

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE
MICROORGANISMOS PRESENTES EN RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS
(PULPA) PROVENIENTES DEL BENEFICIO DEL CAFÉ**

CLAUDIA INÉS PAYÁN BASTIDAS

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES
CENTRO DE INVESTIGACIÓN, PROYECCIÓN Y DESARROLLO
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA
AGROINDUSTRIAL
ESPECIALIZACIÓN EN MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
MANIZALES**

2011

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE
MICROORGANISMOS PRESENTES EN RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS
(PULPA) PROVENIENTES DEL BENEFICIO DEL CAFÉ**

CLAUDIA INÉS PAYÁN BASTIDAS

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:
Especialista en Microbiología Industrial**

Director:

MAGISTRA TERESA CABRA CENDALES

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES
CENTRO DE INVESTIGACIÓN, PROYECCIÓN Y DESARROLLO
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA
AGROINDUSTRIAL
ESPECIALIZACIÓN EN MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
MANIZALES**

2011

Nota de aceptación

**Firma de Director del Trabajo de
Grado**

**Firma del presidente del Comité de
Programa**

**Firma de integrante del Comité de
Programa**

Manizales, 09 de DICIEMBRE de 2011

DEDICATORIA

A DIOS

Por regalarme cada día fortaleza, paciencia y esperanza para culminar esta etapa más en mi vida

A MIS PADRES

Luis Alberto y Virginia Elizabeth, quienes han sido el pilar de mi vida y apoyo incondicional en cada logro que me he dispuesto a alcanzar y que con sus palabras de aliento me han levantado en los momentos más difíciles...Los amo

A MIS HERMANOS

Diana, Ernesto y Luis, por su constante compañía a pesar de la distancia...Los adoro

A MIS SOBRINOS

Dana y Angel, por ser el regalo más hermoso que Dios ha puesto en mi vida...los adoro

A MI NOVIO

Javier Esteban por su paciencia y apoyo en cada uno de mis logros alcanzados aun en la distancia...Te amo

A MIS FAMILIARES Y AMIGOS

Por el apoyo brindado y por confiar en que alcanzaría uno más de mis sueños

AGRADECIMIENTOS

A todas y cada una de las personas que aportaron de manera directa e indirecta en la realización de este proyecto.

A LA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES

Por ser mi segundo hogar y abrirme las puertas para seguir formándome profesionalmente

A LA DOCTORA TERESA CABRA CENDALES

Por su paciencia, dedicación, experiencia, orientación y compañía en este proceso investigativo.

AL MICROBIÓLOGO NARMER FERNANDO GALEANO

Por su apoyo y disposición en el desarrollo de esta investigación y por la asesoría en biología molecular

A LA MAGISTRA GLORIA INÉS ESTRADA SALAZAR

Por su asesoría y apoyo en el desarrollo de esta investigación

A DIANITA MENESES

Por su constante compañía y apoyo en el tiempo trabajado, por las experiencias compartidas...mi amiga incondicional en la lucha

AL PERSONAL DE CALER

A Paulita, Gladycita, Angelita, Marthica, Amparito y Dianita por su ayuda, paciencia y disponibilidad incondicional.

A SAMY Y DOÑA FABIOLA

Por ser mi gran familia durante todo este tiempo...gracias por la compañía y apoyo.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	12
1. OBJETIVOS	14
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	14
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
2. MARCO TEORICO	15
2.1 GENERALIDADES DEL CAFÉ.....	15
2.1.1 Clasificación del café	16
2.1.2 Clasificación Taxonómica del Café	16
2.2 Especies de importancia económica	17
2.2.1 <i>Coffea arabica L</i> o Café arábigo	18
2.2.2 <i>Coffea canephora</i> Pierre ex Froehner o Café robusta	18
2.3 EL FRUTO DEL CAFETO	18
2.4 EL CLIMA Y SU IMPORTANCIA EN EL CULTIVO DEL CAFÉ.....	20
2.4.1 Latitud y altitud	20
2.4.2 Temperatura.....	20
2.4.3 Variedad.....	21
2.4.4 Época de Siembra.....	21
2.5 BENEFICIO DEL CAFE.....	21
2.5.1 Beneficio seco.....	21
2.5.2 Beneficio húmedo	22
2.5.3 Beneficio ecológico del café.....	22
2.6 SUBPRODUCTOS DEL BENEFICIO HÚMEDO DEL CAFÉ.....	23
2.6.1 La Pulpa de Café	23
2.7 MICROORGANISMOS AISLADOS DE SUBPRODUCTOS DEL CAFÉ.....	26
2.8 BIOMASA LIGNOCELULÓSICA	27
2.8.1 Celulosa	28
2.8.2 Hemicelulosa.....	30
2.8.3 Lignina.....	31
2.9 MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA	33

2.9.1	Microorganismos degradadores de celulosa.....	33
2.9.2	Microorganismos degradadores de lignina.....	34
2.10	TIPOS DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA.....	35
2.10.1	Residuos agrícolas	35
2.10.2	Subproductos de procesos agrícolas.....	36
2.10.3	Cultivos destinados a la generación de energía	36
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	36
3.1	Aislamiento de microorganismos presentes en la biomasa lignocelulósica (pulpa de café).	36
3.1.1	Toma de muestra.....	36
3.1.2	Preparación de la muestra	37
3.1.3	Siembra y recuperación de los microorganismos.....	37
3.1.4	Aislamiento y purificación de Colonias.....	38
3.2	IDENTIFICACIÓN EN GÉNERO Y ESPECIE LA BIOTA MICROBIANA PRESENTE EN EL RESIDUO LIGNOCELULÓSICO EVALUADO.....	38
3.2.1	Identificación de Bacterias y hongos levaduriformes	38
3.2.2	Identificación de Hongos Filamentosos.....	38
3.3	Identificación molecular de microorganismos presentes en el residuo lignocelulósico evaluado (pulpa de café).....	39
3.4	PRESERVACIÓN DE CEPAS.....	39
4.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	41
4.1	Aislamiento de microorganismos presentes en la biomasa lignocelulósica (pulpa de café).....	41
4.1.1	Cuantificación inicial de Unidades Formadoras de Colonia (UFC/mL) 42	
4.2	Identificación en género y especie de la biota microbiana presente en el residuo lignocelulósico evaluado (Pulpa de Café).....	43
4.2.1	Identificación de Bacterias y Hongos levaduriformes.....	44
4.2.2	Identificación de Hongos filamentosos.....	55
	CONCLUSIONES	60
	RECOMENDACIONES.....	61
	BIBLIOGRAFÍA.....	62
	ANEXOS.....	66

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación taxonómica del cafeto	17
Tabla 2. Tiempo de de maduración del fruto del Cafeto	19
Tabla 3. Composición química de la pulpa de café fresca.....	24
Tabla 4. Contenido de otros compuestos en la pulpa de café	25
Tabla 5. Contenido de cenizas y de minerales en la pulpa de café	25
Tabla 6. Constituyentes de paredes celulares y polisacáridos estructurales en la pulpa de café.	26
Tabla 7. Aislamiento de microorganismos provenientes de pulpa de café	41
Tabla 8. Recuento de Unidades Formadoras de Colonia	42
Tabla 9. Relación de Microorganismos recuperados.....	43
Tabla 10. Paralelo de resultados obtenidos por sistema VITEK2 COMPAQ® y SECUENCIACIÓN.....	44
Tabla 11. Resultados Secuenciación <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	46
Tabla 12. Resultados secuenciación <i>Klebsiella</i> sp	49
Tabla 13. Resultados secuenciación <i>Bacillus</i> sp.	50
Tabla 14. Resultados secuenciación <i>Rhodococcus erythropolis</i>	52
Tabla 15. Resultados secuenciación <i>Pseudomonas</i> sp.....	54
Tabla 16. Resultados secuenciación <i>Cladosporium</i> sp.....	57
Tabla 17. Resultados secuenciación <i>Penicillium brevicompactum</i>	59
Tabla 18. Paralelo de resultados obtenidos por MICROCULTIVO y SECUENCIACIÓN.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Partes del fruto del cafeto	19
Figura 2. Estructura molecular de la celulosa	29
Figura 3. Estructura molecular de la celulosa y sitio de acción de las enzimas exoglucanasa, endoglucanasa y β -glucosidasa.	29
Figura 4. Estructura molecular de la hemicelulosa y sitio de acción de las enzimas endo- β -xilanasas, α -glucuronidasa, α -arabinofuranosidasa y β - xilosidasa.	31
Figura 5. Estructura de lignina (Bommarius & Riebel, 2004)	32
Figura 6. Esquema de Preparación de muestras (Meneses, 2011)	37
Figura 7. Características Macroscópicas (7a) y Microscópicas (7b) <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	46
Figura 8. Características Microscópicas (8a) y Macroscópicas (8b) de <i>Klebsiella</i> sp.	48
Figura 9. Características microscópicas (9a) y macroscópicas (9b) de <i>Bacillus</i> sp	50
Figura 10. Características microscópicas (10a) y macroscópicas (10b) de <i>Rhodococcus</i> sp	51
Figura 11. Características microscópicas (11a) y macroscópicas (11b) de <i>Pseudomonas</i> sp.	54
Figura 12. Características Microscópicas (12a) y Macroscópicas (12b) de <i>Cladosporium</i> sp	56
Figura 13. Características Macroscópicas (13a) y Microscópicas (13b) de <i>Penicillium brevicompactum</i>	58

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Extracción de dna en levadura	66
Anexo 2. Extracción y purificación dna bacterias.....	67
Anexo 3. Protocolo extracción de hongos de wendland et al. (1996)	68

RESUMEN

En el presente estudio se aislaron e identificaron microorganismos presentes en los residuos lignocelulósicos (pulpa) provenientes del beneficio del Café; las muestras fueron tomadas de tres fincas del municipio de Chinchiná en el Departamento de Caldas (Colombia).

Los microorganismos fueron aislados mediante la técnica de dilución en placa. La identificación de bacterias y levaduras se realizó con el equipo automatizado VITEK 2 COMPAQ® y la identificación de hongos filamentosos se hizo mediante la clave taxonómica de hongos imperfectos de Barnet y Hunter.

La identificación de microorganismos fue confirmada por análisis de secuenciación de los productos de amplificación obtenidos por PCR con primers universales RN y RW para bacterias y primers ITS1 e ITS4 para hongos filamentosos y levaduras.

Los resultados de la secuenciación obtenidos muestran microorganismos de importancia industrial como el hongo filamentoso *Penicillium brevicompactum* que presenta un gran potencial debido a su producción eficiente de pectinasa. Las enzimas pectinolíticas catalizan la degradación de la pectina presente en la pared celular de las plantas.

Entre las bacterias aisladas se identificó por el sistema VITEK, *Klebsiella oxytoca*, especie de importancia industrial reportada en la literatura, sin embargo por métodos moleculares solamente se confirmó el género *Klebsiella* sp.

Palabras clave: Café, Pulpa de café, Microorganismos de importancia agroindustrial, Residuos lignocelulósicos, Secuenciación.

INTRODUCCIÓN

En la superficie de nuestro planeta alrededor de 155 billones de toneladas de materia orgánica son producidas mediante el proceso fotosintético, cada año (Rajarithnam & Bano, 1991). Sin embargo solamente una porción de esta materia orgánica es directamente comestible por el hombre y por los animales, la mayoría de ella tomando diversas formas, no es comestible y en muchos casos se convierte en una gran fuente de contaminación ambiental. (Rodríguez, 1999)

Las pocas alternativas, desde el punto de vista económico, social y nutricional, que en la actualidad se presentan para el aprovechamiento de los residuos agroindustriales, aunado a la falta de conciencia en la protección del medio ambiente provocan que estos sean mal manejados y se conviertan en fuentes de contaminación de los recursos naturales (suelo, agua y aire)(Rodríguez, 1999). Si analizamos los residuos que se producen en las diferentes agroindustrias, encontramos, por ejemplo, que en la industria del fique se utiliza solamente el 2% de la biomasa producida, en la industria de la cerveza solamente el 8% de los nutrientes del grano, y en las industrias del aceite de palma y de la celulosa se utiliza menos del 9% y 30%, respectivamente, de la biomasa producida. (Zeri, 1997)

La utilización de biomasa lignocelulósica como materia prima para la elaboración de diversos productos de valor comercial es una alternativa que puede mitigar los problemas actuales de contaminación ambiental.

La lignocelulosa es el principal componente de la pared celular de las plantas, esta biomasa producida por la fotosíntesis es la fuente de carbono renovable más prometedora para solucionar problemas actuales. El material lignocelulósico es atractivo por su bajo costo y alta disponibilidad en diversos climas y localidades, sin embargo, el principal impedimento para su utilización es la falta

de una tecnología de bajo costo para degradar la fracción recalcitrante de la biomasa. (Cuervo, Folch, & Quiroz, 2009)

La biomasa lignocelulósica está conformada por tres tipos de polímeros, celulosa, hemicelulosa y lignina, los cuales se encuentran asociados formando una matriz sólida que dependiendo de las proporciones de cada polímero le confiere al material propiedades especiales de dureza, flexibilidad y rigidez. (Quintero & Cardona, 2009)

La biomasa lignocelulósica proviene principalmente de residuos agrícolas, forestales, agroindustriales, de industrias de alimentos entre otras.

