

EVALUACIÓN DE LAS RESPUESTAS FISICOQUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS DE UN ENSILADO DE PULPA DE CAFÉ (*Coffea arabica*) APLICANDO LA METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

EVALUATION OF PHYSIC-CHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL RESPONSE OF A COFFEE (*Coffea arabica*) PULP SILAGE USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

Ricardo García

Ingeniero Agroindustrial. MSc en Ingeniería Agroindustrial. Profesor Asistente adscrito al Programa Ciencias del Agro y del Mar. UNELLEZ San Carlos. Estado Cojedes.

Venezuela. Correo Electrónico: raga2760@hotmail.com. Contacto: 0426-1487277

Recibido: 16-01-2011

Aceptado: 15-04-2011

RESUMEN

En este estudio se hizo una evaluación de las respuestas microbiológicas y fisicoquímicas basado en el establecimiento de modelos matemáticos lineales de segundo orden para los factores % de melaza, % de inóculo de *Lactobacillus plantarum* y tiempo de fermentación. Con estos modelos matemáticos se optimizó el uso de los factores con la metodología de Superficie de Respuesta. Las respuestas microbiológicas fueron las unidades formadoras de colonias de bacterias acidolácticas (BAL) y, de mohos y levaduras (M y L). Mientras que el pH, la acidez titulable total (AAT), los sólidos solubles totales (SST) se establecieron como respuestas fisicoquímicas. Se observó efecto en el pH, ATT y M y L por acción del factor tiempo de fermentación. El factor tiempo no causó cambios significativos en los SST y BAL. El factor concentración de melaza no tiene efecto sobre las respuestas pH, SST y M y L con excepción de las BAL. La concentración del inóculo causó variabilidad significativa en las respuestas pH y BAL. Las repeticiones realizadas en el ensayo para las respuestas estudiadas, fueron no significativas. Los modelos estimados de segundo orden para las respuestas pH, BAL, ATT y SST no presentaron falta de ajuste.

Palabras Clave: *ensilaje, fermentación acidoláctica, subproducto.*

SUMMARY

This study made an assessment of physic-chemical and microbiological responses based on the establishment of linear mathematical models of second order for molasses %, *Lactobacillus plantarum* inoculum % and fermentation time factors. With these mathematical models optimize the use of factors with the response surface methodology. Microbiological responses were acidoláctic bacteria (BAL) and molds and yeasts (M y L) colony forming units . While that pH, total titulable acidity (AAT), the total soluble solids (TSS) were established as physic-chemical responses. Effect on the pH, ATT and M y L was observed by action of the factor fermentation time. The factor time not caused significant changes in the SST and BAL. The molasses concentration factor has no effect on responses pH, SST and M y L with the exception of the BAL. The concentration of the inoculum caused significant variability in responses pH and BAL. The repetitions in the test for studied responses were not significant. Models estimated second-order for pH responses; BAL, ATT and SST had no lack of adjustment.

Key Words: *silage, acidolactic fermentation, subproduct*

INTRODUCCIÓN

En el beneficio del café, una de las etapas en que se produce mayor cantidad de desechos es la de despulpado. Cerca del 39% del peso total del café cereza cosechado, constituye un desperdicio en forma de pulpa. Esta pulpa es acumulada en los alrededores de las plantas de beneficio, creando problemas de contaminación ambiental por la descomposición y difusión de malos olores (García, 1988).

Últimamente se ha utilizado parte de la pulpa de café en la producción de abono orgánico en composteros y como sustrato en lombricultura entre otros usos. Sin embargo, el alto contenido nutricional de este sub-producto ha llevado a proponer su uso directo en alimentación animal (Ferrer *et al.*, 1995). En vista de los grandes volúmenes de pulpa producidos durante el beneficiado y del tiempo que transcurre desde el comienzo hasta el final de la cosecha, cuando generalmente se usa como alimento animal se hace necesario preservarla, de manera sencilla, económica y sin afectar significativamente sus propiedades nutricionales en la época de sequía que sigue a la época de cosecha.

