



Casa abierta al tiempo

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

“UTILIZACIÓN DE PULPA DE CAFÉ COMO  
COMPLEMENTO EN DIETAS PARA CRIAS DE TILAPIA  
*Oreochromis niloticus*”.

María del Rocío Barreto Castro

Director:

Dr. J. Gerardo Saucedo Castañeda.

Asesores

Dra. Isabelle Gaimé Perraud.  
Dr. Miguel Ángel Olvera Novoa.  
Dr. José Luis Arredondo Figueroa.

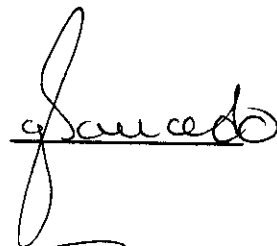
El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la comunicación de resultados que presentó:

**MARÍA DEL ROCÍO BARRETO CASTRO**

El día 13 de Diciembre de 2001.

Comité tutorial:

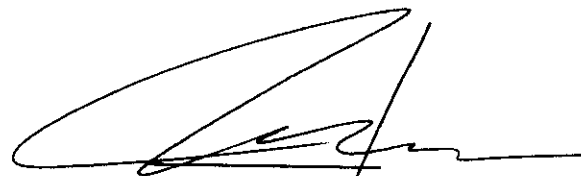
Director: Dr. J. Gerardo Saucedo Castañeda.  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



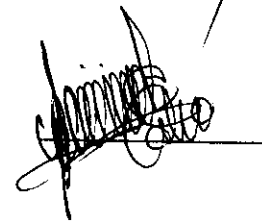
Coordinadora: Dra. Isabelle Gaime-Perraud.  
Instituto Francés de Investigación y Desarrollo



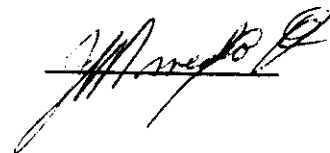
Coordinador: Dr. Miguel Angel Olvera Novoa  
CINVESTAV-IPN-MERIDA



Coordinadora: Dr. Octavio Loera Corral.  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Coordinador: Dr. José Luis Arredondo Figueroa.  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



## Dedicatorias

Quiero expresar mi amor y gratitud a quienes han formado parte de mi vida, siendo pieza medular en mi crecimiento como persona y como profesionista:

**A MI PADRE**, Por haberme heredado tu coraje y entrega a una visión que es imponente, inspirante, sublime, noble y transformadora de vida, porque aunque ya no estés personalmente conmigo, siento infinitamente tu presencia.

**A MI MADRE**, Por estar cada segundo conmigo, nutriendo amorosamente cada proyecto de mi vida, desde su concepción hasta su conclusión. Porque con tu apoyo al concluir este trabajo, tú también eres Maestra en Biotecnología, T.Q.M.

**A GABY**, Por ser parte de mi equipo, por demostrar en todo momento, constante energía y dedicación, por mantener el nivel más alto de integridad en todos nuestros esfuerzos, T.Q.M.

## A ALGUIEN MUY ESPECIAL.....

Siempre que me sentía insegura, triste o desalentada... *estabas ahí*. Siempre necesité ayuda para resolver un problema, por pequeño que pareciera... *estabas ahí*. Siempre que lloraba, reía o me enojaba... *estabas ahí*. Hoy que mi dicha es tan grande, *estás aquí*. **GRACIAS RICARDO**.

## Agradecimientos

En el desarrollo de este trabajo han colaborado muchas personas a quienes deseo brindar mi más sincero agradecimiento.

Al Dr. J. Gerardo Saucedo Castañeda; por haber depositado en mí toda su confianza, por su apoyo y paciente dirección.

A la Dra. Isabelle Gaiame-Perraud; Por su apoyo y estímulo a lo largo de esta tarea.

Al Dr. Miguel Angel Olvera Novoa, por todo su apoyo y asesoría durante mi estancia en el CINVESTAV-IPN-Mérida hasta la conclusión de este proyecto.

A la Sra. Julia Casanova de Olvera, por permitirme compartir con su familia y haber estado conmigo en los momentos difíciles.

A Viviana Ixtchel Olvera Casanova, por haber hecho de mi estancia en Mérida algo inolvidable.

A Viviana, Valentina y José Francisco Peón por su compañía.

A la Sra. Maricela Cámara, por haber sido pieza importante durante mi desarrollo en Mérida.

A toda la gente del laboratorio de Nutrición del CINVESTAV-Mérida.

A mis amigos: Juan Luis Morales, Laura Escobar, Julio Alpuche y Maurilio Lara, por haber trabajado a mi lado apoyándome en todo momento.

A mis amigos Juan Manuel Romano Machado y Jean Phillippe Carralot, por su apoyo en el desarrollo de este proyecto.

A todos aquellos que sin querer he omitido y a quienes pido una disculpa, pero el que no los nombre no significa que no les agradezca todo su apoyo.

## INDICE

Capítulo	Contenido	Página
	<b>Justificación del Proyecto</b>	1
<b>1.</b>	<b>Revisión Bibliográfica</b>	3
1.1	Fuentes alternativas de proteína y energía en acuicultura.	4
1.1.1.	Criterios de evaluación de nuevas fuentes proteicas.	4
1.1.2	Proteínas de organismos unicelulares.	7
1.1.3.	Fuentes proteicas de origen vegetal.	8
1.1.4.	Proteína y energía en la dieta.	10
<b>1.2</b>	<b>Pulpa de café</b>	14
1.2.1.	Composición química de la pulpa de café.	15
1.2.2.	Los compuestos fenólicos.	17
1.2.2.1.	Efecto de los polifenoles en la alimentación animal.	17
<b>1.2.3.</b>	<b>Cafeína</b>	<b>19</b>
1.2.3.1.	Efecto de la cafeína en la alimentación animal	19
1.2.3.2	Composición microbiológica de la pulpa de café	20
<b>1.3</b>	<b>El Ensilaje</b>	<b>20</b>
<b>1.4</b>	<b>Fermentación en Medio Sólido.</b>	<b>23</b>
<b>1.5</b>	<b>Tilapia</b>	<b>25</b>
1.5.1.	Distribución	28
1.5.2.	Requerimientos nutricionales.	30
1.5.2.1	Proteína	31

1.5.2.2	Lípidos	32
1.5.2.3.	Vitaminas	33
1.6	Requerimientos energéticos	35
1.6.1.	Energía	35
<b>2.</b>	<b>Objetivos.</b>	<b>38</b>
<b>3.</b>	<b>Materiales y métodos.</b>	<b>39</b>
3.1	Preparación de los productos fermentados.	39
3.1.1.	El ensilaje	39
3.1.2.	Fermentación en medio sólido.	41
3.2	Formulación y elaboración de las dietas.	44
3.2.1.	Sistema experimental	44
3.2.2.	Elaboración de las dietas	45
3.2.3.	Análisis químicos realizados a los productos obtenidos de la fermentación de la pulpa de café.	47
3.2.4.	Análisis químicos realizados a las dietas.	47
3.3.	Análisis estadístico de los resultados.	50
<b>4.</b>	<b>Resultados y discusiones.</b>	<b>51</b>
4.1	Características físicas químicas y microbiológicas del ensilaje.	51
4.1.1	Evolución de los ácidos grasos volátiles.	51
4.1.2	Evolución de la microflora	52
4.2	Fermentación en Medio Sólido	54
4.3	Composición química de la pulpa de café sometida a procesos de fermentación..	57
4.4.1	Fibra cruda	58

4.4.2	Carbohidratos	58
4.4.3	Proteína	59
4.4.4.	Cafeína	60
4.4.5	Polifenoles	61
4.5	Utilización del alimento	62
5.	Conclusiones	69
6.	Recomendaciones	70
7.	Literatura citada.	71
8.	ANEXOS	80

## **Justificación del Proyecto**

Cada vez más la producción de alimentos se constituye como uno de los principales problemas a los que se enfrenta la población mundial. El problema se complica debido a la diferencia en el poder económico que existe entre los países vanguardistas y los que se encuentran en vías de desarrollo. La producción de alimentos se basa en las actividades agrícolas, ganaderas y pesqueras, pero la producción que se obtiene de ellas responde cada vez menos a las necesidades de la población mundial. El sector pesquero es el que posiblemente tiene mayores problemas, debido a que su actividad principal es la recolección de organismos vivos del mar y embalses epicontinentales, dejando a la naturaleza todo el ciclo de producción.

La acuicultura representa una alternativa reciente siendo una actividad que implica la producción controlada de organismos acuáticos como algas, peces, crustáceos y moluscos tanto de agua dulce como salobre y marina, mediante sistemas de diversa complejidad tecnológica. Se realiza en ambientes distintos que van desde los cuerpos de agua naturales y artificiales, hasta la infraestructura altamente tecnificada construida al efecto. Esta permite además, un aprovechamiento integral y sostenible de los recursos naturales entre ellos el más estratégico, el agua, al podersele dar un uso múltiple combinándola con proyectos de irrigación agrícola. Así mismo, abre enormes posibilidades al reciclaje de subproductos y desechos agropecuarios bajo la forma de fertilizantes orgánicos y alimentos balanceados.

Su doble potencial como generadora de alimentos y de riqueza, la hace promotora del desarrollo rural integral con gran viabilidad e impacto socioeconómico inmediato a nivel mundial y nacional. En relación a la conservación del medio ambiente, es de destacar que ofrece la posibilidad de un desarrollo sostenido, ecológicamente equilibrado y productivo, con alta rentabilidad económica y social, al ser relativamente sencillo controlar sus efectos sobre el entorno.



Por otra parte en los países tropicales existe una gran variedad de desechos y subproductos agrícolas, producidos en gran volumen y que no han sido utilizados en su totalidad (Tacon,1993). Entre estos desechos se encuentran principalmente los derivados del banano, la caña de azúcar, el cacao, los cítricos y el café (Ulloa, 1995).

La pulpa de café es uno de los subproductos agroindustriales que se obtiene a partir del proceso por vía húmeda del café grano, poca atención se ha prestado a este subproducto, pero a causa de varios factores como su alto contenido en agua que hace antieconómico su transporte y deshidratación, así como la contaminación ambiental que genera su alta producción, se han venido proponiendo alternativas para el aprovechamiento total de estos subproductos, siendo la pulpa de café el centro de atención de las actuales investigaciones.

El impacto en el ambiente que genera la eliminación de estos desechos se podría disminuir sustancialmente si se logra su incorporación como fuentes de nutrientes en la producción animal. Con el fin de sustituir aquellos ingredientes tradicionales, que en la actualidad son escasos o compiten con su uso en la alimentación humana (harina de pescado, harina de trigo, maíz, soya, etc).

Este trabajo forma parte del proyecto BIOPULCA, convenio INCO-DC Num. IC18\*CT970185 establecido entre el IRD (Instituto Francés de Investigación y Desarrollo)-Francia, La Universidad de Reading,-Inglaterra, El UFPR Paraná-Brasil y la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa,-México. Uno de los objetivos del proyecto BIOPULCA fue aplicar como complemento el producto ensilado y descafeinado de pulpa de café en dietas balanceadas para crías de tilapia *Oreochromis niloticus*, utilizando cepas seleccionadas de bacterias ácido lácticas y un hongo filamentoso, capaces de conservar los compuestos nutricionales de la pulpa y disminuir o eliminar los compuestos tóxicos y antinutricionales tales como la cafeína y los polifenoles respectivamente, logrando de esta manera obtener un producto apto para su utilización en acuicultura, actividad altamente potencial como generadora de alimentos.

## 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Fuentes alternativas de proteína y energía en acuicultura.

La nutrición proteica de los peces ha sido uno de los campos más investigados dentro de la nutrición de estos animales, dado que plantea una especial problemática. En primer lugar, la mayor parte de las especies de peces que se cultivan en régimen intensivo son carnívoras; por consiguiente, sus necesidades proteicas son muy elevadas, llegando a necesitar de 2 a 4 veces más proteína en sus dietas que los animales terrestres de granja (Mertz, 1969, 1972).

Los ingredientes proteicos de las dietas son uno de los factores económicos más importantes de su formulación, sobre todo si se busca una buena calidad y constancia en su composición cuantitativa y cualitativa. Si a este factor unimos la elevada proporción en que la proteína debe formar parte de la dieta, no es de extrañar que en cultivos intensivos de peces, los gastos de alimentación lleguen a suponer entre 40% y 60% de los costos totales de producción (Collins y Delmondo, 1976; FAO, 1983),

En términos prácticos de formulación de dietas, la harina de pescado ha sido, hasta el momento, la fuente tradicional que suministra una fracción importante de la proteína en los piensos para peces. Su elevado contenido proteico, su composición en aminoácidos esenciales y el adecuado equilibrio entre estos, lógicamente similares al de la proteína del propio pez, y la buena palatabilidad que presenta para los animales, aseguran una óptima utilización nutritiva y elevadas tasas de crecimiento .

La harina de pescado es un producto de alta calidad proteica lo que hace difícil el encontrar un sustituto adecuado, si bien, en la actualidad se están empleando sustituciones parciales, mediante mezclas de diversas fuentes de proteína, que pueden llegar a cubrir hasta la mitad de la proteína total en piensos comerciales (Tacon y Jackson, 1985). Por otra parte, los niveles de harina de pescado podrían disminuirse

aún más, mediante el uso de otras materias primas ricas en proteínas, siempre que se cubran los requerimientos de la especie en aminoácidos esenciales (Ketola,1982).

El planteamiento básico consiste en disminuir el destino energético de la proteína dietaria, que en los peces alcanza proporciones importantes, lo que condiciona un bajo rendimiento en la retención neta de nitrógeno. Por otra parte, es bien conocido, para diversas especies de peces, que la mejor utilización de la proteína para crecimiento, se consigue a niveles de la dieta menores que los necesarios para alcanzar la máxima tasa de crecimiento ( De la Higuera,1987).

Por consiguiente, y es ya un planteamiento clásico, se pensó que el uso que el animal haga de las proteínas, se verá condicionado por los aportes calóricos de la dieta procedentes de otros macro nutrientes no proteicos. Se trata, pues, de disminuir al máximo el contenido proteico de la dieta, sin efectos negativos sobre el crecimiento y conversión del alimento, mediante la mayor sustitución posible de los aminoácidos, por lípidos e hidratos de carbono en la dieta (De la Higuera y col., 1985).

### **1.1.1. Criterios de evaluación de nuevas fuentes proteicas**

La investigación de las posibilidades de utilización de una fuente proteica en concreto, debe ir precedida, desde un punto de vista estrictamente nutritivo, del conocimiento de los datos correspondientes a los requerimientos proteicos de la especie sobre la que se va a ensayar. Así como de los requerimientos cuantitativos para cada uno de los aminoácidos esenciales (Tabla 1.1). Sobre esta base, se puede estudiar el cubrir dichas necesidades a partir de diferentes proteínas o mediante una combinación adecuada de estas.

**Tabla 1.1 Requerimientos cuantitativos de aminoácidos esenciales (% de proteína)**  
<sup>1</sup>Ulloa.,1995. <sup>2</sup>De la Higuera., 1987.

	Tilapia <sup>1</sup> ( <i>O. mossambicus</i> )	Tilapia <sup>1</sup> ( <i>O. niloticus</i> )	Anguila <sup>2</sup>	Carpa <sup>2</sup>	Pez gato <sup>2</sup>	Salmón <sup>2</sup>	Trucha <sup>2</sup>
Fenilalanina	2.5	3.75	5.8	6.5	5.0	5.1	-
Metionina	0.99	2.68	3.2	3.1	2.3	4.0	2.2-3.0
Lisina	3.78	5.12	5.3	5.7	5.1	5.0	3.7-6.1
Leucina	3.40	3.39	5.3	3.3	3.5	5.9	-
Isoleucina	2.01	3.11	4.0	2.6	2.6	2.2	-
Histidina	1.05	1.72	2.1	2.1	1.5	1.8	-
Arginina	2.82	4.20	4.5	4.3	4.3	6.0	3.3-4.9
Treonina	2.93	3.75	4.0	3.9	2.0	2.2	-
Tirosina	-	5.54	1.1	0.3-0.8	0.5	0.5	0.5-0.6
valina	-	2.8	4.0	3.6	3.0	3.2	-

Entre los criterios de selección de posibles fuentes proteicas alternativas hay que tener en cuenta que el contenido proteico del producto a utilizar, cualquiera que sea su origen (animal, vegetal o unicelular), sea lo suficientemente elevado como para permitir sustituciones sustanciales de la harina de pescado, ya que la formulación de las dietas para peces debe contemplar, no solo el nivel de proteínas, sino la inclusión de lípidos, hidratos de carbono digeribles, vitaminas y minerales, en cantidades adecuadas.

Otro criterio de gran trascendencia es la calidad nutritiva de la proteína, definida por su composición en aminoácidos esenciales. En general, se admite que las fuentes proteicas cuyo balance en aminoácidos esenciales es semejante al que presenta la proteína de los animales a alimentar, son las de mejor calidad y promueven un crecimiento más rápido (Nose, 1979).

El problema que plantea la deficiencia de una proteína en uno o varios aminoácidos en concreto, puede ser abordado mediante mezclas de varias fuentes proteicas hasta obtener el patrón de aminoácidos esenciales requeridos por el pez, o mediante la suplementación con aquellos aminoácidos que sean limitantes.

El criterio de cantidad/calidad proteica va estrechamente unido al concepto de digestibilidad: es decir la cantidad de aminoácidos de la dieta que son absorbidos por el organismo tras los procesos digestivos.

Una fuente proteica puede tener un alto contenido en proteína y presentar un buen patrón de aminoácidos esenciales, pero si su digestibilidad es baja, la cantidad absorbida de cada uno de los aminoácidos puede no cubrir, en su conjunto, las necesidades para el crecimiento. Por tanto, la determinación de la digestibilidad de una proteína es uno de los primeros datos necesarios para evaluar sus posibilidades como componente de una dieta, e investigar, en su caso, la posibilidad de efectuar tratamientos previos que puedan mejorar su utilización digestiva. Estos pueden abarcar desde hidrólisis y fermentaciones hasta cocción, expansión, extrusión, micronización, etc. Así sucede con fuentes proteicas vegetales como las leguminosas, donde, por ejemplo, el tratamiento térmico de la soya aumenta siete veces la ganancia de peso en la trucha arcoiris (Ketola, 1982) y la carpa (Viola y col, 1983). Por el contrario, el calentamiento no parece tener efecto sobre el aprovechamiento de la proteína de altramuza por la trucha arcoiris (Moyano, 1985).