Para el caso de la industria del café, solamente se utiliza el 9.5% del peso del fruto fresco en la preparación de la bebida, el 90,5% queda en forma de residuo (Calle, 1977). Muchos de estos residuos generan graves problemas de contaminación ambiental, una de las opciones para el manejo adecuado de estos, es su utilización como materia prima la producción de etanol.

La producción anual de pulpa de café en Colombia, es de aproximadamente 2 millones de toneladas (Rodríguez, 1999). En la mayoría de los casos los procesos estudiados para su utilización han estado encaminados a hacer de la pulpa de café un producto apto para el consumo animal en forma de ensilaje o bien seca. (Bressani, 1978)

Es importante aislar e identificar los microorganismos que colonizan la pulpa de café en las condiciones del beneficio de los frutos, en la zona cafetera colombiana, para utilizarlos en bioprocesos y contribuir a mitigar la contaminación ambiental causada por este residuo.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar aislamiento, identificación y conservación de microorganismos presentes en residuos lignocelulósicos (pulpa) provenientes del beneficio del café.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar microorganismos presentes en la biomasa lignocelulósica.
- Identificar en género y especie la biota microbiana presente en el residuo lignocelulósico evaluado.
- Conservar las cepas de interés agroindustrial para contribuir con el banco de cepas de la Universidad Católica de Manizales

2. MARCO TEORICO

2.1 GENERALIDADES DEL CAFÉ

El café es uno de los principales productos de origen agrícola comercializados en los mercados internacionales y a menudo supone una gran contribución a las exportaciones de las regiones productoras. (http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Especial:Libro&bookcmd=rendering&return_to=Caf%C3%A9&collection_id=bc8509bfd5732798&writer=rl). El cultivo del café está muy extendido en numerosos países tropicales, en especial Brasil, que concentra poco más de un tercio de la producción mundial.

Próspero Alpini en 1529, fue el primer europeo en describir las ramas y granos de la planta de cafeto que era conocida en Egipto como Bon o Ban. Desde sus inicios, se creía que el cafeto era de origen arábigo y fue identificado como un tipo de jazmín al que el botánico holandés Jussieu en 1714 le dio el nombre de *Jasminus arabicum laurifolia*. Sin embargo, Carl von Linneus lo describió como perteneciente al género *Coffea*. El nombre asignado por Linneus permanece y es utilizado actualmente.

Los cafetos son árboles o arbustos reconocibles por sus hojas simples, opuestas y con estípulas frecuentemente bien desarrolladas. Sus flores son pequeñas, tubulosas y blancas y se agrupan en glomérulos axilares. Tienen ovario ínfero, bicarpelado y está coronado por un disco nectarífero que atrae insectos. Los carpelos son uniovulados. El fruto es una drupa con dos nueces y con pulpa azucarada. El género *Coffea* tiene un tipo de placentación diferente al de las otras Rubiáceas denominada coffeana, caracterizada por la presencia de un sillón invaginado en la parte ventral del albumen de los granos. De acuerdo con su estructura floral, los cafetos se reparten en el género *Coffea* (estilos largos con las anteras y estigmas exteriores) y el género *Psilanthus* (estilo corto con las anteras y estigma interiores). (Cenicafé, 2006)

2.1.1 Clasificación del café

(FEC; <http://www.federacioncafe.com/Publico/EICafe/EICafeto.asp>)

La planta del café se denomina cafeto. Pertenece al género *Coffea*, de la familia de las rubiáceas. Los cafetos son arbustos que pueden llegar a medir más de 12 metros de altura en estado salvaje, incluso algunas variedades, 20 metros. Sin embargo, y con el fin de facilitar la recolección, en las plantaciones se podan entre los dos y los cuatro metros de altura. Su tronco es recto y liso. Sus hojas son perennes y mantienen un color verde brillante todo el año. La flor es de color blanco, parecida al jazmín, y de vida muy corta, ya que a los tres días de florecer, deja paso al fruto. El cafeto suele dar su primer fruto entre los tres y los cinco años de vida, y ofrece un rendimiento de entre 400g y 2,2 kilos al año, durante un periodo de 30 a 50 años.

La planta de cafeto, es originaria de los montes de Etiopía. (Montoya & Villegas, 2008). Los cafetos (*Coffea* sp.) son un género que contiene diez especies de plantas de la familia de las rubiáceas, originarias del sur de Asia y el África subtropical. Se cultivan ampliamente por sus semillas que se emplean para la elaboración del café, una bebida estimulante; la importancia económica del cafeto es extraordinaria, ya que, es uno de los productos vegetales más importantes del mercado global.

2.1.2 Clasificación Taxonómica del Café

Fuente: Cenicafé. Curso virtual de fisiología. Módulo 1. Estructura de la planta y su relación con las funciones vegetales. 2006. 29 p.

La familia Rubiaceae comprende alrededor de 500 géneros y más de 6.000 especies, en su mayor parte árboles y arbustos y, ocasionalmente, plantas herbáceas. Son principalmente plantas tropicales y se encuentran en los estratos más bajos de los bosques. *Coffea* es el género de las Rubiáceas (Rubiaceae) más importante económicamente (Tabla No.1). (Cenicafé, 2006).

Tabla 1 Clasificación taxonómica del cafeto

TAXONOMÍA DEL CAFETO	
Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Espermatofitas</i>
Clase	<i>Angiospermas</i>
Subclase	<i>Dicotiledóneas</i>
Orden	<i>Rubiales</i>
Familia	<i>Rubiaceae</i>
Género	<i>Coffea</i>

(Cenicafé, 2006)

La taxonomía del género *Coffea* permanece confusa (el número de especies pertenecientes al género varía desde 25 hasta 100). Los estudios más recientes proponen alrededor de 60 especies (33 en África Tropical, 14 en Madagascar, 3 en las Islas Mauricio y Reunión, y probablemente 10 en el sudeste asiático). (Cenicafé, 2006)

2.2 Especies de importancia económica

Las especies más importantes comercialmente pertenecientes al género *Coffea*, son conocidas como *Coffea arabica* Linneo (conocida como Arábica o Arábiga) y *Coffea canephora* Pierre Ex Froehner (conocida como Robusta). (Vasco 1989)

Las primeras semillas de café llegaron a Colombia de las indias occidentales francesas, a finales del siglo XVIII. (Fondo Cultural Cafetero) Con el tiempo el cultivo de cafeto se extendió a otros departamentos, las plantaciones se establecieron preferencialmente en tierras de ladera de clima medio que por su temperatura y régimen de lluvias favorece la producción de un café cuya calidad es reconocida en el mundo.

El café es uno de los principales productos de exportación agrícola en Colombia y representa una de las principales industrias en el país. (Méndez, Montaña *et al.* 2004)

2.2.1 *Coffea arabica* L o Café arábigo

Se estima que representa aproximadamente un 80% del mercado mundial de café. Se registran entre 40 y 50 genotipos derivados de dos tipos de *Coffea arabica*, el que comprende la variedad Typica y la variedad Abyssinica y el tipo Bourbon que incluye la variedad Culta. Se cree que el tipo arábica se originó a partir de *Coffea arabica* nativa de Etiopía y el tipo Bourbon proviene de un mutante espontáneo de Etiopía, cultivado en la isla Reunión. (Cenicafé, 2006)

2.2.2 *Coffea canephora* Pierre ex Froehner o Café robusta

Esta especie representa el 20% restante y es posible encontrarla en forma silvestre en África Occidental, Zaire, Sudán, Uganda, Tanzania y Angola. Se conoce usualmente como Robusta. (Cenicafé, 2006)

2.3 EL FRUTO DEL CAFETO

El fruto del cafeto tiene el mismo aspecto de una cereza, por esta razón se le llama con este nombre. La cereza de café en estado de madurez es un fruto de color rojo o amarillo. Cada cereza tiene una piel exterior (exocarpio) que envuelve una pulpa dulce (mesocarpio). Debajo de la pulpa están los granos recubiertos por una delicada membrana translúcida (Silver Skin) y estas membranas envuelven las dos semillas (endosperma) de café.

Las semillas de café, conocidas como café verde o café oro en ciertos países, son las que se tuestan para la elaboración de la bebida que los consumidores conocen.

Disponible en:

www.cafedecolombia.com/particulares/es/sobre_el_cafe/el_cafe/post-cosecha/

El fruto del cafeto cuyas semillas tostadas y molidas se utilizan para el consumo humano está compuesto, de afuera hacia dentro, por una cubierta exterior llamada pulpa, una sustancia gelatinosa azucarada que recibe el nombre de mucílago, una cubierta dura que se denomina pergamino o cáscara, una cubierta más delgada y fina llamada película y finalmente el grano o almendra que es la parte del fruto que, una vez tostada y molida, se utiliza para la producción de la bebida del café,(Gómez and Nicolás 2006). (Figura 1)

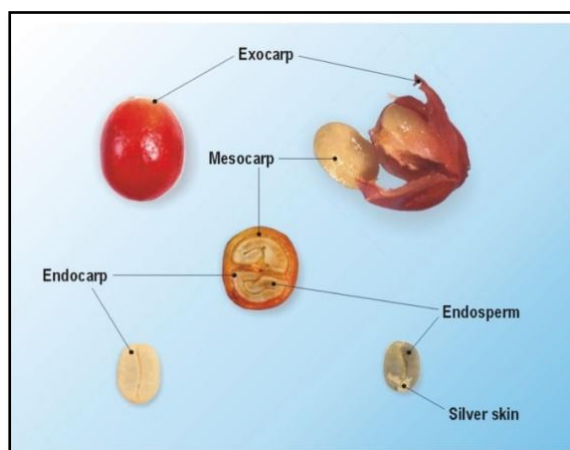


Figura 1. Partes del fruto del cafeto

Fuente: http://www.cafedecolombia.com/particulares/es/sobre_el_cafe/el_cafe/el_arbol_y_el_entorno/

El color de la epidermis varía de verde (clorofila) a rojo (antocianinas) y depende de la variedad de café y el grado de maduración del fruto (Tabla No. 2). Envuelto por la epidermis se encuentra el mesocarpio el cual está constituido por una gruesa capa de tejido esponjoso de aproximadamente 5mm de espesor, rico en azúcares y pectinas y que rodea dos granos enfrentados por su cara plana.(Vasco, 1989)

Tabla 2. Tiempo de de maduración del fruto del Cafeto

Especie	Tiempo
<i>C. arábica</i>	6 a 8 meses
<i>C. canephora</i>	9 a 11 meses
<i>C. liberica</i>	11-14 meses

Fuente: <http://academic.uprm.edu/mmonroig/id53.htm>

2.4 EL CLIMA Y SU IMPORTANCIA EN EL CULTIVO DEL CAFÉ

Fuente: Guía Ambiental para el Sector cafetero. Federación Nacional de Cafeteros. Disponible en <http://www.federaciondecafeteros.org/static/files/8Capitulo6.pdf>

2.4.1 Latitud y altitud

La zona cafetera colombiana se encuentra localizada en las laderas de las cordilleras que atraviesan el país de sur a norte. De acuerdo con la latitud está ubicada sobre el trópico de cáncer y cubre desde 1° hasta 10° de latitud norte, en una franja altitudinal comprendida entre los 1000 y 2000 metros sobre el nivel del mar. Estos límites de altura son amplios, debido a la influencia que tiene la latitud sobre la altura conveniente para sembrar café. Así, cerca al Ecuador geográfico, a un grado de latitud, se pueden utilizar zonas cercanas a los 2000 metros sobre el nivel del mar para sembrar café económicamente rentable, lo que no es posible en la región de la Sierra Nevada, que se encuentra a 10° de latitud. De las 845000 hectáreas que cubre la región cafetera, el 75% se halla en los Departamentos de Caldas, Antioquia, Tolima, Cundinamarca, Quindío y Risaralda, los cuales proporcionan aproximadamente el 85% de la producción cafetera nacional.(FEDERACAFE, 1987)

2.4.2 Temperatura

La zona cafetera colombiana presenta una temperatura media muy uniforme a través del año para una misma región. Tiene una temperatura media que varía entre los 18°C y los 22.5°C. Regiones con temperaturas fuera de estos límites se consideran como marginales (se identifican como zona marginal alta y zona marginal baja) para el cultivo del café. Las diferencias entre las temperaturas media y máxima pueden ser hasta de 15°C.

2.4.3 Variedad

Parte del éxito en el cultivo está en la variedad que se seleccione. Las principales cualidades que debe reunir una buena variedad de café son: alta producción, alto rendimiento, resistente a enfermedades limitantes como la roya, resistente a plagas, de porte bajo, ya que permite disponer de más árboles por área, de fácil manejo, de iniciación rápida en la producción, de buen sistema radicular.

2.4.4 Época de Siembra

Considerando una oferta ambiental óptima para el cultivo se debe definir una época de siembra. Para ello hay que tener en cuenta las condiciones climáticas de la región, ya que estas determinan la dinámica de crecimiento y desarrollo de la planta de café. Dentro de ellas la distribución de la lluvia define en gran medida el ciclo vegetativo y reproductivo del cafeto.