Uno de los métodos de campo más usados en la preservación de productos y subproductos agrícolas, es el ensilaje. Este método consiste en conservar el producto en sin tratamiento térmico, mediante el uso de la fermentación acidoláctica en estado semi-sólido provocada por las bacterias anaeróbicas que actúan sobre el sustrato disponible en el proceso (Mc Donald *et al.*, 1981). Como resultado de la fermentación acidoláctica, se producen ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico, el cuál baja el pH del producto ensilado, dificultando el desarrollo y crecimiento de las poblaciones de bacterias, mohos y levaduras y establecer mediante la aplicación de la metodología estadística de superficie de respuesta, cómo la concentración de inóculo, la concentración de melaza y el tiempo de fermentación afectará de manera positiva o negativa el comportamiento o los valores de éstas dentro del ensilado.

Este trabajo de investigación consistió en el estudio del efecto de las concentraciones de melaza, inóculo de bacterias acidolácticas y del tiempo de fermentación en la producción de un ensilado de pulpa de café como método alternativo de conservación para su posterior utilización en alimentación animal. Para evaluar el ensilaje se hicieron determinaciones de acidez titulable total, pH, unidades formadoras de colonias (UFC) de mohos y levaduras y unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias acidolácticas.

Los datos recolectados se utilizaron para analizar el proceso de ensilaje mediante la metodología de superficie de respuesta y los modelos matemáticos generados sirvieron para predecir el comportamiento de las variables acidez titulable total, pH, UFC de mohos y levaduras y UFC de bacterias acidolácticas en el ensilaje. En el análisis estadístico de los datos se emplearon los paquetes estadísticos STATISTICA y JMP.

MATERIALES Y METODOS

Población y muestra

La población consistió en la pulpa de café maduro producida durante la época de cosecha, entre los meses de septiembre y noviembre en la central de beneficio cafetalero ubicado en la finca “La Peña”, en la parroquia Juan Ángel Bravo del Municipio San Carlos.

El café del cuál se extrajo la pulpa provino de los cafetales de los productores adyacentes al central de beneficio.

Los frutos maduros se cosecharon manualmente de plantaciones de café de 6 años de edad, en lotes de producción de café de la variedad Borbón Salvadoreño, los cuales se trasladaron al galpón de beneficio y procesamiento, donde se despulparon en una máquina modelo Jotagallo N° 4.

La muestra de la población fue tomada *in situ* y estará representada por el 2% (150kg) de la producción de pulpa de café en el central de beneficio. La toma de muestras se hizo en la etapa media de la época de cosecha.

Diseño de la investigación.

La pulpa de café fue tomada a la salida de la despulpadora en cuñetes de plástico de 25 kg de capacidad e inmediatamente fue llevada a las instalaciones del Laboratorio de Ingeniería y Tecnología de Alimentos (LITA) de la UNELLEZ San Carlos.

El inóculo de bacterias acidolácticas *Lactobacillus plantarum* se obtuvo del líquido de repollo ácido fermentado y enriquecido con jugo de tomate preparado en las instalaciones del Laboratorio de Ingeniería y Tecnología de Alimentos (LITA) de la UNELLEZ San Carlos.

Para la obtención del inóculo de *Lactobacillus plantarum* a base del líquido del repollo ácido, se compraron el repollo fresco, los tomates maduros y la sal en un abasto local. El repollo se limpió y se cortó en trozos de aproximadamente 1 cm cuadrado y se mezcló con el jugo del tomate ya licuado y colado, la sal común y el sorbato de potasio en las proporciones mostradas en la cuadro 1. Se colocó la mezcla en un recipiente de plástico tipo cuñete y se revolvió manualmente hasta observar la salida abundante del líquido del repollo y se disuelve totalmente la sal y el sorbato de potasio. Luego se presionó la mezcla contra el fondo del recipiente tapándola con un plato de acero inoxidable de diámetro ligeramente inferior al del recipiente, al cual se le colocaron dos piedras de río de aproximadamente 5 Kg cada una. Esta presión se hace tratando de sacar el aire de la mezcla para crear condiciones de anaerobiosis y para ayudar a salir el agua contenida en el tejido

del repollo, se debe observar que el plato quede cubierto por el líquido liberado por el repollo. Por último se tapó el cuñete y se dejó fermentar por 8 días a temperatura ambiente.

La melaza se compró en una casa agropecuaria ubicada en la zona en un envase de plástico tipo cuñete y se trasladó inmediatamente al sitio de preparación del ensilaje.

