

## Table des matières

|   |           |
|---|-----------|
| <b>TABLE DES MATIERES</b> .....   | <b>1</b>  |
| <b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b> .....  | <b>2</b>  |
| <b>I. INTRODUCTION</b> .....  | <b>3</b>  |
| <b>II. TRAVAUX SCIENTIFIQUES REALISES</b> .....                             | <b>4</b>  |
| 2.1.    SELECTION DE SOUCHES .....  | 4         |
| 2.2.    DESIGN ET REALISATION DES SILOS .....                               | 5         |
| 2.3.    REALISATION D'ENSILAGE A GRANDE ECHELLE.....                        | 6         |
| 2.4.    CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE ET MICROBIENNE DES ENSILAGES ..... | 6         |
| 2.5.    MISE AU POINT D'UN MILIEU DE CULTURE ET PRODUCTION D'INOCULUM ..... | 8         |
| <b>III. TRAVAUX DE FORMATION</b> .....                                      | <b>8</b>  |
| <b>IV. DIVULGATION SCIENTIFIQUE</b> .....                                   | <b>9</b>  |
| <b>V. CONCLUSIONS</b> .....   | <b>9</b>  |
| <b>VI. REFERENCES</b> .....   | <b>10</b> |
| <i>ANNEXES</i> .....  | <b>I</b>  |

## Table des illustrations

|  |   |
|--|---|
| <u>Fig. 1</u> : Détermination par HPLC des profils fermentatifs des 15 souches présélectionnées..... | 4 |
| <u>Fig. 2</u> : Photos des silos (vue d'ensemble).....   | 5 |
| <u>Fig. 3</u> : Photo du système d'inoculation (a) et d'un silos préparé (b).....                    | 6 |

## I. Introduction

Mon travail en tant que Coopérant au Service National à l'Étranger s'est inscrit dans le programme de valorisation de la pulpe de café qui a débuté en 1987 lorsque des chercheurs de la UAM-Iztapalapa et de l'IRD se sont intéressés aux moyens biotechnologiques permettant l'élimination des composés toxiques de la pulpe de café. A l'heure actuelle, ce programme bénéficie d'un support financier dans le cadre d'un projet de recherche européen (BIOPULCA # IC18\*CT970185) regroupant la France (IRD), l'Angleterre (Université de Reading), le Brésil (Université Fédérale du Parana) et le Mexique (Université Autonome Metropolitaine-Iztapalapa).

La pulpe de café, qui représente plus de 40 % du fruit frais (Tauk, 1986), est actuellement sous utilisée et au contraire constitue un déchet posant de graves problèmes de pollution organique (Adams *et al.*, 1981). Pourtant sa composition riche en carbohydrates et en protéines (Zuluaga *et al.*, 1975) laisse envisager de nombreuses valorisations pour ce sous-produit de l'industrie cafeeière très développée dans de nombreux pays du sud. Les différentes applications étudiées par les différents partenaires du projet BIOPULCA sont l'alimentation animale, le lombricompostage, la culture de champignons comestibles et la production d'enzyme à potentiel agro-industriel. Néanmoins, la forte humidité (80-85%) et la composition riche de la pulpe de café induisent une forte croissance microbienne et une rapide décomposition aérobie. Il est donc primordial de développer un système de conservation pour la pulpe de café avant d'envisager toute extrapolation. Étant destiné au milieu agricole de pays en voie de développement ou émergents, ce procédé se doit d'être simple et peu coûteux.

Le volet de conservation de la pulpe de café par fermentation lactique (ensilage) m'a été plus particulièrement confié lors de mon CSNE au Mexique au sein de la UAM-Iztapalapa sous la direction d'Isabelle Gaime-Perraud chercheur IRD. L'ensilage est un procédé, connu en zones tempérées, de conservation de substrats très divers (fourrages, sous-produits du maïs, déchets de poissons ou de viande...) par une fermentation lactique anaérobie. En effet, les pH acides obtenus grâce à la production d'acides organiques par les bactéries lactiques et les conditions d'anaérobiose préviennent tout développement de la flore responsable de la putréfaction du substrat. Ce procédé présente les avantages d'être très peu coûteux, simple d'utilisation. De plus, l'utilisation de ferments lactiques ne représente aucun danger de santé humaine ou de pollution environnementale.

## II. Travaux scientifiques réalisés

- Mes principales tâches ont été :
- sélection de souches intéressantes pour le processus d'ensilage,
  - design et fabrication de silos à l'échelle agro-industrielle,
  - réalisation d'ensilages à grande échelle,
  - caractérisation physico-chimique et microbienne des ensilages réalisés.
  - mise au point d'un milieu de culture et production d'inoculum,

### 2.1. Sélection de souches

Dans le but de privilégier la fermentation lactique de la pulpe de café et ainsi d'optimiser et garantir les qualités de l'ensilage, la pulpe est inoculée avec des bactéries lactiques. A partir des carbohydrates du substrat, ces microorganismes vont produire majoritairement de l'acide lactique et divers acides organiques (Ac. acétique, Ac. propionique...) qui vont abaisser le pH du substrat et inhiber la croissance de microorganismes indésirables.

Avant mon arrivée sur le projet, 100 bactéries ont été isolées à partir d'ensilage naturel de pulpe de café et leur profil fermentatif sur milieu commercial MRS (dont la composition apparaît en annexe 1) a été déterminé par trois étudiants mexicains. A partir de cette collection, j'ai alors sélectionné 15 souches (critères de sélection : forte production d'acides organiques et pas de production d'éthanol) et confirmé leurs profils. Pour cela, les souches ont été cultivées 24 et 48 h sur milieu MRS et la consommation en sucres (glucose et fructose) ainsi que la production en acide lactique, Ac. propionique, Ac. acétique, Ac. butyrique et éthanol ont été déterminées par HPLC.

