

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



Para optar al título de

QUIMICO BIOLOGO

Guatemala, agosto de 1983

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

DL
06
T(2526)

JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA
DE LA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANO	Dr. José Héctor Aguilar
SECRETARIO	Lic. Leonel Carrillo R.
VOCAL PRIMERO	Lic. Luis Fernando Girón
VOCAL SEGUNDO	Lic. Francisco Monterroso
VOCAL TERCERO	Dr. Mario Roberto Molina
VOCAL CUARTO	Br. Víctor Hugo Hunter
VOCAL QUINTO	Br. Ligia Recinos

CUADRO 8

PARAMETROS FISICOS DEL SUSTRATO FERMENTADO

Sustrato	Humedad final (%)	Pérdida de materia seca (%)	pH final
A	* 80.87' ± 0.14	* 2.43' ± 0.73	* 3.0' ± 0.12
	** 81.52' ± 0.25	5.55' ± 1.41	3.2' ± 0.12
B	81.42 ± 0.25	5.08 ± 1.28	3.7 ± 0.07
	82.25 ± 0.33	9.84 ± 2.08	5.9 ± 0.09
C	81.83 ± 0.22	2.86 ± 1.36	3.8 ± 0.15
	82.77 ± 0.19	11.06 ± 1.65	5.9 ± 0.09
D	81.24 ± 0.02	4.26 ± 0.09	4.8 ± 0.01
	83.62 ± 0.20	16.43 ± 1.03	6.3 ± 0.05

A carente de nitrógeno agregado
 B nitrógeno agregado a mitad de la concentración estándar
 C únicamente urea
 D nitrógeno agregado a concentración estándar

' Media
 ± Desviación estándar
 n = 30 en A, B, C, D.
 * 24 hrs de fermentación
 ** 67 hrs de fermentación

CUADRO 9

CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES TOTALES EN
LOS DIFERENTES PRODUCTOS OBTENIDOS DESPUES DE
24 y 67 HORAS DE FERMENTACION
(5 Base Seca)

Sustrato	24 hrs de fermentación	67 hrs de fermentación
A	13.47' ± 0.4258	12.84' ± 0.2008
B	14.54 ± 0.0131	10.38 ± 0.1489
C	14.42 ± 0.2088	13.53 ± 0.2473
D	10.63 ± 0.1508	10.17 ± 0.3196
Pulpa	14.55	

A carente de nitrógeno agregado
B nitrógeno agregado a mitad de
la concentración estándar
C únicamente urea
D nitrógeno agregado a la con-
centración estándar

' Media
+ Desviación
- estándar
n = 30 en A, B,
C, D.

DEDICO ESTE ACTO

A DIOS

A MIS PADRES

Isaías de J. Aguilar M.
Dora Leticia de Aguilar

A MI HERMANA

Ma. Eugenia Aguilar M.

A MIS ABUELOS

A MIS FAMILIARES

A MIS AMIGOS

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Mario Roberto Molina por su asesoría, sin la cual no hubiera sido posible este estudio.

A los profesionales y personal técnico de la División de Ciencias Agrícolas y de Alimentos del INCAP, especialmente al Sr. Marco Antonio Baten por su colaboración.

RECONOCIMIENTO

A la Universidad de San Carlos de Guatemala.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Al Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá.

"ESTUDIOS SOBRE LA UTILIZACION DE CARBOHIDRATOS, POR
Aspergillus niger EN SISTEMAS DE FERMENTACION
SOLIDA, USANDO PULPA DE CAFE COMO SUSTRATO
Y DIFERENTES NIVELES DE NITROGENO".

INDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	4
Antecedentes.....	6
Justificaciones.....	24
Objetivos.....	26
Hipótesis.....	27
Aspectos Metodológicos.....	28
Resultados.....	32
Discusión.....	51
Conclusiones.....	68
Recomendaciones.....	70
Referencias.....	72
Anexos.....	79

LISTA DE CUADROS

- CUADRO 1 PRODUCCION DE CAFE Y DISPONIBILIDAD DE PULPA DE CAFE EN CENTRO AMERICA Y PANAMA.
- CUADRO 2 COMPOSICION QUIMICA DE LA PULPA DE CAFE
- CUADRO 3 CONTENIDO DE AMINOACIDOS EN LA PROTEINA DE LA PULPA DE CAFE
- CUADRO 4 CONSTITUYENTES DE PAREDES CELULARES Y POLISACARIDOS ESTRUCTURALES EN LA PULPA DE CAFE
- CUADRO 5 ENZIMAS PRODUCIDAS EN SISTEMAS DE FERMENTACION SOLIDA
- CUADRO 6 CARBOHIDRATOS SOLUBLES Y ESTRUCTURALES DE LA PULPA DE CAFE UTILIZADA COMO SUSTRATO DE FERMENTACION SOLIDA
- CUADRO 7 AUXONOGRAMA DE CARBONO DE A. niger
- CUADRO 8 PARAMETROS FISICOS DEL SUSTRATO FERMENTADO
- CUADRO 9 CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS SOLUBLES TOTALES EN LOS DIFERENTES PRODUCTOS OBTENIDOS DESPUES DE 24 y 67 HORAS DE FERMENTACION
- CUADRO 10 CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS REDUCTORES EN LOS DIFERENTES PRODUCTOS OBTENIDOS DESPUES DE 24 y 67 HORAS DE FERMENTACION
- CUADRO 11 CONTENIDO DE HEXOSAS EN LOS DIFERENTES PRODUCTOS OBTENIDOS DESPUES DE 24 y 67 HORAS DE FERMENTACION
- CUADRO 12 CONTENIDO DE PENTOSAS EN LOS DIFERENTES PRODUCTOS OBTENIDOS DESPUES DE 24 y 67 HORAS DE FERMENTACION
- CUADRO 13 CONTENIDO DE CETOSAS EN LOS DIFERENTES PRODUCTOS OBTENIDOS DESPUES DE 24 y 67 HORAS DE FERMENTACION
- CUADRO 14 CONSTITUYENTES DE PAREDES CELULARES, CARBOHIDRATOS ESTRUCTURALES DE LOS DIFERENTES PRODUCTOS OBTENIDOS DESPUES DE 24 y 67 HORAS DE FERMENTACION

LISTA DE GRAFICAS

- GRAFICA 1 RELACION ENTRE CARBOHIDRATOS SOLUBLES TOTALES, pH Y CRECIMIENTO DE A. niger DEL SUSTRATO CARENTE DE SALES DE NITROGENO AGREGADAS
- GRAFICA 2 RELACION ENTRE CARBOHIDRATOS SOLUBLES TOTALES, pH Y CRECIMIENTO DE A. niger DEL SUSTRATO QUE CONTIENE NITROGENO A MITAD DE LA CONCENTRACION ESTANDAR DESPUES DE 24 HORAS DE FERMENTACION
- GRAFICA 3 RELACION ENTRE CARBOHIDRATOS SOLUBLES TOTALES, pH Y CRECIMIENTO DE A. niger DEL SUSTRATO QUE CONTIENE NITROGENO A LA MITAD DE LA CONCENTRACION ESTANDAR DESPUES DE 67 HORAS DE FERMENTACION
- GRAFICA 4 RELACION ENTRE CARBOHIDRATOS SOLUBLES TOTALES, pH Y CRECIMIENTO DE A. niger DEL SUSTRATO QUE UNICAMENTE CONTIENE UREA DESPUES DE 24 y 67 HORAS DE FERMENTACION
- GRAFICA 5 RELACION ENTRE CARBOHIDRATOS SOLUBLES TOTALES, pH Y CRECIMIENTO DE A. niger DEL SUSTRATO QUE UNICAMENTE CONTIENE UREA DESPUES DE 24 y 67 HORAS DE FERMENTACION
- GRAFICA 6 RELACION ENTRE CARBOHIDRATOS SOLUBLES TOTALES, pH Y CRECIMIENTO DE A. niger DEL SUSTRATO QUE CONTIENE LA CONCENTRACION ESTANDAR DE NITROGENO DESPUES DE 24 HORAS DE FERMENTACION
- GRAFICA 7 RELACION ENTRE CARBOHIDRATOS SOLUBLES TOTALES, pH Y CRECIMIENTO DE A. niger DEL SUSTRATO QUE CONTIENE LA CONCENTRACION ESTANDAR DE NITROGENO DESPUES DE 67 HORAS DE FERMENTACION
- GRAFICA 8 RELACION ENTRE CARBOHIDRATOS REDUCTORES Y CRECIMIENTO DE A. niger DEL SUSTRATO CARENTE DE NITROGENO AGREGADO DESPUES DE 24 HORAS DE FERMENTACION
- GRAFICA 9 RELACION ENTRE CARBOHIDRATOS REDUCTORES Y CRECIMIENTO DE A. niger DEL SUSTRATO CARENTE DE NITROGENO AGREGADO DESPUES DE 67 HORAS DE FERMENTACION
- GRAFICA 10 RELACION ENTRE CARBOHIDRATOS REDUCTORES Y CRECIMIENTO DE A. niger DEL SUSTRATO QUE CONTIENE NITROGENO A LA MITAD DE LA CONCENTRACION ESTANDAR DESPUES DE 24 HORAS DE FERMENTACION

- GRAFICA 11 RELACION ENTRE CARBOHIDRATOS REDUCTORES Y CRECIMIENTO DE A. niger DEL SUSTRATO QUE CONTIENE NITROGENO A LA MITAD DE LA CONCENTRACION ESTANDAR DESPUES DE 67 HORAS DE FERMENTACION
- GRAFICA 12 RELACION ENTRE CARBOHIDRATOS REDUCTORES Y CRECIMIENTO DE A. niger DEL SUSTRATO QUE CONTIENE UNICAMENTE UREA DESPUES DE 24 HORAS DE FERMENTACION
- GRAFICA 13 RELACION ENTRE CARBOHIDRATOS REDUCTORES Y CRECIMIENTO DE A. niger DEL SUSTRATO QUE CONTIENE UNICAMENTE UREA DESPUES DE 67 HORAS DE FERMENTACION
- GRAFICA 14 RELACION ENTRE CARBOHIDRATOS REDUCTORES Y CRECIMIENTO DE A. niger DEL SUSTRATO QUE CONTIENE NITROGENO A LA CONCENTRACION ESTANDAR DESPUES DE 24 HORAS DE FERMENTACION
- GRAFICA 15 RELACION ENTRE CARBOHIDRATOS REDUCTORES Y CRECIMIENTO DE A. niger DEL SUSTRATO QUE CONTIENE NITROGENO A LA CONCENTRACION ESTANDAR DESPUES DE 67 HORAS DE FERMENTACION
- GRAFICA 16 RELACION ENTRE HEXOSAS Y CRECIMIENTO DE A. niger DEL SUSTRATO CARENTE DE NITROGENO AGREGADO
- GRAFICA 17 RELACION ENTRE HEXOSAS Y CRECIMIENTO DE A. niger DEL SUSTRATO QUE CONTIENE NITROGENO A LA MITAD DE LA CONCENTRACION ESTANDAR DESPUES DE 24 HORAS DE FERMENTACION
- GRAFICA 18 RELACION ENTRE HEXOSAS Y CRECIMIENTO DE A. niger DEL SUSTRATO QUE CONTIENE NITROGENO A LA MITAD DE LA CONCENTRACION ESTANDAR DESPUES DE 67 HORAS DE FERMENTACION
- GRAFICA 19 RELACION ENTRE HEXOSAS Y CRECIMIENTO DE A. niger DEL SUSTRATO QUE CONTIENE UNICAMENTE UREA DESPUES DE 24 HORAS DE FERMENTACION
- GRAFICA 20 RELACION ENTRE HEXOSAS Y CRECIMIENTO DE A. niger DEL SUSTRATO QUE CONTIENE UNICAMENTE UREA DESPUES DE 24 HORAS DE FERMENTACION
- GRAFICA 21 RELACION ENTRE HEXOSAS Y CRECIMIENTO DE A. niger DEL SUSTRATO QUE CONTIENE NITROGENO A LA CONCENTRACION ESTANDAR DESPUES DE 24 HORAS DE FERMENTACION

GRAFICA 22 RELACION ENTRE HEXOSAS Y CRECIMIENTO DE A. niger
DEL SUSTRATO QUE CONTIENE NITROGENO A LA CONCEN-
TRACION ESTANDAR DESPUES DE 67 HORAS DE FERMEN-
TACION

I. RESUMEN

En el presente estudio se evaluó el efecto del agregado de diferentes concentraciones de sales de nitrógeno, sobre el grado de crecimiento y utilización de diferentes carbohidratos, por Aspergillus niger, al cultivársele por la tecnología de fermentación sólida sobre pulpa de café como única fuente de carbono.

Para el efecto se utilizaron cuatro sustratos distintos los cuales contenían pulpa de café y sales de nitrógeno a distintas concentraciones. Al primero no se le agregaron sales de nitrógeno, al segundo se le adicionó urea (1.75 grs%) y sulfato de amonio (3.75 grs%); al tercero únicamente urea -- (1.75 grs%) y al cuarto se le agregó 3.5 grs% de urea y 7.50 grs% de sulfato de amonio. Estos cuatro sustratos fueron -- inoculados con esporas de A. niger (2×10^7 esporas/g seco) y sometidos a un proceso de fermentación sólida por 24 y 67 -- horas. Durante el mismo fueron estudiados los cambios físicos como pH, pérdida de materia seca y humedad a los dos -- tiempos de fermentación. También se evaluaron los cambios en contenido de carbohidratos solubles totales, carbohidratos reductores, hexosas, pentosas y cetosas de la pulpa de café durante la fermentación.

Determinaciones gravimétricas de celulosa, hemicelulosa y fibra de la pulpa también fueron realizadas, antes y después del proceso de fermentación.

La capacidad de utilización de carbohidratos por A. niger se determinó por medio de auxonogramas de carbono, con el fin de establecer la relación entre éstos y los presentes en la pulpa de café.

Además, después de los dos tiempos de fermentación evaluados (24 y 67 hrs) se encontró que en los sustratos que contenían sales de nitrógeno hubo una mayor pérdida de materia seca y un mayor contenido de humedad que en el sustrato que careció de sales de nitrógeno. Estas diferencias fueron altamente significativas ($P < 0.001$).

Los carbohidratos solubles totales disminuyeron significativamente ($P < 0.001$), después de 24 y 67 horas de fermentación en los cuatro sustratos sólidos; existiendo diferencias altamente significativas ($P < 0.001$) entre los distintos sustratos evaluados.

La concentración de hexosas y carbohidratos reductores aumentó después de 24 hrs de fermentación, posiblemente debido a una degradación de la celulosa u otro polisacárido por enzimas que posee A. niger. Este aumento en los dos tipos de carbohidratos citados, fue altamente significativo ($P < 0.001$), existiendo además diferencias significativas ($P < 0.01$), entre los tipos de sustratos evaluados.

La celulosa y la fibra de la pulpa de café tuvieron una disminución altamente significativa ($P < 0.001$), después del último tiempo de fermentación (67 hrs), lo que amplía la probabilidad de uso del producto fermentado en la alimenta--

ción animal, pudiéndose sugerir para animales monogástricos. Existieron diferencias entre los sustratos, ya que se obtuvo un mayor descenso de celulosa, y fibra en los sustratos que contenían nitrógeno a más altas concentraciones que en los que no lo contenían.

En conclusión, la concentración y disponibilidad de nitrógeno estuvo relacionada directamente con la utilización de carbohidratos. La disminución de celulosa y fibra contribuyó al mejoramiento de la calidad de la pulpa de café, como posible alimento para animales.

II. INTRODUCCION

La pulpa de café uno de los principales desechos agrícolas de Guatemala. La contaminación ambiental que ésta causa al ser eliminada en los ríos ha impulsado diversas investigaciones sobre sus posibles usos en diferentes campos (10, 11,12,49). Dentro de las mismas destacan las investigaciones realizadas para determinar el posible uso de la pulpa en la alimentación animal (10,43). Estos también han vertido información sobre la presencia en la pulpa de café de factores antifisiológicos que limitan su uso directo en la alimentación animal. Los mismos han sido tentativamente identificados como la cafeína, los polifenoles y el alto contenido de paredes celulares de la pulpa de café (9,46).

Tecnologías de extracción de cafeína y de fermentación anaeróbica y aeróbica se han evaluado para mejorar la calidad nutricional de la pulpa de café (10,43,65). Entre éstas una alternativa atractiva y que promete viabilidad es la fermentación sólida recientemente evaluada en pulpa de café (49).

Debido a que muy poco es conocido de la naturaleza de los carbohidratos solubles de la pulpa de café, que son las principales fuentes de energía suplidas por este material para la fermentación, el presente estudio comprende la identificación de tales compuestos y el seguimiento de los cambios en su concentración a través de la fermentación sólida

del producto, utilizando A. niger. Los hallazgos obtenidos en este estudio, sientan las bases para la realización de otras - investigaciones que conlleven a aumentar la eficiencia de la - fermentación sólida, y así mejorar la calidad nutricional de - la pulpa de café.

III. ANTECEDENTES

A. PULPA DE CAFE

a. Generalidades:

El café es uno de los principales productos agrícolas en Centro América. Como éste se obtiene en grandes cantidades - (Cuadro 1), es deseable aprovechar en la mejor forma posible los subproductos que quedan después del procesamiento del grano de café.

La pulpa de café es la parte del fruto de café formada - por el epicarpio o película roja exterior, y casi la totalidad del mesocarpio o capa de tejido blando y hialino que rodea al pergamino o endocarpio. Esta se desprende del grano, en la fase inicial del beneficiado del café (57). La pulpa es transportada por agua a un sistema de desperdicios de donde es posible obtenerla para ser utilizada. Según Bressani y col. (8) - de 1 kg de fruto de café se obtienen 432 grs de pulpa de café, lo que representa el 28.7% en peso del fruto en base seca. En el Cuadro 1 puede verse la producción de café y la disponibilidad de la pulpa en Centro América, lo que ofrece gran oportunidad de investigar procesos en los cuales esta pulpa puede ser utilizada.

b. Composición química:

Valores representativos de la composición química de la pulpa de café se presentan en el Cuadro 2. El contenido de humedad de la pulpa fresca es muy alto y representa el princi

pal problema en su utilización, transporte y uso directo en la alimentación animal.

c. Compuestos orgánicos:

La pulpa de café es un desecho agrícola rico en compuestos orgánicos, tales como los carbohidratos solubles y estructurales.

Los carbohidratos solubles son monosacáridos (47). Estos monosacáridos son comúnmente determinados como carbohidratos solubles totales, los valores varían dependiendo del tratamiento y procesamiento de la pulpa. Molina y col (42) informan valores de 9.03% de azúcares solubles totales en pulpa deshidratada a 120°C, Elías (18) informa 14.4% de los mismos en pulpa no tratada. Los azúcares solubles se reducen a un 1.54% cuando es percolada a 94°C (43). Los tratamientos alcalinos que se le dan a la pulpa de café para su detoxificación reducen los azúcares solubles a medida que aumenta la concentración del alcalí (24).

Los carbohidratos estructurales de la pulpa de café son polisacáridos como la celulosa y la hemicelulosa, la primera se encuentra en mayor cantidad que la segunda, con valores de 17.7% para la celulosa y 2.3% para la hemicelulosa como puede verse en el Cuadro 4. Murillo (47) informa valores de 30% de celulosa y 0.4% de hemicelulosa en pulpa de café ensilada.

Bressani y col (8) informan que la proteína de la pulpa contiene niveles de aminoácidos comparables o superiores a -

los que de otras fuentes de proteína vegetal como lo son las harinas de algodón y de soya (Cuadro 3). Gómez Brenes (25) encontró valores de aminoácidos más bajos de los descritos - por Bressani (8) para la pulpa de café. De acuerdo con éste, alrededor del 40% del nitrógeno total de la pulpa de café, es nitrógeno no proteico (cafeína, purinas y nitrógeno inorgánico). Por consiguiente la menor concentración de los aminoácidos puede deberse a que solamente alrededor del 60% del nitrógeno proviene de la proteína. Los valores publicados de proteína cruda varían Aguirre (1) informa 9.2% y Bressani (8) 11.2%. El contenido de fibra cruda según Jaffé y Ortiz (31) es de 18.1%; Aguirre (1) informa valores de 13.2% a 27.6%.

d. Posibles usos de la pulpa de café:

1. Como abono:

Suárez de Castro (57) informa que la pulpa de café es empleada como fertilizante en las mismas plantaciones de café por su alto contenido orgánico y su bajo costo, complementando así la acción de los fertilizantes orgánicos.

2. En la alimentación animal:

La posible utilización de la pulpa de café en la alimentación de cerdos, ganado de carne y en la preparación de concentrados para vacas lecheras ha sido objeto de múltiples investigaciones, debido al bajo costo del material y a un aparentemente alto valor nutritivo del mismo, deducido de su composición química (8).

3. Para el crecimiento de microorganismos:

La pulpa de café, por ser una fuente rica en azúcares, puede ser usada como medio de cultivo para microorganismos. Calle (12) inoculó Torulopsis utilis en pulpa de café, y obtuvo un crecimiento de la levadura que después de 24 hrs resultó ascender a 7.5 mg% (base seca). La pulpa de café, también posee nitrógeno proteico y no proteico (25), el cual puede ser utilizado por hongos filamentosos y otros microorganismos como fuente de nitrógeno para su crecimiento (32,51).

La pulpa de café es buena como sustrato para Aspergillus oryzae, Bacillus megaterium y Saccharomyces cerevisae (13).

Aspergillus niger, Penicillium crustosum y Trichoderma harzianum, crecen notablemente en pulpa de café usada como -- sustrato en sistemas de fermentación sólida (49).

e. Compuestos antifisiológicos de la pulpa de café:

El número total de sustancias de la pulpa de café con un posible efecto antifisiológico no ha sido determinado, pero en base a análisis químicos del grano de café se han dilucidado tres factores con efectos adversos en animales. Estas sustancias son: cafeína; fenoles libres, como los ácidos clorogénico, cafeico y tánico; y los fenoles poliméricos (9).

En la pulpa de café seca, la cafeína se presenta en concentraciones que varían de 0.6 a 1.2%; el ácido clorogénico varía de 0.18 a 3.16%; el cafeico de 0.28 a 2.58%; y el tánico de 2.30 a 5.36% (9).

1. Cafeína:

Este alcaloide es ampliamente conocido, actúa como estimulante del sistema nervioso central y del músculo cardíaco, estimula la secreción de ácido clorhídrico a nivel gástrico y eleva el nivel de glucosa y ácidos grasos libres en el plasma (49).

2. Fenoles libres y taninos:

Los principales fenoles libres en la pulpa de café son los ácidos cafeico, clorogénico y tánico (18). Bressani (9) resume la posible acción de los fenoles como una interferencia con la digestibilidad de la proteína, probablemente debido a reacciones de fenoles libres con aminoácidos y grupos libres de proteína. Además, se cree que los polifenoles se unen a las proteínas de la pulpa de café y a la lignina, formando con éstas complejos insolubles, lo cual las hacen no digeribles en la alimentación animal (9).