El efecto beneficioso de estos procesos se debe a:

1. A la destrucción o inactivación de factores antinutritivos termolábiles, que se hallan presentes en la mayor parte de las fuentes proteicas vegetales (p. Ej, inhibidores de la tripsina).

2. A la ruptura de paredes celulares, indigestibles, con lo que aumenta la disponibilidad de los nutrientes y mejora la digestibilidad de los carbohidratos. (Luquet y Bergot, 1976; Hilton y col, 1981).

Por otra parte, y al margen del método utilizado, existen variaciones de la digestibilidad de una misma fuente proteica provocadas por diversos factores, como el nivel proteico de la dieta (Austreng y Refstie, 1979), el tiempo de actuación de las enzimas digestivas, que depende de la velocidad de tránsito y esta a su vez de otros factores como el volumen de ingesta y determinados componentes de la dieta.

Así mismo, entre los criterios nutritivos de valoración de una determinada proteína, hay que considerar el posible efecto, positivo o negativo, de los procesos tecnológicos de fabricación de dietas sobre la digestibilidad proteica (desnaturalización, reacción de Maillard, etc.) o sobre las disponibilidades de aminoácidos esenciales.

Por último, y desde una perspectiva más amplia, hay que considerar otra serie de factores que van a matizar la rentabilidad o no, del uso de una determinada fuente de proteínas. Entre ellos, hay que destacar, obviamente, el precio, que si bien no ha de ser necesariamente menor que el de harina de pescado, al menos debería llegar a ser competitivo, en determinadas circunstancias, con el de esta.

La presencia de factores antinutritivos o nocivos que deban ser eliminados, puede suponer un importante costo adicional a tener en cuenta.

### **1.1.2. Proteínas de organismos unicelulares**

Durante los últimos años, algunos organismos unicelulares han llamado la atención de los investigadores en cuanto a su potencial en la alimentación de especies acuícolas cultivadas.

Diversos tipos de levaduras, algas unicelulares y bacterias han sido estudiadas para comprobar su papel nutritivo y la posibilidad de incluirlos en las dietas de peces como una fuente proteica efectiva capaz de disminuir sensiblemente, los niveles de harina de pescado (Kihlberg,1972).

La elección de estos microorganismos se ha debido a que presentan, ventajas entre las que Kihlberg (1972) destaca las siguientes:

1. Pueden crecer sobre sustratos de bajo costo o sobre productos de desecho agroindustriales, tal es el caso de la pulpa de café.
2. En muchos casos, los propios organismos se obtienen como subproductos de algunos procesos industriales.
3. El contenido proteico suele ser muy elevado (entre el 40 y 70 % de proteína en sustancia seca).
4. Su alta velocidad de reproducción, junto con el hecho de que se puedan cultivar de forma continua, en pequeños espacios y con relativa independencia del clima, confiere a muchos de sus cultivos una alta productividad y rentabilidad.
5. Por último, las nuevas técnicas de manipulación genética podrían mejorar, en cierta medida, sus características nutritivas.

### **1.1.3. Fuentes proteicas de origen vegetal**

La utilización de las proteínas de origen vegetal ha sido inferior a las de origen animal. Sin embargo, hay que hacer consideraciones a nivel de utilización digestiva, retención de nitrógeno/crecimiento, papel de los procesos tecnológicos que puedan afectar su

valor nutritivo y posibilidad de complementación con aminoácidos libres u otras proteínas.

En lo que a procesos digestivos tecnológicos se refiere, podría tratarse de un deficiente tratamiento tecnológico: calentamiento insuficiente para producir la inactivación de los factores inhibidores de la tripsina, provocando así un aporte inadecuado de aminoácidos esenciales (De la Higuera, 1987).

El empleo de sustitutos de proteína ha sido con la finalidad de solucionar en parte el costo de la harina de pescado intentándose mediante el cultivo de especies con menores requerimientos proteicos (omnívoras o herbívoras). Estas son capaces de utilizar alimentos de baja calidad y emplear subproductos agrícolas de muy bajo costo y poco usados en la alimentación animal. Tal es el caso de la pulpa de café, incorporada a las dietas para tilapias por Bayne y col, en 1976. Los piensos, conteniendo hasta 30% de pulpa de café, además de otras fuentes vegetales (salvado de trigo, harina de semilla de algodón, etc.), fueron bien aceptados y promovieron crecimientos aceptables frente a la dieta control, ésta no contenía proteínas de origen animal.

El diseño del experimento y las condiciones de cultivo se muestran en las Tablas 1.2-1.6 (Anexo 1).

Ulloa Rojas en 1995, utilizó diferentes niveles de inclusión de pulpa de café seca (10, 20, 30 y 40 %) en dietas para tilapia del género *Oreochromis aureus*, en este trabajo no se reporta el nivel de proteína de la pulpa de café. Los resultados muestran que el crecimiento e incremento de peso diario para las dietas conteniendo pulpa de café es más bajo que el encontrado con machos de Tilapia mantenidos en jaulas, pero similar al reportado en encierros o corrales (García y col, 1974). Los valores de conversión alimenticia con las dietas conteniendo pulpa de café son aceptables en acuicultura Tabla 1.7, (Anexo 2) y coinciden con los datos reportados por Bayne y colaboradores en 1976 para el cultivo de tilapias en jaulas.



Con los resultados obtenidos, Ulloa Rojas en 1995 sugiere que la pulpa de café podría ser incorporada en dietas para *O. aureus*, aunque es necesario realizar nuevos ensayos utilizando pulpa de café procesada en otras condiciones para determinar su utilidad en dietas para Tilapia.

Sin embargo los estudios realizados por Christensen en 1981, en carpa y una especie de Bagre muestran que la adición de pulpa de café en un 30 % en las dietas causan efectos adversos principalmente en el crecimiento ya que de un peso inicial de 1.65 g bajó a 0.34 g en organismos de talla juvenil.

#### **1.1.4. Proteína y energía de la dieta**

En la mayoría de las especies de peces y en todas las especies carnívoras, existe un uso preferencial de la proteína sobre los hidratos de carbono, como fuente de energía (Tacon y Cowey, 1985). Esto se explica porque el medio acuático permite a los peces excretar amoníaco como principal catabolito del metabolismo nitrogenado lo que los libera de la necesidad de convertir el amoníaco en otras moléculas nitrogenadas más inocuas y, por ende, les permite obtener más energía metabolizable del catabolismo proteico en comparación con los animales terrestres (Tacon y Cowey, 1985). Por otra parte, la utilización digestiva de los carbohidratos es muy variable, en función del régimen natural de cada especie, y dentro de las carnívoras, de mayor interés en la acuicultura de nuestro país, dicha utilización de los hidratos de carbono es escasa (Zamora y Echevarría, 1987).

En resumen, tal y como expresan Cho y Kaushik en 1985, la energía necesaria para mantenimiento es considerablemente más baja en los peces que en los animales homeotermos. Sin embargo, en comparación a estos últimos, los peces emplean mayor proporción de proteína dietaria para estos fines. Ante estos hechos, el planteamiento inmediato que surge es el de incorporar a la dieta otras fuentes de energía (grasa, carbohidratos) que permitan disminuir la oxidación de la proteína.

De esta manera, se podría conseguir un efecto de ahorro de proteína, la cual sería desviada hacia la síntesis de estructuras corporales, con lo que aumentaría el crecimiento y mejorarían los índices de utilización proteica.

De hecho en ocasiones se ha podido comprobar que, al añadir grasa a la dieta, los requerimientos proteicos de una especie eran sensiblemente inferiores a los calculados en un principio. Por tanto una fracción de la proteína estaba cumpliendo funciones de suministro de energía, que podrían ser desempeñadas por cualquier otro macro nutriente energético de la dieta (De la Higuera, 1987).

En definitiva, la cantidad óptima de proteína en la dieta viene dictada, al margen de la calidad proteica, por un delicado equilibrio entre proteína y energía. Este equilibrio influye así mismo, sobre el balance de nitrógeno, de forma que se pueden conseguir mejores retenciones de proteína y por consiguiente, crecimientos más rápidos. Así nace el concepto “relación proteína/energía” de la dieta (De la Higuera, 1987).

El coeficiente de digestibilidad de los hidratos de carbono tales como dextrinas, almidón, etc está inversamente relacionado con el peso molecular de los glúcidos (Sing y Nose, 1967; Smith, 1971), y con la tasa de incorporación de la dieta. También es conocido que distintos tipos de tratamientos tecnológicos como: cocción, gelatinización, expansión, etc., mejoran la utilización digestiva de dichos hidratos de carbono (Zamora y Echevarría, 1987).

A la mala utilización digestiva de los glúcidos se suma el aumento de volumen que provoca una aceleración de la velocidad de tránsito intestinal (Spannhof y Plantikow, 1983). Por tanto, el tiempo para la absorción de los distintos nutrientes disminuye. De este modo, altos niveles de glúcidos en la dieta no sólo afectan a su propia digestibilidad, sino que podrían disminuir la de los otros macro nutrientes.

Como consecuencia de estas peculiaridades, altos niveles de carbohidratos digestibles en las dietas, mantienen elevada glucemia del pez, con la posibilidad de que actúe de forma prolongada sobre los centros de la saciedad, disminuyendo así el apetito y, lógicamente, la tasa de ingesta. Si bien, en los peces, el control del apetito parece estar más ligado al nivel de aminoácidos circulantes que a la glucemia.

Por otra parte, un exceso de energía dietaria proveniente de glúcidos usualmente produce cúmulos de grasa y glucógeno en el hígado (Bergot, 1979, Furuichi y Yone, 1980, Refstie y Austreng, 1981; Hilton y Atkinson, 1982), provocando disfunciones hepáticas y retrasos en el crecimiento de los animales.

De cualquier modo, está ampliamente demostrado, para distintas especies de peces, que los hidratos de carbono añadidos a las dietas son capaces de ejercer una acción de ahorro proteico, mejorando los índices de utilización proteica y favoreciendo el crecimiento.

Sin embargo el problema reside, en determinar la cantidad adecuada de carbohidratos que pueden ser añadidos a la dieta de cada especie.

Buena parte de los trabajos realizados en este campo de la sustitución energética de la proteína, utilizan como fuente de energía tanto glúcidos como lípidos y se centran en la relación existente entre la energía (digestible o metabolizable) de la dieta y la proteína (Hilton y Atkinson, 1982).

De la mayoría de estos estudios se puede deducir:

- Existe una relación inversa entre coeficiente de eficacia en crecimiento y relación proteína/energía de la dieta.

- Un aumento del nivel energético, manteniendo constante el porcentaje proteico, mejora la eficacia nutritiva de la dieta, hasta unos determinados límites en que se producen depósitos grasos importantes.
- Existen considerables diferencias entre las relaciones recomendadas para diferentes especies, pero según se puede apreciar en la Tabla 1.8, los valores oscilan entre 15 y 35 g de proteína/Mili joules (Mj) siendo normalmente, más elevados en los peces carnívoros que en omnívoros o herbívoros.
- En términos generales, los peces comen hasta satisfacer sus requerimientos energéticos.

Según esta última conclusión, no parece lógico expresar la relación en términos de energía/proteína, puesto que parecería implicar que la ingesta en los peces se realiza en función de los requerimientos proteicos y no de los energéticos (Cho y Kaushik, 1985). Que la energía de la dieta determine la tasa de ingestión del alimento supone también, que dietas con un baja relación proteína/energía digestible, puedan provocar un cese de la alimentación antes de que el animal haya ingerido suficiente cantidad de proteína (Tabla 1.8) y, por consiguiente, afectar al crecimiento.

Al contrario, dietas con elevada relación proteína/energía producen un aumento de la actividad de las enzimas gluconeogénicas (Cowey y col, 1981) indicativo de un mayor uso energético de los aminoácidos. En consecuencia, el concepto de la relación proteico/calórica debe restringirse a dietas adecuadas en proteína y energía; es decir, que cubran ambos requerimientos, al mismo tiempo debe existir un adecuado equilibrio entre proteína, grasa e hidratos de carbono en la dieta.

**Tabla 1.8 Recomendaciones proteína/energía (g proteína/Mj) en la dieta de varias especies de peces, De la Higuera y col, 1985.**

<b>Especie</b>	<b>T(°C)</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>R.P.E.</b>	<b>Energía</b>	<b>Referencia</b>
<i>Clarias gariepinus</i>	27	40	31	Met	Machiels y Henken (1985)
<i>Cyprinus carpio</i>	24	160	21-23	Dig	Schwartz y col, 1983
	23	4	21-23	Dig	Takeuchi y col, 1979
<i>Dicentrarchus labrax</i>	18	5	32-34	Dig	Alliot y col, 1979
<i>Ictalurus punctatus</i>	27	14-114	28-33	?	Page y Andrews, 1973
	27	6	21	Dig	Garling y Wilson, 1976
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	5-12	0-4	35	Dig	Fowler, 1981
<i>Salmo gairdneri</i>	12	5	19-25	Met	Lee y Putman, 1973
	11-14	15	18	Dig	Takeuchi y col, 1978
	7-15	1-90	20-25	Dig	Cho, 1983
<i>Salvelinus alpinus</i>	12	5	31	Met.	Tabeck, 1986
<i>Salvenilus fontinalis</i>	6-17	3-6	32	Dig	Ringrose, 1971
<i>Seriola quinqueradiata</i>	25-29	65	26-35	Met	Takeda y col, 1975
	23	105	35	Met	Shimeno y col, 1980
<i>Sparus aurata</i>	23-26	44	22	?	Marais y Kissil, 1979
<i>Tilapia nilotica</i>	31	2-8	26-29	Dig	Winfrey y Stickney, 1979
	25	6	16-17	Dig	Wang y col, 1985

**R.P.E.** Relación Proteína-Energía.

**Mj.** Mili-joules.

Referencias citadas en De la Higuera y col, 1985.

## 1.2 Pulpa de café

La pulpa de café es la parte carnosa del fruto que se encuentra entre la cáscara y el grano. Es el primer subproducto que resulta del beneficio húmedo del café y ha sido objeto de estudio por varios años debido a los problemas de contaminación ambiental que genera su elevada producción en los países cafetaleros.

Por otra parte su composición química, hace posible su utilización como materia prima para la obtención de diferentes productos. Su uso como alimento animal (Cabezas y col., 1978; Bressani y Braham, 1980), la producción de enzimas (Favela y col., 1989), la producción de hongos comestibles (Martínez-Carrera y col., 1989) y la producción de probióticos (Tapia y col., 1989) son algunas alternativas que se han citado para su utilización.

La propuesta más ambiciosa y sobre la cual se han realizado la mayoría de los estudios, es la detoxificación de la pulpa de café a fin de lograr un producto apto para consumo en animales rumiantes y/o monogástricos. La cantidad que puede ser incorporada a las raciones es bastante limitada porque en la pulpa de café están presentes sustancias con efectos antifisiológicos (cafeína) y antinutricionales (compuestos fenólicos) que reducen el valor nutritivo que ofrece su composición química.

### **1.2.1 Composición química de la pulpa de café**

La pulpa fresca contiene naturalmente entre un 80-85% de agua en peso. Está constituida principalmente de hidratos de carbono, proteínas, compuestos fenólicos, cafeína, materias grasas y minerales. El contenido de estos constituyentes varía de acuerdo a la especie de café, la madurez, el tratamiento aplicado y la zona de producción.

La Tabla 1.9 (Anexo 3) presenta los resultados de un análisis químico proximal de pulpa de café fresca y deshidratada, expresados en base seca.

Como se mencionó anteriormente el contenido de carbohidratos contenidos en la materia prima a utilizar como sustituto de proteína es un punto muy importante a considerar para la elaboración de dietas, de tal manera que siendo la pulpa de café un

fruto se tiene un alto contenido de carbohidratos en forma de azúcares, los cuales son importantes para poder llevar a cabo el balanceo de dicho alimento.

El análisis de los azúcares, por cromatografía gas-líquido, de la pulpa de café secada por liofilización, contiene 22.65% de azúcares libres (Zuluaga,1989). Su naturaleza y proporciones pueden observarse en la Tabla 1.10 (Anexo 4). La diferencia en el contenido de azúcares libres entre la pulpa liofilizada y la pulpa secada al sol puede explicarse por el efecto de la hidrólisis de glucósidos y de polisacáridos ocurrida durante el secado al sol, dando origen a una mayor cantidad de azúcares libres.

En lo que a contenido de aminoácidos se refiere la evaluación “in vitro” de la calidad de las proteínas muestra que los aminoácidos esenciales más abundantes son: triptófano, treonina, tirosina, valina y fenilalanina y las menos abundantes: metionina e isoleucina, Tabla 1.11 (Anexo 5).

El hecho de querer utilizar la pulpa de café como sustrato alimenticio, depende principalmente de sus características químicas y nutricionales después de ser sometida a diferentes procesos. Elías (1978) reporta los siguientes valores obtenidos del fraccionamiento de la pared de la pulpa (% PMS): contenido celular 63.2%, hemicelulosa 2.3%, celulosa 17.7%, lignina 17.5%, proteína lignificada 3.0% y proteína cruda 10.1%. Los niveles de lignocelulosa, hemicelulosa y lignina indican que este producto es superior a otros tipos de materiales utilizados en raciones para animales.

Sin embargo, el alto contenido de carbohidratos en sus diferentes formas podría convertir a la pulpa en un sustrato no propio para el consumo para peces, pues en lo que a hemicelulosa y lignina se refiere, son macromoléculas de difícil digestión por los peces. Además de que la pulpa presenta sustancias como los compuestos fenólicos y cafeína que disminuyen su valor nutricional.