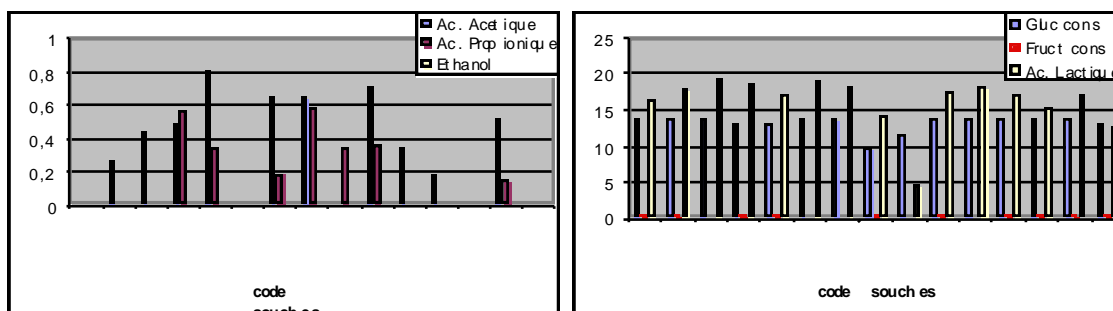


Fig. 1 : Détermination par HPLC des profils fermentatifs des 15 souches présélectionnées

A partir de ces résultats, j'ai sélectionné deux souches pour la formation des inoculums destinés aux ensilages. La première, *Lactobacillus plantarum*, est la bactérie qui produit la plus grande quantité d'acide lactique. Cette caractéristique nous intéresse pour obtenir une forte mais aussi rapide chute de pH. La seconde souche, *Pediococcus pentosaceus*, produit elle les plus grandes quantités d'acide propionique connue pour son action antibiotique (Haikara et al., 1994).

## 2.2. Design et réalisation des silos

Afin de tester la faisabilité pratique et économique du process d'ensilage, des silos à l'échelle agro-industrielle ont été dessinés et fabriqués. Ces silos doivent répondre aux caractéristiques suivantes :

- coût minimum,
- simple d'utilisation (remplissage et disponibilité de la pulpe),
- robustesse,
- garantie des conditions d'anaérobiose.
- isolement des eaux de pluies,
- isolement du sol.

En respect à ces critères, j'ai opté pour des silos de type horizontal, constitué d'une dalle de béton et de trois murs d'une hauteur de 1.70 m. Le sol possède une inclinaison permettant l'écoulement des jus de fermentation jusqu'à une canalisation d'égout. La largeur des silos permet l'accès des camions de charge utilisés pour transporter la pulpe. Chaque silos peut être compartimenté afin de réaliser les différents essais d'inoculum nécessaires à l'étude scientifique. L'anaérobiose est assurée par un film plastique déposé sur la pulpe est maintenue par des poids (similaire au modèle utilisé en France pour les ensilages de Maïs). Enfin, l'isolement de la pluie est obtenu par une bâche tendue sur l'ensemble des silos.

Les silos ont été réalisés sur le terrain de la société partenaire '**Terranova lombricultores**' située à Coatepec dans l'état du Veracruz. Ce site a été choisi pour sa proximité de notre source de pulpe (5 km) et parce qu'il s'agit d'un site majeur d'utilisation de la pulpe ensilée.



Fig. 2 : Photos des silos (vue d'ensemble)

### 2.3. Réalisation d'ensilage à grande échelle

La réalisation des ensilages à une échelle agro-industrielle nous a permis d'une part de tester la faisabilité d'un tel procédé appliqué à la pulpe de café mais également de nous fournir du matériel en quantité suffisante pour les autres aspects du projet BIOPULCA (lombriculture, detoxification, croissance de champignons comestibles, production d'enzymes...).

Quatre types d'ensilages d'environ 4t ont été réalisés afin de tester différentes conditions : - sans inoculation (naturel) servant de contrôle,  
- inoculation avec la souche *Lactobacillus plantarum* (L08),  
- inoculation avec la souche *Pediococcus pentosaceus* (L20)  
- inoculation avec un mélange de la souche *Lactobacillus plantarum* et de la souche *Pediococcus pentosaceus* (L08-L20).

Chaque ensilage a été réalisé en double afin d'obtenir une répétabilité nécessaire à toute étude scientifique.

La pulpe a été fournie par le « beneficio » de **Miguel Cervantes** (Coatepec, Ver, Mex.). A la sortie du dépulpeur, la pulpe est acheminée à l'aide d'un tapis roulant jusqu'au camion de transport. Au passage, la pulpe a été inoculée par un

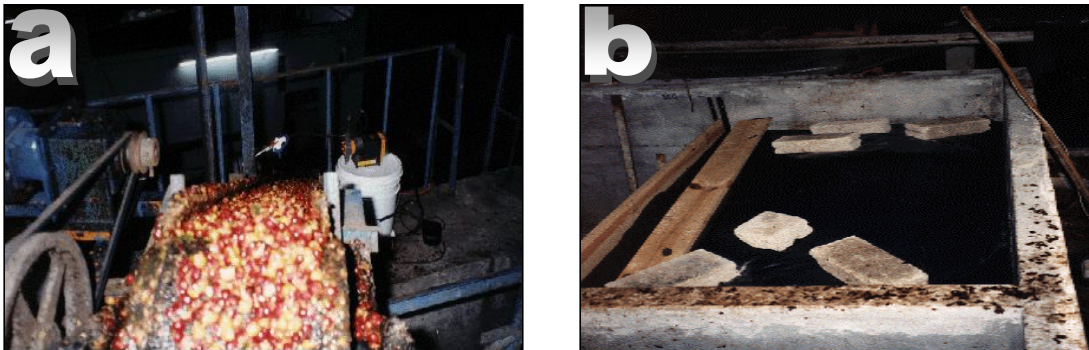


Fig. 3 : Photo du système d'inoculation (a) et d'un silos préparé (b).

système d'aspersion (Fig. 3.a) permettant une inoculation homogène. Une fois le camion rempli, le substrat a été alors acheminé sur le site d'ensilage et les silos ont été alors préparés (Fig. 3.b).

