

UNIVERSIDAD NACIONAL

Campus Omar Dengo

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE QUÍMICA

Proyecto de graduación en la modalidad de tesis de grado

ESTUDIO DEL EFECTO DE UN PROCESO DE FERMENTACIÓN EN ESTADO  
SÓLIDO SOBRE EL VALOR NUTRICIONAL Y LA DIGESTIBILIDAD DE LA  
BROZA DE CAFÉ

Bach. José Gabriel Vargas Jiménez

Tutor:

Dr. Luis Roberto Villegas Peñaranda

Asesores:

Dr. Humberto Trimiño Vásquez

MSc. Miguel Castillo Umaña

Heredia, Costa Rica

Febrero, 2024

"Este trabajo de graduación fue \_\_\_\_\_ por el Tribunal Examinador de la Escuela de Química de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en Química Industrial".

**Miembros del Tribunal Examinador del Trabajo Final de Graduación:**

**Nombre:**

**Firma:**

Decanato de  
Facultad de Ciencias  
Exactas y Naturales:

---

Dirección de la  
Escuela de Química:

---

Tutor: Dr. Luis Roberto Villegas Peñaranda

---

Asesor: Dr. Humberto Trimiño Vásquez

---

Asesor: MSc. Miguel Castillo Umaña

---

Lector(a):

---

Proponente: Bach. José Gabriel Vargas Jiménez

---

## Resumen

El uso de técnicas de biorrefinería permite revalorizar desechos agroindustriales, compuestos en su mayoría por material lignocelulósico. Los subproductos del beneficiado de café, como la broza, son un abundante residuo agroindustrial en Costa Rica, ya que el café es el tercer producto con mayor exportación del sector agrícola en el país. Esta broza de café no cuenta con ninguna aplicación comercial, y su disposición inadecuada arraiga consigo problemas ambientales; no obstante, cuenta con un considerable potencial para ser empleada como suplemento alimenticio para animales, con ayuda de un proceso fermentativo. En la presente investigación, se realizó un proceso de fermentación en fase sólida a la broza de café, empleando el hongo *Fusarium venenatum*. Por lo tanto, se llevó a cabo una fermentación preliminar en broza de café, pretratada con una extracción con agua a 60°C, por un periodo de 60 días y posteriormente se repitió el proceso con una duración de 30 días, empleando broza extraída y sin extraer, ambas suplementadas con un medio rico en nitrógeno. Se evaluaron los parámetros de proteína, digestibilidad *in vitro* y la composición de fibras: neutro detergente (carbohidratos no fibrosos), ácido detergente (hemicelulosa), digeribles en ácido sulfúrico 72% (celulosa) y lignina. Se observó que el hongo no cuenta con la capacidad enzimática para degradar la lignina, pero sí para consumir las demás fracciones de fibra. El aumento proporcional de lignina en la muestra ocasiona una disminución en el porcentaje de digestibilidad *in vitro* de la misma, por lo que el material fermentado no cuenta con buenas características en calidad nutricional para rumiantes. Adicionalmente, se evaluó la composición química del extracto acuoso de broza y del extracto acuoso de una muestra fermentada por 17 días de broza sin extraer. Se contrastó por UHPLC-DAD con varios estándares de compuestos típicos encontrados en el café; sin embargo, solo se correlacionó con presencia de cafeína, en concentraciones de  $0.760 \pm 0.025$  % y  $0.880 \pm 0.019$  % respectivamente. Así mismo, se evaluó el contenido polifenólico total de ambos extractos por Folin-Ciocalteu, obteniendo un valor de  $1.04 \pm 0.03$  % y  $1.06 \pm 0.01$  % respectivamente. Estos resultados indicaron que el hongo no degrada ni la cafeína ni los taninos presentes en la broza, siendo ambos considerados compuestos antinutricionales en animales y, por ende, son otro factor que disminuye la digestibilidad del material si este no recibe un pretratado para remover estos compuestos.

## **Agradecimiento**

Mas allá de los temas tratados en esta investigación, me encuentro enormemente agradecido por el crecimiento personal que tuve a lo largo de estos dos años. Logré mejorar mucho mis habilidades blandas gracias a verme envuelto en un trabajo tan multidisciplinario y mantener contacto con numerosas personas. Amplié mucho mis conocimientos profesionales y eso a su vez me permitió ser de ayuda para los demás. Le agradezco encarecidamente a todos aquellos que me brindaron, por pequeña que fuese, una porción de su tiempo para solventarme dudas, enseñarme, acompañarme o ayudarme con alguna etapa de un experimento. El proceso fue desesperante en ocasiones por los tiempos de espera del microorganismo o la coordinación con terceros para poder continuar con las etapas del trabajo; cometí muchos errores y me tocó aprender a ser más estoico y resiliente, pero llegado a este punto, veo que durante el camino logré desenvolverme mucho como persona, y me estoy agradecido por no haber abandonado en los momentos complicados. Agradezco a mi tutor Luis Roberto por tomarse el tiempo de explicarme a detalle y con paciencia cuando llegó a hacer falta, y a el personal administrativo, docentes y estudiantes asistentes del LIB. También quisiera dedicar un agradecimiento inmenso al personal del LASEQ, ya que de no ser porque me permitieron utilizar sus instalaciones, probablemente no tendría resultados para este trabajo. Finalmente, quisiera agradecer a mis padres por apoyarme y darme la oportunidad de estudiar, espero haberlo aprovechado apropiadamente y sin saber que me depara el futuro, espero ser capaz de hacerlos sentir orgullosos de mí.

<b>TABLA DE CONTENIDO</b>	<b>Página</b>
ÍNDICE DE CUADROS .....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	iv
LISTA DE ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS .....	vi
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes y Justificación .....	1
1.2. Marco Teórico .....	4
1.2.1. Generalidades de la agroindustria del café .....	4
1.2.2. Composición química de la broza de café .....	6
1.2.3. Requerimientos nutricionales de la alimentación en rumiantes .....	8
1.2.4. Procesos de fermentación en fase sólida .....	11
CAPÍTULO II: OBJETIVOS .....	13
2.1. Hipótesis .....	13
2.2. Objetivo general .....	13
2.3. Objetivos específicos .....	13
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA .....	14
3.1. Obtención y acondicionamiento de la broza de café .....	14
3.2. Sistema de fermentación.....	14
3.3. Preparación del inóculo .....	15
3.4. Fermentación en fase sólida de la broza de café con <i>Fusarium venenatum</i> .....	16
3.5. Diseño del experimento .....	17
3.6. Extracción de la broza de café.....	17
3.7. Identificación y cuantificación de compuestos presentes en el extracto de broza.....	18
3.8. Preparación de medio de cultivo para suplementación de nitrógeno .....	19
3.9. Determinación de materia seca a 105 °C .....	20

3.10.	Análisis de fibras .....	20
3.10.1.	Fibra neutro detergente (FND) .....	20
3.10.2.	Fibra ácido detergente (FAD).....	21
3.10.3.	Fibra digerible en H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 72% (FDAS).....	21
3.10.4.	Determinación de lignina por corrección con cenizas.....	22
3.11.	Análisis de digestibilidad <i>in vitro</i> .....	22
3.12.	Análisis de proteína .....	24
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		25
4.1.	Pruebas iniciales de crecimiento de <i>F. venenatum</i> en broza de café.....	25
4.2.	Análisis de componentes por UHPLC-DAD del extracto de broza de café.....	26
4.3.	Análisis de polifenoles totales .....	29
4.4.	Análisis proximal y de digestibilidad de la curva preliminar de crecimiento en broza extraída con <i>F. venenatum</i> .....	29
4.5.	Análisis proximal de las muestras recolectadas de la fermentación en fase sólida de broza extraída y broza sin extraer, suplementadas con nitrógeno. ....	35
4.6.	Relación entre la digestibilidad y los componentes extraídos o no extraídos de la broza.	
	41	
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....		42
CAPÍTULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....		44
ANEXOS .....		52
	Anexo 1. Curvas de calibración .....	52
	Anexo 2. Ecuaciones utilizadas en los análisis.....	53

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.</b> Composición química de los subproductos de la producción de café. <sup>16</sup> .....	6
<b>Cuadro 2.</b> Grado óptimo de inclusión de pulpa y cáscara de café en la dieta de animales de corral. <sup>2</sup> .....	7
<b>Cuadro 3.</b> Concentración recomendada de nutrientes en raciones de alimento para vacas lecheras. <sup>29</sup> .....	9
<b>Cuadro 4.</b> Composición nutricional de forrajes alimenticios para nutrición animal. <sup>30</sup> .....	10
<b>Cuadro 5.</b> Composición del medio de cultivo utilizado para el desarrollo del inóculo de <i>F. venenatum</i> . <sup>39-41</sup> .....	15
<b>Cuadro 6.</b> Composición del medio para suplementación de nitrógeno. <sup>47</sup> .....	19
<b>Cuadro 7.</b> Composición química del neutro-detergente.....	21
<b>Cuadro 8.</b> Composición química del ácido-detergente. ....	21
<b>Cuadro 9.</b> Composición química de los buffers A y B. ....	23

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Principales países productores de café en el periodo 2020/2021. <sup>6</sup> .....	4
<b>Figura 2.</b> Estacionalidad de la cosecha de café en Costa Rica según el porcentaje de recolección mensual desde 2016/2017 a 2019/2020. <sup>17</sup> .....	5
<b>Figura 3.</b> Estructura de un grano de café. <sup>10</sup> .....	5
<b>Figura 4.</b> Estructura química de la <b>(d)</b> cafeína y los isómeros del ácido cafeoiquínico: <b>(a)</b> ácido 3-O-cafeoiquínico, <b>(b)</b> ácido 4-O-cafeoiquínico, <b>(c)</b> ácido 5-O-cafeoiquínico. <sup>20</sup> .....	7
<b>Figura 5.</b> Sistema de fermentación utilizado para la fermentación en fase sólida de la broza de café.....	14
<b>Figura 6.</b> Crecimiento de hongos en broza de café. Las placas en la fila “ <b>I</b> ” corresponden a broza sin extraer y las de la fila “ <b>II</b> ” a broza extraída. Las columnas indican la inoculación de la broza con: <b>A.</b> <i>Fusarium venenatum</i> , <b>B.</b> <i>Ganoderma</i> spp y <b>C.</b> <i>Pleurotus ostreatus</i> . .....	25
<b>Figura 7.</b> Coloración del micelio de <i>F. venenatum</i> empleando broza de café pretratada como medio de cultivo. ....	26
<b>Figura 8.</b> Cromatograma de UHPLC-DAD en fase reversa con lectura de absorbancia a 280 nm. <b>A.</b> Patrón combinado de cafeína, ácido t-ferrúlico, ácido p-cumárico, ácido clorogénico y ácido cafeico según su orden de salida de izquierda a derecha respectivamente; <b>B.</b> Extracto acuoso de broza de café; <b>C.</b> Extracto acuoso de muestra de broza fermentada en fase sólida a 25 °C por 17 días con <i>F.venenatum</i> en broza sin extraer; <b>D.</b> Extracto en metanol de broza de café. Datos obtenidos con el software Chromeleon © Dionex versión 7.2.9.11323. ....	27
<b>Figura 9.</b> Criterio de conteo de esporas de cada cuadro de los cuadrantes de 4x4 de la cámara de neubauer.....	30
<b>Figura 10.</b> Reducción de masa (g) de broza extraída fermentada en fase sólida a 25 °C con <i>F. venenatum</i> . ....	31
<b>Figura 11.</b> Resultados del análisis de fibras y de digestibilidad in vitro, por metodología de Van Soest, de las muestras de broza extraída fermentadas en fase sólida a 25 °C con <i>F. venenatum</i> . Representación del contenido presente en la masa remanente de broza post-fermentación en: <b>A.</b> porcentaje (%) y <b>B.</b> masa (g). .....	32
<b>Figura 12.</b> Resultados del análisis de proteína a partir del nitrógeno total por método Kjeldahl, de la fermentación en fase sólida a 25 °C de broza extraída con <i>F. venenatum</i> . .....	34

<b>Figura 13.</b> Reducción de masa (g) de broza de café suplementada con nitrógeno y fermentada en fase sólida a 25 °C con <i>F. venenatum</i> . <b>A.</b> Broza extraída; <b>B.</b> Broza sin extraer.....	37
<b>Figura 14.</b> Resultados del análisis proximal de las muestras de broza, fermentadas en fase sólida a 25 °C con <i>F. venenatum</i> en <b>broza extraída</b> y suplementada con N. Representación del contenido presente en la masa remanente de broza post-fermentación en: <b>A.</b> porcentaje (%) y <b>B.</b> masa (g).....	38
<b>Figura 15.</b> Resultados del análisis proximal de las muestras de broza, fermentadas en fase sólida a 25 °C con <i>F. venenatum</i> en <b>broza sin extraer</b> y suplementada con N. Representación del contenido presente en la masa remanente de broza post-fermentación en: <b>A.</b> porcentaje (%) y <b>B.</b> masa (g).....	39
<b>Figura 16.</b> Curva de calibración de cafeína obtenida por absorbancia a 280 nm en HPLC-DAD. Datos obtenidos con el software Chromeleon © Dionex versión 7.2.9.11323.....	52
<b>Figura 17.</b> Curva de calibración de ácido gálico por absorbancia en microplacas por el método de Folin-Ciocalteu. ....	53

## LISTA DE ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS

ICAFFE	Instituto del café de Costa Rica
PDA	Agar papa dextrosa
UHPLC	Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia
DAD	Detector de arreglo de diodos
FND	Fibra neutro detergente
FAD	Fibra ácido detergente
FDAS	Fibra digerible en ácido sulfúrico 72%
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
CTAB	Cetil trimetil bromuro de amonio
mM	Milimolar
LIB	Laboratorio de Biorefinería
LADIP	Laboratorio de Apoyo a la Docencia, Investigación y Producción
UNA	Universidad Nacional de Costa Rica

## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes y Justificación

La población mundial ha aumentado en un 250 % en las últimas seis décadas y se prevé que si este crecimiento continua al mismo ritmo, se alcanzará una cifra de 9 billones de individuos para el año 2042.<sup>1</sup> Esto se traduce en un desafío por la mayor demanda de alimentos, una de las principales causas de desnutrición en el mundo y cuyas principales fuentes dependen de la agricultura y la cría de animales para consumo; sin embargo, la producción agrícola suele ser utilizada también como alimento para animales.<sup>2</sup> Actualmente, la harina de soya es una de las principales fuentes de piensos vegetales utilizados como alimento para la nutrición de animales debido a su elevado contenido proteico (~40 %); sin embargo, existen grandes preocupaciones debido a su cada vez más alta demanda, que ha ocasionado problemas ambientales asociados a su amplia ocupación de terreno.<sup>3,4</sup>

Por ello, destaca la búsqueda de la utilización de desechos agroindustriales como fuente o aditivo de alimento para la nutrición animal, que permitan convertir la cadena de suministro lineal del sistema económico actual a un ciclo cerrado y traer consigo una “bioeconomía circular”, para así aumentar la eficiencia y la sostenibilidad de los recursos, mediante su uso continuo, reutilización y reciclaje, reduciendo así el desperdicio y evitando efectos medioambientales negativos.<sup>5</sup> El uso de técnicas de biorrefinería, tales como la fermentación, es lo que posibilita la revalorización de estos desechos agroindustriales, compuestos en su mayoría por material lignocelulósico; como lo es el caso de los subproductos de la producción de café, sector económico que destaca como una de las principales actividades económicas de Costa Rica, siendo el tercer producto con mayor exportación del sector agrícola.<sup>6</sup>

La demanda de café a nivel mundial ha ido en aumento en los últimos 150 años hasta el punto de posicionarla como una de las bebidas más consumidas en el mundo.<sup>7</sup> Según reportes de la International Coffee Organization (ICO), la producción global de café aumentó en un 0,1% durante el periodo 2022/2023, con 168,2 millones de sacos de 60 kg; es decir, un total de 10.09 millones de toneladas.<sup>8</sup> Por su parte, en Costa Rica, según el Instituto del café de Costa Rica (ICAFÉ), la producción de café tuvo un aumento de

un 15 % en el año 2022/2023 con un total de 1,412 millones de sacos, y se estima que la producción para el año 2023/2024 podría alcanzar los 1,44 millones de sacos, osea 84,7 mil toneladas y 86,4 mil toneladas respectivamente.<sup>9</sup>

El procesamiento del fruto de café para su comercialización como grano o semilla seca genera distintos subproductos como parte de su cadena productiva. Estos subproductos corresponden a la separación de las capas externas de la semilla, como lo son la piel, la pulpa, el mucílago, la piel plateada y el pergamino, cuyo conjunto representa un 50 % del fruto en peso húmedo; esto quiere decir que por cada dos toneladas de fruto de café procesado, una corresponderá a grano de café y la otra a los subproductos mencionados.<sup>10</sup> Estos subproductos no cuentan con ninguna aplicación comercial en la industria cafetalera; no obstante, la disposición inadecuada de estos residuos de café puede generar problemas ambientales, principalmente en el aumento de la acidez de mantos acuíferos y del suelo, lo que a su vez reduce su fertilidad. Por ello se han realizado investigaciones que buscan el desarrollo de métodos para su utilización en distintos aspectos como producción de alimentos, compost, biocombustibles, entre otros.<sup>11</sup>

Anteriormente se ha estudiado la utilización de la broza de café como suplemento alimenticio para animales por su contenido promedio de 50, 10, 2.5 y 18 % de carbohidratos, proteína, grasa y fibra respectivamente; sin embargo, el uso de este material para nutrición animal ha sufrido dificultades debido a su toxicidad inherente por la presencia de compuestos polifenólicos (taninos) y alcaloides (cafeína) dentro de su composición, que han demostrado afectar la palatabilidad de la broza como alimento y su digestibilidad proteica en animales.<sup>2,12</sup> No obstante, la remoción de estos compuestos mediante el uso de microorganismos y procesos de extracción química ha sido objeto de estudio en numerosas ocasiones para otorgarle cualidades a la broza que faciliten su uso.<sup>13</sup>

