



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

INFORME TÉCNICO DE RESIDENCIA

PROFESIONAL

PROYECTO

**ESTUDIO MICROBIOLÓGICO Y BROMATOLÓGICO DE
LOS RESIDUOS SÓLIDOS DEL BENEFICIO HÚMEDO DE
CAFÉ (*Coffea arabica*) EN CHIAPAS.**

PRESENTA:

PAVEL VLADIMIR DE LA CRUZ PAEZ

ASESOR INTERNO:

DR. VÍCTOR MANUEL RUÍZ VALDIVIEZO

ASESOR EXTERNO:

ING. JESÚS CARMONA DE LA TORRE

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS

JULIO 2017

RESUMEN

El presente informe técnico de residencia profesional forma parte del proyecto “Estrategias de mitigación de impactos ambientales derivados del beneficio húmedo de café Chiapas” en el cual se analizaron las principales problemáticas por el manejo irresponsable de residuos sólidos, líquidos, microbiológicos y agrónomos en las fincas cafetaleras de la zona de los Cuxteques, del municipio de la Concordia en el estado de Chiapas, México.

Con el apoyo y financiamiento de El Colegio de la Frontera Sur se realizó un viaje para conocer las principales fincas cafetaleras del municipio de los Cuxteques y observar las dificultades por las que pasan los caficultores además de conocer cuál es el método que se utiliza para el proceso del café antes de su comercialización. Durante el recorrido se observó que las principales problemáticas que enfrentan los caficultores se deben a plagas o a microorganismos como es el hongo de la roya *Hemileia vastatrix*, por lo cual enfocan más sus actividades a solucionar estos problemas de manera poca ortodoxa o recurriendo a fertilizantes que provocan deficiencia en las plantas de café. De la misma manera tampoco cuentan con un manejo adecuado de los residuos producidos en el beneficio húmedo del café, el manejo que utilizan de los residuos líquidos es desecharlos en algún arroyo o río cercano provocando su contaminación y con los residuos sólidos es dejarlo en alguna zanja sin tratamiento alguno, dejando que la descomposición y fermentación de la pulpa del cerezo propicie el crecimiento y desarrollo de patógenos y microorganismos dañinos para el café, plantas o árboles cercanas, por lo cual se realizó un estudio microbiológico y físico-químico de la pulpa de café, con el fin de conocer su riqueza microbiana, principalmente en bacterias y levaduras y sus características bromatológicas. Esto con el propósito de aportar soluciones en el ámbito científico y con fines académicos, para el desarrollo de tecnologías locales para mitigar el impacto ambiental.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
CAPÍTULO 1	6
1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. ANTECEDENTES	9
2.1 Café	9
2.2 Especies y variedades	10
2.2.1 <i>Coffea arabica</i>	11
2.3. Origen y distribución	12
2.4. Producción	13
2.4.1. Producción mundial	13
2.4.2. Producción nacional	15
2.5 Proceso	16
2.5.1 Recolección del fruto.....	16
2.5.2 Beneficio húmedo	17
2.5.3 Despulpado	18
2.5.4 Fermentación	19
2.5.5 Lavado	20
2.5.6 Secado	21
2.5.7 Trillado.....	21
2.5.8 Torrefacción	22
2.6 Residuos.....	22
2.6.1 Usos alternativos.....	24
2.7 Caracterización de la pulpa de <i>C. arabica</i>	24
2.7.1 Caracterización físico – química	24
2.7.2 Caracterización microbiológica	25
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26

4. JUSTIFICACIÓN	27
5. OBJETIVOS	28
5.1 Objetivo general:.....	28
5.2 Objetivos específicos:	28
CAPÍTULO 2	29
6. METODOLOGÍA	29
6.1 Sitio de muestreo.....	29
6.2 Localización del área de estudio.....	29
6.3 Análisis bromatológicos	29
6.3.1 Pre tratamiento de la muestra	30
6.3.2 Humedad	30
6.3.3 Cenizas.....	30
6.3.4 Análisis del contenido de grasas	31
6.3.5 Determinación de proteína cruda	31
6.3.6 Determinación del contenido de fibra cruda	32
6.3.7 Análisis del contenido de azúcares reductores.....	33
6.3.8 Carbohidratos.....	33
6.3.9 Taninos condensables	34
6.3.10 Energía calorífica	34
6.4 Extracción de DNA	35
6.4.1 Extracción de ácidos grasos volátiles (AGV's)	36
6.4.1.1 Técnica de Folch	36
6.4.1.2 Método de ácido fosfórico	36
6.4.2 Lavado con buffer de fosfatos.....	37
6.4.3 Método CTAB 2X	37
6.4.3.1 Extracción de DNA.....	37
6.4.4 Electroforesis.....	38
6.4.5 Cuantificación de DNA.....	38
CAPÍTULO 3	39
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39

7.1	Caracterización físico – química	39
7.1.1	Humedad	40
7.1.2	Cenizas.....	40
7.1.3	Contenido de grasa.....	41
7.1.4	Proteína cruda	42
7.1.5	Fibra cruda.....	43
7.1.6	Azúcares reductores.....	44
7.1.7	Carbohidratos.....	45
7.1.8	Taninos condensables	46
7.1.9	Energía calorífica	46
7.2	DNA total obtenido de la pulpa de café para su caracterización microbiológica.....	48
8.	CONCLUSIÓN	50
9.	COMPETENCIAS DESARROLLADAS	51
10.	BIBLIOGRAFÍA	52

ÍNDICE DE FIGURA

CAPITULO 1

Figura 1.1 Partes del fruto de café.....	10
Figura 1.2.- Coffea arabica L.....	11
Figura 1.3.- Principales estados productores de café cereza en México.....	16
Figura 1.4.- Despulpadora tipo tambor horizontal.....	19
Figura 1.5.- Composición de la materia seca del mucílago de café (Porcentaje en base húmeda).....	20
Figura 1.6.- Niveles de tueste.....	22

CAPITULO 2

Figura 2.1.- Diseño esquemático de la bomba de oxígeno.....	35
---	----

CAPITULO 3

Figura 3.1.- Medias del % de humedad de la pulpa de café a diferentes tiempos de descomposición.....	40
Figura 3.2.- Medias del % de Cenizas a diferentes tiempos de descomposición...41	
Figura 3.3.- Medias del % de Extracto etéreo de la pulpa de café a diferentes tiempos de descomposición.....	42
Figura 3.4.- Medias del contenido de proteína cruda de la pulpa de café a diferentes tiempos de descomposición.....	43
Figura 3.5.- Medias del contenido de Fibra cruda.....	44
Figura 3.6.- Comparación gráfica de medias del % de Azúcares reductores en pulpa de café.....	45
Figura 3.7.-Comparación de las medias de los porcentajes de Taninos condensables.....	46
Figura 3.8.- Gráfica de medias de la energía calorífica de la pulpa de café a diferentes tiempos de descomposición.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

CAPITULO 1

Tabla 1.1 .- Taxonomía de la planta de cafeto.....	9
Tabla 1.2 Características de las principales especies de café cultivados a nivel mundial.....	10
Tabla 1.3.- Producción Mundial de Café.....	13
Tabla 1.4.- Ranking de productores 1990-2015.....	14
Tabla 1.5.- Residuos obtenidos en el proceso de beneficio e industrialización.....	23

CAPITULO 2

Tabla 2.1. - Descripción de las muestras.....	29
Tabla 2.2.- Preparación de la curva de calibración utilizando glucosa como estándar.....	33
Tabla 2.3.- Preparación de la curva de calibración utilizando catequina como estándar.....	33

CAPITULO 3

Tabla 3.1.- Resultados del análisis físico - químico de la pulpa de café en diferentes tiempos de descomposición.....	39
Tabla 3.2.- Concentración y calidad de las extracciones de DNA a partir de pulpa de café en diferentes tiempos de degradación.....	48

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

El café *Coffea spp.* es cultivado en casi 80 países tropicales y subtropicales del mundo (Solís *et al.*, 2008), y constituye uno de los productos primarios más valiosos del comercio mundial (ICO, 2009). El área ocupada por el cultivo de café en todo el planeta es de 13.2 millones de km² (Onzima *et al.*, 2014), de los cuales, el 75% es cultivado en pequeñas fincas de unas 10 ha, principalmente manejados por el grupo familiar (Jeffrey, 2011). El sector cafetero en su conjunto, incluyendo el cultivo, procesamiento, comercio, distribución y exportación del café (Rutherford, 2007; ICO, 2009) es una importante fuente generadora de empleo en muchos países tropicales y subtropicales (Donald, 2007). En este contexto, Onzima *et al.*, (2007), mencionan que alrededor del 5% a 10% de la población mundial está empleada en este sector, otros autores mencionan que más de 25 millones de personas (principalmente pequeños agricultores) están involucradas directamente en la producción del café y 75 millones más son indirectamente dependientes del café para generar sus medios de subsistencia.

Chiapas es un estado con un tradicional cuidado en el cultivo, producción y de buena comercialización con respecto al café, la primera vez que se introdujo el grano de café al estado fue en 1847 por Gerónimo Manchinelli, en el municipio de Tuxtla Chico, en donde se encuentran las conocidas e históricas ruinas de Izapa. El grano de café provenía de Guatemala, donde las condiciones climáticas y de producción son parecidas, pero originalmente en Centroamérica el café comenzó a producirse desde el siglo XVII cuando fue traído de Francia. A partir de entonces el cultivo de café ha sido de suma importancia ya sea con métodos tradicionales o con la implementación de nuevas tecnologías, entre las más destacadas se encuentra la agricultura orgánica la cual es una pequeña rama de la actividad económica que está adquiriendo creciente importancia en el sector agrícola de algunos países, independientemente de su

nivel de desarrollo. Por ejemplo, en varios países desarrollados ha llegado a representar una parte significativa del sistema alimentario, el 20% por ejemplo, en Estados Unidos, Francia, Japón y Singapur. Algunos países en desarrollo tienen pequeños mercados orgánicos internos y unos cuantos han empezado a aprovechar las lucrativas oportunidades de exportación que ofrece la agricultura orgánica, en México con especial atención a la producción del café (FAO, 2010).

El café es el producto agrícola más comercializado en los mercados internacionales y ocupa el segundo lugar, solo detrás del petróleo crudo, entre los productos naturales de mayor demanda. En el ciclo de cosecha 2015/16 se produjeron cerca de 152 millones de sacos de 60kg a nivel mundial de los cuales el 60% pertenece a la especie *Coffea arabica*, y cabe destacar que México y Centroamérica contribuyeron con la producción de aproximadamente 17.6 millones de sacos de 60 kg, o 1.6 millones de sacos de café. Chiapas aportó el 36% de la producción nacional siendo el mayor productor de café en el país, La Concordia junto con 9 municipios concentran el 46% de la producción en el estado.

Anualmente en Chiapas se invierten más de 536 millones de pesos, con el propósito de que mantenga su posición como líder en producción de café en México y en el mundo.

En los países cafeteros se han usado diversos métodos, prácticas y condiciones de beneficio para retirar el mucílago del grano de café, pero el método más utilizado es el de beneficiado húmedo. Esta vía involucra el despulpado, desmucilado utilizando grandes cantidades de agua y secado del fruto, en cada etapa del proceso se generan residuos líquidos y sólidos, siendo la pulpa y el mucílago los que constituyen los subproductos más abundantes del proceso de beneficio húmedo del café y representan alrededor del 60% del peso del fruto fresco (Calle, 2011).

Cuando no se utilizan adecuadamente generan la mayor fuente de contaminación ambiental en la zona cafetera. Se ha calculado que la pulpa y el

mucílago generados durante el beneficio húmedo del café, para la obtención de una arroba de café pergamino seco, producen una contaminación equivalente a la generada por los excrementos y orina de 100 personas en un día (Zuluaga, 2012). Aun que ya hay varias alternativas para el tratamiento adecuado de la pulpa de café muchos caficultores prefieren ignorar la problemática y por ende generan daños preocupantes en los alrededores de los cultivos de café y aguas cercanas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Café

El café se define como la semilla seca que proviene del cafeto (Temis *et al.*, 2011), arbusto perteneciente a la familia de las Rubiáceas del género *Coffea* con alrededor de 500 géneros y más de 6000 especies (Tabla 1.1), en su mayoría árboles y arbustos (Waller *et al.*, 2007). No obstante, únicamente tres de estas se mencionan como cultivadas comercialmente, destacándose las dos primeras según el orden siguiente *Coffea arabica* L., *C. canephora* Pierre ex-Froehner y *C. liberica* Bull ex-Hiern. Todas las plantas del género *Coffea* se caracterizan por una hendidura en la parte central de la semilla. Se encuentran desde pequeños arbustos hasta arboles de más de 10 m, presentan hojas opuestas verdes brillantes, con márgenes lisos. Sus flores, de color blanco crecen en grupos en las axilas de las hojas y son aromáticas (en la misma flor se encuentran todos los órganos). A partir de ellas, se producen sus frutos, que son drupas de diferentes formas, colores y tamaños dependiendo de la especie, dentro de las cuales se encuentran las semillas, normalmente dos por fruto (Figura 1.1) (Suarez, 2012).