## **1.2.2 Los compuestos fenólicos**

En la pulpa de café están presentes compuestos fenólicos de estructuras simples como el ácido clorogénico pero también sustancias más complejas como los taninos (Clifford, 1985). Los compuestos fenólicos son un grupo químicamente amplio que se encuentran extensamente distribuidos en las plantas formando una de las principales clases de metabolitos secundarios (Ribereau-Gayon, 1968). En términos generales se pueden clasificar en:

- Ácidos fenólicos simples y sus derivados
- Flavonoides.
- Fenólicos poliméricos

### **1.2.2.1. Efecto de los polifenoles en la alimentación animal.**

El papel que juegan los polifenoles, ácidos caféico, clorogénico y tánico contenidos en la pulpa de café está relacionado con: a) la bioquímica misma de la pulpa de café, b) el efecto que puedan tener sobre la utilización de los nutrientes de la pulpa, y c) sus efectos antifisiológicos (Bressani, 1978).

Cuando la pulpa de café se pone en contacto con el aire, ya sea fresca o ensilada, cambia de un color rojo sangre a uno marrón oscuro o negro. Este cambio de color ha sido atribuido a reacciones de empardamiento enzimático causados por la oxidación de los polifenoles o quinonas, las que a su vez se combinan con aminoácidos libres y proteínas para dar complejos de coloración oscura. La ligación de las proteínas por estos productos de oxidación tiene un efecto sobre la digestibilidad de la proteína y, por lo tanto, en la cantidad absorbida de este nutriente para llenar las necesidades fisiológicas (Bressani, 1978).



Los polifenoles libres pueden interferir con la utilización de la proteína, ligándola, pero también pueden combinarse con las enzimas digestivas. La disminución en la digestibilidad de la proteína puede también servir para explicar el efecto protector de los niveles altos de la proteína en la dietas que contienen pulpa de café. El efecto de estos polifenoles de interferir con la utilización de los nutrientes no se limita a la proteína ya que puede interferir con otros nutrientes (Bressani, 1978).

Respecto a los taninos, la característica más importante es su capacidad de ligar proteínas, haciéndolas inaccesibles al organismo; también pueden actuar como inhibidores enzimáticos. La proteína dietética al unirse con los taninos puede ser protegida de la hidrólisis proteolítica enzimática. Estos compuestos poliméricos pueden, por lo tanto, interferir con el comportamiento de los animales al disminuir la disponibilidad biológica de la proteína consumida, o a través de un proceso de inactivación de la acción enzimática, o como una fuente de componentes fenólicos libres (Bressani, 1978).

En 1989, Zuluaga reportó en el primer Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetalera la determinación cuantitativa de las diferentes clases de compuestos fenólicos para dos muestras de pulpa de café arábica, variedad Típica roja, secadas por liofilización y por exposición al sol, respectivamente, mostrando la ausencia de taninos en la pulpa fresca (liofilizada) y un contenido de 2.1% en la pulpa secada al sol. El total de compuestos fenólicos en la pulpa fresca es de 6.3% (expresados como ácido gálico por cada 100 mg de pulpa fresca) y de 6.6% en la pulpa secada al sol.

De igual manera que para los azúcares libres, el contenido de fenoles en la pulpa secada al sol se explica por hidrólisis de glicósidos fenólicos que dejan libre el núcleo fenólico y el azúcar.

### **1.2.3 Cafeína**

La cafeína (1,3,7-trimetilxantina), es una purina que por su comportamiento parecido al de las bases o álcalis, se considera un alcaloide. Su fórmula química es  $C_8H_{10}N_4O_2$ , con un peso molecular de 194.2 g/mol. En forma cristalina es un polvo blanco, es muy soluble en agua hirviendo de la cual cristaliza con una molécula de agua, es inodora y muy amarga. Se presenta en el té (1-4%), el café (1-2%), la guaraná, el mate (té de Paraguay), y en pequeñas cantidades en el cacao. La concentración promedio de cafeína en la pulpa de café arábica varía de 0.6 a 1.3 % en relación a la materia seca (Bressani y col., 1972), y es otro de los factores condicionantes del valor nutritivo de la pulpa de café.

#### **1.2.3.1. Efecto de la cafeína en la alimentación animal.**

La cafeína presenta tres factores que lo convierten en un producto antinutricional para los animales, estos son: concentración relativamente alta de nitrógeno, su efecto conocido como estimulante de la actividad física, y el efecto diurético. En animales rumiantes alimentados con raciones que contienen más del 20% de pulpa de café, se ha observado una deficiencia en la utilización del nitrógeno absorbido y un aumento en la excreción urinaria (Cabezas y col., 1978). Si bien la cafeína es un factor antifisiológico de la pulpa de café, el sitio y la forma en que afecta su valor nutritivo es desconocido.

Los estudios encaminados a descafeinar la pulpa de café han señalado tratamientos alcalinos (Bendaña, 1977) y métodos de extracción con disolventes como el agua (Molina y col., 1974). Sin embargo, las técnicas de degradación de cafeína por vía microbiana se presentan como una alternativa interesante en el plan ecológico. Al respecto, las investigaciones realizadas por el IRD y la UAM Iztapalapa en México, han permitido seleccionar cepas de hongos filamentosos capaces de degradar la cafeína (Aquihuatl y col., 1988., Roussos y col., 1989; Roussos y col., 1995; Perraud-Gaime, 1995).

#### **1.2.4 Composición microbiológica de la pulpa de café.**

La pulpa de café es un sustrato muy cargado en microorganismos (bacterias, levaduras y hongos), presentes en una cantidad que varía de  $10^5$  a  $10^8$  microorganismos por gramo de materia seca de acuerdo a la variedad del café, el orden geográfico y el tipo de tratamiento aplicado a la cereza de café (Perraud-Gaime, 1995).

Esta microflora evoluciona rápidamente favorecida por el elevado contenido de humedad de la pulpa de café (80-85%), y si no es estabilizada pronto, la acción incontrolada de los microorganismos endógenos puede afectar su calidad nutricional; de ahí la necesidad de una técnica eficaz de conservación, en donde el ensilaje se propone como una solución para orientar la actividad de la microflora natural hacia el desarrollo de bacterias lácticas para estabilizar este subproducto agrícola (Perraud-Gaime, 1995).

#### **1.3. El ensilaje**

El ensilaje se define como la conservación de un material húmedo (orgánico alimenticio) por una acidificación anaerobia debida a la acción de microorganismos (McCullough, 1977). Este método está basado en la fermentación natural por bacterias ácido-lácticas.

Estas fermentan los carbohidratos solubles en agua a ácidos orgánicos principalmente ácido láctico, bajo condiciones anaerobias. Como resultado de la disminución del pH, se lleva a cabo la inhibición de anaerobios putrefactantes y se logra una preservación permanente del producto (Weinberg, 1996).

En forraje el proceso de ensilaje puede dividirse en cuatro fases (Weinberg, 1996):

**1. Fase aeróbica:** El aire (oxígeno) se encuentra presente entre las partículas del ensilado, en esta fase el pH se encuentra en un rango de 6.0-6.5. Estas condiciones son favorables para la respiración, la actividad de las proteasas y la actividad de los microorganismos aeróbicos y aeróbicos facultativos, tales como levaduras y bacterias ácido acéticas entre las que se encuentran, bacilos, mohos y enterococos. Su presencia provoca aumento en la temperatura y por lo tanto disminución de la materia húmeda, lo cual disminuye el valor nutricional del ensilaje (Lindgren, 1985, Spoelstra, 1988).

**2. Fase de fermentación:** Después de algunos días el ensilaje entra a una etapa de anaerobiosis. Las bacterias ácido lácticas se desarrollan y empiezan a ser predominantes en la población microbiana, se empieza a producir el ácido láctico y otros ácidos y el pH disminuye entre 5.0 hasta 3.8 aproximadamente.

**3. Fase de estabilización:** En esta etapa ocurren relativamente pocos cambios, ya que en la etapa anterior ya se pudo eliminar el mayor contenido de aire.

**4. Fase final:** Aquí se ve terminada la etapa de ensilaje, el sustrato es liberado y expuesto al aire. Esto provoca la reactivación de microorganismos aeróbicos, muchas levaduras, mohos, bacilos y bacterias ácido acéticas, empiezan a causar la degradación del producto.

Cada fase del proceso de ensilaje debe ser controlado para mantener la calidad del ensilado. La susceptibilidad del ensilaje a la degradación en alguna de las etapas depende de la cosecha del ensilado, la tecnología de ensilaje y el tipo de silo (Weinberg, 1996).

El objetivo del ensilaje es reducir al mínimo las pérdidas en materia seca y el valor nutritivo, así como evitar el desarrollo de una población microbiana indeseable productora de compuestos que tengan consecuencias negativas sobre la salud de los animales al ingerir el producto ensilado.

La susceptibilidad del ensilaje a un deterioro aeróbico es determinado principalmente por factores físicos, tales como el manejo, en donde influye la compactación, el sellado del silo y el volumen utilizado, estos factores afectan grandemente la difusión del oxígeno dentro del ensilaje (Muck, 1995).

Los estudios de los inóculos del ensilaje son importantes por dos razones fundamentales: su efecto de preservación, respiración, efluente y en el valor nutricional. Como se mencionó anteriormente en una de las fases de estabilización del ensilaje, se encuentra presente el oxígeno el cual es degradante para la calidad del ensilaje ya que se encuentran disponibles microorganismos aeróbicos degradantes que son activos durante esta etapa (Woolford, 1990).

Entre los aditivos biológicos se encuentran las bacterias inoculantes y las enzimas. Las bacterias inoculantes tienen la ventaja sobre los aditivos químicos porque son inóculos vivos (no peligrosos), son fáciles de usar, no corrosivos, no son contaminantes al ambiente y son reconocidos como productos naturales.

De acuerdo a trabajos realizados por Mc Donald y col, en 1991 citado por Weinberg y Muck en 1996, probaron el efecto de la aplicación de inóculos comerciales de bacterias ácido lácticas, en maíz y diversas variedades de sorgo en varios estadios de madurez. Los inóculos utilizados fueron: *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* y *Pediococcus acidilactici*, en un nivel de inóculo desde  $0.5 \times 10^6$  ufc  $g^{-1}$  hasta  $1.5 \times 10^{10}$ .

Dichos autores encontraron que la adición de bacterias ácido-lácticas favorece una rápida fermentación, dando como resultado, tanto la rápida acumulación de ácido láctico, como la disminución de pH lo que favoreció la conservación del ensilaje. Concluyendo que el nivel de inóculo fue el adecuado para el objetivo perseguido.

Weinberg y Muck en 1996, demostraron que los inóculos de bacterias ácido-lácticas sirven como aditivos del ensilaje, favoreciendo una eficiencia en la preservación del mismo. Existen inóculos comerciales disponibles tales como las bacterias ácido lácticas homofermentativas, las cuales son rápidas y eficientes productoras de ácido láctico. En este trabajo se utilizó un nivel de inóculo de  $10^5$ - $10^6$  ufc  $g^{-1}$  el cual, resultó en un nivel adecuado para el desarrollo del experimento.

#### **1.4. Fermentación en Medio Sólido.**

En términos generales, la fermentación en medio sólido se refiere al tratamiento de un material húmedo, no suspendido en el agua y sin escurrimiento acuoso, que permite el desarrollo de una fermentación empleando uno o varios microorganismos. En todos los casos los microorganismos utilizados pueden ser hongos, bacterias o levaduras. Los cultivos aeróbicos y anaeróbicos se diferencian por sus requerimientos particulares de oxígeno.

Sin embargo, el sustrato puede contener suficiente humedad para favorecer el crecimiento microbiano (Pandey, 1992). Las fermentaciones en medio sólido no son de origen reciente, el hombre las ha utilizado desde hace mucho tiempo, ya sea para la preparación de alimentos fermentados o quesos, así como para el ensilaje (Moo-Young y col., 1983; Hesseltine, 1987).

La FMS se propone como una alternativa en las tecnologías actualmente empleadas para la utilización y la valorización de productos agrícolas primarios. El objetivo de numerosas fermentaciones sólidas alimentarias tradicionales no es aumentar la cantidad de proteínas *de novo* en los alimentos, si no mejorar las posibilidades de conservación, de transformar propiedades físicas u organolépticas. Por otra parte, estas fermentaciones permiten eliminar los factores antinutricionales o antifisiológicos de ciertos productos vegetales (Aquiahuatl y col., 1988).

En el caso de la pulpa de café, se ha visto que su valor nutritivo puede mejorarse a través de una fermentación sólida con hongos filamentosos donde la cafeína es empleada como fuente de nitrógeno para su crecimiento (Aquihuatl y col., 1988; Perraud-Gaime, 1995) y posiblemente los taninos como fuente de carbono (Roussos y col.,1989; Roussos y col.,1995; Romano-Machado y col., 1999).

Entre los organismos implicados en los procesos de Fermentación en Medio Sólido, los hongos filamentosos, constituyen la microflora predominante, siendo los microorganismos mejor adaptados al cultivo sólido gracias a su capacidad para colonizar las superficies sólidas. Característica raramente encontrada en bacterias y levaduras. La colonización se lleva a cabo por alargamiento apical y ramificación de las hifas. Esta característica permite el aprovisionamiento de los nutrientes al micelio en crecimiento (Raimbault,1980).

En la mayoría de los procesos de fermentación, la aireación de los medios de cultivo se lleva a cabo por inyección de aire a través de los fermentadores, el intercambio de gases se realiza entre el aire y la matriz sólida. La composición en CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> de la fase gaseosa afecta de una manera muy importante el metabolismo de los microorganismos cultivados (Saucedo y col, 1995).

A medida que los sustratos se consumen (reduciendo su diámetro), la biomasa fungal aumenta de tamaño proporcionalmente a los sustratos consumidos. La limitación de oxígeno o la ausencia de otros sustratos puede orientar el metabolismo hacia la esporulación o la producción de metabolitos secundarios. Este fenómeno se presenta de manera idéntica en cultivos líquidos y sólidos, se puede suponer que el agua no es quien detiene el metabolismo sino la ausencia de oxígeno (Saucedo y col, 1995).

Es evidente que los sistemas de control de la Fermentación en Medio Sólido deben tomar en cuenta simultáneamente la humedad del medio, la humedad relativa del aire y la temperatura para controlar exitosamente los procesos de fermentación en fase sólida (Saucedo y col, 1995).

### 1.5. Tilapia

La tilapia es originaria de África, de donde se distribuyó en forma natural hacia el medio oriente. La dispersión de la tilapia, ya con fines piscícolas o pesqueros se inició en el año de 1939 debido a su gran adaptabilidad que ha convertido su cultivo en uno de los más importantes en aguas cálidas y semicálidas (FAO, 1989). Actualmente su distribución es mundial.

La pesquería de tilapia en México se inició con la introducción de tres especies:

Tilapia melanopleura, Tilapia mossambica (*O. mossambicus*) y tilapia nilótica (*O. aureus*) provenientes de Auburn Alabama al Centro Acuícola de Temazcal Oaxaca (Morales, 1974). De aquí se distribuyó a otros estados como son Morelos, Veracruz y Michoacán. En 1978 se trajo de Panamá la especie *O. urolepis hornorum* la cual se introdujo en la estación piscícola del Rodeo Morelos, distribuyéndose posteriormente hacia todo el territorio.

Dentro de la familia **Cichlidae** se ubica la tribu Tilapiini. Los miembros de esta tribu presentan aleta dorsal grande y espinosa, un orificio nasal a cada lado del cuerpo por encima de los labios, el cuerpo es oprimido lateralmente y una línea lateral interrumpida en dos partes, las escamas son cicloides. Presentan hileras de dientes bicúspides o tricúspides en las mandíbulas superior e inferior, así como dientes faringeos en la base del hueso faringeo en la garganta.



De acuerdo con Trewavas en 1983, las tilapias existentes en México se clasifican de la siguiente manera:

Phylum	Vertebrata
Subphylum	Craneata
Superclase	Gnathostomata
Serie	Pisces
Clase	Teleostomi
Subclase	Actinopterygii
Orden	Perciformes
Suborden	Percoidei
Familia	Cichlidae
Género	Tilapia
Especie	<b><i>Tilapia</i></b> ; esp. <i>rendalli</i> o <i>melanopleura</i> <b><i>Oreochromis</i></b> ; esp. <i>aurea</i> , <i>niloticus</i> <i>mossambicus</i> , <i>Urolepis hornorum</i>

De acuerdo con Bardach y col en 1972, el cultivo de tilapia fue practicado en Egipto hace aproximadamente 2500 años; cultivar y explotar esta especie representa muchas ventajas que se mencionan a continuación:

**1. Rápido crecimiento:** Requieren de cerca de 3 ó 4 meses para su desarrollo desde crías jóvenes hasta peces de 150 g.

**2. Habitat:** La tilapia vive en diversas clases de agua, salobre o dulce así como en zanjas prácticamente de todos los tamaños, pantanos, estanques, lo mismo que en depósitos superficiales de agua fangosa, tales como arrozales, resistiendo fuertes condiciones adversas.

**3. Alimentación:** No requieren una clase especial de alimentación; se sustentan de animales pequeños y toda clase de plantas acuáticas. También aceptan alimentación balanceada.

**4. Control biológico:**

- Es consumidora de insectos y gusanos, siendo utilizada como control biológico en estanques y campos arroceros.
- Consume gran cantidad de plantas acuáticas y ayuda a limitar su crecimiento.

**5. Fertiliza el agua en los estanques:** La rápida digestibilidad de tilapia y los residuos de expulsado se convierten en abono útil para fertilizar el agua en los estanques.

**6. Alimento de buena calidad:** Constituyen un alimento apropiado para los procedimientos de deshidratado, salado, ahumado o productos en escabeche.

**7. Rápida reproducción:** La tilapia alcanza la madurez sexual aproximadamente a los cuatro meses y puede reproducirse durante todo el año, con intervalos de dos o tres meses, además que hay gran cuidado paternal hacia las crías, lo que da una elevada supervivencia.

