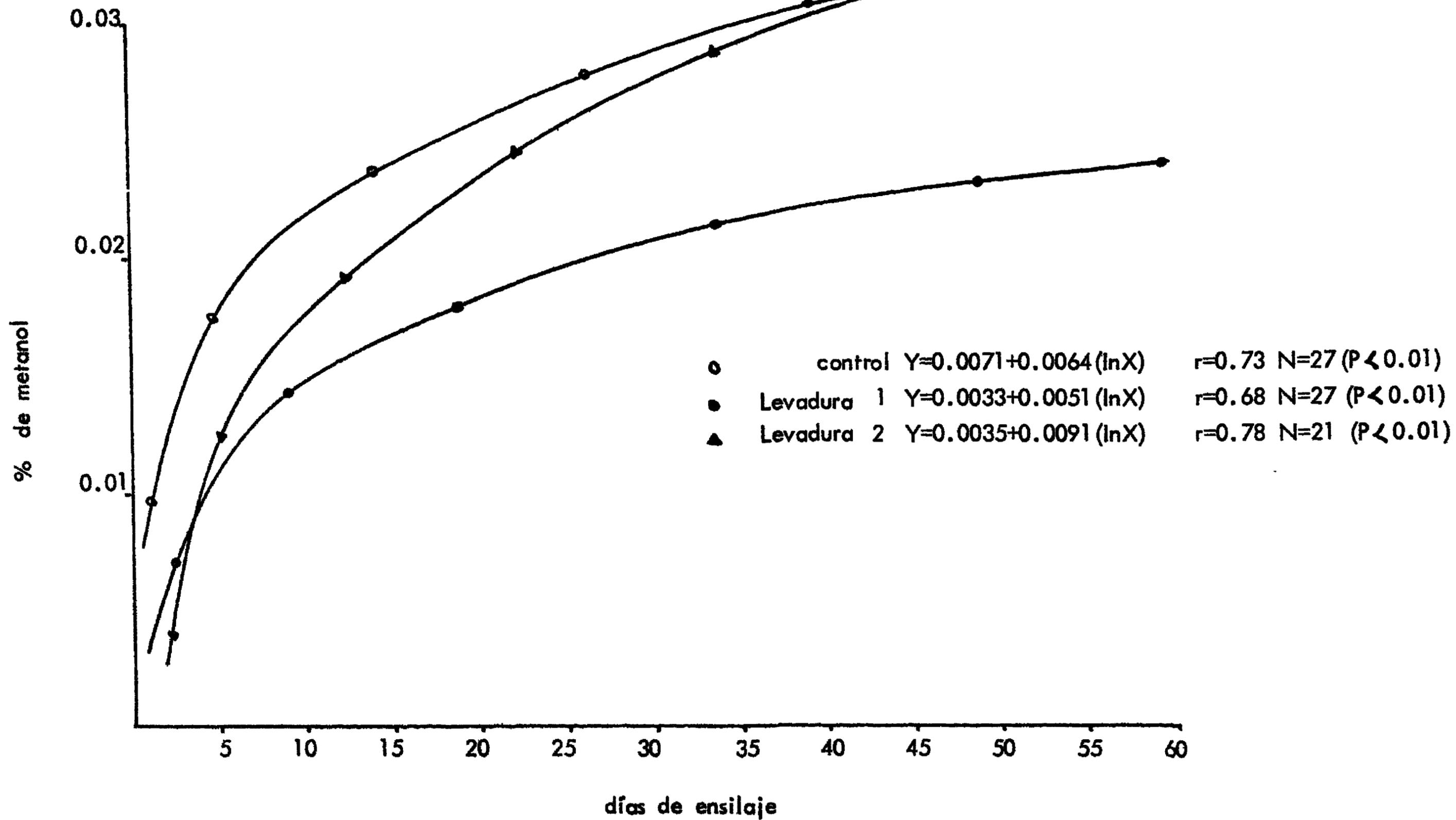


### GRAFICA 3

LINEAS DE REGRESION QUE DESCRIBEN LOS CAMBIOS EN CONCENTRACION DE ACIDO ACETICO DURANTE EL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE

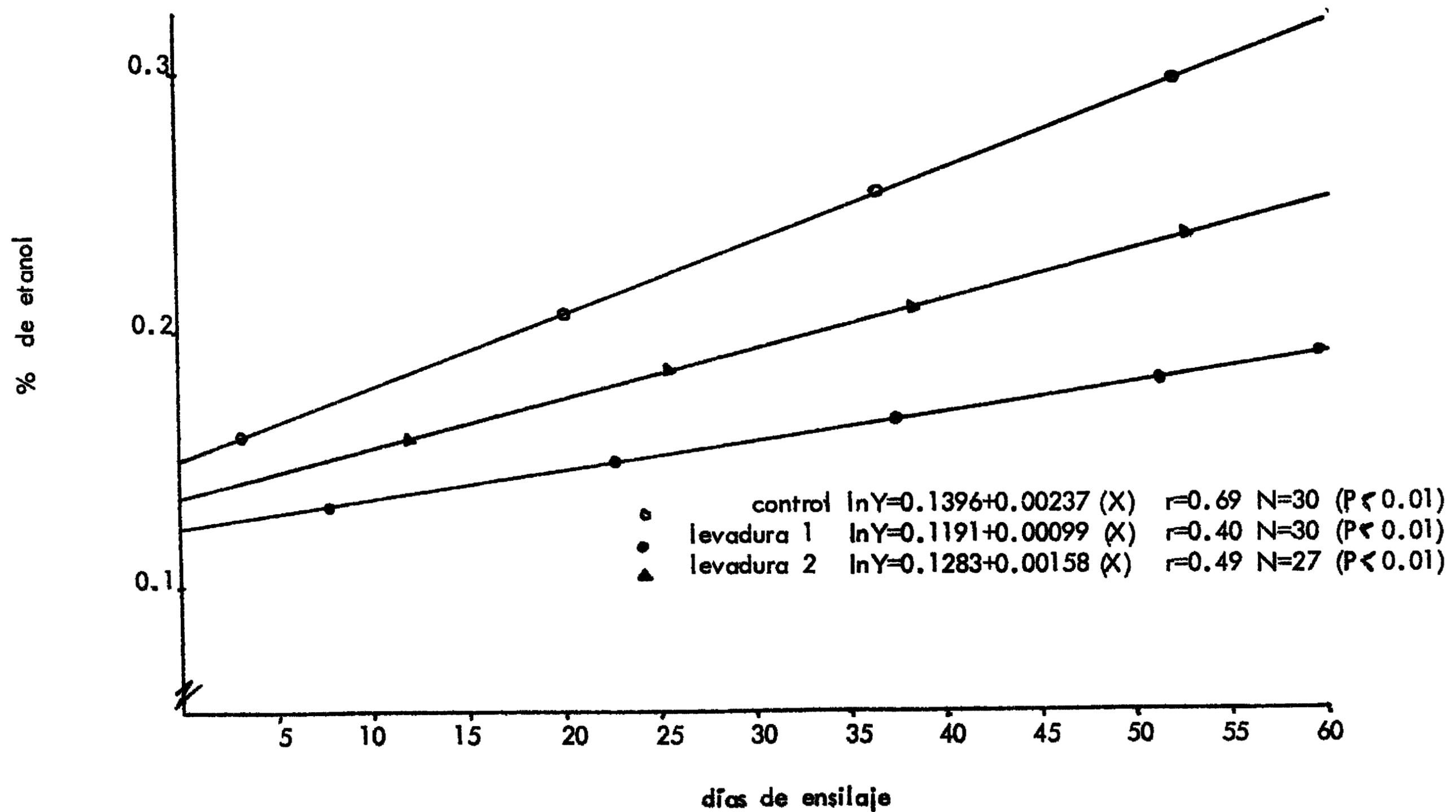


GRAFICA 4  
 LINEAS DE REGRESION QUE DESCRIBEN LOS CAMBIOS EN  
 CONCENTRACION DE METANOL EN EL ENSILAJE  
 DE PULPA DE CAFE



