

PRODUCCIÓN DE LACASA EXTRACELULAR, REMOCIÓN DE FENOLES Y CAFEÍNA POR *Pleurotus spp.* CULTIVADO EN PULPA DE CAFÉ

Nora García Oduardo*, Rosa Catalina Bermúdez Savón*, Christopher Augur**,
Sebastianos Roussos**, Isabelle Perraud-Gaime**

*Centro de Estudio de Biotecnología Industrial (CEBI), **Universidad Paul Cézanne, Marsella, Francia

*Se muestran los resultados del cultivo de seis cepas de **Pleurotus spp.** (cinco de **P. ostreatus** y una de **P. sajor-caju**) sobre pulpa de café en un sistema de fermentación sólida. En este trabajo, se discute la capacidad del hongo de pudrición blanca, **Pleurotus spp.**, para producir enzima lacasa durante su crecimiento sobre pulpa de café, empleando el dispositivo de fermentación sólida aerobia y las columnas de vidrio descritas por Raimbault, a diferentes escalas de fermentación con similar factor gravimétrico de escala: 30 g (pequeña); 150 g (media) y 750 g (grande). Se analiza además, la disminución de los compuestos tóxicos: fenoles totales y cafeína, presentes en la pulpa de café, obteniéndose una relación entre la detoxificación de estos compuestos y la máxima producción de la enzima lacasa. El comportamiento cinético estudiado fue similar en todas las escalas de fermentación, indicando la efectividad del criterio de escala seleccionado.*

Palabras clave: *Pleurotus spp.*, pulpa de café, enzima lacasa, fermentación en estado sólida.

*The results of the cultivation of six strains of **Pleurotus spp.** (five **P. ostreatus** and one **P. sajor-caju**) on coffee pulp by solid state fermentation system are presented. In this work the capacity of white-rot fungi, **Pleurotus sp.**, to produce laccase enzyme during the colonization of coffee pulp was evaluated for solid state fermentation columns described by Raimbault, at different scale-up using similar gravimetric scale factor: 30 g (small); 150 g (medium) and 750 g (large). The loss of toxic components, particularly total phenols and caffeine, was also studied; a relation between detoxification of these compounds and maximum production of laccase enzyme, was observed. The ability to obtain the same results in all the fermentation columns sizes indicates the high potential of the simple scale-up criterion used.*

Key words: *Pleurotus spp.*, coffee pulp, laccase enzyme, solid state fermentation.

Introducción

La lacasa (p-difenol:dioxígeno: óxido-reductasa, EC 1.10.3.2), es una de las pocas enzimas que es objeto de investigación desde principios del siglo XIX/1/, es una multicobre azul oxidasa que cataliza la oxidación unielectrónica de orto y para difenoles y aminas aromáticas, por remoción de un electrón y un protón de un grupo hidroxilo para formar un radical libre. Ésta puede, además, catalizar la ruptura alquil-fenil y C_α-C_β de dímeros fenólicos de la lignina y la demetoxilación de muchos compuestos modelos de la lignina. /2, 3/

La enzima lacasa ha sido empleada de forma inmovilizada para remover compuestos xenobióticos de residuales acuosos /4/, en la detoxificación de compuestos fenólicos en vinos /5/, en la obtención de hidrolizados de ligninocelulosa antes de ser usados para la fer-

mentación alcohólica por *S. cerevisiae* /6/, y se ha reportado su participación en la decoloración de melazas, colorantes /7/ y efluentes coloreados como la vinaza de destilería y el extracto líquido de la cocción de la pulpa de café. /8/

Los hongos de pudrición blanca poseen un sistema multienzimático complejo, del cual la lacasa forma parte, que les permite degradar además de la lignina un gran número de compuestos de estructuras disímiles y complejas. Dentro de estos hongos se encuentra *Pleurotus spp.*, cuyo sistema enzimático ligninolítico se caracteriza por la producción de las enzimas: lacasa, manganeso peroxidasa y veratril alcohol oxidasa, pero no lignina peroxidasa /9/. *Pleurotus spp.* es muy utilizado en zonas tropicales por sus facilidades para crecer sobre una gran diversidad de subproductos agroindustriales, y por la calidad nutritiva y organoléptica de su cuerpo fructífero. /10/