**8.- Resistentes a rangos amplios en variables fisicoquímicas (Tabla 1.12)**

**Tabla 1.12. Parámetros fisicoquímicos óptimos par Tilapia *O. niloticus*. Ling, 1963.**

<b>FACTOR</b>	<b>LIMITE</b>	
Temperatura	Máxima	38-42.5°C
	Óptima	25-32 °C
	Mínima	8-10 °C
Oxígeno	Óptimo	5 mg/l
	Mínimo	1 mg/l
pH	Máximo	9
	Óptimo	7-8
	Mínimo	6
Bióxido de carbono		50-100 ppm
Alcalinidad		14-150 ppm
Dureza		100-170 ppm
Turbidez	Mínimo	14 cm
Transparencia		45 cm
Conductividad	De	200-500 mh/cm
Penetración de la luz	Mayor de	30 cm
Nitritos		0 mg/Lt
Nitratos	Menor de	90 mg/Lt
Amonio (H - NH <sub>3</sub> )		0.3 ppm

**1.5.1 Distribución**

Actualmente la tilapia de encuentra en todos los embalses y cuencas del país, constituyendo la pesquería epicontinental más importante del país con una producción en 1986 de 100,000 toneladas (Arredondo, 1986).

El crecimiento de los peces está determinado por factores abióticos que incluyen el alimento y las condiciones externas del pez, y por factores bióticos o condiciones internas del pez. El alimento influenciará las tasas de crecimiento de los peces a través de la composición nutricional, la formulación de ingredientes, los aspectos físicos (textura, densidad, tamaño, etc.) y además, por la cantidad de alimento que se le suministre. Lo anterior incidirá en la calidad de la dieta en términos de balance de nutrientes, contenido de energía, y biodisponibilidad de los nutrientes. En las condiciones externas se incluyen dos aspectos:

1. La crianza (manejo, densidad de siembra, sistema de cultivo y frecuencia de alimentación).
2. La calidad del agua (temperatura, luz, oxígeno, metabolitos, flujo del agua, etc).

Las condiciones internas que determinarán el crecimiento son: la edad, el sexo, el tamaño, el estado fisiológico del pez y su composición corporal (Heinsbroek.,1990; Jobling., 1994).

En el ambiente natural la tilapia en sus estadios larvales se alimenta del plancton cambiando posteriormente sus hábitos alimenticios. Las diferentes especies de tilapia, en su etapa adulta, son herbívoras, omnívoras o detritívoras, alimentándose de cierta proporción de algas macrófilas acuáticas, materia vegetal en descomposición, organismos bénticos y fito/zoo-plancton (El-Sayed y Teshima,1991).

Por lo tanto, es de esperar que los requerimientos nutricionales de la tilapia sean similares a los de otros peces omnívoros y hervíboros con relación a la calidad de las proteínas y aminoácidos (AA), lípidos y ácidos grasos (AG), carbohidratos, vitaminas y minerales. Sin embargo, la demanda cuantitativa de estos nutrientes variará entre especies, etapa de crecimiento, y condiciones ambientales (NRC,1983).

### 1.5.2. Requerimientos nutricionales

Las diferencias en los requerimientos nutricionales están relacionadas con la especie, la variedad genética, el sexo, el estado de madurez sexual, etc., lo cual afecta la tasa de crecimiento, la conversión alimenticia y la composición corporal del pez.

El requerimiento total de un nutriente específico durante la etapa de crecimiento (cantidad necesaria para el mantenimiento y la formación de estructuras) puede ser también afectado por las interrelaciones entre ingredientes y nutrientes (Tabla 1.13), y sus niveles en la dieta (Hilton y col, 1986, y Heinsbroek, 1990).

**Tabla 1.13. Interrelaciones entre variables que afectan los requerimientos en los peces. Hilton y col, 1986 y Heinsbroek, 1990.**

Tipo de variable	efecto/Interrelación
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mayor grado de insaturación de la fuente de lípidos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incrementa el requerimiento de tocoferol (Vitamina E)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mayor nivel de proteínas en la dieta</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incrementa el requerimiento de piridoxina (Vitamina B6) y de Magnesio</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Contenido de energía en la dieta</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Afecta el requerimiento de proteínas</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nivel de carbohidratos y fibra en la dieta</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Afecta la digestibilidad de carbohidratos y de otros nutrientes (proteínas, vitaminas)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• La tasa de crecimiento</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Afecta el requerimiento de proteínas, vitaminas, etc.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mayor nivel de calcio y fitatos, fuente de proteína</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incrementa el requerimiento de Zinc</li> </ul>

Los componentes de la nutrición no sólo abarcan las fuentes de energía y las de formación de estructuras, sino también, otros componentes que cumplen diferentes funciones de vital importancia para el pez (Tabla 1.14).

**Tabla 1.14. Componentes de la nutrición. De la Higuera,1987.**

Categoría del material	Nutrición
1.-Para formación de tejidos	Proteína (AA), Grasa (AG, fosfolípidos, glicerol), minerales (macro-), Agua y Carbohidrato.
2.- Como fuente de energía	Proteína, grasa y Carbohidrato
3.- De apoyo	Vitaminas, minerales, hormonas, anti-oxidantes, antibióticos y pigmentos.
4.- Antinutrientes	Toxinas, contaminantes, factores antinutricionales
5.- Otros	Aglutinantes, fibra y atrayentes.

**1.5.2.1. Proteína:** Los estudios sobre la nutrición de las proteínas están muy relacionados con la cantidad y la biodisponibilidad de los aminoácidos (AA) que la componen (NRC 1993, Wilson 1989, Tacon 1990). Las proteínas y sus unidades constitutivas, los AA, tienen varias funciones de suma importancia dentro del organismo.

Algunas de estas son:

- a) Participan en el metabolismo celular.
- b) Componentes de ácidos nucleicos, vitaminas, hormonas, etc.
- c) Intervienen en el metabolismo de carbohidratos y lípidos.
- d) Participan en la formación de tejidos, etc,

La calidad de las proteínas depende de su digestibilidad, valor biológico (balance de AAE y su disponibilidad individual) y su utilización neta, Tabla 1.15, (NRC 1983, Satoh 1991), y ha sido evaluado por medio de métodos químicos y biológicos. Estos últimos son más precisos y en ellos, el peso ganado y la retención de nitrógeno son usados como criterios indicadores. Los índices más utilizados son: la tasa de eficiencia de las proteínas, el valor biológico y la utilización neta de las proteínas (NPU).

NPU=nitrógeno retenido por el pez\*100/consumo de nitrógeno.

**Tabla 1.15. Requerimientos de aminoácidos esenciales para tilapia en porcentaje de la proteína y de la dieta (paréntesis). Ulloa,1995.**

<b>Aminoácido</b>	<b><i>O.mossambicus</i></b>	<b><i>O.niloticus</i></b>
Arginina	2.82(1.83)	4.20(1.18)
Histidina	1.05 (0.42)	1.72 (0.48)
Isoleucina	2.01 (0.80)	3.11 (0.87)
Leucina	3.40 (1.35)	3.39 (0.95)
Lisina	3.78 (1.51)	5.12 (1.43)
Metionina	0.99 (0.40)	2.68 (0.75)
+ cistina		3.21
Fenilalanina	2.50 (1.00)	3.75 (1.05)
+ tirosina		5.54
Treonina	2.93 (1.17)	3.75 (1.05)
Triptófano	0.43 (0.17)	1.00 (0.28)
Valina		2.80 (0.78)

**1.5.2.2. Lípidos:** Los peces utilizan los lípidos de la dieta como fuente de energía y de ácidos grasos esenciales (AGE). También tienen un papel importante como componentes de la estructura celular, como transportadores de vitaminas solubles en grasas (A, D, E y K), para el mantenimiento de la integridad de las membranas y, como precursor de componentes activos (hormonas, pigmentos, etc).

La fluidez de las membranas es parcialmente regulada por los AGE contenidos en los fosfolípidos que controlan tales procesos (NCR 1983, Satoh 1991, Jobling 1994).

Los ácidos grasos poli-insaturados tienen varios papeles centrales en la regulación de las funciones respiratoria y reproductiva de los peces.

Los peces son incapaces de sintetizar de novo los AGE (Tabla 1.16) de las series n-6 (Ácido linoleico, 18:2n-6) y n-3 (Ácido linolénico, 18:3n-3), por lo que ingredientes conteniendo estos AGE deben ser incluidos en la dieta para garantizar un crecimiento y sobrevivencia normales (Watanabe., 1982),

**Tabla 1.16 Requerimientos de ácidos grasos esenciales de tilapia, expresado como porcentaje de la dieta. El Sayed y Teshima, 1991.**

<b>Especie</b>	<b>Ácido graso *</b>	<b>Cantidad</b>
<i>T. zilli</i>	18:2n-6	
	22:4n-6	1.0
<i>O. niloticus</i>	18:2n-6	1.0
	22:4n-6	1.0
	18:2n-6	0.5
<i>O. aureus</i>	n-6 series	
	"n-3" <sup>b</sup>	

**1.5.2.3. Vitaminas:** Las vitaminas son compuestos orgánicos esenciales para el mantenimiento de la salud y crecimiento del pez, aunque estas son requeridas en pequeñas cantidades en el alimento (Tabla 1.17). El requerimiento cualitativo y cuantitativo de vitaminas se ha determinado estableciendo la necesidad mínima para alcanzar un crecimiento normal y sin signos de deficiencia.



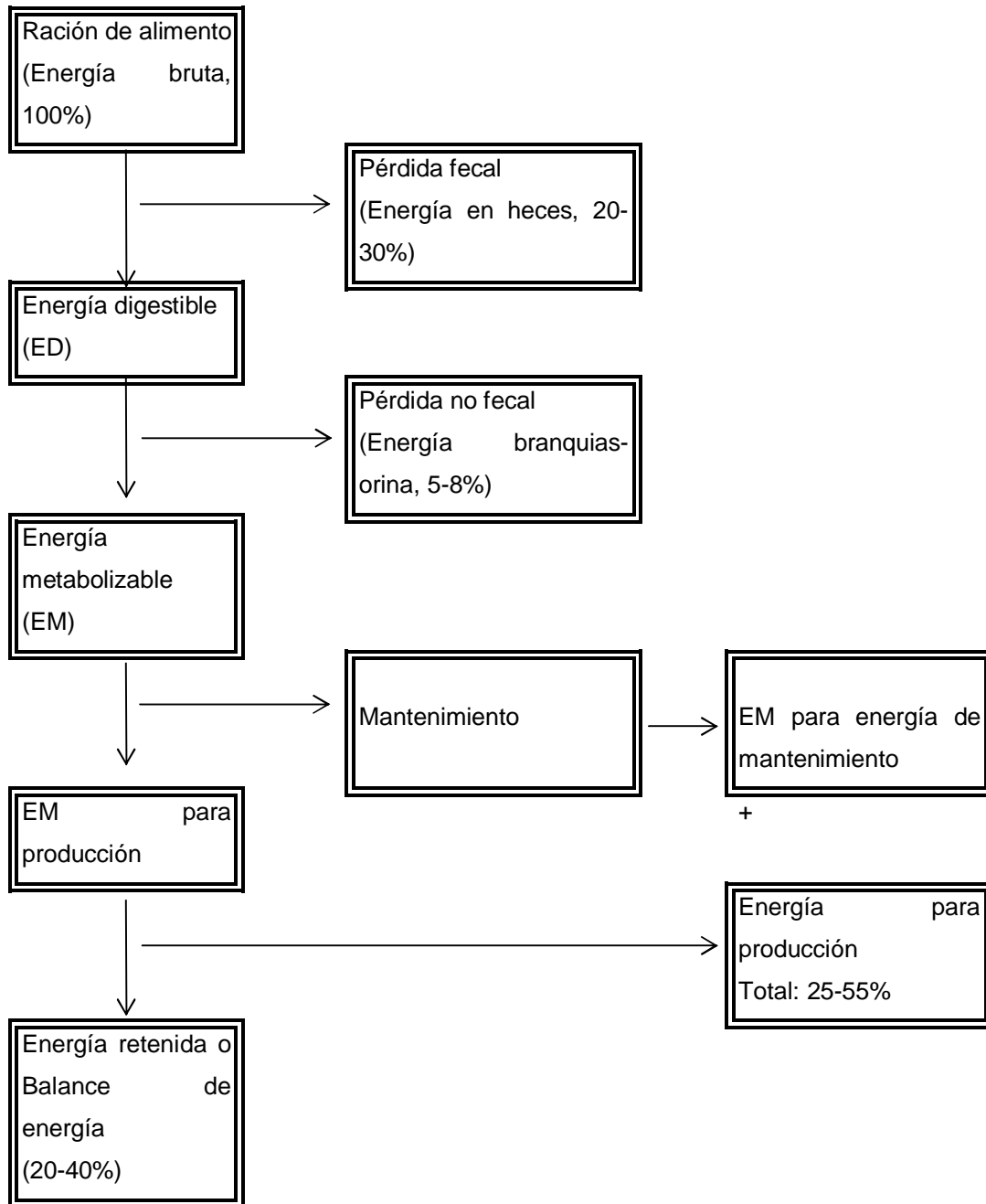
**Tabla 1.17. Principales funciones de las vitaminas en el organismo. Ulloa,1995.**

<b>Vitamina</b>	<b>Funciones</b>
A	Mantenimiento de epitelios, funcionamiento de branquias, pigmentos visuales.
D	Metabolismo del calcio y fósforo
E	Antioxidante intra y extracelular
K	Síntesis de proteínas del plasma, coagulación de la sangre, reacciones de fosforilación.
Ácido fólico	Síntesis de ácidos nucleicos, formación de células sanguíneas, interconversión de AA.
Riboflavina	Metabolismo energético, componente de coenzimas
Pantotenato	Componente de la coenzima A y del acil-transportador de proteína, metabolismo de la energía, síntesis de esteroides y AG.
Tiamina	Metabolismo de lípidos y carbohidratos.
Piridoxina	Coenzima, síntesis de sustancias neuroendocrinas, metabolismo respiratorio, de AG.
Niacina	Coenzima, metabolismo de lípidos y metionina.
B <sub>12</sub>	Funcionamiento de tejido nervioso.
Biotina	Coenzima, síntesis de AG y purinas, oxidación de carbohidratos
Colina	Forma neurotransmisor acetilcolina.
C	Antioxidante, síntesis de colágeno y cartílago, metabolismo del hierro.
Inositol	Fosfolípidos, células sanguíneas.

## 1.6. Requerimientos energéticos

**1.6.1. Energía:** La energía en la dieta puede ser aportada por las proteínas, por la grasa y los carbohidratos. El requerimiento de energía en la dieta para el máximo crecimiento del pez depende principalmente del tamaño del pez, de la temperatura y flujo del agua y del nivel de proteína en la dieta (NRC 1983, Tacon 1990). Para establecer el nivel de energía recomendado en dietas se debe tomar muy en cuenta la tasa óptima de energía: proteína para el pez. Niveles óptimos de energía son importantes ya que niveles bajos podrían resultar en una mayor utilización de la energía de las proteínas como fuente energética y no para la síntesis de tejidos. El exceso de energía en la dieta podría causar una reducción en la toma de nutrientes o un acumulación de grasa en el pez (NCR 1983). De los nutrientes utilizados para crecimiento, el requerimiento para gastos energéticos es el mayor y el que determina en mayor medida la toma de alimento total. Por lo tanto, es importante la determinación del presupuesto energético para la especie cultivada (Figura 1.1).

Figura 1.1 Diagrama de flujo de la utilización de la energía del alimento por parte del pez.



FUENTE: ULLOA-ROJAS, 1995.

Las dietas comerciales de tilapia son bastante simples y, por lo general incluyen de tres a cuatro ingredientes, principalmente de origen vegetal como, harina de soya, de semilla de girasol, cereales y sub-productos y desechos de la industria cervecera, combinados con algunas fuentes de origen animal.

Existen tres factores que se deben considerar cuando se va a alimentar tilapias, y que afectarán, en ciertos casos, las tasas de alimentación.

1. Las fluctuaciones en la toma de alimento y la digestibilidad *ad libitum*, por lo que se sugiere alimentar la tilapia a dos tasas de alimentación (1o. Tasa de alimentación alta, 2o. Tasa de alimentación baja), ya sea el mismo día o cada dos días (De Silva y Perera, 1984, Yakupi-Tiyage, 1993).
2. La descarga total de materia orgánica al sistema de cultivo, que afectará principalmente la calidad del agua de los cultivos de tilapia en estanques.
3. La descarga total de nitrógeno en el sistema, la cuál afectará la concentración total de amonio y el crecimiento de las tilapias en estanques. Se ha indicado que la descarga máxima de nitrógeno en un estanque debería ser cercana a 4Kg/ha/día (asumiendo una tasa de alimentación de 100KG de materia seca/Ha/día, con 80% de digestibilidad de la proteína y 50% de retención de la proteína digerida (Yakupi-Tiyage, 1993).

La tilapia tiene hábitos alimenticios continuos y un estómago de pequeña capacidad, por lo que se recomienda alimentar varias veces al día. Así, con *O. niloticus* se establece nueve veces al día para juveniles y seis para peces de 100 g o de mayor peso, y con *O. mossambicus*, ocho veces para juveniles y tres para adultos. Para tilapias pequeñas se recomienda alimento de poco diámetro, mientras que en peces grandes, gránulos de mayor tamaño.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo general:

Evaluar el producto ensilado y descafeinado de pulpa de café, como complemento en dietas balanceadas para crías de tilapia *Oreochromis niloticus*.

### 2.2 Objetivos particulares:

- Obtener productos a partir de pulpa de café bajo procesos de fermentación aerobia mediante el cultivo de hongos filamentosos y anaerobia a través de ensilaje.
- Evaluar las características químicas y bromatológicas de la pulpa de café: fermentada, ensilada, re-ensilada y seca.
- Evaluar el efecto de la inclusión de los productos fermentados de pulpa de café; sobre el crecimiento, utilización y digestibilidad del alimento en crías de tilapia, comparando las dietas de cada subproducto respecto de un control de harina de pescado.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 PREPARACIÓN DE LOS PRODUCTOS FERMENTADOS

La pulpa de café utilizada fue proporcionada por la empresa General de Solubles (Gesol), la cual se conservó seca. La pulpa tenía una humedad aproximada de 8.4%. Con este dato se procedió a la elaboración de la concentración de cada uno de los inóculos (Fig. 3.1, Anexo 6), para llevar a cabo las fermentaciones en medio sólido.