Tabla 1.1 .- Taxonomía de la planta de cafeto

TAXONOMIA	NOMBRE
Reino	Plantae
División	<i>Magnoliophyta</i>
Sub-división	<i>Angiospermae</i>
Clase	<i>Magnoliata</i>
Sub-clase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Rubiales</i>
Familia	<i>Rubiaceae</i>
Género	<i>Coffea</i>
Especie(s)	<i>Arabica, canephora, liberica.</i>

Fuente: Herrera, S. (2004).

2.2 Especies y variedades

La taxonomía del género *Coffea* ha sido revisada recientemente por Davis *et al.* (2007) quien ha enumerado 103 especies dentro de este género, 41 especies en África, 59 en Madagascar y 3 en las Islas Mascareñas, ubicadas en el Océano Índico al este de Madagascar. Solo 3 especies de *Coffea* tienen importancia económica, ya que constituyen el producto agrícola más importante del comercio mundial: *C. arabica*, *C. canephora* y *C. liberica* (León, 2000) (Tabla 1.2).

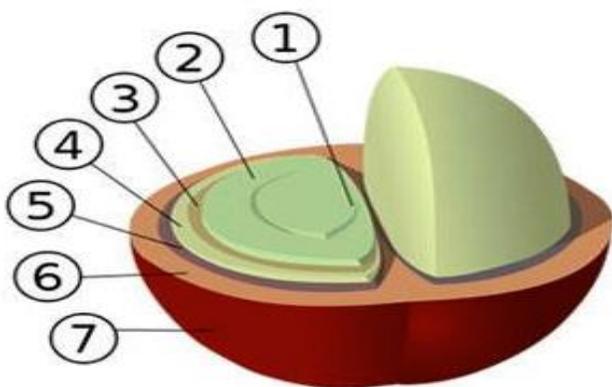


Figura 1.1 Partes del fruto de café. 1- Corte central (Embrión). 2- Endospermo (grano de café). 3- Película plateada (tegumento). 4- Endocarpio (pergamino). 5- Capa de pectina (mucílago). 6- Mesocarpio (pulpa). 7- Epicarpio (cascara). Fuente: Herrera, S. (2004).

Tabla 1.2 Características de las principales especies de café cultivados a nivel mundial

Características distintivas de las tres principales especies de café cultivadas a nivel mundial			
Características	<i>C. arabica</i>	<i>C. canephora</i>	<i>C. liberica</i>
Origen	Etiopía, Sudan. Kenia 1300-2000 m.s.n.m.	Guinea, Angola 0-1300 m.s.n.m.	África Oriental
Grano Caracol (%)	Medio	Alto	Alto
Principales cultivares	Typica, Borbon, Mundo Novo, Caturra, Catuaí	Robusta	Liberica, Excelsa
Contenido de cafeína (%)	1,0 - 1,3 Débil	2,0 - 3,0 Fuerte	Variable Muy fuerte
pH del grano	Medio	Elevado	Bajo
Propiedades degustativas de la bebida	Buenas	Medianas	Malas en caliente

Fuente: Alvarado, S. (2002).

2.2.1 *Coffea arabica*

De las tres especies que se explota comercialmente, la *Coffea arabica* es la más destacada a nivel mundial, no sólo por el área sembrada y la cantidad suplida en el mercado, sino por la excelente calidad en su bebida, además que constituye más del 60% del café que se comercializa en el mercado mundial (Suarez, 2012).

Es una especie autógama, es decir, se autopoliniza o autofertiliza. Se cultiva principalmente en el centro de Brasil, en un área de baja altitud ya casi en el límite de la franja tropical; en las zonas montañosas desde México a Colombia; en las tierras altas de África Oriental y, en menor escala, en áreas montañosas de India, Filipinas e Indonesia (León, 2000). Se considera un café de altura, que se cultiva bien en temperaturas de 18 a 25 °C y a alturas entre los 1200 y los 2000 msnm. (Waller *et al.*, 2007). Se trata de un arbusto pequeño liso de hojas lustrosas que miden en promedio 15 cm de largo por 6 cm de ancho de forma oval o elíptica, acuminadas, agudas en la base. Las flores de color blanco o cremoso crecen en las yemas axilares de las hojas, de 2 a 9 en racimos muy cortos. La cereza o baya es elíptica, de aproximadamente 1.5 cm de largo, al principio de color verde, después de color rojo – violeta y con el tiempo azul – negro. Las semillas varían de tamaño, de 8.5 a 12.7 mm de largo, estos granos contienen entre 1.0 y 1.4% de cafeína en base a materia seca y es menos amargo que las otras especies cultivadas (Figura 1.2). Es el café de mejor calidad en taza (Suarez, 2012).



Figura 1.2.- *Coffea arabica* L. 1- Flor (sección transversal). 2- Estambres. 3- Pistilo. 4- Ovario y cáliz (sección transversal). 5-Semilla 6-Semilla (sección transversal) 7- Fruto (sección transversal). 8- Sección de la baya mostrando el embrión 9- Embrión. Fuente: Alvarado, S. (2002).

La planta *Coffea arabica* es autógama y sobre todo endogámica, se puede cruzar con la mayoría de las especies diploides, pero si esto no ocurre, se producirá la autopolinización y autofecundación. Una pequeña cantidad de variabilidad natural ocurre dentro de la especie debido a la hibridación y a las mutaciones naturales. Se reconocieron anteriormente dos variedades botánicas que dieron origen a cultivares tradicionales:

- *Coffea arabica* Linn var. *arabica* era el primer tipo original cultivado en Yemen, de donde la mayoría de variedades tienen origen. Las ramas fructíferas primarias son esbeltas y crecen horizontalmente, las hojas son estrechas, a veces pendulares y con punta de bronce cuando son jóvenes. Históricamente, la mayor parte de la producción comercial de café del mundo proviene de esta variedad también llamada “typica”.
- *Coffea arabica* Linn var. *bourbon* surgió como un mutante espontáneo de doble recesión. El árbol es más delgado que la variedad “typica” con las ramas fructíferas primarias crecidas rígidamente en un ángulo agudo y dobladas solamente en las puntas durante la fructificación.

Un gran número de otras variedades botánicas han sido descritas, muchas informalmente, pero ninguna de ellas es reconocida por Davis *et al.* (2007) como válida y todas son consideradas como sinónimos de *Coffea arabica* L. Entre 40 y 50 taxones intraespecíficos son reconocidos por la industria del café como cultivares, varios de los cuales incorporan mutaciones (Waller *et al.*, 2007).

2.3. Origen y distribución

La propagación a nivel mundial del género de la planta *Coffea* es originario de Abisinia (la actual Etiopía). Situada en el África oriental. Para 1510 su producción y consumo ya se habían extendido hasta el Cairo (Cinza *et al.*, 2002). A principios del siglo XVII, el café se introdujo en la India y a mediados del siglo XVIII, el consumo de café se extendió por Europa. En América, el café fue introducido

durante el siglo XVIII, la planta se propago por el Caribe y el continente. En 1731, el café fue introducido en Jamaica y Santo Domingo, de donde su cultivo se extendió al resto de los actuales países productores de América. Con la revolución industrial y el crecimiento de la población mundial durante el siglo XX, el café prácticamente se convirtió en una bebida universal (Temis *et al.*, 2011).

2.4. Producción

La especie económicamente más importante de café es *Coffea arabica* la cual produce aproximadamente el 80-90% de la producción mundial, *C.canephora* cerca del 20% y *C.liberica* sobre un 1%. El café se produce en América Latina, en África y en Asia, y es una de las materias primas agrícolas más comercializadas en los mercados internacionales (Rodríguez, 2015).

2.4.1. Producción mundial

Desde 1990 hasta 2015 la producción mundial de café se ha incrementado en más de un 50% (Tabla 1.3). Brasil mantiene, desde antes de 1990, el primer puesto como país productor de café con bastante diferencia sobre el resto de países. Vietnam ha experimentado un crecimiento impresionante desde 1990, pasando desde el puesto 17 al segundo mayor productor de café, desplazando a Colombia a la tercera posición y a Indonesia a la cuarta, mientras que México ha tenido un gran descenso en su producción de café durante esos 25 años.

Tabla 1.3.- Producción Mundial de Café

Año	En millones de Kg
1990	5,586
1991	6.066
1992	5,926
1993	5,433
1994	5,594
1995	5,214
1996	6,189

1997	5,973
1998	6,532
1999	7,890
2000	6,813
2001	6,481
2002	7,366
2003	6,303
2004	6,989
2005	6,695
2006	7,716
2007	7,198
2008	7,753
2009	7,387
2010	8,039
2011	8,215
2012	8,887
2013	8,787
2014	8,483
2015	8,602

Fuente: International Coffee Organization (www.ico.org).

Tabla 1.4.- Ranking de productores de Café (1990-2015)

País	Producción		Posición		
	1990	2015	1990	2015	
Brasil	27.286	43.235	1	1	0
Vietnam	1.310	27.500	17	2	+15
Colombia	14.268	13.500	2	3	-1
Indonesia	7.441	11.000	3	4	-1
Etiopía	2.909	6.400	7	5	+2
India	2.829	5.833	8	6	+2
Honduras	1.568	5.750	14	7	+7
Uganda	1.955	4.755	11	8	+3
México	4.674	3.900	4	9	-5
Guatemala	3.271	3.400	5	10	-5
Perú	937	3.200	22	11	+11
Nicaragua	461	2.175	28	12	+16
Costa de Marfil	2.940	1.800	6	13	-7
Costa Rica	2.562	1.492	9	14	-5
Kenia	1.485	833	16	15	+1
Papúa Nueva Guinea	963	800	21	16	+5
Tanzania	932	800	23	17	+6
El Salvador	2.465	762	10	18	-8
Ecuador	1.504	700	15	19	-4
Camerún	1.682	570	12	20	-8

Fuente: International Coffee Organization (www.ico.org)

2.4.2. Producción nacional

La introducción del cultivo en México ocurrió hace 200 años (Cano *et al.*, 2005). A nivel mundial, México es el sexto productor de café arábica con una participación del 3.8 por ciento (Rodríguez, 2015) y es el primer productor mundial de café orgánico, y uno de los primeros en cafés “Gourmet” (Cinza *et al.*, 2007).

La producción de café en México se realiza en una superficie equivalente al 3.3 por ciento del área total sembrada en México. Esta cadena productiva es una de las más importantes en el sector agroindustrial del país y destaca por el número de productores que incorpora (504,372) y el número de empleos que genera (Rodríguez, 2015). En el ciclo cafetalero 2014/15 se destinaron 727,385 hectáreas al cultivo del café en México. De dicha superficie se cosecharon 666,375 hectáreas, de la cual el 90.3% se concentró en cinco entidades: Chiapas (37.2%), Veracruz (20.3%), Oaxaca (17.6%), Puebla (8.9%) y Guerrero (6.3%).

La producción de café cereza se ubicó en 1.04 millones de toneladas en el ciclo 2014/15, volumen que significa una reducción de 11 % con respecto a la cosecha del ciclo previo y su nivel más bajo desde 1979/80, ciclo a partir del cual se tiene registro. Así, durante los últimos diez años la producción de café cereza decreció a una tasa promedio anual de 4.2 %. Aproximadamente el 95% de la producción de café se obtiene de la especie arábica y el 5% corresponde a variedad robusta (Rodríguez, 2015).

En 2014/15 se produjo café en 16 entidades; en cinco de estas se concentró el 93.6% de la oferta nacional: Chiapas (36.9%), Veracruz (26.9%), Puebla (17.5%), Oaxaca (8.0%) y Guerrero (4.4%) (Figura 1.3).