Entre los subproductos agroindustriales más empleados en el cultivo de *Pleurotus* está la pulpa de café, rica en carbohidratos, proteínas y minerales, aunque la presencia de taninos, cafeína y polifenoles limita su utilización y aplicación comercial /11/; por lo que se convierte en un considerable agente contaminante de ríos y zonas aledañas a las despulpadoras de café. Otras alternativas de utilización de la pulpa de café son la fermentación sólida y el vermicompost, las cuales permiten el reciclaje de este subproducto al medio ambiente. /10, 12/

La fermentación en estado sólido (FES) ofrece ventajas sobre la convencional fermentación sumergida al emplear sustratos que pueden actuar simultáneamente, como soportes y fuente de nutrientes a los microorganismos que se cultivan en ellos, reduciendo considerablemente los costos de producción; estos sustratos son heterogéneos, insolubles en agua y de naturaleza compleja, por lo que es necesario convertirlos en sustratos adecuados para que puedan ser utilizados por los microorganismos para la producción de enzimas. /13/

Aunque la FES en columnas de vidrio ha sido muy empleada para los estudios de crecimiento de microorganismos y degradación de compuestos complejos, como los polifenoles, lignina, cafeína en la pulpa de café y otros sustratos, su uso se ha limitado a los de hongos filamentosos /14, 12/, siendo nula la información sobre el cultivo de basidiomicetos a nivel de columnas de FES.

El cultivo comercial de *Pleurotus spp.* sobre pulpa de café a niveles de producción, empleando bolsas plásticas con la finalidad de comercialización de las setas, está siendo cada día más difundido y perfeccionado /10, 15, 16/, lo que requiere intensificar el estudio de los mecanismos utilizados por *Pleurotus spp.*, durante su crecimiento vegetativo para lograr una más efectiva transformación del sustrato, a través de su complejo enzimático, pudiendo ser también a su vez ésta una fuente de obtención de enzimas lacasas.

En el presente trabajo, el objetivo es estudiar la producción de la enzima lacasa por fermentación en estado sólido a diferentes escalas de fermentación, y su relación con la disminución de la concentración de compuestos tóxicos como los

fenoles totales y la cafeína presentes en la pulpa de café, empleando diferentes cepas de *Pleurotus spp.* como biodegradadoras de este subproducto.

Materiales y métodos

Cepas

Se estudiaron seis cepas de *Pleurotus spp.*: *P. ostreatus*, CCEBI 3021, CCEBI 3023 y CCEBI 3073; *P. ostreatus* (var.) Florida, CCEBI 3024 y *P. sajor-caju*, CCEBI 3027, pertenecientes a la colección de cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Universidad de Oriente, Cuba, y *P. ostreatus*, MC 50, procedente de la colección del Colegio de Posgraduados de Puebla, México. Éstas se conservaron en agar papa dextrosa a 25 °C.

Medios de cultivo

Se emplearon tres medios agarizados: agar papa dextrosa (SIGMA); extracto pulpa de café con glucosa y extracto pulpa café sin glucosa /15/. Todos los medios se esterilizaron a 121 °C durante 15 min.

Inóculo

Granos de trigo (*Triticum aestivum L.*) (50 % humedad) previamente esterilizados durante 1 h a 121 °C; posteriormente se inocularon con las cepas en estudio y se incubaron a 25 °C durante 10 d.

Sustrato

Se empleó pulpa de café (*Coffea arábica L.*) seca, molida y tamizada (entre 0,8 y 2 mm), procedente del centro de beneficio húmedo “El Ramón” en el municipio Santiago de Cuba.

Fermentación en estado sólido

Se trabajó a tres escalas de fermentación, empleando factor gravimétrico de escala igual 5: pequeña (30 g), media (150 g) y grande (750 g)

(tabla 1). Los fermentadores consisten en columnas de vidrio /17/ que contenían la pulpa de café húmeda (67 %), éstos se colocaron sobre los humidificadores y se introdujeron dentro del baño

termostatado (figura 1), bajo las siguientes condiciones: temperatura: $25 \pm 0,5$ °C, flujo de aire para cada columna: 2 mL/min/g de sustrato seco y 10 % (peso/peso) de inóculo.