Esta primera fase de experimentación se divide en dos grandes etapas.

##### **Etapas 1. ENSILAJE (Fermentación anaerobia)**

Este proceso fermentativo ofrece una solución de almacenamiento y conservación en condiciones húmedas y controladas. La pulpa de café fue inoculada con la bacteria ácido láctica *Lactobacillus plantarum* "L08" a un nivel de inóculo de  $10^8$  bac/ml.

##### **Etapas 2. FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO (Fermentación aerobia)**

Para la fermentación se trabajó con el hongo filamentoso *Penicillium commune* a un nivel de inóculo de  $10^7$  esporas/ml, con la finalidad de disminuir los compuestos antinutritivos como los polifenoles y antifisiológicos como la cafeína.

#### 3.1.1. EL ENSILAJE

##### 3.1.1.1. Preparación del inóculo

Se utilizó como medio selectivo de bacterias ácido lácticas, caldo "MRS". Como punto de partida se reactivó la bacteria *Lactobacillus plantarum* "L08", inoculando 1ml de la cepa en 9ml de caldo MRS en un tubo de ensaye, se realizó por triplicado. Los tubos fueron colocados durante 24 horas en una cámara de temperatura controlada a 30°C.

Posteriormente, una vez reactivada la cepa L08, se resembró para obtener mayor volumen de inóculo, esto se realizó en un frasco Wheatton, colocando los 10 ml de caldo MRS con bacterias L08 del tubo de ensaye preparado anteriormente en 90 ml de caldo MRS. Este frasco fue colocado durante 24 horas a 30°C, de esta manera se obtuvo un nivel de inóculo de  $10^9$  bac/ml.

### **3.1.1.2. Realización del ensilaje**

Se utilizaron 23 Kg de pulpa de café GESOL, esta fue humedecida con agua de garrafón hasta un 65%, posteriormente se inoculó con la suspensión de bacterias *Lactobacillus plantarum* L08, bajo la siguiente consideración: **10<sup>8</sup> bac/g de peso seco**.

Al final de la inoculación la pulpa de café alcanzó un 75% de humedad. El inóculo fue agregado por medio de un aspersor manual de tal manera que se distribuyera lo más uniformemente posible, una vez inoculada la pulpa de café se procedió a colocarla en botes de plástico con tapa de rosca de 2.5 Kg de capacidad, se procuró colocar la pulpa lo más compactamente posible, para sacar la mayor cantidad de aire creando condiciones anaerobias (Figura 3.2, Anexo 7).

Siguiendo este mismo procedimiento se elaboraron nueve lotes, los lotes fueron colocados en unas cubetas con tapa cubiertas con papel aluminio para protegerlos de la luz para evitar el desarrollo de microorganismos que pudieran afectar el ensilaje, estos silos fueron colocados en una cámara de temperatura controlada a 30°C por treinta días.

### **3.1.1.3. Muestreo, análisis microbiológico.**

Se prepararon 2 soluciones stock, la primera compuesta de 10 g de pulpa de café seca y 90ml de agua destilada estéril adicionada con un tensoactivo (Tween 80 a una concentración de 1g/l). La segunda compuesta de 10g de pulpa de café ensilada (muestra tomada al tiempo cero de inoculación) y 90ml de agua destilada estéril, adicionada con un tensoactivo (Tween 80 a una concentración de 1g/l).

A partir de estas soluciones madre se realizaron diluciones desde 10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-8</sup>, en tubos de ensaye de 10ml. Con estas diluciones el número de células se evaluó mediante el método de siembra en placa. De cada una de las diluciones decimales se depositaron por goteo 20μl (Figura 3.3), en cajas petri con medio selectivo para bacterias ácido-lácticas “MRS” y medio específico para cuenta total “PCA”.

El ensilaje tuvo una duración de 30 días, de tal manera que se programaron muestreos al tiempo cero y a los días 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25 y 30, la siembra en placa se realizó por triplicado para cada medio de cultivo, en cada uno de los días de muestreo.

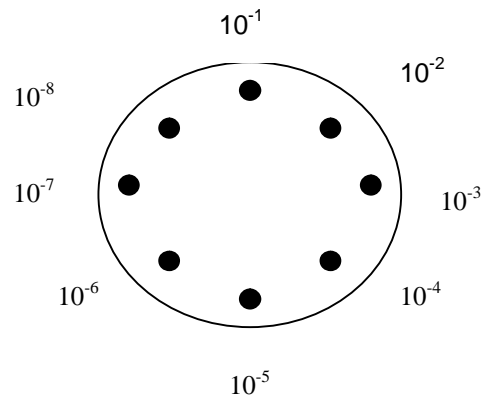


Figura 3.3. Esquema de la técnica de siembra en placa por punto

### 3.1.2. Fermentación en medio sólido

Pasados los treinta días se recuperaron tres silos, los cuales fueron utilizados para la fermentación en medio sólido aerobia, este material fue inoculado con el hongo *Penicillium commune*.

#### 3.1.2.1. Preparación del inóculo

Para obtener el inóculo, en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad se adicionaron 100 ml de medio de cultivo CMS (Anexo 8) se inocularon con 0.5 ml de suspensión de esporas que contenían  $10^7$  esporas/ml (Perraud-Gaime, 1995). El inóculo se adicionó en forma masiva, incubándose por siete días a  $30^{\circ}\text{C}$ . Una vez desarrollado el inóculo se extrajeron las esporas con 30 ml de solución de Tween 80 (0.01%) y se tomaron muestras para conteo de esporas en una cámara de Neubauer de 16 cuadros por cuadrícula, se contaron nueve cuadrículas de las veinticinco de la cámara, utilizando una dilución 1:20.



La fórmula empleada para expresar el número de esporas fue la siguiente:

$$N = \hat{e} * f * d * 25$$

Donde:

N= Número total de esporas/ml.

$\hat{e}$  = Promedio de esporas.

f= factor de la cámara ( $1 \cdot 10^4$ )

d= dilución empleada (1:20)

25= Número de cuadros de la cámara.

### 3.1.2.2. Fermentación

Una vez extraídas las esporas se procedió a inocular la pulpa ensilada. Esto se realizó con un aspersor manual de 500 ml de capacidad hasta alcanzar una humedad del 85%. Una vez inoculada la pulpa, se utilizó un reactor de cuatro charolas de 800 g de capacidad cada una, el cual se colocó en una cámara bajo condiciones controladas de humedad, temperatura y aireación (Figura 3.4, Anexo 9).

Al reactor se hizo circular flujos controlados de aire, dicho aire se saturó previamente haciendo burbujear el agua contenida en una columna de vidrio de 3 Lts de capacidad. Para calibrar el flujo de aire se utilizó un Rotámetro Gilmont 40490, para aire con flotador de vidrio, esta columna estaba conectada a un controlador de temperatura. Las condiciones de cultivo se mencionan a continuación:

<b>Inóculo</b>	$10^7$ esporas/ml
<b>Humedad inicial</b>	85% (85g de agua/100g de medio sólido húmedo)
<b>Flujo de aire</b>	0.5 vkgm (l de aire/Kg de medio sólido húmedo)
<b>Temperatura</b>	30° C

La fermentación tuvo una duración de 36 horas. Durante este tiempo se monitorearon los gases O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> por medio de cromatografía de gases, en un cromatógrafo de gases Gow-Mac 580 equipado con un sistema de inyección automático que permite el análisis en línea de 16 muestras, una columna Alltech (CTR1) para la separación de los gases, y un detector que registra la conductividad térmica de los gases.

El cromatógrafo está acoplado a una computadora provista del programa Chroma de la sociedad Biosysteme. El programa permite controlar la secuencia de análisis en el cromatógrafo, la programación de frecuencia de análisis, la integración automática de los cromatogramas, y el almacenamiento de los resultados de oxígeno (O<sub>2</sub>), bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y nitrógeno (N<sub>2</sub>), en por ciento.

Los parámetros de operación del sistema de cromatografía fueron los siguientes:

<b>Detector</b>	<b>Conductividad térmica</b>
<b>Temperatura del detector</b>	80 °C
<b>Temperatura de la columna</b>	50 °C
<b>Temperatura del inyector</b>	80 °C
<b>Corriente del detector</b>	150 mA
<b>Fase móvil</b>	Helio
<b>Flujo de la fase móvil</b>	40 ml/min
<b>Presión de la fase móvil</b>	1 bar

### **3.1.2.3. Análisis de resultados de los gases CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>.**

Para el análisis de los resultados de gases, se empleó la metodología descrita por Saucedo-Castañeda y col en 1994.

Para analizar el cultivo de *Penicillium commune* durante la fermentación se determinó la proporción de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> en los gases de salida utilizando cromatografía de gases.

La velocidad específica de producción de CO<sub>2</sub> se expresó en mg/h g MSI utilizando la ecuación siguiente:

$$r_{CO_2} = \frac{(\%CO_2) (F) (PM) (fc)}{(MSI) 100}$$

Donde:

r CO<sub>2</sub>: Velocidad específica de producción de CO<sub>2</sub>. (mg/h g MSI)

% CO<sub>2</sub>: % v/v determinado por análisis de los gases de salida.

F: Flujo de aire al reactor (ml/h).

PM: Peso molecular del CO<sub>2</sub> (44 mg/mmol).

Fc: factor de corrección (0.031 mmol/ml).

MSI: contenido de materia seca del medio sólido al inicio de la fermentación. (g).

Una vez transcurridas las 36 horas se cortó el tiempo de fermentación, posteriormente se procedió a recuperar el sustrato para Re-ensilarlo, para llevar a cabo este re-ensilaje se trabajó con la misma bacteria al mismo nivel de inóculo, este re-ensilaje tuvo una duración de 20 días.

Con tres lotes más de pulpa ensilada, se realizó una nueva fermentación, de tal manera que se preparó más inóculo de *Penicillium commune*, y las condiciones de fermentación se procuró que fueran lo más homogéneamente posibles a la primera fermentación.

De esta forma se obtuvieron tres sustratos, obtenidos a partir de cada una de las fermentaciones y como testigo se trabajó con la pulpa seca sin ningún tipo de tratamiento:

- Ø Pulpa seca
- Ø Pulpa ensilada
- Ø Pulpa ensilada y fermentada
- Ø Pulpa ensilada, fermentada y re-ensilada.

Cada uno de estos sustratos fue secado en una secadora de alimentos de aire forzado a 45 °C durante 24 horas y se molió en un molino de café doméstico marca Braun Aromatic, posteriormente se tamizó en un tamiz de malla #35, se sometieron a un análisis bromatológico completo para conocer su calidad nutricional y se empacaron en bolsas hasta su utilización para la elaboración de las dietas.

### **3.2 Formulación y elaboración de las dietas**

#### **3.2.1. Sistema experimental**

Se construyó un sistema cerrado de recirculación el cual constaba de 16 cubetas de plástico de 20 lts, dicho sistema tenía un tanque de captación, el cual suministraba el agua mediante una bomba marca Siemens con motor monofásico de 1/4 HP, hacia un tanque elevado, el cual por medio de gravedad suministraba el agua a todas las cubetas, el sistema contaba con dos tinajas de sedimentación de residuos con dos filtros biológicos cada uno para mantener la óptima calidad del agua.

En el tanque de bombeo se colocó un termostato Clepco Smart Heater de 120 Volts para mantener una temperatura constante de entre 28°C y 29°C, la cual se registró con un detector automático Eco-Systems 1767-Benbow.

El flujo de agua del sistema se reguló a una velocidad de 1.5 l/min, manteniendo así una concentración de oxígeno disuelto de  $6.5 \pm 0.5$  mg/l, el sistema experimental se instaló en un laboratorio con temperatura controlada a 22°C y fotoperíodo ajustado a 12 horas luz y 12 horas oscuridad. Dicho laboratorio esta adscrito al Departamento de Recursos del Mar, del CINVESTAV-IPN Mérida, el cual es coordinado por el Doctor Miguel Angel Olvera Novoa.

En cada cubeta se colocaron diez crías de tilapia nilótica de aproximadamente 300 mg de peso, éstas permanecieron siete días en el sistema para su aclimatación, cada muestra “estandarizada” de diez tilapias fue pesada y se tomó registro de la biomasa total para obtener los pesos promedios iniciales (Figura 3.5, Anexo 10).

### **3.2.2. Elaboración de las dietas**

Para el balanceo de las dietas se utilizó una hoja de cálculo de “Balanceo porcentual de Alimentos”, en la cuál se tomó en cuenta las características bromatológicas de cada uno de los ingredientes con respecto del nivel de proteína de la harina de pescado.

De esta manera debido al elevado porcentaje de Extracto Libre de Nitrógeno de la pulpa de café únicamente se pudo trabajar con un nivel máximo de inclusión proteica del 10.2 %, así se elaboraron cinco dietas isoproteicas (40% de proteína) e isocalóricas (408 Kcal/100 g), como la pulpa de café contaba con un máximo de proteína del 14 %, el principal aporte proteínico fue provisto por la harina de pescado.

Las dietas fueron elaboradas con los sustratos obtenidos a partir del procesamiento de la pulpa de café y como testigo únicamente se empleó harina de pescado de tal manera que se obtuvieron las siguientes dietas:

- Dieta con pulpa seca PS
- Dieta con pulpa ensilada PE
- Dieta con pulpa fermentada PF
- Dieta con pulpa re-ensilada PRE
- Dieta con harina de pescado como testigo. HP

Para la preparación de las dietas se procedió a mezclar primero todos los compuestos sólidos en una mezcladora KitchenAid. Classic Model K45SS por diez minutos, de los cuales se utilizó como ligante carboximetilcelulosa, como relleno se empleó almidón de maíz, además de suplementar según la técnica de Tacon y col., 1983; Tacon y col., 1984 premezcla de vitaminas y minerales. Posteriormente se agregaron aceites de soya y pescado tratando de homogenizar lo más posible, el almidón se gelatinizó previamente y se agregó al final, se utilizó óxido de cromo como marcador inerte para cuantificar la digestibilidad del alimento.

Una vez mezclados los ingredientes, se agregó la cantidad suficiente de agua para formar una masa con consistencia adecuada, para poder ser pasada por un molino de carne de cedazo de 2 mm de diámetro para obtener el pellet.

Posteriormente se colocó cada dieta en una charola para su secado en una secadora de Alimento a 45°C por 24 horas. Una vez obtenido el alimento se procedió a triturar los pellets en un mortero siendo pasado por un tamiz de malla #35 para obtener el tamaño adecuado para los organismos, que en este caso fue casi polvo por la corta edad de los organismos.

### **3.2.3. Análisis bioquímicos realizados durante el ensilaje.**

Se realizaron análisis bioquímicos en los que se determinaron contenido de azúcares y ácidos grasos por HPLC en cada uno de los muestreos al tiempo cero y a los días 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 del ensilaje.

#### **3.2.3.1. Análisis químicos realizados a los productos obtenidos de la fermentación de la pulpa de café.**

Se realizaron análisis químicos proximales a cada uno de los productos de pulpa de café, determinando, humedad (AOAC, 1990) mediante deshidratación en una estufa a 100°C por 24 horas, cenizas (AOAC, 1990) mediante calcinación a 600°C, grasa cruda por el método Soxhlet, Nitrógeno total, se determinó en un analizador Perkin-Elmer 2400 II, por medio de combustión, los elementos de las muestras son convertidos en gases (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>) de tal manera que para obtener el contenido de proteína se utiliza el por ciento de nitrógeno y se multiplica por el factor 6.25 y elementos libres de nitrógeno (AOAC, 1990), fibra cruda (AOAC, 1990), carbohidratos (por diferencia), valor energético en Kcal/100g (por cálculo), cafeína (Denis, 1992) y polifenoles (Zuluaga,1981).

#### **3.2.4. Análisis químicos realizados a las dietas**

Se realizaron análisis químicos proximales a los ingredientes, a las dietas y a los peces al inicio y al final del experimento, determinando: humedad (AOAC, 1990) mediante deshidratación en una estufa a 100 °C por 24 horas, cenizas (AOAC, 1990) mediante calcinación a 600°C, grasa cruda (AOAC, 1990) por el método de Soxhlet, nitrógeno total se determinó en un analizador Perkin-Elmer 2400 II, de esta manera se pudo constatar el contenido nutricional del alimento a suministrar (Tabla 3.1).

Estas se asignaron aleatoriamente a cada una de las cubetas, cada tratamiento se desarrolló por triplicado, se llevó a cabo la alimentación de los peces por un período de

ocho semanas, fueron alimentados con las diferentes dietas a una tasa del 8% de la biomasa total, la ración de alimento diaria se dividió para su mejor aprovechamiento en tres porciones diarias (09:00, 13:00 y 17:00 hrs).

La aplicación del alimento se realizó manualmente con la finalidad de distribuirlo uniformemente en toda la cubeta.

**Tabla 3.1. Formulación y composición proximal de las dietas experimentales (% p/p)**

<b>INGREDIENTE (g)</b>	<b>PS</b>	<b>PE</b>	<b>PF</b>	<b>PRE</b>	<b>HP</b>
Harina de pescado	45.74	45.39	45.39	45.39	50.54
Aceite de soya	5.00	5.18	5.07	4.75	0.78
Aceite de pescado	1.75	1.52	1.89	1.23	0.00
Almidón (gelificado)	0.80	4.92	14.45	14.19	40.68
Premezcla de minerales <sup>1</sup>	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
Premezcla de vitaminas <sup>2</sup>	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Carboximetil celulosa	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Oxido de cromo	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Pulpa de café	38.71	35	25.21	26.44	0.00
<b>COMPOSICIÓN PROXIMAL (%)</b>					
Humedad	6.4	5.7	5.3	6.3	4.5
Proteína cruda	39	40	40	39	42
Lípidos	11.5	11.6	12.3	11.6	11.2
Cenizas	1.5	1.5	1.4	1.6	2.8
ELN	38.9	38.7	39.1	41.5	37.8
Energía bruta (Kcal/100g)	408.6	408.6	408.6	408.2	408.5

<sup>1</sup>Jauncey y Ross, 1982.

<sup>2</sup>Tacon y col, 1984.