2.5 BENEFICIO DEL CAFE

Fuente: http://www.cafedecolombia.com/particulares/es/sobre_el_cafe/el_cafe/post-cosecha/

Las prácticas de post cosecha, que varían de acuerdo con el país, el tipo de cultivo y la especie de café, transforman la cereza en un producto seco, listo para el proceso de trilla. En otras palabras, son procesos que se utilizan para la separación del mesocarpio del endocarpio. El tiempo que duren dichos procesos y el efecto que pueden generar los diferentes compuestos presentes en la pulpa y mucílago del café en la semilla, tiene una clara influencia en la calidad final de la bebida.

2.5.1 Beneficio seco

Uno de los procesos más utilizados es el llamado *beneficio seco* del café. En este proceso de pos cosecha las cerezas comúnmente se exponen al sol durante

varios días hasta alcanzar cierto grado de humedad en rangos que pueden variar. Uno de los efectos que tiene este método es la impregnación de la semilla con los azúcares y otros compuestos presentes en el mucílago del café, lo que conduce a la generación en la bebida final de sabores característicos de los cafés *beneficiados* por esta vía.

2.5.2 Beneficio húmedo

El beneficio húmedo del café incluye el despulpado, la fermentación, el lavado y el secado del grano. En el despulpado a las cerezas se les retira la pulpa rápidamente después de la recolección. En caso de que ésta se retrase por más de 6 horas, el grano, y posteriormente la bebida, pueden presentar el defecto en taza denominado fermento. Este defecto también se presenta cuando hay presencia de frutos sin despulpar y de pulpa adherida al pergamino o en la medida que aumenta el porcentaje de grano sobre maduro en el café cosechado.

Posteriormente se retira el mucílago (mesocarpio) por medio de la *fermentación* del grano en tanques de fermentación o por medios mecánicos.

Por ser el tiempo de fermentación un factor definitivo en la calidad del café, es necesario realizar muestreos periódicos de la masa de café en el tanque de fermentación, para determinar el punto óptimo antes de iniciar el proceso de lavado final del grano. Si el café se sobre fermenta, se mancha, pierde peso, se avinagra la almendra y se afecta irremediablemente la calidad.

2.5.3 Beneficio ecológico del café

La tecnología de *beneficio* ecológico del café, desarrollada por Cenicafé y conocida como Becolsub o Ecotec, ha permitido optimizar el proceso de *beneficio* húmedo del grano, ahorrando sustancialmente el consumo de agua en este proceso de post cosecha.

Una vez finalizado el proceso de fermentación, comienza el *lavado* del grano, cuyo objetivo es eliminar totalmente el mucílago del grano. De esta forma, al

separar rápidamente la pulpa y el mucílago del grano de café, y lavarlo, se evita la aparición posterior de sabores defectuosos.

El proceso de *beneficio* húmedo constituye un trabajo arduo y artesanal que está íntimamente ligado a la tradición cafetera colombiana, y se constituye en uno de los principales elementos que garantizan la calidad del café. En este proceso se eliminan impurezas y permite una selección y clasificación del café.

Una vez el café ha pasado por el proceso de *beneficio* se seca al sol o en secadores mecánicos. Cuando ya se tiene el café seco, se le denomina *café pergamino*, puesto que al grano lo cubre una capa amarilla opaca llamada pergamino.

2.6 SUBPRODUCTOS DEL BENEFICIO HÚMEDO DEL CAFÉ

En el beneficio húmedo del café, la pulpa y el mucílago constituyen los subproductos más abundantes y representan alrededor del 60% del peso del fruto fresco. (Blandón, Rodríguez, & Dávila, 1998) 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. (Blandón, Rodríguez, & Dávila Arias, 1999)

2.6.1 La Pulpa de Café

La pulpa representa un 40% en peso del fruto fresco maduro constituyéndose así como el principal subproducto del beneficio húmedo del café, se considera una gran fuente de materia orgánica, la cual posee buenas cantidades de nitrógeno y potasio, lo que permite afirmar que es un fertilizante orgánico de mucho valor para el cafeto. Además de esto la pulpa del café al igual que el

mucílago, son una fuente rica en carbohidratos y por lo tanto es el medio de cultivo ideal para el desarrollo de una gran variedad de bacterias, hongos, levaduras y actinomicetos. (Blandón, et al., 1999)

La producción anual de pulpa de café, en Colombia, es de aproximadamente dos millones de toneladas (Rodríguez, 1999). Esta se ha venido utilizando principalmente como un producto para alimentación animal, así como también para la producción de abono, y la obtención de cafeína, sustancias pécticas y enzimas pectinolíticas; por procesos hidrolíticos es posible la obtención de melazas y a través de la fermentación también puede ser empleada en la obtención de etanol. La pulpa como subproducto del beneficio del café tiene gran importancia a nivel agroindustrial ya que debido a su composición (Tabla No.3, 4, 5 y 6) es posible obtener productos de valor agregado.

Tabla 3. Composición química de la pulpa de café fresca

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA PULPA DE CAFÉ FRESCA - %	
Humedad	76,7
Materia seca	23,3
Extracto etéreo	0,48
Fibra cruda	3,4
Proteína cruda N x 6.25	2,1
Cenizas	1,5
Extracto libre de Nitrógeno	15,8

Fuente: (Elías, 1978)

Tabla 4. Contenido de otros compuestos en la pulpa de café

CONTENIDO DE OTROS COMPUESTOS EN LA PULPA DE CAFÉ - %	
Taninos	1,80 – 8,56
Sustancias pécticas totales	6,5
Azúcares Reductores	12,4
Azúcares No Reductores	2,0
Cafeína	1,3
Ácido Clorogénico	2,6
Ácido Cafeico Total	1,6

Fuente: (Elías, 1978)

Tabla 5. Contenido de cenizas y de minerales en la pulpa de café

CONTENIDO CENIZAS Y DE MINERALES EN LA PULPA DE CAFÉ	
Cenizas %(bs)	6.66
Grasas %(bs)	1.60
Proteína % (bs)	11.00
Fibra % (bs)	11.43
N % (bs)	1.76
P % (bs)	0.13
K % (bs)	2.82
Ca % (bs)	0.32
Mg % (bs)	0.08
Fe (ppm) (bs)	159
Mn(ppm) (bs)	69
B (ppm) (bs)	22
Zn (ppm) (bs)	8
Cu (ppm) (bs)	10

Fuente: (Rodríguez, 2007)

Tabla 6. Constituyentes de paredes celulares y polisacáridos estructurales en la pulpa de café.

CONSTITUYENTE DE PAREDES CELULARES Y POLISACARIDOS ESTRUCTURALES EN LA PULPA DE CAFÉ - %	
Contenido Celular	63,2
Fibra Detergente Neutra	36,8
Fibra Detergente Ácida	34,5
Hemicelulosa	2,30
Celulosa	17,7
Lignina	17,5
Proteína Lignificada	3,0
Proteína Cruda	10,1
Cenizas Insolubles	0,4

Fuente: (Elías, 1978)

2.7 MICROORGANISMOS AISLADOS DE SUBPRODUCTOS DEL CAFÉ

Por las características fisicoquímicas entre las que se encuentran la humedad y carbohidratos, la pulpa de café se sabe que es un medio de cultivo apto para el desarrollo de una amplia variedad de microorganismos como bacterias y hongos.

En investigaciones realizadas por Blandón y Rodríguez, 1999, los principales géneros de microorganismos aislados en la pulpa de café fueron: Enterobacter, Staphylococcus, Serratia, Candida, Torulopsis, Rhodotorula, Escherichia, Citrobacter, Hafnia y Strptomyces. La pulpa de café también permite el desarrollo de otros microorganismos como Bacillus, Saccharomyces, Aspergillus, Penicillium, entre otros.

La pulpa de café es esencialmente rica en carbohidratos, proteínas, minerales (especialmente potasio) y también contiene grandes cantidades de taninos, polifenoles y cafeína. Debido a la presencia de factores anti-nutricionales tales

como la cafeína, los taninos y polifenoles, su uso como alimentación animal ha sido restringido.

Otro estudio realizado por *Roussos et al*, 1994, muestra los géneros de hongos presentes en la pulpa de café: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Humicola*, *Rhizopus* y *Trichoderma*, siendo *Aspergillus* el género predominante.

2.8 BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

Fuente: www.smbb.com.mx/revista/Revista_2009_3/Lignocelulosa.pdf

La lignocelulosa (celulosa, hemicelulosa y lignina) es el principal componente de la pared celular de las plantas, esta biomasa producida por la fotosíntesis es la fuente de carbono renovable más prometedora para solucionar los problemas actuales de energía. (Cuervo, et al., 2009). La composición y porcentajes de los polímeros dependen de la especie de planta, la edad y la etapa de crecimiento.

Los principales constituyentes de los vegetales son el almidón (utilizado como reserva energética) y los que componen sus paredes celulares, constituidas por pectina, celulosa, hemicelulosa y lignina en una relación aproximada de 4:3:3 variando sensiblemente según las diferentes especies (Papinutti, 2003),. Gracias a su origen renovable, a la biodegradabilidad de sus derivados y sus posibilidades de reciclaje, son una fuente idónea de materiales poliméricos de interés industrial.

Existen dos tipos de sistemas enzimáticos extracelulares: los que producen hidrolasas que degradan la celulosa (celulasas) y la hemicelulosa (hemicelulasas) y los que despolimerizan la lignina por reacciones de oxidación (peroxidasas y lacasas) (Pérez *et al.*, 2002).

La biomasa lignocelulósica consiste principalmente de tres tipos de polímeros, celulosa, hemicelulosa y lignina, los cuales se encuentran asociados uno con el

otro formando una única matriz sólida que dependiendo de las proporciones que posea de cada polímero le confiere al material propiedades especiales de dureza, flexibilidad y rigidez. (Quintero & Cardona, 2009)

2.8.1 Celulosa

La celulosa es el componente de la biomasa de plantas de mayor abundancia en la naturaleza, sin embargo también es producido por algunos animales y algunas pocas bacterias (Lynd *et al.*, 2002).

Es un polímero de D- Glucosa que están unidas por enlaces glucosídicos β -1,4 que forman largas cadenas lineales unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals dando origen a una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática.

Las características de la celulosa han sido diversamente investigadas (Atlas & Bartha 1980; Fan *et al.* 1980; Ladisch *et al.* 1983) la celulosa es un hidrato de carbono consistente en su forma nativa de una cadena lineal de unidades de glucosa con enlaces glucosídicos β , 1-4. El análisis por difracción de rayos X indica que la celulosa presenta una estructura cristalina altamente ordenada, constituyendo fibras elementales o micro fibras de 500 a 1000 angstroms de longitud. Algunas zonas de la fibra elemental contienen porciones de celulosa “amorfa” que es fácilmente hidrolizable. Las moléculas de celulosa están además organizadas en haces de cadenas paralelas que forman fibrillas.

En las paredes celulares de las plantas, las fibrillas de celulosa muy densamente empaquetadas y dispuestas en haces paralelos, rodean a la célula, frecuentemente formando capas cruzadas. Estas fibrillas se hallan aglutinadas por una matriz de otros tres materiales polímeros: hemicelulosa, pectina y extensina. (Lehninger 1987).

En la Figura 2, se muestra la estructura molecular de la cadena de celulosa y como las moléculas de celulosa se unen entre sí mediante enlaces de puente de hidrógeno usando el OH libre (Kumar *et al.*, 2008).

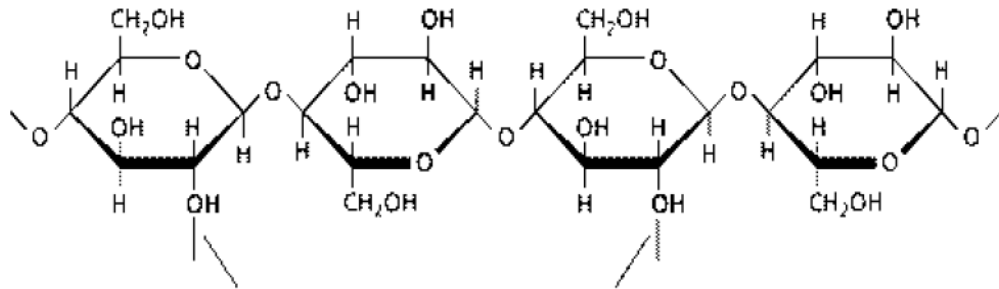


Figura 2. Estructura molecular de la celulosa

A partir de estudios bioquímicos de los sistemas de celulasas de hongos y bacterias, aeróbicos y anaeróbicos, las enzimas se han clasificado en tres grupos basados en sus propiedades estructurales: endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas (Figura 3).