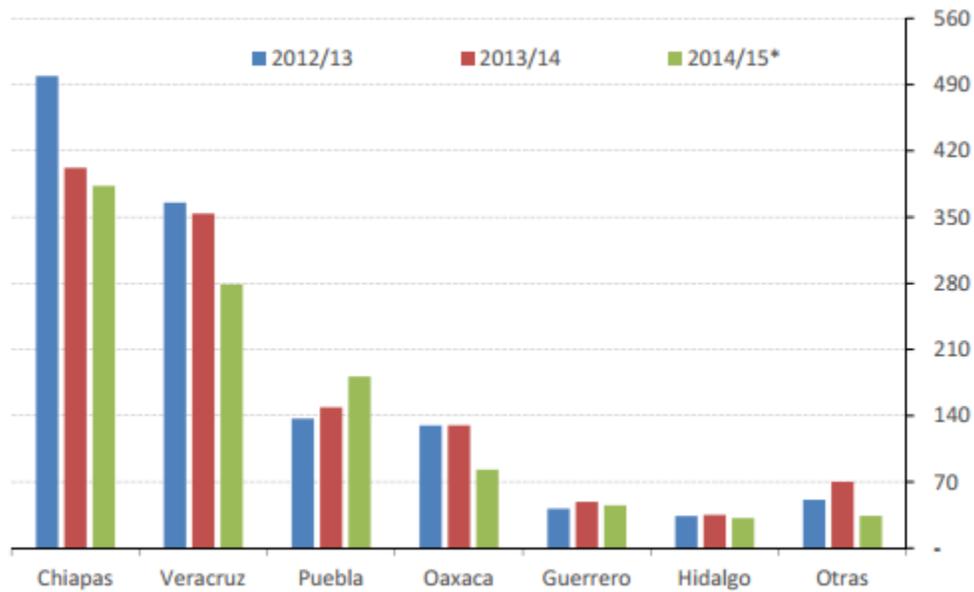


Figura 1.3.- Principales estados productores de café cereza en México. 2012/13 - 2014/15, en miles de toneladas. Fuente: SIAP-SAGARPA (2015).

2.5 Proceso

El proceso de la caficultura empieza con la siembra de cafetos, la producción del café se inicia entre los dos y tres años después del establecimiento del cafetal, la productividad depende de factores como la variedad empleada, las condiciones ecológicas de la zona de cultivo y el manejo agronómico (Duicela *et al*, 2004).

2.5.1 Recolección del fruto

La época de cosecha puede variar, según la zona geográfica, en función del inicio de las lluvias que inciden directamente en la floración y fructificación de los cafetales (Duicela *et al.*, 2004), en México la cosecha se realiza entre septiembre y marzo. Por lo general se cosecha anualmente, cuando maduran las cerezas.

En general se pueden señalar cuatro sistemas: 1) cosecha selectiva en varias etapas en la que se arrancan los racimos cuando contienen principalmente cerezas maduras; 2) cosecha única en la que los trabajadores cosechan todo a su paso por el cafetal; 3) cosecha mecánica con maquinaria, a veces operada manualmente, que desprende el fruto del árbol mediante vibración; 4) cosecha selectiva en varias etapas de manera manual, en la que se recogen solo las cerezas maduras, este sistema de recolección es el más utilizado (Temis *et al.*, 2011).

La recolección selectiva de cerezas maduras evidentemente eleva al máximo la cantidad de café maduro que se cosecha, ya que los granos, que todavía no están maduros se dejan en el árbol para madurar, y las cerezas que se han pasado de madurez se evitan, es la parte más costosa de la producción de café, suelen necesitarse entre 5 y 10 “pasadas” en una cosecha. (FAO, 2011). Los frutos inmaduros no deben cosecharse, pues dificultan el proceso de beneficio. Una vez realizada la cosecha del café debe evitarse la sobre exposición al sol, así como el amontonamiento por periodos prolongados, ya que el recalentamiento de los frutos causa una sobre fermentación, mancha el pergamino y deteriora la calidad de la bebida (Duicela *et al.*, 2004).

2.5.2 Beneficio húmedo

El beneficiado es el tratamiento del café cosechado hasta producir granos secos y estables, es decir, la transformación del fruto maduro de la planta de café conocido como cereza para obtener café verde o pergamino (Temis *et al.*, 2011). El beneficio es un factor determinante de la calidad de la taza. Los frutos maduros de café pueden ser procesados por tres métodos para la obtención de los granos verdes (Duicela *et al.*, 2004). El más sencillo y rustico es el procesamiento seco, que se utiliza para fermentar y secar café al sol sobre plataformas. Otro método es el proceso húmedo, en el que la pulpa y mucílago son eliminados por medios mecánicos y los granos se fermentan en depósitos con grandes volúmenes de

agua. Y por último el proceso semi – seco que es una variación del proceso húmedo, en el que, de los frutos del café también se les quita la pulpa, pero el proceso de fermentación se realiza directamente en la plataforma (FAO, 2011).

Los diferentes tipos de procesamiento producen bebidas con gustos y aromas que el consumidor puede seleccionar de acuerdo a sus preferencias. El café de mejor calidad, y por lo general de costo elevado, son los de la especie arábica preparados por el beneficio húmedo y se les conoce como cafés suaves. Poseen un sabor fino, aromático y con cuerpo, es por ello que el beneficio húmedo es el más utilizado por los caficultores (Marques *et al.*, 2010).

2.5.3 Despulpado

Una vez cosechados los frutos maduros, se realiza la eliminación de la pulpa (pericarpio), esta operación mecánica se efectúa usando maquinas despulpadoras que aprovechan la cualidad lubricante del mucílago del fruto, para que por presión y fricción se separen los granos y la pulpa (Wintgens, 2004). Las cerezas alimentan a la despulpadora uniformemente a lo largo del cilindro desde arriba. El tambor rotador mueve a las cerezas a través de los canales de la placa, ejerciendo presión en la cereza hasta que se remueve la pulpa. La distancia entre el cilindro y la placa se puede ajustar para minimizar el daño al grano y para evitar tener cerezas sin despulpar (Figura 1.4). Esta operación debe realizarse el mismo día de la cosecha. Si el despulpado no se efectúa el mismo día de la recolección, se provoca un recalentamiento que produce la sobre fermentación del café. El café despulpado se conoce como “café baba”, que pasa inmediatamente a recipientes apropiados para su fermentación (Temis *et al.*, 2011).

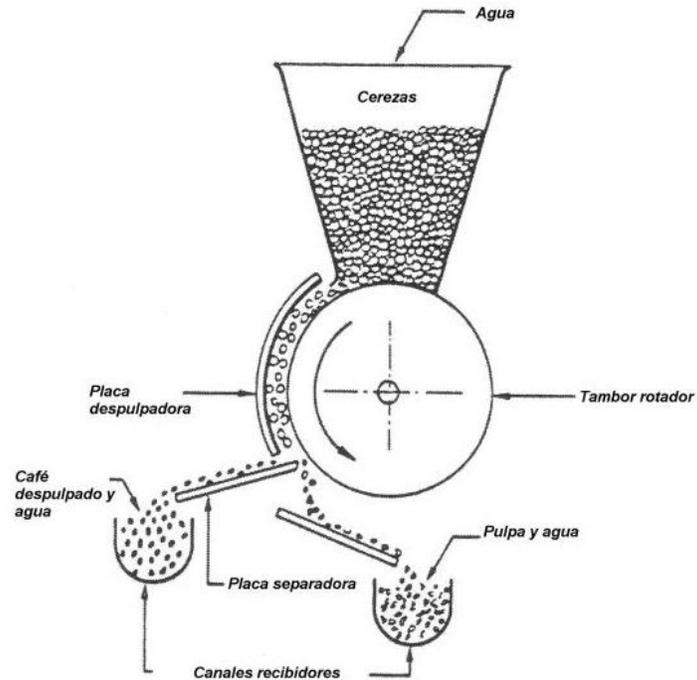


Figura 1.4.- Despulpadora tipo tambor horizontal. Fuente Wintgens, S. (2004).

2.5.4 Fermentación

La fermentación del café tiene el propósito de remover el mucilago adherido al pergamino. Para proceder a la fermentación, se coloca el “café baba”, sin agregar agua, en un recipiente apropiado como los tanques de fermentación, que pueden ser madera o concreto. La fermentación requiere de 12 a 20 horas, variando según la temperatura de la zona de producción.

Durante la fermentación se presentan cambios en la humedad del mucilago de café, que son mayores en cuanto mayor es la temperatura ambiente durante el proceso. La materia seca del mucilago de café está conformada por proteínas, lípidos, carbohidratos, sales minerales, ácidos y alcoholes (Figura 1.5), los cuales son oxidados, degradados, hidrolizados y consumidos en su mayoría por levaduras y bacterias lácticas que se encuentran en el café despulpado, produciendo energía (ATP), etanol, ácido láctico, ácido acético y dióxido de carbono, además se obtiene otros alcoholes como propanol, butanol, ácidos como

el succínico, fórmico y sustancias olorosas como aldehídos, cetonas y ésteres. (Puerta, 2012)

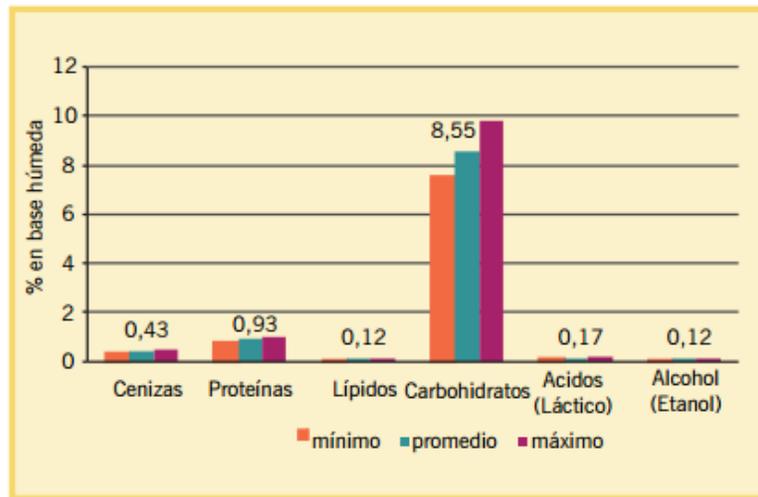


Figura 1.5.- Composición de la materia seca del mucílago de café (Porcentaje en base húmeda). Fuente: Puerta, P. (2012).

La sobre fermentación origina una bebida con sabores a vinagre y rancio, completamente defectuosa. Las fermentaciones incompletas dan granos con la película plateada pegada a la almendra, causando dificultad al momento de trillar y tostar el grano (Duicela *et al.*, 2004).

2.5.5 Lavado

El lavado del café se realiza para eliminar el mucilago del pergamino, inmediatamente después de constatarse el punto óptimo de fermentación. Una demora en el lavado provoca un severo deterioro en la calidad del café en taza. Para efectuar un buen lavado se debe usar agua limpia, restregando fuertemente el café fermentado y cambiando el agua las veces que sean necesarias, hasta que el pergamino quede completamente limpio. El lavado del café puede realizarse en los mismos tanques donde se realizó la fermentación o en otros recipientes de cemento, madera o plástico, o sobre canalones diseñados con este propósito (Duicela *et al.*, 2004).

2.5.6 Secado

El secado del café se efectúa para eliminar el agua adherida al pergamino y reducir la humedad hasta llegar a 12.5%. El tiempo de secado que requiere el café pergamino es de 40 a 50 horas de sol, aproximadamente. Una recomendación fundamental, en la fase de secado, es evitar el re-humedecimiento de los granos porque altera su color, crea condiciones para el ataque de hongos causantes de la Ochratoxina A (OTA, 2013), deteriora la calidad organoléptica de la bebida y pone en riesgo la salud de los consumidores.

Existen algunas formas prácticas para estimar el punto de secado apropiado del café en grano:

- Un grano de tamaño mediano se muerde fuertemente con los dientes. Si al morderlo se marca ligeramente, es señal de que el café está en el punto correcto de secado.
- Un grano se coloca con la parte plana hacia abajo y si al golpearle con un martillo se aplasta, aún le falta secamiento; si se marca y queda en el mismo lugar, está en el punto correcto de secado; y si se quiebra esta reseco.

Un secado muy rápido o excesivo, provoca alteraciones en el color, aspecto visual y pérdida de peso, depreciando el valor del producto (Duicela *et al.*, 2004).