Tabla 1
Descripción de las escalas de fermentación

Escala de fermentación	Dimensiones (cm)		Volumen (mL)		
	Altura	Diámetro	Total	De trabajo	Carga (g)
pequeña	20	2,5	95	65	30
media	30	4,0	350	250	150
grande	20	10,0	1 600	1 600	750

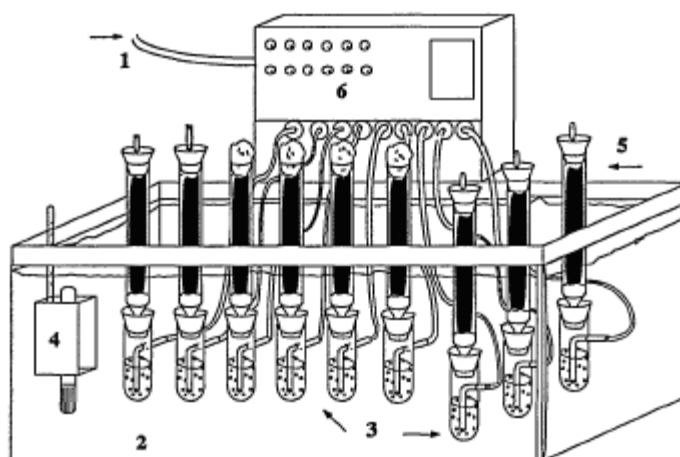


Fig. 1 Dispositivo de fermentación aerobia con columnas de fermentación en estado sólido. 1. Entrada del aire. 2. Baño de agua. 3. Humidificadores. 4. Termostato. 5. Columna de fermentación. 6. Válvulas de control del aire.

Cada columna funcionó independientemente, permitiendo retirar las mismas para tomar las muestras sin desestabilizar el resto del dispositivo. Se llevó la fermentación hasta los 7 d en todas las escalas de fermentación.

Tratamiento de las muestras

Para las escalas de fermentación pequeña y media se tomaron muestras de sustrato húme-

do de cada columna (duplicado para cada determinación): a 10 %: determinación de humedad y análisis de cafeína, b 20 %: extracción con agua y determinación de la actividad lacasa y c 20 %: liofilización y molido antes de la medición de fenoles totales. Para las escalas pequeña y media se tomaron muestras cada día; para la escala grande sólo se tomaron las muestras inicial y después de 7 d de fermentación.

Evaluación cualitativa de la actividad lacasa

Se determinó empleando el 2,2'-azino-bis (3 etilbenzotiazolina-6 ácido sulfónico) (ABTS) 0,2 mol en tampón fosfato citrato (pH 3,30 °C). /18/ Se añadieron dos gotas sobre el micelio de *Pleurotus spp.*, una en el centro y otra en el lateral de la placa, el cambio de coloración de la gota a un verde azul intenso cuando transcurren 7-10 d indicó la presencia de enzima lacasa.

Evaluación cuantitativa de la actividad lacasa

Se utilizó el mismo sustrato que en la determinación anterior, ABTS /3/. La mezcla de ensayo fue: ABTS 2 mmol/L en tampón citrato de sodio 0,1 mol/L (pH 3, 30 °C). La oxidación del ABTS se siguió a través del incremento de la absorbancia a 420 nm ($\epsilon = 36\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La actividad enzimática se expresó en U/g de sustrato seco, y se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de ABTS oxidado, en 1 min bajo las condiciones especificadas.

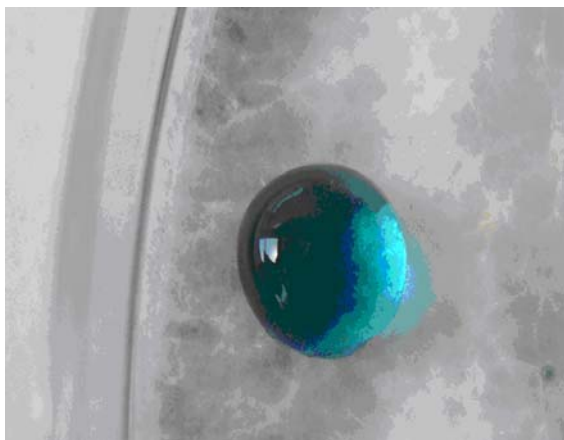
Evaluación del contenido de fenoles totales y cafeína

La concentración de fenoles totales se determinó por el método de Folin-Ciocalteu /19/, y la cafeína, por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), luego de la extracción con agua caliente de las muestras liofilizadas y pulverizadas /20/. Los valores de ambas determinaciones se expresaron en mg/g de sustrato seco.