### 2.4. Caractérisation physico-chimique et microbienne des ensilages

Des échantillons de chaque silos ont été prélevés après 0, 1, 2, 3, 5, 10, 15, 30, 60, 90 jours de fermentation et ont été immédiatement congelés. A cette occasion, la température ainsi que la hauteur des silos ont été relevés. Au laboratoire, deux fois 10g de chaque échantillon ont été suspendus dans 90 ml d'une solution d'eau distillée et tween 80 (1ml/l) et la suspension obtenue a été alors broyée. Ce broyat a été utilisé pour la mesure de pH, comme solution mère pour l'étude microbiologique, et, après centrifugation le surnageant a été conservé pour l'étude biochimique par HPLC.

Les résultats obtenus sont présentés en annexe 2. Le premier fait remarquable de ces résultats est l'absence de différences très significatives entre les quatre type d'ensilages testés. Ceci peut facilement s'expliquer par la faible concentration en bactéries des inoculum testés qui n'ont pas réussi à dominer la microflore endogène de la pulpe de café. En effet, ceci est confirmé par le graphique de l'étude microbiologique qui montre peu de différence entre les populations bactériennes au début de la fermentation. Nous pouvons donc conclure que cette expérience a été la répétition de 8 ensilages naturels (sans inoculum) de pulpe de café.

Malgré cette erreur, les résultats nous donnent des informations précieuses ; Dans un premier temps, la température augmente puis se stabilise à 25-27°C. Cette hausse de température peut s'expliquer par une activité aérobie qui s'exprime dans le laps de temps nécessaire à l'instauration des conditions acides et anaérobies de l'ensilage. Dans les trois premiers jours, les silos subissent une perte de hauteur de 35% en moyenne puis se stabilisent. Une telle perte de volume peut être attribuée à la compactation naturelle de la pulpe mais aussi à une perte de matière sèche due à une putréfaction aérobie. Au troisième jour de fermentation, la pulpe de café atteint des valeurs de pH inférieures à 4.0 et reste stable durant les trois mois d'étude. Ceci indique que le produit est stabilisé dans un temps assez court pour prévenir une détérioration anaérobie trop importante (Mc Donald *et al.*, 1991). L'acide lactique est rapidement produit (moins de trois jours) à environ 10-14 % de matière sèche (MS) ce qui explique la chute de pH observée. La présence d'acide acétique à 4-7 % (MS) peut être attribuée à une fermentation hétérolactique par la flore endogène de la pulpe de café. La production d'acide propionique reste très hétérogène et toujours inférieure à 2 % (MS) ce qui confirme la faiblesse de notre inoculum dans le cas des ensilages L20 et L08-L20. Une production d'éthanol, due à l'activité aérobie résiduelle des levures notamment, peut s'observer au début de la fermentation. Comme le reporte la littérature (Perraud-Gaime, 1995), la microflore endogène est très élevée (bactéries :  $10^8$ UFC/g MS ; levures :  $10^6$ UFC/g MS) dans la pulpe de café fraîche. Cependant, dans les trois premiers jours les populations bactériennes et levuriennes sont respectivement réduites à  $10^5$ - $10^6$  UFC/g MS et  $10^2$ - $10^3$ UFC/g DM. Ceci peut être expliqué par l'action combinée du pH, de l'anaérobiose et des propriétés antibiotiques des acides organiques produits.

En conclusion, durant cette expérience d'ensilage de pulpe de café, la fermentation lactique s'est instaurée assez rapidement pour abaisser le pH en moins de trois jours. Ces conditions acides, associées à l'anaérobiose du silos, ont conduit à une inhibition rapide de la flore endogène du substrat. Néanmoins, pendant les trois jours nécessaires à la stabilisation du produit, plusieurs signes de dégradation aérobie ont été observés (augmentation de la température, perte de matière sèche, formation d'éthanol). Dans le but de limiter cette activité aérobie qui peut être nocive pour les futures applications de la pulpe ensilée, il serait intéressant de tester l'action d'inoculum constitués de bactéries lactiques. Ces « starters » permettraient en effet de contrôler la microflore endogène et ainsi garantir les qualités des ensilages. De plus, ces bactéries lactiques produiraient de plus grandes quantités d'acides



organiques conduisant à un effet antibiotique plus important pouvant réduire l'activité aérobie initiale. Cette hypothèse sera vérifiée durant la prochaine saison de café (Novembre à Mars).

### **2.5. Mise au point d'un milieu de culture et production d'inoculum**

Pour inoculer les grandes quantités de pulpe de café, les volumes d'inoculum utilisés sont très importants (de l'ordre de la dizaine de litres). Il est donc indispensable de mettre au point un milieu de culture économique et une technique de culture optimale.