Los diferentes tratamientos descritos en el diseño experimental con sus respectivos porcentajes de pulpa de café, melaza e inóculo se mezclaron manualmente en un recipiente cilíndrico de acero inoxidable con capacidad de 40 litros. Luego se envasaron herméticamente en recipientes de vidrio con capacidad de 4,5 Kg y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su apertura en el tiempo establecido en el diseño experimental. Al transcurrir el tiempo establecido en el diseño, se procedió a realizar los diferentes análisis para determinar los valores de las variables fisicoquímicas y microbiológicas de cada unidad experimental.

Cuadro 1. Proporciones de los ingredientes utilizados en la preparación del inóculo de *Lactobacillus plantarum* a partir del jugo de repollo ácido.

INGREDIENTE	PESO (g)	(%)
REPOLLO	4112,5	82,25
JUGO DE TOMATE	50	15
SAL	125	2.5
SORBATO DE POTASIO	12,5	0,25

Diseño estadístico.

La investigación se clasifica como de tipo experimental exploratoria. En condiciones controladas de laboratorio y organizadas en un diseño estadístico de superficie de respuesta, los resultados se utilizaron para la obtención de modelos lineales de segundo orden para estimar el comportamiento físico-químico y microbiológico del ensilado, durante la fermentación y almacenamiento a temperatura ambiente. Estos modelos lineales se utilizaron para optimizar las variables concentración de melaza, concentración de inóculo de bacterias acidolácticas y tiempo de fermentación.

La investigación se rigió por un diseño compuesto central ortogonal para tres factores y cinco niveles de experimentación en cada factor. El diseño constó de ocho tratamientos en la porción factorial, seis tratamientos en la porción estrella, un tratamiento en el punto central y cinco repeticiones del punto central para un total de 20 unidades experimentales completamente repetidas. El cálculo de la distancia axial para ortogonalidad fue $\alpha = 1,5225$.

El rango de variación de los factores se definió en base a la bibliografía consultada. La concentración de melaza se varió entre 2% y 10 %, la concentración de inóculo bacterias acidolácticas se varió entre 0% y 5 % y el tiempo de fermentación se varió entre 20 y 100 días.

Resultados y Discusión de Resultados

Caracterización de la pulpa de café fresca

En la cuadro 2 se muestran los resultados de la caracterización química y microbiológica de la pulpa de café fresca. Ferrer *et al.* (1995) obtuvo valores cercanos para la composición química de la pulpa de café, encontrándose el rango de variación entre 7,5 y 11,09 para la acidez titulable, 4,5 y 5,3 para el pH, 15, 3 y 11,0 para los sólidos solubles totales, 75,6 y 87,3 para la humedad, 8,86 y 18,35 para proteínas y 13,4 y 23,25 para la fibra cruda. En el caso de los valores microbiológicos, Ramirez-Martínez *et al.* (1999) obtuvo valores en el orden de $5,4 \times 10^5$ y $3,5 \times 10^7$ UFC para mohos y levaduras y valores de $4,510^4$ y $9,2 \times 10^6$ para las BAL (flora acidoláctica). Las variaciones observadas, aunque provienen de estudios hechos en Venezuela, puede que se deban a las diferentes variedades del café, los diferentes tipos de suelo y clima y a las diferentes formas de cosechar y beneficiar el café.

Cuadro 2. Caracterización de la pulpa de café.

Parámetro de caracterización	Resultado
Acidez Titulable ATT (%)	9,05 ±1,9
pH	4,41 ±0,3
Sólidos Solubles Totales SST (%)	11,8 ±2,2
Humedad (%)	81±4,7
Proteínas (%)	11,5±4,3
Fibra Cruda (%)	15,5±5,2
Mohos y Levaduras M y L (UFC/g)	$1,5 \times 10^6 \pm 0,74 \times 10^2$
Flora Acidoláctica BAL (UFC/g)	$2,2 \times 10^7 \pm 0,35 \times 10^2$

Análisis de varianza.

Previo cumplimiento de los supuestos del análisis de la varianza (ANAVAR), en la cuadro 3 se muestra el resumen del grado de significancia de cada término del modelo poblacional para las respuestas “pH”, “SST” , “ATT”, “BAL” y “M Y L”. En éste se visualiza que existe efecto altamente significativo en los tratamientos, con excepción en la respuesta SST, en donde no se encontró efecto. Se observó la implicación sobre los cambios en el pH, ATT y mohos y levaduras por acción del tiempo de fermentación (X1), aunque este factor no causó cambios significativos en los SST y BAL. El factor

concentración de melaza (X2) mostró tener efecto sobre las respuestas pH, SST y M y L (con excepción del BAL). Así mismo se encontró que la concentración del inóculo causó variabilidad significativa en las respuestas pH y BAL. Las repeticiones para las respuestas estudiadas, fueron no significativas, lo que indica baja variabilidad entre ensayos, y precisa que no era necesario realizar las mediciones en repetición. En cuanto a los modelos estimados de segundo orden para las respuestas pH, BAL, ATT y SST no se presentaron falta de ajuste.