Los taninos son fenoles poliméricos, que pueden ser hidrolizables y condensables. La característica más importante de los taninos es probablemente su capacidad de ligar proteínas, haciéndolas no digeribles por el organismo. Provocan también retención de nitrógeno y reducción de la energía metabolizable (9).

f. Alternativas para disminuir los factores antifisiológicos:

Desde hace mucho tiempo se ha intentado utilizar la pulpa de café en la alimentación animal, pero la presencia de los

factores antifisiológicos que contienen ha limitado dicha utilización. Se han hecho varias investigaciones dirigidas a disminuir o eliminar estos compuestos tóxicos de la pulpa de café, entre ellas tenemos: tratamientos físicos como el secado o -- deshidratación y percolación de la pulpa, para la extracción de cafeína (42,43); el uso de hidróxido de sodio, hidróxido de calcio y bisulfito de sodio, para la disminución del contenido de taninos, cafeína, ácido clorogénico y tánico (24). La utilización de ensilaje, procedimiento ampliamente conocido por su tecnología simple y aplicación relativamente fácil en el beneficiado de café, contribuye a la disminución de la cafeína y los taninos (47). Se han realizado análisis químicos y microbiológicos del ensilaje de la pulpa de café, con el fin de investigar si este proceso microbiológico anaeróbico reduce los factores antifisiológicos de la pulpa de café. Se han aislado levaduras como Saccharomyces sp y Schizosaccharomyces sp, las cuales utilizan la cafeína como fuente de nitrógeno, por lo cual se origina una disminución del nitrógeno no proteínico de la pulpa de café, y aumenta la digestibilidad de la misma (65).

Se ha utilizado también la pulpa de café en fermentación aeróbica del tipo "Composting", que es una descomposición de la materia orgánica heterogénea, la cual se lleva a cabo por acción de una mezcla de poblaciones microbianas en un ambien-

te caliente y aeróbico. En este estudio se utilizaron dos inóculos distintos de levaduras del género Saccharomyces sp, las cuales son capaces de consumir la cafeína como única fuente de nitrógeno, obteniéndose disminución significativa de la cafeína de la pulpa, y aumento relativo de proteína de la misma. Utilizando este procedimiento se mejora la calidad nutricional de la pulpa de café, y se contribuye a disminuir sus factores antifisiológicos (10).

La última alternativa evaluada para disminuir los factores antifisiológicos de la pulpa de café es la fermentación sólida, la cual representa una magnífica perspectiva. Peña-loza (49) utilizó Aspergillus niger por su capacidad de síntesis proteínica, pero no obtuvo ningún cambio en la concentración de la cafeína, probablemente porque se adicionaron sales de nitrógeno al medio de cultivo, las cuales no permitieron que el moho utilizara el nitrógeno de la cafeína de la pulpa de café. Los fenoles libres y los taninos tampoco mostraron cambios significativos. En cambio la fibra, celulosa y hemicelulosa de la pulpa sí disminuyeron durante el proceso. En este estudio no se realizaron análisis para saber la concentración de los carbohidratos solubles.

B. FERMENTACION SOLIDA

a. Generalidades:

La fermentación en estado sólido representa, como su nombre lo indica, el crecimiento de microorganismos en sustratos

sólidos. A diferencia de las fermentaciones líquidas, el agua requerida para el crecimiento microbiano está contenida en el material sólido y su cantidad puede regularse de acuerdo con los requerimientos de los microorganismos (49,50).

Las fermentaciones sólidas han sido comúnmente usadas desde hace varios años en distintas regiones del mundo, aunque no se les había llamado como tal. Ejemplo de esto es la producción de queso Roquefort en el sur de Francia o del tipo Camembert y de la salsa soya en Oriente (22). Actualmente la fermentación sólida es utilizada en la producción de metabolitos, de enzimas, de micotoxinas y de alimentos fermentados con alto contenido de proteína; así como para el aprovechamiento de los desechos agrícolas (49).

b. Tipos de fermentación sólida:

Se conocen en la actualidad dos tipos de fermentación sólida, uno que se lleva a cabo en forma estática, y el otro, en sistemas giratorios.

1. Fermentación sólida estática:

En esta clase de fermentación los materiales a fermentar permanecen en reposo. Esta se ha aplicado para la maduración de quesos; para el mejoramiento de la calidad nutritiva de alimentos como la yuca (35,51); u otros materiales con alto contenido de almidón (50); y en la fermentación sólida de la pulpa de café (49).

2. Fermentación sólida con agitación:

En este grupo se incluyen a las fermentaciones que se mantienen constantemente en movimiento mediante mezcladores giratorios, con control de aireación, y mantenimiento de equilibrio de los niveles de O_2 y CO_2 . Estas se han sugerido para procesos de obtención de enzimas y de mejoramiento de la calidad nutricional de los residuos agrícolas (3,45).

c. Condiciones óptimas en el crecimiento de microorganismos en fermentación sólida:

Para la obtención de un crecimiento homogéneo de los microorganismos en sistemas de fermentación sólida es necesario controlar los siguientes factores: humedad, temperatura, pH, aireación y agitación; así como la concentración del inóculo.

1. Humedad:

Los mohos son capaces de desarrollarse a niveles de humedad disponible en el sustrato inferiores a aquéllos en los cuales se desarrollan bacterias y levaduras. Así pues, el porcentaje de humedad en sistemas de fermentación sólida influye directamente en el tipo de microorganismo, y magnitud de su crecimiento.

Linderfelser y Cliegler (38) informan que el porcentaje de humedad es el factor de mayor influencia en el crecimiento de Aspergillus ochraceus cuando se usa para la producción

de ocratoxina A. Silman (54) estima que 18-26% de humedad en el maíz es indispensable para el crecimiento de Aspergillus flavus, y para que se produzcan aflatoxinas.

En sustratos amiláceos los niveles de humedad óptimas para la buena germinación del micelio oscilan entre 50-60% (52), mientras que en otros materiales, como la pulpa de café, este nivel de humedad es de 80% (49).

2. Temperatura:

La temperatura influye en la esporulación de los mohos y en su metabolismo. En general, éstos pueden crecer dentro del rango de 20-40°C, aunque existen cepas termotolerantes como algunas de A. niger que crece a temperaturas por debajo de los 20°C hasta los 50°C. La temperatura óptima de crecimiento de A. niger en sustratos sólidos es de 35-40°C (50,52).

A. flavus crece en sustratos sólidos a temperaturas de 29-33°C, y produce aflatoxinas (53).

3. pH:

El pH es un factor importante en todo tipo de fermentación, ya que permite eliminar la posibilidad de contaminación con otros microorganismos. Los mohos crecen ordinariamente a pH bajos; en fermentación sólida el pH generalmente recomendado es de 3.5 para el inicio del proceso (49,50,52).

Las sales agregadas al medio en fermentación, como la urea y el sulfato de amonio, tienen influencia en el pH resultante de la fermentación. La acumulación de ion amonio,

compensa en parte la posible acidificación que pueden causar los metabolitos resultantes. Por ser campo nuevo la utilización de sustratos amiláceos en fermentación sólida, la influencia de las sales sobre el pH no está claramente establecida (50).

4. Aireación y agitación:

La cantidad de oxígeno disponible para los mohos y microorganismos aeróbicos en general es un factor importante en su desarrollo, y éste depende a su vez de la difusión del gas dentro del sustrato sólido. En sistemas estáticos de fermentación sólida se deben mantener en equilibrio las concentraciones de O_2 y CO_2 , ya que éstas afectan la producción de biomasa y enzimas, Bajracharya y Mudgett (3) informan que la producción de amilasa es significativamente mayor cuando hay aumento de la presión de oxígeno, y menor cuando aumente la presión de dióxido de carbono. En el estudio realizado por los anteriores investigadores, la producción de biomasa no fue afectada porque hubo formación de producto microbiano a presiones intermedias de dióxido de carbono.

En estudios realizados por Raimbault (50) se observó mayor crecimiento de A. niger cuando se aplican de 4-8 lts/hr de aire y un crecimiento constante cuando se aplica de - - - 0.5-4 lts/hr.

La agitación es un factor importante para la fermentación sólida en gran escala, porque favorece la distribución de es-

poras del inóculo y facilita el intercambio de calor y gases (50).

5. Inóculo de esporas:

La inoculación de esporas en una forma homogénea en el sustrato facilita el crecimiento de los mohos, y la cantidad adecuada de inóculo evita que haya una competencia con otros microorganismos que puedan estar presentes.

Raimbault (50) realizó estudios sobre la influencia del nivel de inoculación de esporas y observó que la concentración de 2×10^7 esporas/gramo fue el adecuado para A. niger, porque hubo crecimiento rápido y buena germinación después de treinta horas de fermentación.

d. Aplicaciones de la fermentación sólida:

1. Preparación de quesos:

El queso Roquefort se prepara de leche cuajada a la que se inoculara Penicillium roqueforti y se conserva a 18-19°C y a 80-85% de humedad (14.48).

El queso Camembert puede prepararse a partir de leche pasteurizada o cruda, de las cuales se prepara un cuajo con bajo grado de acidez, éste es inoculado con Penicillium camemberti a 11-15°C, y mantenido a 50% de humedad (14,48).

2. Preparación de comidas orientales:

El uso de la soya y su alto contenido de proteínas dió origen a la elaboración de comidas orientales fermentadas preparadas con soya, arroz y hongos filamentosos. A continuación

se enumeran las principales comidas orientales, haciéndose énfasis en los microorganismos y condiciones de fermentación empleadas para su producción.

El miso es una comida japonesa preparada por la fermentación sólida del arroz y la soya. La obtención del miso es un proceso que envuelve dos fermentaciones distintas. La primera es una fermentación aeróbica de arroz con cepas seleccionadas de A. oryzae, a ésta se le ha dado el nombre de Koji. La segunda, es una fermentación del producto anterior con sal e inoculado con Saccharomyces rouxii, que es una levadura osmofílica (22,29,48).

La salsa soya es el alimento fermentado que más se consume en Occidente. Es preparado con soya, arroz y trigo, los cuales son mezclados e inoculados con A. oryzae o A. soyae, incubados 72 hrs a 30°C (koji). Esta fermentación conduce a la producción de ácido láctico que es el factor clave en la elaboración de salsa soya. En este paso la bacteria implicada es Lactobacillus delbrueckii, la cual fue aislada por Lackwood y Smith (48,66); el papel que tiene esta bacteria es el de remover los sabores indeseables y adicionar el buen aroma de la salsa soya. Una segunda fermentación la lleva a cabo S. rouxii, Zygosaccharomyces soya o Zygosaccharomyces major las cuales convierten los azúcares en alcohol; la duración de esta fermentación es de 1 a 3 años (22,48,66).

El tempoh es un alimento de Indonesia preparado por fermentación sólida, con soya envuelta en cáscara de banano e inoculada con Rhizopus oligosporus, e incubado a 30-31°C por 20-24 hrs (22,49,58,66).

El ontjos es maní envuelto en cáscara de banano fermentado con Neurospora sitophila (22).

El sufu es un queso chino preparado por fermentación sólida, elaborado de soya, leche y sulfato de calcio o magnesio los cuales son mezclados y calentados para coagular las proteínas. Luego, el producto obtenido es inoculado con - - Actinomucor elegans e incubado a 20°C por 3-7 días (22).

También en Occidente se está haciendo uso de la fermentación sólida para la producción de alimentos ricos en proteínas. Se han utilizado sustratos amiláceos como residuos de yuca, banano y papa, fermentados por A. niger dada su alta actividad amilolítica y adecuada composición de aminoácidos (30,50,52).

3. Producción de enzimas:

La fermentación en sustrato sólido es utilizada en Francia para la elaboración de una variada gama de enzimas, las cuales son empleadas a nivel industrial (Cuadro 5) (50).

Bajrachrya y Mudgett (3) produjeron amilasa y biomasa en sistemas de fermentación sólida utilizando A. oryzae; en este caso la fase gaseosa fue mantenida por un sistema de - aireación estática. La producción de amilasa fue significa-

tivamente sensible a las presiones de O_2 y CO_2 . Los mismos investigadores utilizaron Aspergillus sp, aislado de alfalfa para mejorar la digestibilidad de los residuos de ésta y producción de biomasa. Estos autores sugieren que el metabolismo microbiano es una función del ambiente gaseoso en fermentación sólida (45).

Aspergillus awamori fue utilizado por Silman (54) para la producción de alfa-galactosidasa e invertasa, usando como sustrato trigo, y manteniendo los vasos de fermentación con adecuada aireación.

La producción de celulasas en fermentación semisólida de desechos de celulosa por Trichoderma viridae y Candida utilis es importante para aumentar la digestibilidad de la celulosa (27). T. viridae es el microorganismo más utilizado para la producción de celulasa en esta clase de fermentación por su alto poder celulolítico (35). El proceso Koji elaborado en sustratos sólidos es una fuente de producción de amilasas y proteasas (19,50).

4. Producción de metabolitos:

El ácido cítrico es el metabolito más importante producido en fermentación sólida. La mayor parte de éste se fabrica a partir de melazas, prefiriéndose en general las de remolacha a las de caña, utilizándose A. niger como microorganismo fermentador. La concentración de azúcar debe ser de

14-20%, el pH bajo, la temperatura de 25-30°C y el período de fermentación de 7-10 días (19,50).

5. Producción de Micotoxinas:

La gran distribución de hongos en la naturaleza y su presencia en lugares donde se almacenan granos y cereales como arroz, maíz, trigo y harina han originado numerosas investigaciones sobre las micotoxinas y las condiciones de almacenamiento en las que se producen. Para esto se ha utilizado la fermentación en sustrato sólido. Las micotoxinas más investigadas son las aflatoxinas producidas por Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus, tanto en medios sintéticos como naturales (61).

Silman (53) produjo aflatoxinas en maíz en gran escala usando la fermentación en sustrato sólido con columnas que contenían 7-8 kgs de maíz. Los niveles de aflatoxinas aumentaron de 6,200 ppb en 10 días; las condiciones usadas en el experimento fueron 18-26% de humedad, 29-30°C de temperatura y humedad relativa mayor del 90%.

La producción de ocratoxina A usando como sustrato trigo en un fermentador con aireación y agitación fue de 2000 - 4000 µg/gr de micotoxina. El porcentaje de humedad adecuado para producir esta cantidad de toxina es de 30-31% y la agitación debe ser baja, 10 rpm (38).

C. ASPERGILLUS NIGER:

A. niger es un hongo saprófito con conidióforos septados y cabezas aspergiladas de color café negruzco; ha sido estudiado desde principios de siglo por ser un hongo fermentativo y celulítico (5,48).

Jannathan y Singh (34) examinaron extractos de A. niger para determinar las enzimas que producía para el metabolismo de carbohidratos, entre las más importantes tenemos: la hexoquinasa, fosfofructoquinasa, aldolasa, enolasa, y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, lo que demuestra que A. niger puede metabolizar glucosa y fructuosa entre otros carbohidratos.

Las mejores fuentes de carbono para A. niger son las hexosas y las dihexosas; aunque también las pentosas pueden ser utilizadas por el microorganismo (51).

Este moho puede utilizar diversidad de compuestos nitrógenados, tanto de naturaleza orgánica como inorgánica (32).

A. niger es ampliamente utilizado en medios de cultivo conteniendo polisacáridos como fuente de carbono (34), por la capacidad que posee este moho de producir celulasas para la degradación de la celulosa. Estas enzimas hidrolizan las uniones glucosídicas beta 1-4 de la celulosa liberando glucosa, la cual puede ser utilizada por el moho o ser extraída para su uso industrial (37).

Las celulasas de A. niger han sido obtenidas en filtrados de cultivos del moho por cromatografía de absorción e in

tercambio iónico (4,5,37). Las celulasas que producen este -
moho son utilizadas para la degradación de tejidos vegetales;
para la producción de nutrientes a partir de celulosa y almi-
dón; para extraer los componentes del té, de la soya, del -
maíz y de la papa (59).

IV. JUSTIFICACIONES

La pulpa de café es obtenida en grandes cantidades en Guatemala por ser el principal subproducto del café. Actualmente este subproducto es desechado en su totalidad, siendo por ende, responsable de la contaminación en sitios aledaños a los beneficios de café. Por esto es conveniente establecer alternativas para su posible utilización. Dentro de estas destaca su posible uso como alimento animal.

Una alternativa que muestra la posibilidad de mejorar la calidad nutricional de la pulpa de café, y que podría hacer factible su utilización como alimento animal, es la fermentación sólida, ya que es un proceso adecuado para nuestros países, dado que es de costo muy inferior a la fermentación convencional en medio líquido. Su uso sería de mucha utilidad, porque para su realización no se necesita de una alta tecnología y los sustratos empleados son desechos agroindustriales como la pulpa de café u otro material celulósico o feculento.

En este trabajo se evaluará el potencial de los carbohidratos solubles de la pulpa de café como fuente de energía por el A. niger, y el poder que posee este moho para la degradación de los carbohidratos estructurales de la pulpa. Además, se determinará la influencia que tiene el nivel y tipo de fuente de nitrógeno sobre el comportamiento del A. niger con respecto a su poder de hidrólisis y utilización.

de carbohidratos. Estas evaluaciones son de vital importancia, porque brindarán los conocimientos básicos necesarios para determinar los parámetros críticos en la fermentación de la pulpa de café, que ayudará a definir el producto de mejores características que puede ser utilizado como fuente proteínica en la alimentación animal.

V. OBJETIVOS

1. Cuantificar los carbohidratos presentes en la pulpa de café, antes, durante y después de la fermentación sólida por Aspergillus niger, con el fin de establecer el grado de transformación y utilización de los mismos por este moho.

2. Determinar el efecto de la concentración y tipo de -- fuentes de nitrógeno agregadas a la pulpa de café, -- tiene sobre el grado de utilización de carbohidratos por A. niger.

3. Determinar los cambios que ocurren en los constituyentes de las paredes celulares de la pulpa de café, durante su fermentación sólida utilizando A. niger, para establecer la digestibilidad del producto fermentado.

VI. HIPOTESIS

Al inocular la pulpa de café con Aspergillus niger, los carbohidratos solubles y estructurales de la -- misma disminuyen a medida que aumenta el crecimiento del microorganismo. La utilización de los carbohidratos por el moho es afectada por la concentración y tipo de fuente de nitrógeno agregada a la - pulpa.

VII. ASPECTOS METODOLOGICOS

a. Universo de trabajo:

Para la realización del presente trabajo se utilizó pulpa de café de la cosecha 1980-1981 procedente del beneficio de café "Michatoya" de Amatitlán, Guatemala; una porción de ésta se inoculó con Aspergillus niger cepa n. 10 del laboratorio ORSTOM (Office de Recherche Scientifique et Technique d'Outre Mer), Francia.

b. Tratamiento de la pulpa de café:

La pulpa se mantuvo congelada antes de su uso. Luego, fue secada en horno de aire a 40°C o liofilizada, para disminuir su humedad hasta un 10%, y molida usando una malla 20.

c. Mantenimiento de cepas y producción de esporas:

La cepa de A. niger fue mantenida en agar papa a 4°C.

La producción de esporas se realizó por el método de Mudgett y Bajracharya (45). El recuento total de esporas se efectuó por hemocimetría y la determinación de esporas viables por el método de recuento en placa (54). Las esporas fueron mantenidas a 4°C antes de su uso (49).

d. Fermentación:

1. Composición del sustrato:

El sustrato se preparó de cuatro diferentes formas, ya que se varió la concentración de sales de nitrógeno.

En el sustrato estándar, por cada 100 grs de pulpa seca se añadió: fosfato diácido de potasio 10 grs, urea 3.5 grs, y

sulfato de amonio 7.5 grs. La concentración de fosfato diácido de potasio permaneció constante en los tres sustratos restantes. El primero contenía únicamente fosfato; en el segundo solamente se utilizó urea y fosfato; y en el tercero además de fosfato se agregó urea y sulfato de amonio, pero a la mitad de la concentración citada para el sustrato estándar. En todos los casos la inoculación se realizó con una suspensión de esporas 2×10^7 esporas/gr de material seco en los cuatro sustratos.

2. Método de cultivo:

Se utilizaron 10 grs de pulpa seca por muestras los cuales se colocaron en columnas con entrada de aire, similares a las empleadas por Raimbault y Alazard (50) y Peñaloza (49) para el estudio de las fermentaciones sólidas (Figura 1).

El pH inicial de las muestras fue de 3.5, el cual fue obtenido agregando unas gotas de H_2SO_4 concentrado a la mezcla esporas—sales—pulpa. La temperatura del baño de agua donde fueron mantenidas las muestras fue de $35^\circ C$, recomendada -- por Raimbault, Senez y Peñaloza para A. niger (49,50,52).

La humedad inicial del sustrato sólido fue de 80% por ser ésta la adecuada para obtener mayor crecimiento de A. niger en fermentación sólida de la pulpa de café (49).

El flujo de aire fue de 8 lts/min/kg suministrado a las columnas que contenían las muestras, por compresión con motores, Elite 802. Este flujo fue controlado por válvulas independientes en cada columna.

El tiempo de incubación de las muestras fue de 24 y 67 hrs, ya que a estos tiempos de incubación se obtienen las - fases de crecimiento representativas (49).

e. Análisis físicos, químicos y microbiológicos:

Al finalizar cada tiempo de fermentación se midió el pH, se determinó el porcentaje de materia seca por el método de la AOAC (2). El material se secó a 50-60°C y se molió, previo a extraerlo con etanol al 65% para los análisis químicos (56).

La determinación de los carbohidratos solubles totales en pulpa fermentada y sin fermentar se realizó por el método de Dubois y col (17); los carbohidratos reductores por el método modificado de Gail (20). Para la determinación de pentosas se empleó el método de Tracey (60); para la cuantificación de hexosas, el de Klein (33) y las cetosas, tanto pentosas como hexosas, se determinaron por el método de Dishe (16).

Para determinar los carbohidratos que pueden ser utilizados por A. niger se realizaron auxonogramas de carbono. Los mismos dieron una adecuada información sobre los carbohidratos que pueden ser metabolizados por el moho (26).

Se realizaron determinaciones de los carbohidratos estructurales de la pulpa de café, como lo son la celulosa y la hemicelulosa, así como de los constituyentes de la pared celular y la fibra; para ello se utilizaron los métodos de Van Soest (62,63,64).

f. Análisis de resultados:

De los resultados obtenidos se efectuaron análisis de "t" de Student. Además, se realizaron análisis de correlación y regresión simple (7,67).

VIII. RESULTADOS

a. Características de la materia prima:

Los valores obtenidos para los distintos carbohidratos cuantificados en la pulpa de café utilizada como única fuente de carbono en esta investigación se presentan en el Cuadro 6. Puede observarse que las hexosas son los carbohidratos solubles que se encontraron a más altas concentraciones en la pulpa de café, existiendo menor cantidad de carbohidratos reductores, pentosas y cetosas. Con respecto a los carbohidratos estructurales, la celulosa se encuentra en mayor concentración que la hemicelulosa (Cuadro 6). Todo lo anterior demuestra que la pulpa de café está constituida en su mayor parte de hexosas y polímeros de éstas.

Los componentes estructurales de la pulpa de café no carbohidratos, como lo es la lignina se observan en el Cuadro 14.

b. Características auxonográficas de A. niger:

Los resultados del auxonograma de carbono de A. niger se muestran en el Cuadro 7. Como puede apreciarse, este moho puede utilizar como fuente de carbono: glucosa, manosa, xilosa y el disacárido celobiosa.