Ce travail a été confié à une étudiante en « servicio social » (projet de fin d'étude d'ingénieur) placé sous ma responsabilité. La méthodologie mise en œuvre est un test de croissance des deux souches utilisées en tubes de 10 ml en présence de différentes sources de carbone et protéines économiques (farine de soja, liqueur de maïs...). Le taux de croissance des microorganismes sur les différents milieux est comparé à celui obtenu sur le milieu commercial M.R.S. utilisé comme référence.

Une fois le milieu de culture sélectionné selon les critères de croissance mais aussi de coup, les conditions de cultures (aération, agitation, température, pH...) seront optimisées dans un réacteur de 5 litres.

## **III. Travaux de Formation**

La présence directe des agents IRD au sein des laboratoires et équipes de recherches partenaires permet de fournir une formation supplémentaire aux étudiants locaux.

Dans cette idée, en Juin 2000 il m'a été confié l'encadrement d'une étudiante de « servicio social ». En effet, en fin d'étude d'ingénieurs les étudiants mexicains doivent effectuer un travail en laboratoire permettant d'appliquer les cours théoriques. Ce type de stage dure environ un an et doit faire l'objet d'un rapport décrivant le travail réalisé. Cette étudiante a donc été placée sur la mise au point d'un milieu de culture et la production d'inoculum. Les techniques suivantes lui seront donc enseignées :

- dénombrement en boîtes de Petri,
- mesures spectrophotométriques,
- détermination de biomasse par gravimétrie,
- utilisation d'un réacteur de fermentation en continu,

A l'occasion d'un cours de fermentation en milieu solide (FMS) organisé par le laboratoire, il m'a été demandé d'encadrer un groupe de 5 étudiants durant la partie pratique du cours. Durant deux jours, il s'agissait de leur enseigner les différentes techniques employées et de leur porter assistance pour le traitement et l'interprétation des résultats obtenus. De plus, j'ai donné une conférence de 45 min. sur les applications de la Fermentation en milieu solide (titre : FMS con bacterias lacticas : El caso del ensilaje, annexe 3).



## IV. Divulgence scientifique

Toute investigation scientifique n'est utile que si elle est soumise à évaluation et divulguée à la communauté scientifique. Ainsi, la présentation des travaux à des congrès de biotechnologie et la parution d'articles dans les revues spécialisées est indispensable.

Projet d'articles : au moment de la rédaction de ce rapport, deux projet d'articles sont en cours de rédaction, l'un portant sur l'étude et la sélection des souches de bactérie lactique et l'autre sur la faisabilité d'ensilages de pulpe de café à grande. Dans un second temps, les résultats sur l'influence des inoculums pourraient fournir matières à un ou deux articles supplémentaires.

Participation à des congrès : • Symposium de biotechnologia-UPIBI 2000 (annexe 4). Ce congrès international organisé par l'Institut Polytechnique National du Mexique réunira du 24 au 29 septembre des scientifiques mexicains et étrangers autour des nouvelles applications de la biotechnologie. Adresse URL : <http://www.upibi.ipn.mx>

• Army's Army 4<sup>th</sup> international symposium on industrial microbiology (annexe 5). Ce congrès réunira du 1<sup>er</sup> au 3 Mars 2001 à merida (Yucatan, Mex.) les anciens étudiants et partenaires du Pr. Arnold L. Demain du Massachusetts Institute of Technology (Cambridge, USA) pour exposer leurs travaux. Adresse URL : [http://arnys\\_army.biomedicas.unam.mx](http://arnys_army.biomedicas.unam.mx)

• Troisième congrès BIOPULCA. Cette réunion qui se déroulera en Avril 2001 à Xalapa (Veracruz, Mex.) permettra à tous les acteurs du projet BIOPULCA de présenter leurs travaux et de confronter leurs idées sur les différents volets du projet.

## V. Conclusions

Durant les 11 premiers mois de mon CSNE, au sein du projet BIOPULCA, mon travail s'est concentré sur la réalisation d'ensilage de pulpe de café à l'échelle agro-industrielle. Ce travail a regroupé une sélection de souches lactiques, la construction des silos, la préparation des ensilages et un suivi de trois mois de leurs caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques. Les résultats ont démontré que l'ensilage de pulpe de café est un process absolument viable et applicable au milieu caféier du Mexique. Néanmoins, pour un problème d'inoculum, l'influence des inoculums n'a pu être testée. Au cours de la prochaine saison de café (Novembre à Mars), l'expérience sera renouvelée avec des inoculums plus concentrés en bactéries afin d'optimiser les qualités de la pulpe de café ensilée.

De plus, le rôle de formation dû à tout agent IRD en poste dans un pays émergent a été assuré par l'encadrement d'une étudiante et la participation à un cours de fermentation en milieu solide.

Enfin, la divulgation des travaux scientifiques sera obtenue par la participation à divers congrès de biotechnologie et la rédaction d'articles scientifiques.

## **VI. Références**

- Adams, M. R. and J. Dougan, 1981, *Trop. Sci.*, **23**, 177-196.
- Haikara, A. and M-L. Niku-Paavol, 1994, VTT Biotechnology and Food Research, Espoo, Finland.
- Mc Donald, P., A. R. Henderson, and S. J. E. Heron, 1991, 2<sup>nd</sup> ed., Chalcombe Publications, Marlow, England. 340 pp.
- Perraud-Gaime, I., 1995, PhD thesis, Université de Montpellier II, France.
- Tauk, S. M., 1986, *Turrialba*, **36** (3), 271-280.
- Zuluaga, J., C Bonilla and R. M. Quijano, 1975, 7<sup>ème</sup> Col. Intern. Quam. Café, Hamburg, ASIC Ed., Paris, 233-242.