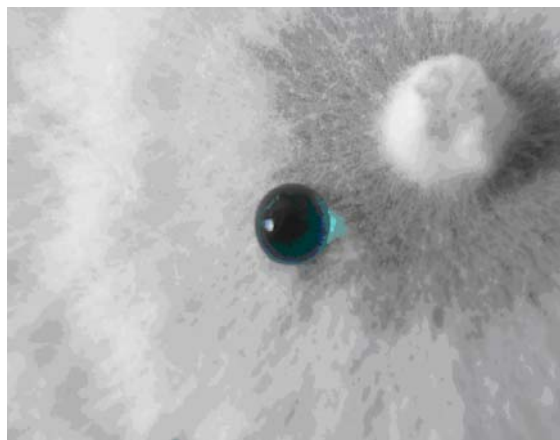
Resultados y discusión

Evaluación cualitativa de la actividad enzimática lacasa

Con el fin de seleccionar entre las seis cepas de *Pleurotus spp.* las mejores productoras de lacasa, se evaluó cualitativamente la actividad enzimática sobre los medios de cultivo agarizados, la coloración es más intensa y aparece con mayor rapidez cuando se añade la gota de ABTS en el centro de la placa, donde existe el micelio más envejecido (figura 2).



A



B

Fig. 2 Actividad lacasa cualitativa sobre micelio de *Pleurotus spp.* crecido sobre extracto de pulpa de café con glucosa, lateral (A) y centro (B)

Se detectó escasa o nula coloración en el medio extracto pulpa café sin glucosa, lo cual pudiera estar asociado con el pobre crecimiento micelial de las cepas

en este medio carente de esta fuente carbonada. En los restantes medios de cultivo la evaluación de la actividad lacasa fue similar para las seis cepas (tabla 2).

Tabla 2
Evaluación cualitativa de actividad lacasa extracelular de las cepas de *Pleurotus spp.* sobre los medios de cultivo a los 10 d de incubación a 25 °C

Cepa	agar papa dextrosa		extracto pulpa de café con glucosa		extracto pulpa café sin glucosa	
	centro	lateral	centro	lateral	centro	lateral
CCEBI 3021	xxx	xx	xx	x	xx	xx
CCEBI 3023	xx	x	xxx	xxx	xx	xx
CCEBI 3024	xxx	xx	xxx	xxx	-	-
CCEBI 3027	xxx	xx	xxx	xx	-	-
CCEBI 3073	xxx	xx	xxx	xxx	xx	xx
MC 50	xxx	xx	xxx	xxx	xx	xx
	x verde azul claro	xx verde azul	xxx verde azul intenso	- no cambio de coloración.		

Fermentación sólida a diferentes escalas

Se llevó a cabo la fermentación sólida con las seis cepas de *Pleurotus spp.* sobre pulpa de café a escala pequeña, seleccionándose dos de ellas

para el estudio cinético de la producción de la enzima lacasa y de la disminución del contenido de polifenoles y cafeína. Todas las cepas desarrollaron micelio y mostraron buen crecimiento durante los 7 d de fermentación (figura 3).