Asimismo, y como se mencionó al inicio, los sistemas de biorrefinería permiten aumentar el valor de la biomasa del café como producto, con técnicas tales como la fermentación, que emplea microorganismos capaces de alimentarse del contenido de la broza como sustrato para su crecimiento y así aumentar el valor nutricional y de digestibilidad del material para su posterior uso como alimento; cuyos sistemas frecuentemente están basados en fermentaciones en estado sólido, dado que suelen

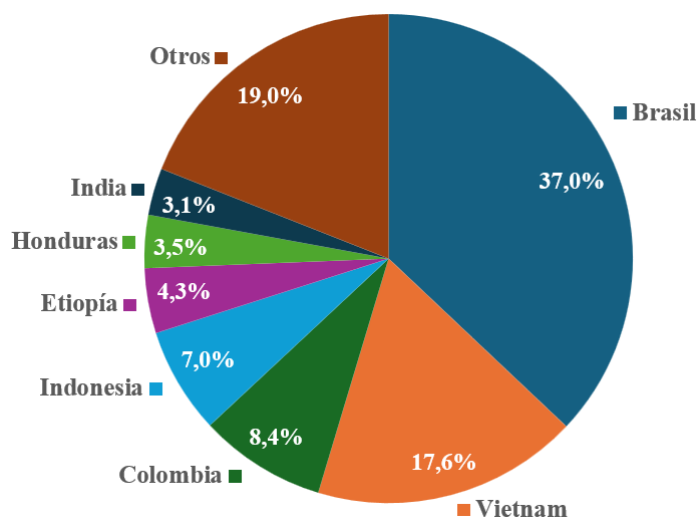
representarse como un bioproceso sencillo, con un costo reducido y que facilita la utilización de subproductos agroindustriales sólidos como sustrato de carbono, tal como es caso de la broza de café, cuya naturaleza intrínseca brinda las condiciones ideales para el crecimiento particular de los hongos.<sup>12</sup> *Fusarium venenatum* es una especie de hongo filamentoso comestible capaz de producir entre un 25 y 45 % de proteína unicelular, también llamada micoproteína, categorizada “generalmente reconocida como segura” (GRAS) por la Food and Drug Administration de los Estados Unidos (FDA), y se utiliza actualmente en productos alimenticios con el nombre comercial Quorn™.<sup>1,14</sup>

Por tanto, la presente investigación plantea el aprovechamiento de un residuo agroindustrial abundante como la broza de café, de manera que se aumente su porcentaje de inclusión en la dieta animal, mediante la remoción de compuestos fenólicos y anti nutricionales que dificultan su uso como alimento, mientras se evalúa su potencial aislamiento en etapas posteriores motivado por el interés comercial inherente a estos compuestos; y adicionalmente, otorgarle una mayor digestibilidad y valor nutricional a la broza a partir de un proceso de fermentación en fase sólida con *Fusarium venenatum*.

## 1.2. Marco Teórico

### 1.2.1. Generalidades de la agroindustria del café

El café es un producto agrícola de gran relevancia a nivel mundial, siendo cultivado por productores de 56 países.<sup>15</sup> En la Figura 1 se muestran los principales países productores de café en las cosechas del periodo 2020/2021. Costa Rica, ocupó el decimocuarto lugar a nivel mundial en la producción del café, con un aporte del 0,85 % de la producción mundial para el periodo 2020/2021.<sup>6</sup>

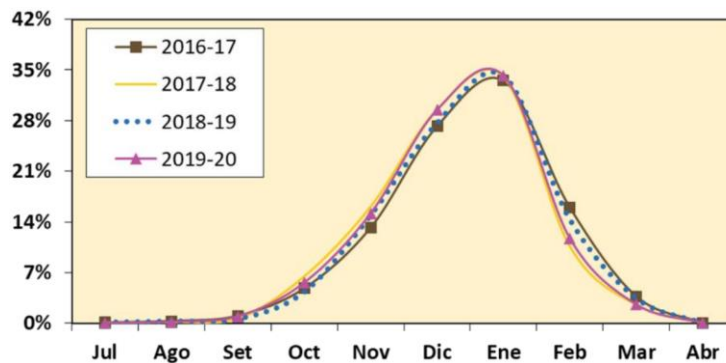


**Figura 1.** Principales países productores de café en el periodo 2020/2021.<sup>6</sup>

La planta de café pertenece a la familia *Rubiaceae*, subfamilia *Cinchonoideae* y género *Coffea*, del cual existen más de 80 especies reportadas en existencia, pero la *Coffea arabica* (Arabica) y *Coffea canephora* (Robusta) son las que poseen el mayor interés comercial a nivel mundial, con un 58 % en la producción de café arábica y un 42 % de café robusta en el periodo 2020/2021. El motivo diferencial entre la mayor comercialización de una sobre la otra recae en que el café tipo Arábica posee un mayor sabor y aroma en comparación con el café robusta.<sup>6,16</sup>

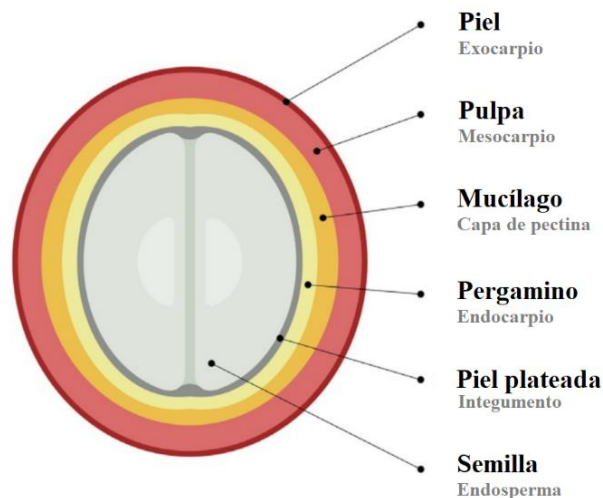
Estas plantas son arbustos perennes con una vida económica útil de 30 años. Muestran sus primeras floraciones al cumplir entre 3 y 4 años y son capaces de alcanzar una altura de 10 m. Además, la planta muestra la aparición de fruto entre 6 y 8 meses luego de su fertilización, cuyo proceso de madurez varía de una coloración verde a un rojo brillante, también conocido como grano maduro o “Cherry”.<sup>7</sup> La Figura 2, muestra la

estacionalidad de la cosecha de café en Costa Rica. En ella se puede apreciar que el café presenta una sola cosecha al año que se ubica entre los meses de octubre y marzo.



**Figura 2.** Estacionalidad de la cosecha de café en Costa Rica según el porcentaje de recolección mensual desde 2016/2017 a 2019/2020.<sup>17</sup>

Posterior a la cosecha se realiza el beneficiado del café, que consiste en la separación del grano o semilla de una serie de cinco capas protectoras externas (Figura 3), cuyo conjunto representa un 50 % del fruto en peso húmedo: la piel, la pulpa, el mucílago, el pergamino y la piel plateada (silverskin). Tradicionalmente el uso del término “broza de café” hace referencia tanto al residuo de grano de café agotado remanente en el filtro al ser preparada la bebida, como al conjunto de las capas externas del grano de café. Para efectos de este estudio, el término “broza” será utilizado para hacer referencia al conjunto de capas externas al grano de café removidas del fruto.



**Figura 3.** Estructura de un grano de café.<sup>10</sup>

### 1.2.2. Composición química de la broza de café

Pese a que la producción de café ocupa una posición económicamente importante con billones de tazas de café consumidas diariamente, de igual forma representa una problemática ambiental importante dado que alrededor del 50 % del producto producido corresponde a los subproductos ya mencionados. Se han hecho numerosos esfuerzos por brindarle un uso a estos desechos; sin embargo, debido a su alto contenido en componentes antinutricionales y fitotóxicos, como los taninos y la cafeína, se imposibilita su uso como abono para el suelo y como fuente de alimento, por lo que sus aplicaciones se han limitado únicamente a su uso en rellenos sanitarios y la producción de energía.<sup>18</sup> En el Cuadro 1 se detalla la composición química promedio de los subproductos del café.

**Cuadro 1.** Composición química de los subproductos de la producción de café.<sup>16</sup>

Compuesto (%)	Cáscara	Pulpa	Piel plateada	Grano de café agotado
Proteína	8 – 11	5 – 15	20	10.32
Lípidos	0.5 – 3	2 – 7	3	16
Minerales	3 – 7	9	~ 8	0.82 – 3.52
Grasa	0.5	2 – 7	2.2	2.29
Carbohidratos	58 – 85	21 – 32	0.25 – 6.35	–
Celulosa	43	63	17.8	8.6
Hemicelulosa	7	2.3	13.1	36.7
Sustancias pécticas	1.6	6.5	0.02	0.01
Lignina	9	14.3 – 17.5	1	0.05
Cafeína	~ 1	1.5	0.6 – 1.1	0.02
Ácido clorogénico	~ 2.5	2.4	3	2.3
Taninos	5 – 9	3	0.02	0.02
Fibra total	24 – 30.8	60.5	60	43
Humedad	13 – 15	82.4	5–7	74.72
Ceniza	5.4 – 6.2	7.3	7.34 – 10.5	0.47

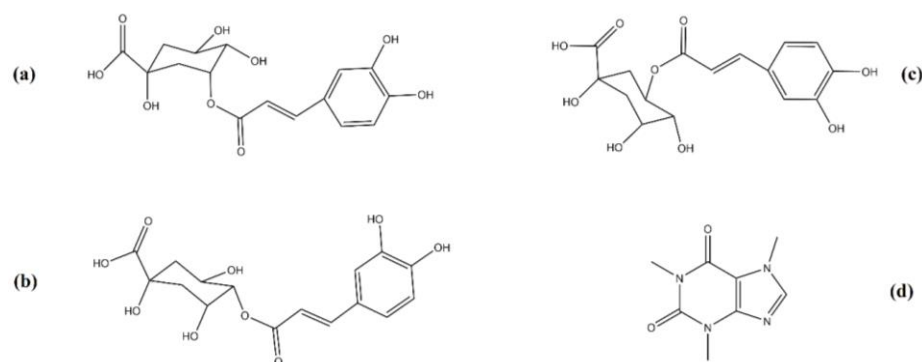
Como se aprecia en el Cuadro 1, los subproductos del café presentan valores importantes de proteína, carbohidratos y fibra, lo que la provee de un potencial uso como fuente o aditivo nutricional en alimento animal; no obstante, la presencia de un alto contenido de compuestos como los taninos y la cafeína dificultan esta aplicación.

Por un lado, los taninos son compuestos polifenólicos considerados factores anti nutricionales debido a su capacidad de inhibir proteasas y acomplejar proteínas, aspecto que disminuye la digestibilidad del alimento, y que por ende, evita su aprovechamiento por el organismo que lo consume.<sup>19</sup> Por esta razón, son el principal causante de que la broza de café sea incluida en la dieta de animales con valores limitados entre un 10 y un 30 %, como se muestra en el Cuadro 2:

**Cuadro 2.** Grado óptimo de inclusión de pulpa y cáscara de café en la dieta de animales de corral.<sup>2</sup>

Suplemento	Grado de inclusión en la dieta (%)			
	Cerdos	Aves de corral	Ganado	Cabras y ovejas
Pulpa y cáscara de café (seca)	8-24	3-5	10-20	10-20

Por su parte, la cafeína (1,3,7-trimetilxantina), cuya estructura química se muestra en la Figura 4, es el alcaloide mayoritario presente en el café y presenta un efecto estimulador del sistema nervioso central, cuya consecuencia fisiológica en animales resulta en un aumento en el uso de energía, que se traduce a un descenso en la ganancia de peso por parte del animal, además de que le otorga un sabor amargo al alimento, factor que puede afectar la palatabilidad por parte del animal.<sup>2</sup>



**Figura 4.** Estructura química de la (d) cafeína y los isómeros del ácido cafeoilquinico: (a) ácido 3-O-cafeoilquinico, (b) ácido 4-O-cafeoilquinico, (c) ácido 5-O-cafeoilquinico.<sup>20</sup>

Pese a los factores negativos que estos compuestos representan en el uso de la broza de café como suplemento en la dieta animal, estos componentes bioactivos pueden ser aislados o extraídos del material, debido a que presentan un interés comercial en la industria farmacéutica, cosmética y alimenticia.<sup>21</sup> En este ámbito destacan los ácidos clorogénicos, que representa un grupo de compuestos polifenólicos comprendidos por los ésteres del ácido quínico, ya sea con el ácido caféico, *p*-cumárico, ferúlico o diésteres de estos. Aquellos ésteres formados con ácido caféico se denominan ácidos cafeoilquínicos y comprenden cerca del 83 % del total de ácidos clorogénicos presentes en el café, que constan de tres isómeros cuyas estructuras químicas se muestran en la Figura 4.<sup>20,22</sup> Numerosos estudios han evidenciado la gran capacidad antioxidante y antiinflamatoria de este tipo de compuestos y además, los han relacionado con efectos antihipertensivos y reducción de peso, por lo que poseen un alto valor comercial.<sup>23</sup>

### 1.2.3. Requerimientos nutricionales de la alimentación en rumiantes

El costo por alimentación representa uno de los mayores valores del costo total de la producción o cría de animales, entre un 70 y 80 %, por lo que la búsqueda del mejoramiento en la eficiencia de la conversión de alimentos en leche o carne puede tener un impacto significativo en la rentabilidad de este tipo de industria, aún más si se considera el aprovechamiento de alimentos de bajo costo como los derivados de desechos agroindustriales como la broza de café.<sup>24</sup>

Los rumiantes, tales como el ganado, poseen sistema digestivo más complejo respecto a otro tipo de animales de cría con sistemas digestivos monogástricos, como pollos o cerdos. Esto último se debe a la habilidad de los rumiantes de producir un consorcio microbiano, también conocido como licor ruminal o rumen, que les permite degradar materiales complejos como los lignocelulósicos con mayor facilidad y aprovechamiento que un sistema digestivo monogástrico.<sup>24</sup>

Los rumiantes cuentan con solo cinco requerimientos de nutrientes clave para su desarrollo: proteína cruda, energía derivada del consumo de fibra, grasas y vitaminas y minerales.<sup>25</sup> La fibra suele ser denominada los carbohidratos insolubles de la pared

celular, entre los que se incluyen la celulosa, la hemicelulosa y la lignina. La celulosa es el polisacárido mayoritario de la pared celular, conformado por cadenas lineales de unidades de glucosa unidas por enlaces  $\beta$ 1-4, que resulta soluble en soluciones fuertemente ácidas. Por su parte, las hemicelulosas son un grupo de polisacáridos de unidades de xilosa, manosa o glucosa, unidas por enlaces  $\beta$ 1-4 con un menor grado de polimerización que la celulosa, que se unen a esta última a través de puentes de hidrógeno, y resultan solubles en soluciones ácido-diluidas calientes. Finalmente, la lignina es el único polímero no sacárido de la pared celular compuesto por una red tridimensional de elevado peso molecular, construido a partir de tres unidades de fenilpropano y que se encarga de mantener rígida la pared celular y hacerla resistente ante varios agentes, tales como enzimas bacterianas.<sup>26,27</sup>

La ingesta y la digestibilidad son las principales características que determinan el suministro de nutrientes de un alimento en un animal determinado. Los análisis químicos son capaces de proporcionar valores de la cantidad bruta de nutrientes con los que cuenta un alimento, mientras que la digestibilidad de un pienso varía respecto al tipo, el estado fisiológico y el uso del animal de prueba, el nivel de ingesta y la combinación o suplementación de alimentos.<sup>28</sup> El Cuadro 3 que se muestra a continuación, ejemplifica la concentración recomendada de nutrientes para vacas lecheras adultas.

**Cuadro 3.** Concentración recomendada de nutrientes en raciones de alimento para vacas lecheras.<sup>29</sup>

<b>Nutriente</b>	<b>Concentración (% de materia seca)</b>
Proteína cruda	10 - 20
Fibra neutro detergente (mínimo)	27 - 33
Fibra ácido detergente (mínimo)	19 - 21
Carbohidratos no fibrosos (máximo)	38
Grasa	3 - 10
Minerales (Ca, P, Mg, S, Na, Cl)	1

El análisis Weende o proximal, se utiliza para estimar la composición nutricional de un alimento en términos de su contenido de proteína cruda, grasa, fibra cruda, ceniza y carbohidratos no fibrosos; no obstante, un valor de fibra cruda no permite diferenciar entre el contenido presente de los distintos tipos de fibra, por lo que este análisis puede

complementarse con la técnica de Van Soest, que permite fraccionar la pared celular empleando una acción combinada de detergente neutro y ácido, de manera que obtiene un extracto de fibra con tres fracciones, de las cuales es posible evaluar el contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa. Por lo que, en una muestra dada, una digestión con neutro detergente (FND) remueve todos aquellos carbohidratos que no conforman la pared celular, tales como carbohidratos no fibrosos, almidones, pectinas y lípidos. Así mismo, si el remanente de esta digestión se trata con un detergente ligeramente ácido (FAD) el componente principalmente removido corresponde a la hemicelulosa y si el remanente se trata una vez más, pero con una solución fuertemente ácida de ácido sulfúrico al 72% (FDAS) la fracción removida corresponde a la celulosa. Finalmente, el residuo de muestra luego de estas tres digestiones es el conjunto de la lignina y los minerales, por lo que al calcinar este remanente, se puede determinar la porción correspondiente a la lignina.<sup>26,28</sup> La composición de nutrientes puede variar según el tipo de forraje alimenticio que se utilice. El Cuadro 4 muestra los datos de composición nutricional de distintos forrajes típicamente utilizados para la nutrición de animales.<sup>30</sup>

**Cuadro 4.** Composición nutricional de forrajes alimenticios para nutrición animal.<sup>30</sup>

Forraje	Porcentaje (%)					
	NDT	Ceniza	PC	EE	FND	FAD
Heno de alfalfa <sup>a</sup>	60	9.2	19.9	2.9	39.3	31.9
Heno de pasto Bermuda <sup>b</sup>	49	8.1	7.8	2.7	73.3	36.8
Ensilaje de maíz <sup>c</sup>	72	3.6	8.7	3.1	46.0	26.6
Heno de festuca <sup>d</sup>	44	6.8	10.8	4.7	70.0	39.0
Heno de trebol ladino <sup>e</sup>	60	9.4	22.4	2.7	36.0	32.0
Heno de hierba de huerto <sup>f</sup>	65	8.5	12.8	2.9	59.6	33.8
Centeno fresco	84	-	17.9	4.1	61.0	38.0
Ensilaje de sorgo	60	5.9	9.4	2.6	60.8	38.8

NDT = nutrientes digestibles totales; PC = proteína cruda; EE = extracto etereo; FND = fibra neutro detergente; FAD = fibra ácido detergente. <sup>a</sup>Floración temprana, curada al sol. <sup>b</sup>Costero, curado al sol, rebrote de 43 a 56 días. <sup>c</sup>Bien aireado. <sup>d</sup>Kentucky 31. <sup>e</sup>Curado al sol. <sup>f</sup>Floración temprana, curado al sol.