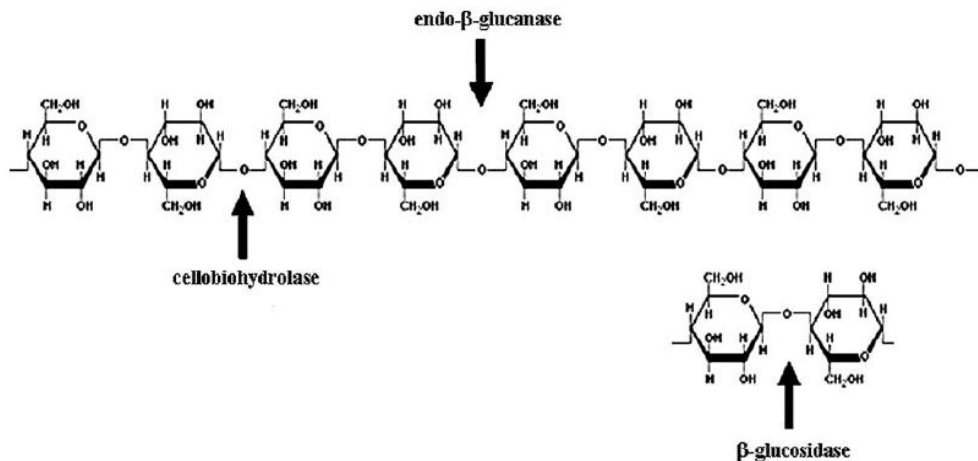


Figura 3. Estructura molecular de la celulosa y sitio de acción de las enzimas exoglucanasa, endoglucanasa y β -glucosidasa.

Las endoglucanasas o 1,4- β -D-glucan-4-glucanohidrolasas cortan la cadena de celulosa al azar en sitios amorfos internos, generando oligosacáridos de varios tamaños y consiguientemente cadenas con nuevas terminaciones. Las exoglucanasas incluyen 1,4- β -D-glucan glucanohidrolasas y 1,4- β -D-glucan celobiohidrolasas, actúan de manera progresiva en las terminaciones de la cadena de celulosa, liberando glucosa (glucanohidrolasas) o celobiosa (celobiohidrolasas). Y las β -glucosidasas: hidrolizan celodextrinas y celobiosa solubles en glucosa (Lynd *et al.*, 2002; Warren, 1996).

Debido a la estructura de la celulosa, su degradación representa un desafío para los sistemas de celulasas, razón por la cual estos sistemas poseen una estructura modular, que incluye un módulo de unión a carbohidrato y un módulo catalítico, que le permite unirse a la superficie de la celulosa, se presume facilita la hidrólisis de la celulosa al acercar el dominio catalítico a la celulosa insoluble (Lynd *et al.*, 2002).

2.8.2 Hemicelulosa

Es un polímero complejo de formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa), que forman cadenas ramificadas y los ácidos 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico, los azúcares están unidos por enlaces β -1,4 y ocasionalmente por enlaces β -1,3 (Pérez, *et al.*, 2002).

En la degradación de la hemicelulosa interfieren varias enzimas dependiendo de la naturaleza de la molécula, las compuestas por xylan son degradadas por endo-1,4- β -xylanasas, β -xilosidasas, α -glucoronidasas, α -L-arabinofuranosidasas y esterases acetilxilan. En la descomposición de glucomanos median las enzimas β -endomananasas que hidrolizan la estructura central resultando en manobiosas y manotriosas. Y las β -manosidasas que liberan manosa de los extremos no

reductores de los compuestos degradados por las endomananasas (Figura 4) (DeVries y Visser, 2001)

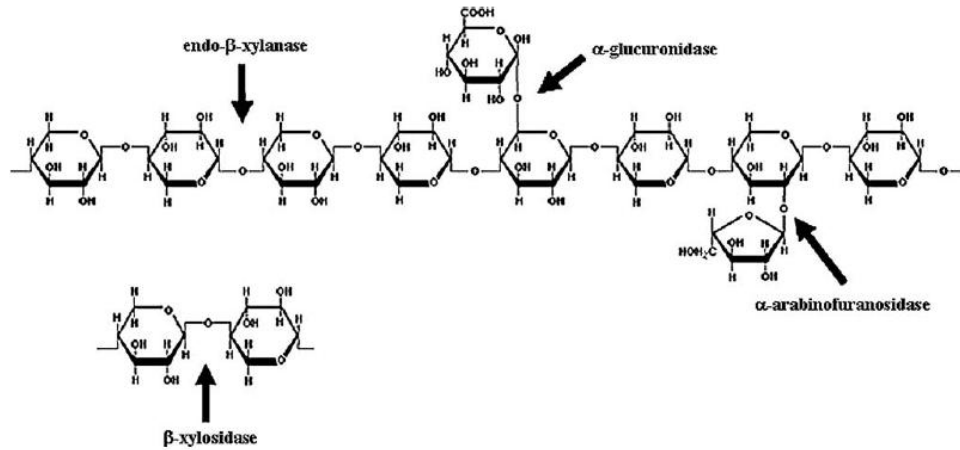


Figura 4. Estructura molecular de la hemicelulosa y sitio de acción de las enzimas endo-β-xilanasas, α-glucuronidasas, α-arabinofuranosidasas y β-xilosidasas.

2.8.3 Lignina

La lignina es un heteropolímero amorfo, tridimensional y ramificado formado por alcoholes aromáticos que dan soporte estructural, rigidez, impermeabilidad y protección a los polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa) y es altamente resistente a la degradación química y biológica (Aro *et al.*, 2005)

La lignina es un compuesto difícil de degradar debido a la recalcitrancia química y a la baja porosidad, cualidades que le permiten cubrir la hemicelulosa y celulosa de la pared celular de las plantas vasculares.

La lignina se origina por la polimerización deshidrogenativa al azar de alcoholes parahidroxicinámicos. Las maderas suaves o gimnospermas están constituidas fundamentalmente por unidades guayacílica (G), mientras que las maderas duras (angiospermas dicotiledóneas) por unidades guayacílica (G) y siringílica (S) y las plantas anuales (angiospermas monocotiledóneas) tienen los tres precursores: guayacílica (G), siringílica (S) y p-hidroxibencílica (H) (Sabatier, 1992). La lignina

es el segundo constituyente en peso (15-30%) y en importancia del reino vegetal (Sabatier, 1992, Mäkelä et al, 2002).

La lignina químicamente es heterogénea y tiene una estructura muy compleja (Figura 5). Los monómeros son todos derivados del fenilpropano y su complejidad resulta del gran número de diferentes enlaces que unen a los monómeros. La diferencia en la composición de las ligninas se manifiestan en el contenido de grupos metoxi; por ejemplo: 21% en árboles de hojas caducas, 16% en abeto y 14% en gramíneas (Olvera, 2003).

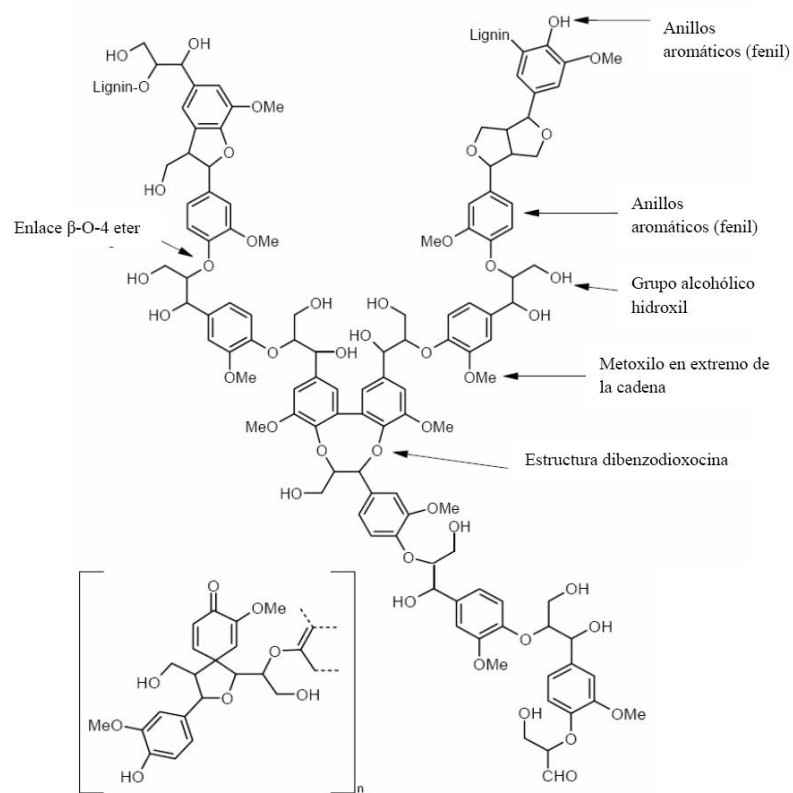


Figura 5. Estructura de lignina (Bommarius & Riebel, 2004)

Hasta el momento se han descrito tres enzimas ligninolíticas: la lignin-peroxidasa (LiP), la manganeso-peroxidasa (MnP) y la lacasa. Otras enzimas ligninolíticas

como la peroxidasa versátil (PV) o la peroxidasa manganeso-independiente se mencionan formando parte del sistema ligninolíticos de algunos basidiomicetes.

La LiP puede oxidar directamente sustratos aromáticos fenólicos y no fenólicos siendo el más estudiado el alcohol veratrílico (3,4 dimetoxi-fenol). La MnP oxida Mn^{+2} a Mn^{+3} y este último es quelado por ácidos orgánicos sintetizados por el hongo (Pérez & Jeffries, 1992). Es decir que la MnP puede oxidar sustratos del tipo fenólico a través del Mn^{+2} (Tuor *et al.*, 1992), pero también puede hacerlo con sustratos no fenólicos a través de los productos de peroxidación de ácidos grasos insaturados (Bao *et al.*, 1994). La PV oxida Mn^{+2} a Mn^{+3} , como lo realiza la MnP y también oxida compuestos no fenólicos, como la LiP; lo que significa que comparte propiedades catalíticas con ambas peroxidases fúngicas (Martinez, 2002; Martinez *et al.*, 1996). Mientras que la lacasa es una oxidasa con cuatro átomos de cobre como cofactor y cuyo aceptor de electrones es el oxígeno dando agua como producto (Thurston, 1994). Esta enzima por ser oxidasa ataca principalmente compuestos fenólicos, pero la presencia de cooxidantes como el 1-hidroxibenzotriazol (HBT), el 2,2'-azinobis(ácido 3-etilbenzothiazoline-6-sulfónico) (ABTS) o el ácido violúrico; capacita a la enzima para atacar sustratos más difícilmente oxidables como los de tipo no fenólico (Soares *et al.*, 2001). La lacasa es la enzima ligninolítica presente más frecuentemente en los hongos de pudrición blanca.

2.9 MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

2.9.1 Microorganismos degradadores de celulosa

Los hongos basidiomicetos y las bacterias aerobias degradan el material celulósico a través de la producción de celulasas extracelulares (Lynd *et al.*,

2002). Entre este grupo se encuentran las bacterias del género *Cellulomonas* sp (Elberson *et al.*, 2000) y *Streptomyces* sp.(Alani *et al.*, 2008), así como los hongos basidiomicetos responsables de la pudrición de la madera (Baldrian & Valaskova, 2008), que son los organismos más estudiados en esta área porque producen celulasas y actualmente dominan las aplicaciones industriales. Entre estos últimos se encuentran *Sclerotium rolfsii*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Volvariella volvacea*, *Schizophyllum commune*, y *Cnoporus sanguineus*, *Bjerkandera adusta*, y algunos ascomicetos como *Trichoderma reesei*, y especies de *Aspergillus* y *Penicillium* (Sternberg, 1976; Duff & Murray, 1996; Ding *et al.*, 2006; Quiroz-Castañeda *et al.*, 2009).

El hongo filamentoso *Fusarium oxysporum* es conocido por su habilidad en la producción de etanol mediante sacarificación y fermentación simultáneas de celulosa. Sin embargo, la velocidad de conversión es baja y se producen cantidades significativas de ácido acético como subproducto. Pocas especies microbianas tienen la habilidad de fermentar directamente celulosa a etanol, algunas de las reportadas son *Neurospora*, *Monilia*, *Paecilomyces* y *Fusarium*.

F. oxysporum produce una amplia gama de celulasas y xilanasas, las cuales ya han sido caracterizadas y tienen potencial en la producción de alcohol. (Quintero & Cardona, 2009)

2.9.2 Microorganismos degradadores de lignina

Los hongos que tienen sistemas ligninolíticos pertenecen principalmente a la clase de los Basidiomycetes y son llamados hongos de la podredumbre blanca, entre los cuales hay especies saprófitas (Steffen *et al.*, 2002; Olvera,2003). Además, existen Ascomycetes que han sido estudiados en la degradación de la lignina como *Fusarium oxysporum* (Valenzuela *et al.*, 2001), *Penicillium* sp. y sobre todo el género *Aspergillus* (Cardoso y Costa, 1994; Valenzuela *et al.*, 2001; Ahammed y Prema, 2002) entre ellos, las especies de *A. niger* (Marquez *et al.*, 2007), *A. flavus* (Betts y Dart, 1989), *A. japonicus* (Milstein *et al.*, 1983) y *A.*

fumigatus (Kadam y Drew, 1985). También se han registrado hongos levaduriformes con la capacidad de degradar lignina, como *Candida sake*, *Cryptomyces laurentii*, *Rhodotorula glutinis* (Olvera, 2003). Los hongos descomponedores de paja son un grupo ecológicamente importante de microorganismos involucrados en el reciclamiento del carbono en los suelos y su hábitat es la parte superior de los suelos en bosques y prados, que son ricos en materia orgánica como la celulosa, hemicelulosa y lignina provenientes de plantas muertas (hojas y ramas). La biodegradación de la lignina es un paso clave para el reciclamiento de carbono en los ecosistemas terrestres, donde los basidiomicetes degradan los polímeros de la madera facilitando la utilización de la celulosa por poblaciones microbiales.