Se realizaron biometrías semanales, se sacaron los organismos de su sistema de tratamiento, se colocaron en una tela para eliminar el exceso de humedad y posteriormente se pesaron en una balanza electrónica de 0.01g de precisión marca OHAUS modelo GT 4800.



De acuerdo a la biomasa se estimó el crecimiento promedio individual y se calculó la dosis de alimento para la siguiente semana. El efecto de las dietas se evaluó con base a los parámetros mostrados en la Tabla 3.2.

**Tabla 3.2 .Expresión de los resultados para evaluar el crecimiento de los organismos y la eficiencia de utilización del alimento en el experimento.**

Parámetro	Fórmula	Variables
Supervivencia (%)	$S=100 (Nf/No)$	No. Número inicial Nf. Número final
Peso ganado (%)	$PG=100(Pf-Po)/Po$	Po. Peso inicial Pf. Peso final
Peso ganado individual. (mg/día)	$PGI=1000(\sum PGIsemanal)/T$	Tiempo en días
Tasa específica de crecimiento (%/día)	$TEC=100(\log_e Pf-\log_e Po)/T$	
Alimento consumido individual (mg/día)	$ACI=1000(\sum ACI semanal)/T$	ACI en peso seco
Tasa de conversión alimenticia	$TCA=ACI/PGI$	PGI en peso húmedo
Tasa de eficiencia proteica	$PER=PGI/proteína consumida$	
Retención de nitrógeno en el cuerpo. (mg/día)	$RNC=((P*PCF)-(Po*PCI))/100/T/6.25$	PCF. Proteína corporal final. PCI. Proteína corporal inicial
Utilización Aparente del nitrógeno. (%)	$UAN=100(RNC/Nconsumido)$	
Digestibilidad Aparente de la materia orgánica (%)	$DAMO=100-(100(Ma/Mh))$	Ma= % indicador de alimento. MH= % indicador en heces.
Digestibilidad aparente de la proteína	$DAP=100-(100((Ma/Mh)*(Ph/Pa)))$	Pa= % de proteína en el alimento. Ph= % de proteína en heces.

Olvera,1985.

Se llevó a cabo el análisis de digestibilidad mediante la cuantificación del contenido de óxido de cromo, tanto en las dietas como en las heces, estas se recolectaron diariamente por sifoneo y fueron depositadas en bolsas de manta de cielo para su secado a 80°C por un mínimo de 12 horas.

Dicho análisis se determinó por digestión ácida con ácido nítrico y ácido perclórico, siguiendo el método descrito por Furukawa y Tsukahara (1966) y De Silva y Anderson (1995).

Con respecto a la calidad del agua semanalmente se realizaron muestreos para la determinación de compuestos nitrogenados (nitratos, nitritos y amonio). Diariamente se vigiló el O<sub>2</sub> disuelto y la temperatura del sistema en general, así como el correcto funcionamiento de este.

### **3.3 Análisis estadístico de los resultados**

Los resultados se compararon estadísticamente entre las diferentes dietas mediante un Análisis de Varianza de una sola vía con un nivel de significancia del 95% ( $P < 0.05$ ) y prueba de control con el fin de hacer comparaciones entre cada una de las dietas que contienen los diferentes sustratos de pulpa de café y la dieta control de harina de pescado con 100% de sustitución proteíca. Las diferencias estadísticas entre las medias fueron identificadas aplicando la prueba de rangos múltiples de Duncan (Duncan, 1955) determinando también el error estándar (E.E) siendo calculado a partir del cuadrado medio del error.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1 Características físicas, químicas y microbiológicas del ensilaje.

El ensilaje es un método de preservación, el cuál está basado en la fermentación natural en donde las bacterias ácido-lácticas fermentan los carbohidratos solubles en agua a ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico en condiciones anaerobias. Como resultado de la disminución del pH se inhiben los microorganismos anaerobios degradantes (Weinberg, 1996).

#### 4.1.1. Evolución de los ácidos grasos volátiles

La figura 4.1 muestra la evolución de los ácidos grasos volátiles del ensilado en por ciento de materia seca (%MS) durante los 30 días de fermentación, se observa una producción progresiva de etanol a lo largo del período, este compuesto es producido principalmente por la presencia de levaduras endógenas de la pulpa de café.

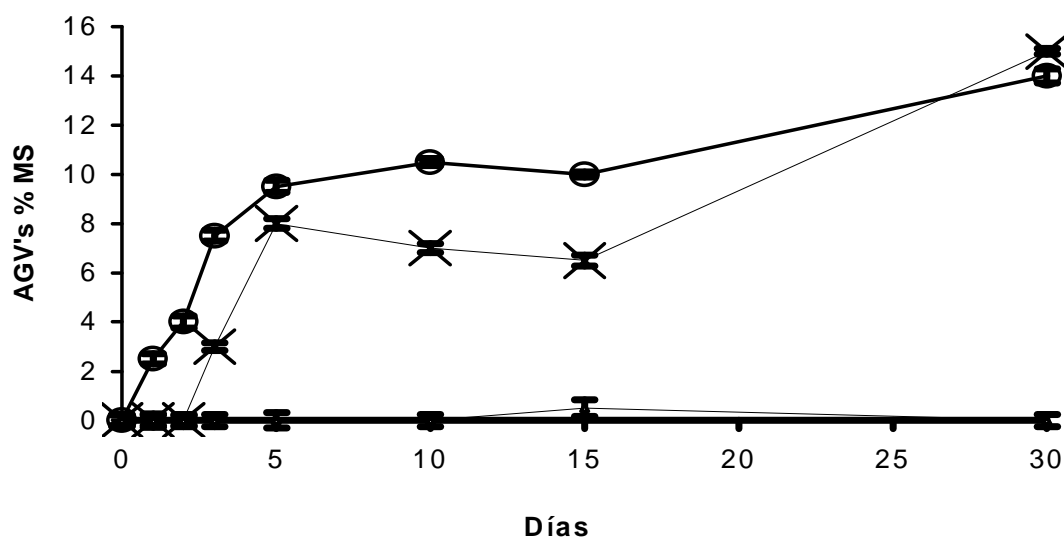


Figura 4.1. Producción de ácidos grasos volátiles (% MS) durante el ensilaje para el producto inoculado con la bacteria ácido láctica L08. —X— Etanol —O— Láctico —▲— Acético

Weinberg (1996) enfatiza que durante los primeros días de ensilaje en forraje, este pasa por una fase aeróbica, la susceptibilidad del ensilaje a un deterioro aeróbico es determinado por algunos factores, entre los que se encuentran los físicos, tales como la compactación del sustrato, el sellado del silo, así como el volumen utilizado, estos factores afectan grandemente y favorecen la difusión del oxígeno dentro del ensilaje.

Cuando el aire está presente entre las partículas del ensilado y considerando que se tiene un pH inicial de 4.5-3.5, estas condiciones son favorables para la respiración, la actividad de las proteasas y la actividad de microorganismos aeróbicos y aeróbicos facultativos, tales como los hongos, levaduras y enterobacterias.

#### 4.1.2. Evolución de la microflora

La figura 4.2 muestra la evolución microbiana en log ufc/g MS durante los 30 días de ensilaje, de levaduras (medio PCA) y bacterias ácido-lácticas (medio MRS).

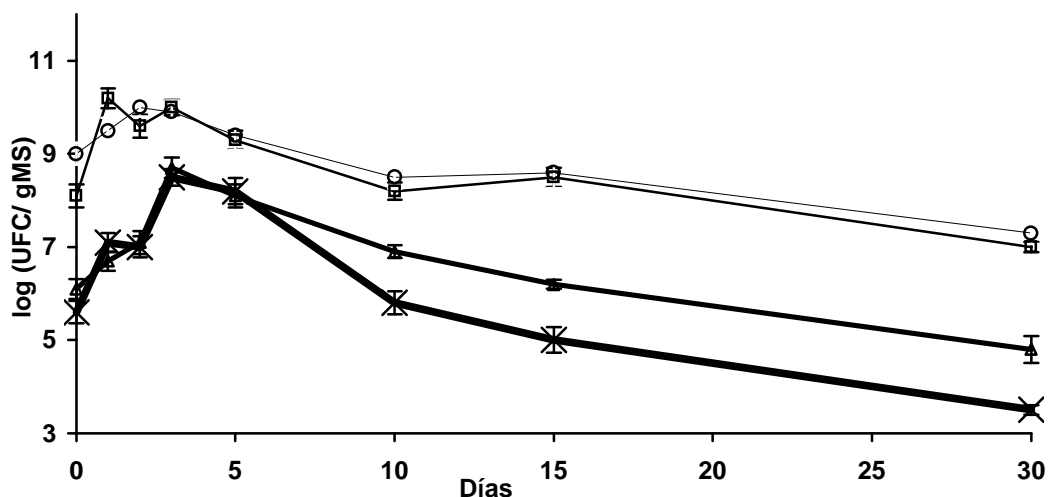


Figura 4.2. Evolución de la microflora durante el ensilaje para el producto inoculado con la bacteria ácido láctica L08.

—×— Lev. Anaeróbicas —▲— Lev. Totales —■— Bac. Lácticas —○— Bac. Totales

Este ensilaje fue inoculado con la bacteria ácido-láctica L08 (*Lactobacillus plantarum*), con la finalidad de mejorar la calidad del ensilaje. Como menciona Spoelstra (1991), el uso de aditivos químicos y biológicos funcionan como promotores adecuados de fermentación, el uso de bacterias lácticas presenta muchas ventajas, tales como: que son seguras, fáciles de usar, no corrosivas, no son contaminantes al ambiente y son muy apreciadas como productos naturales.

En lo que a ácido láctico se refiere puede notarse que desde el principio del proceso hay producción de ácido láctico, y en el quinto día se presenta el pico de mayor producción aumentando progresivamente hasta el final del ensilaje. Esto concuerda con Pitt (1985), el cual menciona que después de los primeros días de ensilaje una vez que pasa la fase de aerobiosis, el ensilaje entra a una fase de anaerobiosis. Las bacterias ácido lácticas se desarrollan y empiezan a ser predominantes en la población microbiana, de tal manera que el ácido láctico es producido disminuyendo el pH hasta 3.5, aproximadamente.

La figura 4.3 muestra la producción de ácido láctico respecto al consumo de azúcares, principalmente glucosa, sacarosa y fructuosa. Puede notarse una relación inversamente proporcional del consumo de azúcares y la producción de ácido láctico, notándose el cambio más notable a los 5 días, período que coincide con la estabilización del ensilaje.

En esta etapa el ensilaje se desarrolló de manera adecuada, así como el inóculo utilizado estuvo dentro de los recomendado en la literatura, ya que como puede observarse el nivel de inóculo se mantuvo de  $10^8$  bact  $g^{-1}$  PMS. Algunos trabajos realizados por Weinberg demuestran que un nivel de inóculo mínimo de  $10^5$ - $10^6$  son adecuados para el ensilaje se desarrolle satisfactoriamente.

De esta manera puede concluirse que el ensilaje ofrece una excelente opción de conservación para la pulpa de café, ya que se reduce su contenido de humedad, se controla de manera significativa el desarrollo de microorganismos putrefactantes además de que enriquece sus propiedades nutricionales.

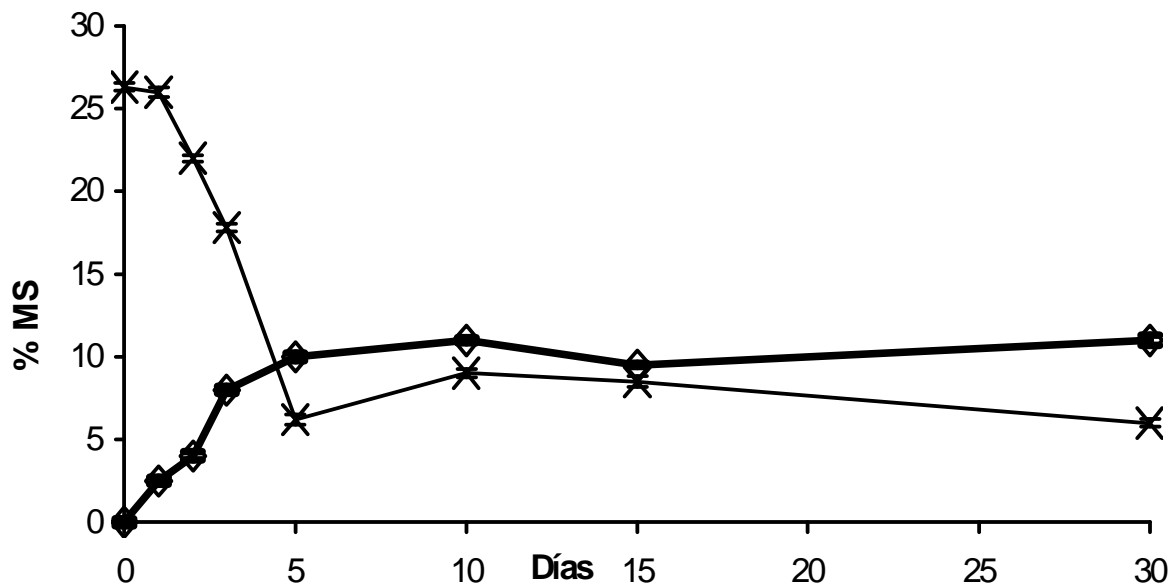


Figura 4.3. Producción de ácido láctico respecto al consumo de azúcares para el producto inoculado con la bacteria ácido láctica L08. —◆— Láctico —\*— Azúcares

## 4.2 Fermentación en medio sólido

La fermentación en medio sólido se refiere al tratamiento de un material húmedo no suspendido en el agua y sin escurrimiento acuoso que permite el desarrollo de una fermentación empleando uno o varios microorganismos. En todos los casos, los microorganismos utilizados pueden ser hongos, bacterias o levaduras (Gutiérrez y Favela, 1995).

En esta sección se presentan los resultados obtenidos durante la fermentación de pulpa de café ensilada respecto de la actividad respiratoria de *Penicillium comune*.

Los resultados de velocidad de producción de CO<sub>2</sub>, calculados con la ecuación descrita por Saucedo-Castañeda y col en 1994, se presentan en la Figura 4.3. Se observa un aumento rápido en la producción de CO<sub>2</sub> durante las primeras 30 horas de cultivo.

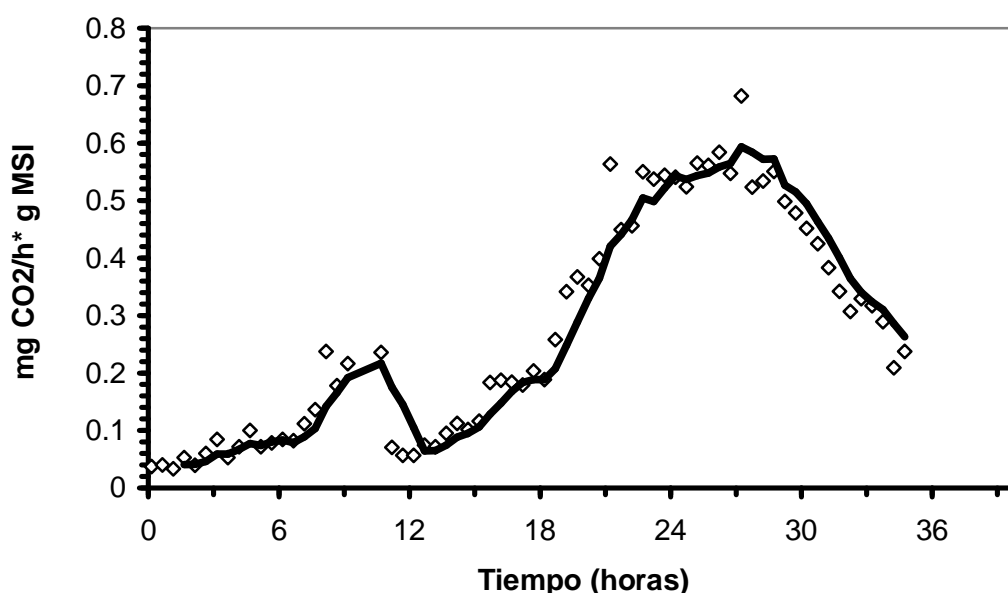


Figura 4.3. Comportamiento de la velocidad de producción de CO<sub>2</sub>.

Aproximadamente a las 27 horas se alcanzó la máxima velocidad en el intervalo de 0.58 y 0.60 mg/h g MSI.

Como se mencionó anteriormente se trabajó con pulpa seca humidificada, la cual fue ensilada para su posterior inoculación con el hongo *Penicillium commune*, de tal manera que podría suponerse que durante las primeras horas de cultivo existió una respiración por microorganismos endógenos de la pulpa de café, tal como puede verse en la figura 4.3 el primer pico de la Figura representa la producción de CO<sub>2</sub> de dichos microorganismos (Perraud-Gaime, 1995).

El comportamiento observado pasadas las primeras 15 horas de cultivo corresponde con la fase de crecimiento vegetativo del hongo. Este período se caracteriza por una multiplicación activa del micelio, durante la etapa de crecimiento exponencial, por lo que la velocidad de producción de CO<sub>2</sub> aumentó proporcionalmente al aumento de la biomasa del hongo (Romano, 1996).

La fermentación se detuvo a las 36 horas para evitar la esporulación del hongo, este efecto está relacionado con la disminución en la velocidad de producción de CO<sub>2</sub> tal como puede verse en la Figura 4.3.

De esta manera puede concluirse que la fermentación cumplió con el objetivo planteado en el objetivo inicial, ya que el proceso de respiración durante la fermentación permitió el desarrollo adecuado del hongo, el monitoreo de los gases permitió estimar el tiempo de desarrollo del hongo hasta el momento previo de la esporulación, meta planeada para poder utilizar la pulpa de café fermentada en la alimentación de las crías de tilapia.

#### **4.4 Composición química de la pulpa de café sometida a procesos de fermentación.**

La Tabla 4.1 muestra los parámetros más importantes a considerar para su utilización como complemento en dietas para peces.