#### 1.2.4. Procesos de fermentación en fase sólida

Como se observa en el Cuadro 1, la broza de café posee un elevado contenido de carbohidratos, lo que la convierte en un sustrato adecuado para utilizarlo como fuente de carbono en diferentes procesos fermentativos, por ejemplo, para la producción de proteína unicelular.<sup>10</sup> Esta proteína unicelular corresponde a las células microbianas de levaduras, bacterias, microalgas u hongos, que pueden utilizar una gran variedad de materias primas de bajo costo y procedentes de residuos como fuentes de carbono, nutrientes y energía para su crecimiento y producción de biomasa rica en proteína; por lo que se ha demostrado que, a través de procesos de fermentación, varios residuos altos en fibra, incluyendo la broza de café, pueden incrementar su valor nutricional.<sup>24,31</sup>

Adicionalmente, la lignina, así como los compuestos fenólicos asociados comentados anteriormente, tienden a contribuir con dificultades para la digestión del material lignocelulósico como alimento; esto dado que la presencia de lignina dificulta la accesibilidad de las enzimas microbianas para hidrolizar los polisacáridos de la pared celular, lo que resulta en una mala fuente de nutrición para el animal.<sup>28</sup> Por lo tanto, romper esta barrera de lignina es un paso clave para optimizar la utilización de la biomasa lignocelulósica como alimento para animales y para ello se han empleado distintos pretratamientos físicos, químicos y biológicos, de los cuales estos últimos atraen un mayor interés debido a la demanda de un enfoque ecológico, especialmente aquellos que emplean el uso de hongos.<sup>32</sup>

Tradicionalmente los sistemas de fermentación en estado sólido han ganado gran interés por su sencillez, bajo requerimiento energético y de producción de efluentes y, además, por el uso de residuos agroindustriales como sustrato para el proceso fermentativo, en los cuales los hongos suelen ser los microorganismos más afines ya que asemeja su entorno natural.<sup>33</sup> Estos sistemas consisten en la puesta en contacto de una matriz sólida en estado de ausencia o casi libre de agua, con el microorganismo que se desea que utilice su actividad metabólica para realizar la conversión del material en uno con un mayor valor agregado.<sup>34</sup>

*Fusarium venenatum* es un hongo filamentoso aerobio, que suele ser encontrado en cultivos de cereales y papas.<sup>35</sup> Es extensamente utilizado para la producción de micoproteína en productos comerciales bajo la marca Quorn™ para consumo humano. Esto ha sido gracias a su estructura filamentosa que simula las fibras de la carne, con el beneficio de proveer un mayor valor nutricional, bajo en grasa, bajo en calorías, alto en fibra y libre de colesterol.<sup>36</sup> En general las micoproteínas están compuestas por un valor promedio de 13 % de grasas, 45 % de proteínas, 10 % de carbohidratos, 25 % en fibra y varias vitaminas y minerales; además, estudios toxicológicos en animales han demostrado que el consumo de micoproteína no genera preocupaciones por problemas de salud y que apoya el crecimiento y desarrollo de la especie animal.<sup>37,38</sup>

## CAPÍTULO II: OBJETIVOS

### 2.1. Hipótesis

- La fermentación de la broza de café con *Fusarium venenatum* mejora sus propiedades nutricionales y de digestibilidad, permitiendo además un aumento de su inclusión en la dieta animal.

### 2.2. Objetivo general

- Evaluar el efecto sobre la digestibilidad y valor nutricional de la fermentación en estado sólido de broza de café con *Fusarium venenatum*, para su utilización como suplemento en la alimentación animal.

### 2.3. Objetivos específicos

- Diseñar un sistema de extracción para la disminución de compuestos fenólicos y derivados del ácido hidroxicinámico en la broza de café.
- Determinar mediante la elaboración de curvas de crecimiento las condiciones ideales de fermentación para la producción máxima de proteína utilizando *Fusarium venenatum* y broza de café como sustrato.
- Comparar el efecto sobre la digestibilidad y características nutricionales del proceso de fermentación en estado sólido con *Fusarium venenatum* en broza de café como único sustrato.

## CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

### 3.1. Obtención y acondicionamiento de la broza de café

El material base fue recolectado entre octubre del 2022 y marzo del 2023, en el beneficio del ICAFE ubicado en San Pedro de Barva de Heredia, correspondiente a la cáscara y pulpa, mejor conocido como broza de café, del grano maduro (“Cherry”) de la planta *Coffea arabica*. Una vez recolectado, este fue sometido a un secado en horno a 60 °C y una posterior molienda, hasta lograr un tamaño de partícula de 2 mm. El material fue conservado libre de humedad y a una temperatura de -20 °C hasta su eventual uso.

### 3.2. Sistema de fermentación

Se diseñó un sistema de fermentación utilizando frascos de vidrio de 250 mL. Se realizaron dos agujeros en la tapa de cada recipiente, donde al primero se le colocó un filtro microporo permitiendo el intercambio gaseoso del sistema y evitando a su vez el ingreso de otros microorganismos contaminantes; y en el segundo, se moldeó un puerto de inoculación con silicona insoluble en agua y resistente a alta temperatura, de manera que permitiese asépticamente la inoculación del sistema utilizando una jeringa con aguja. Esto último, dado que no se requeriría remover la tapa del sistema y al retirar la aguja, el sistema permanecería sellado.

El sistema descrito se muestra en la Figura 5. Cada frasco con material fermentado correspondió en su totalidad a una réplica de muestreo asociada a un tiempo determinado.



**Figura 5.** Sistema de fermentación utilizado para la fermentación en fase sólida de la broza de café.

### 3.3. Preparación del inóculo

El inóculo requerido para la fermentación se obtuvo transfiriendo 0.5 cm<sup>2</sup> de micelio, proveniente de una cepa de *Fusarium venenatum* replicada en placas Petri con medio de cultivo de PDA y conservada a 4 °C, a un matraz con medio de cultivo estéril descrito por Royer *et al.* (1999) para fomentar la esporulación de este microorganismo. Dicho medio consistió en una variación del medio base II presentado por Vogel (1964). La composición final del medio se detalla en el Cuadro 5. El pH del medio fue ajustado entre 6.5 - 6.8, y se colocó en incubación a 25 °C y 150 rpm durante un periodo de 5 días.<sup>39-41</sup>

**Cuadro 5.** Composición del medio de cultivo utilizado para el desarrollo del inóculo de *F.venenatum*.<sup>39-41</sup>

Sustancia	Concentración	Unidad
Glucosa	2.5	%
Peptona	0.1	
Agar	2	
Almidón soluble	0.2	
NaNO <sub>3</sub>	25	mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.0005	mol/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.0005	
CaCl <sub>2</sub>	0.0005	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.0005	

Una vez desarrollado el micelio en el medio, se empleó un homogeneizador IKA T18 digital ULTRA-TURRAX a 10 000 rpm durante 5 min y previamente esterilizado, con la finalidad de obtener una suspensión de micelio de *F. venenatum* lo más homogénea posible, la cual fue utilizada finalmente como inóculo para cada sistema de fermentación. La concentración en gramos de micelio de *F.venenatum* por mililitro de la suspensión fue determinada gravimétricamente al hacer pasar 5 mL de la suspensión, previamente homogenizada, por un filtro de masa conocida. Los posibles residuos de medio líquido fueron removidos y el micelio retenido en el filtro fue llevado a sequedad en horno a 105 °C por 3 horas y finalmente, se pesó el filtro con el micelio seco.

### 3.4. Fermentación en fase sólida de la broza de café con *Fusarium venenatum*

Los ensayos de fermentación fueron realizados empleando la metodología propuesta por Stoffel *et al.* (2019) con modificaciones. Para ello se pesaron 20 g de broza seca, a un tamaño de partícula de 2 mm, en cada uno de los frascos empleados como sistema de fermentación y se humedeció el material hasta lograr un 75 % de humedad. Posteriormente el material fue esterilizado en autoclave a 121 °C por 15 min y luego se permitió que el material de cada frasco se enfriara a temperatura ambiente previo a su correspondiente inoculación.<sup>42,43</sup>

Hecho esto, se inoculó cada sistema de fermentación con 5 mL de la suspensión de micelio de *F. venenatum*, empleando tanto jeringas como agujas estériles. El sello de la tapa de los frascos fue desinfectado con alcohol al 70% previo a la inyección de la suspensión y todo el proceso se llevó a cabo asépticamente dentro de una cámara de flujo laminar previamente esterilizada.

Finalmente, cada frasco inoculado fue colocado en incubadora a 25 °C sin agitación y se inició el conteo de horas de fermentación. Se realizaron muestreos por triplicado para cada día de fermentación correspondiente, considerando cada frasco individual como una sola de las repeticiones. La toma manual de los frascos con el material fermentado se realizó aleatoriamente en referencia a la posición que estos ocupaban en la incubadora, de manera tal que no hubiese ningún sesgo asociado. Cada frasco muestreado fue nuevamente esterilizado en autoclave a 121 °C por 15 min y el material fermentado, ahora estéril, fue colocado en horno a 60 °C hasta lograr sequedad constante y finalmente, molido, tamizado y almacenado libre de luz y humedad hasta su posterior análisis. Cabe resaltar que este material fermentado, una vez seco, debió ser pesado de manera que fuese posible cuantificar la diferencia en masa respecto a los 20 g iniciales de broza en cada frasco.<sup>44</sup>

### 3.5. Diseño del experimento

Se trabajó con dos categorías de broza de café. La primera, realizando una extracción previa a la broza utilizando el método descrito en la sección 3.6 y la segunda, empleando el material sin ninguna extracción previa.

Inicialmente, con la finalidad de evaluar el comportamiento del microorganismo con el material, se realizó un ensayo preliminar de fermentación a 60 días con toma de muestra cada 6 días, por lo que se efectuaron en total 10 muestreos con triplicado y adicionalmente se consideró una muestra de día cero o control, el cual correspondió a la broza de café sin inocular. Esta prueba se realizó utilizando como matriz broza extraída seca y el material fue humedecido con agua desionizada.

Una vez obtenidos los resultados de esta primera prueba, se repitió el ensayo, pero esta vez hasta un máximo de 30 días con toma de muestra cada 3 días y su correspondiente control a día cero; sin embargo, llevando a cabo dos curvas de crecimiento distintas. En la primera curva de crecimiento se utilizó broza extraída como matriz y en la segunda se empleó broza sin extraer, y adicionalmente, el material de cada curva fue humedecido con un medio rico en nitrógeno, descrito en la sección 3.8, en lugar de agua desionizada.

Tanto a las muestras tomadas de la curva de crecimiento preliminar a 60 días, como a las dos posteriores a 30 días, se les realizó el mismo procedimiento de análisis de su composición proximal y de su digestibilidad *in vitro*; donde las barras de error de los resultados graficados se basaron en la desviación estándar del resultado promedio de cada triplicado de muestra analizado.

### 3.6. Extracción de la broza de café

La extracción de la broza fue llevada a cabo por maceración, colocando el material en presencia de agua desionizada a 60 °C durante 30 min y con agitación cada 5 min. Posteriormente se decantó el extracto y el material sólido fue sometido dos veces más al mismo proceso de extracción. Finalmente, el material sólido, correspondiente a la broza extraída, fue llevado al horno a 60 °C hasta lograr humedad constante y se almacenó a -

20 °C libre de humedad hasta su posterior uso. El extracto acuoso resultante fue conservado para un posterior análisis de sus constituyentes.

### 3.7. Identificación y cuantificación de compuestos presentes en el extracto de broza

Se llevó a cabo un análisis del extracto obtenido de la broza por UHPLC-DAD en un equipo Thermo Scientific Dionex Ultimate 300. Se utilizó una columna C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm) y se ajustó el DAD para medir absorbancia a 220, 240, 280 y 325 nm. Adicional a las muestras se prepararon y analizaron estándares de 2 mg/mL de: cafeína, ácido clorogénico, ácido caféico, ácido t-ferrúlico y ácido p-cumárico. Se trabajó con un volumen de inyección de 10 µL, una temperatura de 35 °C, y un gradiente de concentración de los solventes de elución: ácido fórmico al 0.1 % (A), metanol (B) y acetonitrilo (C). Por lo tanto, para cada corrida, se realizó inicialmente una fase de purga de -5 min con un flujo de 0.8 mL/min de A:C en proporciones 9:1 respectivamente y a continuación, la inyección de la muestra manteniendo el mismo flujo de los eluyentes anteriores durante los primeros 5 min de corrida. Seguidamente se mantuvo el flujo a 0.8 mL/min pero en proporciones de A:B:C de 8:1:1 respectivamente hasta el minuto ocho, y luego con A:B:C a 5:4:1 hasta alcanzar los 10 min. Hecho esto se aumentó el flujo a 1.5 mL/min de A:B:C a 9:1:1 hasta los 13 min con 30 s, y finalmente se disminuyó el flujo nuevamente a 0.8 mL/min con proporciones de A:C a 9:1 a partir de los dieciséis minutos y estas condiciones se mantuvieron hasta finalizar la corrida al cumplir los 20 min.

Adicionalmente, se analizó el contenido de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu, con la metodología descrita para lector de microplacas por Zhang et al (2006). Por lo tanto, se cargaron en la microplaca 20 µL del extracto de broza y de estándares de ácido gálico a concentraciones de 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.10 mg/mL, y les fueron añadidos 100 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu, para luego agitar durante 5 min. Seguidamente se añadieron 80 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7,5 % y se volvió a agitar por 5 min. Se dejó reposar la microplaca cargada en oscuridad y a temperatura ambiente por 2 horas y se agitó una vez más por 1 min, para finalmente medir la absorbancia a 750 nm. Cabe resaltar que tanto la muestra como los estándares fueron medidos por triplicado y se

empleó como blanco 200  $\mu\text{L}$  de agua desionizada; además, se prepararon controles de muestra y del estándar de 0.06 mg/mL, colocando 20  $\mu\text{L}$  del correspondiente y añadiendo a estos 180  $\mu\text{L}$  de agua desionizada en lugar del reactivo de Folin-Ciocalteu y el  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 7,5 %. La medición de absorbancia se realizó en un lector de microplacas Thermo Scientific Varioskan LUX y los resultados de concentración obtenidos para las muestras se asociaron a equivalentes de ácido gálico y se reportaron como porcentaje de polifenoles totales.<sup>45,46</sup>

### 3.8. Preparación de medio de cultivo para suplementación de nitrógeno

Se preparó el medio de cultivo líquido diseñado por Mandels *et al* (1969) como suplemento de nitrógeno para la hidratación de la broza seca. El pH del medio fue ajustado a 5 y su composición se detalla en el Cuadro 6.

**Cuadro 6.** Composición del medio para suplementación de nitrógeno.<sup>47</sup>

Sustancia	Concentración	Unidad
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2.00	g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.40	
Urea	3.00	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.30	
$\text{CaCl}_2$	0.30	
Peptona	1.00	
Tween 80	1.00	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.00	mg/L
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.56	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.40	
$\text{CoCl}_2$	2.00	

### 3.9. Determinación de materia seca a 105 °C

Previo a los análisis de fibras, proteína y digestibilidad, se realizó una determinación de materia seca a 105 °C pesando 2 g de la correspondiente muestra y colocándola en el horno durante un periodo de 4 horas. Hecho esto, se pesó nuevamente la muestra y se determinaron tanto el porcentaje de humedad como el de materia seca por la diferencia en masa.

### 3.10. Análisis de fibras

El análisis de fibras consistió en cuatro etapas realizadas secuencialmente.<sup>48-50</sup> Cabe resaltar que adicional a las muestras, se realizó el mismo proceso a bolsas filtro ANKOM F57 vacías (sin muestra) y de masa conocida a modo de control, de manera que se conociera la pérdida percibida por las mismas en cada una de las etapas del análisis.

#### 3.10.1. Fibra neutro detergente (FND)

En esta primera etapa se pesó 1 g de muestra en una bolsa filtro ANKOM F57 de masa conocida. Posteriormente las bolsas filtro con la muestra fueron sometidas a una digestión en un analizador de fibra ANKOM<sup>200</sup>. Se estableció una temperatura de trabajo de 100 °C por un periodo de 75 min y fueron añadidos a cada batch: 2 L de neutro-detergente, 20 g de sulfito de sodio y 4 mL de  $\alpha$ -amilasa. Hecho esto se drenó el sistema y se realizaron 3 lavados adicionales a las muestras, de 5 min cada uno y utilizando agua desionizada a 100 °C. Una vez realizado el proceso, las muestras fueron llevadas a un horno a 105 °C hasta el día siguiente y finalmente fueron pesadas para determinar la diferencia en masa post digestión. La composición del neutro-detergente utilizado se muestra a continuación en el Cuadro 7.