Puede apreciarse también, que A. niger utiliza más fácilmente glucosa y celobiosa (unidad estructural de la celulosa) que los demás carbohidratos evaluados, por lo que se infiere que, para utilización de carbohidratos, este moho produce mayor cantidad de enzimas glucosídicas, bajo las condiciones probadas.

c. Características físicas de los diferentes sustratos
evaluados:

1. Pérdida de la materia seca:

Los resultados de la pérdida de materia seca de la pulpa, o consumo de materia seca, por el moho durante el proceso de fermentación se presentan en el Cuadro 8.

Como puede observarse, la pérdida de materia seca aumentó con el tiempo de fermentación y con el aumento de la concentración de nitrógeno, suministrado al sustrato.

Aunque después de 24 hrs de fermentación se observa un aumento de la pérdida de la materia seca en el sustrato que contenía agregado de nitrógeno de urea y sulfato de amonio a media concentración estándar, éste no fue estadísticamente significativo. Sin embargo, sí se alcanzó significancia en el sustrato que contenía dichas fuentes de nitrógeno a concentración estándar.

Al comparar la pérdida de materia seca del sustrato que contenía las dos fuentes de nitrógeno a la mitad de la concentración estándar con la observada en él que carece de ellas, y con él que contenía urea solamente, se pudo establecer una diferencia altamente significativa ($P < 0.001$) en este parámetro.

Después de 67 hrs de fermentación puede observarse que la mayor pérdida de materia seca se obtuvo en el sustrato que

contenía las dos fuentes de nitrógeno agregadas a la concentración estándar, teniendo diferencia altamente significativa ($P < 0.001$) entre éste y los demás sustratos sólidos. Al comparar el sustrato que contenía urea y sulfato de amonio a la mitad de la concentración estándar, con el que contenía urea solamente se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$), produciéndose mayor pérdida de materia seca en este último.

2. pH:

Los valores de pH obtenidos después de 24 y 67 horas de fermentación de los cuatros sustratos estudiados se presentan en el Cuadro 8. Por estos resultados puede observarse que el pH ácido predomina en el sustrato que carece de sales de nitrógeno. Cuando se aumenta la concentración de nitrógeno agregado, así como el tiempo de fermentación, el producto tiende a alcalinizarse. Se pudo establecer una diferencia altamente significativa ($P < 0.001$) entre el pH del sustrato estándar que contiene sales de nitrógeno, y el del que carece de ellas, tanto después de 24 hrs como de 67 hrs después de la fermentación. El pH determinado después de 24 hrs de fermentación en el sustrato que contenía urea y sulfato de amonio a mitad de la concentración estándar fue significativamente ($P < 0.05$) inferior del que contenía urea solamente. Después de 67 hrs de fermentación no existió diferencia significativa.

3. Humedad:

En el Cuadro 8 se resumen los resultados de humedad final en el sustrato después de 24 y 67 hrs de fermentación.

Puede observarse que la humedad de los cuatro productos evaluados aumenta significativamente ($P < 0.01$), respecto a la humedad del sustrato inicial (80%). Después de 24 hrs de fermentación, los resultados muestran que existió mayor humedad en los productos de los sustratos que contenían un agregado de sales de nitrógeno que en donde no se adicionaron. La humedad del producto sin el agregado de sales de nitrógeno después de 24 hrs de fermentación, fue significativamente inferior tanto a la encontrada en él que las contiene a la mitad de la concentración estándar ($P < 0.01$), como de la determinada en él que contiene únicamente urea ($P < 0.05$), y la registrada por el obtenido del sustrato que contenía las sales de nitrógeno agregadas en la concentración estándar. ($P < 0.001$).

También, después de 24 hrs de fermentación, existieron diferencias entre los resultados de humedad final de los sustratos que sí contienen nitrógeno agregado, ya que el aumento de humedad final en el sustrato que contiene urea y sulfato de amonio a mitad de la concentración estándar fue significativamente ($P < 0.01$) mayor que aquel obtenido en el sustrato agregado de urea solamente.

La diferencia en contenido de humedad después de 24 hrs de fermentación, entre los sustratos que contenían las

las sales de nitrógeno agregadas a media concentración y a la concentración estándar, no alcanzó diferencia estadística.

En todos los sustratos sólidos se observa un aumento de los valores de humedad final después de 67 hrs de fermentación, comparándolos tanto con el valor inicial como con el obtenido a las 24 hrs de fermentación. Este aumento resultó ser altamente significativo ($P < 0.001$) en ambos casos. Al igual que las 24 hrs de fermentación, se observó mayor humedad en los sustratos que contienen nitrógeno agregado, existiendo una diferencia altamente significativa ($P < 0.001$) entre la humedad de éste y la del que carece del agregado de sales.

El sustrato que contiene urea y sulfato de amonio a la concentración estándar, presente el valor más elevado de humedad, existiendo diferencias altamente significativas ($P < 0.001$) entre éste y los demás sustratos que contienen nitrógeno agregado a las otras concentraciones estudiadas.

Los valores de humedad final después de 67 hrs de fermentación, en los sustratos que contienen urea y sulfato de amonio a mitad de la concentración estándar no fueron estadísticamente diferentes de los presentados por el que únicamente contiene urea.

d. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la utilización de diferentes fracciones de carbohidratos, por *Aspergillus niger*:

1. Después de 24 hrs de fermentación:

En el Cuadro 9 se presentan los resultados obtenidos con relación a los cambios en la concentración de carbohidratos solubles totales, después de 24 hrs de fermentación, en los cuatro sustratos evaluados.

En el sustrato donde no se agregaron sales de nitrógeno y en él que se agregó la mayor concentración de las mismas, se produjo un descenso altamente significativo ($P < 0.001$) de los carbohidratos solubles totales después de 24 hrs de fermentación. En el sustrato estándar de las mismas se produjo un descenso altamente significativo ($P < 0.001$) de los carbohidratos solubles después de 24 hrs de fermentación. En el sustrato en él que únicamente se agregó urea como fuente de nitrógeno, se observó una disminución significativa ($P < 0.02$) relativamente menor de tales compuestos.

En el sustrato que contenía urea y sulfato de amonio agregado a la mitad de la concentración estándar se observó la menor disminución a este tiempo de fermentación (24 hrs), no alcanzando significancia.

Se encontró diferencia altamente significativa ($P < 0.001$), al comparar los cambios en la concentración de los carbohidratos

solubles totales del sustrato con las sales de nitrógeno a la concentración estándar con la de los otros tres tipos de sustrato.

Las concentraciones de carbohidratos reductores en todos los sustratos después de fermentados, se presentan en el Cuadro 10. En todos los casos se produjo un aumento altamente significativo ($P < 0.001$) de los carbohidratos mencionados, comparado con el valor de la materia prima. A las 24 hrs de fermentación, comparando entre los cuatro sustratos, el aumento observado en él que solamente se agregó urea como fuente de nitrógeno fue significativamente mayor ($P < 0.05$).

En el Cuadro 11 se presentan los valores de hexosas después de la fermentación. Se observa que existió un aumento altamente significativo ($P < 0.001$) de la concentración de hexosas, en los cuatro sustratos después de 24 hrs de fermentación, comparados con el valor del material inicial. El aumento de hexosas en el sustrato sin agregado de sales de nitrógeno fue significativamente ($P < 0.02$) menor que el observado en el que las contiene a la mitad de la concentración estándar. Puede observarse también, que el aumento de hexosas en los sustratos mencionados anteriormente fue significativamente mayor ($P < 0.001$) que el observado en el que contiene sales de nitrógeno a la concentración estándar.

En el Cuadro 12 se presentan los valores de pentosas después de la fermentación. Se observa que, al igual que en el caso de las hexosas, todos los sustratos presentaron un aumento altamente significativo ($P < 0.001$) en su concentración, después de 24 hrs de fermentación. Existió también una diferencia en el aumento de la concentración de pentosas entre los cuatro sustratos, la cual fue estadísticamente significativa ($P < 0.001$).

En el Cuadro 13, se presentan los valores de cetosas. En él se observa que los valores de estos carbohidratos disminuyen significativamente ($P < 0.01$), después de las primeras 24 hrs de fermentación. El mayor descenso de estos -- carbohidratos ocurrió en el sustrato que contiene únicamente urea como fuente de nitrógeno, el cual fue altamente significativo ($P < 0.001$) comparado con el resto. El sustrato al que se le agregó la cantidad estándar de sales de nitrógeno presentó la menor disminución.

Los resultados obtenidos en las determinaciones de carbohidratos estructurales se presentan en el Cuadro 14. En éste se observa que mientras la celulosa disminuye significativamente ($P < 0.001$) en los cuatro sustratos, después de 24 hrs de fermentación, el contenido de hemicelulosa se incrementó significativamente ($P < 0.001$), solamente en tres de los productos. El sustrato que contiene urea y sulfato de

amonio a la mitad de la concentración estándar mostró una disminución significativa ($P < 0.05$) en el contenido de hemicelulosa, después de 24 hrs de fermentación.

Los otros constituyentes de la pared celular de la pulpa de café, además de los carbohidratos estructurales, fueron también cuantificados antes y después de la fermentación y se incluyen en el Cuadro 14. Como puede observarse, existió una disminución altamente significativa ($P < 0.001$) de fibra neutro detergente en los sustratos que contenían urea y sulfato de amonio. En el sustrato que no contiene nitrógeno agregado y en aquél al que se le agregó únicamente urea, la disminución observada no alcanzó significancia estadística.

Los valores de fibra ácido detergente, por otra parte, disminuyeron significativamente ($P < 0.01$), después de 24 hrs de fermentación, en los cuatro productos evaluados.

La lignina disminuyó después de 24 hrs de fermentación en los cuatro sustratos. Sin embargo, esta disminución no fue estadísticamente significativa en el sustrato al que se le agregaron sales de nitrógeno a la concentración estándar. En cambio en los otros tres esta disminución sí fue significativa ($P < 0.01$).

2. Después de 67 hrs de fermentación:

Como puede observarse (Cuadro 9), la concentración de carbohidratos solubles totales disminuyó significativamente ($P < 0.01$) en los cuatro sustratos evaluados, comparando con el valor de la materia prima, y con el obtenido después de 24 -- hrs de fermentación. Puede observarse también, que las concentraciones de carbohidratos solubles después de 67 hrs de fermentación, fueron significativamente ($P < 0.001$) diferentes entre los sustratos que contienen las dos sales de nitrógeno agregadas a aquéllas que carecen de una o las dos de ellas.

Los valores obtenidos de la concentración de carbohidratos reductores después de 67 hrs de fermentación (Cuadro 10), muestran que su concentración tendió a disminuir en los cuatro productos, y que existió diferencia altamente significativa ($P < 0.001$) con los resultados obtenidos después de 24 hrs de fermentación.

La concentración de estos carbohidratos, sin embargo, nunca disminuyó con respecto al valor de la materia prima, ya que ésta fue siempre significativamente ($P < 0.001$) superior.

En los sustratos que contenían sales de nitrógeno no se observó diferencia estadísticamente significativa en la disminución de carbohidratos reductores. En cambio, se encontró diferencia significativa ($P < 0.001$) entre éstos y el sustrato que carece de sales de nitrógeno agregadas.

Los resultados obtenidos de la concentración de hexosas (Cuadro 11), muestran que la concentración de las mismas, después de 67 hrs de fermentación fue significativamente menor ($P < 0.001$) que la indicada a las 24 hrs de fermentación. Al igual que en los carbohidratos reductores, el aumento significativo ($P < 0.001$) alcanzado a las 24 hrs de fermentación fue de tal magnitud, que los valores a las 67 hrs del proceso no disminuyen por debajo del valor de hexosas en el sustrato inicial (Cuadro 6).

El sustrato que contiene sales de nitrógeno agregadas a la concentración estándar presentó una concentración de hexosas significativamente ($P < 0.001$) menor que todas las demás. Mientras que el sustrato al que no se le agregaron sales de nitrógeno, aunque presentó una disminución significativa ($P < 0.001$) de hexosas a las 67 hrs con respecto a 24 hrs de fermentación, también mostró un contenido de hexosas después de 67 hrs de fermentación que probó ser significativamente ($P < 0.001$) más alto que el determinado en los demás productos.

Los resultados obtenidos de los cambios de la concentración de pentosas (Cuadro 12), muestran que después de 67 hrs de fermentación existió un aumento significativo ($P < 0.001$) de la concentración de pentosas en el sustrato que contiene urea como única fuente de nitrógeno. En cambio, en el que contiene las dos fuentes de nitrógeno agregadas, tanto a la

concentración estándar como a la mitad, existió disminución significativa ($P < 0.001$) después del mismo tiempo (67 hrs) - de fermentación.

En los cuatro productos persiste el aumento de la -- concentración de pentosas, con respecto al valor encontrado en la materia prima, el cual continúa siendo estadísticamente significativo ($P < 0.01$).

La concentración de cetosas después de 67 hrs de fermentación (Cuadro 13), muestra que existe un aumento altamente significativo ($P < 0.001$) de este tipo de carbohidratos en los cuatro productos, al comparar su concentración a las 24 hrs de fermentación.

Comparando el valor de cetosas obtenido en el sustrato inicial con el obtenido después de 67 hrs de fermentación sí se observa una disminución estadísticamente significativa ($P < 0.001$) en los cuatro productos.

Los resultados con respecto al contenido de celulosa y hemicelulosa en el producto después de 67 hrs de fermentación (Cuadro 14), muestran que existió una disminución altamente significativa ($P < 0.001$) del valor de celulosa, en los cuatro sustratos. Hay que hacer notar que la disminución de celulosa es altamente significativa ($P < 0.001$), comparándola con el valor obtenido en el material inicial.

El contenido de hemicelulosa, por otra parte, aumentó en los cuatro sustratos después de 67 hrs de fermentación con respecto al obtenido después de 24 hrs de fermentación. Este aumento fue altamente significativo ($P < 0.001$) en todos los sustratos, excepto en el que contenía únicamente urea como fuente de nitrógeno. El contenido de hemicelulosa de los cuatro productos después del segundo tiempo del proceso (67 hrs), también fue significativamente ($P < 0.001$) mayor que el encontrado para la materia prima.

El contenido de fibra neutro detergente de los cuatro productos obtenidos después de 67 hrs de fermentación (Cuadro 14) tendió a aumentar con respecto al valor obtenido -- después de 24 hrs de fermentación, pero continuó siendo menor que el obtenido en la pulpa de café sin fermentar.

El contenido de fibra ácida detergente (Cuadro 14), por su parte, disminuyó en todos los productos obtenidos después de 67 hrs de fermentación (excepto en el que contenía las sales de nitrógeno a la concentración estándar) con respecto a los valores detectados después del primer tiempo de fermentación. Esta disminución fue altamente significativa ($P < 0.001$). El sustrato que contenía sales a la concentración estándar, presentó un aumento de este tipo de fibra, pero el mismo no fue estadísticamente significativo.

Los valores de fibra ácida detergente de los cuatro productos después de 67 hrs de fermentación son menores al encontrado en el sustrato inicial. En los productos provenientes de los sustratos que contenían las dos sales de nitrógeno agregadas a la concentración estándar como a la mitad, la disminución fue altamente significativa ($P < 0.001$). Comparando el contenido de este tipo de fibra en estos dos productos, se pudo establecer que aquél proveniente del medio agregado de las dos sales de nitrógeno a la concentración estándar contiene la menor cantidad de fibra ácida detergente. Esta diferencia fue altamente significativa ($P < 0.001$).

El contenido de lignina (Cuadro 14) de los productos obtenidos de los cuatro sustratos, después de 67 hrs de fermentación, tendió a aumentar al compararlo con el de los productos después de 24 hrs de fermentación.

Al comparar los valores de lignina de los productos de 67 hrs de fermentación con el encontrado en el material inicial, se observa una tendencia a disminuir en el producto del sustrato que carece de sales de nitrógeno, y un aumento altamente significativo ($P < 0.001$) en los productos de los demás sustratos sólidos.

e. Relación entre la utilización de carbohidratos por *A. niger*, rendimiento en síntesis proteínica y tipo de fuente de nitrógeno:

Para poder establecer la utilización de los distintos carbohidratos por *A. niger* es necesario conocer el grado de crecimiento del microorganismo en los distintos sustratos. Tal crecimiento puede detectarse por el grado de incremento en el contenido de proteína verdadera en el sustrato a través de la fermentación (49,50). Por otra parte, el grado de incremento en el contenido de proteína verdadera en el sustrato puede detectarse midiendo el aumento en concentración de aminoácidos básicos (49). Aún más, el incremento en la concentración de tales aminoácidos correlaciona con el incremento en el pH del sustrato (49).

La ecuación de regresión correspondiente entre los dos parámetros es $y = 0.5806x - 0.9945$; donde "y" es igual al porcentaje de aminoácidos básicos, "x" al pH final de las fermentaciones; 0.5806 a la pendiente de la recta, y 0.9945 al intercepto. Esta ecuación fue obtenida de las cinéticas efectuadas por Peñaloza (49) en fermentación sólida de la pulpa de café, donde se tenían valores de aminoácidos básicos y de pH a distintos tiempos de fermentación. Esta relación entre la variación de pH y el incremento de aminoácidos básicos del producto fermentado fue altamente significativo ($P < 0.001$) (49). Por lo tanto, el pH determinado en este estudio a los distintos tiem-

pos de fermentación evaluados en los cuatro sustratos, fue utilizado para estimar el rendimiento o crecimiento del moho, y poder así establecer una relación entre dicho crecimiento y la utilización de carbohidratos.

Cabe indicar que los valores de aminoácidos básicos obtenidos a partir de la ecuación lineal citada, son similares a los determinados en el laboratorio por técnicas adecuadas de hidrólisis ácida del producto fermentado, y separaciones electroforéticas en los mismos materiales de este estudio. Lo anterior da una alta confiabilidad a las relaciones que adelante se establecen.

1. Carbohidratos Solubles Totales:

En la Gráfica 1 puede observarse que existe una relación inversa entre la disminución de carbohidratos solubles totales observada después de 24 y 67 hrs de fermentación, en el sustrato que carece de fuente de nitrógeno y el pH del mismo o el grado de crecimiento de A. niger (expresado como concentración total de aminoácidos básicos).

En las Gráficas 2, 3, 4, 5, 6 y 7 se puede observar que la misma relación negativa entre crecimiento o pH y grado de utilización de carbohidratos solubles se manifiesta en todos los sustratos utilizados, tanto a 24 como a 67 hrs de fermentación. En todos los casos la correlación negativa señalada fue significativa ($P < 0.001$).

En las Gráficas 6 y 7 puede notarse que cuando las dos sales de nitrógeno usadas fueron agregadas al sustrato en la concentración estándar se obtuvo un mayor crecimiento del mo-
ho que en los demás sustratos sólidos. Este hecho va acompa-
ñado de un mayor consumo de carbohidratos solubles, tanto des-
pués de 24 como de 67 hrs de fermentación. El pH también de-
muestra un mayor grado de incremento.

2. Carbohidratos reductores:

Las Gráficas 8, 10, y 12 muestran la relación entre cre-
cimiento y contenido de carbohidratos reductores después de
24 hrs de fermentación, en los sustratos sin agregado de sales
de nitrógeno, con agregado de solamente urea y con agregado -
de sulfato de amonio y urea a mitad de la concentración están-
dar. Como se puede observar, dicha relación es positiva (cur-
va de regresión con pendiente positiva), en contraste con la
relación negativa observada, también a las 24 hrs de fermen-
tación, entre los mismos parámetros en el sustrato agregado
de las dos fuentes de nitrógeno a las concentraciones están-
dar (Gráfica 14). Esto implica que en este último caso sí
existió una utilización más eficiente de carbohidratos re-
ductores después del tiempo de fermentación citado (24 hrs),
que en los otros casos.

Las Gráficas 9, 11, 13 y 15 muestran las líneas de re-
gresión que expresan la relación entre crecimiento y utiliza

ción de carbohidratos reductores, para los cuatro sustratos evaluados, después de 67 hrs de fermentación. Al contrario de lo anotado arriba para el caso de 24 hrs de fermentación, aquí todas las pendiente de las rectas son negativas, lo que indica una correlación negativa entre el crecimiento de A. niger y la utilización de carbohidratos reductores. En otras palabras, a las 67 hrs de fermentación sí existió una disminución de estos carbohidratos a medida que incrementó el crecimiento del moho expresado como porcentaje de aminoácidos básicos en los cuatro sustratos evaluados. Sin embargo, debe anotarse que se observa un mayor crecimiento en el sustrato que contiene las dos sales de nitrógeno agregadas a la concentración estándar, aun cuando, como se indicara, se obtuvo la misma relación entre los cuatro sustratos.

3. Hexosas:

Las Gráficas 16, 17, 18, 19, 20, 21 y 22 presentan -- las relaciones y las líneas de regresión correspondientes -- entre el crecimiento de A. niger y la utilización de hexo-- sas de los cuatros sustratos, después de 24 y 67 horas de -- fermentación. Entre ellas puede observarse que siempre e-- xistió la tendencia de una correlación negativa (pendien-- tes negativas de las rectas) en todos los sustratos evalua-- dos, que indica que un mayor crecimiento de A. niger va a-

compañado de una mayor utilización de hexosas y, por lo tanto, se obtiene una menor concentración de éstas en el producto fermentado.

IX. DISCUSION

a. Características de la materia prima:

Los resultados obtenidos de los carbohidratos evaluados - en pulpa de café usada como sustrato inicial, se sumarizan en el Cuadro 16. En éste puede observarse que 14.55% fue el valor -- obtenido para carbohidratos solubles totales, similar al encontrado por Elías (18) y Bressani y col (8) en pulpa de café sin procesar. Esta similitud pudo deberse a que los tipos de pulpa de café evaluadas pertenecían a un mismo lugar, y estaban sometidas a otros factores similares que influyen en las determinaciones químicas de la pulpa de café (10).

Con respecto a los valores iniciales de carbohidratos reductores, mientras Bressani y col (8) informaron concentraciones hasta de 12.4%, Calderón (10) informó valores de 1.3%. Este último es el que más concuerda con el valor inicial encontrado en este estudio (Cuadro 6). Es probable que las diferencias anteriores se deban al tipo de café, pérdidas de azúcares por percolación durante el beneficiado húmedo de café y a la prontitud con que la pulpa fuera removida del depósito inferior del pulpero, donde recibe constantemente una corriente de agua (10).

Las hexosas son los carbohidratos más abundantes en la pulpa de café (Cuadro 6).

No se tienen referencias de valores de hexosas de pulpa de café, para poder comparar los resultados obtenidos, ya que éste es el primer estudio efectuado a este respecto.

Los valores de pentosas y cetosas (Cuadro 6), representan una mínima parte de los carbohidratos solubles en la pulpa de café utilizada como sustrato. Los resultados anteriores permiten demostrar que la pulpa de café es un material pobre en este tipo de carbohidratos.

La celulosa y la hemicelulosa constituyen los carbohidratos estructurales de la pulpa de café. La celulosa se encontró en mayor cantidad que la hemicelulosa (Cuadro 6); lo anterior se debe a que la celulosa es un polímero de glucosa (hexosa), y la hemicelulosa de pentosas, especialmente xilosa (36).