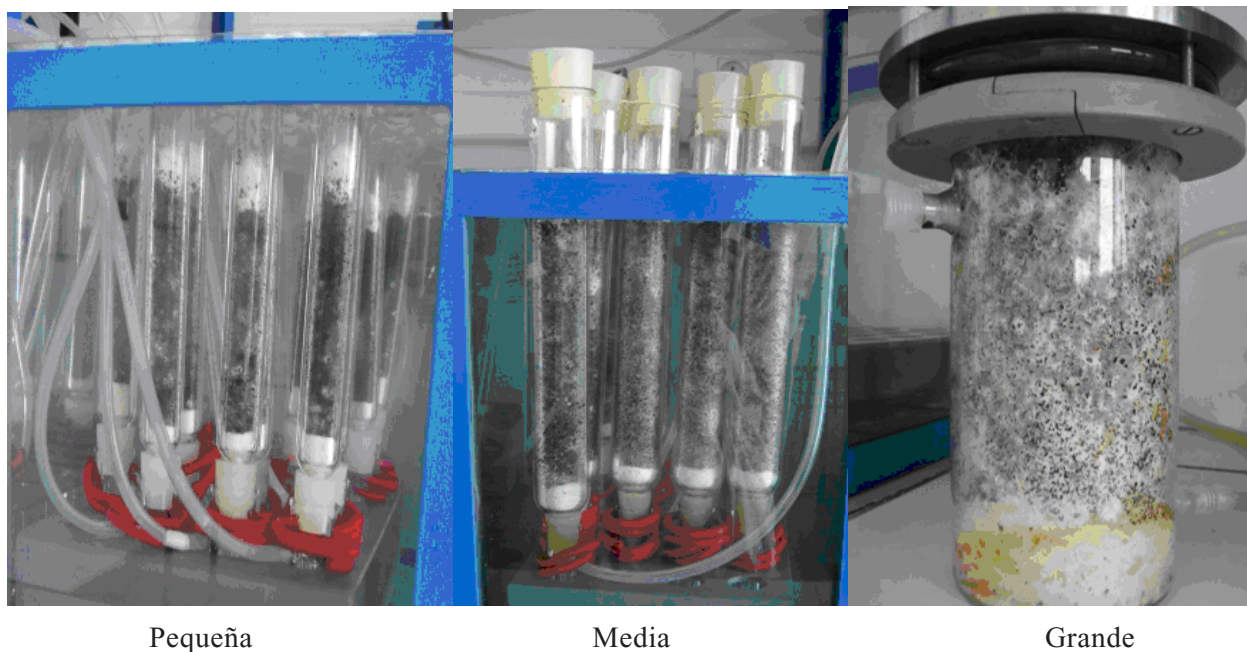


Fig. 3 Columnas FES con micelio de *Pleurotus spp.*

Todas las cepas expresaron actividad lacasa durante los 7 d de fermentación, siendo máximos los valores de actividad entre el segundo y el cuarto día de fermentación, la cepa CCEBI 3023 presentó el mayor valor, 25 U/g, al cuarto

día. El comportamiento cinético de las seis cepas fue muy similar, prácticamente todas expresan máxima actividad y luego tienden a decrecer a partir del tercero o cuarto día (figura 4).

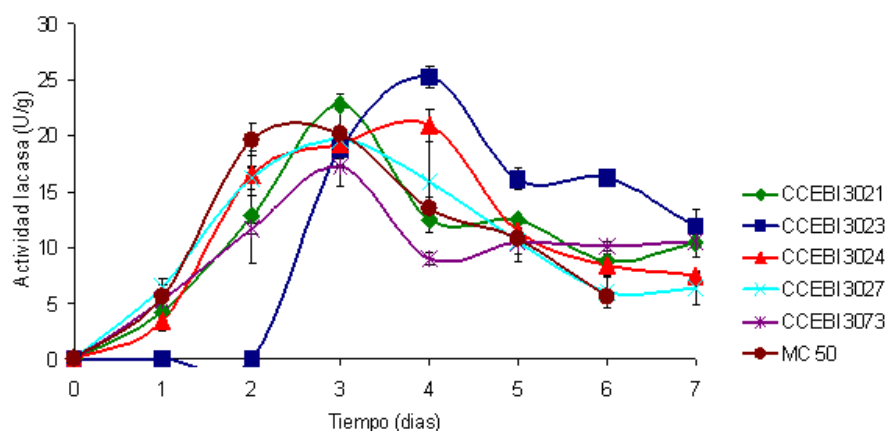


Fig. 4 Cinética de la actividad enzimática lacasa durante el crecimiento de seis cepas de *Pleurotus spp.* (CCEBI 3021, CCEBI 3023, CCEBI 3024, CCEBI 3027, CCEBI 3073, MC 50) sobre pulpa de café a escala pequeña de fermentación.

La cepa CCEBI 3024 ha sido estudiada para decolorar efluentes coloreados como la vinaza de destilería y el procedente de la pasteurización de la pulpa de café (ELP), reportándose valores de actividad lacasa de $8,53 \pm 0,73$ U/mL, a los 9 d de cultivo en este último residual. /8/

Conociendo estos antecedentes y los resultados obtenidos en los medios agarizados y en escala pequeña, se escogieron las cepas CCEBI 3023 y 3024 para continuar los estudios a otras escalas.

La producción de la enzima lacasa está asociada con la morfogénesis de las cepas de *Pleurotus spp.*, debido a que su nivel se incrementa con el crecimiento vegetativo. /2/ Por otro lado /21/, se reporta que la actividad enzimática degradadora de lignina

comienza a incrementarse al final de la fase de crecimiento para luego decrecer rápidamente.

Al estudiar la actividad lacasa en las diferentes escalas de fermentación, el comportamiento es similar al anteriormente descrito, la cepa CCEBI 3023 (líneas azules) expresa valores mayores que la cepa CCEBI 3024 (líneas rojas), volviendo ambas a mostrar decrecimiento en el fin de la fermentación (figura 5). La diferencia entre escalas no es significativa para ambas cepas estudiadas, los máximos valores de actividad se lograron entre el cuarto y sexto día de fermentación para las escalas pequeña y media, esto pudiera deberse a la constancia del flujo de aire. El decrecimiento al séptimo día se manifiesta también en la escala grande (tabla 4).