En lo que respecta a las respuestas pH, y ATT, se puede observar que las cantidades de melaza, inóculo y tiempo aplicados en los diferentes tratamientos provocaron cambios significativos en estas variables, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Ferrer *et al.*(1995), quien logró cambios en el pH y los SST de un ensilaje de pulpa de café con 1% de melaza y con un máximo de 133 días de fermentación. Ramirez-Martinez *et al.*(1999) estudió las variables de respuesta BAL y mohos y levaduras, entre otras, en un ensilaje de pulpa de café con melaza e inóculo de bacterias *Lactobacillus plantarum* observando efecto altamente significativo.

Cuadro 3. Resumen de los ANAVAR para las respuestas estudiadas.

Fuente de Variación	pH	SST	ATT	BAL	M y L
Tratamientos	**	Ns	**	**	**
Regresión	**	ns	**	**	**
Tiempo (X ₁)	**	ns	**	ns	**
Melaza (X ₂)	**	**	ns	ns	**
Inóculo (X ₃)	**	ns	ns	**	ns
X ₁ ²	**	ns	**	ns	*
X ₂ ²	ns	ns	ns	ns	ns
X ₃ ²	**	ns	**	*	**
X ₁ *X ₂	ns	ns	ns	**	**
X ₁ *X ₃	ns	ns	ns	**	**
X ₂ +X ₃	ns	ns	ns	ns	**
Falta de ajuste	ns	ns	ns	ns	*
Repetición	ns	ns	ns	ns	ns

** . Altamente significativa (p<0,01), * .Significativo (p<0,05), n.s. No significativo.

Análisis de coeficientes estimados del modelo poblacional

El resumen de los coeficientes estimados para cada modelo poblacional de las respuestas medidas se observa en la cuadro 5. Se denota que los factores tiempo de fermentación (X1) y concentración de inóculo (X3) disminuyen de manera lineal (primer orden) los cambios en el pH y los SST durante la fermentación acidoláctica del ensilado, es decir, por cada aumento de una unidad en el tiempo se provoca una disminución del “pH” y los “SST”, a razón de: **-0,022 (X1) -0,101(X3)** unidades, respectivamente y por cada aumento de una unidad de la concentración de inóculo se provoca una disminución del “pH” y los “SST”, a razón de **-0,053 (X1) -0,086(X3)** unidades, respectivamente. Según lo expuesto por Esperance *et al.* (1991), esto se explica por el hecho de que al haber mayor cantidad de bacterias acidolácticas y más tiempo para que éstas actúen se consumirán más los azúcares disponibles (SST) y se producirá más ácido láctico que debe bajar el pH a niveles por debajo de 4, suficiente como para preservar el ensilaje de los microorganismos deteriorativos. Contrario efecto causa el factor tiempo de fermentación (X1) en las respuestas ATT y mohos y levaduras, ya que éstas incrementarían en el orden de **0,018** y **4,5E-5**, respectivamente, por cada incremento de una unidad del tiempo en la fermentación.

Al observar el efecto estimado por la concentración de melaza (X2) se encontró que los β_{ij} para las respuestas pH, SST, ATT y BAL aumentan estas repuestas por cada unidad de incremento (cuadro 5), mientras que con los valores de mohos y levaduras se encontró una disminución al incrementar la concentración de melaza adicionada en la formulación del ensilado. Esta situación coincide con lo señalado por Esperance *et al.* (1991), al referirse al hecho de que la cantidad de mohos y levaduras persisten durante los primeros días de fermentación de un ensilaje, ya que no son inhibidas por los niveles de pH producidos inicialmente, pero esta cantidad baja a medida que hay mayor disponibilidad de azúcares para fermentar y transformar en ácidos orgánicos. Por esto, un ensilaje bien fermentado debe contener grandes cantidades de ácido láctico y baja concentración de carbohidratos

solubles residuales al final de la fermentación. La interacción entre el tiempo de fermentación y la concentración de melaza muestra tendencia a incrementar las respuestas microbiológicas estudiadas, pero son disminuidas por la interacción entre el tiempo de fermentación y la concentración de inóculo.