**Cuadro 7.** Composición química del neutro-detergente.

Sustancia	Concentración	Unidad
Dodecil sulfato de sodio	30	g/L
EDTA	18,61	
Borato de sodio	6,81	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,64	
Etilenglicol	10	mL/L

### 3.10.2. Fibra ácido detergente (FAD)

Este corresponde a la segunda etapa del análisis de fibras. Para ello se tomaron las muestras ya previamente digeridas en neutro-detergente y de igual manera, fueron sometidas a digestión en el analizador de fibra ANKOM<sup>200</sup>; sin embargo, para este caso fueron añadidos por batch únicamente 2 L de solución ácido-detergente y se estableció una temperatura de trabajo de 100 °C por un periodo de 60 min. Asimismo, una vez concluida la digestión, se drenó el sistema y se realizaron 3 lavados con agua desionizada a 100 °C de 5 min cada uno; luego las muestras fueron llevadas a un horno a 105 °C hasta el día siguiente y fueron pesadas para determinar la pérdida sufrida en esta digestión. La composición del ácido-detergente se detalla a continuación en el Cuadro 8.

**Cuadro 8.** Composición química del ácido-detergente.

Sustancia	Concentración	Unidad
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.89	%
CTAB	20	g/L

### 3.10.3. Fibra digerible en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% (FDAS)

Para la tercera etapa del análisis de fibras, las muestras previamente digeridas en ácido-detergente se llevaron a una nueva digestión, esta vez en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72% a temperatura ambiente, por un periodo de 2 horas y agitando cada 15 min. Hecho esto, se descartó el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se realizaron 4 lavados con agua desionizada a 60 °C de 10 min cada

uno, con agitación y finalmente se llevaron al horno a 105 °C hasta el día siguiente para la medición de la masa remanente posterior a esta digestión.

#### 3.10.4. Determinación de lignina por corrección con cenizas

Una vez realizadas las tres digestiones anteriores, la cuarta y última etapa consistió en someter al remanente de cada muestra a una calcinación a 600 °C durante 2 horas, una vez alcanzada esa temperatura. Finalmente se determinó la masa de las cenizas resultantes de cada muestra y con ello, la masa asociada a la lignina.

#### 3.11. Análisis de digestibilidad *in vitro*

Este método está basado en la metodología establecida por Goering *et al* (1979), la cual consiste en la fermentación de las muestras por parte de las bacterias provenientes de un inóculo de licor ruminal. Para ello, se pesaron 0.5 g de muestra en una bolsa filtro ANKOM F57 de masa conocida y la totalidad de las muestras se distribuyeron de manera homogénea entre los frascos de digestión de una incubadora ANKOM DAISY<sup>II</sup>. Seguidamente se añadió a cada frasco de digestión 1600 mL de una mezcla de proporción 5:1 a 39 °C y pH de 6.8, de una solución buffer A y un buffer B respectivamente. Tanto el control de temperatura como el de agitación fueron accionados para mantener la mezcla de solución buffer con las muestras a una temperatura estable de 39 °C. La composición de cada solución buffer se detalla en el Cuadro 9.

**Cuadro 9.** Composición química de los buffers A y B.

Solución	Sustancia	Concentración (g/L)
Buffer A	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	10
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
	NaCl	0.5
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1
	Urea	0.5
Buffer B	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	15
	$\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	1

La toma de muestra del licor ruminal fue realizada con termos precalentados a 39 °C y todo material utilizado a posterior con el propósito de contener este líquido ruminal, se trató del mismo modo. Se extrajeron 2 L de líquido ruminal junto con dos “puñados” de esterilla fibrosa y se transfirieron a una licuadora. Seguidamente se purgó el contenido en el vaso de la licuadora con  $\text{CO}_2$  y se mezcló a alta velocidad durante 30 segundos. Hecho esto se hizo pasar el contenido de la licuadora por un filtró de gasa y el líquido se transfirió a un nuevo contenedor, el cual fue purgado continuamente con  $\text{CO}_2$  hasta finalizar con la transferencia eventual de todo su contenido a los frascos de digestión de la incubadora. A cada frasco de digestión con mezcla buffer y las muestras, se le añadieron 400 mL del inóculo de licor ruminal, luego se purgó cada uno de estos frascos de digestión con  $\text{CO}_2$  durante 30 segundos, se taparon y se dejaron las muestras en incubación a  $39.5 \pm 0.5$  °C durante 48 horas. Al término de la incubación, se drenó el líquido y se lavaron las muestras con abundante agua hasta que el lixiviado de las mismas se distinguiese clarificado. Finalmente, las muestras se llevaron al horno a 105 °C hasta el día siguiente y se pesaron nuevamente para registrar la pérdida respecto a la masa inicial.<sup>50</sup>

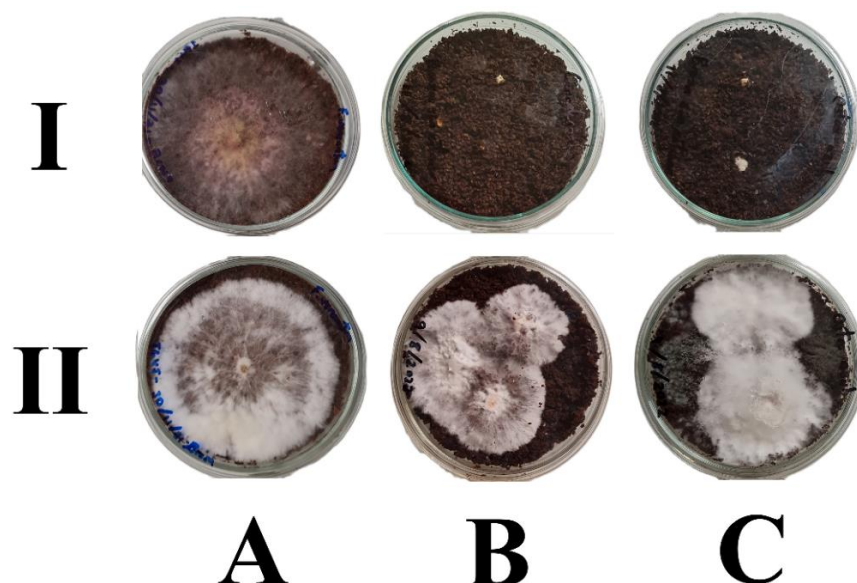
### 3.12. Análisis de proteína

Primeramente, se realizó un análisis de proteína cruda de 0.5 g de cada muestra mediante el método Kjeldahl, empleando un analizador automático de nitrógeno HANON K1160, a partir del cual se obtuvo el contenido porcentual de nitrógeno total de la muestra, que posteriormente fue multiplicado por un factor de 6.25 para obtener el porcentaje de proteína cruda.<sup>51</sup>

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Pruebas iniciales de crecimiento de *F. venenatum* en broza de café

Inicialmente se elaboraron pruebas de crecimiento del microorganismo en la broza de café, de manera que se lograra conocer cualitativamente al hongo y en qué condiciones se desarrollaba apropiadamente. Para ello se colocó un trozo de micelio en placas Petri con broza húmeda y se incubó el material a 25 °C durante 5 días. En numerosas ocasiones estos ensayos resultaron en ausencia de crecimiento del hongo en el material, e incluso se realizaron pruebas con otras especies de hongos, *Pleurotus ostreatus* y *Ganoderma spp*, obteniendo el mismo resultado. Varios estudios han reportado que a concentraciones cercanas o superiores a un 1 % de cafeína, el crecimiento de varios hongos se ha visto mermado en hasta un 50 %.<sup>52</sup> La concentración de este alcaloide está reportada en broza de café en valores de hasta un 1 %, por lo que se decidió hacer una extracción previa del material, con agua a 60 °C, con la finalidad de que dicho pretratamiento removiese la totalidad o gran parte de la cafeína y así evaluar su impacto en el crecimiento del microorganismo. Esto resultó en un crecimiento adecuado en el material para las tres especies evaluadas, como se observa en la Figura 6.



**Figura 6.** Crecimiento de hongos en broza de café. Las placas en la fila “I” corresponden a broza sin extraer y las de la fila “II” a broza extraída. Las columnas indican la inoculación de la broza con: **A.** *Fusarium venenatum*, **B.** *Ganoderma spp* y **C.** *Pleurotus ostreatus*.

Adicionalmente, se observó que la coloración del micelio de *Fusarium venenatum* variaba según su estado reproductivo y las condiciones de crecimiento. Dichas coloraciones variaban de una tonalidad blanca, a una rojiza y otra verde-amarillenta, siendo esta última en la que se mostraba presencia, y una mayor concentración o producción de esporas.<sup>53</sup> En la Figura 7, se observa la última de estas coloraciones descritas.



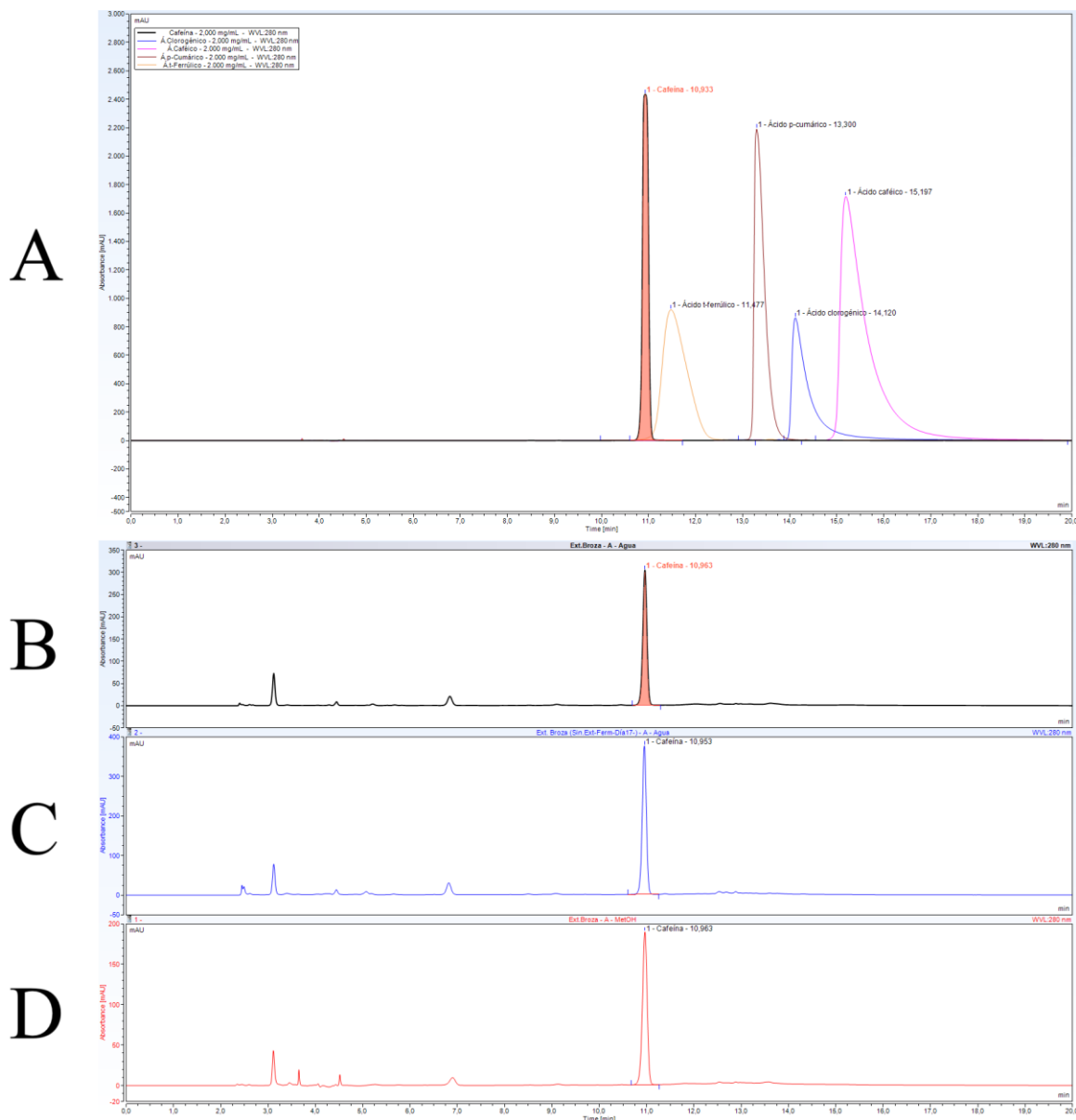
**Figura 7.** Coloración del micelio de *F. venenatum* empleando broza de café pretratada como medio de cultivo.

#### 4.2. Análisis de componentes por UHPLC-DAD del extracto de broza de café

Se realizó una extracción cuantitativa a la broza de café empleando el método descrito en la sección 3.6. Adicionalmente, se tomó una de las muestras fermentadas en fase sólida con *F. venenatum*, concretamente del día 17 de fermentación e inoculada en un inicio en broza sin extraer, y se le realizó una extracción empleando la misma metodología. Se pesaron por triplicado 0.1 g de la muestra correspondiente y el extracto final fue ajustado a un volumen de 10 mL. A estos extractos se les realizó el análisis de sus componentes y de su contenido polifenólico total con la metodología descrita en la sección 3.7.

Primeramente, los extractos fueron inyectados en UHPLC y contrastados con estándares de cafeína, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido p-cumárico y ácido t-

ferrúlico, compuestos comúnmente encontrados en el café. La Figura 8 muestra los cromatogramas resultantes de dicho análisis.



**Figura 8.** Cromatograma de UHPLC-DAD en fase reversa con lectura de absorbancia a 280 nm. **A.** Patrón combinado de cafeína, ácido t-ferrúlico, ácido p-cumárico, ácido clorogénico y ácido cafeico según su orden de salida de izquierda a derecha respectivamente; **B.** Extracto acuoso de broza de café; **C.** Extracto acuoso de muestra de broza fermentada en fase sólida a 25 °C por 17 días con *F. venenatum* en broza sin extraer; **D.** Extracto en metanol de broza de café. Datos obtenidos con el software Chromeleon © Dionex versión

7.2.9.11323.

Como se observa en el cromatograma de la Figura 8, tanto el extracto acuoso de broza de café (Figura 8B) como el de broza sin extraer fermentada por 17 días (Figura 8C), mostraron correlación con la señal asociada al estándar de cafeína; sin embargo, ninguno de estos dos extractos mostró señales que se asociaran a alguno de los otros cuatro estándares. Por otro lado, la solubilidad de estos últimos es considerablemente más elevada en alcohol, por lo que se realizó nuevamente un extracto a la broza de café, pero esta vez empleando un baño ultrasónico a 40 °C y metanol como solvente de extracción, en lugar de la maceración con agua a 60 °C.<sup>54</sup> El cromatograma de este último extracto se muestra en la Figura 8D, en el cual se observa que tampoco se halló presencia de ninguno de los otros estándares, aparte de la cafeína. La falta de presencia de estos compuestos también pudo deberse al tiempo de almacenamiento de la broza tanto en el laboratorio, como en el beneficio; ya que en estudios anteriores se ha encontrado que en un periodo de 8 meses de almacenamiento se puede perder hasta un 80 % de la concentración de estos compuestos.<sup>54</sup>

En vista de esto último, se preparó una curva de calibración de cafeína con estándares de 0.01, 0.05, 0.10, 0.15, 0.17 y 0.20 mg/mL, para la cual se obtuvo un  $R^2$  de 0.9998. Considerando la masa medida de 0.1 g de la muestra de broza y el aforo del extracto a 10 mL, se obtuvo una concentración de cafeína de  $0.760 \pm 0.025$  % para el extracto de broza con agua a 60 °C,  $0.880 \pm 0.019$  % en el extracto de broza “sin extraer” fermentada por 17 días y de  $0.580 \pm 0.034$  % para el extracto de broza en metanol. Por lo tanto, estos resultados no solo sugieren que la cafeína no es metabolizada por el hongo, sino que también se muestra que su concentración es suficiente para mermar el crecimiento del microorganismo; lo que justifica lo evidenciado en la sección 4.1. Adicionalmente, se observa un incremento de un 13.6 % en el porcentaje de cafeína extraída de la broza post-fermentación respecto al porcentaje de cafeína obtenido en el extracto de broza pre-fermentación. Esto último está asociado a que el hongo, al alimentarse de la pared celular de la broza, expone a la cafeína a ser más fácilmente extraíble, ya que el microorganismo no es capaz de metabolizar dicho alcaloide y por ende permite su liberación al medio.

Además, cabe señalar que dado a que la cafeína es un compuesto de un considerable interés comercial por sus amplias utilidades en la industria farmacéutica y alimenticia, a

una concentración de 0.8 % de este compuesto en broza, en este residuo agroindustrial se estarían perdiendo hasta 8 kg de cafeína por tonelada de broza, por lo que mejorando el sistema de extracción, se podría no solo dar valor agregado a la broza mediante el proceso fermentativo, sino que también se podrían recuperar compuestos de interés comercial de la misma y por ende, generar un mayor aprovechamiento económico de este residuo agroindustrial.