# *Annexes*

|                       |  |
|-----------------------|--|
| <i>Annexe 1</i> ..... | <i>Composition du milieu MRS</i>   |
| <i>Annexe 2</i> ..... | <i>Suivie physico-chimique et microbiologique des<br/>ensilages de pulpe de café</i> |
| <i>Annexe 3</i> ..... | <i>Cours de fermentation en milieu solide</i>  |
| <i>Annexe 4</i> ..... | <i>Résumé du travail présenté au congrès UPIBI-IPN<br/>2000.</i>                     |
| <i>Annexe 5</i> ..... | <i>Résumé du travail présenté au congrès Army's army.</i>                            |

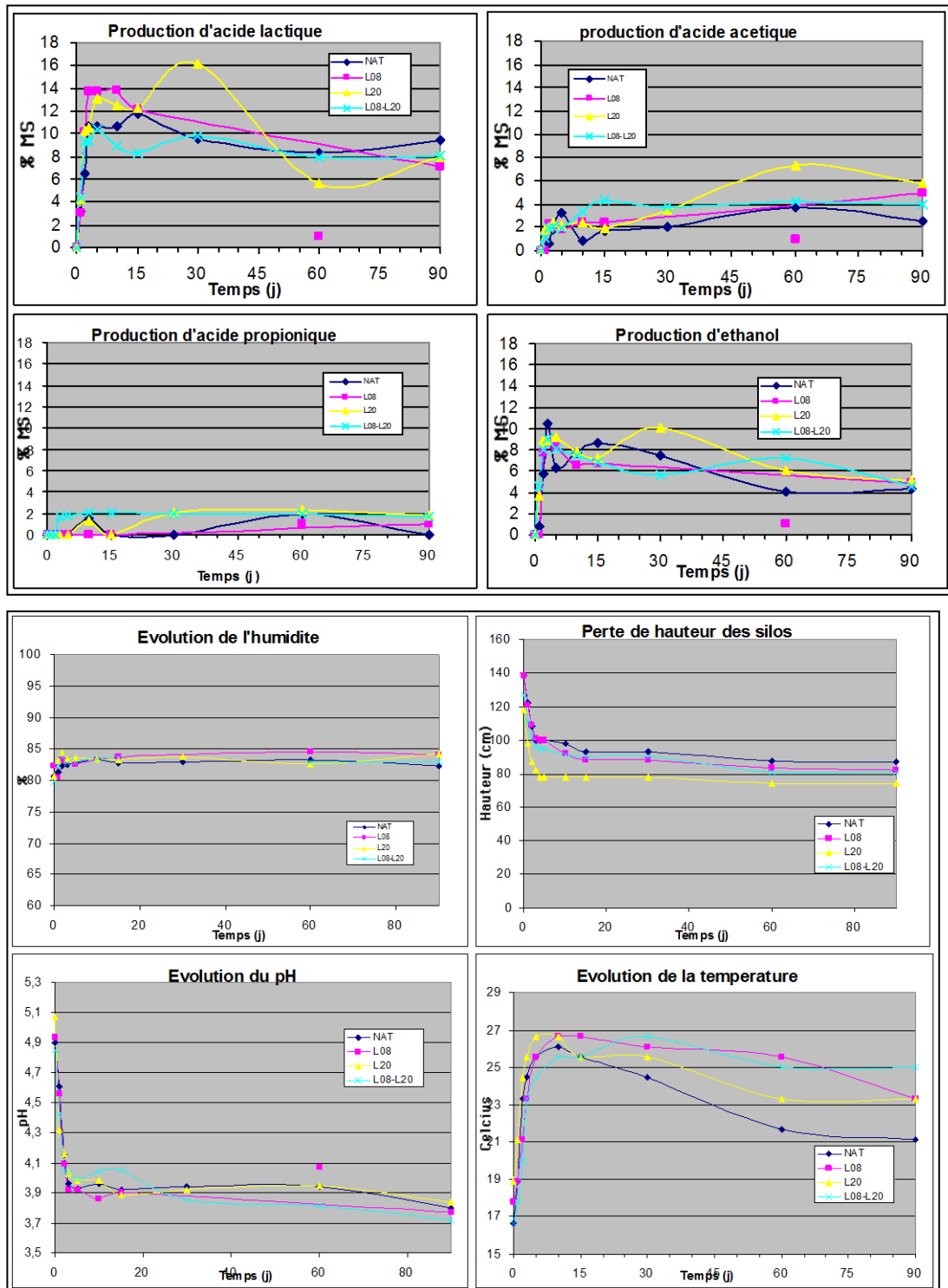
## Annexe 1

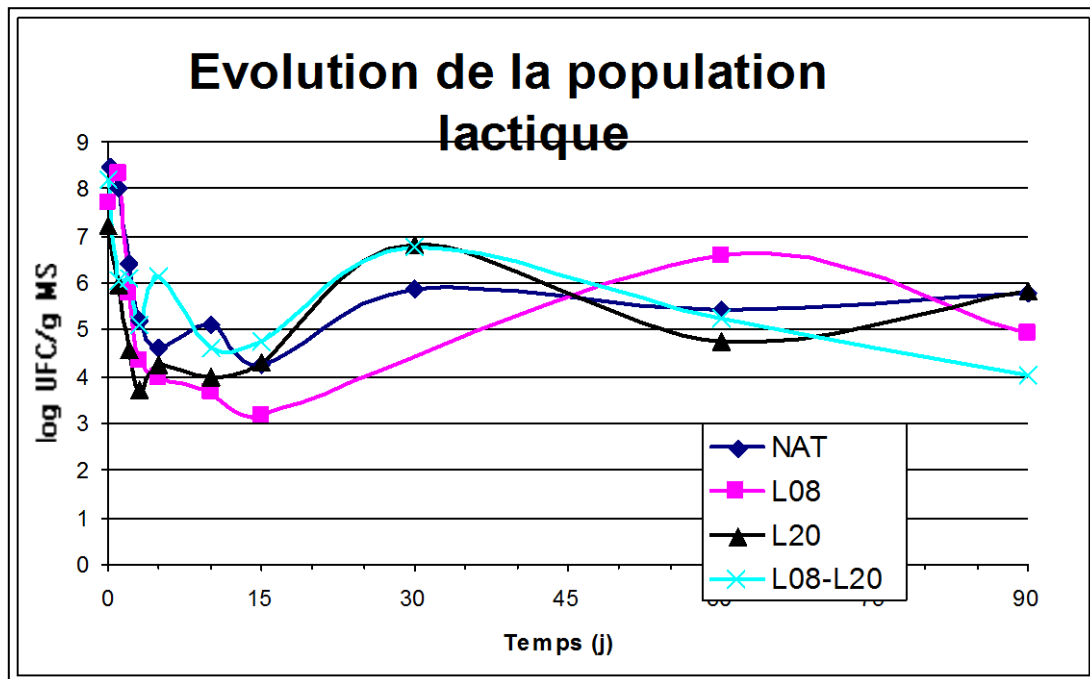
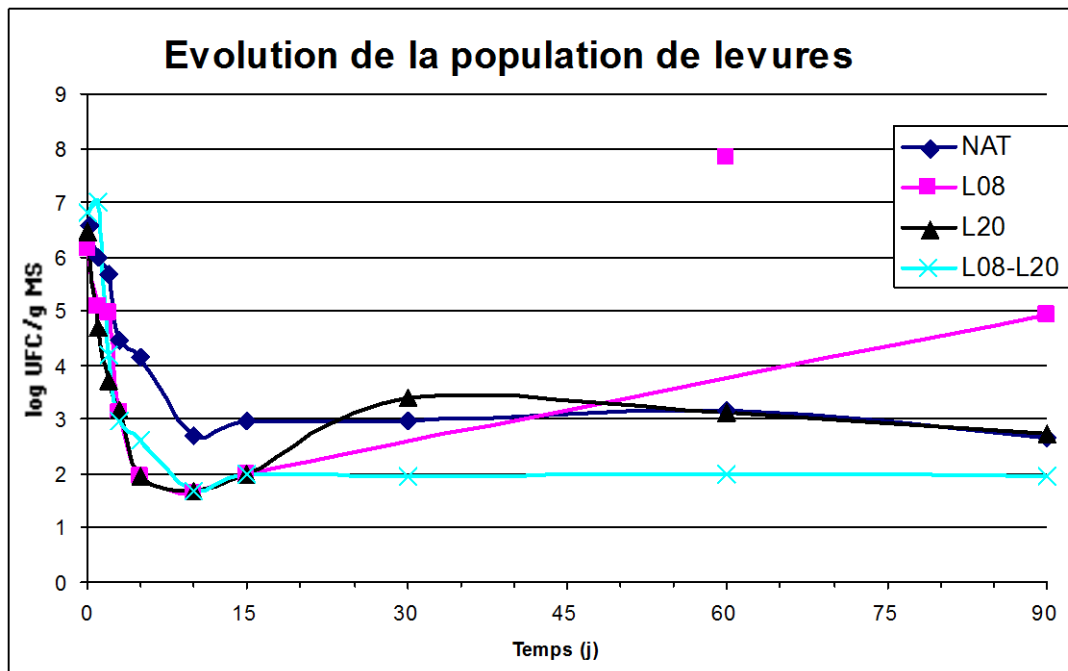
Composition en g/l du milieu « Lactobacilli MRS broth » (DIFCO, Sparks, MD, USA) :

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| Bacto Proteose Peptone n°3..... | 10.00 g |
| Bacto Beef Extract.....         | 10.00 g |
| Bacto Yeast Extract.....        | 5.00 g  |
| Bacto Dextrose.....             | 20.00 g |
| Polysorbate 80.....             | 1.00 g  |
| Ammonium Citrate.....           | 2.00 g  |