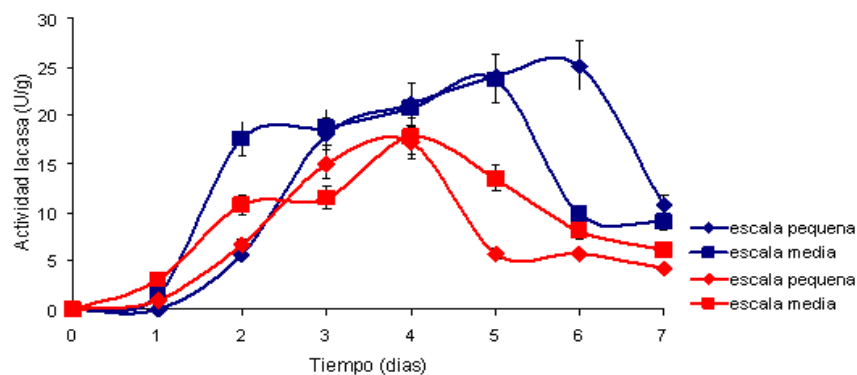


Fig. 5 Actividad enzimática lacasa de las cepas CCEBI 3023 (línea azul) y CCEBI 3024 (línea roja) sobre pulpa de café, con diferentes escalas de fermentación.

Tabla 4
Máxima actividad lacasa producida por las cepas a diferentes escalas de fermentación

Cepa	Escala de fermentación		
	Pequeña	Media	Grande
CCEBI 3023	25,1±0,1(6)	23,7±0,2(5)	3,6±0,1(7)
CCEBI 3024	17,9±0,1(4)	17,2±0,1(4)	12,6±0,1(7)

(Días de fermentación)

Investigadores mexicanos /22/ realizaron un estudio con varias cepas de *Pleurotus spp.*, demostrando que a nivel de bolsa de cultivo (200 g), la actividad lacasa se incrementa desde los ocho primeros días, hasta alcanzar un máximo a los 12 d de cultivo, y luego disminuir, cuando el micelio ha colonizado todo el sustrato, se reportaron valores máximos de 30 U/g en *Pleurotus ostreatus*.

En investigaciones realizadas en nuestra planta de investigación-producción se analiza la producción de enzima lacasa una vez terminada la cosecha de setas *Pleurotus spp.* (60 d de fermentación) sobre la pulpa de café pura y mezclada con diferentes sustratos (datos no mostrados), los valores obtenidos fueron una décima parte de los aquí reportados. También fueron realizados estudios de actividad lacasa con CCEBI 3024, en bolsas plásticas (250 g), evaluando cada 7 d de fermentación el comporta-

miento de la enzima, obteniendo un máximo de 2,41 U/g a los 14 d de cultivo /23/. Con nuestros resultados, se demuestra que la diferencia entre la fermentación con limitación de oxígeno que se desarrolla en las bolsas, y la fermentación con mayor aireación, que ocurre en las columnas de vidrio es un factor que hay que tener en cuenta para la obtención de mayor actividad enzimática lacasa.

Existe una disminución del contenido de fenoles totales del sustrato por las dos cepas estudiadas, en ambas escalas de fermentación, siendo evidente desde las primeras 24 h la disminución de la concentración de estos compuestos tóxicos, y luego durante el resto de los días de la fermentación un nivel casi constante de la concentración. La cepa CCEBI 3024 presentó mayores niveles de remoción (53,07 % de fenoles totales transformados a las 24 h) que la cepa CCEBI 3023 (45,51 %, a las 48 h).