**Tabla 4.1. Composición química general de la pulpa de café sometida a diferentes procesos.**

Parámetro	Pulpa seca	Pulpa ensilada	Pulpa ensilada y fermentada	Pulpa ensilada, fermentada y re-ensilada
Húmedad (%)	5.9	5.9	5.9	5.9
Materia seca (%)	94.0	94.1	94.0	94.1
Cenizas (%BS)	5.5	6.3	7.8	9.5
<b>Fibra cruda (%BS)</b>	<b>12.8</b>	<b>16.2</b>	<b>24.5</b>	<b>18.3</b>
Grasa (%BS)	2.03	3.46	2.90	4.05
Valor energético (Kcal/100g)	312.9	303.5	261.4	285.2
<b>Carbohidratos (%BS)</b>	<b>65.1</b>	<b>57.9</b>	<b>44.7</b>	<b>48.7</b>
<b>Proteína (N*6.25)</b>	<b>8.6</b>	<b>10.2</b>	<b>14.2</b>	<b>13.5</b>
pH	5.7	3.6	5.6	4.3
Cafeína (%)	0.47	0.39	0.06	0.06
Polifenoles (mg eq AG/MS)	55.3	33.6	29	15.8

Como puede observarse el procesamiento al que fue sometida la pulpa de café modifica la composición inicial de cada parámetro, a continuación se especifican los más importantes:

**4.4.1 Fibra cruda:** Está expresada en base seca (%), puede observarse en la Tabla 4.1 un porcentaje inicial en la pulpa seca de 12.8 y un máximo de 24.5% en la pulpa fermentada.

El aumento a través de los procesos fermentativos se debe principalmente al crecimiento microbiano de cada uno de los inóculos en cada fermentación, la presencia del inóculo de *Penicillium commune* durante la fermentación aerobia,

favorece sustancialmente el aumento de este parámetro ya que la pared celular de los hongos filamentosos es una estructura dinámica muy compleja, es el sitio de actividad de diversas enzimas. La composición química de la pared celular de los hongos filamentosos contiene macromoléculas estructurales de quitina y celulosa, ambas con muchos otros polisacáridos y cantidades específicas de proteínas y lípidos. Los polisacáridos forman parte cerca del 80-90% del peso seco de la pared celular del hongo, entre estos se encuentran las: Hexosas, metilpentosas, pentosas y ácidos hexunóricos. (Smith, 1975).

En la pulpa de café la celulosa, es el principal constituyente de la fracción conocida como fibra cruda, la cual no puede ser utilizada por los peces ya que la enzima responsable de su hidrólisis “la celulasa” no es un constituyente de su complejo enzimático digestivo.

Como puede notarse la pulpa fermentada presenta la mayor cantidad de fibra y mientras más fibra cruda posee una ración, menos digerible es esa ración. Esto en sí no representa un problema ya que lo que no se digiere se excreta, si no fuera por el hecho de que la fibra cruda contribuye con volumen que llena al animal, el cual consecuentemente, ingiere cantidades proporcionalmente menores de los otros ingredientes de la ración.

El resultado neto de esta situación es que el animal prosperará mejor con una dieta que contenga cantidades bajas de fibra que con una que contenga altos niveles de este constituyente.

Respecto de esto cabe señalar que los animales monogástricos tal es el caso de los peces, a diferencia de los rumiantes, no pueden beneficiarse de algunos constituyentes de los alimentos o, en el mejor de los casos, pueden utilizarlos sólo en cantidades limitadas (Braham, 1978).

**4.4.2 Carbohidratos:** Los carbohidratos pueden actuar como fuente de energía inmediata o como una reserva energética rápidamente disponible, almacenada como glucógeno en el hígado y músculos (Satoh, 1991). Sin embargo, es muy difícil estimar el nivel de carbohidratos en la dieta que podría utilizar el pez, ya que las proteínas y lípidos pueden ser usados, además, como fuentes de energía, y su nivel en la dieta podría afectar la utilización de los carbohidratos (Wilson, 1994).

La pulpa de café contiene carbohidratos entre los que se encuentran; la celulosa (17.7%), sustancias pécticas (6.5%), azúcares reductores (12.4%) y no reductores (2%) (Elías, 1978). Puede observarse que en la pulpa seca hay un 65.1% en base seca y que a través de los procesos disminuyó hasta un 44.7% en la pulpa fermentada.

Esta disminución en el contenido de los carbohidratos se debió principalmente a la acción enzimática, degradando las sustancias pécticas y la celulosa, los azúcares fueron utilizados como fuente de carbono durante la fermentación para la producción de ácido láctico.

Los procesos fermentativos brindaron un efecto benéfico ya que llevaron a cabo la ruptura de las paredes celulares indigestibles, aumentando la disponibilidad de los nutrientes mejorando la digestibilidad de los carbohidratos (De la Higuera, 1987), de tal manera que por esta razón la pulpa fermentada fue la que mejores resultados brindó de los productos obtenidos a partir de la pulpa de café.

En la pulpa de café seca, no hubo una digestibilidad de la dieta y esto debido primeramente al alto contenido de carbohidratos ya que como lo menciona Cowey (1985), en los peces existe un uso preferencial de la proteína sobre los carbohidratos, como fuente de energía.

Esto se explica porque el medio acuático permite a los peces excretar amoníaco como principal catabolito del metabolismo nitrogenado, lo que les libera de convertir el amoníaco en otras moléculas nitrogenadas, permitiendo obtener más energía metabolizable del catabolismo proteico.

**4.4.3 Proteína:** La calidad de las proteínas depende de su digestibilidad, valor biológico (balance de aminoácidos esenciales y su disponibilidad individual) y su utilización neta (NRC 1983, Satoh 1991). El peso ganado y la retención de nitrógeno son usados como criterios indicadores. Los índices más utilizados son: La tasa de eficiencia de las proteínas, el valor biológico y la utilización neta de las proteínas.

La pulpa de café seca presentó un 8.6 % de proteína inicial y a través de los procesos fermentativos se logró alcanzar hasta un 14.2 % en la pulpa fermentada.

El aumento en el contenido de proteína durante los procesos fermentativos (en el caso de la pulpa ensilada y la pulpa fermentada) se debe principalmente al crecimiento microbiano tanto de *Lactobacillus plantarum* como de *Penicillium commune*, cabe resaltar que el por ciento de proteína reportado en la Tabla 4.1 fue calculado de acuerdo a la concentración de Nitrógeno total de la muestra, de tal manera que el aumento aparente del nitrógeno total es causado por una disminución en la cantidad de Sólidos presentes, lo que conlleva a una disminución en el contenido de carbono por el desprendimiento de CO<sub>2</sub> debido a la Fermentación durante el ensilaje y a la respiración durante la Fermentación en Medio Sólido.

Tal como lo menciona De la Higuera (1987), "El criterio de cantidad/calidad proteica" va estrechamente ligado al concepto de digestibilidad.

Una fuente proteica puede tener un alto contenido de proteína y presentar un buen patrón de aminoácidos esenciales, pero si su digestibilidad es baja, la cantidad absorbida de cada uno de los aminoácidos puede no cubrir en su conjunto las necesidades para el crecimiento, tal es el caso de la dieta con 100% de inclusión de harina de pescado (Tabla 4.2). Esta tiene un alto contenido proteico, sin embargo presenta baja digestibilidad para los organismos en experimentación, esto porque las tilapias en sus primeros estadios de vida son herbívoras (principalmente *Oreochromis niloticus*), el contenido proteico de la harina de pescado es de tipo animal, lo que impide que sea totalmente asimilada por las crías.

En lo que a las dietas con pulpa de café se refiere se puede observar que la pulpa fermentada presentó mayor por ciento de digestibilidad aparente de la proteína (Tabla 4.2) a menor consumo, con esto se puede concluir que los procesos de fermentación ayudan a mejorar la calidad nutricional de la pulpa de café, suministrando proteína de origen vegetal, lo que resulta adecuado para la especie y la edad de los organismos manejados en esta experimentación.

**4.4.4 Cafeína:** En los últimos años, se han llevado a cabo diversos estudios con el fin de disminuir o eliminar los compuestos tóxicos de la pulpa de café, para poder utilizarla eficientemente en la alimentación animal. Recientemente los métodos biológicos de eliminación de sustancias de naturaleza compleja o tóxicos por degradación microbiana han atraído el interés de diversos investigadores como una alternativa interesante desde el punto de vista ecológico (Aquiahuatl, 1992).

La pulpa de café presentó un porcentaje inicial en base seca de 0.47. Una vez ensilada logró disminuirse hasta 0.39 % obteniendo aproximadamente un 17 % de degradación.

El ensilaje de pulpa de café da como resultado una disminución importante en el contenido de taninos y cafeína, debido a su solubilización y pérdida en los líquidos de drenado, más que a una actividad microbiana (Murillo, 1979).

Posteriormente al ensilaje de la pulpa se procedió a llevar a cabo un cultivo aerobio con el hongo *Penicillium commune*. Cabe resaltar que la mayoría de los hongos pueden sobrevivir en condiciones extremas y limitadas además de que tienen la capacidad de producir gran cantidad de esporas que se liberan y dispersan con gran eficiencia, las cuales germinarán cuando las condiciones se tornen favorables, de tal manera que prácticamente cualquier habitat es susceptible de ser colonizado por estos organismos (Aquiahuatl, 1992).

Considerando que el inóculo de esporas ( $10^7$  esp g MSI) fue colocado en la pulpa ensilada la cuál representó ser un sustrato adecuado para dicho hongo, ya que su contenido de azúcares fue utilizado como fuente de carbono y el contenido de cafeína fue utilizado como fuente de carbono y nitrógeno, condiciones que permitieron un desarrollo favorable del hongo, cumpliendo así con el objetivo inicial de la fermentación, reducir el contenido de cafeína.

Esto puede observarse en la Tabla 4.1, ya que de 0.39 % logró disminuirse hasta 0.06 % lo que representa aproximadamente un 87 % de degradación.

#### **4.4.5 Polifenoles:**

Es importante señalar que al hacer una comparación de estos resultados con los de la bibliografía se encuentra diferencia significativa en la concentración de compuestos fenólicos totales.

Zuluaga en 1981 reportó un contenido de 6.62 mg/100 mg de compuestos fenólicos en la pulpa de café secada al sol y contenido de 6.29 mg/100 mg en pulpa liofilizada con un método de extracción diferente al aquí empleado.

Como se puede ver en la Tabla 4.1 existe una variación en cuanto a la cantidad de polifenoles totales, existiendo mayor cantidad en la pulpa seca de 55.3 mg eq AG/MS, logrando modificarlos en el re-ensilaje hasta 15.8 mg eq AG/MS.

No se podría definir exactamente que cantidad o que tipo de polifenoles fueron eliminados, de tal manera que durante esta parte solo se puede deducir la presencia o ausencia de polifenoles.

Sin embargo los resultados no son necesariamente inconsistentes ya que si se considera que el método de extracción no fue el adecuado para una cuantificación específica la cuál permitiera definir el tipo y la cantidad del polifenol, por lo menos permite saber que los procesos de fermentación los modifica en forma relativa de alguna manera.

#### **4.5 Utilización y digestibilidad del alimento**

En la figura 4.4 se presenta el crecimiento en peso promedio de los organismos durante un período experimental de ocho semanas. El tratamiento control presentó un mayor crecimiento con respecto a las dietas adicionadas con pulpa de café.

Esta diferencia se nota a partir de la segunda semana. Respecto a las dietas adicionadas con pulpa de café, las cuatro siguieron un crecimiento proporcional notándose que a partir de la quinta semana los peces alimentados con la dieta adicionada con pulpa de café fermentada presentaron mayor crecimiento.

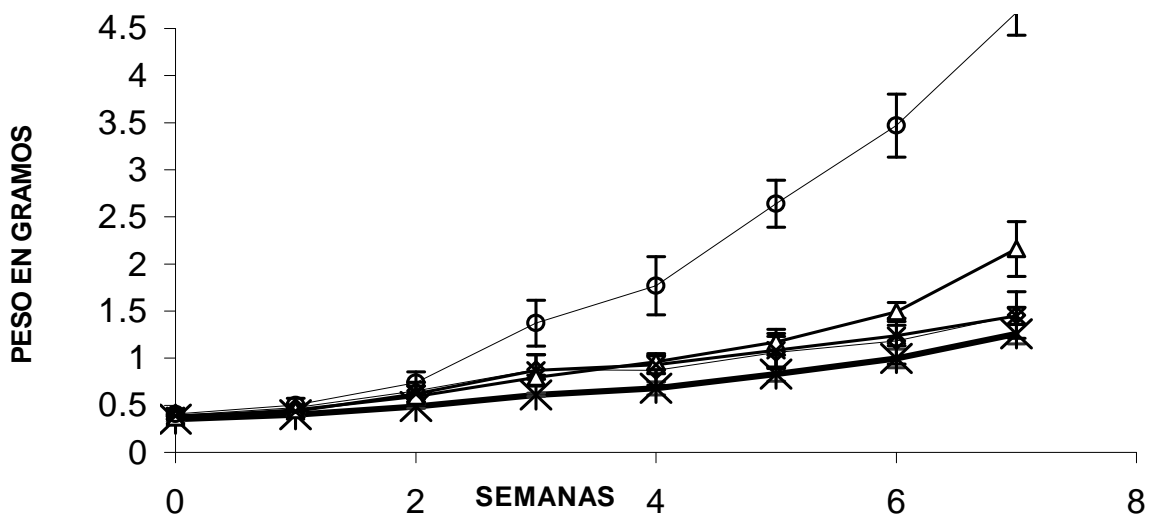


Figura 4.4. Crecimiento en peso promedio de los peces alimentados con dietas adicionadas con pulpa de café.

—\*— PS    —◇— PE    —△— PF    —×— PRE    —○— HP

En la Tabla 4.2 se presentan los resultados en términos de crecimiento y utilización del alimento, en cuanto a la sobrevivencia se observa que el tratamiento adicionado con pulpa seca (PS) presenta diferencia significativa respecto a los demás tratamientos, siendo la dieta que menos mortalidad presentó.

Esto se atribuye principalmente a las características bromatológicas y químicas de la pulpa de café, constatándose principalmente que dichos organismos obtuvieron el menor peso promedio final ya que consumieron menor cantidad de alimento.

Como se nota en la Tabla 4.2, la PS contiene el mayor porcentaje de carbohidratos, respecto de los otros productos, Considerando que el contenido de carbohidratos en el pez es mínimo (menos del 1% en peso húmedo), después de que son absorbidos, éstos son quemados para producir energía o almacenados temporalmente como glucógeno o grasa la cuál se deposita como reserva de energía en los tejidos (Guzmán y López, 2000).



Los carbohidratos también pueden servir como precursores de varios compuestos importantes, tales como aminoácidos no esenciales, necesarios para el crecimiento (Lovell, 1989; Piper y col, 1989), sin embargo, no se ha demostrado que los peces requieran este nutriente.

La digestión de los carbohidratos es afectada y estimulada por el jugo estomacal, pero el factor más importante en la hidrólisis de estos son las carbohidrasas. Estas enzimas son de especial interés en peces debido a que no todos digieren carbohidratos con la misma eficiencia y algunos carecen de esta capacidad. La dificultad de asimilar los carbohidratos por los peces es uno de los factores que aumentan más el costo del alimento (Hepher, 1990). Además hay que considerar que la PS, adicionalmente a su contenido de carbohidratos, también presenta el menor contenido de proteína y cuenta con la presencia de compuestos antifisiológicos como la cafeína y antinutricionales como los polifenoles.

Tabla 4.2. Utilización de pulpa de café en crías de tilapia nilótica.

Parámetros	PS	PE	PF	PRE	HP	E.E.±
<b>Sobrevivencia (%)</b>	<b>93<sup>b</sup></b>	<b>63<sup>ab</sup></b>	<b>53<sup>a</sup></b>	<b>53<sup>a</sup></b>	<b>57<sup>a</sup></b>	<b>1.753</b>
Peso promedio inicial (gramos)	0.353 <sup>a</sup>	0.391 <sup>a</sup>	0.373 <sup>a</sup>	0.389 <sup>a</sup>	0.406 <sup>a</sup>	
<b>Peso promedio final (gramos)</b>	<b>1.25<sup>a</sup></b>	<b>1.48<sup>a</sup></b>	<b>2.26<sup>b</sup></b>	<b>1.45<sup>a</sup></b>	<b>4.72<sup>c</sup></b>	<b>0.256</b>
Alimento consumido individual (mg/día)	49.6 <sup>a</sup>	68 <sup>ab</sup>	81 <sup>b</sup>	70 <sup>ab</sup>	145 <sup>c</sup>	4.523
<b>Factor de conversión alimenticia</b>	<b>2.72<sup>b</sup></b>	<b>3.08<sup>b</sup></b>	<b>2.08<sup>a</sup></b>	<b>3.22<sup>b</sup></b>	<b>1.64<sup>c</sup></b>	<b>0.096</b>
Tasa específica de crecimiento (%/día)	2.58 <sup>a</sup>	2.70 <sup>a</sup>	3.66 <sup>b</sup>	2.69 <sup>a</sup>	5.01 <sup>c</sup>	0.123
<b>Consumo de proteína (mg/día)</b>	<b>19<sup>a</sup></b>	<b>27<sup>a</sup></b>	<b>32<sup>b</sup></b>	<b>25</b>	<b>60</b>	<b>1.523</b>
<b>Digestibilidad aparente de la proteína (%)</b>	<b>75.9<sup>c</sup></b>	<b>70.7<sup>b</sup></b>	<b>76.1<sup>c</sup></b>	<b>66.4<sup>a</sup></b>	<b>74.4<sup>bc</sup></b>	<b>2.456</b>
<b>Digestibilidad aparente de la materia orgánica(%)</b>	<b>42.3<sup>a</sup></b>	<b>38.9<sup>a</sup></b>	<b>99.9<sup>c</sup></b>	<b>41.6<sup>a</sup></b>	<b>60.1<sup>b</sup></b>	<b>1.156</b>
Utilización aparente del nitrógeno (%)	15.927 <sup>a</sup>	15.723 <sup>a</sup>	22.97 <sup>b</sup>	13.817 <sup>a</sup>	24.307 <sup>b</sup>	2.528

Valores con el mismo superíndice no tienen diferencia estadística ( $\alpha=0.05$ ).