El resultado es el llamado “Café Pergamino”, y es de esta forma en la que se almacena (en condiciones controladas) en sacos de 60 kg, hasta el momento de su exportación o preparación para el consumo. Un café de tipo Arabica puede almacenarse, en estas condiciones hasta 12 meses (Puerta, 2012).

2.5.7 Trillado

El trillado del café consiste en separar o descascarillar el grano del pergamino. Hay diferentes aparatos diseñados para esta tarea, muchos basados en fricción por medio de tambores, discos, rotores y cuchillas, pero todos cumplen la misma

función: decorticar el grano. Dependiendo del tipo de grano y su humedad se utilizan diferentes aparatos.

Una vez el grano ha sido descascarado, se pasa a un proceso de pulido para eliminar los residuos de pergamino que hayan podido quedar después del proceso anterior. Aunque este proceso no es indispensable con el resultado de ciertas maquinas, el café pulido es considerado de mejor calidad que aquel que no lo es. (Duicela *et al*, 2004).

2.5.8 Torrefacción

La torrefacción es la operación en la cual son formados, bajo la acción del calor, los principios aromáticos que no existen previamente en la semilla del café. Consiste en calentar los granos a una temperatura que provoque modificaciones físico-químicas que hace de éstos se pueda obtener una infusión cuyas cualidades sean satisfactorias, estas cualidades dependen del grado de tueste (Figura 1.6). En este proceso el calor tiene que ser aplicado rápida y uniformemente manteniendo los granos en movimiento. Si las temperaturas son muy altas el café se quema. Con insuficiente calor no se tuesta o piroliza. Ambas condiciones producen mala calidad a la bebida. Si los granos no se agitan continuamente no hay uniformidad en el tueste y se pueden quemar (Puerta, 2012).



Figura 1.6.- Niveles de tueste: rubio, canela, medio, ropa de monje, marrón, marrón oscuro, francés (seminegro), italiano (negro). Fuente: Suarez, A. (2012).

2.6 Residuos

El beneficio húmedo es el método más utilizado para el tratamiento post-cosecha, en esta vía se generan residuos líquidos (mucílago, agua de lavado y despulpe) y sólidos (pulpa de café) (Terry *et al*, 2005). El

procesamiento de 100 kg de frutos de café maduros genera aproximadamente 10% de café oro y el 90% restante está formado por subproductos, como pulpa fresca (40%), mucílago (20%), agua (17%), pergamino y película plateada (3%), entre otros (Noriega *et al*, 2009).

La pulpa constituye el residuo más abundante del proceso. Cuando no se utiliza adecuadamente genera la mayor fuente de contaminación ambiental en las zonas cafetaleras. Se ha calculado que la pulpa generada durante el beneficio húmedo del café, produce una contaminación equivalente a la generada por los excrementos y orina de 100 personas en un día (Blandón *et al*, 2009), esto debido a su alto contenido de material orgánico que provoca un aumento considerable en los niveles de contaminación en los cuerpos receptores (Terry *et al*, 2005).

En el estado de Chiapas se produjeron aproximadamente 167,319 toneladas de pulpa de café en el ciclo 2014/15 y solo un pequeño porcentaje de los productores dispone de este residuo de una manera adecuada, la gran mayoría desecha la pulpa en zonas destinadas a tal fin, convirtiéndose en fuente de contaminación de los recursos naturales (Carmona, 2015).

Tabla 1.5.- Residuos obtenidos en el proceso de beneficio e industrialización de 100 kg de café cereza. Tomado de Suarez, 2012.

Proceso	Residuo obtenido	Pérdida en kg
Despulpado	Pulpa fresca	43.6
Lavado	Mucílago	14.9
Secado	Agua	17.1
Trillado	Pergamino y película plateada	4.2
Torrefacción	Volátiles	2.2
Preparación de la bebida	Borra	10.4
Pérdida total	Residuos	92.4

2.6.1 Usos alternativos

Ante esta realidad se han realizado muchos estudios para aprovechar la pulpa de café y disminuir su efecto tóxico en el ambiente. Dentro de esas alternativas destacan el ensilaje destinado a la alimentación animal (Noriega *et al*, 2009), la pulpa como fuente alternativa de antioxidantes (Días, 2011), como fuente de cuatro clases principales de polifenoles (flavan-3-oles, ácidos hidroxicinámicos, flavonoles y antocianidinas) (Ramírez-Coronel *et al.*, 2004), la producción de biogás y lodos de digestión que son factibles para ser usados como bioabonos y alimento animal (Terry *et al.*, 2005), el compostaje o lombricompostaje para fertilización de los cultivos (Blandón *et al.*, 2009), entre otros.

2.7 Caracterización de la pulpa de *C. arabica*

Conocer las características de la pulpa de café permite aplicar estrategias de manejo de dichos residuos, que estén al alcance de los productores, para mitigar el impacto al medio ambiente.

2.7.1 Caracterización físico – química

Algunos estudios realizados en relación a las características físicas y químicas han indicado su uso potencial en la alimentación animal. A través de tales investigaciones se ha podido establecer que la pulpa de café posee factores anti-nutricionales (o tóxicos) que limitan su uso en la alimentación animal, particularmente de animales monogástricos (Molina *et al*, 1990). Se ha podido establecer que dentro de tales factores los más nocivos son cafeína, polifenoles, taninos y el alto contenido de fibra de la pulpa. Consecuentemente, se han investigado alternativas para detoxificar este material que representa el subproducto más abundante del beneficiado del café. Noriega *et al.* (2009) señalaron que a los 120 días de ensilaje de pulpa de café se registraron valores muy bajos de taninos, lo que le proporcionan alto valor nutricional y

potencialmente podría ser recomendada en la elaboración de dietas para animales. Otra alternativa para disminuir la concentración de factores anti – nutricionales es el proceso de fermentación sólida usando *Aspergillus niger*. A través de este proceso se ha podido reducir los niveles de cafeína, polifenoles y fibra de la pulpa. Otros estudios realizados han señalado que la pulpa de café puede ser una fuente de fitoquímicos, útiles para la industria alimentaria y farmacéutica. Ramirez-Coronel *et al*, (2004) encontraron cuatro clases principales de polifenoles (flavan-3-oles, ácidos hidroxicinámicos, flavonoles y antocianidinas) en la pulpa de *C. arabica*.

2.7.2 Caracterización microbiológica

Debido a la compleja naturaleza de la pulpa de café en estado de fermentación, la caracterización microbiológica presenta muchas dificultades. Los microorganismos de muestras tan dinámicas suelen ser incultivables y es por ello que se utilizan técnicas moleculares. La obtención de DNA de calidad adecuada y en cantidades suficientes es una etapa crítica del análisis de las comunidades microbianas, estos métodos son susceptibles a contaminantes tales como ácidos húmicos, metales y xenobióticos que interfieren con el proceso de extracción (He *et al.*, 2009), además de los metabolitos secundarios que los mismos microorganismos producen como ácidos grasos, alcoholes y cetonas. Es difícil eliminar eficazmente los contaminantes que inhiben la actividad de las enzimas utilizadas en la obtención del DNA de estos tipos de muestras. Guillén *et al.* (2015) compararon 3 métodos de laboratorio y 2 kits para extracción de DNA de muestras ambientales complejas, entre ellas la pulpa de café en descomposición. El método de extracción que presentó mejores resultados fue el método de Lisozima, aunque con aproximadamente 10% de impurezas, esto impidió realizar la técnica de PCR para la identificación de los microorganismos.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Siendo la industria del café uno de los principales factores de desarrollo del municipio de la Concordia, se convierte a su vez en una actividad que trae consigo una problemática ambiental generada por el inadecuado tratamiento, aprovechamiento y/o disposición final de los residuos resultantes en el beneficio de ésta.

Anualmente se produce una cantidad considerable de materia orgánica representada por material vegetal en los diversos procesos de la producción agrícola, pero solo una cierta parte de esta producción es aprovechada directamente para la alimentación humana y animal, dejando a la deriva una gran cantidad de mal llamados desechos, los cuales se convierten en un potencial de contaminación ambiental. El producto agrícola más importante en el mundo es el café, generando solo en México, alrededor de 450 mil toneladas al año de residuos sólidos, de los cuales el 40% se generan en Chiapas. El vertimiento de dichos residuos en botaderos a cielo abierto, cerca de las zonas de beneficio esparcidas en los terrenos y a las fuentes de agua es la alternativa de manejo actual hacia un producto que aún es visto en la zona de los Cuxtepeques, del municipio de la Concordia como en otros lugares del país como un residuo especial y de difícil manejo.

4. JUSTIFICACIÓN

El creciente desarrollo económico impulsado por el afán del ser humano de satisfacer sus necesidades básicas, éstas cada vez más exigentes, trae consigo el también creciente y constante deterioro del medio ambiente generado por la explotación desmesurada de los recursos bióticos.

La zona de los Cuxtepeques, del municipio de la Concordia, tiene como principal factor de desarrollo económico la siembra y beneficio del café, gracias a su privilegiada ubicación y calidad de los suelos para dicha actividad. En la actualidad la generación de los residuos sólidos derivados de esta actividad económica se está convirtiendo en una problemática para este municipio y la zona cafetera donde no hay estrategias claras para el aprovechamiento, tratamiento y disposición final de los residuos resultantes del beneficio húmedo del café.

Si todo este material vegetal generado no se maneja y dispone de forma apropiada, se convierte en fuente de contaminación de los recursos naturales presentes en la zona cafetalera, por lo cual es de suma importancia generar diferentes prácticas y procesos para el manejo, tratamiento y valorización de estos residuos, de forma que se logren evitar impactos ambientales adversos en el ecosistema cafetero, y que se puedan generar, a partir de estos residuos, procesos de producción limpia que le permiten a los productores alcanzar la certificación de sus fincas y comercializar su café con un valor agregado.

La posibilidad de aprovechamiento de un residuo que en su totalidad es orgánico, se convierten en distintas alternativas propuestas para el manejo inteligente del agua y de los subproductos del café en el proceso de beneficio húmedo, de forma que el impacto ambiental sea reducido en el ecosistema cafetero y que le permitan contribuir a la rentabilidad del negocio cafetero. Además de que el estudio microbiológico permita estudiar la riqueza microbiana de los residuos sólidos del café, principalmente en bacterias y levaduras, de esta manera aportar soluciones para el manejo en usos alternativos y el desarrollo de tecnologías locales para mitigar el impacto ambiental.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general:

Analizar la composición físico-química y microbiológica en la degradación de los residuos sólidos en proceso de degradación derivados del beneficio húmedo de *Coffea arabica*, que contribuyan al manejo integral de residuos en la zona de los Cuxtepeques, del municipio de la Concordia, Chiapas..

5.2 Objetivos específicos:

- Determinar las características físico-químicas de los residuos sólidos generados durante el beneficio húmedo de café en la región de la finca de los Cuxtepeques.
- Estandarizar el método de extracción de DNA para muestras de pulpa de café en proceso de degradación.
- Identificar grupos microbianos de los residuos sólidos por medio de la técnica de PCR en tiempo real.
- Elaborar propuestas sustentadas en los resultados de este estudio para el control de los residuos sólidos

CAPÍTULO 2

6. METODOLOGÍA

6.1 Sitio de muestreo

Las muestras de residuos sólidos fueron colectadas en la región de los Cuxtepeques (15°45'52.8"N, 92°58'03.4"W) localizada en el municipio de La Concordia en Chiapas, México en el mes de Enero de 2017. Para cada muestra se tomaron aproximadamente 1000 g de pulpa e inmediatamente se almacenaron en una hielera para detener el proceso de descomposición natural.

Tabla 2.1. - Descripción de las muestras.

Número de muestra	Especie	Altitud del cultivo	Tiempo de degradación (semanas)
0	<i>Coffea arabica</i>	1600 msnm	0
1			1
2			2
3			3
4			4

Fuente: Elaboración Propia

6.2 Localización del área de estudio

Los análisis para la caracterización físicos – química y microbiológica de las muestras se llevaron a cabo en los laboratorios de Bromatología y Genética respectivamente, dentro de las instalaciones de los Laboratorios Institucionales en el edificio C ubicado en El Colegio de la Frontera Sur unidad San Cristóbal.

6.3 Análisis bromatológicos

Para la caracterización físico-químicos de los residuos sólidos se realizó el Análisis Químico Proximal (AQP), la determinación de un factor anti nutricional y energía calorífica. Las pruebas se realizaron por duplicado.