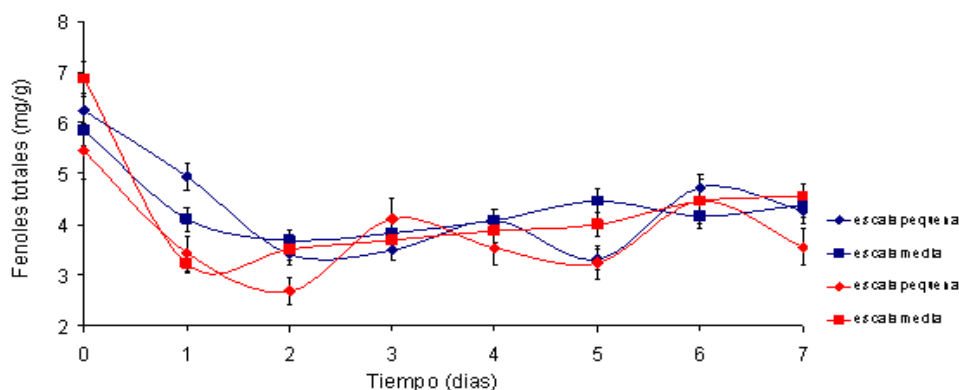


Fig. 6 Remoción del contenido de los fenoles totales durante el crecimiento de las cepas CCEBI 3023 (línea azul) y CCEBI 3024 (línea roja), a diferentes escalas de fermentación.

La disminución máxima de concentración de cafeína se observó al séptimo (último) día estudiado, los valores de remoción de cafeína, indepen-

dientemente de la escala de fermentación, oscilaron entre 15-24 % (tabla 5), similares valores se reportan por Salmones y col. /24/

Tabla 5
Concentración inicial y final de cafeína (mg/g) de la pulpa de café (% de pérdida de cafeína)

Cepa	Escala de fermentación		
	Pequeña	Media	Grande
CCEBI 3023	0,52 y 0,40 (23,4)	0,58 y 0,48 (16,6)	0,54 y 0,41 (22,9)
CCEBI 3024	0,64 y 0,53 (18,5)	0,56 y 0,43 (24,0)	0,51 y 0,44 (15,2)

La disminución de la concentración de los fenoles totales y de la cafeína de la pulpa de café pudiera estar asociada con la producción de la enzima lacasa, la cual puede ser responsable de esta transformación /21, 24/, junto a otras enzimas, que se expresan en menor actividad; se conoce que la pulpa de café está compuesta, entre otros, por lignina y compuestos aromáticos con estructura química semejante a ésta /11/, los cuales son inductores de enzimas lacasas. /1/

Conclusiones

1. Se reporta, por primera vez, el estudio de fermentación en estado sólido de basidiomicetos con columnas de vidrio.
2. Las cepas de *Pleurotus spp.* estudiadas muestran actividad lacasa durante su crecimiento sobre pulpa de café a diferentes escalas de fermentación, siendo la cepa CCEBI 3023 la de mayor actividad en la escala pequeña.
3. Disminuyen las concentraciones de los compuestos tóxicos (con máximos, 53 % para los fenoles totales y 24 % para la cafeína) de la pulpa de café durante la fermentación a diferentes escalas.
4. Los resultados similares, obtenidos en las diferentes escalas, permiten afirmar qué factor de escala gravimétrico seleccionado es adecuado.

Bibliografía

1. Ikehata, K.; Buchanan, I.; Smith, D., "Recent Developments in the Production of Extracellular

- Fungal Peroxidase and Laccases for Waste Treatment", *J Environ Eng Sci.* 3: 1-19, 2004.
2. Leonowicz, A., *et al.*, "Fungal Laccase: Properties and Activity on Lignin", *J. Basic Microb.* 41: 185-227, 2001.
3. Palmieri, G., *et al.*, "A Novel White Laccase from *Pleurotus ostreatus*", *J. Biol Chem.* 272, 31301-31307, 1997.
4. Crecchio, C.; Ruggiero, P.; Pizzigallo, M. D. R., "Polyphenoloxidases Immobilized in Organic Gels: Properties and Applications in the Detoxification of Aromatic Compounds", *Biotechnol Bioeng.* 48, 585-591, 1995.
5. Kersten, P. J., *et al.*, "Comparison of Lignin Peroxidase, Horseradish Peroxidase and Laccase in the Oxidation of Methoxybenzenes", *Biochem J.* 268:475-480, 1990.
6. Jönsson, L. J.; Palmqvist, E.; Nilvebrant, N. O.; Hahn-Hägerdal, B., "Detoxification of Wood Hydrolysates With Laccase and Peroxidase From the White-Rot Fungus *Trametes versicolor*", *Appl Microbiol Biotechnol* 49: 691-697, 1998.
7. Novotny, C., *et al.*, "Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus Ostreatus* for Decolorization of Chemically Different Dyes", *J. Biotechnol.* 89: 113-122, 2001.
8. Rodríguez, S., Decoloración de los residuales de la pasteurización de la pulpa de café y la vinaza por *Pleurotus sp.*, Tesis doctoral, Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Universidad de Oriente, 2006, 107 págs.
9. Cohen, R.; Persky, L.; Hadar, Y., "Biotechnological Applications and Potential of Wood-Degrading Mushrooms of the Genus *Pleurotus*", *Appl Microbiol Biotechnol.* 58: 582-594, 2002.
10. Martínez-Carrera, D., *et al.*, "Commercial Production and Marketing of Edible Mushrooms Cultivated on