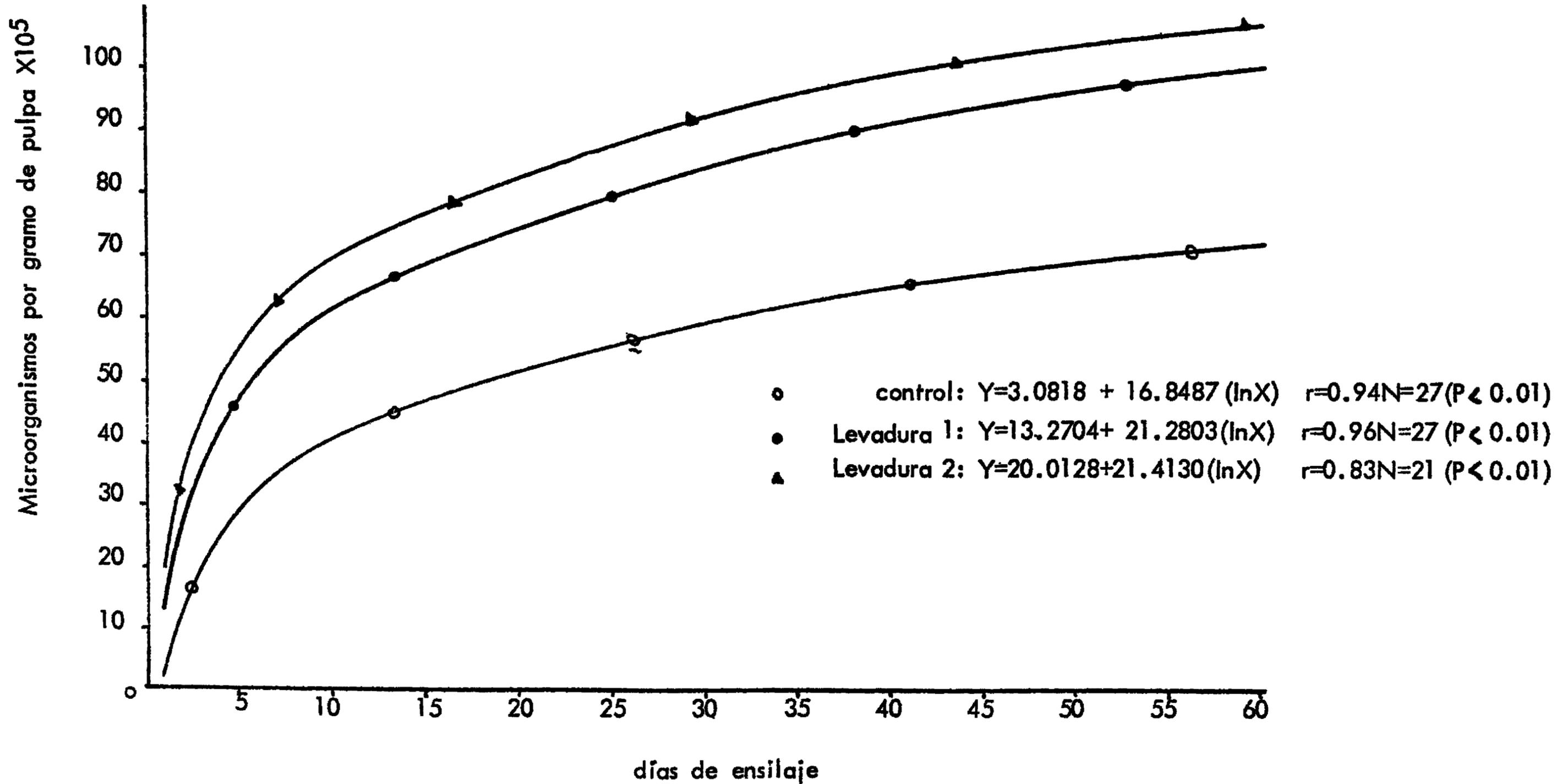
### GRAFICA 5

LINEAS DE REGRESION QUE DESCRIBEN LOS CAMBIOS EN CONCENTRACION DE ETANOL EN EL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE



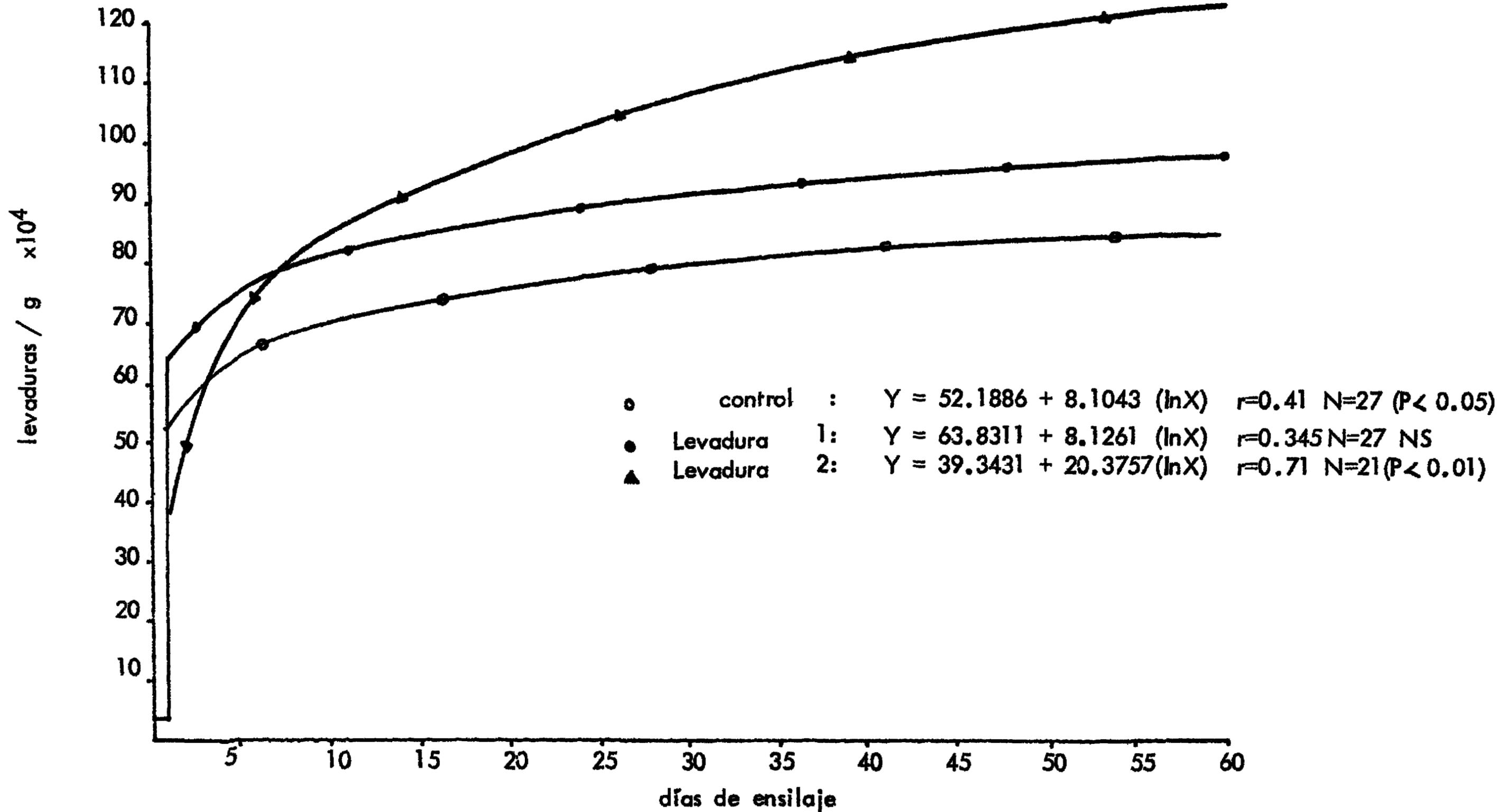
# GRAFICA 6

## LINEAS DE REGRESION QUE DESCRIBEN EL CRECIMIENTO MICROBIOLOGICO EN EL ENSILAJE DE LA PULPA DE CAFE



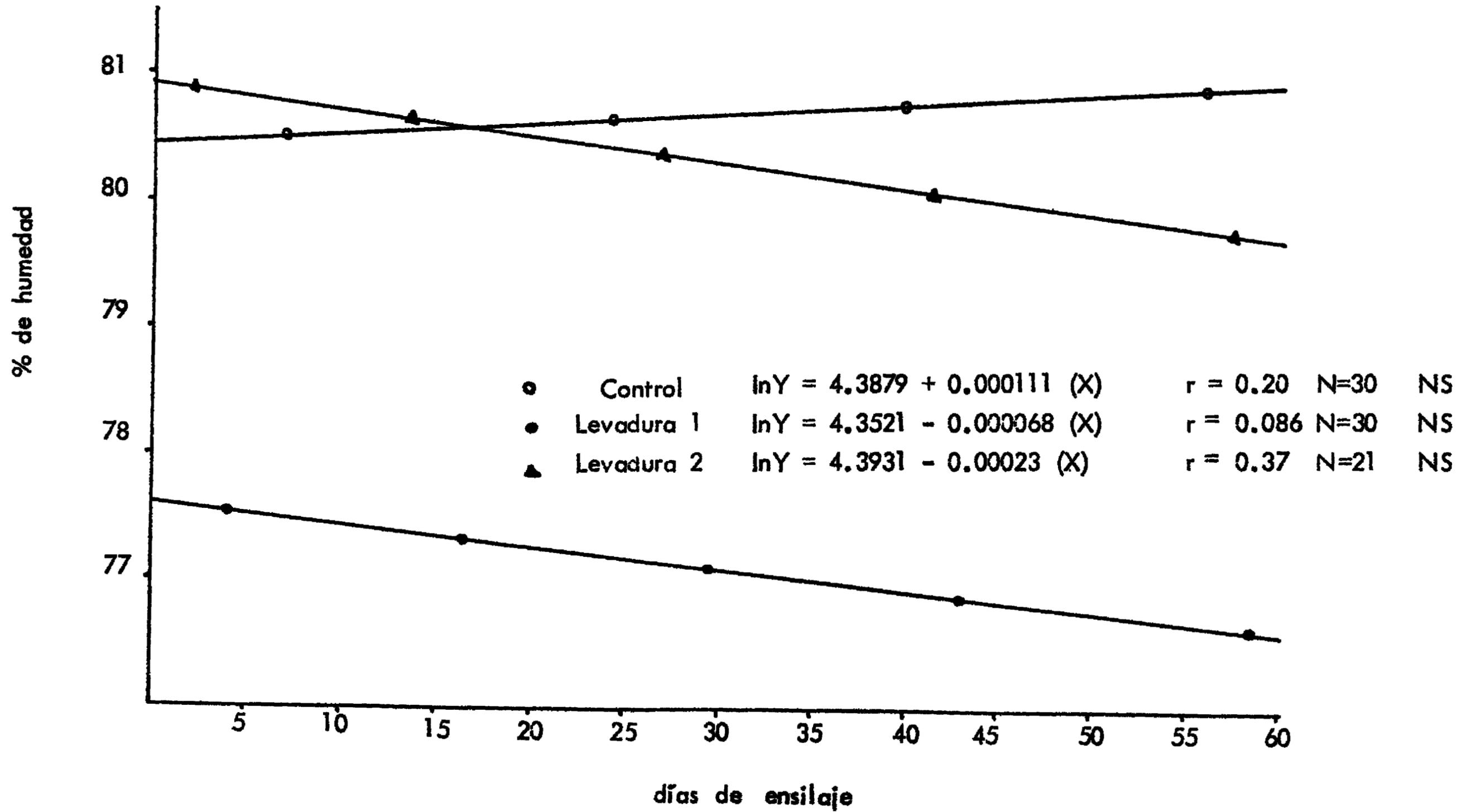
GRAFICA 7

LINEAS DE REGRESION QUE DESCRIBEN EL CRECIMIENTO DE LEVADURAS  
CAPACES DE USAR CAFEINA COMO UNICA FUENTE DE NITROGENO  
DURANTE EL ENSILAJE DE LA PULPA DE CAFE