| Sodium Acetate.....             | 5.00 g  |
| Magnesium Sulfate.....          | 0.10 g  |
| Manganese Sulfate.....          | 0.05 g  |
| Dipotassium Phosphate.....      | 2.00 g  |

pH final 6.5 ±0.2

## Annexe 2





### Annexe 3

#### FMS con bacterias lacticas : El caso del ensilaje

Jean-Philippe Carralot<sup>1</sup> y Dra Isabelle Gaime-Perraud<sup>2</sup>

Institut de Recherche pour le Développement

Calle Ciceron # 609, Col. los Morales, 11530 Mexico D.F

e-mail : <sup>1</sup>[jcarralo@yahoo.fr](mailto:jcarralo@yahoo.fr), <sup>2</sup>[isa@xanum.uam.mx](mailto:isa@xanum.uam.mx)

La industria agricola produce muchos desechos que todavia presentan altas cantidades de compuestos tales como proteinas, fibras y carbohidratos entre otros, que les dan un caracter de productos con valor agregado. A menudo, estos sub-productos se echan a perder por su caracter temporal o perecedero. El ensilaje representa una buena manera de conservar estos residuos hasta su utilización ulterior. Por ejemplo, los desechos pueden guardarse hasta el invierno cuando las fuentes de alimento para el ganado son mas escasas.