La degradación de la lignina es de naturaleza oxidativa y es realizada por un conjunto de enzimas agrupadas conocidas como enzimas ligninolíticas o peroxidasas ligninolíticas, quienes catalizan la oxidación del peróxido de hidrógeno (este proceso ha sido identificado como una reacción clave en el proceso degradativo de la lignina).

2.10 TIPOS DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

Los materiales lignocelulósicos se pueden clasificar en residuos agrícolas, subproductos de procesos agrícolas, cultivos destinados a la generación de energía.

2.10.1 Residuos agrícolas

Estos son generados a partir de ciertos procesos de la agroindustria, como por ejemplo cáscaras, frutos, desechos de animales, etc. En países como el nuestro este tipo de materiales abundan y se considera que no tienen ningún tipo de aplicación en la industria de la manufactura de productos de alto valor agregado diferente al de abonos orgánicos. Los residuos agrícolas se generan en grandes cantidades y es posible adquirirlos fácilmente y a un precio muy económico.

2.10.2 Subproductos de procesos agrícolas

Estos son el resultado de procesos realizados en el sector agrícola, como por ejemplo el bagazo de caña como subproducto en la producción de azúcar y la pulpa y el mucílago de café en el proceso de beneficiado para la producción de café.

2.10.3 Cultivos destinados a la generación de energía

Son cultivos que se emplean únicamente en la generación de biocombustibles como por ejemplo los cultivos de heno, sauce, etc.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Aislamiento de microorganismos presentes en la biomasa lignocelulósica (pulpa de café).

3.1.1 Toma de muestra

El muestreo se realizó en tres fincas ubicadas en el municipio de Chinchiná en el Departamento de Caldas, se tomaron muestras de la pulpa procedente del beneficio del café. Se realizó muestreo de 500 gramos por cada finca. Las muestras se colectaron en bolsas plásticas estériles debidamente marcadas, se sellaron y almacenaron en termos de icopor con hielo.

Posteriormente se llevaron al laboratorio del Grupo de Investigaciones Biológicas (GIBI) ubicado en la Universidad Católica de Manizales para su procesamiento y fueron conservadas a una temperatura de 4°C para evitar la proliferación microbiana.

3.1.2 Preparación de la muestra

De cada uno de los 500 gramos de la muestra de pulpa, se tomaron 10g y se adicionaron a 90 mL de agua destilada estéril para realizar la solución madre, se agitó vigorosamente para lograr una homogenización completa. Posteriormente, se realizaron diluciones en base 10, para ello se emplearon 7 tubos, cada uno con 9 mL de agua destilada estéril, al primer tubo se le adicionó 1 mL de la solución madre, quedando de esta manera preparada la dilución de 10^{-1} , luego se transfirió 1 mL de la dilución 10^{-1} al siguiente tubo para preparar la dilución 10^{-2} y así sucesivamente hasta alcanzar una dilución de 10^{-7} .

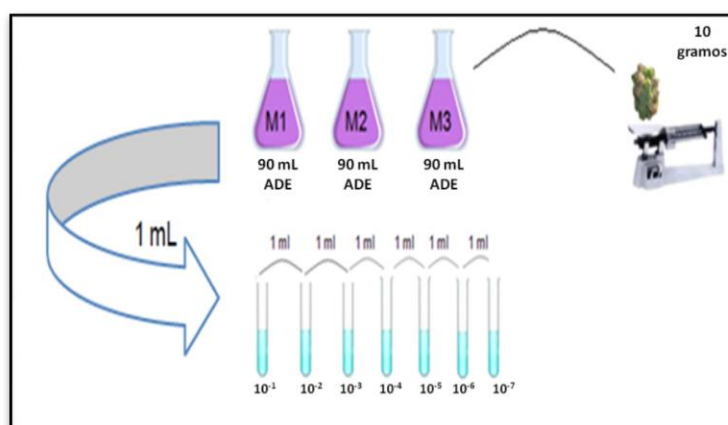


Figura 6. Esquema de Preparación de muestras (Meneses, 2011)

3.1.3 Siembra y recuperación de los microorganismos

Se realizó siembra por superficie en Agar- Rosa de Bengala para hongos filamentosos y levaduras, Agar-Nutritivo para bacterias y hongos, y Agar-PDA para hongos filamentosos y levaduriformes tomando 0.1 mL de la dilución 10^{-6} y adicionándolo en cada una de las cajas, teniendo en cuenta de realizar el procedimiento por duplicado, la muestra se distribuyó en la caja con rastrillo bacteriológico. El periodo de incubación fue para bacterias 24 a 48 horas, levaduras 96 horas y para hongos filamentosos 5 a 8 días.

3.1.4 Aislamiento y purificación de Colonias

Después de obtener crecimiento de las colonias en cada una de las cajas se procedió a realizar la purificación de las colonias. Se realizó coloración de Gram para definir el tipo de microorganismo y se procedió a realizar purificación de las diferentes colonias aislando bacterias, hongos levaduriformes y hongos filamentosos en Agar nutritivo, Agar Rosa de Bengala y Agar Papa Dextrosa respectivamente.

3.2 IDENTIFICACIÓN EN GÉNERO Y ESPECIE LA BIOTA MICROBIANA PRESENTE EN EL RESIDUO LIGNOCELULÓSICO EVALUADO.

En el proceso de identificación se tuvieron en cuenta las características macroscópicas de las colonias, como color, topografía y textura.

3.2.1 Identificación de Bacterias y hongos levaduriformes

Teniendo en cuenta la coloración de Gram a partir del Agar nutritivo, se procedió a realizar aislamiento selectivo en Agar MacConkey y Agar Sangre para bacterias Gram positivas y Gram negativas respectivamente y para el caso de hongos levaduriformes se realizó aislamiento selectivo en Agar Sabouraud, con el fin de proceder con la identificación en el equipo automatizado VITEK 2 COMPAQ®, teniendo en cuenta que el equipo maneja tarjetas con pruebas bioquímicas que contienen diferentes ensayos enzimáticos para diferenciar los microorganismos.

3.2.2 Identificación de Hongos Filamentosos

La identificación de hongos filamentosos se realizó a través de microcultivos, empleando un medio de cultivo pobre en nutrientes para permitir a los hongos expresar estructuras fructíferas y compararlas con la clave taxonómica de hongos imperfectos de Barnet y Hunter, y de esta manera identificar los hongos filamentosos presentes en este tipo de residuo agroindustrial.

3.3 Identificación molecular de microorganismos presentes en el residuo lignocelulósico evaluado (pulpa de café)

Para la identificación molecular fue necesario realizar protocolos de extracción de DNA dependiendo del tipo de microorganismo (Anexo 1, 2 y 3), posteriormente se realizó amplificación del DNA con la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) empleando *Primers Universales* para Bacterias y *Primers ITS1* e *ITS4* para hongos levaduriformes y filamentosos. Los productos de PCR obtenidos fueron enviados a secuenciar.

3.4 PRESERVACIÓN DE CEPAS

Después de tener identificados los microorganismos se llevo a cabo la preservación de las cepas.

La preservación se realizó adicionando una colonia aislada a cada tubo conteniendo glicerol al 10%, la suspensión realizada debe estar en una escala de MacFarland ideal que para bacterias y levaduras debe estar entre 3 y 4. Este procedimiento se realizó por duplicado.

Posteriormente se almacena la suspensión en tubos eppendorf, adicionando 1.5mL a cada tubo. Se realiza una adaptación del microorganismo llevándolo primero a una temperatura de 4°C durante 1 hora, luego 4 horas a temperatura de congelamiento y finalmente a -20°C. Se observa la viabilidad de los microorganismos a las 48 horas.

Es importante asignarle un código a cada una de las cepas, dicho código es suministrado teniendo en cuenta la información requerida por el sistema de organización del cepario de la Universidad Católica de Manizales.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Aislamiento de microorganismos presentes en la biomasa lignocelulósica (pulpa de café)

En la Tabla No. 7 se describen los 41 microorganismos aislados, de las muestras tomadas en tres fincas ubicadas en el municipio de Chinchiná en el departamento de Caldas, de los cuales 26 corresponden a bacterias, 13 a hongos filamentosos y 2 hongos levaduriformes respectivamente.

Tabla 7. Aislamiento de microorganismos provenientes de pulpa de café

	Muestra 1 (Hacienda el prado)	Muestra 2 (Hacienda la Regina)	Muestra 3 (Hacienda la Ínsula)	TOTAL
BACTERIAS	12	9	5	26
HONGOS FILAMENTOSOS	5	4	4	13
HONGOS LEVADURIFORMES	1	1	-	2
TOTAL	18	14	9	41

4.1.1 Cuantificación inicial de Unidades Formadoras de Colonia (UFC/mL)

Tabla 8. Recuento de Unidades Formadoras de Colonia

	MUESTRA 1 Hacienda el Prado	MUESTRA 2 Hacienda la Regina	MUESTRA 3 Hacienda la Ínsula
Agar Nutritivo	10 x10⁷	35 x10⁷	21 x10⁷
Agar PDA	30 x10⁶	29 x10⁷	30 x 10⁶
Agar Rosa de Bengala	20 x 10⁶	20 x 10⁶	< 1000000

En la Tabla No. 8 se presentan los recuentos, se observa que las muestras presentan un elevado número de microorganismos, sin embargo, la Muestra 2 que corresponde a la “Hacienda la Regina” presenta mayor cantidad de microorganismos con respecto a las otras.

La muestra 3 presenta un recuento menor de hongos levaduriformes comparada con la muestra 1 y 2.

En cuanto a los medios de cultivos empleados se observa mayor recuperación en Agar nutritivo, este medio permite el crecimiento rápido de microorganismos poco exigentes.

Los medios de cultivo Agar PDA y Rosa de bengala se utilizaron para la recuperación de hongos filamentosos y levaduriformes

Antes de realizar la recolección de las muestras se confirmó que las haciendas no hubieran aplicado ningún tipo de control biológico ni químico al cultivo.

4.2 Identificación en género y especie de la biota microbiana presente en el residuo lignocelulósico evaluado (Pulpa de Café)

Después del proceso de recuperación de colonias y aislamiento de cada una, se obtuvo un total de 20 microorganismos, 13 bacterias, 6 hongos filamentosos y 1 hongo levaduriforme respectivamente.

Tabla 9. Relación de Microorganismos recuperados

	Muestra 1 Hacienda el prado	Muestra 2 Hacienda la Regina	Muestra 3 Hacienda la ínsula	TOTAL
BACTERIAS	10	1	2	13
HONGOS FILAMENTOSO	1	2	3	6
HONGOS LEVADURIFORMES	1	-	-	1
TOTAL	12	3	5	20

La Tabla No.9, muestra una reducción del 50% de los microorganismos aislados inicialmente, esto es debido a la contaminación por ácaros presentada, en donde se trato de recuperar y purificar la mayoría de microorganismos (bacterias, hongos y levaduras).

4.2.1 Identificación de Bacterias y Hongos levaduriformes

Después de recuperadas las colonias se realizó coloración de Gram y purificación en medios de cultivo selectivo para determinar el tipo de microorganismo y definir características macroscópicas y microscópicas de cada una de las colonias.

Se realizó una primera identificación con el equipo automatizado VITEK 2 COMPAQ® y los resultados obtenidos se validaron a través de técnicas moleculares.

Tabla 10. Paralelo de resultados obtenidos por sistema VITEK2 COMPAQ® y SECUENCIACIÓN

Código	Resultados VITEK 2 COMPAQ®	Resultados Secuenciación
173_AG_B	<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>
175_AG_B	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	No Identifico
176_AG_B	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella sp.</i>
177_AG_B	<i>Globicatella sanguinis</i>	<i>Bacillus sp.</i>
178_AG_B	<i>Alloiococcus otitis</i>	No identifico
179_AG_B	<i>Kocuria varians</i>	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
180_AG_B	<i>Achromobacter denitrificans</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>
181_AG_B	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	No identifico
182_AG_B	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Cellulosimicrobium sp</i>
183_AG_B	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>
184_AG_B	<i>Kocuria rosea</i>	No identifico
185_AG_B	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Promicromonospora flava</i>

La Tabla 10 muestra, los resultados obtenidos a través del sistema VITEK2 COMPAQ® y por Secuenciación. No fue posible identificar algunas bacterias por técnicas moleculares lo que pudo deberse a secuencias muy pequeñas en los productos de PCR interfiriendo en la obtención de buenos resultados.