Cuadro 5. Resumen de los coeficientes estimados del modelo poblacional planteado, para las respuestas estudiadas.

	pH	SST	ATT	BAL	M y L
β_0	4,132	14,267	2,001	6,582	3,136
X ₁	-0,022**	-0,053 ns	0,018* *	-0,009 ns	4,5E-5**
X ₂	0,045**	0,634**	0,009 ns	0,452 ns	-0,003**
X ₃	-0,101**	-0,086 ns	-0,169 ns	0,364**	0,913 ns
X ₁₁	1,2E-5**	3,9E-5 ns	-1,33E-5**	-4,8E-6 ns	-7,6E-6*
X ₂₂	-2,2E-4 ns	-0,048 ns	-0,002 ns	0,008 ns	-0,002 ns
X ₃₃	0,019**	0,040 ns	0,030* *	-0,030*	-0,115**
X ₁₂	0,000 ns	0,002 ns	2,3E-5 ns	0,005**	0,004**
X ₁₃	2,9E-5 ns	-7,3E-5 ns	-4,3E-6 ns	-0,007**	-0,003**
X ₂₃	-2,9E-4 ns	7,3E-4 ns	0,005 ns	0,023 ns	-0,034**

** altamente significativo t< 1%: ns: no significativo t>

Análisis de los coeficientes de regresión R^2

Los coeficientes de regresión (R^2), mostrados en la cuadro 6 indican buena capacidad de predicción de los modelos poblacionales planteados ya que estos son cercanos o superiores al 80%. Esto indica, que en esos porcentajes los modelos encontrados son capaces de predecir las respuestas estudiadas y el resto del porcentaje se puede deber a factores externos que no fueron considerados para el estudio. A excepción del modelo encontrado para predecir el comportamiento de SST el cual presento valores de R^2 inferiores al 42,38%.

Cuadro 6. Modelos lineales múltiples cuadráticos con interacciones de primer orden para las respuestas estudiadas.

RESPUESTA	MODELO	R^2
pH	$4,132 - 0,022X_1 + 0,045X_2 - 0,101X_3 + 1,2e-5X_1^2 + 0,019X_3^2$	89,42
SST	$14,267 + 0,634 X_2$	42,38
ATT	$2,001 + 0,018 X_1 - 0,169 X_3 - 1,33e-5 X_1^2 + 0,030 X_3^2$	84,82
BAL	$6,582 + 0,364X_3 - 0,030X_3^2 + 0,005X_{12} - 0,007X_{13}$	73,37
M y L	$3,136 + 4,5e-5X_1 - 0,003X_2 - 7,6e-6X_1^2 - 0,115X_3^2 + 0,004 X_{12} - 0,003X_{13} - 0,034 X_{23}$	87,44

Análisis de Perfiles Multirespuestas.

La figura 1 presenta el perfil de predicción dinámico multirespuestas y multifactor experimental (maximización y minimización). Aquí se muestra que con niveles de 53,7 días de tiempo de fermentación (X_1), 2,55% de concentración de melaza (X_2) y 0.92 % de concentración de inóculo (X_3), se obtiene la combinación óptima operativa que permite

establecer las condiciones fisicoquímicas y recuentos microbiológicos en el ensilado de pulpa de café de: pH 3,34 (mínimo), Log de recuentos de bacterias acidolácticas 5,565 (máximo), log recuentos de mohos y levaduras 3,95 (mínimo) y acidez titulable total en el ensilado cercanos al promedio 2,49% .