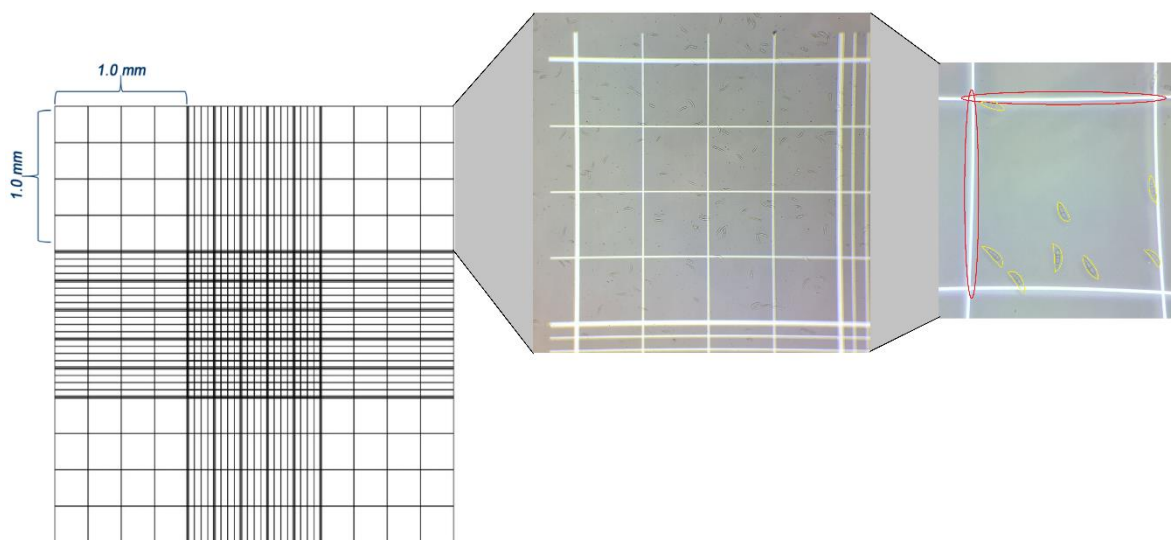
#### 4.3. Análisis de polifenoles totales

Se analizó espectrofotométricamente el contenido total de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu, por triplicado y contrastando sus valores contra una curva de calibración de estándares de ácido gálico de 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.10 mg/mL, que contó con un  $R^2$  de 0.9989. El contenido de polifenoles totales a partir de los equivalentes de ácido gálico de las muestras, se determinó en  $1.04 \pm 0.03$  % para el extracto de broza con agua a 60 °C, de  $1.06 \pm 0.01$  % en el extracto de broza “sin extraer” fermentada por 17 días y de  $0.36 \pm 0.03$  % para el extracto de broza en metanol. Estos resultados muestran que la concentración de polifenoles que lograron ser extraídos de la broza de café pre y post fermentación no varía, lo que sugiere que el hongo no es capaz de metabolizar este tipo de moléculas, tales como los taninos; que como ya fue mencionado, son categorizados como un factor anti nutricional en la búsqueda del uso de la broza como suplemento alimenticio para animales, debido a que reduce la digestibilidad de este material.

#### 4.4. Análisis proximal y de digestibilidad de la curva preliminar de crecimiento en broza extraída con *F. venenatum*.

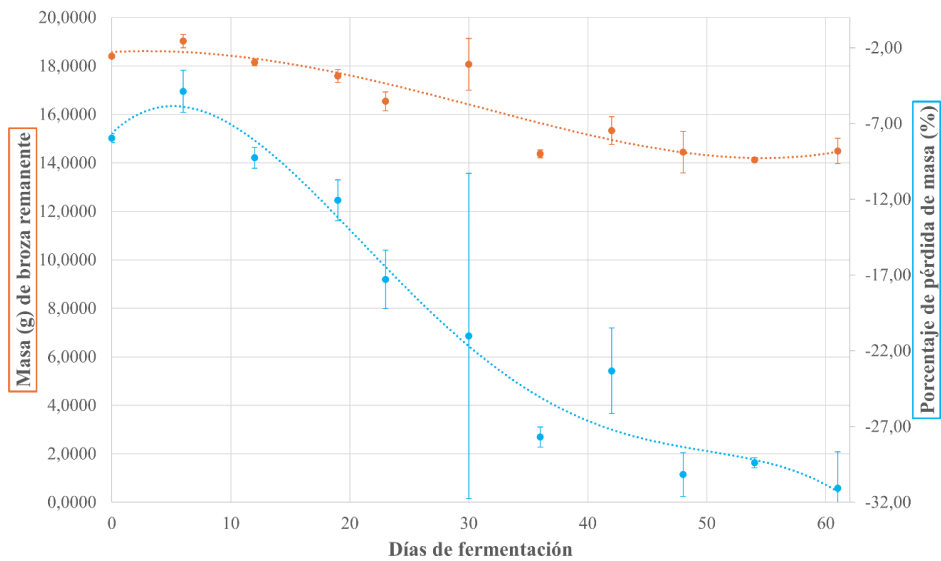
La inoculación con *F. venenatum* en la broza extraída utilizada para la curva preliminar de crecimiento se realizó mediante la inyección en los sistemas de fermentación de 6 mL de suspensión de esporas del hongo a una concentración de  $1.84 \times 10^8$  esporas/mL. La determinación de esta concentración de esporas se realizó mediante un conteo de esporas, por duplicado, empleando una cámara de Neubauer con cuadrantes de dimensiones de 1x1x0.1 mm de largo, ancho y profundidad respectivamente. Se tomaron como criterios de conteo, la medición en los cuatro

cuadrantes de las esquinas de la cuadrícula total de 3x3 de la cámara de Neubauer y se contaron las esporas en cada pequeño cuadro de estos cuatro cuadrantes de cuadrículas de 4x4. Únicamente se consideraron, para el conteo de cada pequeño cuadro, aquellas esporas que estuviesen dentro de estos o que se ubicaran sobre el borde superior o el lateral izquierdo de los mismos. La Figura 9 corresponde al acercamiento en microscopio óptico de uno de estos cuadrantes de 4x4 y ejemplificando el criterio de conteo de cada pequeño cuadro.



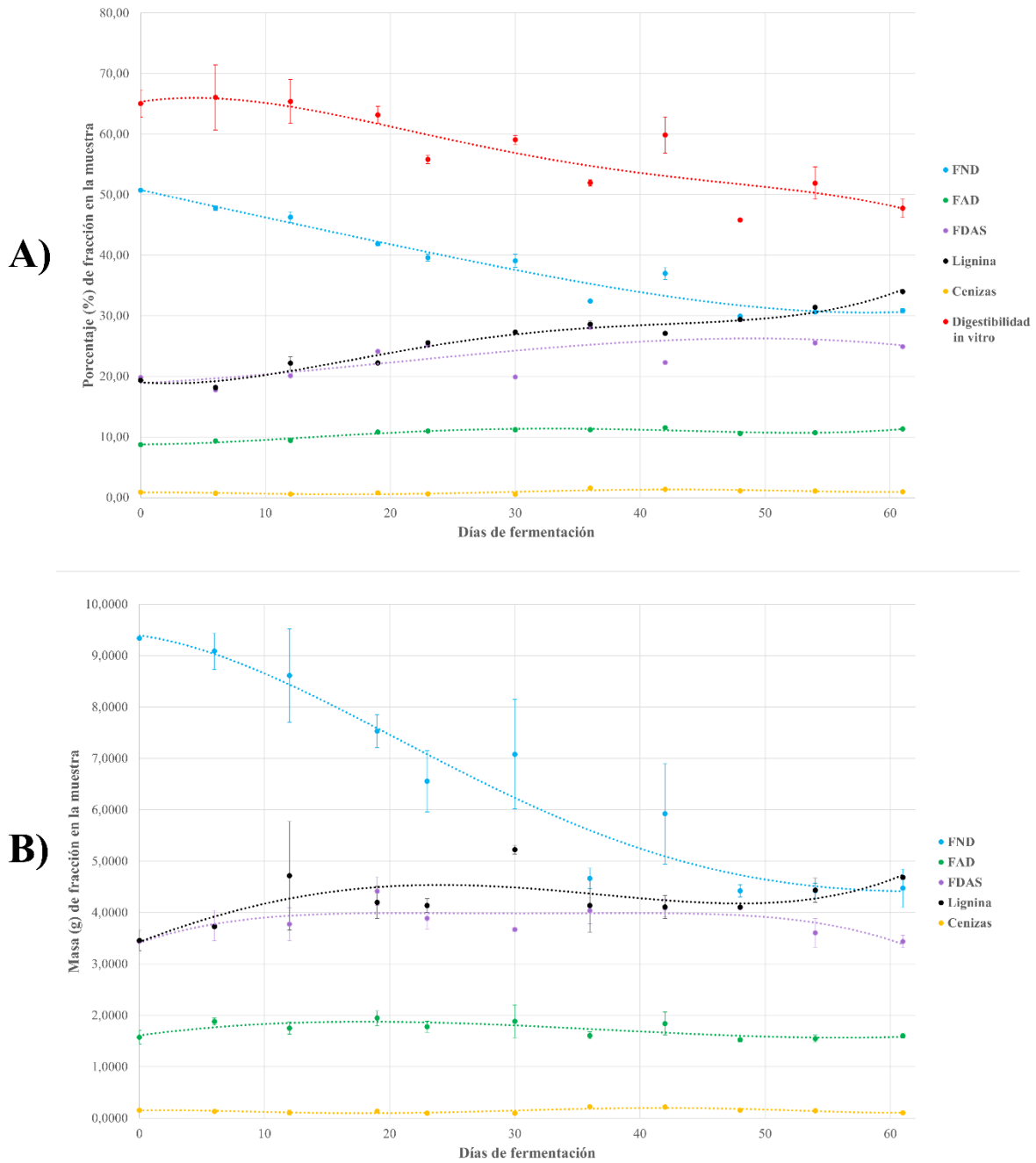
**Figura 9.** Criterio de conteo de esporas de cada cuadro de los cuadrantes de 4x4 de la cámara de Neubauer.

La fermentación se llevó a cabo en incubación a 25 °C durante 60 días y se realizó un muestreo por triplicado cada 6 días, donde para cada muestreo la muestra fue autoclavada, secada, pesada y molida. En la Figura 10 se muestra la reducción de masa sufrida por la fermentación, respecto a los 20 g iniciales de broza seca contenidos en cada sistema de fermentación. Nótese como el porcentaje máximo de masa reducida al día 60 fue de un 30 %, que representan 6 g menos de los 20 g iniciales en el día 0. Esta pérdida se da debido a que el microorganismo, dentro de sus procesos metabólicos, transforma parte de esta materia en productos gaseosos que se liberan al medio, como el CO<sub>2</sub>.<sup>55</sup>



**Figura 10.** Reducción de masa (g) de broza extraída fermentada en fase sólida a 25 °C con *F. venenatum*.

Posteriormente, a cada una de estas muestras les fue realizado, por duplicado, un análisis proximal y de digestibilidad *in vitro*. El análisis proximal se compuso de la medición del contenido de proteína a partir del nitrógeno total por método Kjeldahl y del contenido de fibras, que abarcó la fibra neutro-detergente (FND), la fibra ácido-detergente (FAD), la fibra soluble en ácido sulfúrico 72 % (FDAS), la lignina y las cenizas. Por otra parte, el porcentaje de digestibilidad *in vitro* se obtuvo a partir de la digestión de las muestras en licor ruminal. Por lo tanto, en total se realizaron 462 análisis, cuyos resultados se observan en la Figura 11 y la Figura 12.



**Figura 11.** Resultados del análisis de fibras y de digestibilidad *in vitro*, por metodología de Van Soest, de las muestras de broza extraída fermentadas en fase sólida a 25 °C con *F. venenatum*. Representación del contenido presente en la masa remanente de broza post-fermentación en: **A.** porcentaje (%) y **B.** masa (g).

La Figura 11A muestra el porcentaje asociado a cada una de las fracciones de fibra y al porcentaje de digestibilidad *in vitro*, respecto a la masa final de la muestra post

fermentación; mientras que la Figura 11B muestra la masa en gramos que representan cada uno de los porcentajes anteriores del total de masa remanente de la muestra post fermentación.

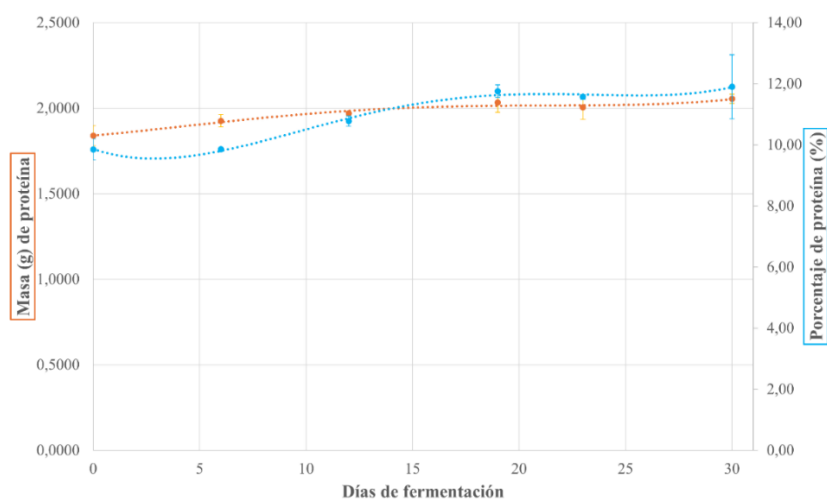
Es importante resaltar como el porcentaje de FND descende de un 50 % a un 30 %, lo cual representa una pérdida de 5 g en 60 días de fermentación; es decir, más del 83 % de los 6 g que fueron consumidos por el hongo del total de la muestra (Figura 10). La FND abarca principalmente compuestos como carbohidratos no fibrosos y almidones, que son en su mayoría nutrientes de bajo peso molecular o de más fácil acceso para el microorganismo, motivo por el que se observa esta priorización del consumo de los mismos respecto a otros nutrientes más complejos.<sup>56</sup> El otro gramo restante de los 6 g totales consumidos, se encuentra distribuido entre la reducción de masa de la FAD y la FDAS. Observando el gráfico, la tendencia porcentual se mantiene constante en la FAD y aumenta un 5% para el día 60 en el caso de la FDAS; no obstante, al verificar sus comportamientos según sus proporciones en masa, la FND comienza a disminuir ligeramente a partir del día 30 y la FDAS a partir del día 50, resultando en una pérdida de 0.5 g en ambos casos. El aumento porcentual de FDAS se genera debido al descenso de la FND y FAD en etapas más tempranas de la fermentación.

Caso similar ocurre con la lignina, que porcentualmente sufre un aumento de 15 %, al pasar de un valor inicial de 20 % en día 0 a un 35% en día 60; sin embargo, su cantidad en gramos se mantiene constante hasta el final de la fermentación. Esto se debe a que el hongo cuenta con un considerable poder celulolítico, pero carece de la producción de enzimas necesarias para degradar la lignina y por ende no podrá captar ni degradar esta molécula y emplearla como nutriente para su desarrollo.<sup>57</sup>

Adicionalmente, se observa como a medida que aumenta la proporción porcentual de la lignina en la muestra, también descende el porcentaje de digestibilidad *in vitro*. Los constituyentes de los forrajes alimenticios suelen estar constituidos de dos categorías principales: contenido celular como proteínas, azúcares y almidón; y los componentes estructurales de la pared celular, como la hemicelulosa, la celulosa y la lignina. Los primeros pueden ser fácilmente digeribles por las enzimas de las bacterias del licor ruminal, mientras que estos últimos no son completamente digestibles y el principal factor limitante es la lignina, dado que esta no es digerida y a su vez limita la digestión

de la hemicelulosa y la celulosa.<sup>58</sup> Esto último explica el descenso del porcentaje de digestibilidad *in vitro*; considerando también como otro aspecto de peso, el que durante la fermentación con el hongo, gran parte de la FND fue consumida por el mismo, y en esta fracción se encuentran los nutrientes de más fácil acceso para las bacterias del rumen. Cabe resaltar que los forrajes alimenticios suelen estar calificados en tres categorías de calidad nutricional según su porcentaje de digestibilidad, siendo este bajo en valores de menores o iguales a un 40 %, intermedio para valores cercanos a un 60 % y alto si estos se acercan o superan el 80 % de digestibilidad.<sup>30</sup> Esto lo que indica es que la broza fermentada con *F. venenatum* con la metodología empleada, no cuenta con características consideradas positivas o de calidad para la nutrición de animales.

Finalmente, el cambio en contenido proteico del material se vislumbra en la Figura 12. Similar a lo ya discutido para la lignina, se observa un incremento de un 2% en la tendencia del porcentaje de proteína del día 0 al día 30; no obstante, al ajustar los valores porcentuales a su masa equivalente en la muestra, se ve que la tendencia se mantiene constante durante toda la fermentación. Esto lo que señala es que los niveles de nitrógeno no aumentan, ya que el microorganismo no fija al sistema el nitrógeno del entorno, por lo que, si se desea ver un aumento sustancial en el nivel de proteína, se debe suplementar el medio con alguna fuente de nitrógeno orgánico, como urea o peptona, o fuentes inorgánicas, como sales de amonio.



**Figura 12.** Resultados del análisis de proteína a partir del nitrógeno total por método Kjeldahl, de la fermentación en fase sólida a 25 °C de broza extraída con *F. venenatum*.

Por lo tanto, en vista de los resultados obtenidos para esta curva preliminar, se decidió replicar el proceso, pero esta vez suplementando la broza con un medio rico en nitrógeno y recortando el tiempo de fermentación de 60 a 30 días.