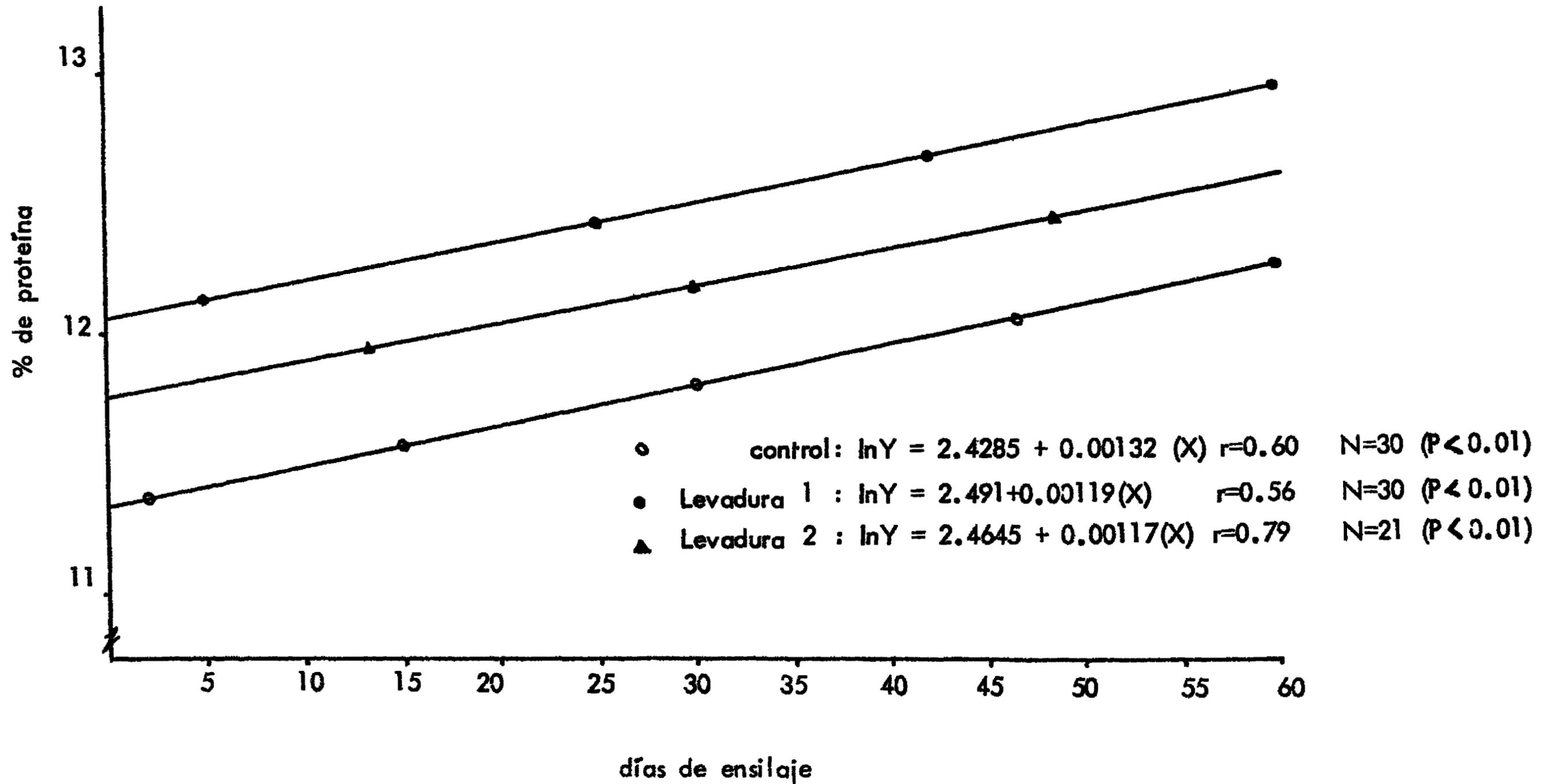
### GRAFICA 8

LINEAS DE REGRESION QUE DESCRIBEN LOS CAMBIOS DE HUMEDAD OBSERVADOS EN EL ENSILAJE DE LA PULPA DE CAFE



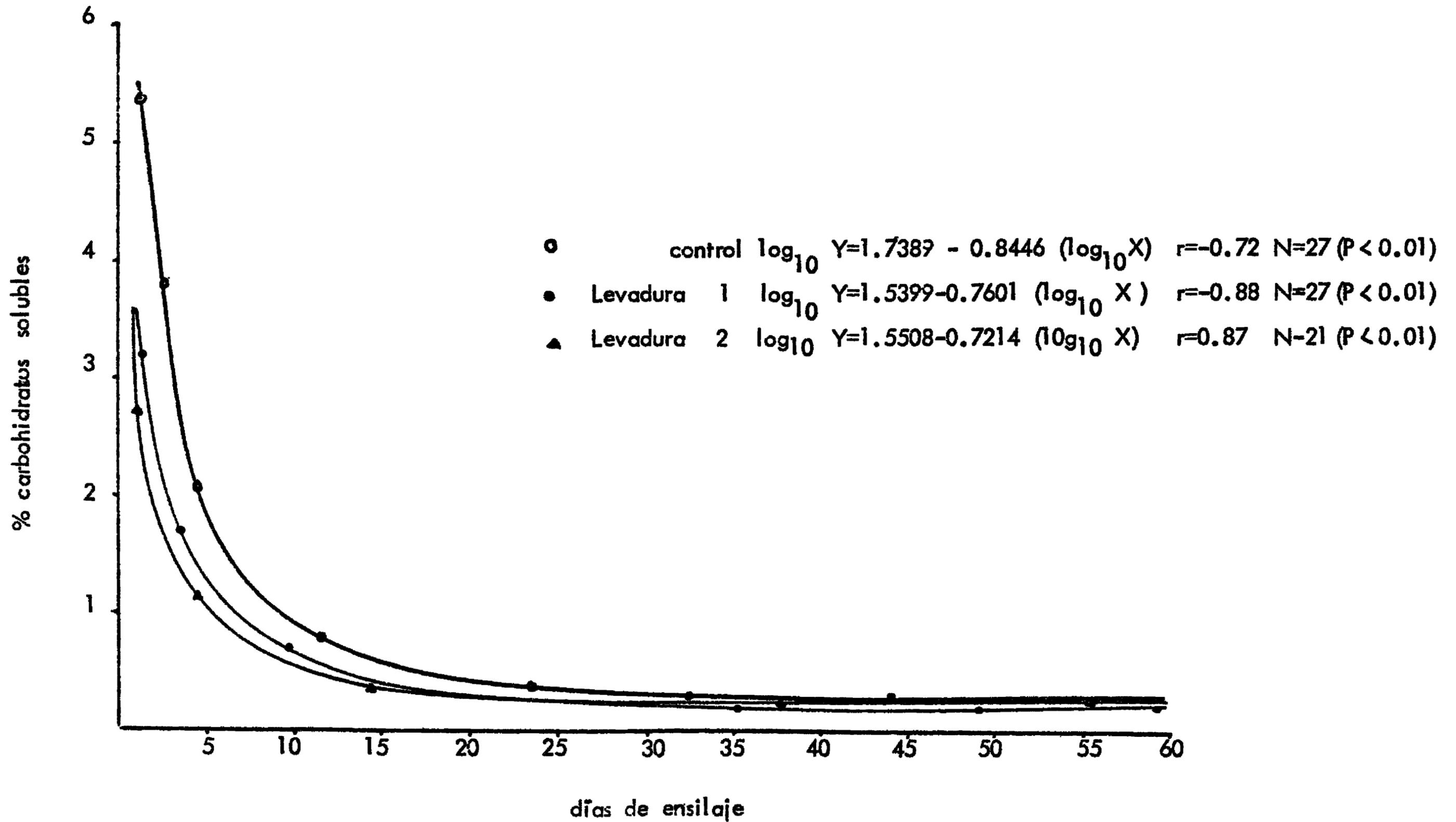
### GRAFICA 9

LINEAS DE REGRESION QUE DESCRIBEN LOS CAMBIOS DE