El proceso de ensilaje presenta los siguientes ventajas :

- proceso sencillo,
- inversion minima,
- baja mano de obra y mantenimiento,
- conserva altas cantidades de materia seca y proteinas.

El principio del ensilaje es una inhibición de la microflora putrefacta (hongos, levaduras, clostridios...) por efecto combinado del pH, de la anaerobiosis y de acidos organicos. En consecuencia, el proceso tipico se basa en poner lo mas rapidamente posible el producto en anaerobiosis (en silos verticales, horizontales o en costales de plastico) para favorecer la microflora *lactica* (*Lactobacillus plantarum*, *pediococcus*...). Estos microorganismos fermentan la azucars reductores en acidos lactico, acetico y propionico resultando en una baja rapida del pH a valores de 3-4. A menudo, esta fermentación lactica esta asegurada con la adición de un inoculo ( $10^6$  b/g materia seca).

Un resultado similar podria ser obtenido por la adición de acidos o de antibioticos. Sin embargo, la fermentación lactica presenta diversas ventajas :

- precio muy bajo,
- utilización sencilla y sin peligro (en contraparte a la manipulación de acidos concentrados)
- propiedades anti-fungicas de los acidos organicos producidos por fermentación que no se encuentran con los acidos inorganicos.

El ensilaje de pulpa de cafe constituye un buen ejemplo de aplicación de este proceso. La pulpa de cafe es un desecho de la industria del cafe que representa 40 % del total de la cantidad de fruta de cafe procesada para la obtention del grano verde; lo que



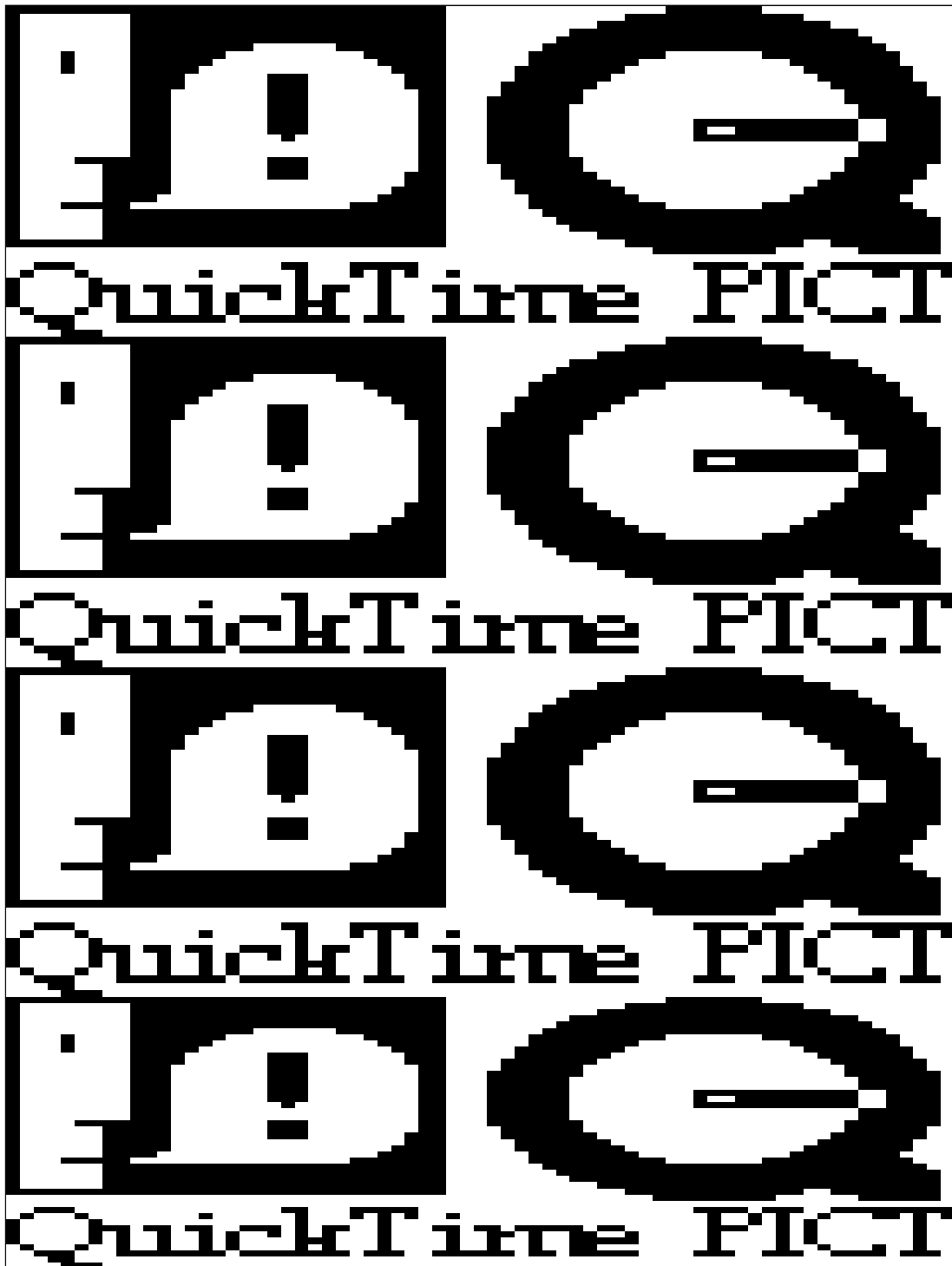
representa un serio problema de contaminación ambiental. Además, esta producción de desecho se concentra en los 5 meses de la cosecha. Sin embargo, este sub-producto presenta altas valores nutritivos. En este caso el ensilaje puede representar una solución atractiva para valorizar este desecho ofreciendo al productor una manera fácil de conservar el producto involucrando bajo costo y mano de obra.