6.3.1 Pre tratamiento de la muestra

Las muestras se ingresaron en estufas a una temperatura de 55°C para su deshidratación durante 4 días, los dos primeros días moviendo la muestra con regularidad para favorecer el secado y evitar cualquier alteración debido al desarrollo de procesos enzimáticos que afecten el contenido nutricional. Luego se pasaron por un molino de cuchillas marca THOMAS-Wiley®, se tamizaron en malla de 1mm y se almacenaron en frascos de plástico con tapa hermética.

6.3.2 Humedad

Las muestras se deshidrataron en una estufa marca Binder® a 100°C por un periodo de 4 h.

$$\% \text{ de Humedad} = \frac{\left(\text{Peso del crisol con} \right)_{\text{muestra húmeda}} - \left(\text{Peso del crisol con} \right)_{\text{muestra seca}}}{\text{Peso de la muestra húmeda}} \times 100$$

6.3.3 Cenizas

Siguiendo la NMX-F-607-NORMX-2002 se realizó la determinación de cenizas en las siguientes condiciones. Las muestras se carbonizaron en una parrilla eléctrica para luego incinerarlas en una mufla marca Felisa® a 550°C durante 6 h.

$$g \text{ Cenizas} / 100g \text{ de muestra} = \left(\frac{C - A}{B} \right) \times 100$$

Dónde: A = peso en gramos del crisol vacío; B = peso en gramos de la muestra;

C= peso en gramos del crisol con ceniza.

6.3.4 Análisis del contenido de grasas

Para la determinación de extracto etéreo en alimentos se siguió la NMX-F-615-NORMEX-2004 basándose en el método Soxhlet. Para la extracción se utilizó éter de petróleo como disolvente con ciclos de recirculación de aproximadamente 35 min, la extracción se efectuó durante 7 h. Los matraces se secaron a una temperatura de 100°C durante 2 horas en un horno marca Binder®.

$$\% \text{ extracto etereo} = \frac{(c - d) - a}{b} \times 100$$

Donde:

a = peso constante del matraz de ebullición; b = peso de la muestra; c = peso del matraz con grasa; d = peso del matraz del blanco.

6.3.5 Determinación de proteína cruda

Para el desarrollo de esta metodología se siguió la NMX-F-608-NORMEX-2011 para la determinación de proteínas en alimentos con el método Kjeldahl. La digestión de las muestras se realizó con 1.5 g de mezcla catalizadora y 5 mL de ácido concentrado en un block digestor a 380°C durante 100 min. A las muestras digeridas se les agrego agua destilada tipo II y 20 mL de solución de hidróxido de sodio 10N. La destilación fue con ácido bórico al 1% con mezcla de indicadores rojo de metilo y verde de bromocresol, por último, la titulación se llevó a cabo con ácido sulfúrico 0.0506 N valorado.

$$\% \text{ Nitrogeno} = \frac{(Va - Vb \times N \times 0.014)}{P} \times 100$$

$$\frac{\text{g Proteína}}{100 \text{ g de muestra}} = \% \text{ Nitrogeno} \times \text{FTP}$$

Dónde:

Va=volumen de ácido sulfúrico (mL) gastados en la titulación de la muestra.

Vb = Volumen de ácido sulfúrico (mL) gastados en la titulación del blanco.

N = Normalidad del ácido sulfúrico valorado.

P = Peso de la muestra en gramos.

0.014 = Mili equivalentes del nitrógeno.

FTP = Factor de Transformación a Proteína Cruda. 6.2

6.3.6 Determinación del contenido de fibra cruda

El análisis de fibra cruda se realizó en un digestor/analizador ANKOM® 200/220 siguiendo la metodología de este equipo. Las muestras se colocaron en bolsas para análisis marca ANKOM® F57 y se sellaron con el equipo marca ANKOM® 1915. La digestión se realizó con ácido sulfúrico 0.255 N durante 30 min a 100°C en agitación y después con hidróxido de sodio 0.313 N en las mismas condiciones. El secado se llevó a cabo en una estufa marca Binder® a 100°C durante 2 h y la incineración en una mufla marca Felisa® a 550°C por 6 h.

$$\% \text{ Fibra cruda} = \frac{[(Ps - Pv) - (Pcp - Pc)] - (Pb - Pc)}{M} \times 100$$

Dónde:

Ps = peso seco de la muestra más el peso de la bolsa para análisis.

Pv = peso de la bolsa para análisis vacía.

Pcp = peso de cenizas de la muestra más el peso del crisol.

Pc = peso constante del crisol.

Pb = peso de cenizas del blanco más el peso del crisol.

M = peso de la muestra

6.3.7 Análisis del contenido de azúcares reductores

La determinación de azúcares reductores totales se realizó por la técnica de DNS. Se agregó H₂SO₄ al 1.5 M a las muestras para hidrolizar los polisacáridos, se incubaron en baño maría en ebullición por 20 min con agitación ocasional. Pasado el tiempo se adicionó NaOH al 10%. La preparación de la curva de calibración se realizó a partir de una solución de glucosa a una concentración de 15 mg/mL y se prepararon las diluciones como se muestra en la tabla 2.2. Para la oxidación de los azúcares reductores totales, a un tubo de ensayo se agregó 1 mL de la solución problema, 2 mL de agua destilada y 1 mL del reactivo DNS. Para el blanco se utilizó agua destilada como solución problema. Durante 15 min se colocaron en un baño maría en ebullición y se enfriaron con hielo para posteriormente agregar 16 mL de agua destilada. Todas las muestras se leyeron a 540 nm en un espectrofotómetro.

Tabla 2.2.- Preparación de la curva de calibración utilizando glucosa como estándar.

Punto de curva	mL de solución madre (15mg/mL)	Concentración (mg/mL)	Aforo
Blanco	0	0	25 mL
1	1.5	0.9	
2	2.0	1.2	
3	2.5	1.5	
4	3.0	1.8	
5	3.5	2.1	

Fuente: Elaboración propia

6.3.8 Carbohidratos

Para la obtención de este factor se aplicó la siguiente fórmula:

$$C = 100 - (\% \text{ Humedad} + \% \text{ Cenizas} + \% \text{ Proteína cruda} + \% \text{ Grasa} + \% \text{ Fibra cruda})$$

6.3.9 Taninos condensables

La extracción se realizó con metanol absoluto en agitación durante 20 min. La preparación de la curva de calibración se realizó a partir de una solución de catequina a una concentración de 5 mg/mL y se prepararon las diluciones como se muestra en la tabla 2.3. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro UV – Vis a una longitud de onda de 500 nm.

Tabla 2.3.- Preparación de la curva de calibración utilizando catequina como estándar.

Punto de curva	mL de solución madre (5mg/mL)	Concentración (mg/L)	Aforo
Blanco	0	0	50 mL
1	2	200	
2	4	400	
3	6	600	
4	8	800	
5	10	1000	

Fuente: Elaboración propia.

6.3.10 Energía calorífica

La determinación de este factor se llevó a cabo en un calorímetro de bomba de oxígeno marca Parr Instrument® modelo 1341 y se siguieron las instrucciones de operación de este equipo. Se elaboraron tabletas circulares de las muestras en una prensa de comprimidos marca Parr Instrument® modelo 2811, para esto se pesó la muestra y se agregaron 3 gotas de agua destilada con el fin de lograr una mayor compactación, siempre procurando de que la pastilla no pesara más de un gramo. La pastilla se colocó en el crisol de acero inoxidable, se cortaron 10 cm de alambre de ignición y se amarró firmemente a los electrodos de la bomba de oxígeno como se muestra en la figura 2.1, asegurándose que el alambre toque la muestra, se cerró la bomba y se presurizó con oxígeno a 35 atm. La bomba de oxígeno se introdujo a la cubeta oval que a su vez se encontraba dentro de la camisa adiabática, luego se agregaron 1400 mL de agua a la cubeta oval, tratando

de que la temperatura estuviera entre 19 y 23 °C, por último se colocó la tapa del calorímetro. Una vez instalado el equipo, se encendió el agitador para alcanzar el equilibrio térmico entre los componentes del sistema, logrado esto se registró la temperatura a los 0, 5 y 10 min. En el minuto 10 se presionó el interruptor para accionar la ignición y se registraron las temperaturas del minuto 10 al minuto 26 en intervalos de 30 segundos. Se desmontó el calorímetro con cuidado y con una pisseta se agregaron aproximadamente 50 mL de naranja de metilo al interior de la bomba de oxígeno a modo de lavado, estos residuos se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 125 mL para ser titulado con NaOH.

$$\frac{\text{cal}}{\text{g}} = \frac{[(\text{Temperatura} \times 1876) - (1400 \times P_{\text{neto}}) - (1.38 \times \text{mL NaOH})]}{P_m}$$

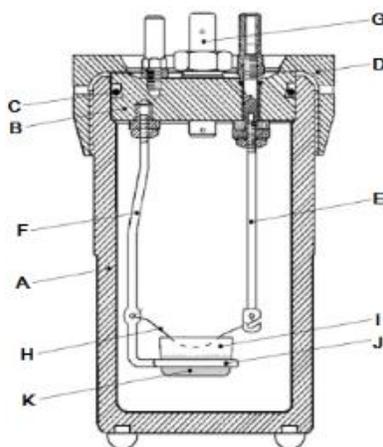


Figura 2.1.- Diseño esquemático de la bomba de oxígeno. A. Cuerpo de la bomba; B. Cabeza de la bomba; C. Anillo viton; D. Tapa roscada; E. Electrodo aislado de la cabeza de la bomba; F. Soporte del electrodo unido a la cabeza de la bomba; G. Válvula de entrada de oxígeno; H. Alambre de ignición; I. Crisol de acero inoxidable; J. Soporte del crisol; K. Muestra. Fuente: Santos, C. (2010).

6.4 Extracción de DNA

Debido a la alta complejidad de las muestras, se realizaron tratamientos previos para eliminar contaminantes que puedan afectar la obtención de un DNA de buena calidad. El pretratamiento de las muestras consistió en la eliminación de ácidos

grasos volátiles y en lavados con buffer de fosfatos. Todos los materiales utilizados fueron esterilizados por calor húmedo a 15 lb/pulg² por 15 min.

6.4.1 Extracción de ácidos grasos volátiles (AGV's)

Se emplearon 2 técnicas de extracción de AGV's aplicadas a diferentes muestras, por lo que no son específicas para muestras de pulpa de *Coffea arabica*.

6.4.1.1 Técnica de Folch

Esta técnica se basa en la propiedad de los disolventes orgánicos, como el cloroformo, para solubilizar los ácidos grasos. La metodología se tomó de Ayala *et al*, (2008) quienes la aplican para la extracción de grasas en frío de carne de bovino y se modificó para extraer los ácidos grasos volátiles de las muestras de estudio.

Se pesaron aproximadamente 20 mg de muestra, a las cuales se les agregó 1 mL de reactivo de Folch (Cloroformo/metanol 2:1), se agitaron en vortex por 1 min y luego se centrifugaron a 13,000 rpm durante 5 min, se desechó el sobrenadante y se lavó una vez más.

6.4.1.2 Método de ácido fosfórico

Este método de extracción de AGV's se tomó de Moreno *et al*, (2007) quienes realizan este método para la cuantificación de ácidos grasos volátiles presentes en materia fecal de conejos y fue modificado para las muestras de pulpa de *C. arabica* en descomposición.

Se pesaron aproximadamente 20 mg de muestra, se agregaron 20 µL de ácido fosfórico al 85%, 1 mL de acetona y 200 µL de agua destilada. Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm por 30 min a 4°C después de haber mezclado en

vortex durante 20 s, el sobrenadante que contenía los ácidos grasos fue eliminado.

6.4.2 Lavado con buffer de fosfatos

De acuerdo con LaMontagne *et al* (2002), los lavados con Buffer de fosfatos ayudan a reducir el DNA extracelular y los contaminantes orgánicos solubles. Es por ello que Yang *et al*, (2007) realiza estos lavados para muestras de compost, este método fue modificado para las muestras de estudio.

A las muestras pretratadas con métodos de extracción de AGV's se les agregó 1 mL de Buffer de Fosfatos (pH 7.4) y se mezclaron en vortex durante 5 min para luego centrifugar a 8,000 rpm durante 10 min a una temperatura de 4°C, el sobrenadante se desechó y las muestras fueron lavadas una vez más.