CONCENTRACION DE PROTEINA EN EL ENSILAJE DE LA PULPA DE CAFE



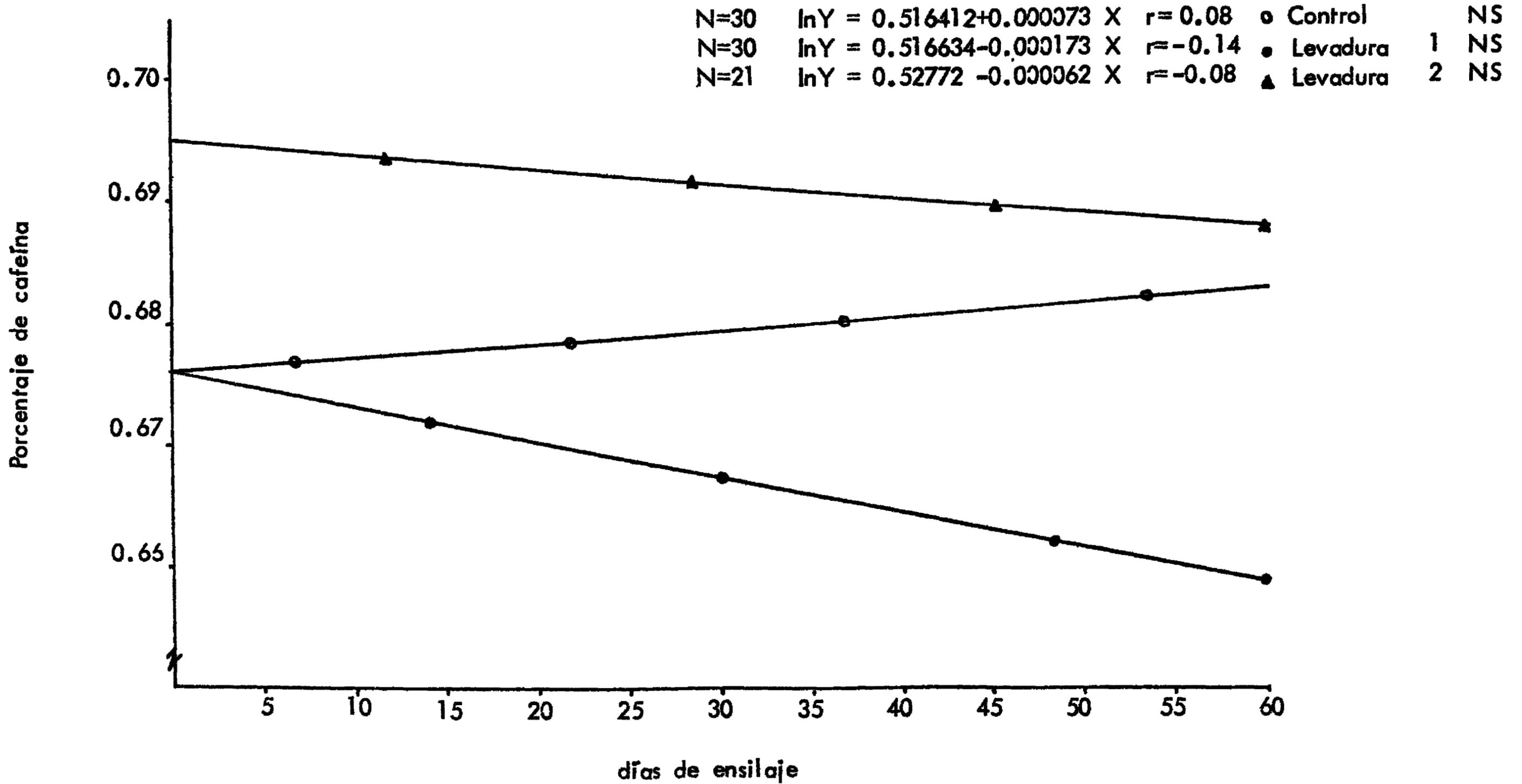
### GRAFICA 10

LINEAS DE REGRESION QUE DESCRIBEN LOS CAMBIOS EN CONCENTRACION DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES EN EL ENSILAJE DE LA PULPA DE CAFE