Varios ensayos realizados en el marco del proyecto BIOPULCA nos demuestran que la pulpa consiste un producto muy adaptado al proceso de ensilaje. La pulpa contiene altos niveles de carbohidratos (necesarios para la fermentación láctica) y su tamaño permite un acceso sencillo a las bacterias lácticas.

Una vez conservada, la pulpa de café se puede usar para diversas aplicaciones :

- producción de hongos comestibles (pleurotus),
- lombricultura,
- alimentación del ganado.





Annexe 4



## Annexe 5

### Microbiological and physico-chemical characterisation of coffee pulp silage

Carralot<sup>1,3</sup> J. P., Aranda Delgado<sup>2</sup> E., Saucedo Castañeda<sup>3</sup> G., Gaime-Perraud<sup>1,3</sup> I.,

<sup>1</sup>Institut de Recherche pour le Développement

Calle Ciceron # 609, Col. los Morales, 11530 MEXICO D.F

tel. : 52-80-76-88 ; [jcarralo@yahoo.fr](mailto:jcarralo@yahoo.fr) ; [isa@xanum.uam.mx](mailto:isa@xanum.uam.mx)

<sup>2</sup>Soc. Terranova lombricultores, Coatepec, Ver., MEXICO.

<sup>3</sup>Universidad Autonoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, MEXICO, D.F.

Coffee pulp represents 40% of the fresh fruit [5] but currently is underutilized, causing serious pollution problems [1]. Moreover, its high level of humidity (80-85%) and its rich composition in carbohydrates and proteins [6] induce the development of an important microflora and rapid spoiling. Thus, it is important to develop a conservation method for this by-product for further utilization. The conservation of the coffee pulp through lactic acid fermentation (silage) represents an economic and simple way to stabilize this seasonal substrate. The following work presents a study of the physical, chemical and microbiological parameters of silage of coffee pulp. Silages of approximately 8t were realized in Xalapa, Ver. (Mexico) with fresh coffee pulp. During the three months study, temperature and heights of silos was monitored. Samples were collected after 1,2,3,5,10,15,30,60,90 days and were immediately frozen. 10g of each sample were added to 90 ml of sterilized water and the mixture was milled. The obtained suspension was used for pH measurement, and for microflora studies. The suspension was then centrifuged and the supernatant was kept for HPLC analysis of carbohydrates consumption and volatile fatty acid, lactic acid and ethanol production. Temperature raises in the three first day and then is stabilized around 25-27°C (77-80°F). This can be explained by a residual aerobic activity that occurs while anaerobic acidic conditions are still not optimum. An average loss of approximately 35% of the original height of silos was observed mostly in the first three days after conditioning of silos. Such a loss can be attributed to the natural compactation of the pulp but also to a loss of dry matter caused by aerobic spoilage. pH of coffee pulp drops to 3.96 at third day of fermentation and remains constant during all the three months of the study. This indicates that the product gets stabilized in a time short enough to prevent a large anaerobic deterioration [3]. Lactic acid is rapidly (less than three days) produced at 10-12 % of dry matter (DM), which can explain the decrease of pH observed. The presence of acetic acid at less than 4% DM is due to a lactic acid fermentation by heterofermentative microorganisms present in the endogen microflora of the pulp. A production of ethanol is observed at initial times of the fermentation. Such a production can be attributed to the residual aerobic activity of yeast. The endogen microflora is very high (bacteria: 10<sup>8</sup>CFU/g DM; yeast 10<sup>6</sup>CFU/g DM) on the fresh pulp [4]. However, on the first three days the bacteria and yeast populations were respectively reduced to 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> CFU/g DM and 10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup>CFU/g DM. This effect can be explained with the combined actions of pH, anaerobiosis and organic acids reported to possess antibiotic properties [2]. During this study of ensiling of coffee pulp, organic acids were rapidly produced leading the product to a pH of 4.0 in less than three days. Due to the combined action of this acidic conditions and of the anaerobiosis of the silos, an important decrease on the endogen microflora of the pulp was induced. However, in the three days needed to set silage conditions and to stabilize the substrate, signs of aerobic activity were observed (raise of temperature, loss of dry matter) and ethanol was produced. In order to avoid this activity that can be nocive for futures applications of ensiled pulp, it would be interesting to test lactic bacteria starters that would produce organic acids to get a faster pH drop and a wider antibiotic effect. This study is already developed in our laboratory.

**Acknowledgment.** This work was supported by IRD, UAMI and UE (project BIOPULCA #IC18\*C7970185)

#### References

1. Adams, M. R. and J. Dougan, 1981, *Trop. Sci.*, **23**, 177-196.
2. Haikara, A. and M-L. Niku-Paavol, 1994, VTT Biotechnology and Food Research, Espoo, Finland.
3. Mc Donald, P., A. R. Henderson, and S. J. E. Heron, 1991, 2<sup>nd</sup> ed., Chalcombe Publications, Marlow, England. 340 pp.
4. Perraud-Gaime, I., 1995, PhD thesis, Université de Montpellier II, France.
5. Tauck, S. M., 1986, *Turrialba*, **36** (3), 271-280.
6. Zuluaga, J., C Bonilla and R. M. Quijano, 1975, 7<sup>ème</sup> Col. Intern. Quam. Café, Hamburg, ASIC Ed., Paris, 233-242.