Los resultados obtenidos demuestran que la pulpa de café es un material rico en carbohidratos, especialmente hexosas, encontrándose disponible para su utilización por el microorganismo, porque se presentan en forma soluble y en cantidades adecuadas. La celulosa puede también ser utilizada, ya que se encuentran en cantidades considerables, y A. niger produce celulasas para el rompimiento de las uniones B-gluco-sídicas del polímero (4,5,32,37), así como la capacidad de utilizar la unidad estructural de la celulosa, como lo es la celobiosa (Cuadro 7).

b. Características auxonográficas de A. niger:

En el Cuadro 7, se presenta el auxonograma de carbono de A. niger; en éste pueden observarse los carbohidratos utiliza

dos por el microorganismo; estos resultados coinciden con los informados por Imrie y col (30). También puede apreciarse - que la glucosa y la celobiosa fueron los azúcares más eficientemente utilizados por el moho; esto se debió a que las mejores fuentes de carbono para los hongos filamentosos, como lo es A. niger, son las hexosas y dihexosas. La facilidad de utilización de celobiosa por este moho es muy importante, ya que este disacárido pudo obtenerse como producto de hidrólisis de la celulosa de la pulpa de café, y haber sido utilizado por el moho en los cuatro sustratos evaluados.

A. niger también puede utilizar pentosas como la xilosa y la arabinosa (Cuadro 7) (30.32). Sin embargo, la cepa de A. niger empleada en este estudio utilizó más eficientemente las hexosas como fuente de carbono, ya que se obtuvo un mejor crecimiento del moho utilizando estos carbohidratos como única fuente de carbono.

c. Características físicas de los diferentes sustratos evaluados:

1. Pérdida de materia seca:

El valor más elevado de pérdida de materia seca se observa en el sustrato que contiene la concentración estándar de sales de nitrógeno (Cuadro 8), después de 24 y 67 hrs de fermentación. Esto se debe a que existió mayor crecimiento del moho, y por lo tanto mayor actividad metabólica, lo que

conlleva a un mayor consumo de nutrientes disponibles y esto origina que se pierda más materia seca (49).

2. pH:

Se encontraron diferencias altamente significativas ($P < 0.001$) entre los valores de pH, los dos tiempos de fermentación y la concentración de sales de nitrógeno agregadas en los cuatro sustratos evaluados.

Se encontró un pH alcalino en el sustrato que contenía sulfato de amonio y urea agregados a la concentración estándar, tanto después de 24 como de 67 hrs de fermentación, lo que nos permite deducir que existe acumulación de ion amonio en el producto fermentado y compensa en parte la acidificación resultante en los sustratos que carecen de estas sales o de alguna de ellas (50).

3. Humedad:

La humedad final de los sustratos evaluados se resume en el Cuadro 8. En él se observa que este parámetro físico de la fermentación sólida presentó variaciones altamente significativas ($P < 0.001$) entre los sustratos y las horas de fermentación. Al igual que los parámetros anteriores, el sustrato que presenta el valor más alto de humedad es el que contenía la concentración estándar de sales de nitrógeno, lo que nos demuestra que existió mayor actividad metabólica y, por lo tanto mayor producción de CO_2 y agua (49).

d. Después de 24 y 67 hrs de fermentación:

A las 24 hrs se encontró una disminución altamente significativa ($P < 0.001$) de la concentración de carbohidratos solubles totales (Cuadro 9) en el sustrato agregado de las dos sales de nitrógeno a la concentración estándar. En el sustrato que carece de nitrógeno también disminuyó significativamente ($P < 0.01$), mientras que el sustrato que contenía solamente urea presentó una disminución a menor nivel de significancia ($P < 0.02$). El sustrato agregado de urea y sulfato de amonio a mitad de la concentración estándar no presentó ningún cambio estadísticamente significativo. Estos resultados muestran que existen diferencias entre los cuatro sustratos, y éstas muy posiblemente se deben a las distintas concentraciones de nitrógeno en los cuatro sustratos evaluados. Por lo anterior, se puede decir que A. niger utilizó mayor cantidad de carbohidratos en el sustrato que contiene la concentración estándar de sales de nitrógeno, y esto hace que la disminución de los carbohidratos alcance el mayor nivel de significancia ($P < 0.001$). En el sustrato que carece de nitrógeno agregado también utilizó parte de los carbohidratos solubles totales, lo que hace suponer que el moho está utilizando el nitrógeno de las sustancias propias de la pulpa de café.

Curiosamente, el sustrato que contiene únicamente urea presenta una disminución de estos carbohidratos a un nivel de

significancia menor que los anteriores. El sustrato que contiene dos fuentes de nitrógeno agregadas a mitad de la concentración estándar, muy curiosamente no muestra ninguna baja en la concentración de carbohidratos solubles totales.

Después de 67 hrs de fermentación los cuatro sustratos mostraron una baja en la concentración de estos carbohidratos, la cual fue estadísticamente significativa ($P < 0.01$) al comparar los valores obtenidos a este tiempo con los indicados antes para las 24 hrs de fermentación, así como el obtenido para la materia prima.

Al igual que a las 24 hrs, la concentración de estos carbohidratos es menor en el sustrato que contiene la concentración estándar de nitrógeno agregado. En este tiempo de fermentación cabe notar que sí existió una disminución altamente significativa ($P < 0.001$) de estos carbohidratos, en el sustrato que contiene urea y sulfato de amonio agregados a la mitad de la concentración estándar. En los sustratos restantes existió disminución significativa ($P < 0.01$).

La disminución en el sustrato que contiene urea y sulfato de amonio agregados a la mitad de la concentración estándar, pudo deberse a que A. niger no había metabolizado la mayor parte de éstos carbohidratos a las primeras 24 hrs de fermentación, y con mayor tiempo del proceso la velocidad de utilización aumentó. Esta disminución es mayor que la registrada para el sustrato que contiene las dos sales a la concentra

ción estándar, pero siempre existió diferencia significativa entre ambas, ya que A. niger utilizó más carbohidratos en el sustrato que contenía la concentración estándar de nitrógeno agregado.

Estos resultados demuestran que la naturaleza y cantidad de compuestos nitrogenados son factores muy importantes para la utilización de carbohidratos solubles por A. niger (30,32).

La concentración de carbohidratos reductores aumentó después de 24 hrs de fermentación (Cuadro 10). Este aumento fue altamente significativo ($P < 0.001$). Esto pudo deberse a la capacidad que posee A. niger de producir celulasas que degradan la celulosa (4,5,30,34). Dado que ésta es un polímero de glucosa y ésta a su vez es un azúcar reductor, se puede inferir que los carbohidratos reductores se incrementaron debido a la hidrólisis de este polímero.

Después de 67 horas de fermentación se obtienen disminuciones altamente significativas ($P < 0.001$) de los carbohidratos reductores respecto al valor obtenido después del primer tiempo de fermentación evaluado (Cuadro 10). Sin embargo, todos los valores encontrados son mayores que el obtenido en el sustrato inicial. Esto pudo deberse a que existió degradación de celulosa durante los dos tiempos de fermentación evaluados (Cuadro 14), A. niger no logró utilizar los carbohidratos reductores resultantes como para alcanzar en los productos finales valores menores que el encontrado en el sustrato inicial (Cuadro 6).

No existieron diferencias significativas entre el contenido de carbohidratos reductores de los productos finales - procedentes de los sustratos en los cuales se agregaron fuentes de nitrógeno, lo que demuestra que en estos tres sustratos se utilizó igualmente este tipo de carbohidratos. En cambio sí existió diferencia significativa ($P < 0.01$) entre el contenido de estos compuestos en los sustratos citados y el del sustrato carente de nitrógeno agregado, por lo que A. niger parece utilizar mejor estos carbohidratos al agregarse una fuente de nitrógeno. Por lo tanto, al igual que en el caso anterior, la utilización de estos carbohidratos está afectada por la cantidad y disponibilidad de la fuente de nitrógeno (32).

En el Cuadro 11 se sumarizan los valores de la concentración de hexosas. Después de 24 hrs de fermentación se observa que existió un aumento de estos carbohidratos, que probó ser altamente significativo ($P < 0.001$) en los cuatro sustratos sólidos. Esto puede deberse principalmente a la degradación de polímeros de hexosas por el moho. Un polímero de tal naturaleza es la celulosa que se ve disminuída en los cuatro sustratos (Cuadro 14), debido a que A. niger posee enzimas capaces de degradarla (4,5,34,39,59).

En el sustrato que contenía la mayor concentración de nitrógeno agregado se observó (Cuadro 11) que existió el menor aumento de la concentración de hexosas, existiendo dife-

rencia altamente significativa ($P < 0.001$), con los demás sustratos sólidos. Esto puede deberse a que A. niger utilizó con mayor facilidad las hexosas presentes en este sustrato, porque este moho utiliza hexosas y dihexosas dependiendo de la cantidad y disponibilidad de nitrógeno presente en el sustrato. Por lo mismo, a mayor disponibilidad y/o cantidad de nitrógeno, mayor utilización de estos carbohidratos (30,32).

Después de 67 hrs de fermentación las concentraciones de hexosas disminuyen significativamente ($P < 0.001$) en los cuatros sustratos, al compararla con las concentraciones encontradas a las 24 hrs. También existen diferencias significativas -- ($P < 0.01$) entre sí notándose que el sustrato que contenía la mayor concentración de nitrógeno agregado se obtuvo la mayor disminución. Las razones de estos resultados pueden ser las mismas que fueron expuestas anteriormente.

Hay que hacer notar que las concentraciones de los carbohidratos reductores y de las hexosas difieren entre sí -- (Cuadro 6, 10 y 11), y considerando que las hexosas y dihexosas poseen poder reductor (44), los resultados obtenidos deberían de ser similares. Pudo haber influido en esto la sensibilidad de los métodos utilizados para las determinaciones, ya que en el método utilizado para medir la concentración de hexosas se refiere que reaccionan igual los monosacáridos y los disacáridos de estas (33). En cambio, en el método utili-

zado para medir la concentración de carbohidratos reductores, se mencionan que los disacáridos reaccionan, pero en menor proporción que los monosacáridos (20). Como existe evidencia de la degradación de celulosa por el moho, se asume que existen productos de hidrólisis de ésta (celobiosa) en las determinaciones realizadas.

Además, de los problemas en la metodología se debe tomar en cuenta las reacciones que pudieran haberse llevado a cabo en los sustratos evaluados, ya que los grupos amino de los aminoácidos, sobre todo de los básicos (21,28), reaccionan con los grupos carbonilo de los carbohidratos formando glucosilaminas (reacción de Maillard); esta reacción no requiere de condiciones estrictamente especiales (21,23,28). Al formarse este compuesto el grupo carbonilo perdería su poder reductor (21,44).

Las pentosas (Cuadro 12) aumentan su valor en el producto fermentado, después de 24 y 67 hrs del proceso, con respecto al valor inicial. Este aumento puede estar influenciado por una disminución en la concentración de otros carbohidratos, dado que los datos se informan en forma porcentual respecto al producto final.

Como puede observarse en el Cuadro 13, la concentración de cetosas en los cuatro sustratos sólidos tuvo una disminu-

ción altamente significativa después de los dos tiempos de fermentación. El descenso alcanzó mayor significancia después de 24 hrs de fermentación. Después del segundo tiempo del proceso, se observa un aumento significativo ($P < 0.01$) en los cuatro sustratos, respecto al valor encontrado en el primer tiempo de fermentación. Esto pudo deberse no a un aumento en sí de cetosas, sino a la disminución de la concentración de azúcares, dado que los datos se informan en forma porcentual respecto al producto final.

La concentración de celulosa descendió en los cuatro sustratos evaluados (Cuadro 14). Este descenso fue altamente significativo ($P < 0.001$) después de los dos tiempos de fermentación. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los contenidos de los diferentes sustratos, ya que la celulosa disminuyó más en el sustrato que contenía la concentración estándar de nitrógeno agregada. El descenso de celulosa se vio influido también por el tiempo de fermentación, porque a mayor tiempo del proceso, menor cantidad de celulosa en todos los productos. Como se mencionó en párrafos anteriores, A. niger tiene la capacidad de producir celulasas, enzimas que degradan la celulosa, y ésta es la causa de que ocurra este descenso en la concentración de este polímero de hexosas que se encuentra presente en la pulpa de café (4,5,37,39).

La hemicelulosa (Cuadro 14) aumentó significativamente ($P < 0.001$) en los cuatro sustratos, tanto después de 24 como de 67 hrs de fermentación, observándose mayor aumento en el segundo tiempo del proceso. Esto puede deberse no propiamente a un aumento de la concentración en sí, sino a la disminución de otros componentes de la pared celular, como la fibra neutro y ácido detergente, ya que la hemicelulosa se calcula a partir de estos resultados (62,63,64).

Los contenidos de fibra neutro detergente de los diferentes sustratos (Cuadro 14), presentaron diferencias sustanciales. Después de 24 hrs de fermentación, los sustratos que contenían urea y sulfato de amonio presentaron una disminución altamente significativa ($P < 0.001$) con respecto al valor inicial, mientras en el sulfato carente de nitrógeno agregado, y en el que únicamente se agregó urea, no se obtuvo disminución significativa. A las 67 hrs de fermentación se obtuvo disminución significativa ($P < 0.001$) en el contenido de este tipo de fibra en los sustratos que contenían urea y sulfato de amonio, con respecto al valor del sustrato inicial, pero no con respecto a los valores obtenidos a las 24 hrs de fermentación. En los restantes sustratos no existieron cambios estadísticamente significativos.

El aumento relativo de fibra neutro detergente en los sustratos que contienen urea y sulfato de amonio, después de 67 hrs de fermentación con respecto a los valores obtenidos a las 24 hrs, pudo deberse a un aumento del contenido celular de la pulpa de café, ya que de la determinación de fibra neutro detergente se obtiene el contenido celular de la misma y en éste va incluido el valor de proteína. Como ésta aumenta en los sustratos que contienen mayor cantidad de sales de nitrógeno (49,50) el contenido celular y orgánico también se ve afectado (63).

La fibra ácida detergente (Cuadro 14), o específicamente el contenido de fibra de la pulpa de café, disminuyó considerablemente después de 24 y 67 hrs de fermentación. El tiempo de fermentación influye en la disminución de la fibra, ya que a mayor tiempo del proceso se obtuvo más descenso de la misma en los cuatro sustratos. Existieron diferencias -- significativas ($P < 0,01$) entre los diversos sustratos, obteniéndose los menores valores en el sustrato que contenía más cantidad de nitrógeno. Esto puede deberse a que el crecimiento de A. niger y el tiempo de fermentación influyen en la degradación de la pulpa. Este fenómeno también se ha informado en fermentaciones anaeróbicas de la pulpa (15,47) y en otro estudio sobre la fermentación sólida de la misma (49).

Otro componente de la pared celular de la pulpa de café es la lignina, el contenido de la cual en los diversos sustratos aumentó con el tiempo de fermentación. Esto pudo deberse a la disminución de otros componentes celulares, porque los resultados se informan en forma porcentual con respecto al producto final.

e. Relación entre la utilización de carbohidratos, por *A. niger*, rendimiento en síntesis proteica y tipo de fuente de nitrógeno.

1. Carbohidratos solubles totales:

La relación entre carbohidratos solubles totales, pH y el crecimiento de *A. niger* en el sustrato carente de nitrógeno agregado (Gráfica 1), resultó ser una relación negativa. Esto nos indica que existió un descenso en el contenido de carbohidratos al aumentar el pH, el crecimiento del moho y el tiempo de fermentación, aunque el crecimiento y la utilización de estos carbohidratos es menor que en los demás sustratos estudiados. Esto puede deberse a que *A. niger* utilizó el nitrógeno disponible en la materia prima, como lo es posiblemente la cafeína de la pulpa de café (10.49), y éste resultó ser no solo menor en cantidad sino probablemente de menor disponibilidad que el agregado a los otros sustratos, por lo que fue insuficiente para soportar un crecimiento adecuado. La velo-

cidad de utilización de carbohidratos solubles en el sustrato sin nitrógeno agregado es menor, debido posiblemente a que las sales nitrogenadas y la disponibilidad de las mismas están íntimamente ligadas a la utilización de carbohidratos (30,32).

La relación de pH, crecimiento y utilización de carbohidratos solubles en los sustratos que contenían sales de nitrógeno agregadas a distintas concentraciones, o supresión de alguna de ellas, muestran una pendiente negativa (Gráficas 2-7). Esto se debe a un aumento del crecimiento de A. niger y, por lo tanto, a una disminución de la concentración de -- carbohidratos solubles en los tres sustratos. Esta relación alcanzó un mayor nivel de significancia ($P < 0.01$), después de 67 hrs de fermentación (Gráficas 3,5,7). Indiscutiblemente la utilización de carbohidratos es mayor en el sustrato que contiene la más alta cantidad de nitrógeno (Gráficas 6,7), siguiéndole el que únicamente contenía agregado de urea (Gráficas 4,5), dado que existió diferencia significativa ($P < 0.05$) entre éste y el que contiene sulfato de amonio y urea agregados a la mitad de la concentración estándar (Gráficas 2,3) (30,32).

Dado que el pH está directamente relacionado con el crecimiento de A. niger, el mismo puede utilizarse para evaluar

la utilización de carbohidratos sin necesidad de conocer el rendimiento obtenido en la fermentación o crecimiento de A. niger (49).

2. Carbohidratos reductores:

La relación entre el contenido de carbohidratos reductores y crecimiento de A. niger después de 24 hrs de fermentación, resultó ser positiva en tres de los sustratos estudiados (Gráficas 8,10,12). Esto se considera debido a que en éstos el crecimiento de A. niger fue a menor velocidad que a la que se efectuaba el aumento de la concentración de carbohidratos reductores, por degradación de polímeros como la celulosa. En cambio, en el sustrato que contenía mayor concentración de nitrógeno, sí existió una relación negativa, lo que nos indica que la utilización de carbohidratos reductores se ve influenciada por la cantidad de la fuente de nitrógeno agregada (30,32).

Después de 67 hrs de fermentación, la relación de carbohidratos reductores y crecimiento de A. niger es negativa en los cuatro sustratos; esto nos indica que el tiempo de fermentación influye directamente en la utilización de los mismos.

3. Hexosas:

La relación entre el contenido de hexosas y crecimiento de A. niger registrado en los diferentes productos resultó -

ser negativa en los cuatro sustratos, a los dos tiempos de fermentación estudiados (Gráficas 16-22). Esto sugiere que las hexosas fueron el tipo de carbohidratos que con mayor facilidad utilizó el moho (30).

X. CONCLUSIONES

1. La concentración, naturaleza y disponibilidad de los compuestos nitrogenados, presentes o agregados al sustrato en fermentación sólida, interviene directamente en la eficiencia de utilización de carbohidratos por A. niger.
2. Las hexosas fueron los carbohidratos mejor utilizados por A. niger en los cuatro sustratos, influyendo directamente la concentración de nitrógeno en el sustrato sobre el grado de utilización de estos carbohidratos.
3. A. niger es capaz de crecer en pulpa de café como única fuente de carbono, sin agregado de ninguna sal de nitrógeno, aunque su crecimiento no es tan rápido y/o eficiente como cuando se agregan sales de nitrógeno al sustrato. Lo anterior sugiere que el moho utiliza los compuestos de nitrógeno propios de la pulpa de café, como puede ser el nitrógeno de la cafeína.
4. A. niger al degradar la celulosa de la pulpa de café sometida a procesos de fermentación sólida, y disminuyendo su porcentaje de fibra, origina un producto fermentado - que posee mejores características para ser usado en la alimentación animal.

5. El tiempo adecuado para obtener una pulpa de café con mejores características de digestibilidad parece ser 67 hrs, en base a los datos de este estudio.

6. La determinación de pH puede ser utilizada para establecer el grado de crecimiento de A. niger (o rendimiento de la fermentación sólida) en este tipo de fermentación.

XI. RECOMENDACIONES

1. Identificar las hexosas, pentosas y cetosas presentes en la pulpa de café, para tener mejores conocimientos de la composición química de la misma.
2. Realizar estudios para establecer cual es el mecanismo que utiliza A. niger para su crecimiento en sustratos - como la pulpa de café, sin el agregado de sales nitrogenadas.
3. Incluir en los estudios sugeridos arriba a las levaduras capaces de utilizar cafeína como única fuente de nitrógeno (10,65) en sistemas de fermentación sólida en pulpa de café, para establecer comparación de rendimiento en síntesis proteica, y utilización de carbohidratos con A. niger.
4. Desarrollar sistemas viables para llevar a cabo fermentaciones sólida de la pulpa de café en grandes cantidades, para así contribuir a la decontaminación ambiental que ésta causa. Tanto este estudio como otros (49) han establecido el beneficio que representa para la utiliza-

ción de la pulpa como alimento animal, aumentando su contenido proteínico y disminuyendo los factores que afectan la digestibilidad del material.

XII. REFERENCIAS

1. Aguirre, B.F. "La utilización industrial del grana de café y sus subproductos". Guatemala, Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial. (Investigaciones Tecnológicas de ICAITI no.1). 1966.
2. Association of Official Agricultural Chemists, Official - Methods of Analysis. 9th ed. Washington, D. C. Association of Official Agricultural Chemists. 1960.
3. Bajrachrya, R., and R.E. Mudgett. "Effects of controlled gas environments in solid substrates fermentations of rice". Biotechnology and Bioengineering, 22: 2219-2235. 1980.
4. Barras, D.R., A.E. Moore and B.A. Stone. "Enzyme substrate relationships among B-glucan hydrolases". IN: Cellulases and their applications. Robert F. Gould. ed. American Chemical Society Publications. 1969.
5. Basu, C.N. and S.N. Ghose. "The production of cellulase by fungi on mixed cellulosic substrates". Canadian J. Microbiology, 6: 265-282. 1960.
6. Blumenthal, Harold. "Carbohydrate Metabolism. 1. -- Glycolysis". In: The fungi and advances treatise. ed. Sussman, A.S. Vol.I. Academic Press, New York-London. 1965.
7. Bonnier, G. Bioestadística. (Trad. por José Sánchez Guillén). Zaragoza, España. Editorial Acribia. 1966.
8. 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.
9. _____. "Factores antifisiológicos en la pulpa de café". En Braham, J.E. y R. Bressani. eds. Pulpa de café, composición, tecnología y utilización. (Ottawa, Canadá. International Development Research Centre, 1978).
10. Calderón Geraldina E. Estudios sobre el posible mejoramiento químico nutricional de la pulpa de café por fermentación oxidativa. Tesis (Licenciatura Químico Biólogo). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala, 1981. 72p.