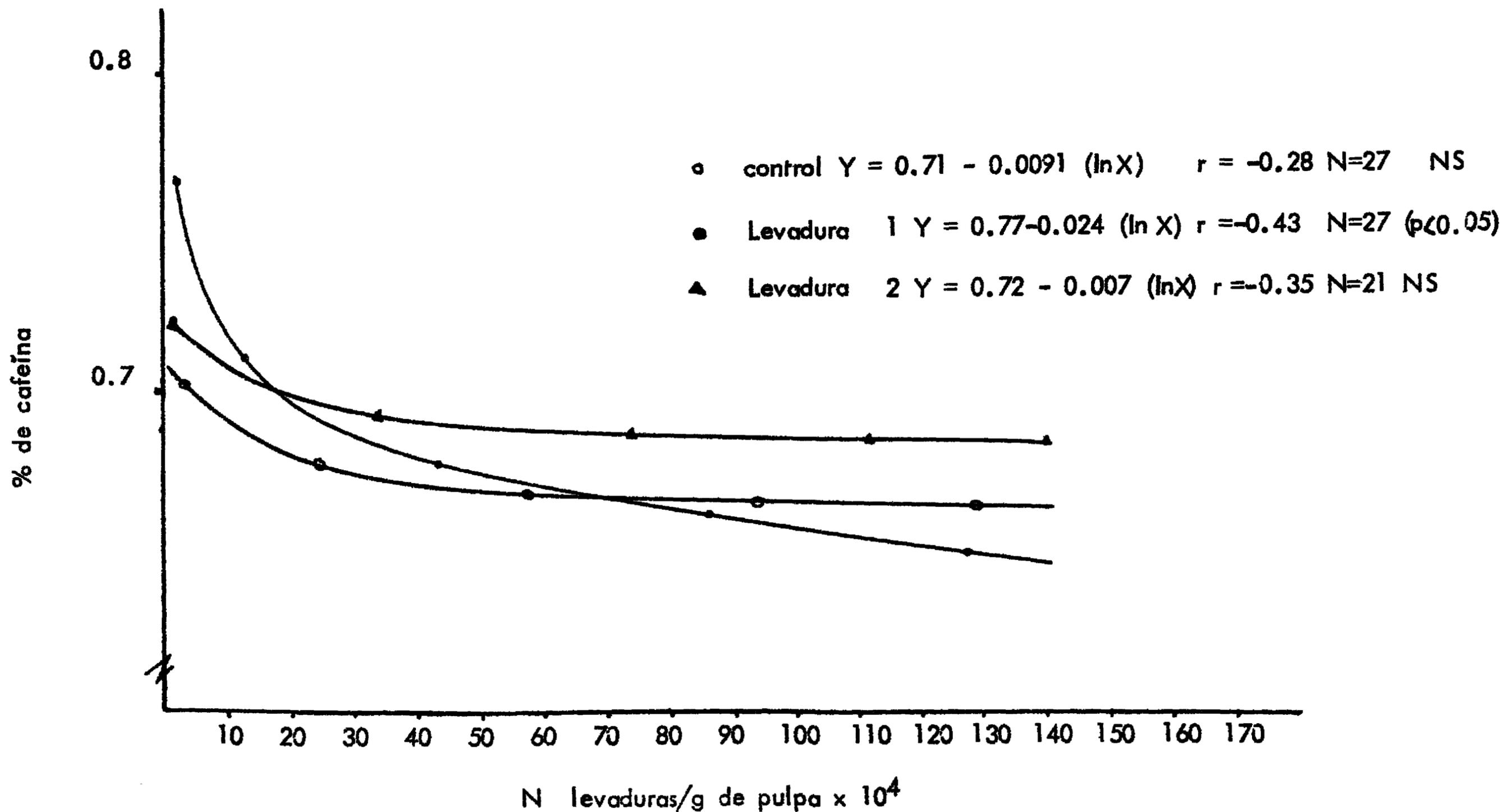
### GRAFICA 11

LINEAS DE REGRESION QUE DESCRIBEN LOS CAMBIOS EN CONCENTRACION DE CAFEINA EN EL ENSILAJE DE PULPA DE CAFE



### GRAFICA 12

LINEAS DE REGRESION QUE DESCRIBEN LA RELACION QUE EXISTE ENTRE EL CRECIMIENTO DE LEVADURAS CAPACES DE USAR CAFEINA COMO UNICA FUENTE DE NITROGENO Y LA CONCENTRACION DE CAFEINA EN LOS SILOS



---

LILIAN RENEE VILLAGRAN BLANCO

---

DR. MARIO ROBERTO MOLINA  
Asesor

---

DR. JOSÉ HÉCTOR AGUILAR  
Director de la Escuela de  
Química Biológica  
Fac. CC. QQ. y Farmacia

---

LIC. LEONEL CARRILLO  
Decano de la Facultad  
de Ciencias Químicas  
y Farmacia