-
- Coffee Pulp in Mexico”, Chapter 45 in *Coffee Biotechnology and Quality*; Sera T., Soccol C. R.; Pandey A.; Roussos S. (eds) Kluwer Dordrecht, págs. 471-488, 2000.
11. Bressani, R., “Factores antifisiológicos de la pulpa de café”, in: Braham, J. B. & Bressani, R. (Eds): “Pulpa de café: composición, tecnología y utilización”, International Development Research Center Ottawa, Canadá, 143-152, 1979.
 12. Perraud-Gaime, I.; Saucedo-Castaneda, G.; Augur, C.; Roussos, S., “Adding Value to Coffee Solid Byproducts Through Biotechnology”, in *Coffee Biotechnology and Quality*; Sera, T.; Soccol, C. R.; Pandey, A.; Roussos, S., Eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 437-446. 2000.
 13. Pérez-Guerra, N.; Torrado-Agrasar, A.; Lopez-Macias, C.; Pastrana, L., “Main Characteristics and Applications of Solid Substrate Fermentation”, *Electron J Environ Agric Food Chem* 2 (3). 343 - 350, 2003.
 14. Viniestra-González, *et al.*, “Advantages of Fungal Enzyme Production in Solid State Over Liquid Fermentation Systems”, *Biochem Eng J.* 13.157–167, 2003.
 15. Bermúdez, R. C.; García, N.; Murlot, A., “Fermentación sólida para la producción de *Pleurotus sp.* sobre mezclas de pulpa de café y viruta de cedro”, en *Revista Tecnología Química*, vol. XXVII, No. 2, 2007, págs. 55-62.
 16. García, N.; Bermúdez, R. C.; Gross, P.; Hernández, M., “Cultivo de cepas de *Pleurotus sp* sobre pulpa de café”, *Rev. Mex Micol.* 23: 99-101, 2006.
 17. Raimbault, M.; Alazard, D., “Culture Method to Study Fungal Growth in Solid Fermentation”, *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*, 9:199–209, 1980.
 18. Velazquez-Cedeño, M. A., Compétition entre *Pleurotus ostreatus* et *Trichoderma sp.* en Culture sur Paille de Blé: role des Communautés Bactériennes du Substrate et des Laccases de *Pleurotus*, Tesis doctoral Universidad Paul Cezanne, Francia, 165 págs. 2005.
 19. Barlocher, F.; Graca, M. S. A., “Total Phenolic”, Chapter 14, in *Methods to Study Litter Decomposition: A Practical Guide*, M. S. A. Graca, F. Barlocher, M. O. Gessner (eds.) Springer. Printed in the Netherlands, 97-100, 2005.
 20. Kreiser, W. R.; Martin, R. A. Jr., “High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Theobromine and Caffeine in Cocoa and Chocolate Products”, *JAOAC*, 61 (6): 1424-1427, 1978.
 21. Mata, G., Murrieta-Hernandez D. M.; Iglesias-Andreu, L. G., “Changes in Lignocellulolytic Enzyme Activities in Six *Pleurotus spp.*”, Strains Cultivated On Coffee Pulp in Confrontation with *Trichoderma spp*”, *World J Microbiol Biotechnol* 21: 143–150, 2005.
 22. Salmones, D.; Mata, G., “Detection of Extracellular Enzymes Produced by *Pleurotus spp.* Grown on Coffee Pulp”, Proceedings of the Fourth International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products. Sánchez *et al.* (eds). UAEM. ISBN 968-878-105-3, págs. 213-219, 2002.
 23. Kourouma, A., Obtención de lacasas de *Pleurotus sp.* en residuales del café, Tesis de Master en Biotecnología, Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Universidad de Oriente, 2007, 42 págs.
 24. Salmones, D.; Mata, G.; Waliszewski, K. N., “Comparative Culturing of *Pleurotus spp.* on Coffee Pulp and Wheat Straw: Biomass Production and Substrate Biodegradation”, *Biores Technol* 96: 537-544. 2005.