6.4.3 Método CTAB 2X

Este método de extracción de DNA se tomó de Doyle & Doyle (1987) para muestras vegetales (hojas y corteza) y fue modificado para las muestras de pulpa de *Coffea arabica* en descomposición.

6.4.3.1 Extracción de DNA

1 mL de solución CTAB 2X (2% w/v) fue agregado a la muestra pretratada, se mezcló en agitador tipo vortex durante 20 segundos para luego incubar por 30 min a 65°C agitando las muestras cada 3 min. Pasado el tiempo de incubación se agregaron 3 µL de mercaptoetanol, se agitó en vortex por 20 seg y se incubó a 65°C toda la noche. Posteriormente se agregaron 400 µL de acetato de amonio frío (7.5 m L⁻¹; pH 5) y se centrifugó a 13,000 rpm durante 8 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio, se agregó un volumen de cloroformo/octanol (24:1)

frío y se centrifugó a 8,000 rpm durante 10 min a 4°C, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se repitió el lavado una vez más. El sobrenadante se transfirió a tubos que contenían 700 µL de etanol frío al 96%, se agitó suavemente con la mano y se incubó a -20°C toda la noche. Luego de la incubación en frío, se centrifugaron las muestras a 13,000 rpm durante 8 min y se eliminó el sobrenadante por decantación, se centrifugó a 13,000 rpm durante 8 minutos después de haber agregado al pellet 300 µL de etanol frío al 80%, se eliminó el sobrenadante por decantación y se centrifugó en un concentrador de DNA por 6 min a temperatura ambiente, luego se hidrataron las muestras con 40 µL de agua libre de nucleasas y se almacenaron a -20°C.

6.4.4 Electroforesis

Se verificó la presencia de DNA y la calidad del mismo mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X añadiendo 4 µL de muestra y 2 µL de Azul de Bromofenol 6X. Las condiciones de corrimiento fueron a 80 V durante 50 min, pasado este tiempo, el gel se incubó en una solución de bromuro de etidio por 15 min para luego ser observado en un transiluminador UV Kodak®.

6.4.5 Cuantificación de DNA

Se continuó con la cuantificación y verificación de la calidad del DNA en un espectrofotómetro marca NanoDrop® 2000c de Thermo Scientific, con una alícuota de 1 µL utilizando como blanco 1 µL de agua estéril libre de nucleasas. Considerando calidad aceptable una relación A260/A280 de entre 1.6 a 2.0.

CAPÍTULO 3

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Caracterización físico – química

Los resultados obtenidos en esta etapa (Tabla 3.1) se analizaron a partir de cinco tratamientos que representaron los diferentes tiempos en descomposición de la pulpa de café y dos repeticiones. Los valores de las variables cuantificadas a las 0, 1, 2, 3 y 4 semanas se analizaron estadísticamente por medio de Análisis de Varianza Simple y las comparaciones de los valores promedios se realizó por la prueba de diferencia mínima significativa al 5% de probabilidad en el software Statgraphics Centurion®.

Tabla 3.1.- Resultados del análisis físico - químico de la pulpa de café en diferentes tiempos de descomposición. Los resultados expresados son las medias obtenidas de cada muestra. a, b, c, d, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Determinación	Tiempo en descomposición (semanas)				
	0	1	2	3	4
Humedad (%)	4.79 ^C ±0.96	3.05 ^a ±0.101	5.24 ^c ±0.333	3.42 ^{ab} ±0.24	4.59 ^{bc} ±0.145
Cenizas (%)	8.17 ^a ±0.02	10.16 ^b ±0.01	10.69 ^{bc} ±0.01	11.12 ^c ±0.04	20.54 ^d ±0.499
Grasa (%)	1.17 ^{ab} ±0.10	1.65 ^d ±0.05	1.60 ^{cd} ±0.08	1.41 ^{bc} ±0.04	1.16 ^a ±0.152
Proteína cruda (%)	9.72 ^a ±0.0	12.53 ^b ±0.02	13.34 ^c ±0.34	12.26 ^b ±0.31	15.89 ^d ±0.062
Fibra cruda (%)	12.53 ^a ±0.61	16.53 ^b ±0.02	19.28 ^d ±0.44	18.34 ^c ±0.22	23.72 ^e ±0.130
Azúcares reductores (%)	52.81 ^d ±0.752	36.61 ^c ±0.6	36.47 ^c ±0.60	29.17 ^b ±0.85	23.88 ^a ±0.973
Carbohidratos (%)	63.41 ^e ±0.64	56.01 ^d ±0.07	49.82 ^b ±0.38	53.74 ^c ±0.94	34.11 ^a ±0.267
Taninos condensables (%)	0.55 ^d ±0.008	0.72 ^e ±0.0	0.18 ^a ±0.008	0.25 ^c ±0.008	0.22 ^b ±0.0
Energía calorífica (cal/g)	4117.55 ^b ±91.55	4100.53 ^b ±119.4	3897.61 ^{ab} ±68.64	3982.61 ^{ab} ±125.2	3787.18 ^a ±11.6

7.1.1 Humedad

Debido a que el área donde se disponen los residuos sólidos no está protegida ni se tiene un control sobre la humedad, este factor presenta muchas fluctuaciones conforme pasa el tiempo y no presenta tendencia definida de aumento o disminución en relación al tiempo de degradación. Presentó un valor promedio entre los 5 muestreos de 4.21%, siendo 5.24% el más alto en la semana 2 con una diferencia significativa con el valor más bajo en la semana 1 con un porcentaje del 3.05%. Los valores restantes no tuvieron diferencia mínima significativa. Estos resultados indican que este parámetro se mantuvo constante lo cual es importante ya que con materiales muy húmedos se presentan pérdidas de nutrientes por efecto del drenado de agua en exceso.

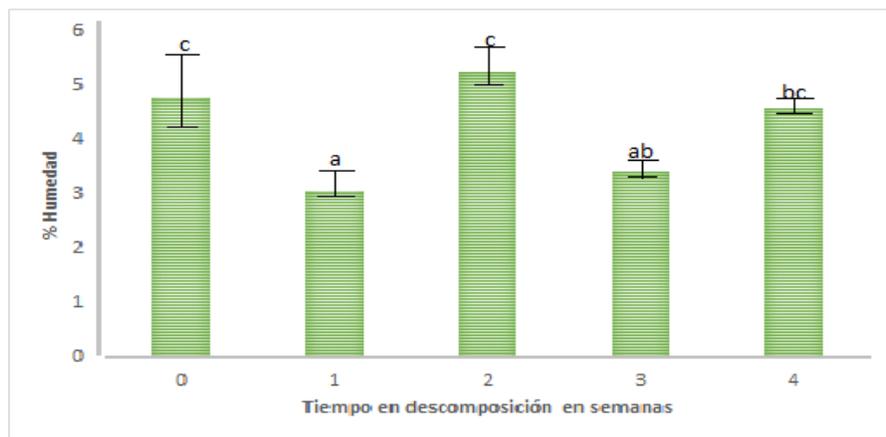


Figura 3.1.- Medias del % de humedad de la pulpa de café a diferentes tiempos de descomposición. Método de Fisher LSD con un nivel de confianza del 95%, indicando diferencia mínima significativa aquellas que tienen letras diferentes.

7.1.2 Cenizas

El contenido de cenizas se incrementó a medida que aumentó el tiempo de descomposición como se puede observar en la Figura 3.2, este incremento concuerda con lo reportado por Noriega *et al.* (2009) quienes evaluaron el contenido de cenizas en pulpa de café a diferentes tiempos de ensilaje, aunque

presentan valores menores para esta determinación, obteniendo 12.46% a los 90 días, comparado con los 20.54% obtenidos a los 28 días, quienes también reportaron porcentajes por debajo de los 15% fueron Braham y Bressani (1978) y Ferrer *et al*, (1995) en pulpa de café a 30 días de fermentación. En este estudio, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de cenizas para las semanas 0, 1, 3 y 4 demostrando que el tiempo es un factor determinante para el aumento del contenido de cenizas, esta es una característica deseable en un alimento para que pueda proporcionar niveles apropiados de minerales necesarios en las dietas para animales tal y como fue reportado por Parra *et al.*, (2009).

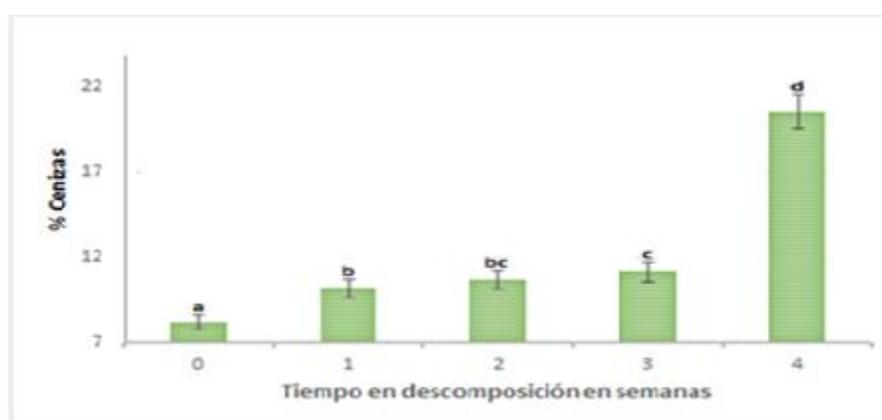


Figura 3.2.- Medias del % de Cenizas a diferentes tiempos de descomposición. Para el análisis estadístico se utilizó el método de Fisher LSD con un nivel de confianza del 95%, indicando diferencia mínima significativa aquellas que tienen letras diferentes.

7.1.3 Contenido de grasa

Los valores del contenido de grasa que se encontraron en el estudio permitieron determinar que existieron diferencias significativas sólo entre los tiempos 1 y 4, el mayor porcentaje de extracto etéreo se obtuvo en la semana 1 con 1.66%, el cual presentó una diferencia mínima significativa con los tiempos 0, 3 y 4 (Figura 3.3). Comparando los resultados de este experimento con los reportados por Noriega *et al.* (2009) y Ferrer *et al.* (1995), se obtuvo un bajo contenido de grasas, reportaron un 3.86% y 5.02% respectivamente de extracto etéreo en pulpa de café sin

fermentar mientras que en este trabajo se obtuvo 1.19%. Estas discrepancias entre los valores encontrados y los señalados en la literatura se pueden explicar debido a que las pulpas analizadas se sometieron a diferentes tiempos de fermentación y no se le adicionó aditivo como lo hizo Ferrer et al. (1995). Durante la fermentación anaeróbica se favorece la actividad enzimática de los microorganismos presentes en la pulpa de café, la cual es muy rica en azúcares fermentables, estos azúcares pudieron contribuir hasta cierto límite con la formación de sustancias solubles en compuestos orgánicos

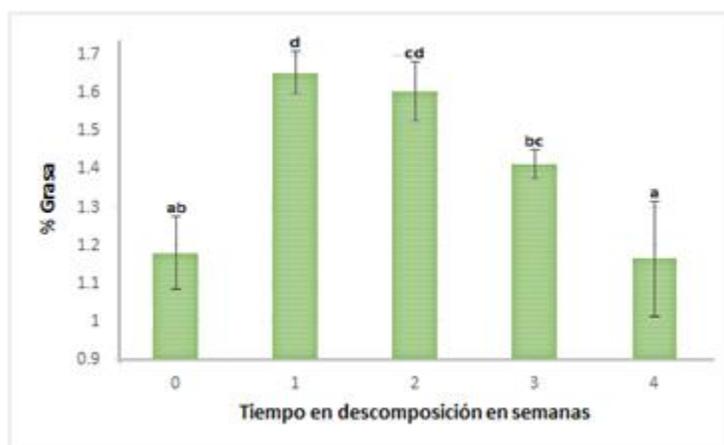


Figura 3.3.- Medias del % de Extracto etéreo de la pulpa de café a diferentes tiempos de descomposición. Método de Fisher LSD con un nivel de confianza del 95%, indicando diferencia mínima significativa aquellas que tienen letras diferentes.