11. Calle, V.H. "Producción de gas combustible por fermentación metánica de la pulpa de café". Bol. Inf., (Cenicafé, Chichiná) 50: 22-27. 1965.
12. _____ . "Propagación de microorganismos alimenticios de la pulpa de café y mucílago de café". Bol. Inf., (Cenicafé, Chichiná) 6: 198-205. 1965.
13. _____ . "Proceso industrial para propagación de levaduras". Federación Nacional de Cafetaleros de Colombia. Centro Nacional de Investigaciones de Café. Chichiná, Colombia. 1974.
14. Compaire, C. Quesos, tecnología y control de calidad. 9a. Edición. Madrid. Publicaciones de Capacitación Agraria. 1969.
15. Daqui, L. E. Características químicas y nutricionales de la pulpa de café ensilada con pasto napier y planta de maíz. Tesis (Magister Scientifical). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. INCAP/CESNA. Guatemala, 1975. 55p.
16. Dishe, Z.E. "A new spectrophotometric method for detection and determination of keto sugars and trioses". J. Biol. Chem., 192: 583-586. 1951.
17. Dubois, M., D.A. Gilles and J. A. Hamilton. "Colorimetric method for detection of sugars and related substances". Analytical Chemistry, 28: 330-354. 1956.
18. Elías, Luiz G. "Composición química de la pulpa de café y otros subproductos". En Braham, J.E. y R. Bressani. eds. Pulpa de café, composición, tecnología y utilización. (Ottawa, Canadá. International Development Research Centre, 1978).
19. Frazier, W.C. Microbiología de los alimentos. 2da. Edición, (Trad. por Victoria Medarde). Zaragoza, España. Editorial Acribia. 1976.
20. Gail, L. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars". Analytical Chemistry, 31: 426-428. 1959

21. Garard, I. Introductory Food Chemistry. 2nd Edition Westport, Connecticut. Avi Publishing Comp. Inc. 1980.
22. Gray, W. D. The use of fungi as food and in food processing. London, Butterwords. CRC Press. -- 1970.
23. Goldblith, S. A. Introducción a la Bioquímica de los alimentos, (Trad. por Bernabé Sanz). Barcelona. Ediciones Omega S.A. 1967.
24. Gómez Brenes, R. "Procesamiento de la pulpa de café: Tratamientos químicos". En Braham, J.E. y R. Bressani. eds. Pulpa de café, composición, tecnología y utilización. (Ottawa, Canadá, International Development Research Centre, 1978).
25. _____, G. Bendaña, C.E. Amezquita, J. E. Braham y R. Bressani. "Estudio comparativo 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 Centro América y Panamá (INCAP), Informe Anual. Guatemala, 1977.
26. Haley, L.D. and C.S. Callaway. Laboratory Methods in Medical Micology. 4th edition. Public Health Service Center for Diseases Control. Atlanta, Georgia. 1978.
27. Han, Y.W. and A.W. Anderson. "Semi-solid fermentation of ryegrass". Appl. Microbiology, 30: 930-934. 1975.
28. Heimann, W. Fundamentals of Food Chemistry. 2nd edition. Westport, Connecticut. Avi Publishing Comp. Inc. 1980.
29. Hesseltine, C.N. and K. Shigasaki. "Miso III. Pure -- culture fermentation with Saccharomyces rouxii". Appl. Microbiology, 9: 515-518. 1961.

30. Imrie, F.K. and R. C. Righlato. "Production of microbial protein from carbohydrate wastes in developing ---- countries". In: Food From Waste, eds. Brich, Parker and Morgan, London. Applied Science Publishers Ltd. 1976.
31. Jaffé, W. y D. S. Ortiz. "Notas sobre el valor alimenticio de la pulpa de café". AGRO (Venezuela), 23: 31-37. 1952.
32. Jørgensen, A. Microbiología de las fermentaciones industriales. (Trad. por Dr. Federico Klein). Zaragoza, España. Editorial Acribia. 1969.
33. Klein, B. "New color reagent for determination of hexoses: Determination of glucose in blood serum". Analytical Chemistry, 25: 771-774. 1953.
34. Krishna, C.R. and B.A. Stone. "Fractionation of B-glucosidases from Aspergillus niger". Biochem. J., 78: 715-725. 1961.
35. Lamo, P.R. "Bioconversion of cassava processing waste from fungal biomasa production". Colataea do Instituto de Tecnologia do Alimentos, 10: 144. 1979.
36. Lehninger, A.L. Bioquímica. 2da. Edición, (Trad. por Dr. Fernando Calvet). Barcelona, España. Ediciones Omega, S.A. 1978.
37. Li, L.H. "Fractionation of B-glucosidases and related extracellular enzymes from Aspergillus niger". Appl. Microbiology, 11: 320-325. 1963.
38. Linderfelser, L.A. and A. Cliegler. "Solid fermentor for Ochratoxin A. Production". Appl. Microbiology, 29: 323-327. 1975.
39. Mandels, M. and E.T. Reese. "Induction of Cellulose in fungi by cellobiose". J. Bacteriology, 79: 316-324. 1960.
40. Martinelli, A. and C.W. Hesseltine. "Tempeh fermentation package and tray fermentation". Food Technol., 18: 761-765. 1964.
41. Menzies, I.S. Chomatografic and Electroforetic Techniques. Vol. I. ed Interscience Publishers Division of John Wiley & Sons. Inc. 1969.

42. Molina, M.R., G.de la Fuente, H. Gudiel y R. Bressani. "Pulpa de pergamino de café. VII. Estudios sobre la deshidratación de la pulpa de café". Turrialba, 24: 280-284, 1974.
43. _____, G.de la Fuente, M.A. Baten y R. Bressani. "Decaffeination. A process to detofy coffee pulp". J. Agr. Food. Chem., 22: 1055-1059. 1974.
44. Morrison, R.T. y R.N. Boyd. Química Orgánica. (Trad. por Peter Fiedler). Barcelona, España. Fondo Educativo Interamericano, S.A. 1973.
45. Mudgett, R.E. and R. Bajcharya. "Effects of controlled gas enviroments in microbial enhancement of plant protein recovey". Journal of Food Biochemistry, 3: 135-149. 1980.
46. Murillo, B. "Aplicación del método de fraccionamiento de paredes celulares de Van Soest en pulpa de café". En: Congreso Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Banco de Guatemala, Guatemala. 26-31 de agosto de 1974. Guatemala (Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 1974).
47. _____. "Ensilaje de la pulpa de café". En: Braham, J.E. y R. Bressani. eds. Pulpa de café, composición, tecnología y utilización. (Ottawa, Canadá. International Development Research Centre, 1978.
48. Pederson, C. Microbiology of Food Fermentations. 2nd. edition. Westport, Connecticut. Avi Publishing Co. Inc., 1979.
49. Peñaloza, W. Fermentación sólida de la pulpa de café. Tesis (Magister-Scientificae). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. 1981. 50p.
50. Raimbault, M. Fermentation en Mielie Solide, Croissance de Champignons filamentaux sus sustrat amilacé. Paris, Orstrom. 1981.
51. Raper, K.B. The genus Aspergillus. Baltimore, Maryland. The Williams & Wilkins Company. 1965.
52. Senez, J.C. "Solid fermentation of starchy substrates". Food and Nutrition Bulletin, 1: 18-21. 1979.

53. Silman, R.W. "Production of Aflatoxin in corn by a large-scale solid substrate fermentation process". Bio-technology and Bioengineering, XXI: 1299-1808. 1979.
54. _____ . "Enzyme formation during solid substrate fermentation in rotating vessels". Biotechnology and Bioengineering, XXI: 411-420. 1980.
55. Spiegler, M.R. Estadística. (Trad. por Luis Gómez). Bogotá, Colombia. McGraw-Hill. 1970.
56. Southgate, D.A. Determination of food carbohydrates. London. Applied Science Publishers. 1976.
57. Suárez de Castro, F. "Valor de la pulpa de café como abono". Boletín Informativo No. 5. Instituto Salvadoreño de Investigaciones del Café. Santa Tecla, El Salvador, C.A. diciembre, 1960.
58. Swang, H.L. "Mass production of Rhizopus oligosporus spores and their applications of tempeh fermentation". J. Food. Sci., 40: 168-170. 1965.
59. Toyama, N. "Applications of cellulase in Japan". In: Cellulases and their Applications. Robert Gould. ed. American Chemical Society Publication. 1969.
60. Tracey, M.V. "Colorimetric method of determination of pentoses in the presence of hexoses and uronic acid". Biochemical Journal, 47: 433-436. 1950
61. Urban, L.D. and N.D. Davis. "Aflatoxin formation by Aspergillus flavus". In: Aflatoxin. Godslatt, L. A. ed. New York, Academic Press. 1969.
62. Van Soest, P.J. "Use of detergents in the analysis of -- their fiber and lignin". J. Assoc. Agric. Chem. 50: 50-55. 1967.
63. _____ . "Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. The determination of plant cell wall constituyents". J. Assoc. Off. Anal. Chem., 46: 829-835. 1963.
64. _____ . "Determination of lignin and cellulose in acid detergent fiber with permaganate". J. Assoc. Off. Anal. Chem., 51: 780-785. 1958.

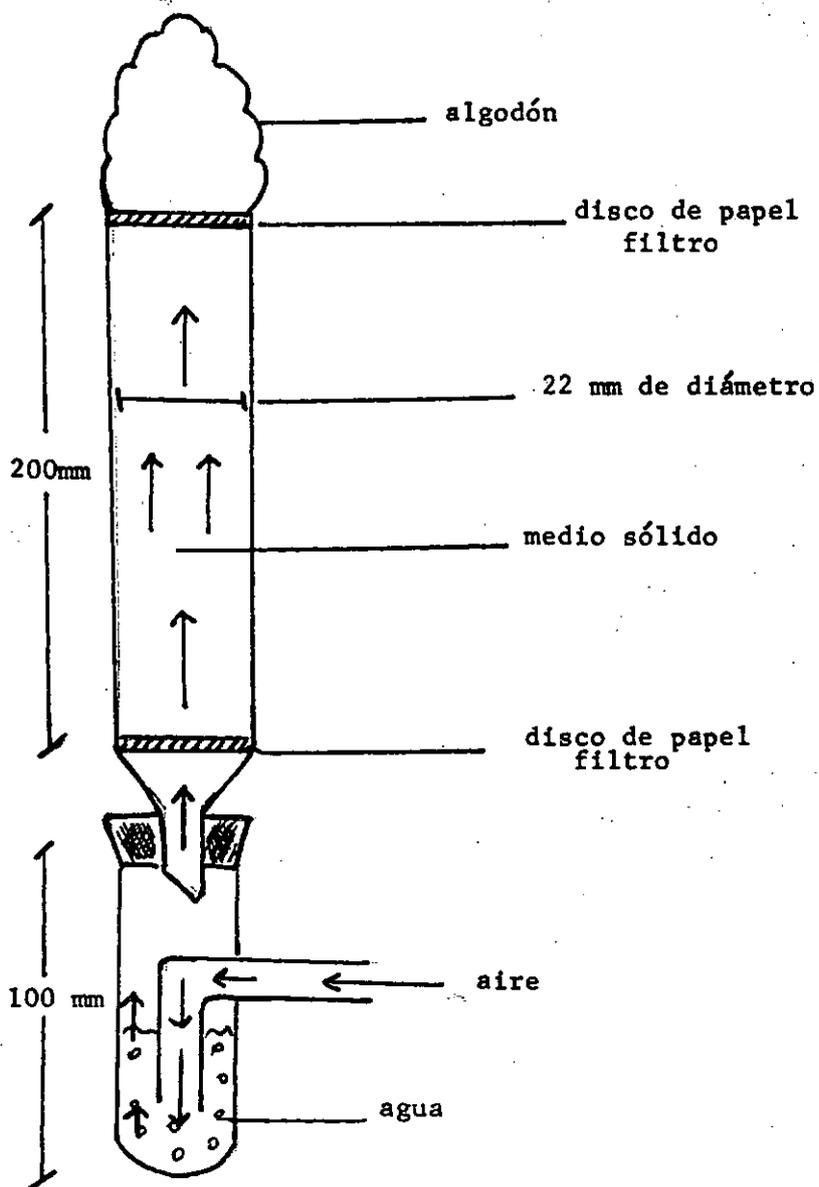
65. Villagran, L. Evaluación química de tratamientos microbiológicos anaeróbicos para reducir los factores antifisiológicos de la pulpa de café. Tesis (Licenciatura Químico Biólogo). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala, 1981. 39p.
66. Whitaker, J. "Biochemical changes occurring during the fermentation of high protein foods". Food Technol., 32: 175-179. 1978.
67. Wilfrid, J.D. Introducción al análisis estadístico. 2da. Edición, (Trad. por José Pérez). New York. McGraw-Hill. 1966.

ANEXOS

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

FIGURA 1

COLUMNA UTILIZADA PARA FERMENTACION SOLIDA



Tomado de: Raimbault (50)

CUADRO 1

PRODUCCION DE CAFE Y DISPONIBILIDAD DE LA PULPA
DE CAFE EN CENTRO AMERICA Y
PANAMA

País	Producción anual de fruto maduro (qq) 1974-1975	Disponibilidad anual de la pulpa de café (qq) 1974-1975
Guatemala	16.141,444	6.973,104
El Salvador	19.443,105	8.399,421
Honduras	5.392,701	2.329,651
Nicaragua	4.769,060	2.060,243
Costa Rica	16.141,444	6.973,104
Panamá	498,915	215,531

CIFRAS TOMADAS DE ANNUAL COFFEE STATISTICS , No. 38
1974 (Pan American Coffee Bureau),
New York

CUADRO 2

COMPOSICION QUIMICA DE LA PULPA DE CAFE
(%)

	Fresca	Deshidratada	Fermentada naturalmente y deshidratada
Humedad	76.7	12.6	7.9
Materia Seca	23.6	87.4	92.1
Extracto etéreo	0.4	2.5	2.6
Fibra Cruda	3.4	21.0	20.8
Proteínas N x 6.25	2.1	11.2	10.7
Cenizas	1.5	8.3	8.8
Extracto libre de nitrógeno	15.8	44.4	49.2

Tomado de: Elías, L. G. (18)

CUADRO 3

CONTENIDO DE AMINOACIDOS EN LA PROTEINA DE LA PULPA DE CAFE
(g/16gN)

Aminoácido	Pulpa de café	Maíz	Harina de soya	Harina de semilla de algodón
Lisina	6.8	1.7	6.3	4.5
Histidina	3.9	2.8	2.4	2.6
Arginina	4.9	3.1	7.2	11.2
Treonina	4.6	3.3	3.9	3.5
Cistina	1.0	1.0	1.8	1.6
Metionina	1.3	1.6	1.3	1.4
Valina	7.4	5.0	5.2	4.9
Isoleucina	4.2	4.3	5.4	3.8
Leucina	7.7	16.7	7.7	5.9
Tirosina	3.5	5.0	3.2	2.7
Fenilalanina	4.9	5.7	4.9	5.2
Hidroxiprolina	0.5	-	-	-
Acido aspártico	8.7	-	-	-
Serina	6.3	-	-	-
Acido glutámico	10.8	-	-	-
Prolina	6.1	-	-	-
Glicina	6.6	-	-	-
Alanina	5.4	-	-	-

Tomado de: Bressani y col. (8)

CUADRO 4

CONSTITUYENTES DE PAREDES CELULARES Y POLISACARIDOS
ESTRUCTURALES EN LA PULPA
DE CAFE
(g%)

Contenido Celular	63.3
Fibra neutra detergente	36.8
Fibra ácida detergente	34.5
Hemicelulosa	2.3
Celulosa	17.7
Lignina	17.5
Proteína lignificada	3.0
Proteína cruda	10.1
Cenizas insolubles	0.4

Tomado de: Elías, L. G. (18)

CUADRO 5

ENZIMAS PRODUCIDAS EN SISTEMAS DE FERMENTACION SOLIDA

Tipos de enzimas	Microorganismo utilizado	Aplicación en la industria
Amilasas	<u>A. oryzae</u>	Sacarificación del almidón
	<u>A. flavus</u>	Conservación de frutas
	<u>A. niger</u>	Conservación de frutas
	<u>Rhizopus</u> sp	Industria alimenticia
	<u>B. subtilis</u>	Industria alimenticia
Invertasas	<u>S. carbogensis</u>	Confitería
Proteasas	<u>A. oryzae</u> , <u>flavus</u> <u>Mucor</u> sp	Hidrólisis de la gelatina
	<u>B. subtilis</u>	Clarificación de la cerveza
Celulasas	<u>T. barungi</u>	Degradación de almidones celulolíticos
	<u>M. verrucarium</u>	Textiles
Pectinasas	<u>Aspergillus</u> sp	Clarificación de jugos de frutas
	<u>Penicillium</u> sp	Vinos
Lactasas	<u>C. pseudotropicalis</u>	Cremas de helados
Lipasas	<u>C. lypolítica</u>	Fabricación de quesos

Tomado de: Raimbault (50).

CUADRO 6

CARBOHIDRATOS SOLUBLES Y ESTRUCTURALES DE LA PULPA
DE CAFE UTILIZADA COMO SUSTRATO DE FERMENTACION
SOLIDA
(% Base Seca)

Carbohidratos Solubles Totales	14.55%
Carbohidratos Reductores	2.00%
Hexosas	10.20%
Pentosas	0.17%
Cetosas	0.98%
Celulosa	25.82%
Hemicelulosa	3.66%

CUADRO 7

AUXONOGRAMA DE CARBONO DE A. niger

Azucar	48 hrs ¹	72 hrs ¹
Manosa	-	+
Galactosa	-	-
Xilosa	-	+
Sorbosa	-	-
Rafinosa	-	-
Inulina	-	-
Sacarosa	-	-
Arabinosa	-	+
Inositol	-	-
Glucosa	++	+++
Celobiosa	+	++

¹Horas de incubación a temperatura ambiente del moho.

CUADRO 10

CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS REDUCTORES EN LOS
DIFERENTES PRODUCTOS OBTENIDOS DESPUES DE
24 y 67 HORAS DE FERMENTACION
(% Base Seca)

Sustrato	24 hrs de fermentación	67 hrs de fermentación
A	4.41' ± 0.0159	3.41' ± 0.1511
B	4.66 ± 0.3483	2.12 ± 0.1122
C	5.07 ± 0.0205	2.29 ± 0.2382
D	4.77 ± 0.1869	2.15 ± 0.1053
Pulpa	2.00	

A carente de nitrógeno agregado
B nitrógeno agregado a mitad de la concentración estándar
C únicamente urea
D nitrógeno agregado a la concentración estándar

' Media
± Desviación estándar
n = 30 en A, B, C, D.

CUADRO 11

CONTENIDO DE HEXOSAS EN LOS DIFERENTES PRODUCTOS
OBTENIDOS DESPUES DE 24 y 67 HORAS DE FERMENTACION
(% Base Seca)

Sustrato	24 hrs de fermentación	67 hrs de fermentación
A	15.34' ± 0.2336	14.81' ± 0.0612
B	15.14 ± 0.1121	12.77 ± 0.7369
C	15.65 ± 0.1750	12.44 ± 0.2849
D	13.69 ± 0.2387	11.72 ± 0.1278
Pulpa	10.20	

A carente de nitrógeno agregado
B nitrógeno agregado a mitad de la concentración estándar
C únicamente urea
D nitrógeno agregado a la concentración estándar

' Media
± Desviación estándar
n = 30 en A, B, C, D.

CUADRO 12

CONTENIDO DE PENTOSAS EN LOS DIFERENTES PRODUCTOS
OBTENIDOS DESPUES DE 24 y 67 HORAS DE FERMENTACION
(% Base Seca)

Sustrato	24 hrs de fermentación	67 hrs de fermentación
A	0.4914' ± 0.0156	0.7462' ± 0.0014
B	0.5426 ± 0.0013	0.4531 ± 0.0017
C	0.4438 ± 0.0019	0.5030 ± 0.0058
D	0.5167 ± 0.0022	0.4004 ± 0.0006
Pulpa	0.1686	

A carente de nitrógeno agregado
B nitrógeno agregado a mitad de
la concentración estándar
C únicamente urea
D nitrógeno agregado a la con-
centración estándar

' Media
± Desviación
estándar
n = 30 en A, B,
C, D.

CUADRO 13

CONTENIDO DE CETOSAS EN LOS DIFERENTES PRODUCTOS
OBTENIDOS DESPUES DE 24 y 67 HORAS DE FERMENTACION
(% Base Seca)

Sustrato	24 hrs de fermentación	67 hrs de fermentación
A	0.2495 ¹ ± 0.0007	0.3955 ¹ ± 0.0017
B	0.2746 ± 0.0024	0.5783 ± 0.0016
C	0.2097 ± 0.0044	0.5052 ± 0.0046
D	0.3363 ± 0.0021	0.4538 ± 0.0016
Pulpa	0.9791	

A carente de nitrógeno agregado
B nitrógeno agregado a mitad de
la concentración estándar
C únicamente urea
D nitrógeno agregado a la con-
centración estándar

¹ Media
± Desviación
estándar
n = 30 en A, B,
C, D.

CUADRO 14

CONSTITUYENTES DE PAREDES CELULARES Y CARBOHIDRATOS
ESTRUCTURALES DE LOS DIFERENTES PRODUCTOS OBTENIDOS
DESPUES DE 24 y 67 HORAS DE FERMENTACION
(% Base Seca)

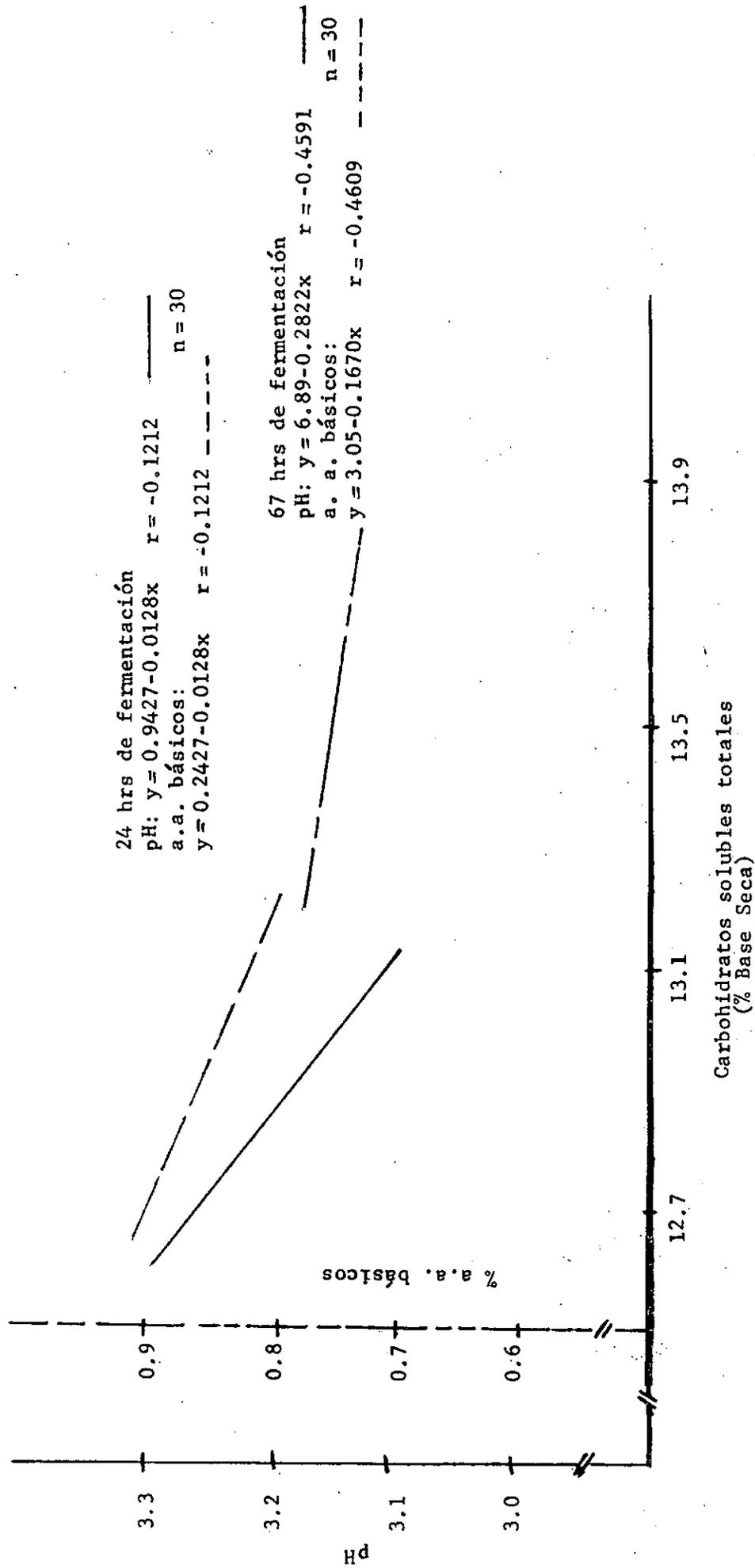
Sustrato	Fibra neutro detergente	Fibra ácido detergente	Lignina	Celulosa	Hemicelulosa
A	49.01' 49.52''	43.65' 42.67''	17.77' 18.77''	24.11' 21.10''	5.36' 7.05''
B	45.25 46.69	42.46 39.33	18.92 27.18	23.99 12.87	2.79 7.18
C	49.35 49.53	43.74 42.96	18.48 28.47	23.23 14.53	5.61 5.79
D	41.37 47.91	36.42 36.67	19.24 24.35	16.94 11.95	4.69 11.27
Pulpa	49.55	45.89	19.42	25.82	3.66

A carente de nitrógeno agregado
B nitrógeno agregado a mitad de la
concentración estándar
C únicamente urea
C nitrógeno agregado a la concen-
tración estándar

' 24 hrs de fermentación
'' 67 hrs de fermentación
n = 25 en A, B, C, D.