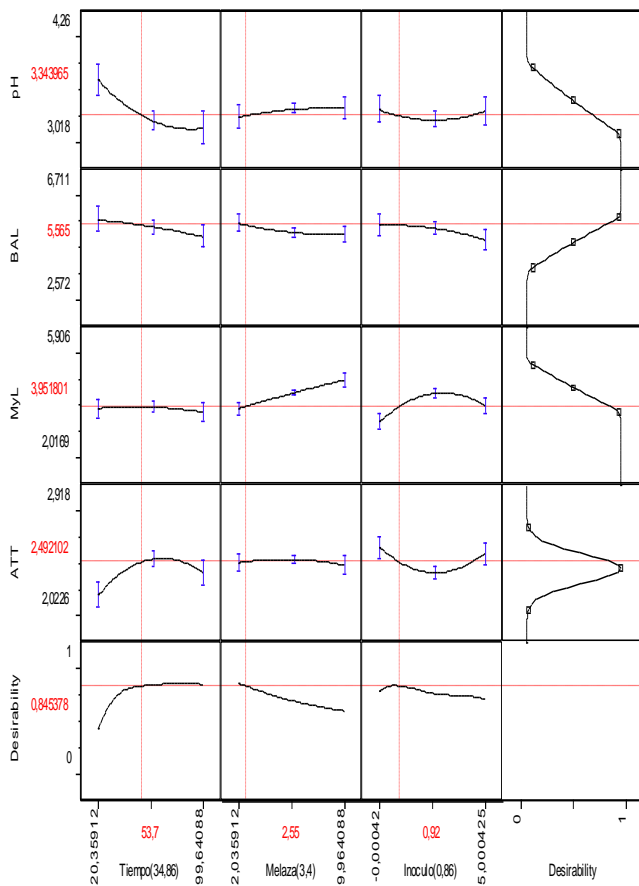


Figura 1. Perfil de predicción dinámico multirespuestas y multifactores experimentales.

CONCLUSIONES

1- La caracterización de la pulpa de café proveniente de los cafetales adyacentes al central de beneficio cafetalero de la finca “La Peña”, ubicada en la parroquia Juan Ángel Bravo del Municipio San Carlos del Estado Cojedes dio como resultado un pH de 4,41, un porcentaje de la acidez titulable de 9,05, una concentración de sólidos solubles totales de 11,8, un del recuento de UFC de mohos y levaduras de $1,5 \times 10^6$, un recuento de UFC de flora acidoláctica de $2,2 \times 10^7$, un porcentaje de humedad de 81, un porcentaje proteínas de 11,5 y un porcentaje de fibra cruda de 15,5.

2- Existe efecto altamente significativo en los tratamientos planteados en la investigación excepto en la respuesta SST. Se observó efecto en el pH, ATT y el Log del recuento de mohos y levaduras por acción del factor tiempo de fermentación. El factor tiempo no causó cambios significativos en los SST y BAL. El factor concentración de melaza no tiene efecto sobre las respuestas pH, SST y M y L con excepción del BAL. La concentración del inóculo causó variabilidad significativa en las respuestas pH y BAL. Las repeticiones realizadas en el ensayo para las respuestas estudiadas, fueron no significativas. Los modelos estimados de segundo orden para las respuestas pH, BAL, ATT y SST no presentaron falta de ajuste.

3-Los coeficientes de regresión (R^2), indican buena capacidad de predicción de los modelos poblacionales planteados ya que estos son cercanos o superiores al 80%, a excepción del modelo encontrado para predecir el comportamiento de SST el cual presentó valores de R^2 inferiores al 42,38%.

4-Con niveles de 53,7 días de tiempo de fermentación, 2,55% de concentración de melaza y 0,92 % de concentración de inóculo, se obtiene la combinación óptima operativa: pH 3,34 (mínimo), Log de recuentos de bacterias acidolácticas 5,565 (máximo), log recuentos de mohos y levaduras 3,95 (mínimo) y acidez titulable total en el ensilado cercanos al promedio 2,49%.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Esperance, M., Targhim, L., Guillén, E. y Reyes N. 1991. Calidad y dinámica de la fermentación de ensilajes elaborados con pulpa de café y forraje. Pastos y Forrajes. La Habana, Cuba. 14: 259-266.
- Ferrer, José R., Páez, G., Chirinos, M. y Mármol, Z. 1995. Ensilaje de la Pulpa de Café. Rev. Fac. Agron. (L.U.Z.). 12: 147-428.
- García, N. 1988. Cafetales y Café. Ediciones M.A.C. Caracas- Venezuela. 165-171.
- Mc Donald, P., R. A. Edwards y J. F. D. Greenhalgh. 1981. Nutrición Animal. Editorial Acribia. España. 71-75.
- Ramírez-Martínez, J. R., Pernía, R. D., Bautista, E., Clifford, M. y Adams, M. R. 1999. Production and Characterization of coffee pulp silage. Trop. Sci. 39,107-114