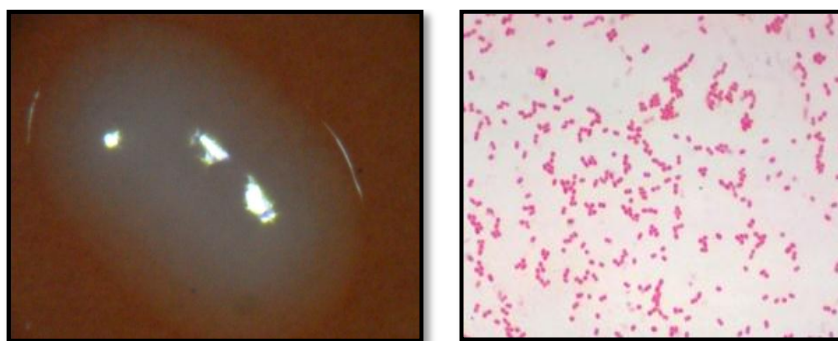
Por otro lado, las discrepancias observadas entre ambos métodos, radica en que el equipo VITEK2 COMPAQ®, esta estandarizado para muestras clínicas y muy pocas veces es empleado en la identificación de microorganismos provenientes de otros ambientes.

En cuanto a las bacterias que no se pudieron confirmar por secuenciación no pueden tenerse en cuenta, ya que, los resultados del VITEK2 COMPAQ®, no son confiables.

4.2.1.1 Achromobacter xylosoxidans

El *Achromobacter xylosoxidans*, también llamado *Alcaligenes xylosoxidans* o *Alcaligenes denitrificans* spp. *xylosoxidans* es un bacilo gram negativo descrito por primera vez en 1971 por Yabuuchi y Ohyama tras su aislamiento en el oído humano. Posteriormente se ha aislado en el tracto gastrointestinal humano y en ambientes acuáticos, tanto intrahospitalarios como extrahospitalarios. . Es un microorganismo patógeno capaz de producir diversas infecciones, principalmente bacteriemia, y se relaciona con estados de inmunosupresión. (Sancho-Chust, *et al*, 2009).

Esta bacteria presenta colonias blancas, cremosas, brillantes, convexas y de borde definido (Figura 7a) y al microscopio se observan como bacilos gram negativos (Figura 7b)



(7a)

(7b)

Figura 7. Características Macroscópicas (7a) y Microscópicas (7b) *Achromobacter xylooxidans*

No se ha reportado en la literatura que esta bacteria presente o tenga utilidad desde el punto de vista industrial.

Los resultados obtenidos por secuenciación se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Resultados Secuenciación *Achromobacter xylooxidans*

Query Name	Subject		Score			Identities		
	AC	Gene	Bit	Raw	EValue	Match	Total	Pct.(%)
111206-10_A01_173_AG_B-RM	AF531768.1	Achromobacter xylooxidans 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1479	746	0.0	746	746	100

4.2.1.2 Klebsiella sp.

Las bacterias del género *Klebsiella* hacen parte de la familia de las Enterobacterias y se caracterizan por ser bacilos gram negativos (Figura 8a) inmóviles. Este género lo forman varias especies entre las que se encuentran *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola* y *K. terrigena*. La capa mas externa de *Klebsiella* sp.

Los microorganismos del género *Klebsiella* son bacilos gram negativos inmóviles que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae. El género *Klebsiella* está formado por varias especies, entre las que se encuentran *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola* y *K. terrigena*. La capa más externa de *Klebsiella* spp., está formada por una gran cápsula de polisacáridos que le confiere la característica mucóide (Figura 8b) a las colonias en medio de cultivo.

El hábitat natural es el suelo y el agua, la mayoría de las *Klebsiellas* puede fijar nitrógeno, propiedad que no se encuentra en ninguna otra enterobacteria. Desde el punto de vista industrial, *Klebsiella oxytoca* muestra gran potencial como degradador de material lignocelulósico para la producción de etanol.

K. oxytoca es una bacteria entérica que ha sido aislada creciendo en papel y en madera. Este microorganismo es capaz de crecer en un pH tan bajo como 5 y a una temperatura de 35°C, puede utilizar para su crecimiento una gran variedad de azúcares incluidos hexosas y pentosas, así como celobiosa y celotriosa, lo cual lo hace muy interesante para producir etanol a partir de celulosa. En los procesos de sacarificación con celulasas las enzimas son inhibidas por la presencia de la celobiosa (Freer & Detroy, 1983), por lo tanto para realizar procesos de sacarificación y fermentación simultánea (SFS) con *K. oxytoca* disminuiría la cantidad de celulasas que se agrega a los cultivos.

K. oxytoca fermenta la glucosa hacia una gran variedad de ácidos orgánicos y productos neutros. En particular la producción de etanol en *K. oxytoca* se lleva a cabo mediante la vía de la piruvato formato liasa (PFL). La introducción del operón PET (conteniendo los genes *pdh* y *adh* de la vía etanológica de *Z. mobilis*) en *K. oxytoca* (M5A1), logró aumentar la concentración de etanol hasta el 90% del total de productos de fermentación (Ohta *et al.*, 1991). Esta cepa tiene a la vez la capacidad de fermentar xilosa tan rápido como la glucosa (2 g/l h), esto es aproximadamente 2 veces más rápido que la cepa *E. coli* KO11. Wood & Ingram (1992) lograron integrar el operón PET en el cromosoma de *K. oxytoca* y

tras métodos de mutagénesis y selección (con el objeto de incrementar su producción de etanol), la cepa resultante se denominó *K. oxytoca* P2 y tuvo la capacidad de metabolizar glucosa (100 g/l) o celobiosa (100 g/l) en 48 horas, con producciones entre 44-45 g/l de etanol. También se han integrado en el cromosoma de esta bacteria dos genes de endoglucanasas extracelulares (*celZ* y *celY*) de *Erwinia chrysanthemi*, además del transportador auxiliar (*out*), la cepa celulolítica fue denominada *K. oxytoca* SZ21 (Zhou & Ingram, 2000). Esta cepa fue capaz de fermentar lentamente celulosa (Sigmacell 50), sin la necesidad de agregar celulasas adicionales (Zhou *et al.*, 2001).

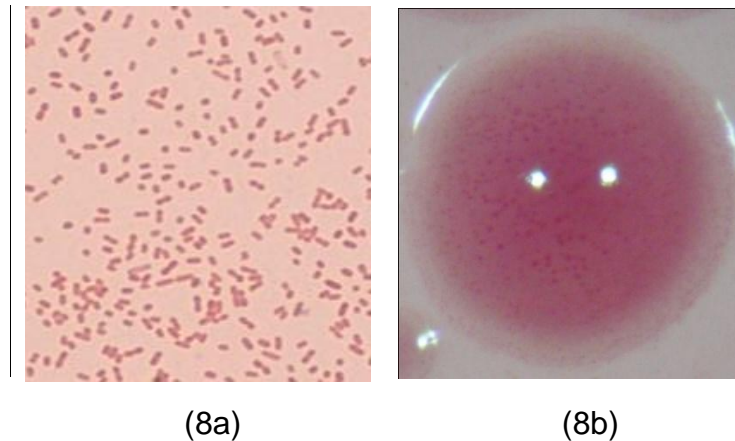


Figura 8. Características Microscópicas (8a) y Macroscópicas (8b) de Klebsiella sp.

En la siguiente tabla, se muestran los resultados obtenidos por secuenciación de *Klebsiella* sp, no se pudo identificar la especie debido a que el gen presenta solo una secuencia parcial.

Tabla 12. Resultados secuenciación *Klebsiella* sp

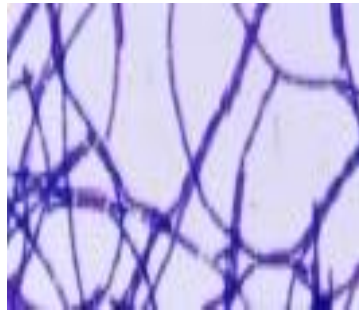
Query	Subject		Score			Identities		
Name	AC	Gene	Bit	Raw	EValue	Match	Total	Pct.(%)
111206-10_D01_176_AG_B-RM	EU074057.1	Klebsiella sp. HBB9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1483	748	0.0	751	752	99

4.2.1.3 *Bacillus* sp

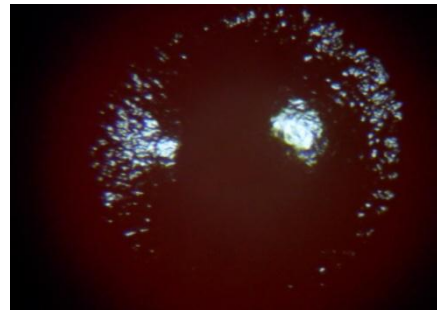
El género *Bacillus* sp., lo constituyen un grupo de bacterias gram positivas en forma de bastón llamadas bacilos (Figura 9a) y en medio de cultivo se evidencian como colonias blancas de bordes irregulares con apariencia de vidrio esmerilado (Figura 9b) estas bacterias pertenecen a la división de Firmicutes. Se caracterizan por ser aerobios estrictos o anaerobios facultativos. En situaciones extremas son capaces de formar endosporas céntricas, que deforman la estructura de la célula. La endospora le confiere resistencia a temperaturas elevadas y a desinfectantes químicos corrientes.

Estas bacterias son saprofitas y es posible encontrar las normalmente en el suelo, el agua de mar y los ríos. Es considerada una bacteria contaminante de muchos alimentos por lo que se la considera como indicadora de calidad alimentaria.

Las especies del género *Bacillus* sp. se clasifican en los subgrupos *B. polymyxa*, *B. subtilis* (que incluye a *B. cereus* y *B. licheniformis*), *B. brevis* y *B. anthracis*.



(9a)



(9b)

Figura 9. Características microscópicas (9a) y macroscópicas (9b) de *Bacillus* sp

Los resultados de la identificación por medio de la secuenciación se observan en la siguiente tabla.

Tabla 13. Resultados secuenciación *Bacillus* sp.

Query	Subject		Score			Identities		
	Name	AC	Gene	Bit	Raw	EValue	Match	Total
111206-10_E01_177_AG_B-RM	DQ448753.1	Bacillus sp. CNJ905 PL04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1495	754	0.0	764	766	99

En cuanto al uso en la industria, está documentado que *B. thuringiensis* se emplea como alternativa biológica a los pesticidas y está estrechamente relacionada con *B. cereus*, una bacteria de los suelos, y con la *B. anthracis* causante del ántrax.

4.2.1.4 Rhodococcus erythropolis

Rhodococcus se encuentra dentro de los 16 géneros descritos como actinomicetos aeróbicos de importancia médica. (Camponovo, *et al.*, 2006). El género Rhodococcus es un grupo diverso de bacterias gram positivas (Figura 10a) que se encuentran comúnmente en el suelo y el agua de mar. El género Rhodococcus contiene 12 especies y se caracterizan por tener alto contenido de G + C. Este microorganismo es capaz de crecer en la mayoría de los medios no selectivos. En agar sangre forma colonias redondas, irregulares y mucosas (Figura 10b)

Rhodococcus sp muestra notable versatilidad metabólica, incluyendo su capacidad para degradar una gran variedad de compuestos xenobióticos, como los bifenilos policlorados (PCB). Algunas cepas son conocidas por producir biosurfactantes y otros son fuente de enzimas útiles como la fenilalanina deshidrogenasa y endoglicosidasas. Debido a estas características, las bacterias Rhodococcus se supone que son de importancia industrial. También puede producir una gran cantidad de polisacáridos extracelulares (EPS), que se supone que juegan un papel crucial en su tolerancia a una variedad de disolventes orgánicos. *Disponible en:* <http://www.bio.nite.go.jp/ngac/e/pr4-e.html>

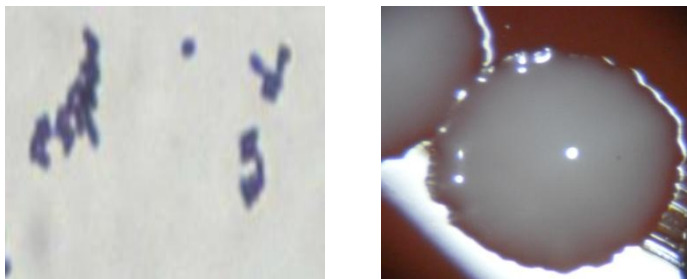


Figura 10. Características microscópicas (10a) y macroscópicas (10b) de Rhodococcus sp

Los resultados de la identificación obtenidos por medio de la secuenciación se observan en la siguiente tabla.

Tabla 14. Resultados secuenciación *Rhodococcus erythropolis*

Query Name	Subject		Score			Identities		
	AC	Gene	Bit	Raw	EValue	Match	Total	Pct.(%)
111206-10_G01_179_AG_B-RM	AP008957.1	Rhodococcus erythropolis PR4 DNA, complete genome	1415	714	0.0	724	726	99

4.2.1.5 *Pseudomonas* sp.

Pseudomonas es un género de bacilos rectos o ligeramente curvados, Gram negativos (Figura 11a), oxidasa positivos, aeróbicos estrictos aunque en algunos casos pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones. El catabolismo de los glúcidos se realiza por la ruta de Etner-Doudoroff y el ciclo de los ácidos tricarbónicos. Algunos miembros del género son psicrófilos, mientras que otros sintetizan sideróforos fluorescentes de color amarillo-verdoso con gran valor taxonómico. Es común la presencia de plásmidos y no forman esporas. Se han aislado bacterias de este género tanto en suelos limpios como en suelos contaminados por productos biogénicos y xenobióticos. También son microbiota predominante en la rizosfera y en la filosfera de plantas; del mismo modo, se han aislado de ambientes acuáticos, tanto de agua dulce como de aguas marinas.