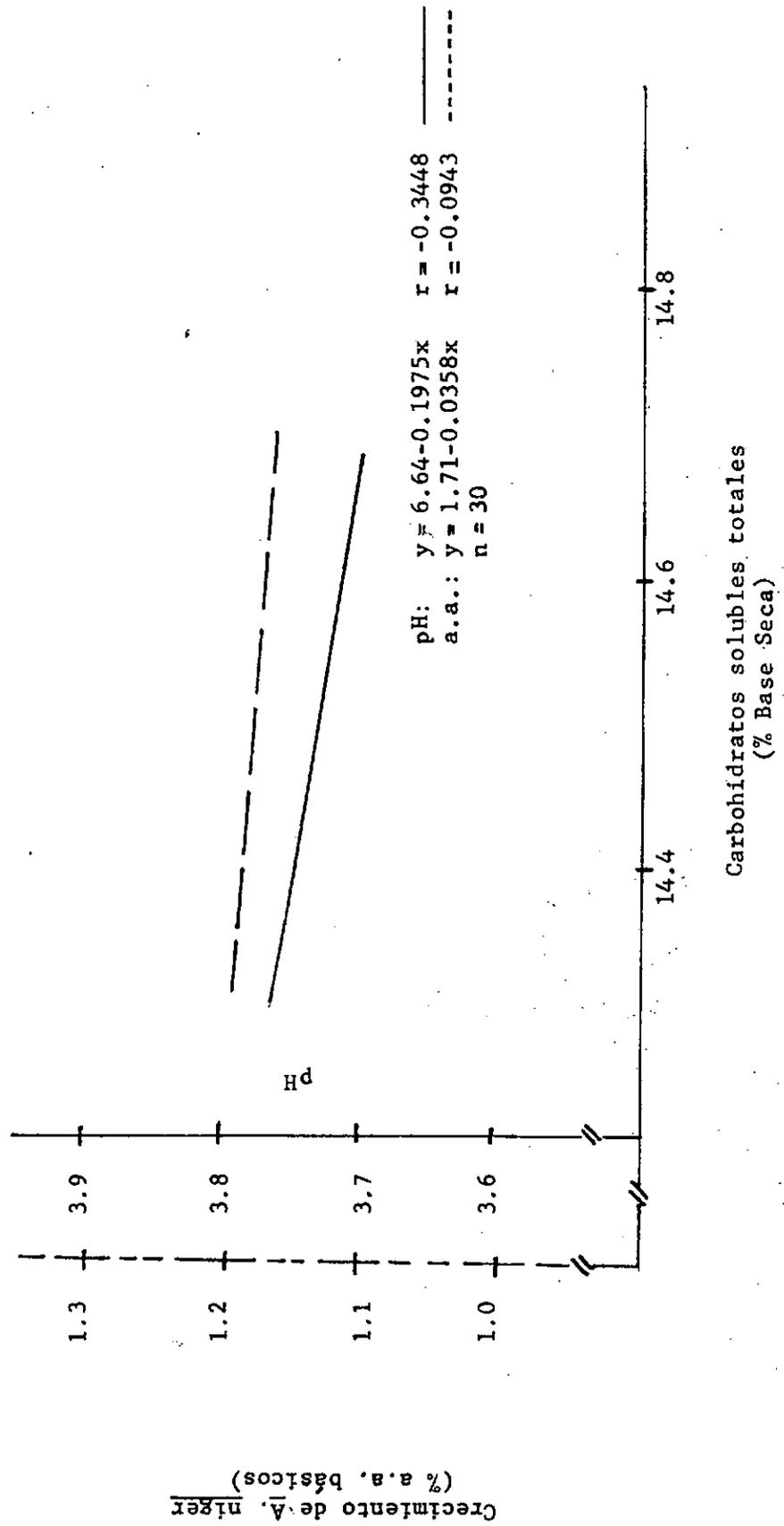
GRAFICA 1

RELACION ENTRE CARBOHIDRATOS SOLUBLES TOTALES, PH Y CRECIMIENTO DE A. niger DEL SUSTRATO
 CARENTE DE SALES DE NITROGENO AGREGADAS



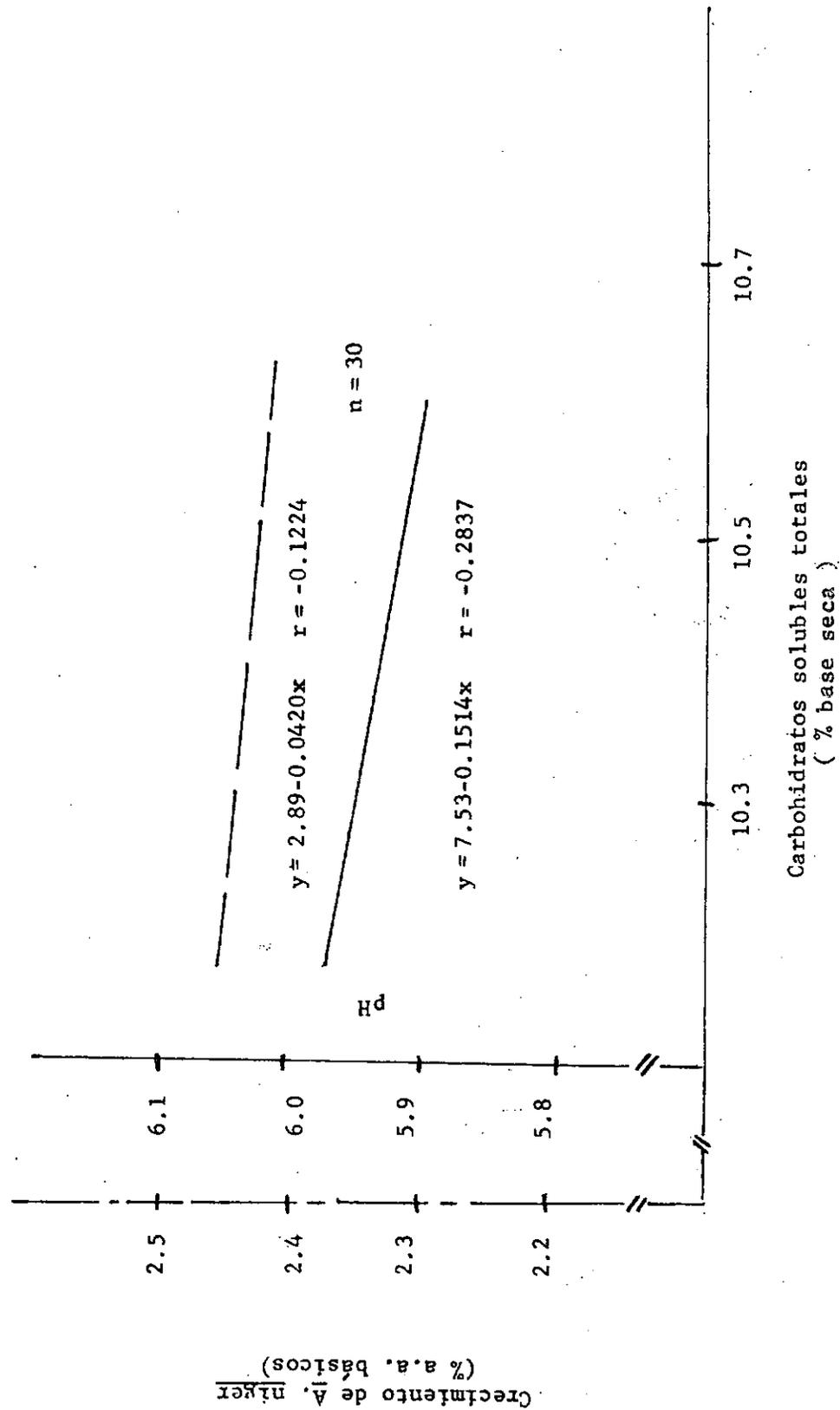
GRAFICA 2

RELACION ENTRE CARBOHIDRATOS SOLUBLES TOTALES, PH Y CRECIMIENTO DE A. niger
 DEL SUSTRATO QUE CONTIENE NITROGENO A MITAD DE LA CONCENTRACION
 ESTANDAR DESPUES DE 24 HRS DE FERMENTACION



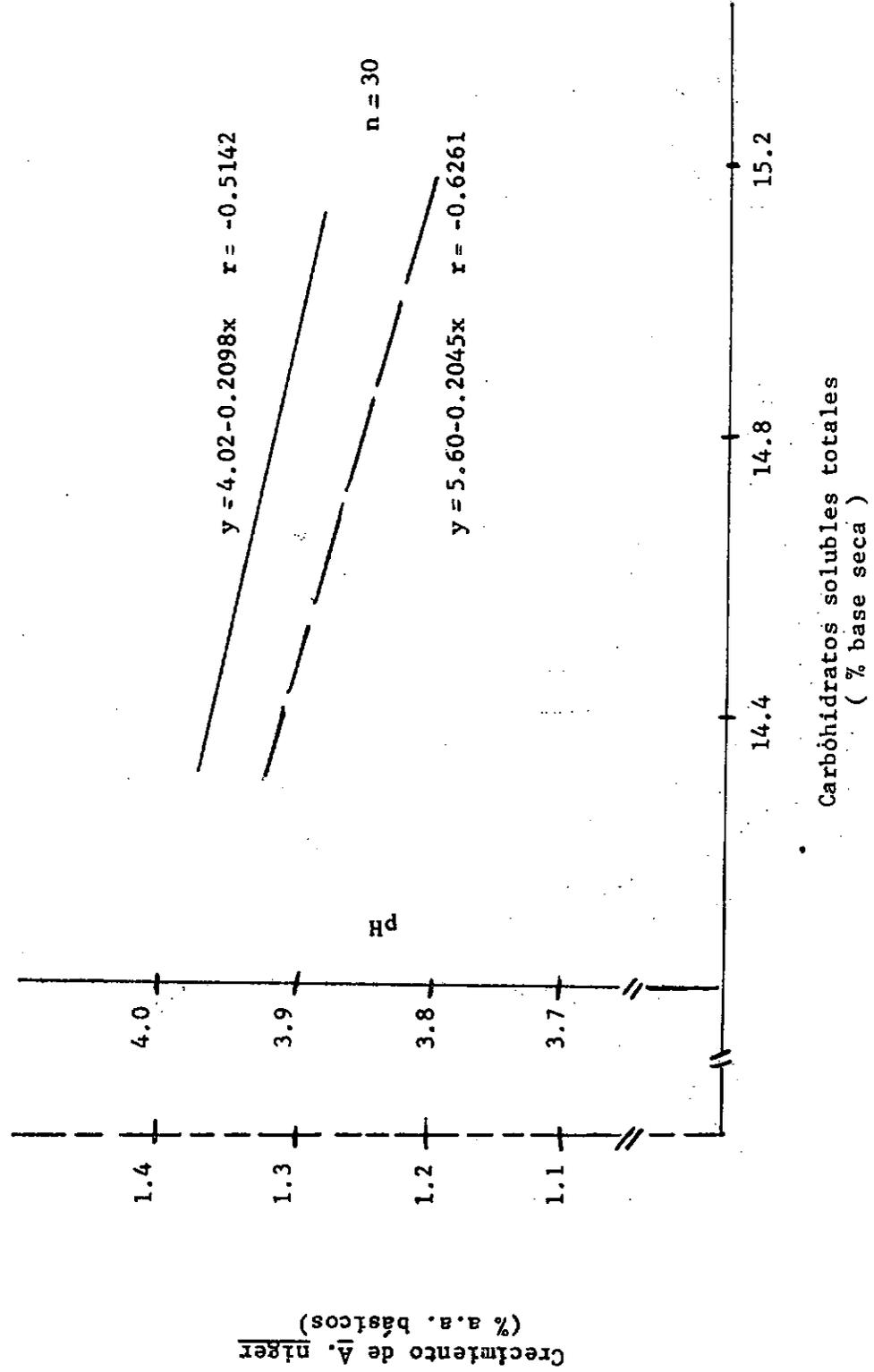
GRAFICA 3

RELACION ENTRE CARBOHIDRATOS SOLUBLES TOTALES, PH Y CRECIMIENTO DE A. niger DEL SUSTRATO QUE CONTIENE NITROGENO A MITAD DE LA CONCENTRACION ESTANDAR DESPUES DE 67 HRS DE FERMENTACION



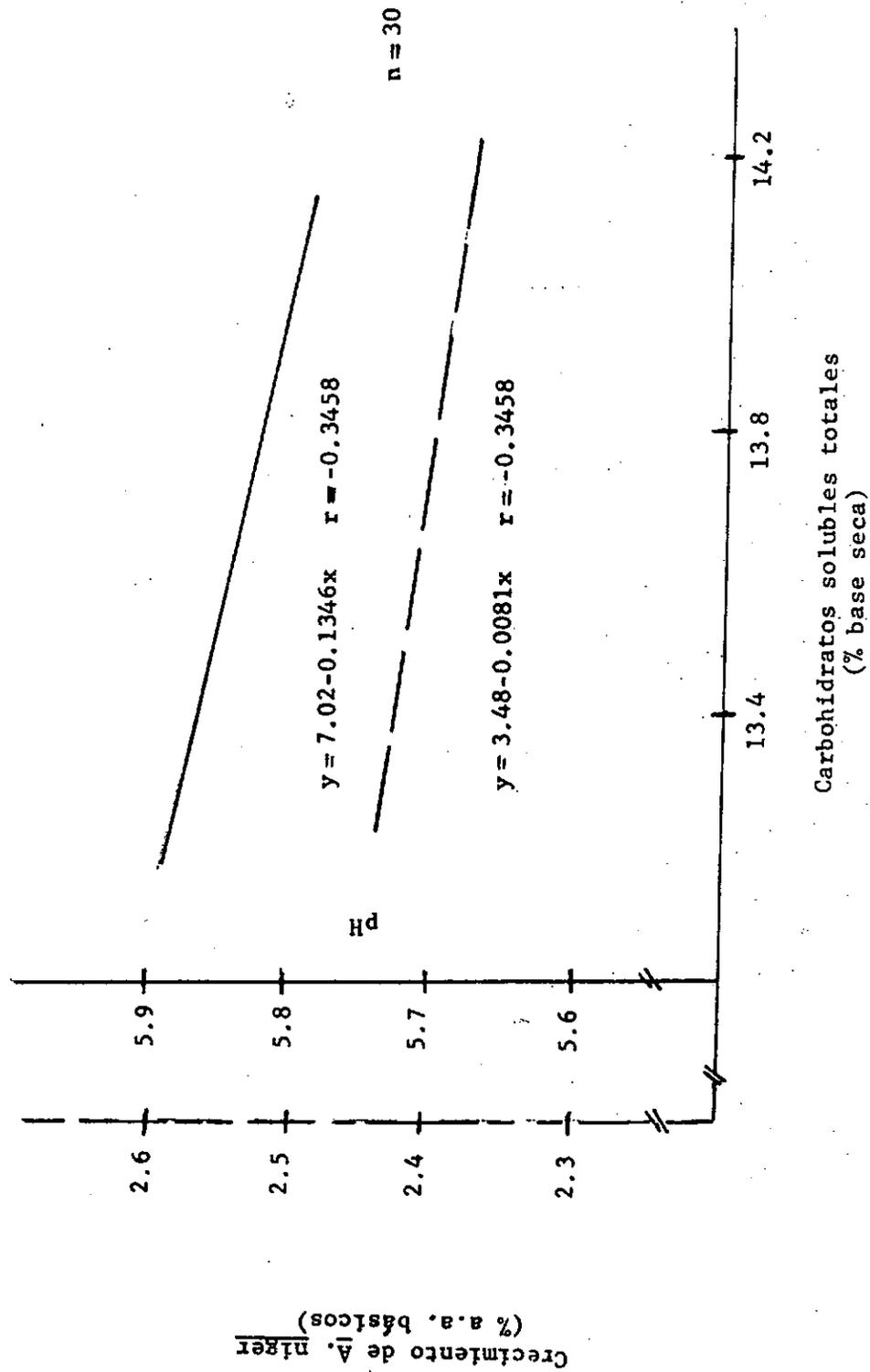
GRAFICA 4

RELACION ENTRE CARBOHIDRATOS SOLUBLES TOTALES, PH Y CRECIMIENTO DE *A. niger* DEL SUSTRATO QUE UNICAMENTE CONTIENE UREA DESPUES DE 24 HORAS DE FERMENTACION



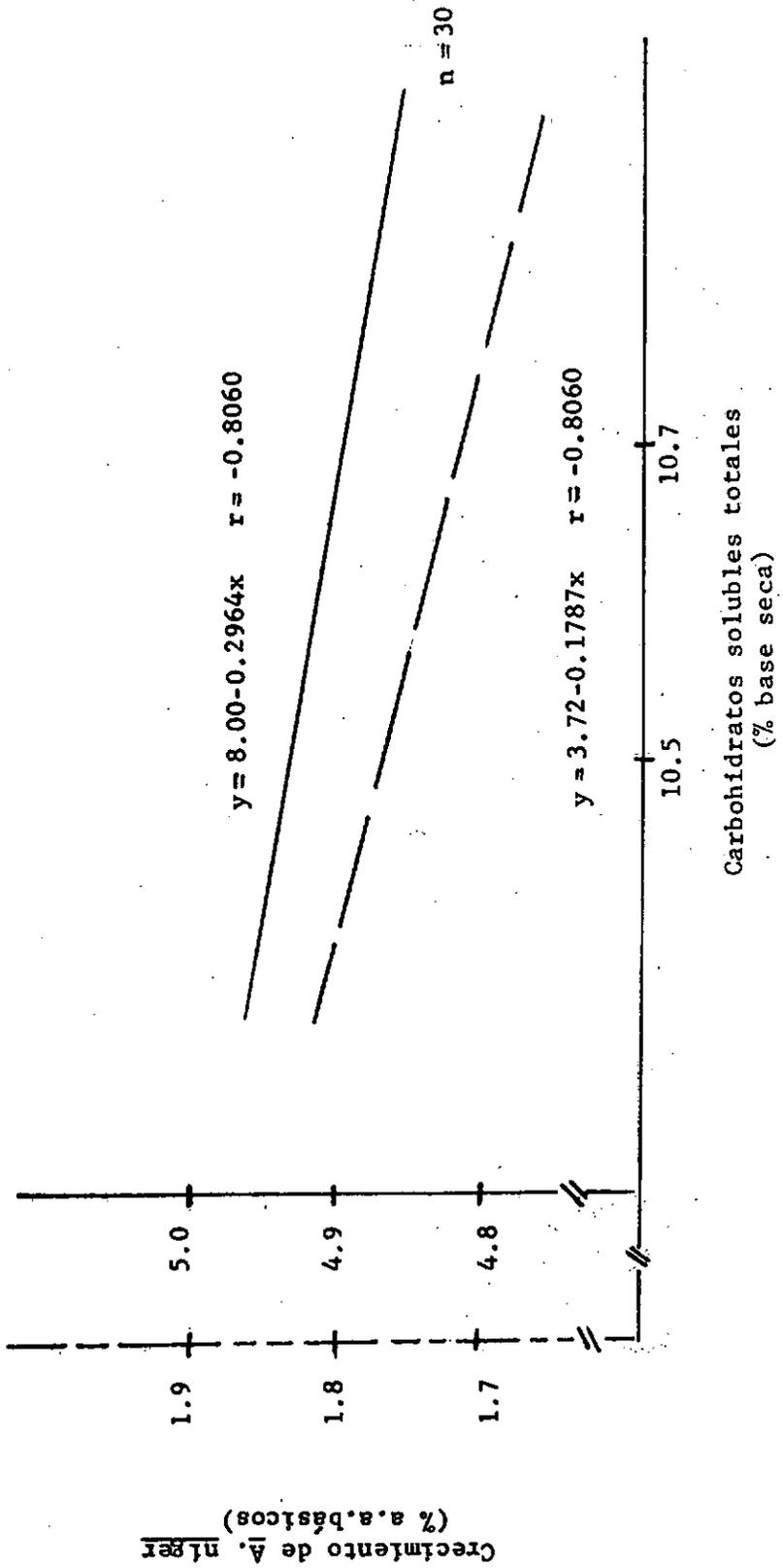
GRAFICA 5

RELACION ENTRE CARBOHIDRATOS SOLUBLES TOTALES, PH Y CRECIMIENTO DE A. niger DEL SUSTRATO QUE UNICAMENTE CONTIENE UREA DESPUES DE 67 HORAS DE FERMENTACION