7.1.4 Proteína cruda

El valor promedio de la concentración de proteína cruda en todos los tiempos de descomposición fue de 12.75%; iniciando con 9.72% en peso seco y tuvo tendencia al alza llegando a 15.89% en la cuarta semana, superando lo reportado por Villalba *et al.* (2011) donde el porcentaje de proteína al inicio y a los 21 días fue de 3.87 y 11.65% respectivamente. Este incremento de proteína con el paso del tiempo se debe a la producción de biomasa, principalmente de levaduras, ya que contienen entre 40 y 45% de proteína en base seca. Noriega *et al.* (2009), clasificaron a los alimentos para animales como de regular calidad cuando contiene valores entre 7 y 9% de proteína y de buena calidad con valores mayores

a 9%, los valores de proteína cruda obtenidos en estos análisis superaron los valores antes señalados lo que significa que el contenido de proteína cruda en la pulpa de café se torna como un alimento de particular valor nutricional.

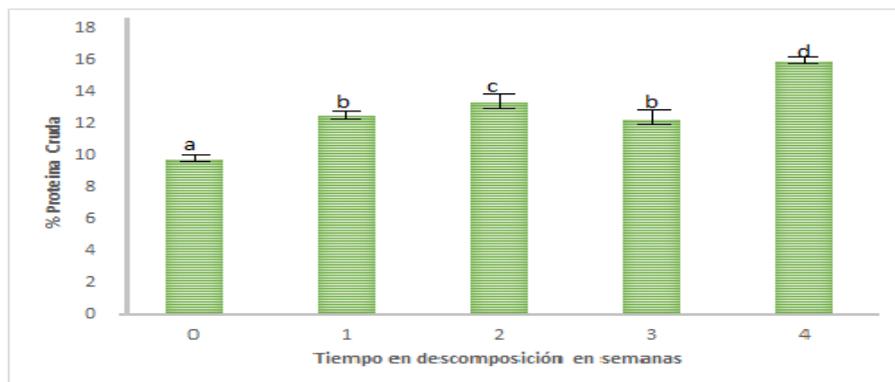


Figura 3.4.- Medias del contenido de proteína cruda de la pulpa de café a diferentes tiempos de descomposición. Método de Fisher LSD con un nivel de confianza del 95%, indicando diferencia mínima significativa aquellas que tienen letras diferentes.

7.1.5 Fibra cruda

El contenido de fibra cruda presente en la pulpa de café se observa en la Figura 3.5, como puede apreciarse, el proceso de degradación natural ayuda a aumentar el contenido de fibra cruda, todos los valores presentan diferencia estadística significativa entre ellas, presentando la mayor concentración en la semana 4 (23.67%). Al igual que la proteína cruda, el aumento de fibra se atribuye a la producción de biomasa, los hongos contienen entre 10 y 15% de fibra, la mayoría presente en la pared celular. Es posible que el alto contenido de fibra cruda sea un factor limitante en la utilización de la pulpa de café. Van Severen & Carbonell (1999) caracterizaron la pulpa de café para evaluar su digestibilidad y obtuvieron un 19.3% de fibra cruda mientras que Martínez (1998) reportó un contenido del 27.45% para evaluar posibles usos económicos.

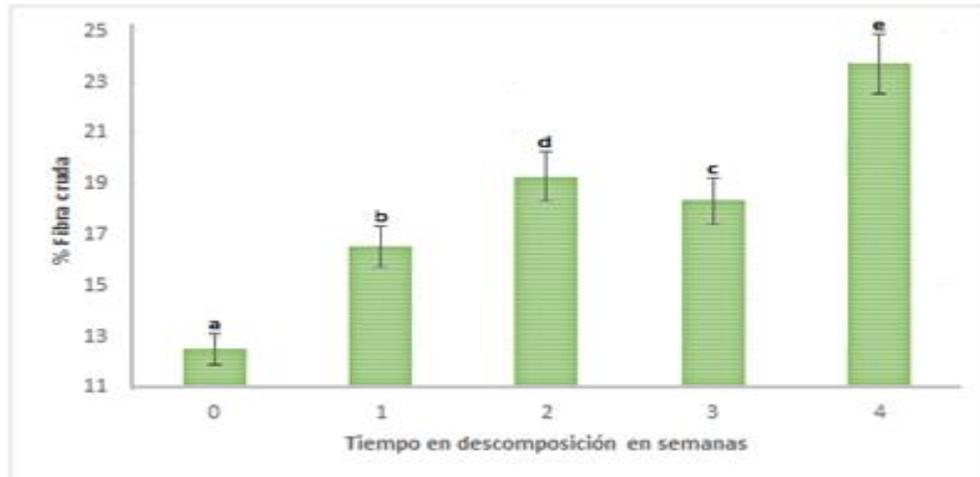


Figura 3.5.- Medias del contenido de Fibra cruda. Análisis LSD con un nivel de confianza del 95%, indicando diferencia mínima significativa aquellas que tienen letras diferentes.

7.1.6 Azúcares reductores

El tiempo es un factor que determinó la concentración de azúcares reductores con tendencia a disminuir como se observa en la Figura 3.6, presentando diferencias significativas entre las medias. Esta tendencia a disminuir se debe al proceso de fermentación natural donde los microorganismos, básicamente bacterias y levaduras mediante sus enzimas naturales oxidan parcialmente los azúcares y producen energía (ATP), etanol, ácido láctico y acético, alcoholes, sustancias olorosas como aldehídos, cetonas y esteres y dióxido de carbono. El porcentaje de azúcares reductores en peso seco de la pulpa de café fue mayor comparándola con lo reportado por Samayoa *et al.* (2014) y Urbaneja *et al.* (1997) quienes evaluaron la concentración de esta característica en pulpa de café fresca obteniendo 12.40% y 21.82% respectivamente, mientras que para la muestra en el tiempo 0 de este estudio se obtuvo un 52.81%.



Figura 3.6.- Comparación gráfica de medias del % de Azúcares reductores en pulpa de café. Indican diferencia mínima significativa aquellas que tienen letras diferentes con un nivel de confianza del 95%.

7.1.7 Carbohidratos

La tendencia en el comportamiento de los carbohidratos fue a la baja, disminuyeron con el tiempo de degradación de la pulpa. Hubo diferencias significativas a nivel de tratamientos, encontrándose en la última semana los menores valores (34.11%), lo que explica el aumento de los valores de proteína cruda para ese mismo tiempo debido a que se consumen los carbohidratos para producir biomasa (alto contenido de proteína). Los resultados obtenidos por Ferrer et al. (1995) y Noriega et al. (2009) de carbohidratos fue de 61.46% y 60.29% respectivamente, similares al obtenido al momento de iniciar el ensayo.

En la formulación de un determinado alimento, se desea un bajo valor de carbohidratos, pero altos valores en otros compuestos como proteína, grasa y en algunos casos de fibra. De igual forma, Ferrer et al. (1995) señalan que fracciones con altos valores de carbohidratos (61.46%) limitan la utilización de la pulpa de café en la alimentación de bovinos, aunque ese obstáculo se eliminaría con la incorporación de melaza y tubérculos en la dieta

7.1.8 Taninos condensables

Para esta variable, el tiempo de degradación afectó significativamente la concentración de taninos presente en la pulpa como se puede observar en la Figura 3.7. El valor promedio de taninos (0.39%) fue inferior en relación a los reportados por Braham y Bressani (1978) de 1.8 a 8.5% y Ferrer *et al.* (1995) de 1.95%, mientras que Noriega *et al.* (2009) reportaron un promedio de 0.23%. Se considera que los taninos junto a sustancias pépticas totales, cafeína, ácido clorogénico y ácido caféico total son responsables de la toxicidad de la pulpa, por lo que se presume que el hecho de tener la pulpa de café por tanto tiempo fermentada estimula la actividad de las reacciones enzimáticas que pueden convertirlas en sustancias inocuas.

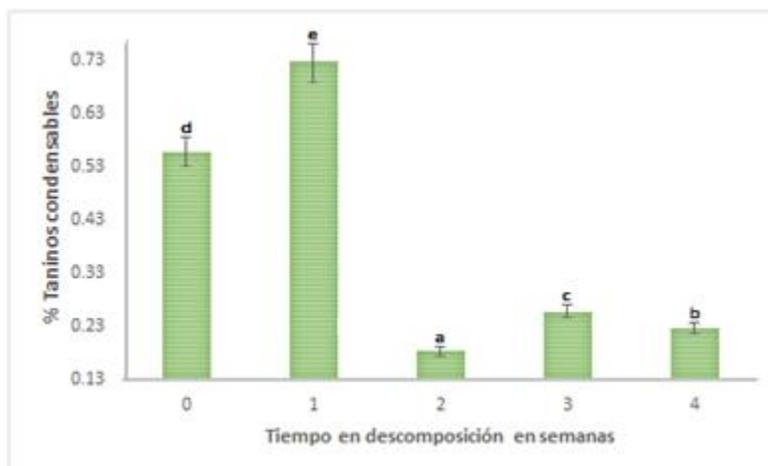


Figura 3.7.-Comparación de las medias de los porcentajes de Taninos condensables.

7.1.9 Energía calorífica

El valor promedio de energía calorífica en todos los tiempos de degradación es de 3977.10 cal/g de pulpa seca con tendencia a disminuir, iniciando con un valor de 4117.55 cal/g y después de las 4 semanas de degradación natural se presentó un valor de 3787.18 cal/g como se puede observar en la Figura 3.8. Estos valores concuerdan con lo escrito por Porres *et al.* (1987) quienes reportan un poder calorífico igual a 3792.87 cal/g de pulpa de café seca para evaluar su uso como

combustible directo. Otros autores reportan su posible uso para producción de biogás como Calle (1974) y Arcila (1979) quienes reportan un valor calórico de 128.9 cal/g de pulpa fresca. Esta diferencia entre el poder calórico de la pulpa seca y fresca se debe al alto contenido de humedad en esta última disminuyendo su capacidad de desprender energía.

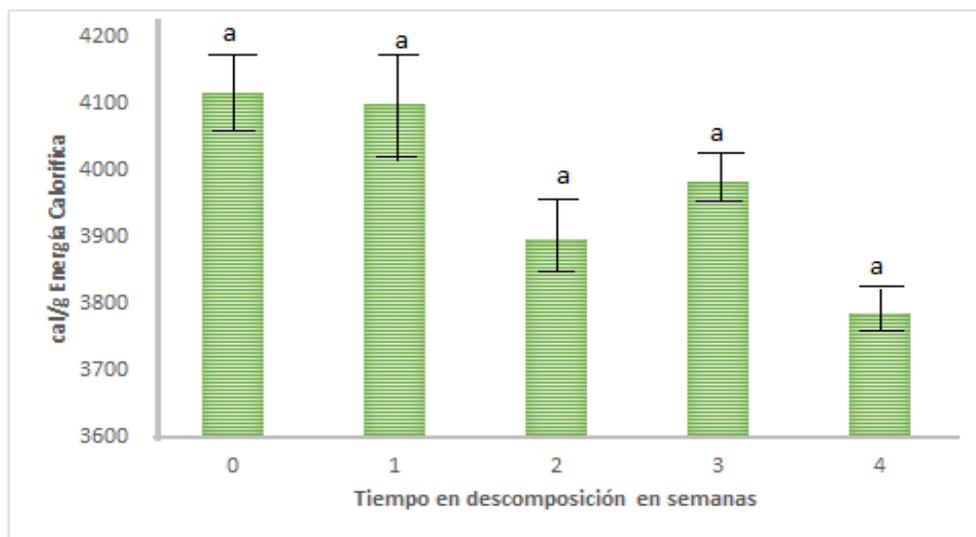


Figura 3.8.- Gráfica de medias de la energía calorífica de la pulpa de café a diferentes tiempos de descomposición. Método de Fisher LSD con un nivel de confianza del 95%, indicando diferencia mínima significativa aquellas que tienen letras diferentes.

7.2 DNA total obtenido de la pulpa de café para su caracterización microbiológica

Tabla 3.2.- Concentración y calidad de las extracciones de DNA a partir de pulpa de café en diferentes tiempos de degradación. Las extracciones se hicieron por duplicado con el método de extracción CTAB 2X y 2 diferentes pretratamientos. + = presencia de DNA; / = ausencia de DNA.