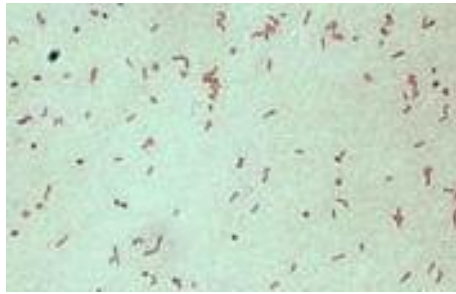
Este género es uno de los más proclives a la degradación de compuestos orgánicos, especialmente cepas de la especie *Pseudomonas putida*. El amplio potencial catabólico de los componentes del género viene dado en muchos casos por la presencia de determinantes plasmídicos y transposones autotransmisibles. La ubicuidad de las bacterias del género *Pseudomonas* y su capacidad para explotar una amplia variedad de nutrientes refleja un sistema de

adaptación al medio ambiente que no encuentra parangón en las bacterias de otros géneros.

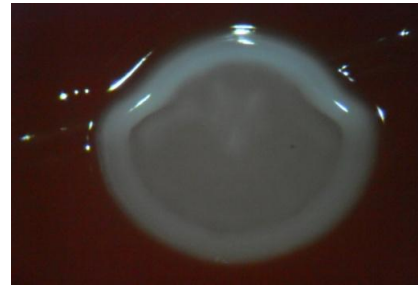
Con el reciente análisis de secuencias del RNAr 16S se han definido la taxonomía de muchas especies bacterianas y como resultado, el género *Pseudomonas* incluyen algunas cepas clasificadas anteriormente dentro de las *Chryseomonas* y *Flavimonas*. Otras cepas clasificadas previamente en el género *Pseudomonas*, ahora son agrupadas en los géneros *Burkholderia* y *Ralstonia*.

No es sorprendente que se considere a las bacterias del género *Pseudomonas* un paradigma de versatilidad metabólica, y microorganismos claves en el reciclado de materia orgánica en los compartimentos aeróbicos de los ecosistemas, jugando, por tanto, un papel esencial en la mejora y el mantenimiento de la calidad medioambiental. Además de su uso en biodegradación las especies del género *Pseudomonas* se emplean en distintos procesos industriales, tales como la fabricación de bioplásticos o en técnicas de biocontrol. El género demuestra una gran diversidad metabólica, y consecuentemente son capaces de colonizar un amplio rango de nichos. Son de fácil cultivo in vitro y ampliamente disponibles en número, por lo que ciertas cepas son excelentes para investigaciones científicas, por ejemplo, *P. aeruginosa* y su rol como patógeno oportunista de humanos, el patógeno de plantas *P. syringae*, la bacteria de tierra *P. putida* y la *P. fluorescens* que promueve el crecimiento de plantas. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas>

Las *Pseudomonas* crecen en medios simples. En agar simple forman colonias brillantes, confluentes, de borde continuo y a veces ondulado con un centro opaco. (Figura 11b). El pigmento (piocianina) se difunde en el medio dándole una tonalidad verdosa.



(11a)



(11b)

Figura 11. Características microscópicas (11a) y macroscópicas (11b) de Pseudomonas sp.

Los resultados de la identificación obtenidos por medio de la secuenciación se observan en la siguiente tabla.

Tabla 15. Resultados secuenciación Pseudomonas sp

Query Name	Subject		Score			Identities		
	AC	Gene	Bit	Raw	EValue	Match	Total	Pct.(%)
111206-10_C02_183_AG_B-RM	FJ938137.1	Uncultured Pseudomonas sp. clone XDC16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1449	731	0.0	743	747	99

4.2.1.6 Cellulosimicrobium sp y Promicromonospora flava

Son bacterias gram positivas, anaerobias facultativas y algunos estudios demuestran que han sido aisladas de intestinos grueso de las termitas australianas (Bakalidou, *et al.*, 2002) y se piensa poseen capacidad celulolítica y xilanolítica, sin embargo, el empleo de estas bacterias y su diversidad metabólica aplicada en el campo industrial apenas se encuentra en estudio.

4.2.2 Identificación de Hongos filamentosos

Para la identificación de hongos filamentosos se realizó la técnica de microcultivo, con el fin de observar estructuras fructíferas propias del hongo y poder de esta manera identificarlos comparando dichas estructuras con la clave taxonómica de hongos imperfectos de Barnett y Hunter. Los resultados obtenidos se validaron a través de técnicas moleculares.

4.2.2.1 Identificación por Técnica de Microcultivo y Secuenciación

La identificación se realizó en un medio pobre que permitiera evidencias estructuras fructíferas del hongo. Se confirmaron por técnicas moleculares dos hongos filamentosos.

4.2.2.1.1 Cladosporium sp.

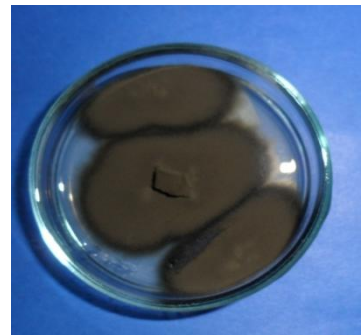
Género perteneciente a la familia-forma *Demaciáceas* (Orden forma *Moniliales*, Subdivisión *Deuteromycotinas*) que engloba a unas 40 especies, algunas de ellas fitopatógenas y la mayoría saprofitas sobre vegetación o sobre el suelo; algunas de sus especies son capaces de atacar celulosa, pectina y lignina. Es un género de distribución cosmopolita, siendo uno de los taxones más aislados y abundantes en los recuentos aerobiológicos de todo el mundo. Disponible en: <http://www.uco.es/aerobiologia/hongos/cladospo.htm>

Sus conidióforos son macronematosos o semimacronematosos simples o poco ramificados, con una coloración marrón o verdosa, y de superficie lisa o ligeramente granulosa en algunas especies. Muchas de sus especies poseen ramoconidios con o sin septos. La célula conidiógena es poliblastica, generalmente integrada y simpodial; da lugar a conidios que generalmente quedan en cadenas acrópetas, o a veces se presentan solitarios. Pueden ser de forma variada (elipsoidales, limoniformes, oblongos, esféricos, subesféricos, fusiformes), con una cicatriz en la base y pueden ser unicelulares o poseer 1-3

septos transversales; poseen pared lisa, verrugosa o equinada, hialina a pigmentada, de color oliváceo a marrón oscuro (Figura 12a). En las preparaciones los conidios de *Cladosporium* pueden aparecer encadenados o solitarios. Poseen un tamaño aproximado de 3-7 x 2-4 micras, son reconocibles por las características de color y forma comentadas en la descripción anterior y por la presencia de una cicatriz en la base. En medio de cultivo se observan colonias de color oliváceo y a veces grises o marrones; aterciopeladas, flocosas o pelosas. (Figura 12b) <http://www.uco.es/aerobiologia/hongos/cladospo.htm>



(12a)



(12b)

Figura 12. Características Microscópicas (12a) y Macroscópicas (12b) de *Cladosporium* sp

Los resultados de la identificación obtenidos por medio de la secuenciación se observan en la siguiente tabla.

Tabla 16. Resultados secuenciación *Cladosporium* sp

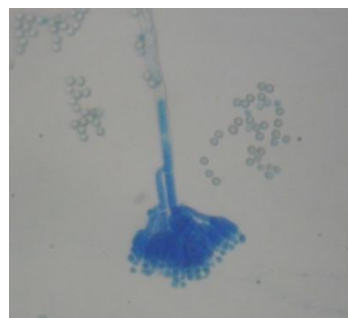
Query Name	Subject		Score			Identities		
	AC	Gene	Bit	Ra w	EValu e	Matc h	Tota l	Pct.(%)
111201- 15_A07_218_AG_F- ITS1	HM855228. 1	Cladosporium sp. NY7460a 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	97 9	494	0.0	497	498	99

4.2.2.1.2 *Penicillium brevicompactum*

Penicillium brevicompactum es un hongo filamentoso con colonias de crecimiento moderado, vellosas, aterciopeladas, con colores verdes y fisuras radiales (Figura 13a). Presenta conidióforos tabicados de pared lisa y ramificada en sus extremos, con métulas compactas y fiálides en forma de botella de donde nacen los conidios lisos o ligeramente verrucosos, elipsoidales formando cadenas, sin ramificar, con un aspecto característico de penacho o pincel (Figura 13b).



(13a) ¹



(13b)

Figura 13. Características Macroscópicas (13a) y Microscópicas (13b) de *Penicillium brevicompactum*

Penicillium brevicompactum es un hongo filamentoso que presenta un gran potencial para su uso industrial debido a su producción eficiente de pectinasa. Las enzimas pectinolíticas catalizan la degradación de la pectina presente en la pared celular de las plantas. Entre estas enzimas la poligalacturonasa preferiblemente hidroliza ácidos pécticos y la pectina liasa cataliza la división de los límites de la α -D-(1,4) glucosídico de la pectina por el mecanismo de beta-eliminación. Después de analizar la producción de pectinasa de 10 especies del género *Penicillium*, Pereira *et al.* (2002) informó que *Penicillium brevicompactum* fue el mejor productor de pectina liasa presentado una considerable actividad poligalacturonasa. Considerando el importante papel que estas enzimas tienen en algunos procesos biotecnológicos este hongo se convirtió en un organismo prometedor para uso industrial. Para estas aplicaciones, esta especie debe ser mejorada genéticamente para obtener una mayor producción de enzimas y por lo tanto un mayor rendimiento a un costo accesible.

En los estudios realizados con pulpa de café sobre aislamiento de microorganismos se coincide con la presencia del género *Penicillium* sp, sin embargo, en la mayoría de los estudios se identifica hasta género, sin obtener resultados certeros de la presencia de *Penicillium brevicompactum*

¹ Fuente: http://www.livne.co.il/thesis/fungi_pictures/penicillium/index.html

Los resultados de la identificación obtenidos por medio de la secuenciación se observan en la siguiente tabla.

Tabla 17. Resultados secuenciación *Penicillium brevicompactum*

Query Name	Subject		Score			Identities		
	AC	Gene	Bit	Raw	EValue	Match	Total	Pct.(%)
111201-15_C08_228_AG_F-ITS1	HM776430.1	Penicillium brevicompactum internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1009	509	0.0	526	529	99

Se recuperaron 6 hongos filamentosos de los cuales solo tres fueron enviados a secuenciar obteniendo resultado únicamente de dos.

Tabla 18. Paralelo de resultados obtenidos por MICROCULTIVO y SECUENCIACIÓN

Código	Resultado Clave de Barnett y Hunter	Resultado Secuenciación
218_AG_F	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Cladosporium lignicola</i>
228_AG_F	<i>Penicillium sp</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>

La Tabla 18, muestra los resultados obtenidos con la clave de Barnett y Hunter y que fueron confirmados con la secuenciación.

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los inconvenientes presentados para la identificación de los microorganismos, se consideró el empleo de técnicas de biología molecular debido a su alta sensibilidad.

Se logró el aislamiento e identificación de bacterias y hongos filamentosos con gran potencial para ser empleados en el campo industrial, sin embargo, no se encontraron en las muestras de residuos analizados microorganismos degradadores de material lignocelulósico.

Rhodococcus erythropolis es una bacteria que muestra notable versatilidad metabólica, incluyendo su capacidad para degradar una gran variedad de compuestos xenobióticos, lo que permite tenerla en cuenta como una bacteria con gran potencial para ayudar a mitigar los problemas de contaminación ambiental.

Penicillium brevicompactum es un hongo filamentosos que puede ser empleado en la industria por su gran capacidad para producir pectinasas.

La identificación molecular es muy sensible frente a otros métodos de identificación microbiana, sin embargo, las técnicas tradicionales son y serán el primer paso para lograr una buena identificación de los microorganismos en cuestión.

La pulpa de café es un residuo que se puede utilizar en procesos agroindustriales con el fin de mitigar los problemas de contaminación ambiental que se presentan actualmente.

La pulpa de café es un material que por su composición permite el crecimiento de una gran diversidad de microorganismos que pueden ser empleados en la industria para mejorar diferentes procesos.

RECOMENDACIONES

Al realizar aislamiento e identificación de microorganismos contar con un laboratorio que brinde condiciones óptimas que aseguren buenos resultados.

Además de emplear técnicas de identificación tradicional es muy importante contar con identificación molecular que nos permita obtener resultados más confiables.

Desarrollar estudios enzimáticos para evaluar el potencial de degradación de compuestos lignocelulósicos de los microorganismos aislados.

Plantear propuestas de investigación sobre el uso sostenible de residuos lignocelulósicos como alternativas desde el punto de vista ambiental y económico.