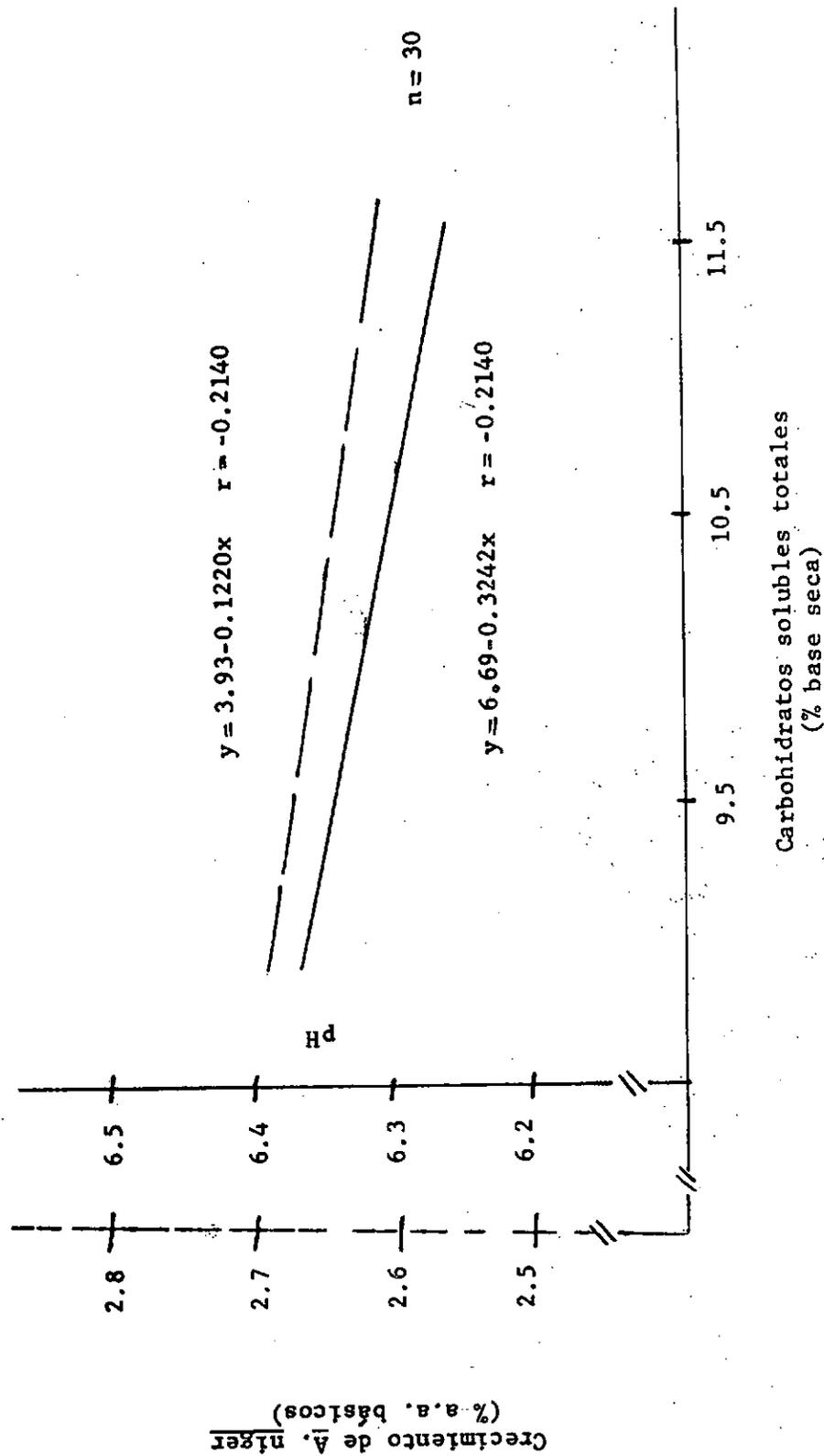
GRAFICA 6

RELACION ENTRE CARBOHIDRATOS SOLUBLES TOTALES, PH Y CRECIMIENTO DE
A. niger DEL SUSTRATO QUE CONTIENE LA CONCENTRACION
ESTANDAR DE NITROGENO DESPUES DE
24 HRS DE FERMENTACION



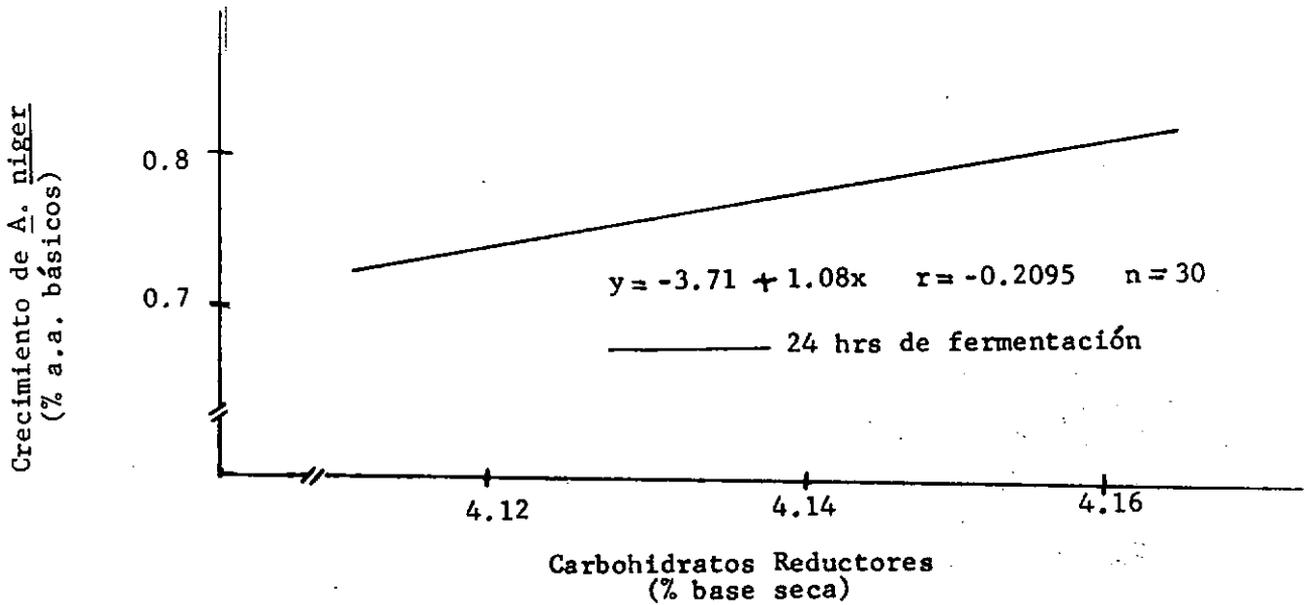
GRAFICA 7

RELACION ENTRE CARBOHIDRATOS SOLUBLES TOTALES, PH Y CRECIMIENTO DE *A. niger* DEL SUSTRATO QUE CONTIENE LA CONCENTRACION ESTANDAR DE NITROGENO DESPUES DE 67 HRS DE FERMENTACION

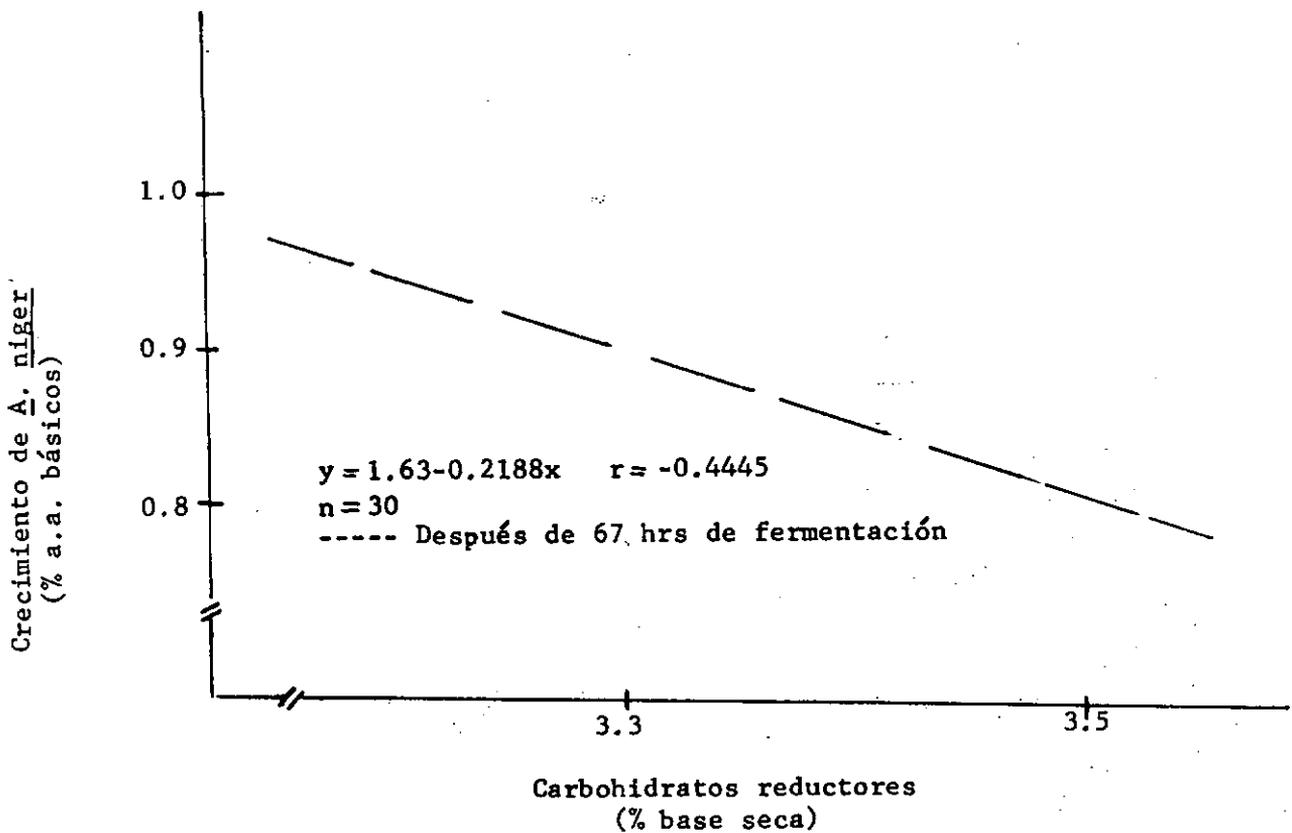


GRAFICA 8

RELACION ENTRE CARBOHIDRATOS REDUCTORES Y CRECIMIENTO DE A. niger
DEL SUSTRATO CARENTE DE NITROGENO AGREGADO

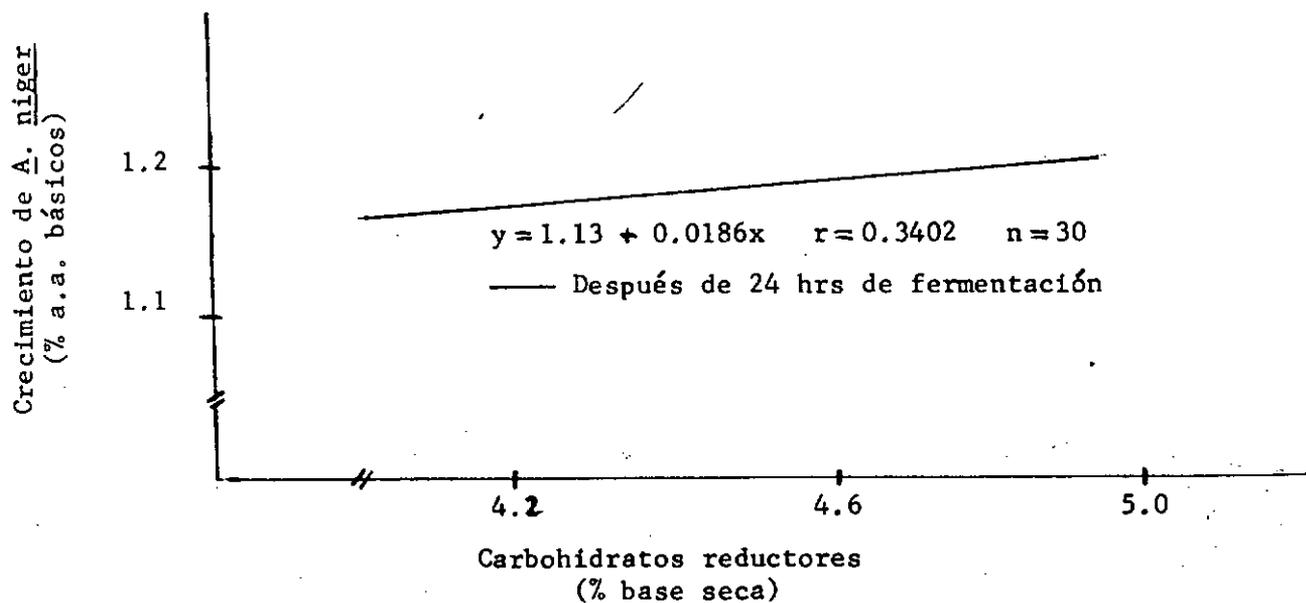


GRAFICA 9

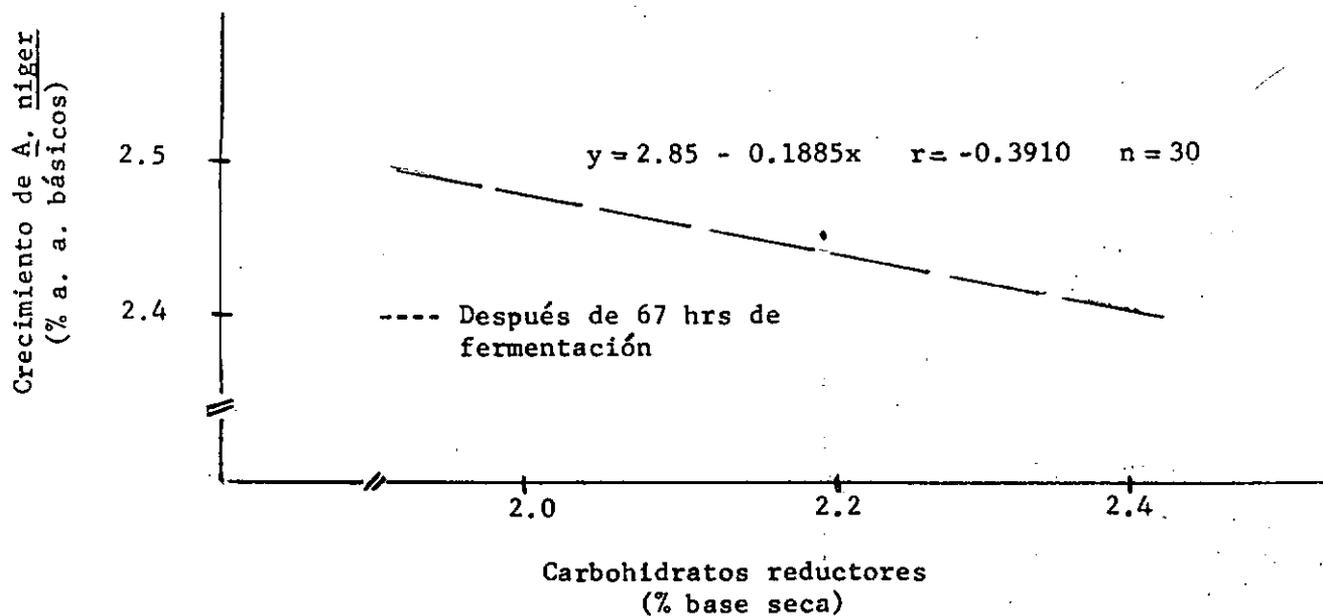


GRAFICA 10

RELACION ENTRE CARBOHIDRATOS REDUCTORES Y CRECIMIENTO DE A. niger
DEL SUSTRATO QUE CONTIENE NITROGENO A LA MITAD DE LA
CONCENTRACION ESTANDAR