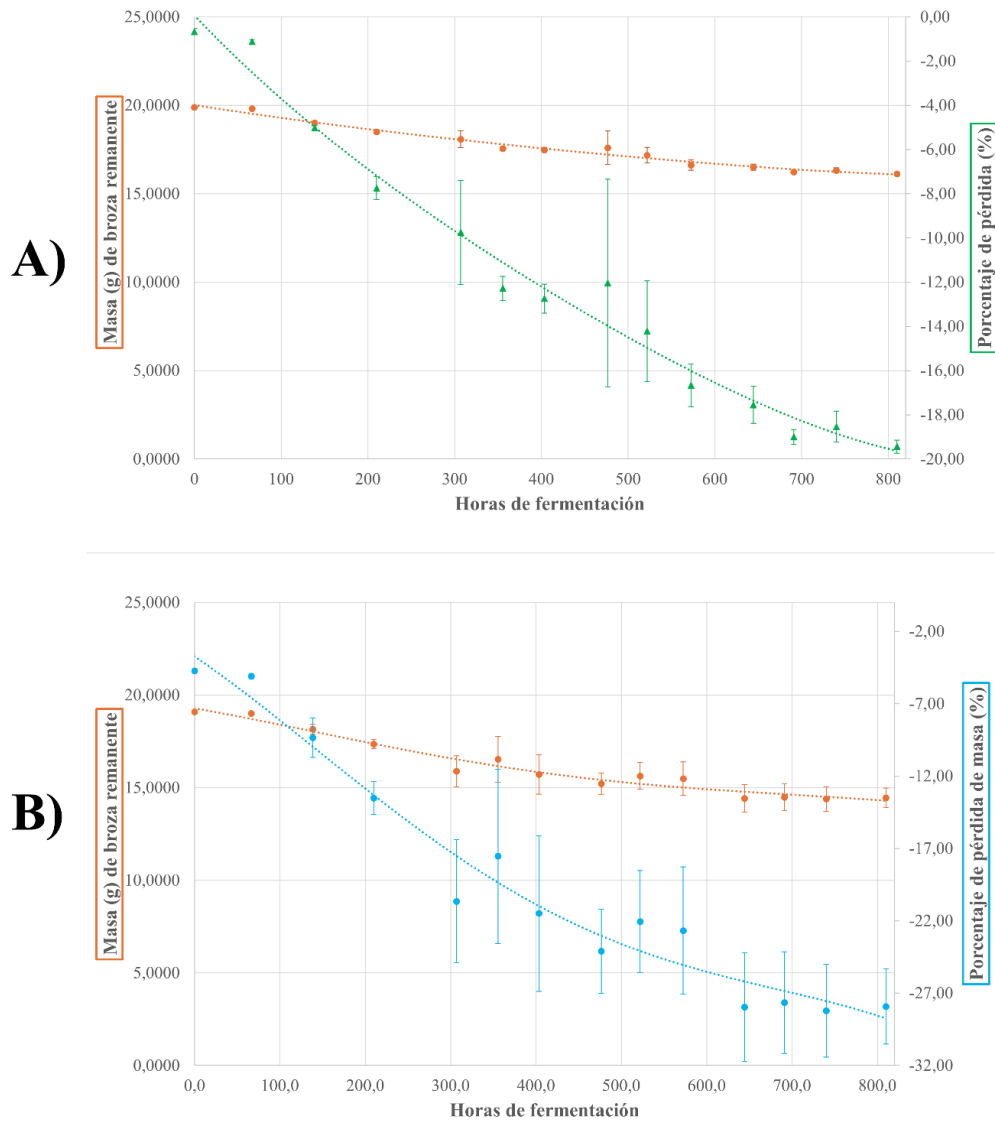
#### 4.5. Análisis proximal de las muestras recolectadas de la fermentación en fase sólida de broza extraída y broza sin extraer, suplementadas con nitrógeno.

Para la inoculación de estas nuevas fermentaciones, se empleó una suspensión de micelio de *F. venenatum* en lugar de una suspensión de esporas, similar a la utilizada en la curva preliminar. El cambio se debió a que, pese a que la determinación de una concentración de esporas resulta un método más reproducible, cuenta con mucha inconsistencia respecto a si el sistema evita o no el desarrollo de las esporas a micelio. Se siguieron condiciones que propician la esporulación, tales como la incubación a temperatura de entre 25 y 30 °C, exposición a luz UV-cercano por al menos 12 horas y 12 horas de oscuridad, condiciones de pH de entre 5.5 y 7, y un bajo nivel de nutrientes;<sup>53</sup> no obstante, el resultado más frecuente fue el desarrollo de micelio o una muy baja concentración de esporas en suspensión. En vista de esto, se permitió que las esporas madurasen y se desarrollase una abundante cantidad de micelio en el medio, para luego homogenizarlo y poder contar con una suspensión del micelio triturado lo más homogénea posible. De esta manera, cada frasco fue inoculado con una cantidad determinada de peso de hongo por mililitro de suspensión de micelio inyectada dentro de los sistemas de fermentación. La concentración final de esta suspensión de micelio fue de  $9.96 \pm 0.45$  miligramos de hongo por mililitro de suspensión.

Se realizaron pruebas de crecimiento inoculando con 5 mL de suspensión de micelio en broza sin extraer y en múltiples ocasiones se observó un crecimiento apropiado del microorganismo. Esto resalta la pregunta de si esto se debe a la cantidad de inóculo utilizado o al estado de desarrollo de este, ya que en aquellas pruebas en las que la cafeína logró inhibir el crecimiento del microorganismo, la porción de hongo fue de apenas 0.5 cm<sup>2</sup> de micelio o con suspensión de esporas. Este aspecto no entra de los alcances de esta investigación; sin embargo, abre la puerta para trabajos futuros.

Se prepararon dos sistemas de fermentación distintos, uno con broza extraída y otro con broza sin extraer, ambos suplementados con un medio rico en nitrógeno e inoculados con 5 mL de la suspensión de micelio de *F. venenatum*; y de manera similar a la fermentación de la curva preliminar, en esta nueva fermentación se incubó el material a 25 °C durante un total de 810 horas (34 días), realizando muestreos por triplicado cada 3 días, donde en cada muestreo se autoclavó, secó, pesó y molió cada muestra tomada. La Figura 13 muestra la reducción de masa sufrida por la fermentación, respecto a los 20 g iniciales de broza seca, extraída (Figura 13A) y sin extraer (Figura 13B), contenidos en cada sistema de fermentación.

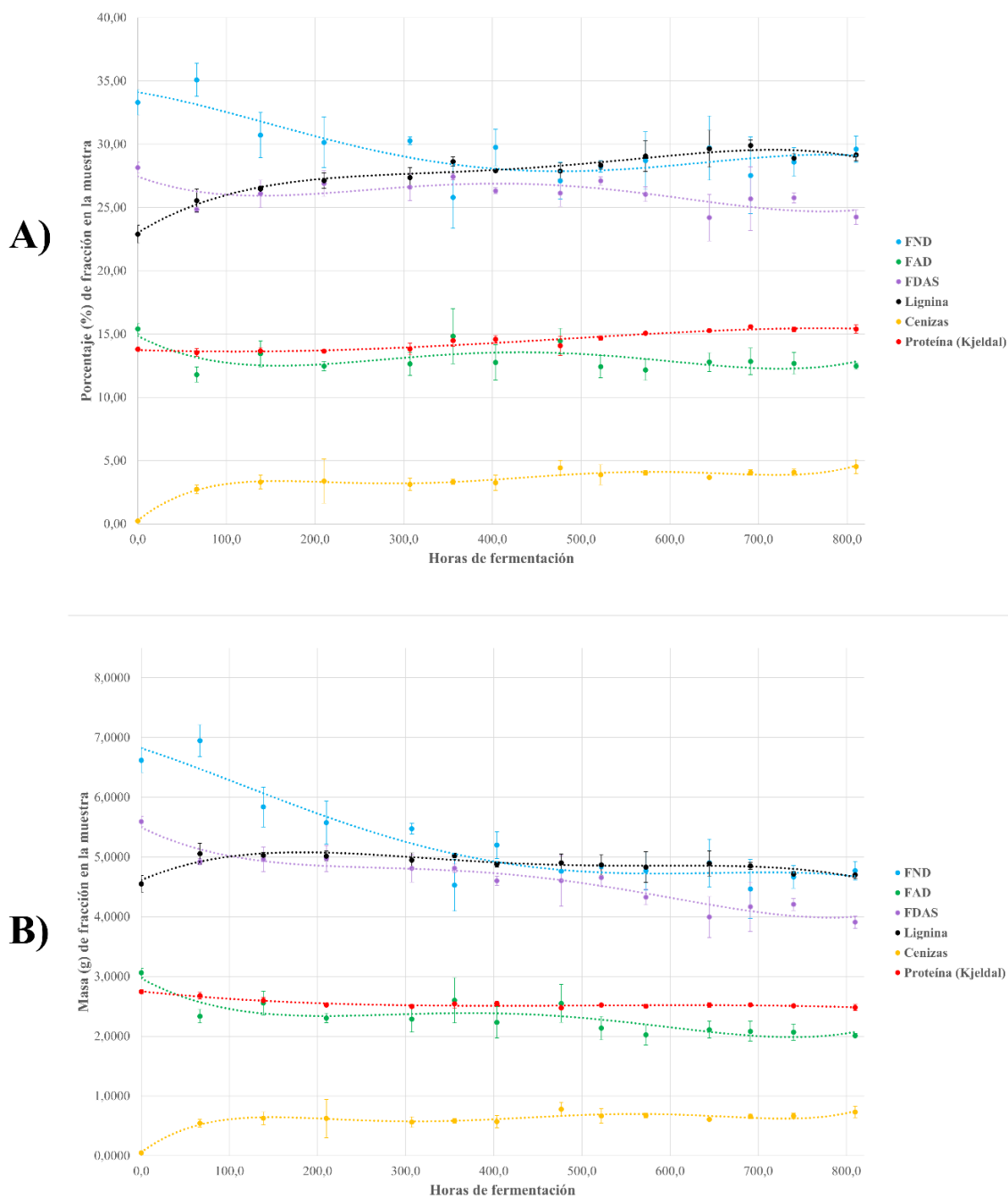
Nótese como el porcentaje máximo de masa reducida en la broza extraída fermentada a las 810 horas (día 34) fue similar al observado para la curva preliminar a día 30 (Figura 10), de un 20 %; es decir, una pérdida de 4 g menos de los 20 g iniciales en el día 0. Por otro lado, las muestras fermentadas de broza sin extraer disminuyeron porcentualmente en un máximo de 28 % a las 810 horas; que representan 6 g consumidos de los 20 g iniciales. Esta diferencia entre las dos fermentaciones puede deberse a la presencia de más nutrientes de menor peso molecular y fácilmente consumibles para el hongo en la broza sin extraer. Adicionalmente, si se observan las barras de error, asociadas a la desviación estándar del promedio obtenido de cada triplicado de muestra analizada, se puede notar que existe una mayor consistencia o menos variación entre los datos obtenidos en la broza extraída, posiblemente debido a la carencia de cafeína; que por otro lado, sí está presente en las muestras de broza sin extraer y que presentan una mayor variación entre los triplicados analizados en cada muestreo.



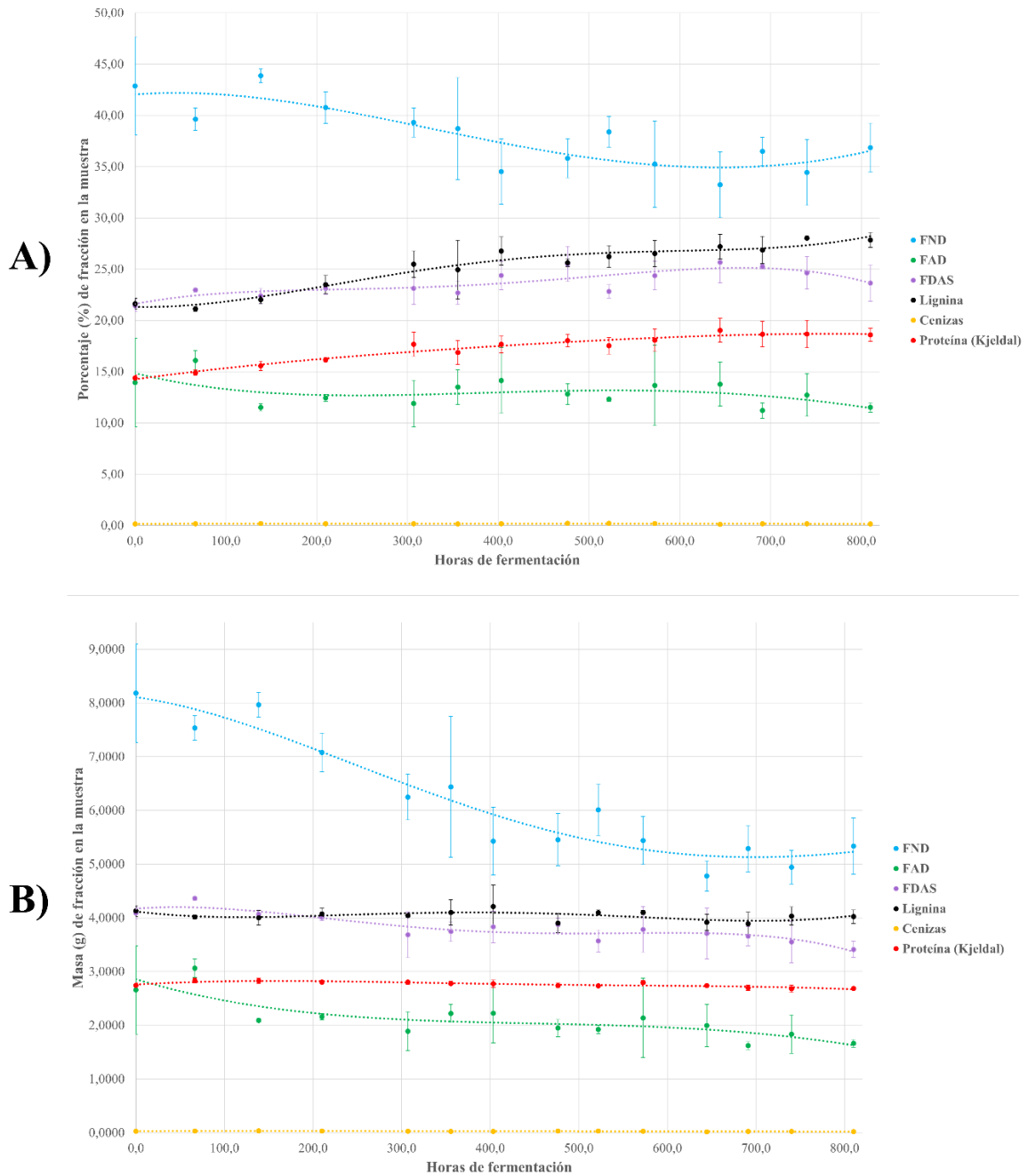
**Figura 13.** Reducción de masa (g) de broza de café suplementada con nitrógeno y fermentada en fase sólida a 25 °C con *F. venenatum*. **A.** Broza extraída; **B.** Broza sin extraer.

De igual forma, a cada una de las muestras de las dos fermentaciones anteriores les fue realizado, por duplicado, el análisis proximal, dando un total de 1008 análisis, cuyos resultados se observan en la Figura 14 y la Figura 15. La Figura 14A muestra el porcentaje, en la masa final de cada muestra de broza extraída fermentada, asociado a cada una de las fracciones de fibra y el de proteína por método Kjeldahl; mientras que la Figura 14B muestra la masa en gramos que representan cada uno de los porcentajes de la Figura 14A.

Esto mismo se ve representado en la Figura 15 A y B, pero para las muestras de broza sin extraer fermentadas.



**Figura 14.** Resultados del análisis proximal de las muestras de broza, fermentadas en fase sólida a 25 °C con *F. venenatum* en **broza extraída** y suplementada con N. Representación del contenido presente en la masa remanente de broza post-fermentación en: **A.** porcentaje (%) y **B.** masa (g)



**Figura 15.** Resultados del análisis proximal de las muestras de broza, fermentadas en fase sólida a 25 °C con *F. venenatum* en **broza sin extraer** y suplementada con N. Representación del contenido presente en la masa remanente de broza post-fermentación en: **A.** porcentaje (%) y **B.** masa (g)

Como se esperaba, las tendencias de los resultados no varían respecto los observados en la curva preliminar. En ambos casos, tanto broza extraída como sin extraer, se observa un aumento en la proporción porcentual tanto de lignina como de proteína en las muestras; no obstante, su proporción en masa se mantiene constante durante toda la fermentación. No obstante, se distingue el consumo de la masa asociada a la FAD y FDAS en etapas más tempranas de la fermentación de broza extraída, mostrando una mayor afinidad por la fracción de FDAS; debido a que hay menos nutrientes presentes en la FND producto de la extracción con la que se pretrató la broza, por lo que el hongo se ve forzado a adquirir alimento de otras fracciones de fibra más complejas y que sí es capaz de degradar. Por otro lado, las muestras de broza fermentada sin extraer comienzan a mostrar indicios del consumo de FAD y FDAS a partir de las 400 horas (día 17) de fermentación, ya que cuentan con una mayor proporción de nutrientes de más fácil acceso en la FND respecto a las muestras fermentadas de broza sin extraer. Curiosamente, en las muestras de ambas fermentaciones, se detiene el consumo de FND a los 5 g remanentes de dicha fracción, ejemplificado más claramente en la Figura 14B donde este valor no disminuyó más a partir de las 400 horas. Esto sugiere, que el hongo no es capaz de degradar moléculas más complejas de esta fracción de fibra, sino que probablemente consume aquellas de bajo peso molecular como azúcares libres o almidones. Esta hipótesis se podría contrastar mediante una cuantificación de la composición de azúcares (glucosa, fructosa, etc) de un extracto acuoso de las muestras.

Cabe resaltar que los valores de proteína fueron determinados empleando el método Kjeldahl, el cual mide el nivel de nitrógeno total en la muestra y que posteriormente se expresa como proteína al multiplicarlo por un factor de 6.25. Esta característica particular del método impide saber cuánta nueva proteína fue producida por el hongo, ya que no diferencia entre la que ya estaba presente en la broza o del nitrógeno que pueda ser suplementado. Por este motivo se debe realizar un análisis de proteína complementario, que permita determinar la cantidad o la proporción de proteína generada por la conversión del nitrógeno no proteico suplementado, por parte del hongo. Esto último puede llevarse a cabo mediante una extracción alcalina de las muestras, donde se buscaría aislar la proteína del extracto por precipitación con ácido tricloroacético, luego redisolverla en buffer salino y finalmente cuantificarla por métodos tradicionales como Bradford o

Lowry.<sup>59,60</sup> Este último procedimiento se llevó a cabo para esta investigación; no obstante, hubo complicaciones que aún están pendientes de resolver para tener un resultado claro. Esto fue debido a la complejidad de la muestra, ya que los taninos presentes en la broza también se ven extraídos durante el proceso, y debido su capacidad para acomplejar proteínas, estos prevalecen en la proteína una vez precipitada; lo que genera interferencias en la lectura posterior de las muestras por Bradford. Por lo tanto, queda aún pendiente finalizar estos análisis, una vez corregido el método.<sup>61</sup>

#### 4.6. Relación entre la digestibilidad y los componentes extraídos o no extraídos de la broza.

Desafortunadamente, debido a problemas de coordinación con el laboratorio con el acceso a las vacas de las que se recolecta el licor ruminal y que cuentan con el instrumental para realizar el análisis; no se ha logrado realizar el análisis de digestibilidad *in vitro* de estas últimas muestras de broza suplementada con N y fermentada a 30 días. Sin embargo, no se espera que la tendencia de estos resultados varíe de la observada para la curva preliminar de broza fermentada a 60 días; donde la digestibilidad disminuyó considerablemente debido a la nula capacidad de *F. venenatum* para degradar la lignina. No obstante, estos resultados pretendían vislumbrar si la presencia de cafeína y taninos en las muestras fermentadas de broza “sin extraer”, provocaban una disminución aún mayor de la digestibilidad respecto a la observada en las muestras fermentadas de broza extraída. Por lo tanto, una vez obtenidos estos resultados, serán un añadido importante a las conclusiones de la presente investigación.

## CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados recopilados en esta investigación indican que la fermentación de la broza de café en fase sólida con *F. venenatum* no influye positivamente en las propiedades nutricionales del material ni en su digestibilidad, principalmente debido a la incapacidad enzimática del microorganismo para alimentarse de la lignina de la broza y en su lugar, compite por los mismos nutrientes que requiere el consorcio microbiano del licor ruminal.

Se observó que la concentración de cafeína presente en la broza supone un impedimento para el crecimiento adecuado del microorganismo con el que se desea fermentar el material. De igual manera, en vista de que la concentración de cafeína y de polifenoles totales no sufrió una variación considerable respecto a la broza pre y post fermentación, se sugiere que *F. venenatum* es incapaz de metabolizar tanto la cafeína como los taninos, o algún otro compuesto polifenólico de la broza.

Es necesaria la suplementación de nitrógeno en el sustrato, de manera que el microorganismo pueda captarlo e incorporarlo en sus procesos metabólicos para la producción de micoproteína, dado que no es capaz de captarlo de su entorno y por ello los niveles de proteína no aumentarían. Adicionalmente, el método Kjeldahl no es el procedimiento más adecuado para la determinación de proteína para este estudio, ya este cuantifica su valor en base al contenido de nitrógeno total, tomando en cuenta el nitrógeno ya presente inicialmente en la broza y el que pueda ser suplementado, sin lograr diferenciar cuánta proteína nueva fue producida realmente por el hongo al captar el nitrógeno del sustrato. Por ello es necesario complementar este análisis con otra metodología, tal como la realización de una extracción alcalina del material, en la que se vería extraída la proteína, y posteriormente, esta se precipitaría empleando ácido tricloroacético, excluyendo así otros interferentes no proteicos. Esto permitiría aislar la proteína y, al redisolverla en buffer salino, cuantificarla por métodos tradicionales, como Bradford o Lowry.

Si bien, en un principio la selección de *F. venenatum* para la fermentación fue bajo el criterio del elevado contenido proteico de su biomasa y que no existen estudios de su uso en la fermentación de desechos agroindustriales como el café; en vista de los resultados obtenidos, este no es un buen candidato para la fermentación de la broza, dado que carece

de la capacidad de producción de enzimas exógenas capaces de degradar lignina. Como opción a sustituir a *Fusarium venenatum*, se pueden evaluar hongos de pudrición blanca como el *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* (ostra) o *Lentinula edodes* (shitake), los cuales se han reportado en otros estudios para el tratado de desechos lignocelulósicos.<sup>62-64</sup> No obstante, un factor limitante continúa siendo la ingesta de FND por parte del hongo que se utilice, ya que en esta fracción se encuentran los nutrientes de más fácil acceso (azúcares, almidones, pectinas, etc) tanto para este microorganismo, como para las bacterias del licor ruminal; y al remover dichos nutrientes, posibilita que se den disminuciones en la digestibilidad del material. Entre las alternativas que se pueden sugerir a este problema destacaría el evitar realizar una fermentación directa en fase sólida con el microorganismo y en su lugar, producir un caldo enzimático de enzimas lignocelulolíticas mediante el cultivo controlado en biorreactor de un hongo que produzca este tipo de enzimas exógenas. Esto permitiría que las enzimas entren en contacto con el sustrato, que degraden el material complejo de su pared celular en moléculas de menor peso molecular y por ende, que sea más fácilmente digerible para el organismo que lo consuma; esto sin resultar en el inconveniente de que el hongo consuma primero los nutrientes más fácilmente accesibles que eventualmente requeriría la biota del animal.

Por lo tanto, los resultados de esta investigación abren muchas puertas en la línea de investigación del aprovechamiento de residuos agroindustriales tanto en el LIB como el LADIP de la UNA, y plantea ideas de proyectos futuros con miras a generar un considerable valor agregado en un abundante residuo agroindustrial del país, como lo es la broza de café.

## CAPÍTULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Hashempour-Baltork, F.; Khosravi-Darani, K.; Hosseini, H.; Farshi, P.; Reihani, S. F. S. Mycoproteins as Safe Meat Substitutes. *J Clean Prod* **2020**, *253*, 119958. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.119958>.
- (2) Bouafou, K.; Guy, M.; Brou André, K.; Viviane, Z.-T.; Séraphin, K.-C. Potential Food Waste and By-Products of Coffee in Animal Feed. *Electronic Journal of Biology* **2011**, *7* (4), 74–80.
- (3) Tian, H.; Guo, G.; Fu, X.; Yao, Y.; Yuan, L.; Xiang, A. Fabrication, Properties and Applications of Soy-Protein-Based Materials: A Review. *Int J Biol Macromol* **2018**, *120*, 475–490. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.110>.
- (4) Schilling-Vacaflor, A.; Lenschow, A.; Challies, E.; Cotta, B.; Newig, J. Contextualizing Certification and Auditing: Soy Certification and Access of Local Communities to Land and Water in Brazil. *World Dev* **2021**, *140*, 105281. <https://doi.org/10.1016/j.worlddev.2020.105281>.
- (5) Akhimien, N. G.; Latif, E.; Hou, S. S. Application of Circular Economy Principles in Buildings: A Systematic Review. *Journal of Building Engineering* **2021**, *38*, 102041. <https://doi.org/10.1016/j.jobe.2020.102041>.
- (6) Instituto del Café de Costa Rica (ICAFFE). *Informe Sobre La Actividad Cafetalera de Costa Rica*; 2021.
- (7) Hoseini, M.; Cocco, S.; Casucci, C.; Cardelli, V.; Corti, G. Coffee By-Products Derived Resources. A Review. *Biomass Bioenergy* **2021**, *148*, 106009. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106009>.
- (8) International Coffee Organization\_Coffee Prices Rise but Falter towards End of Month\_Coffee Market Report - December 2023.
- (9) USDA Foreign Agricultural Service. *Coffee Annual Costa Rica*; 2023.
- (10) de Melo Pereira, G. V.; de Carvalho Neto, D. P.; Magalhães Júnior, A. I.; do Prado, F. G.; Pagnoncelli, M. G. B.; Karp, S. G.; Soccol, C. R. Chemical Composition and

- Health Properties of Coffee and Coffee By-Products; 2020; pp 65–96.  
<https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.10.002>.
- (11) Manasa, V.; Padmanabhan, A.; Anu Appaiah, K. A. Utilization of Coffee Pulp Waste for Rapid Recovery of Pectin and Polyphenols for Sustainable Material Recycle. *Waste Management* **2021**, *120*, 762–771.  
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.10.045>.
- (12) Pandey, A.; Soccol, C. R.; Nigam, P.; Brand, D.; Mohan, R.; Roussos, S. Biotechnological Potential of Coffee Pulp and Coffee Husk for Bioprocesses. *Biochem Eng J* **2000**, *6* (2), 153–162. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(00\)00084-X](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(00)00084-X).
- (13) López-Gómez, J. P.; Manan, M. A.; Webb, C. Solid-State Fermentation of Food Industry Wastes. In *Food Industry Wastes*; Elsevier, 2020; pp 135–161.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817121-9.00007-3>.
- (14) Hülsen, T.; Carvalho, G.; Egger, F.; Cruz, H.; Vertstraete, W.; Batstone, D. J.; Pikaar, I. Production of Single-Cell Proteins from Organic Matter and Residual Nitrogen. In *Wastewater Treatment Residues as Resources for Biorefinery Products and Biofuels*; Elsevier, 2020; pp 355–389. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816204-0.00016-3>.
- (15) Patay, É. B.; Bencsik, T.; Papp, N. Phytochemical Overview and Medicinal Importance of Coffea Species from the Past until Now. *Asian Pac J Trop Med* **2016**, *9* (12), 1127–1135. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.11.008>.
- (16) Santos, É. M. dos; Macedo, L. M. de; Tundisi, L. L.; Ataide, J. A.; Camargo, G. A.; Alves, R. C.; Oliveira, M. B. P. P.; Mazzola, P. G. Coffee By-Products in Topical Formulations: A Review. *Trends Food Sci Technol* **2021**, *111*, 280–291.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.064>.
- (17) ICAFE; Instituto del Café de Costa Rica. Informe de Actividad Cafetalera de Costa Rica. **2017**, 59.
- (18) Galanakis, C. Food Waste Valorization Opportunities for Different Food Industries. In *The Interaction of Food Industry and Environment*; Elsevier, 2020; pp 341–422.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816449-5.00011-4>.

- (19) Noriega Salazar, A.; Silva Acuña, R.; García de Salcedo, M. *Revisión Utilización de La Pulpa de Café En La Alimentación Animal*; 2008; Vol. 26.
- (20) Jeszka-Skowron, M.; Zgoła-Grześkowiak, A.; Grześkowiak, T. Analytical Methods Applied for the Characterization and the Determination of Bioactive Compounds in Coffee. *European Food Research and Technology* **2015**, *240* (1), 19–31. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2356-z>.
- (21) Santos, É. M. dos; Macedo, L. M. de; Tundisi, L. L.; Ataide, J. A.; Camargo, G. A.; Alves, R. C.; Oliveira, M. B. P. P.; Mazzola, P. G. Coffee By-Products in Topical Formulations: A Review. *Trends Food Sci Technol* **2021**, *111*, 280–291. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.064>.
- (22) Trugo, L. C.; Macrae, R. Chlorogenic Acid Composition of Instant Coffees. *Analyst* **1984**, *109* (3), 263. <https://doi.org/10.1039/an9840900263>.
- (23) Naveed, M.; Hejazi, V.; Abbas, M.; Kamboh, A. A.; Khan, G. J.; Shumzaid, M.; Ahmad, F.; Babazadeh, D.; FangFang, X.; Modarresi-Ghazani, F.; WenHua, L.; XiaoHui, Z. Chlorogenic Acid (CGA): A Pharmacological Review and Call for Further Research. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2018**, *97*, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.064>.
- (24) Milawarni; Arskadius; Elfiana, E.; Yassir. Characteristics of Wafer Originated from Coffee Waste as Ruminant Animal Feed. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng* **2020**, *854* (1), 012032. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/854/1/012032>.
- (25) McGrath, J.; Duval, S. M.; Tamassia, L. F. M.; Kindermann, M.; Stemmler, R. T.; de Gouvea, V. N.; Acedo, T. S.; Immig, I.; Williams, S. N.; Celi, P. Nutritional Strategies in Ruminants: A Lifetime Approach. *Res Vet Sci* **2018**, *116*, 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.09.011>.
- (26) Gidenne, T. Fibres in Rabbit Feeding for Digestive Troubles Prevention: Respective Role of Low-Digested and Digestible Fibre. *Livest Prod Sci* **2003**, *81* (2–3), 105–117. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(02\)00301-9](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(02)00301-9).

- (27) Nozière, P.; Ortigues-Marty, I.; Loncke, C.; Sauvant, D. Carbohydrate Quantitative Digestion and Absorption in Ruminants: From Feed Starch and Fibre to Nutrients Available for Tissues. *Animal* **2010**, *4* (7), 1057–1074. <https://doi.org/10.1017/S1751731110000844>.
- (28) Mould, F. L. Predicting Feed Quality—Chemical Analysis and in Vitro Evaluation. *Field Crops Res* **2003**, *84* (1–2), 31–44. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(03\)00139-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(03)00139-4).
- (29) Anrique, R. G.; Agr, I.; Molina, X. S.; Alfaro, M.; Saldaña, R. P. *COMPOSICION DE ALIMENTOS PARA EL GANADO BOVINO Colaboradores*.
- (30) National Research Council. *Nutrient Requirements of Beef Cattle*, Seventh Edition.; National Academies Press: Washington, D.C., 2000. <https://doi.org/10.17226/9791>.
- (31) Halmemies-Beauchet-Filleau, A.; Rinne, M.; Lamminen, M.; Mapato, C.; Ampapon, T.; Wanapat, M.; Vanhatalo, A. Review: Alternative and Novel Feeds for Ruminants: Nutritive Value, Product Quality and Environmental Aspects. *Animal* **2018**, *12*, s295–s309. <https://doi.org/10.1017/S1751731118002252>.
- (32) Nayan, N.; Sonnenberg, A. S. M.; Hendriks, W. H.; Cone, J. W. Prospects and Feasibility of Fungal Pretreatment of Agricultural Biomass for Ruminant Feeding. *Anim Feed Sci Technol* **2020**, *268*, 114577. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114577>.
- (33) Gandia, A.; van den Brandhof, J. G.; Appels, F. V. W.; Jones, M. P. Flexible Fungal Materials: Shaping the Future. *Trends Biotechnol* **2021**, *39* (12), 1321–1331. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2021.03.002>.
- (34) Arora, S.; Rani, R.; Ghosh, S. Bioreactors in Solid State Fermentation Technology: Design, Applications and Engineering Aspects. *J Biotechnol* **2018**, *269*, 16–34. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.01.010>.
- (35) Thrane, U. Fusarium. In *Encyclopedia of Food Microbiology*; Elsevier, 2014; pp 76–81. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00141-5>.

- (36) Ghorai, S.; Banik, S. P.; Verma, D.; Chowdhury, S.; Mukherjee, S.; Khowala, S. Fungal Biotechnology in Food and Feed Processing. In *Comprehensive Biotechnology*; Elsevier, 2011; pp 603–615. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00543-2>.
- (37) Finnigan, T.; Needham, L.; Abbott, C. Mycoprotein. In *Sustainable Protein Sources*; Elsevier, 2017; pp 305–325. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802778-3.00019-6>.
- (38) Hashempour-Baltork, F.; Khosravi-Darani, K.; Hosseini, H.; Farshi, P.; Reihani, S. F. S. Mycoproteins as Safe Meat Substitutes. *J Clean Prod* **2020**, *253*, 119958. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.119958>.
- (39) Barksdale, A. W. Inter-Thallic Sexual Reactions in Achlya, a Genus of the Aquatic Fungi. *Am J Bot* **1960**, *47*, 14–23.
- (40) Vogel, H. J. Distribution of Lysine Pathways Among Fungi: Evolutionary Implications. *Source: The American Naturalist* **1964**, *98* (903), 435–446.
- (41) Royer, J. C.; Christianson, L. M.; Yoder, W. T.; Gambetta, G. A.; Klotz, A. V; Morris, C. L.; Brody, H.; Otani, S. *Deletion of the Trichodiene Synthase Gene of Fusarium Venenatum: Two Systems for Repeated Gene Deletions*; 1999. <http://www.idealibrary.com>.
- (42) Stoffel, F.; Santana, W. de O.; Gregolon, J. G. N.; Kist, T. B. L.; Fontana, R. C.; Camassola, M. Production of Edible Mycoprotein Using Agroindustrial Wastes: Influence on Nutritional, Chemical and Biological Properties. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2019**, *58*, 102227. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102227>.
- (43) Olufunke, O. E.; Ogugua, C. A. Solid State Fermentation of Cassava Peel with Trichoderma Viride (ATCC 36316) for Protein Enrichment. *International Journal of Nutrition and Food Engineering* **2013**, *7*, 202–209.
- (44) Santos da Silveira, J.; Durand, N.; Lacour, S.; Belleville, M.-P.; Perez, A.; Loiseau, G.; Dornier, M. Solid-State Fermentation as a Sustainable Method for Coffee Pulp Treatment and Production of an Extract Rich in Chlorogenic Acids. *Food and*

- (45) Zhang, Q.; Zhang, J.; Shen, J.; Silva, A.; Dennis, D. A.; Barrow, C. J. A Simple 96-Well Microplate Method for Estimation of Total Polyphenol Content in Seaweeds. *J Appl Phycol* **2006**, *18* (3–5), 445–450. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9048-4>.
- (46) Pérez, M.; Dominguez-López, I.; Lamuela-Raventós, R. M. The Chemistry Behind the Folin–Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)Phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern. *J Agric Food Chem* **2023**, *71* (46), 17543–17553. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c04022>.
- (47) Mandels, M.; Weber, J. The Production of Cellulases. In *Cellulases and their applications*; 1969; pp 391–414. <https://doi.org/10.1021/ba-1969-0095.ch023>.
- (48) Ferreira, G.; Thiex, N. Symposium Review: Fiber and in Vitro Methods, Analytical Variation, and Contributions to Feed Analysis. *Journal of Dairy Science*. Elsevier Inc. June 1, 2023, pp 4464–4469. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22407>.
- (49) Van Soest, P. J.; Wine, R. H. Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds. IV. Determination of Plant Cell-Wall Constituents. *Journal of the A.O.A.C.* **1967**, *50*, 50–55.
- (50) Goering, M. K.; Van Soest, P. J. Forage Fiber Analysis (Apparatus, Reagents, Procedures and Some Applications). *Agricultural Handbook* **1979**, N<sup>o</sup> 379.
- (51) Association of official analytical chemists (AOAC). Animal Feed: Official Method 988.05. *Official Methods of Analysis* **2005**, 24–25.
- (52) Sugiyama, A.; Sano, C. M.; Yazaki, K.; Sano, H. Caffeine Fostering of Mycoparasitic Fungi against Phytopathogens. *Plant Signal Behav* **2016**, *11* (1). <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1113362>.
- (53) Ajmal, M.; Hussain, A.; Ali, A.; Chen, H.; Lin, H. Strategies for Controlling the Sporulation in *Fusarium* Spp. *Journal of Fungi* **2022**, *9* (1), 10. <https://doi.org/10.3390/jof9010010>.