Diseñar propuestas de investigación que permitan aprovechar los microorganismos identificados de acuerdo con su potencial industrial.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahammed S. y P. Prema. 2002. Influence of media nutrients on synthesis of lignin peroxidase from *Aspergillus* sp. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 102-103(1-6).
- Arias, C. E. L., & Piñeros, E. P. A. (2008). *Aislamiento e Identificación de Hongos Filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde*. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Atlas, R.M. & Bartha, R. 1980. The carbon cycle. In: *Microbial Ecology: Fundamentals and applications*. Addison-Wesley Publishing Company.
- Betts W. y R. Dart. 1989. Initial reactions in degradation of tri- and tetrameric lignin-related compounds by *Aspergillus flavus*. *Mycological Research* 92(2):177-181.
- Bommarius, A. S., & Riebel, B. (2004). *Biocatalysis*. Atlanta, USA: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Blandón, G., Rodríguez, N., & Dávila Arias, M. T. (1999). Caracterización Microbiológica y Físico-Química de la Pulpa de Café sola y con mucilago, en proceso de lombricompostaje. *Revista del Centro Nacional de Investigaciones del Café. CENICAFÉ*, 50.
- Blandón, G., Rodríguez, N., & Dávila, M. T. (1998). Caracterización microbiológica y fisicoquímica de los subproductos del beneficio del café en proceso de compostaje. *Revista del Centro Nacional de Investigaciones del Café. CENICAFÉ*, 49.
- Bressani, R. (1978). Posibles usos de los subproductos del grano de Café. In Braham & Bressani (Eds.), *Pulpa de Café. Composición, Tecnología y Utilización*
- Calle, H. (1977). Subproductos del Café. *Boletín Técnico No. 6*, 84p
- Camponovo, R., & García, P. (2006). *Rhodococcus equi*. *Retrato microbiológico* 23(2).
- Carantón, C. F. T. (2010). *Producción de Etanol a partir de residuos provenientes del cultivo de café*. Unpublished Posgrado, Universidad Nacional de Colombia, Manizales.
- Cardoso J. y M. Costa. 1994. Aspergilli and lignocellulosics: Enzymology and biotechnological applications. *Microbiology Reviews* 13(2-3):377-386.
- Carreón, R. O. E., Ramos, L. A. S., Centeno, L. S., Leal, R. L., Martínez, J. A., & Fernandez, S. M. T. (2009). Etanol Carburante. *Biotecnología*, 13(3).

Cenicafé (Producer). (2006) Curso virtual de Fisiología. Estructura de la Planta y su relación con las funciones vegetales. . *Modulo 1*.

Claassen, P. A. M., van Lier, J. B., López Contreras, A. M., van Niel, E. W. J., Sijtsma, L., Stams, A. J. M., et al. (1999). Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 741-755.

Conesa A., C. Hondel y P. Punt. 2000. Studies on the Production of Fungal Peroxidases in *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol* 66(7): 3016–3023.

Cuervo, L., Folch, J. L., & Quiroz, R. E. (2009). Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares Para la Producción de Etanol. *Biotecnología*, 13, 11-25

Devries, R.; Visser, J. 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of Fan, L.T.; Lee, Y-H & Beardmore, D.H. 1980. Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*. XXII, 177-199.

FEC. Clasificación Botánica. El cafeto. Retrieved Octubre, 2010, from <http://www.federacioncafe.com/Publico/EICafe/EICafeto.asp>

FEDERACAFE. Guía Ambiental para el Sector Cafetero.

FEDERACAFE. (1987). Tecnología del cultivo del café.

FNC. (2010). Un producto especial: Post - cosecha. from http://www.cafedecolombia.com/particulares/es/sobre_el_cafe/el_cafe/post-cosecha/

Gómez, D. L., & Nicolás, M. J. A. (2006). *Producción de Alcohol etílico a partir de mucilago de Café*. Universidad Earth, Guácimo, Costa Rica.

http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Especial:Libro&bookcmd=rendering&return_to=Caf%C3%A9&collection_id=bc8509bfd5732798&writer=rl. Café. Retrieved Octubre, 2010

<http://www.federacioncafe.com/Publico/EICafe/EICafeto.asp>. Clasificación Botánica. El cafeto. Retrieved Octubre, 2010

Mäkelä M., S. Galkin, A. Hatakka y T. Lundell. 2002. Production of organic acids and oxalate decarboxylase in lignin-degrading white rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 542-549.

Méndez, E. L. Á., Montaña, J. S., Acuña, R., Gaitán, A., & Pacheco de Peña, M. (2004). CONSTRUCCIÓN DE UNA BIBLIOTECA GENÓMICA DE *Coffea Arabica* Var. COLOMBIA Y EVALUACIÓN CON UNA SECUENCIA HOMÓLOGA A UBIQUITINA. *Revista de la Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana*, 9, 81-90.

Montoya, C. R., & Villegas, C. D. (2008). Aplicación del mucilago de café para la obtención de Biocombustible (Etanol). Retrieved Octubre, 2010, from www.medellin.edu.co/.../

Olvera P. 2003. Aislamiento de levaduras que tengan la capacidad para degradar lignina y búsqueda de algunos genes implicados en dicha degradación. Tesis profesional presentada para obtener el título en maestría en biotecnología. Escuela de Ciencias, Universidad de las Américas. Puebla-México.

Pereira, J.F.; Queiroz, M.V.; Gomes, E.A.; Muro-Abad, J.I.; Araújo, E.F. Molecular characterization and evaluation of pectinase and cellulase production of *Penicillium* spp. *Biotechnol. Lett.*, 24, 831- 838, 2002.

Pérez, J., & Jeffries, T. W. (2002). Roles of Manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidases by Phanerochaete plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 65(4): 497-522.

Polyanna N. Herculano D. Lima M. Fernandes R. Neves C. Souza-Motta A. 2011. Isolation of cellulolytic Fungi from Waste of Castor (*Ricinus communis* L.). *Curr Microbiol* (2011) 62:1416-1422. DOI 10.1007/s00284-011-9879-3.

Prescott L. 2004. *Microbiología* 5ª Ed. Editorial McGraw-Hill Interamericana, Madrid-España

Rajaratnam, S., & Bano, Z. (1991). Biological utilization of Edible Fruiting Fungi. In Arora, Mukerji & Math (Eds.), *Handbook of Applied Mycology. Foods and Feeds* (Vol. 3)

Rodriguez, N. (Producer). (1999) *Manejo de Residuos en la Industria Cafetera*.

Roussos, S., Aquíhuatl, M. d. I. A., Trejo-Hernández, M. d. R., Perraud, I. G., Favela, E., Ramakrishna, M., et al. (1994, 1995). Biotechnological management of coffee pulp-isolation, screening, characterization, selection of caffeine-degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk. *Applied Microflora and Biotechnological*, 42, 7.

Sabatier J. 1992. Estudio de la deslignificación a la soda del bagazo. Tesis presentada en opción al grado Científico de Doctor en Ciencias Químicas. Instituto cubano de investigaciones de los derivados de la caña de azúcar. Ciudad de la habana-Cuba.

Sánchez, O. J., & Cardona, C. A. (2005). Producción Biotecnológica de Alcohol Carburante I: Obtención a partir de diferentes materias primas. *Interciencia. Revista de Ciencia y Tecnología de América*, 30.

Sánchez-de León, Y., De Melo, E., Soto, G., Johnson- Maynard, J., & Lugo-Pérez, J. (2006). Earthworm Populations, Microbial Biomass and Coffee

Production in Different Experimental Agroforestry Management Systems in Costa Rica. *Caribbean Journal of Science*,, 43(3).

Sancho-Chust, J. N., Agudo, P., Camarasa, A., & Chiner, E. (2009). *Achromobacter xylosoxidans* como agente colonizador de bronquiectasias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.

Sanhueza, E. (2009). Agroetanol. ¿Un combustible ambientalmente amigable? *Interciencia. Revista de Ciencia y Tecnología de América*, 34.

Vasco, J. Z. (1989). Utilización Integral de los subproductos del café / *Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetera*. Xalapa: Instituto Mexicano del café.

Zeri. (1997). Curso para postgrado en cero emisiones. , *Fundación Universitaria de Manizales*. Manizales

ANEXOS

ANEXO 1. EXTRACCION DE DNA EN LEVADURA

1. Transfiera 1.5 ml de cultivo líquida de levadura en un tubo eppendorf. Centrifugar 20,000g (4100rpm) durante 5 minutos.
2. Añada 200 μ de buffer Tritón/SDS.
3. Sumerja los tubos en un baño de etanol de hielo seco durante 2 minutos,
4. Transferencia a en un 95°C baño maría durante 1 minuto.
5. Repita los dos últimos pasos
6. Vortex 30 segundos.
7. Añada 200 μ l de fenol cloroformo y 0.3 g de perlas de cristal. vortex 2 minutos a temperatura ambiente. Adicionar 200 μ l de TE (pH 8). Mezclar en vortex brevemente.
8. Centrifugue 5 minutos a temperatura ambiente. Para separa la fase acuosa y la fase orgánica.
9. Trasferir la fase superior acuosa a un tubo y añadir 400-1000 de etanol helado al 100%. Mezclar por inversión o vortex. Incubar a temperatura ambiente, 5 minutos. O bien, precipite el ADN en -20°C para aumentar la producción.
10. Centrifugue 5 minutos a temperatura ambiente.
11. Remover el sobrenadante con una pipeta de Pasteur por aspiración.
12. Lavar el pellet con 500 μ l etanol 70%.
13. Centrifugue 5 minutos a temperatura ambiente.
14. Remover el sobrenadante. Secar a temperatura ambiente.
15. Suspender el pellet de acido nucleico en 50 μ l TE (pH 8.0).

ANEXO 2. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DNA BACTERIAS

EXTRACCIÓN DNA

1. Adicionar 50 μ L de ADE a un tubo eppendorf y agregar una colonia.
2. poner a hervir en 1 mL de ADE durante 10 minutos a 95 °C.
3. llevar a nevera a -20 °C.

PURIFICACIÓN PCR BACTERIAS

1. Prepare el gel a 0.8% de Agarosa en buffer TAE 1X.
2. Corra la electroforesis de 3-6 V/cm.
3. Deje correr la electroforesis hasta que este haya llegado a las $\frac{3}{4}$ partes de la cámara de corrido.
4. Coloque con mucho cuidado el gel de agarosa en el transiluminador con la luz UV encendida, y corte el fragmento de interés que será aislado (lo más delgado posible).
5. Transfiera el pedazo de gel cortado a un tubo limpio.
6. Después de cortar la banda tome la fotografía del gel para documentar el tamaño de la banda que fue purificada.
7. Adicionar 5 volúmenes de buffer de elución, cierre el tubo y fusione el gel por incubación por 5 minutos a 65°C.
8. Enfríe la solución a temperatura ambiente y añadale un volumen igual de Fenol a pH 8.0. Haga vortex de la mezcla durante 20 segundos y recupere la fase acuosa por centrifugación a 4000 g por 10 minutos.
9. Extraiga la fase acuosa y después agregue fenol:cloroformo y luego con cloroformo siguiendo el paso 8.
10. Transfiera la fase acuosa a un tubo limpio de centrifugación. Adicione 0.2 volúmenes de acetato de amonio 10 M y 2 volúmenes de etanol absoluto a 4°C.
11. Almacene la mezcla por 10 minutos a -20°C y después centrifugue a 5000 g por 20 minutos a 4°C.
12. Lave el pellet con 70% de etanol, centrifugue, vote el sobrenadante, deje secar y disuelva en un volumen apropiado de TE pH 8.0.

ANEXO 3. PROTOCOLO EXTRACCIÓN DE HONGOS DE WENDLAND ET AL. (1996)

1. Crecer el hongo en 5 ml de medio SB durante 3 o 4 días en un tubo cónico de 50 ml.
2. Filtrar en un papel whatman en manifold, el contenido del medio hasta que pase completamente.
3. Agregue 200 ml de agua destilada estéril y deje pasar en su totalidad hasta que pase todo el líquido.
4. Seque con papel absorbente y retire el micelio del hongo y pase a un tubo eppendorf con 500 μ L de Buffer de extracción.
5. Incubar a 65°C durante 1 hora.
6. Agregar 1 μ g/ml de RNAsa e incubar por 1 hora a 37°C.
7. Adicionar Fenol-Cloroformo-Isoamilalcohol (25:24:1) (V/V), y agitar suavemente hasta formar emulsión.
8. Centrifugar a 5000 rpm durante 10 minutos.
9. Recuperar el sobrenadante y agregar solución de Cloroformo: isoamil: alcohol (24:1) y mezclar por inversión SUAVEMENTE durante 30 segundos.
10. Centrifugar a 5000 rpm durante 10 minutos.
11. Repetir estos dos pasos cuantas veces sea necesario hasta observar el sobrenadante transparente. De no llegar hasta este estado, lavar sólo tres veces.
12. Recuperar el sobrenadante y adicionar 2.5V de etanol Absoluto y 0.3 M de Acetato de Sodio.
13. Incubar 1-2 horas a -20°C.
14. Centrifugar a 5000 rpm durante 10 minutos.
15. Descartar la solución y lavar el pellet con Etanol al 70%
16. Centrifugar a 5000 rpm durante 10 minutos.
17. Dejar secar a temperatura ambiente.
18. Adicionar 500 μ L de Agua o Buffer TE pH 8.0
19. Mezclar suavemente e incubar a 60°C por 5 minutos.
20. Correr electroforesis en agarosa al 1%.