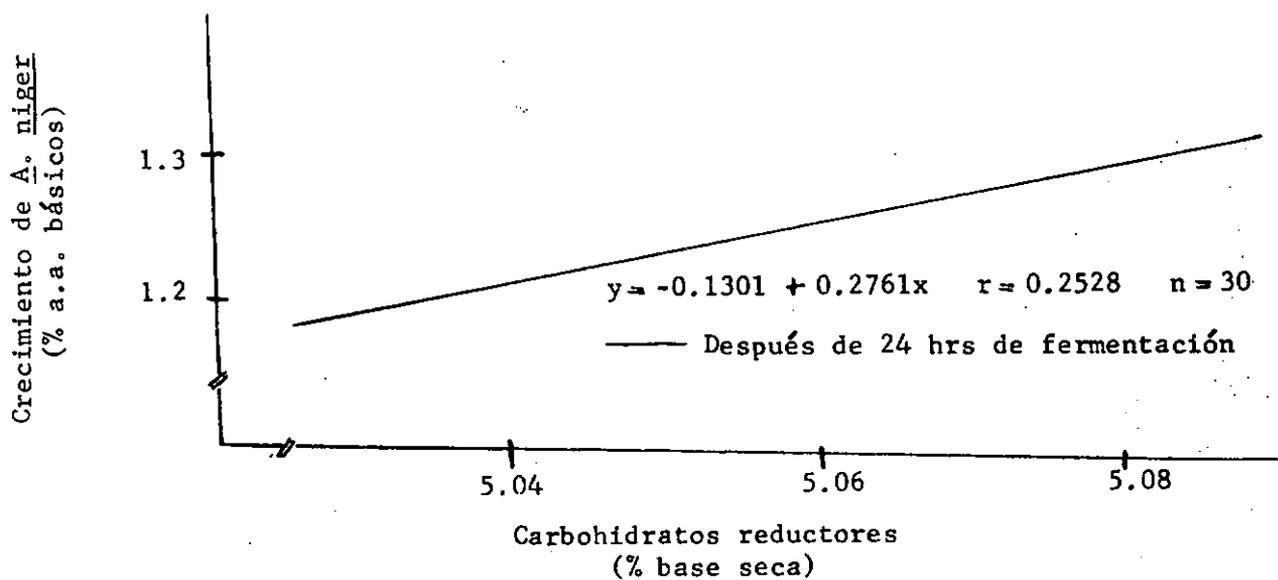


GRAFICA 11

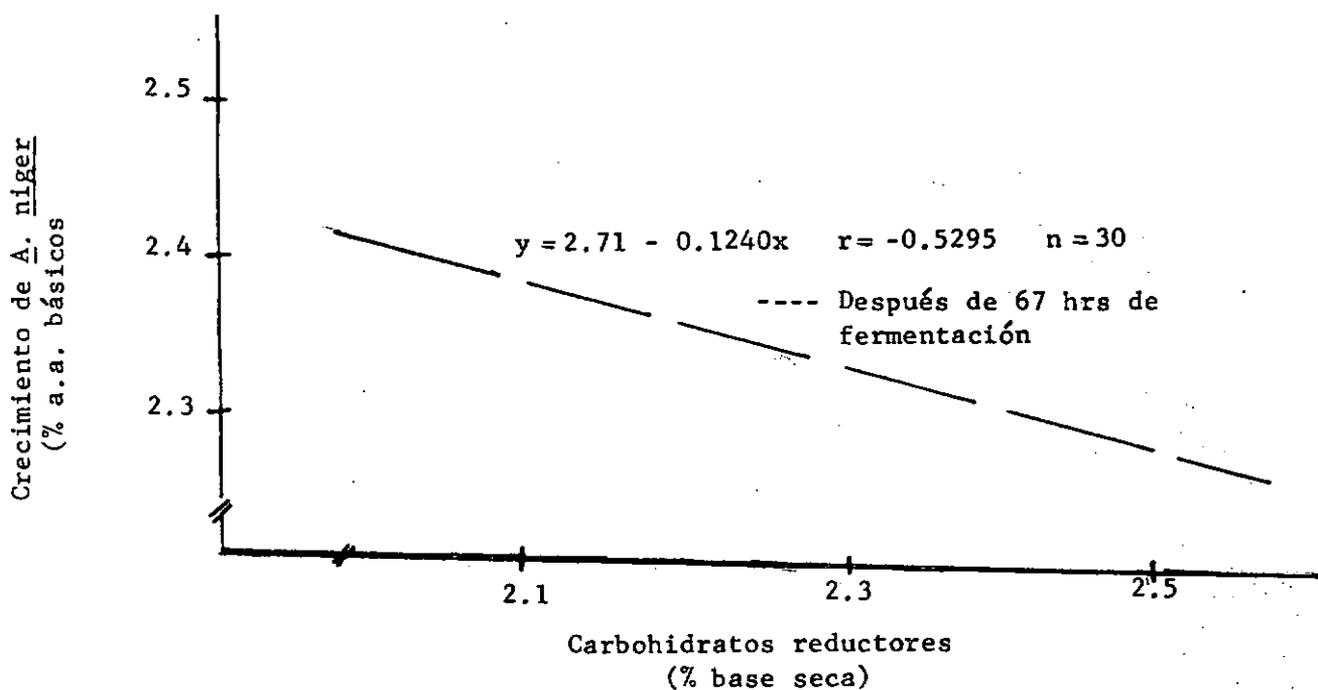


GRAFICA 12

RELACION ENTRE CARBOHIDRATOS REDUCTORES Y CRECIMIENTO DE A. niger
DEL SUSTRATO QUE CONTIENE UNICAMENTE UREA

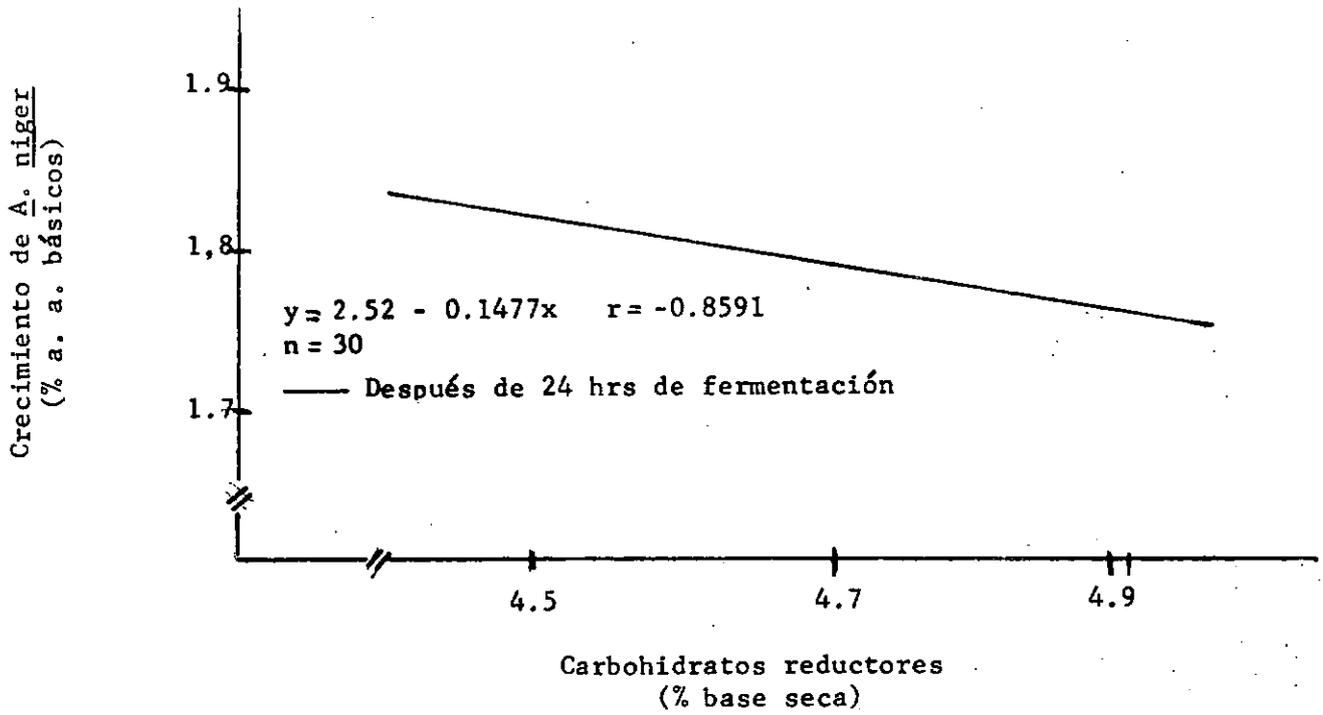


GRAFICA 13

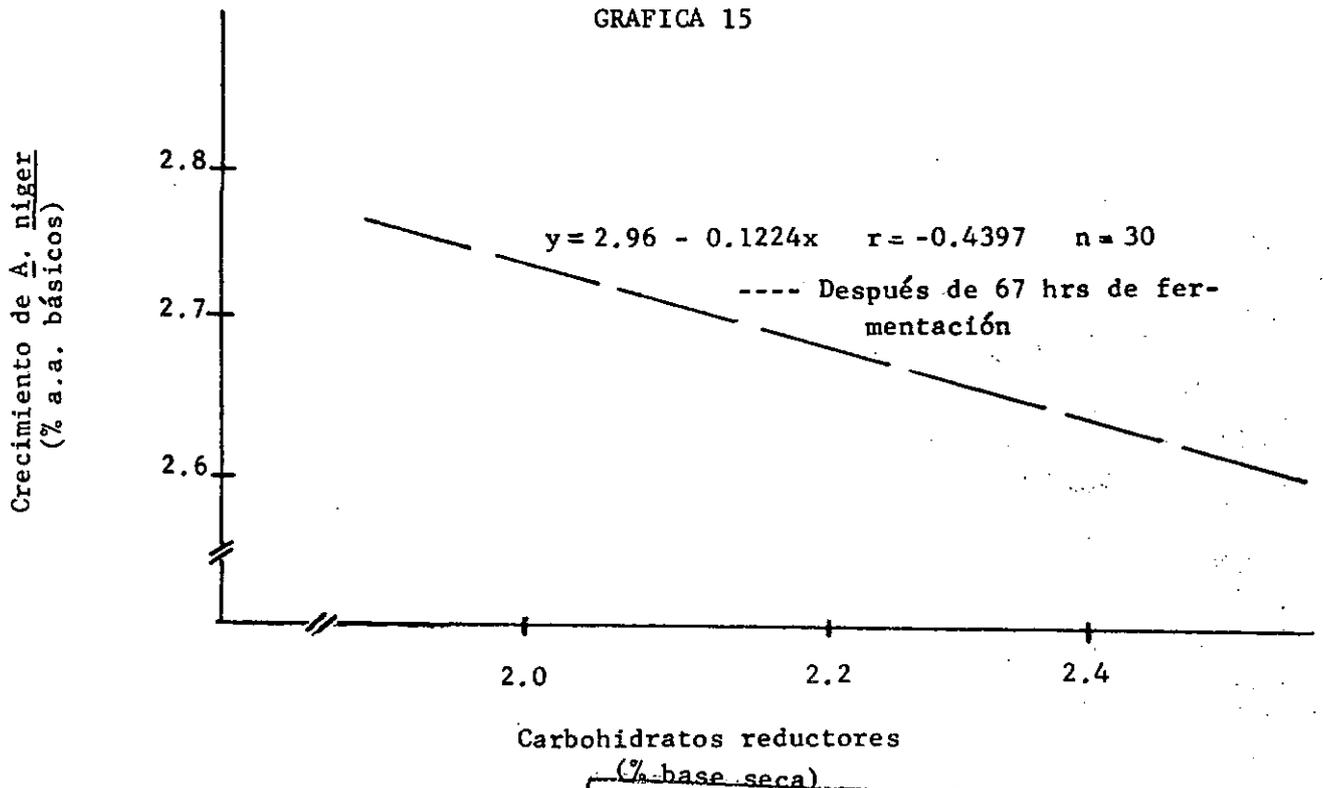


GRAFICA 14

RELACION ENTRE CARBOHIDRATOS REDUCTORES Y CRECIMIENTO DE A. niger DEL SUSTRATO QUE CONTIENE NITROGENO A LA CONCENTRACION ESTANDAR



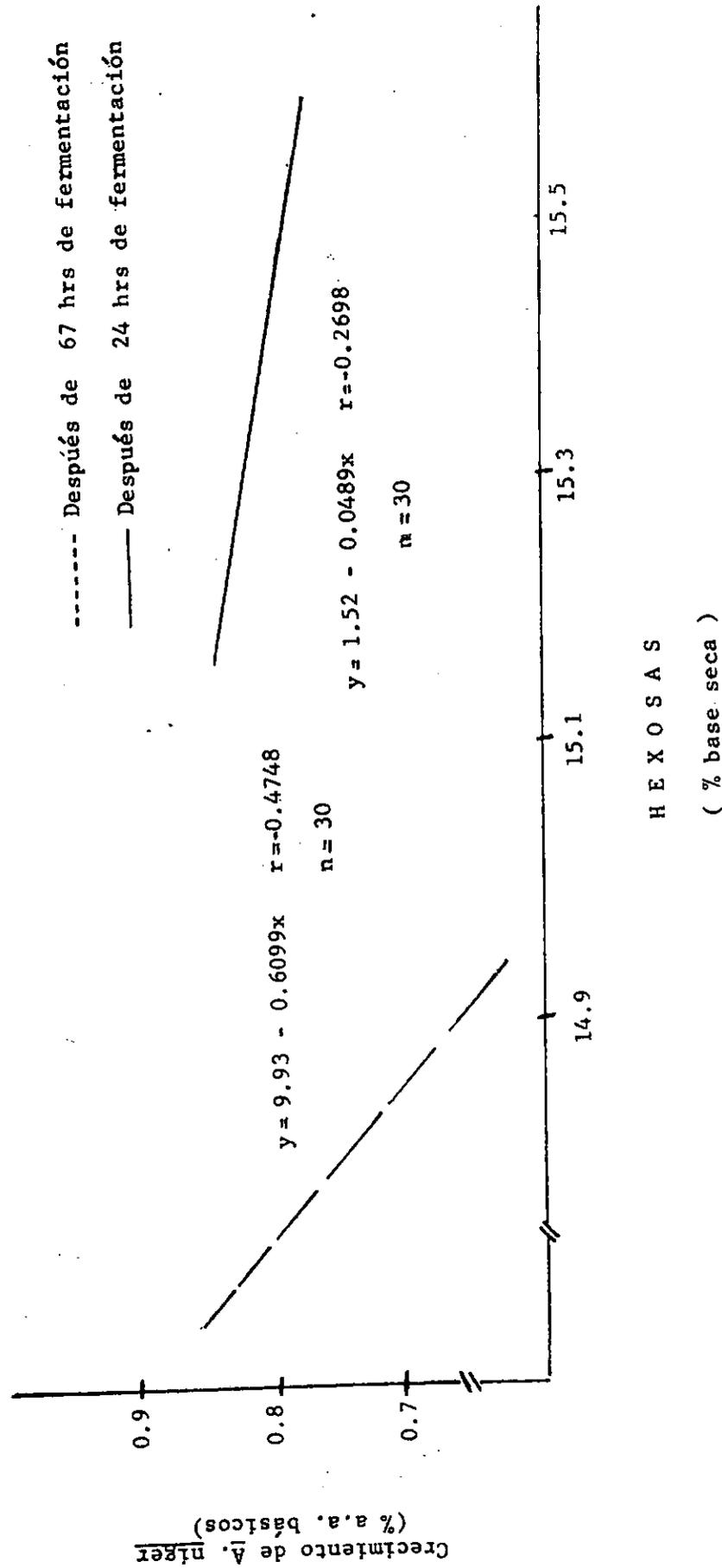
GRAFICA 15



PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

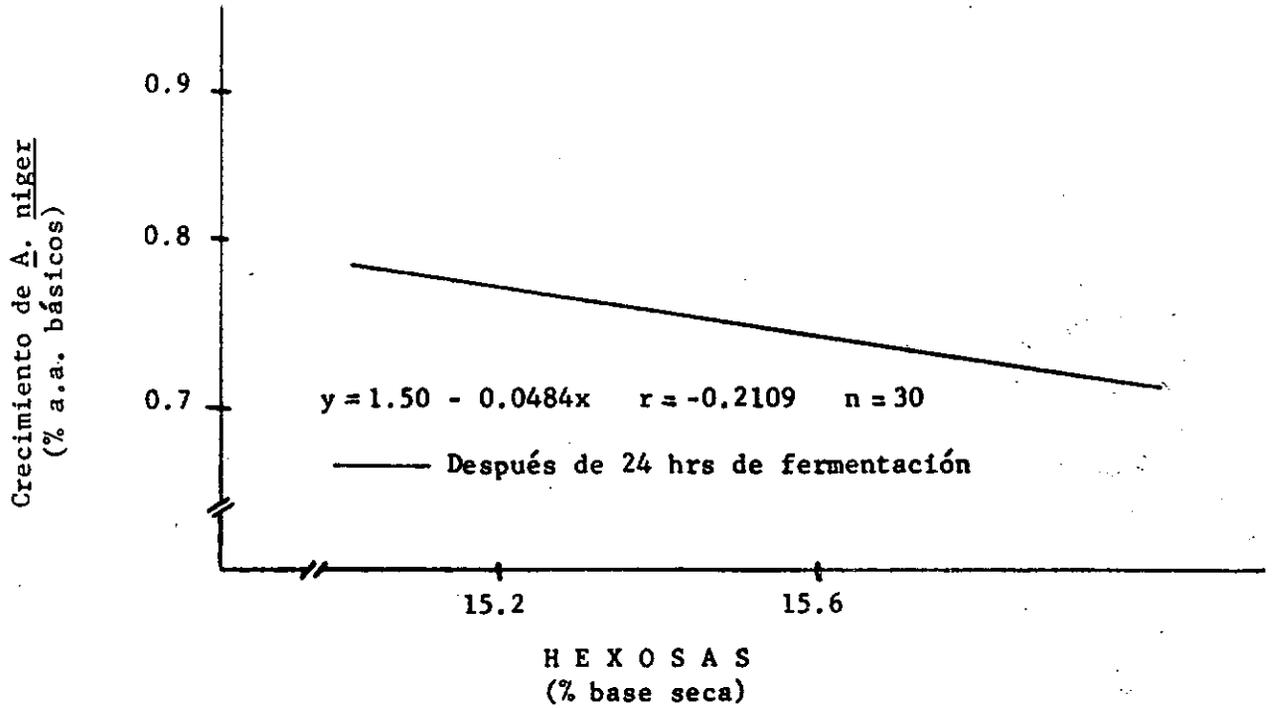
GRAFICA 16

RELACION ENTRE HEXOSAS Y CRECIMIENTO DE A. niger
DEL SUSTRATO CARENTE DE NITROGENO AGREGADO

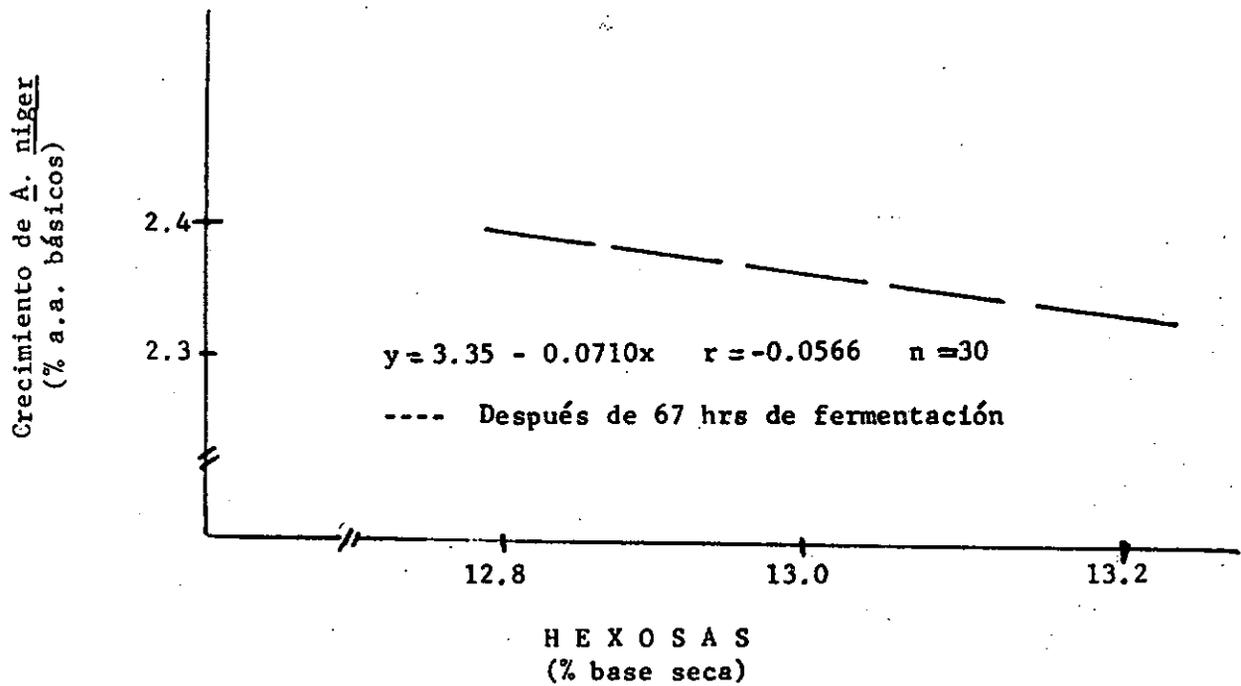


GRAFICA 17

RELACION ENTRE HEXOSAS Y CRECIMIENTO DE A. niger
DEL SUSTRATO QUE CONTIENE NITROGENO A LA MITAD
DE LA CONCENTRACION ESTANDAR

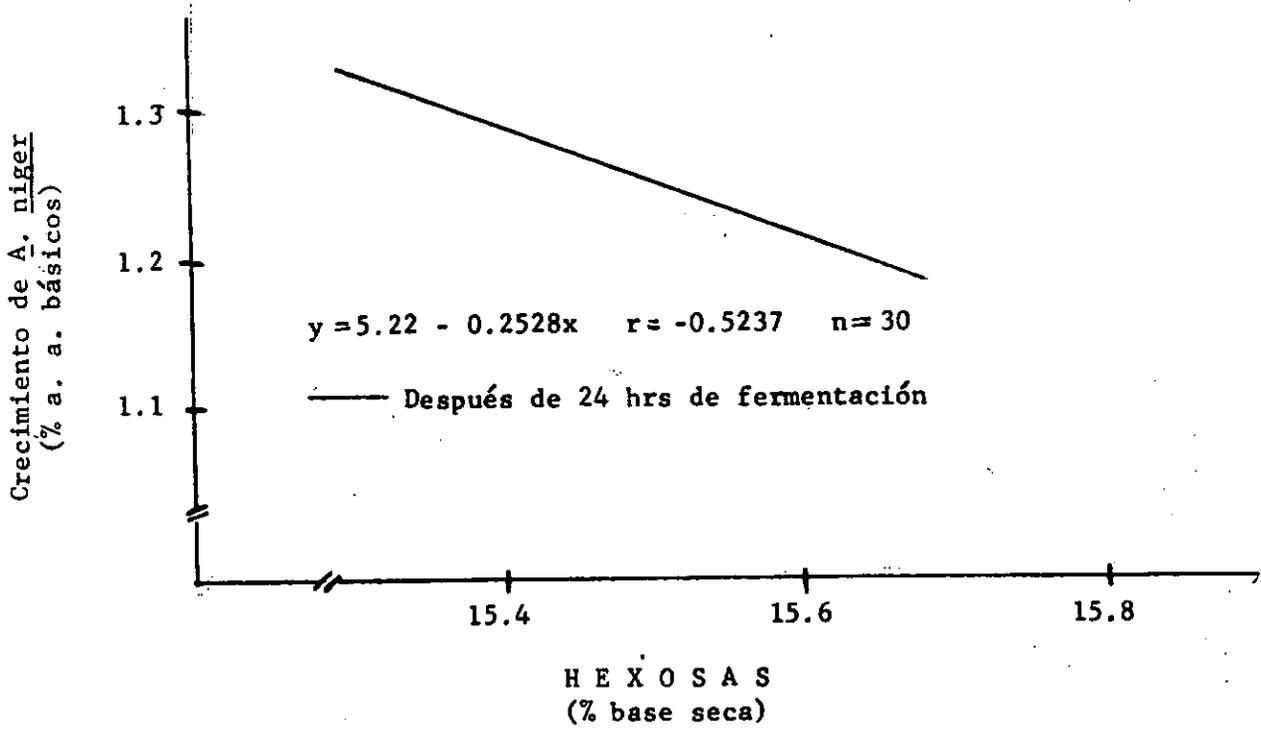


GRAFICA 18

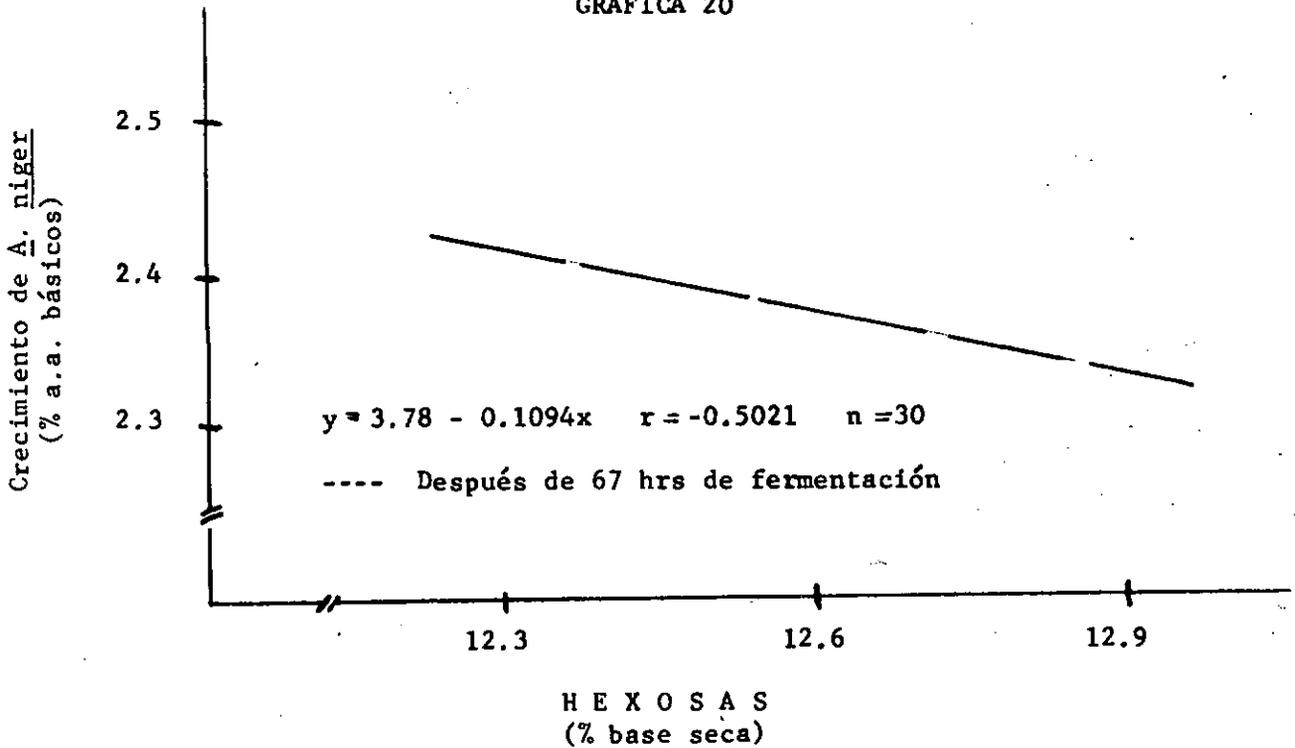


GRAFICA 19

RELACION ENTRE HEXOSAS Y CRECIMIENTO DE A. niger
DEL SUSTRATO QUE CONTIENE UNICAMENTE UREA

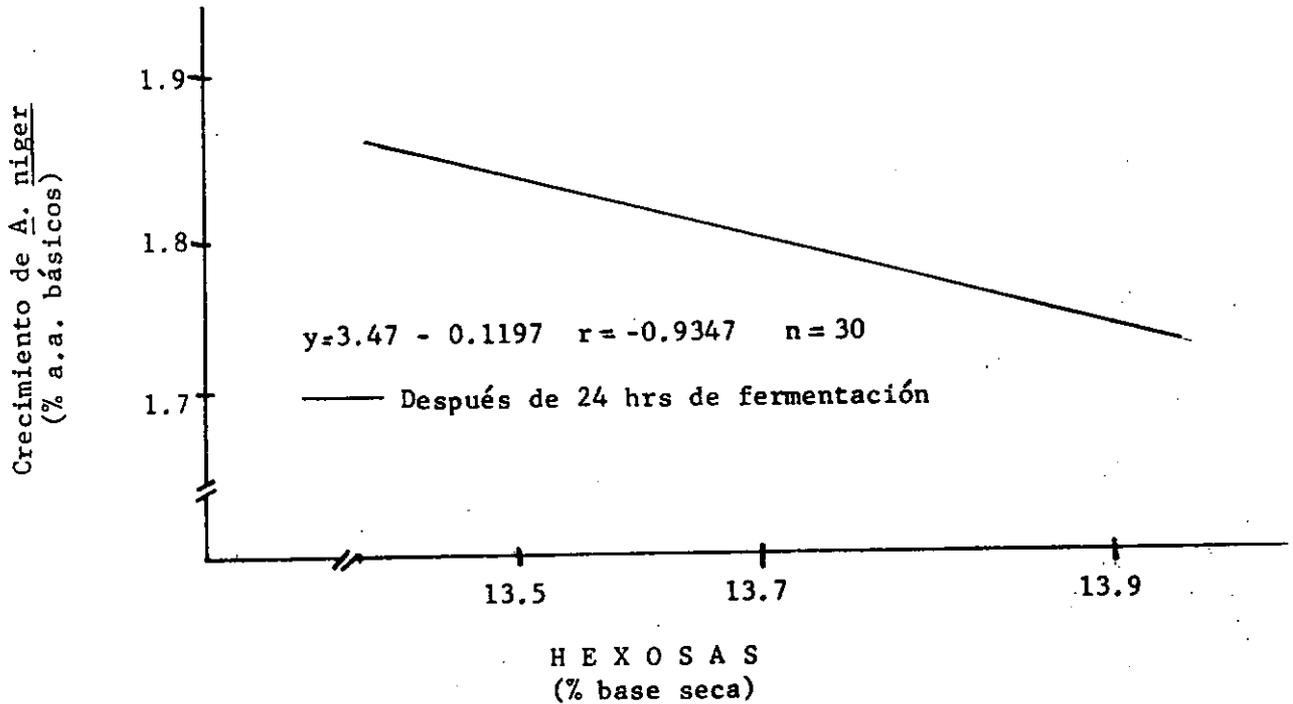


GRAFICA 20



GRAFICA 21

RELACION ENTRE HEXOSAS Y CRECIMIENTO DE A. niger
DEL SUSTRATO QUE CONTIENE NITROGENO
A LA CONCENTRACION ESTANDAR



GRAFICA 22