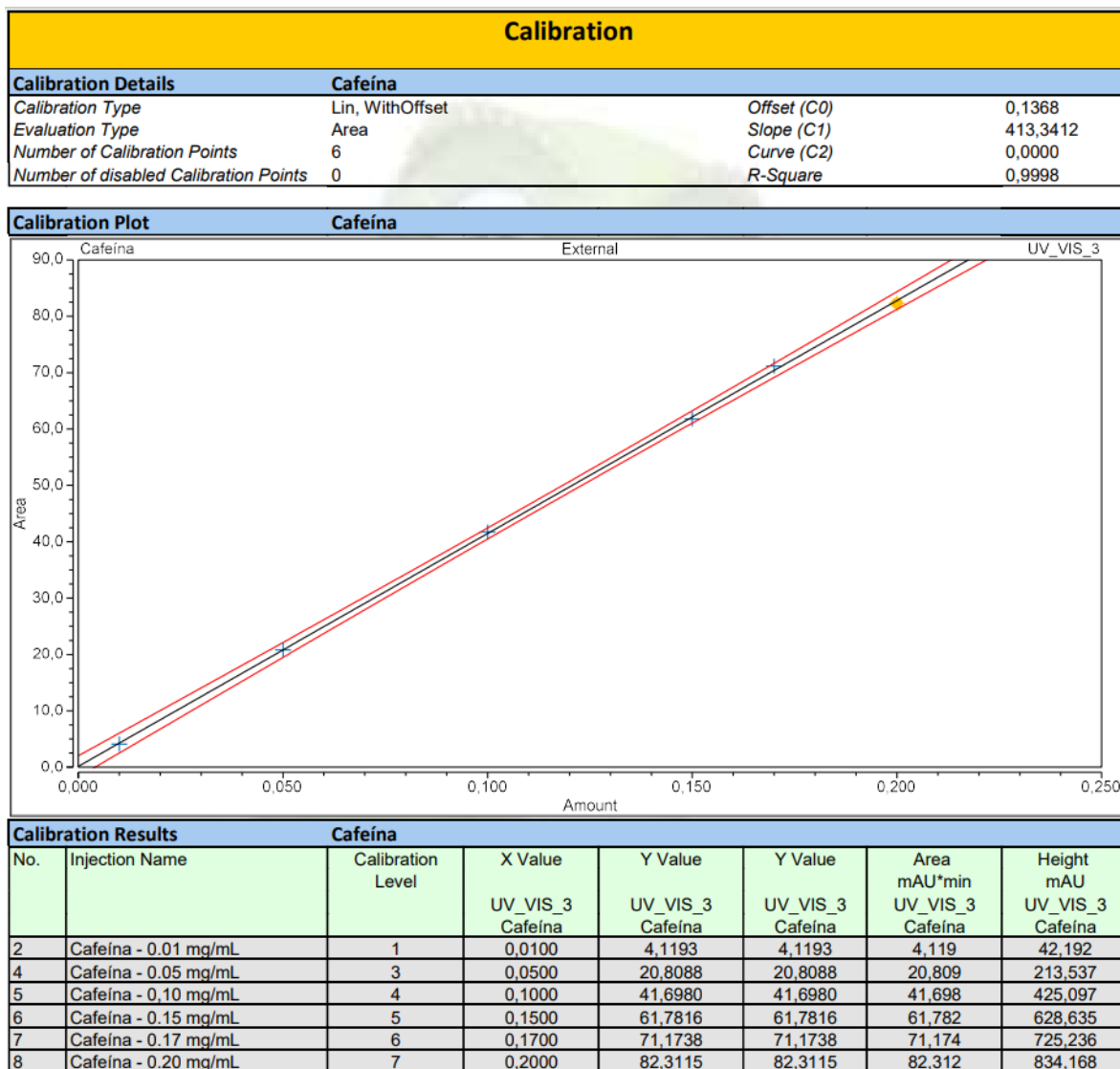
- (54) Bouhzam, I.; Cantero, R.; Margallo, M.; Aldaco, R.; Bala, A.; Fullana-i-Palmer, P.; Puig, R. Extraction of Bioactive Compounds from Spent Coffee Grounds Using Ethanol and Acetone Aqueous Solutions. *Foods* **2023**, *12* (24), 4400. <https://doi.org/10.3390/foods12244400>.
- (55) Mendoza, D.; Kulich, J. C.; Kulich, I.; Elena. Aplicación de Balances de Masa y Energía al Proceso de Fermentación En Estado Sólido de Bagazo de Caña de Azúcar Con *Aspergillus Niger*. *Biotecnología Aplicada* **2004**, *21*, 85–91.
- (56) Mäkelä, M. R.; Donofrio, N.; de Vries, R. P. Plant Biomass Degradation by Fungi. *Fungal Genetics and Biology* **2014**, *72*, 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.08.010>.
- (57) Valencia-Guerrero, M. F.; Quevedo-Hidalgo, B.; Franco-Correa, M.; Diez-Ortega, H.; Parra-Giraldo, C. M.; Rodríguez-Bocanegra, M. X. Evaluación de Actividades Enzimáticas de *Fusarium Spp.*, Aislados de Lesiones En Humanos, Animales y Plantas. *Univ Sci (Bogota)* **2011**, *16* (2), 147. <https://doi.org/10.11144/javeriana.SC16-2.aoc>.
- (58) Moore, J. E. Forage Crops. In *Crop Quality, Storage, and Utilization*; American Society of Agronomy, Crop Science Society of America: Madison, WI, USA, 2012; pp 61–91. <https://doi.org/10.2135/1980.cropquality.c3>.
- (59) Peitersen, N. Continuous Cultivation of *Trichoderma Viride* on Cellulose. *Biotechnol Bioeng* **1977**, *19*, 337–348.
- (60) Nouroozi, V.; Nouroozi, R. V.; Noroozi, M. V.; Ahmadizadeh, M. *Determination of Protein Concentration Using Bradford Microplate Protein Quantification Assay*; 2015; Vol. 4.
- (61) McArt, S. H.; Spalinger, D. E.; Kennish, J. M.; Collins, W. B. A Modified Method for Determining Tannin–Protein Precipitation Capacity Using Accelerated Solvent Extraction (ASE) and Microplate Gel Filtration. *J Chem Ecol* **2006**, *32* (6), 1367–1377. <https://doi.org/10.1007/s10886-006-9089-9>.
- (62) Tišma, M.; Žnidaršič-Plazl, P.; Šelo, G.; Tolj, I.; Šperanda, M.; Bucić-Kojić, A.; Planinić, M. *Trametes Versicolor* in Lignocellulose-Based Bioeconomy: State of the

Art, Challenges and Opportunities. *Bioresour Technol* **2021**, *330*, 124997. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124997>.

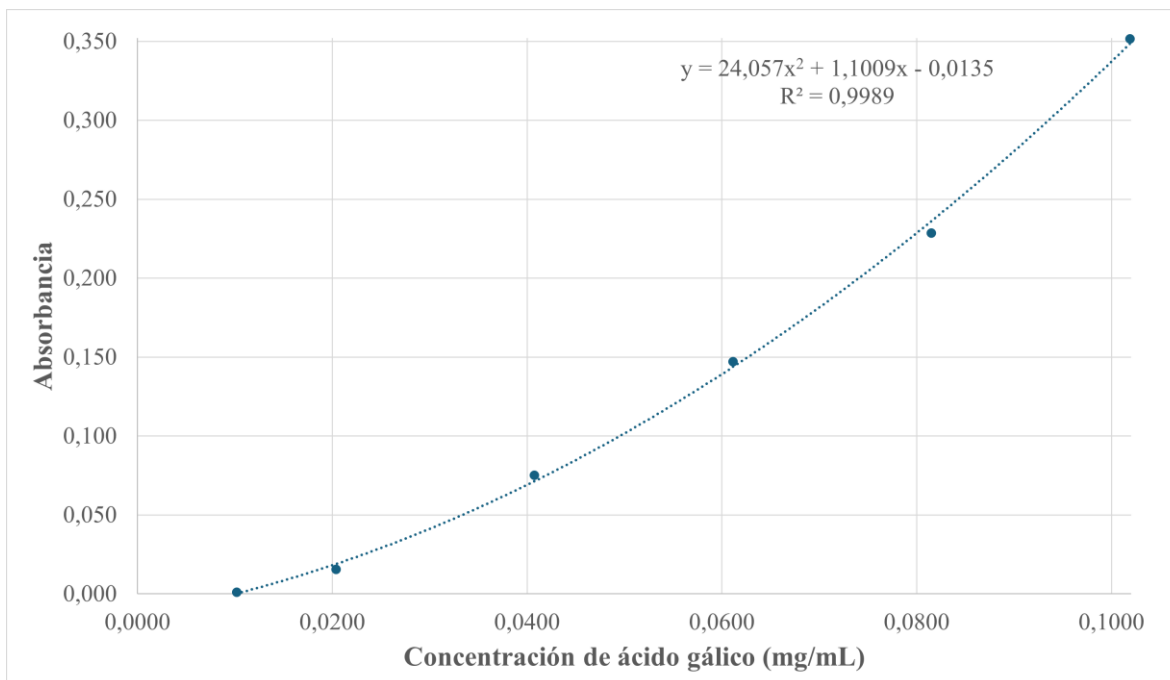
- (63) Sánchez, C. Cultivation of *Pleurotus Ostreatus* and Other Edible Mushrooms. *Appl Microbiol Biotechnol* **2010**, *85* (5), 1321–1337. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2343-7>.
- (64) Muszynska, B.; Pazdur, P.; Lazur, J.; Sulkowska-Ziaja, K. *Lentinula Edodes* (Shiitake) – Biological Activity. *Med Int Rev* **2017**, *27*, 189–195.

# ANEXOS

## Anexo 1. Curvas de calibración



**Figura 16.** Curva de calibración de cafeína obtenida por absorbancia a 280 nm en HPLC-DAD. Datos obtenidos con el software Chromeleon © Dionex versión 7.2.9.11323.



**Figura 17.** Curva de calibración de ácido gálico por absorbancia en microplacas por el método de Folin-Ciocalteu.

## Anexo 2. Ecuaciones utilizadas en los análisis

### A. Determinación de concentración de esporas por conteo en cámara de Neubauer

$$[X] = PEC \times \frac{1 \text{ cuadrante}}{(L \times A \times P)} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ cm}^3} \times \frac{1 \text{ cm}^3}{1 \text{ mL}} \times FD$$

**Donde:**

[X] = Concentración de esporas de la suspensión (esporas/mL)

PEC = Promedio de esporas contadas por cuadrante

L = Largo de cuadrante (mm)

A = Ancho de cuadrante (mm)

P = Profundidad de la cámara de Neubauer (mm)

FD = Factor de dilución de la suspensión de esporas

**B. Porcentaje de materia seca**

$$MS = \left( \frac{M_{105^{\circ}\text{C}}}{M_1} \right) \times 100$$

**Donde:**

MS = Porcentaje de materia seca de la muestra (%)

$M_{105^{\circ}\text{C}}$  = Masa de la muestra post secado a 105 °C (g)

$M_1$  = Masa medida de muestra fresca (g)

**C. Porcentaje de FND**

$$B_{\text{pFND}} = B_{\text{C1}} - B_{\text{FND}}$$

$$M_{\text{FND}} = M_{\text{pFND}} - B_{\text{V1}} - B_{\text{pFND}}$$

$$\% \text{ FND} = \left( \frac{(M_1 \times MS) - M_{\text{FND}}}{M_1 \times MS} \right) \times 100$$

**Donde:**

$B_{\text{C1}}$  = Masa de bolsa ANKOM F57 vacía usada como control (g)

$B_{\text{FND}}$  = Masa registrada de la bolsa control vacía ANKOM F57 post FND (g)

$B_{\text{pFND}}$  = Pérdida de masa de bolsa control vacía ANKOM F57 post FND (g)

$M_{\text{FND}}$  = Masa muestra post FND (g)

$M_{\text{pFND}}$  = Masa registrada de “muestra + bolsa ANKOM F57” post FND (g)

$B_{\text{V1}}$  = Masa de bolsa ANKOM F57 vacía usada para la muestra (g)

$M_1$  = Masa medida de muestra fresca (g)

MS = Porcentaje de materia seca de la muestra (%)

#### D. Porcentaje de FAD

$$B_{pFAD} = B_{FND} - B_{FAD}$$

$$M_{FAD} = M_{pFAD} - B_{V1} - (B_{pFND} + B_{pFAD})$$

$$\% \text{ FAD} = \left( \frac{M_{FND} - M_{FAD}}{M_1 \times MS} \right) \times 100$$

#### Donde:

$B_{FND}$  = Masa registrada de la bolsa control vacía ANKOM F57 post FND (g)

$B_{FAD}$  = Masa registrada de la bolsa control vacía ANKOM F57 post FAD (g)

$B_{pFAD}$  = Pérdida de masa de bolsa control vacía ANKOM F57 post FAD (g)

$M_{pFAD}$  = Masa registrada de “muestra + bolsa ANKOM F57” post FAD (g)

$B_{V1}$  = Masa de bolsa ANKOM F57 vacía usada para la muestra (g)

$B_{pFND}$  = Pérdida de masa de bolsa control vacía ANKOM F57 post FND (g)

$M_{FAD}$  = Masa muestra post FAD (g)

$M_{FND}$  = Masa muestra post FND (g)

$M_1$  = Masa medida de muestra fresca (g)

$MS$  = Porcentaje de materia seca de la muestra (%)

## E. Porcentaje de FDAS

$$B_{pFDAS} = B_{FAD} - B_{FDAS}$$

$$M_{FDAS} = M_{pFDAS} - B_{V1} - (B_{pFND} + B_{pFAD} + B_{pFDAS})$$

$$\% \text{ FDAS} = \left( \frac{M_{FAD} - M_{FDAS}}{M_1 \times MS} \right) \times 100$$

### Donde:

$B_{FAD}$  = Masa registrada de la bolsa control vacía ANKOM F57 post FAD (g)

$B_{FDAS}$  = Masa registrada de bolsa control vacía ANKOM F57 post FDAS (g)

$B_{pFDAS}$  = Pérdida de masa de bolsa control vacía ANKOM F57 post FDAS (g)

$M_{pFDAS}$  = Masa registrada de “muestra + bolsa ANKOM F57” post FDAS (g)

$B_{V1}$  = Masa de bolsa ANKOM F57 vacía usada para la muestra (g)

$B_{pFND}$  = Pérdida de masa de bolsa control vacía ANKOM F57 post FND (g)

$B_{pFAD}$  = Pérdida de masa de bolsa control vacía ANKOM F57 post FAD (g)

$M_{FAD}$  = Masa muestra post FAD (g)

$M_{FDAS}$  = Masa muestra post FDAS (g)

$M_1$  = Masa medida de muestra fresca (g)

$MS$  = Porcentaje de materia seca de la muestra (%)

**F. Porcentaje de lignina por corrección con cenizas**

$$\% \text{ Lignina} = \left( \frac{M_{\text{FDAS}} - M_{\text{C}} - B_{\text{pC}}}{M_1 \times \text{MS}} \right) \times 100$$

$$\% \text{ Cenizas} = \left( \frac{M_{\text{C}} - B_{\text{pC}}}{M_1 \times \text{MS}} \right) \times 100$$

**Donde:**

$M_{\text{FDAS}}$  = Masa muestra post FDAS (g)

$M_{\text{C}}$  = Masa de cenizas de muestra post calcinación (g)

$B_{\text{pC}}$  = Masa de cenizas de bolsa control vacía ANKOM F57 post calcinación (g)

$M_1$  = Masa medida de muestra fresca (g)

$\text{MS}$  = Porcentaje de materia seca de la muestra (%)

**G. Porcentaje de digestibilidad *in vitro***

$$B_{\text{pD}} = B_{\text{C2}} - B_{\text{D}}$$

$$\% \text{ D}_{\text{in vitro}} = 100 - \left( \frac{(M_1 \times \text{MS}) - M_{\text{pD}} - B_{\text{V2}} - B_{\text{pD}}}{M_1 \times \text{MS}} \right) \times 100$$

**Donde:**

$B_{\text{C2}}$  = Masa de bolsa ANKOM F57 vacía usada como control (g)

$B_{\text{D}}$  = Masa registrada de la bolsa control vacía ANKOM F57 post digestibilidad *in vitro* (g)

$B_{\text{pD}}$  = Pérdida de masa de bolsa control vacía ANKOM F57 post digestibilidad *in vitro* (g)

$M_{pD}$  = Masa registrada de “muestra + bolsa ANKOM F57” post digestibilidad *in vitro* (g)

$B_{V2}$  = Masa de bolsa ANKOM F57 vacía usada para la muestra (g)

$M_C$  = Masa de cenizas de muestra post calcinación (g)

$M_1$  = Masa medida de muestra fresca (g)

$MS$  = Porcentaje de materia seca de la muestra (%)

**H. Porcentaje de proteína por método titulométrico (Kjeldahl):**

$$\% \text{ Proteína} = \left( \frac{14.007 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times (V_A - V_B) \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times C_A}{M_1 \times MS} \right) \times 100 \times 6.25$$

**Donde:**

$V_A$  = Volumen consumido de ácido por la muestra (mL)

$V_B$  = Volumen consumido de ácido por el blanco (mL)

$C_A$  = Concentración del ácido de titulación (mol/L)

$M_1$  = Masa medida de muestra fresca (g)

$MS$  = Porcentaje de materia seca de la muestra (%)