Muestra	Pretratamiento	Presencia en gel de agarosa 1%	Cuantificación en Nanodrop		
			$\left[\frac{ng}{\mu l}\right]$	$A \frac{260}{280}$	
0	Extracción de AGV's con el método de Folch + Lavados con Buffer de fosfatos	+	38.6	1.78	
0-a		/	37.7	1.74	
1		+	72.9	2.00	
1-a		/	41.3	2.08	
2		+	38.2	1.88	
2-a		+	35.3	2.03	
3		+	50.0	1.96	
3-a		+	41.1	1.90	
4		+	42.3	2.00	
4-a		+	30.1	2.07	
0		Extracción de AGV's con el método de ácido fosfórico + Lavados con Buffer de fosfatos	+	52.8	1.95
0-a			/	33.8	2.03
1	+		49.7	2.00	
1-a	/		24.3	2.02	
2	+		30.6	1.99	
2-a	/		36.8	2.10	
3	/		17.9	1.92	
3-a	+		56.1	1.93	
4	/		35.7	2.02	
4-a	/		99.7	1.93	

En la tabla 3.2 se observan los resultados obtenidos de las extracciones de DNA a partir de pulpa de café en diferentes tiempos de degradación empleando 2 pretratamientos, la extracción de AGV's y lavados con buffer de fosfatos, y el método CTAB 2x para la extracción de DNA. Se puede observar que con el

método utilizado se obtiene un DNA de buena calidad y cantidad, ya que la mayoría de los valores de la relación A 260/280 están dentro del rango aceptable (1.6 – 2.0) de acuerdo a lo reportado por Maricela (2014). Las muestras que presentan una mala calidad es debido a la presencia de sustancias producidas en la fermentación que interfieren con la acción de las soluciones utilizadas en el proceso de extracción, confirmando lo descrito por Guillén et al. (2015) donde mencionan la dificultad para lograr obtener un DNA de buena calidad y en cantidad suficiente para estudios posteriores debido a las características altamente dinámicas del proceso de degradación; los autores evalúan 4 métodos de laboratorio y 2 kits comerciales obteniendo mejores resultados con el método de lisozima (30.5 ng/ μ L) con un porcentaje relativo de impurezas del 15%, lo que lleva a afirmar que el método con el que se obtiene mejores resultados es el utilizado en dicha investigación, ya que se obtiene un valor promedio de la relación A 260/280 de 1.95 con una concentración de hasta 123 ng/ μ L y es posible realizar estudios posteriores con el DNA obtenido. De igual forma se observan los resultados obtenidos de las extracciones de DNA a partir de pulpa de café en diferentes tiempos de degradación empleando 2 diferentes pretratamientos para la extracción de AGV's y el método CTAB 2x para la extracción de DNA.

8. CONCLUSIÓN

La pulpa de café genera la mayor fuente de contaminación ambiental en las zonas cafetaleras y ahora que ya se conocen sus características físico – químicas es posible proponer usos alternativos para mitigar el impacto al medio ambiente. Este residuo presentó potencial para su uso como alimento para animales, sustrato para la producción de lombricomposta o producción de biogás, ya que se obtuvieron niveles bajos de taninos condensables (0.22%), azúcares reductores (23.89%) y carbohidratos (34.11%) tras 4 semanas de degradación natural y con tendencia a disminuir, lo contrario se observó con la proteína cruda (15.9%), fibra cruda (23.67%), cenizas (20.54%) y grasa (1.66%), que aumentaron su concentración conforme avanzaba el proceso de descomposición.

A pesar de la complejidad de las muestras se logró estandarizar un método para la obtención de DNA de buena calidad y cantidad suficientes, el cual consiste en tratamientos previos con el método de Folch para eliminar ácidos grasos volátiles y lavados con buffer de fosfatos para eliminar contaminantes orgánicos, obteniendo una concentración de hasta 123 ng/ μ L de DNA con valores de A 260/280 aceptables para su futura secuenciación y análisis molecular de la dinámica de microorganismos en el proceso de descomposición de la pulpa del café.

9. COMPETENCIAS DESARROLLADAS

- **Capacidad de comunicación:** Habilidad de transmitir ideas y opiniones hacia el asesor.
- **Trabajo en equipo:** Interés, predisposición y capacidad para trabajar con otros y perseguir metas comunes en el laboratorio
- **Compromiso con el laboratorio:** Capacidad y voluntad de implicarse en prioridades y necesidades del grupo de trabajo y de las instalaciones.
- **Capacidad de adaptación:** Habilidad de trabajar eficientemente en diferentes situaciones con distintas personas.
- **Capacidad de planificación y organización:** Priorización de tareas y actividades en el laboratorio de manera que se puedan lograr los resultados esperados de acuerdo al cronograma de actividades.
- **Iniciativa:** Habilidades que permiten actuar de manera eficaz ante imprevistos y problemas buscando una solución rápida; evitando problemas futuros.
- **Creatividad:** Idealización de alternativas para realizar el trabajo, en dado caso de falta de material o problemáticas en el laboratorio.
- **Uso solvente de los recursos de información:** Capacidad para encontrar, relacionar y estructurar información proveniente de diversas plataformas electrónicas y de integrar ideas y conocimientos.
- **Automotivación:** Importancia en la satisfacción personal, necesidad de alcanzar los objetivos establecidos con éxito y mejorar académica y profesionalmente.
- **Tolerancia al estrés:** Dominio del carácter ante acumulación de tareas o responsabilidades, de tal forma que se realicen bien las actividades.
- **Independencia:** Decisiones basadas en las propias convicciones.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Arcila O., F. (1979) Producción de biogás a base de pulpa de café. Chinchiná, Guatemala: CENICafé.
- Ayala Torres A.; Hernández Zarazúa I. L.; Aguilera Barreyro A. (2008). Implementación de la técnica de Folch para la extracción de grasas en frío. Querétaro, México
- Blandón Castaño Gladis; Dávila-Arias María Teresa; Rodríguez-Valencia Nelson. (1999). Caracterización microbiológica y fisicoquímica de la pulpa de café sola y con mucilago, en proceso de lombricompostaje. Colombia: CENICafé.
- Braham J. y R. Bressani. (1978). Coffee pulp. Composition, technology and utilization. Institute of Nutrition of Central America and Panama. Inter. Develop. Res. Centre. Ottawa, Canadá.
- Calle V., H. (1974) Como producir gas combustible con pulpa de café. Chinchiná, Guatemala: CENICafé.
- Cano Flores, Milagros; Delfín Flor Lucila; Díaz Cerón Ana; García Teresa; González Rafael. (2005). Estudio de mercado sobre el consumo de café en la ciudad de Xalapa, Veracruz. Veracruz, México.
- Cinza Borrelli, Rosa; Visconti, Attilio; Mennella, Carmela; Anese, Monica; Fogliano, Vincenzo. (2002). Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. Udine, Italy: Journal of Agricultural and Food Chemistry.
- Davis Aaron P.; Govaerts Rafael; Bridson Diane M.; Stoffelen Piet. (2007). An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). London, UK: Botanical Journal of the Linnean Society.
- Días Curay, Alejandra. (2011). Pulpa de café (*Coffea arabica* L.) como fuente alternativa de antioxidantes. Ecuador: Universidad de Loja.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*.
- Duicela Luis; Farfán Diana; García José; Corral Rubén; Chilán William. (2004). Post-cosecha y calidad del café arábigo. Ecuador: IMPREGCOL.
- FAO a. (2011). Reducción de la ocratoxina A en café. Food and Agriculture Organization.
- Ferrer J., G. Páez, M. Chirino y Z. Mármol. (1995). Ensilaje de la pulpa de café. *Rev. Fac. Agron.*
- Guillén-Navarro Karina; David Herrera-López; Mariana Y. López-Chávez; Máximo Cancino-Gómez; Ana L. Reyes-Reyes. (2015). Assessment of methods to recover DNA from bacteria, fungi and archaea in complex environmental samples. México: *Folia Microbiology*.
- He Y, Zhao Y, Zhou G, Huang M (2009) Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from aged refuse for microbial community analysis. *Word J Microbiology Biotechnology*
- ICO - International Coffee Organization. (2014). World coffee trade (1963-2013): A review of the markets, challenges and opportunities facing the sector. London, UK.

- LaMontagne M.G., F.C. Michel Jr., P.A. Holden, C.A. Reddy. (2002). Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis. Michigan, USA: Journal of Microbiological Methods.
- León, Jorge. (2000). Botánica de los cultivos tropicales. San José, Costa Rica: Editorial Agroamericana.
- Marques Vilela Danielle, Vinícius de M. Pereira Gilberto, Cristina Ferreira Silva, Luís Roberto Batista, Rosane Freitas Schwan. (2010). Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). Brazil: Food Microbiology Journal.
- Martinez Nadal, N. G. (1998). Coffe by-products. Their chemical composition and posible economic uses. Coffee and Tea Industries and the flavor field.
- Molina Mario; Lechuga Otto; Bressani Ricardo. (1990). Valor nutritivo de la pulpa de café sometida a fermentacion sólida usando *Aspergillus niger* en pollos y cerdos. Honduras: Agronomía Mesoamericana.
- Moreno Ponce A. L.; Aguilera Barreyro A.; Escobar García K.; Bernal Santos G.; Reis de Souza T.; Muñóz Hernández G. (2007). Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV's) y pH en el contenido de ciegos de conejos alimentados con una dieta comercial y una experimental. Querétaro, México
- Noriega Salazar, Adrianyela; Silva Acuña Ramón; Moraima García de Salcedo. (2009). Composición química de la pulpa de café a diferentes tiempos de ensilaje para uso potencial en la alimentación animal. Venezuela: Zootecnia Trop.
- Porres, C.; Calzada, J.F.; Rolz, C. (1987). Combustión de la pulpa de café. In: Simposio Internacional sobre la utilización Integral de los Subproductos del Café, Guatemala.
- Puerta Quintero, Gloria Inés. (2012). Factores, procesos y controles en la fermentación del café. Colombia: CENICafé.
- Ramírez-Coronel María Ascensión; Nathalie Marnet, V. S. Kumar Kolli, Sevastianos Roussos, Sylvain Guyot, Christopher Augur. (2004). Characterization and estimation of proanthocyanidins and other phenolics in coffee pulp (*Coffea arabica*) by Thiolysis-High-Performance Liquid Chromatography. France: Journal of Agricultural and Food Chemistry.
- Rodríguez, Fira. (2015). Panorama Agroalimentario: Café 2015. México: DIEES.
- Samayoa Toledo, Ana; Borrayo Herrera, Brizna; Pérez Solares, Alejandra. (2014). Extracción de mucílago, azúcares y taninos de la pulpa del café y producción de ácido acético comercial a partir de las mieles del café. Guatemala: Universidad de San Carlos
- Santos, Rui C. (2010). Valor energético de los alimentos. Ejemplo de una determinación experimental usando calorimetría de combustión. Lisboa, Portugal: Quim. Nova.
- Suarez Agudelo, Jesús María. (2012). Aprovechamiento de los residuos sólidos provenientes del beneficio del café, en el municipio de Betania Antioquia: usos y aplicaciones. Antioquia, Colombia: Corporación Universitaria Lasallista.

- Temis Pérez, A. L.; López-Malo Vigil A.; Sosa Morales M.E. (2011). Producción de café (*Coffea arabica* L.): cultivo, beneficio, plagas y enfermedades. Puebla, México: Universidad de las Américas Puebla.
- Terry, A. I.; Rodríguez, S.; Bermúdez, R. C.; Fernández, M.; Aguilera, I.; Buzón, J. (2005). Evaluación de un inóculo para el arranque de reactores UASB empleados en el tratamiento de residual líquido de café. Santiago de Cuba, Cuba: Revista Cubana de Química.
- Urbaneja Gladys; Ferrer José; Páez Gisela; Moreno Lilia; Sandoval Luis. (1997). Hidrolisis acida y caracterización de carbohidratos de la pulpa de café. Venezuela: Revolución Agronómica.
- Van Severen, M. L. & Carbonell, R. (1999). Estudios sobre digestibilidad de la pulpa de café y de la hoja de banano. El café de El Salvador.
- Villalba Diana K.; Vilma A. Holguin; Julián A. Acuña; Roberto Piñeros Varon. (2011). Bromatological and organoleptic quality of organic waste silages of coffee-musaceous production system. Colombiana: Revista colombiana de Ciencia Animal.
- Waller, J.M.; Bigger M.; Hillocks R.J. (2007). Coffee pests, diseases and their management. London, UK: CABI.
- Wintgens Jean Nicolas. (2004). Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production. London, UK.
- Yang Zh. H.; Y. Xiao; G. M. Zeng; Zh. Y. Xu; Y. Sh. Liu. (2007). Comparison of methods for total community DNA extraction and purification from compost. Applied Microbiology Biotechnology.
- ZULUAGA, J. Manejo del agua en el proceso de beneficio húmedo del café para el control de la contaminación. Chinchiná, Avances Técnicos Cenicafé No 187: 1-4.1993.