Se observa que el tratamiento sin pulpa de café (HP) obtuvo el mayor peso promedio final, y el menor valor en cuanto al factor de conversión alimenticia, el cuál nos indica que por cada unidad de alimento consumido el organismo gana aproximadamente una unidad en peso, de tal manera que los peces alimentados con la dieta con pulpa fermentada (PF) necesitan consumir dos veces más alimento para aumentar una unidad de peso, los peces alimentados con la dieta de pulpa re-ensilada son los que menos aprovechan adecuadamente el alimento.

De las dietas adicionadas con pulpa de café, la dieta con pulpa fermentada (PF) fue la que mejores resultados brindó en cuanto a factor de conversión alimenticia, consumo de proteína, digestibilidad aparente de la proteína y digestibilidad aparente de la materia orgánica. Además de que bromatológicamente contiene el mayor porcentaje de proteína, de fibra y en lo que a compuestos tóxicos se refiere, con el proceso se ve modificado el por ciento de polifenoles así como también se ve reducido el por ciento de cafeína.

La proteína es el nutriente básico constituyente del crecimiento de cualquier animal, anatómicamente como constituyente del músculo, es el mayor componente del pez. La proteína usualmente constituye aproximadamente del 68 al 85 % de la materia seca del cadáver del pez (Jauncey y Ross, 1982).

Para que el nivel de la proteína dietética produzca el máximo crecimiento en los peces debe considerarse lo siguiente:

1. El contenido de energía de la dieta.
2. El estado fisiológico del pez (edad, sexo, estado reproductivo y factores ambientales, tales como la temperatura oxígeno disuelto y salinidad)
3. La calidad de la proteína (disponibilidad y perfil de aminoácidos).
4. Nivel de la ingesta (Jauncey y Ross, 1982).

La cadena alimenticia de las tilapias es un punto muy importante para la formulación y los regímenes alimenticios en un sistema de cultivo. Las tilapias son predominantemente herbívoras y omnívoras. Su dieta natural está constituida en mayor o en menor grado por plantas superiores, detritos vegetales, algas azul-verdes, diatomeas, fitoplancton, fitobentos, perifiton, macrofitas acuáticas, zooplancton y bacterias, existiendo variaciones en cuanto a preferencias alimenticias, según la especie y condiciones de cultivo (Olvera, 1996).

La alimentación de juveniles se constituye principalmente de fitoplancton y de pequeños invertebrados, especialmente crustáceos (LeRoux, 1956), según la especie, material animal también puede ser consumido sin embargo no constituye una proporción significativa de la ingesta total (Bowen, 1982).

El rango potencial de digestión alimenticia se ve limitado por la estructura del tracto digestivo. El canal alimentario de tilapias es relativamente simple, consiste de un pequeño estómago (semejante a un saco) y un intestino largo enrollado, dicha estructura es propia de organismos de hábitos alimenticios herbívoros (Jauncey y Ross, 1982).

Cabe resaltar que el tipo de proteína producida durante la fermentación es unicelular, y gran parte de esta biomasa fue producida principalmente por el hongo *Penicillium commune*. La proteína unicelular es una buena fuente de proteína, minerales y vitaminas, particularmente B<sub>12</sub>. Sin embargo, existen problemas asociados con el uso de proteína unicelular como complemento alimenticio, tales como: palatabilidad, digestibilidad, contienen fósforo, presentan deficiencias en cuanto al perfil de aminoácidos, pueden secretar sustancias tóxicas (micotoxinas, por ejemplo), toxicidad por minerales y desbalanceo, infección microbiana y por último la posible presencia de compuestos tóxicos o carcinogénicos, de sabores y olores desagradables (Tacon, 1979).

Con esto podría justificarse la diferencia en cuanto peso final de las dietas con pulpa de café, respecto de la dieta sin pulpa de café (HP). En cuanto a la utilización aparente del nitrógeno (UAN), no hubo diferencia significativa entre la dieta control (HP) y la dieta con pulpa fermentada (PF). Siendo estas dos diferentes a los demás tratamientos, lo que indica un mejor aprovechamiento de la proteína para la formación de tejidos.

A pesar de que los peces alimentados con la dieta sin pulpa de café (HP) crecieron más y presentaron el mejor factor de conversión alimenticia, presentaron digestibilidad aparente de la proteína sin diferencia significativa respecto de la dieta adicionada con pulpa fermentada (PF), incluso siendo el consumo de proteína por parte de los peces casi del doble de la dieta sin pulpa de café (HP) respecto de la dieta con pulpa fermentada (PF), esto justifica los datos mostrados en la Tabla 4.3, en donde puede verse que el contenido de grasa total es mayor en HP, lo que nos indica que debido a la edad y especie utilizada durante esta experimentación, este tipo de alimento no representa ser el mejor ni el más adecuado, debido a las especificaciones antes descritas.

Cabe mencionar que los organismos tienen requerimientos propios de asimilación de nutrientes, así que la cantidad extra que consumen de proteína los organismos de la dieta HP, no la asimilan, pero como la consumen, esta cantidad se ve traducida en grasa, factor que afecta la calidad del pez y principalmente afecta los intereses del acuicultor.

Respecto del contenido de proteína en el músculo propio del pez (Tabla 4.3), puede notarse que las dietas provistas de proteína unicelular; pulpa ensilada (PE) y pulpa fermentada (PF), presentan el mayor porcentaje, hecho que coteja que organismos de la edad, talla y peso con que se trabajó (3 semanas de nacidos con 300 mg de peso) asimilan mejor la proteína propia de sus hábitos alimenticios.

Tabla 4.3. Composición proximal de los peces al final del experimento (%)

<b>COMPOSICIÓN</b>	<b>Inicial</b>	<b>PS</b>	<b>PE</b>	<b>PF</b>	<b>PRE</b>	<b>HP</b>
Humedad (%)	74.1 <sup>a</sup>	76.2 <sup>a</sup>	73.1 <sup>a</sup>	73.9 <sup>a</sup>	75.36 <sup>a</sup>	73.4 <sup>a</sup>
Proteína cruda (% BH)	15.1 <sup>a</sup>	16.3 <sup>a</sup>	18.2 <sup>b</sup>	18.2 <sup>b</sup>	15.8 <sup>a</sup>	16.3 <sup>a</sup>
Grasa cruda (%)	7.3 <sup>a</sup>	15.3 <sup>a</sup>	12.4 <sup>a</sup>	17.4 <sup>b</sup>	18.2 <sup>b</sup>	24.5 <sup>c</sup>

Valores con el mismo superíndice por renglón no presentan diferencia estadística ( $\alpha=0.05$ )

Por esta razón, podría considerarse a la pulpa fermentada como un buen sustituto de proteína animal para esta especie, siempre y cuando se pueda brindar a la especie adecuada en la edad indicada, en la cual los organismos tengan la capacidad de digerir y asimilar adecuadamente el alimento que se les brinde.

## 5. CONCLUSIONES

1. El ensilaje es un método eficiente de conservación de la pulpa de café.
2. El ensilaje se desarrolló adecuadamente, sin embargo el inóculo estuvo por debajo de la concentración de la microflora endógena, por lo cuál las características del ensilaje se consideran de un ensilaje natural.
3. La presencia de levaduras favorece la competencia por el sustrato, lo que resulta en un nivel de acidificación menor.
4. A las 36 horas de fermentación en medio sólido, la pulpa de café, alcanzó aproximadamente un 87 % de degradación de cafeína, en cultivo con *Penicillium commune*.
5. Los procesos de fermentación sólida (aerobia y anaerobia), mejoran la calidad nutricional de la pulpa de café, aumentando el porcentaje en proteína (unicelular), y disminuyendo tanto su contenido de carbohidratos como en compuestos tóxicos.
6. La dieta sin pulpa de café a base de harina de pescado presentó el mayor peso final, el mejor factor de conversión de alimenticia, pero alto consumo de proteína, sin diferencia significativa en la digestibilidad aparente de la proteína respecto de la dieta con pulpa fermentada.
7. La pulpa fermentada, tiene los valores más aceptables en acuicultura, de proteína, carbohidratos y compuestos tóxicos, lo que la convierte en el mejor producto respecto de las otras dietas preparadas con pulpa de café. Además de ser la más eficiente en cuanto a asimilación y aprovechamiento de la proteína, incluso de la propia dieta sin pulpa de café (HP).

## 6. RECOMENDACIONES

1. La pulpa de café resulta ser un sustrato adecuado para la alimentación animal por lo que sería recomendable, trabajar con pulpa de café ensilada como base para el desarrollo de los procesos de fermentación ya que de esta manera se aprovechará más el contenido natural de dicha pulpa.
  
2. Debido a las características obtenidas durante los procesos de fermentación es factible utilizarla como alimento en peces, siempre y cuando se consideren los siguientes puntos:
  - Se trabaje con la especie adecuada, con hábitos alimenticios propios que le permitan al organismo aprovechar el alimento brindado.
  
  - Se utilicen organismos de mayor edad, ya que esto les permitirá tener sus órganos digestivos bien diferenciados, además de que ya contarán con las enzimas digestivas propias que les permita asimilar el alimento brindado.
  
3. Es necesario hacer un seguimiento de las variables fisicoquímicas más importantes, tales como: nitritos, nitratos y amonio para tener un control de la calidad del agua en el sistema, ya que de esto dependerá en gran parte un buen desarrollo del bioensayo.

## 7. LITERATURA CITADA

**AUSTRENG, E., Y REFSTIE, T.** 1979. Effect of varying dietary protein level in different families of rainbow trout. *Aquaculture*, 18:145-156.

**A.O.A.C.** 1990. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemist, 14<sup>th</sup> edition Arlington. Washington, d.c. 3413 pp.

**ARREDONDO, F. J. L. Y GUZMÁN ARROYO, M.** 1986. Actual situación taxonómica de la especie Tilapiini (PISCES: Cichilidae) introducidas en México. *Rev. Zoo.* (1) 555-572. 20 XI-1986.

**AQUIAHUATL, R.A., RAIMBAULT, M., ROUSSOS, S. Y TREJO M.R.** 1988. Coffee pulp detoxification by solid state fermentation: isolation, identification and physiological studies. En: Proceedings of the seminar solid state. Fermentation in Bioconversion of Agroindustrial Raw materials, Raimbault, M., ORSTOM. (Eds), Montpellier France, 13-26.

**AQUIAHUATL, R.A.** 1992. Detoxificación de la pulpa de café: Morfología, fisiología y Bioquímica de hongos filamentosos que degradan la cafeína. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de México. Facultad de Ciencias. 72 p.

**BARDACH, J. E., RYTHER, J. AND Mc LARNEY, W. O.** 1972. *Aquaculture the farming and husbandry of freshwater and marine organisms.* Wiley. Intersciencie, N. Y. 350-384.

**BAYNE, D., DUSETH D, Y GARCÍA, C.** 1976. Supplemental feeds containing coffee pulp for rearing *Tilapia* in Central America. *Aquaculture*, 7:133-146.

**BENDAÑA, G.G.** 1977. Efecto de tratamientos alcalinos por remojo y contacto sobre el valor nutritivo y composición química de la pulpa de café fresca o ensilada. Tesis (Magister Scientifcae). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Guatemala, 1977. 50 p.

**BERGOT, F.** 1979. Carbohydrate in rainbow trout diets: effect of the level and source of carbohydrate and the number of meals on growth and body composition. *Aquaculture*. 18: 157-167.

**BRAHAM, J.E. Y BRESSANI, R.** 1978. Pulpa de café en otras especies, INCAP, Guatemala. 89-96 pp.

**BRESSANI, R.** 1978. Factores antifisiológicos en la pulpa de café. *In Pulpa de café: Composición, tecnología y utilización.* Braham, J.E. y Bressani, R. (Eds), INCAP. 143-152.



**BRESSANI, R., ESTRADA, E. Y JARQUÍN R.** 1972. Pulpa y pergamino de café. I. Composición química y contenido de aminoácidos de la proteína de la pulpa. Turrialba, 22(3):299-304.

**BRESSANI, R. Y BRAHAM, J.E.**1980. Utilization of coffee pulp as animal feed. En; ASK 9<sup>o</sup> Colloquium on Coffee. Londres, Inglaterra.303-323 p.

**BOWEN, S.H.** 1982. Feeding, digestion and growth qualitative considerations. In: The Biology and culture of tilapias. Pullin, R,S.V. and Lowe-McConnell, R.H. (eds). Iclarm (Manila). Proc. Int. Conf. On the Biology and Culture of tilapias.

**CABEZAS. M,T., FLORES A., Y EGAÑA, J.E.** 1978. Uso de la pulpa de café en alimentación de rumiantes. En pulpa de café: composición, tecnología y utilización. Braham, J.E. y Bressani, R. (Eds), INCAP, 45-67.

**CHO, C. Y KAUSHIK. S.J.** 1985. Effects of protein intake on metabolizable and net energy values of fish diets. En.: Nutrition and feeding in fish. Cowey,, C.B., Mackie, A. M. y Bell. J.G. eds. Academic Press, London, pp. 95-118.

**CHRISTENSEN, M.** 1981. Preliminary tests on the suitability of coffee pulp in the diets of common carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Clarias mossambicus* Peters). Aquaculture, 25:235-242.

**CLIFFORD, M.N.** 1985. Chlorogenics acids *In* Clarke R.J. Maurae, R. (Eds). Coffee. Vol. 1. Chemistry London, elsevier, 153-202.

**COLLINS, R.A., Y DELMONDO, M.N.**1976. Comparative economics of aquaculture in cages, raceways and aclosures. FAO Technical Conference on Aquaculture, Japan, 1976, FIR AQ/Conf/76/R. 37, 11 pp.

**COWEY, C.B., COOKE, D.J., MATTY, A. J., ADRON, J.W.** 1981. Effects of quantity and quality of dietary protein on certain enzyme activities in rainbow trout, *J. Nutr.*, 111:336-345.

**DENIS, S.** 1992. La degradation de la caféine pour deux champignons filamenteux: *Aspergillus oryzae* et *Penicillium roqueforti*. Rapport de DEA, Faculté del Sciences, Université de Montpellier, 30 p.

**DE LA HIGUERA, M.** 1987. Protein and energy from soya in fish nutrition. Fullfat Soya, a Regional Conference. Milán Abril, 1987.

**DE LA HIGUERA, M., Y CARDENAS, P.** 1985. Influence of dietary composition of gluconeogenesis from L-(U-14C) glutamate in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 81: 391-395.

**DE LA HIGUERA, M., GARCIA, M., SANZ, A. Y CARDENETE, G.** 1985. Digestive and nutritive utilization of lupin-seed meal incorporated to rainbow trout diets. Preliminary results. Fish Culture Conference. Barcelona.

**DE SILVA, S. S. AND ANDERSON, T.A.** 1995. Fish Nutrition in aquaculture. 1<sup>st</sup> Edition. Aquaculture Series 1. Chapman and Hall, 319 pp.

**DE SILVA, S. AND M. PERERA.**1984. Digestibility in *Sarotherodon niloticus* fry:effect of dietary protein level and salinity with further observations on variability in daily digestibility. Aquaculture, 38:293-306.

**DUNCAN, D.B.** 1955. Multiple range and multiple F-tests. Biometrics, 11:1-42.

**ELÍAS, L.G.**1978. Composición química de la pulpa de café y otros subproductos. In, Pulpa de café: composición, tecnología y utilización. Braham, J.E. y Bressani, R. (Eds), INCAP, 19-29.

**EL-SAYED, A. AND S. TESHIMA.** 1991. Tilapia nutrition in aquaculture. Reviews in Aquatic sciences, 5: 247—265.

**FAO.** 1983. Fish feeds and feeding in developing countries, UNDPL, FAO. ADCP/REP/83/18.97 pp.

**FAO.** 1989. Smoke curing of fish. Fish Rep. (88) 43.

**FAVELA, E., HUERTA, S., ROUSSOS, S., OLIVARES, G., NAVA, G., VINIEGRA, G.G. y GUTIÉRREZ, M.**1989. Producción de enzimas a partir de pulpa de café y su aplicación en el beneficio húmedo. In Memorias, I.Sem.Intern.Biotechnol.Agroindust. Café (ISIBAC), Roussos, Licono y Gutiérrez (Eds), Jalapa, México, 145-151.

**FURUICHI, M, Y YONE, Y.,** 1980. Effect of dietary dextrin levels on the growth and feed efficiency, the chemical composition of liver and dorsal muscle and the absorption of dietary protein and dextrin in fishes. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 46: 225-229.

**FURUKAWA, H. AND TSUKAHARA, H.** 1966. On the acid digestion method for the determination of chromic oxide as an index substance in the study of digestibility of fish fed. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 32(6): 502-508.

**GARCÍA, R. Y BAYNE.** 1974. Cultivo de tilapia aurea (*Steindachner*) en corrales con alimentación suplementaria. FAO. Boletín de Acuicultura.

**GUTIERREZ, R.M. Y FAVELA, T.E.** 1995. Biotecnología: Fundamentos y aplicaciones de los procesos de fermentación en Medio Sólido. 146 p.

**GUZMÁN, M. ME. Y LÓPEZ, M. W.G.** 2000. Efecto de la inclusión de probióticos en dietas sobre el crecimiento y actividad enzimática intestinal en tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) bajo condiciones de alta densidad. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Yucatán. 73 p.

**HESSELTINE, C.W.**1987. Solid State Fermentation. An Overview. *Int. Biodeterioration*, 23, 79-89.

**HEINSBROEK, L.**1990. growth and fish Culture and Fisheries, Wageningen agricultural University, Holland. 93 p.

**HEPHER, B.** 1990. Nutrition of pond fishes. Cambridge University Press, Cambridge, 388 p.

**HILTON, J.W., Y ATKINSON, J. L.** 1982. Response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to increased levels of available carbohydrate in practical trout diets. *Br. J. Nutr.* 47: 597-607.

**HILTON, J.W., CHO, C. Y., SLINGER, S.J.** 1981. Effect of extrusion processing and steam pelleting diets on pellet durability, pellet water absorption, and the physiological response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 25: 185-194.

**HILTON, J.W., Y SLINGER, S.J.** 1986. Digestibility and utilization of canola meal in practical type diets for Rainbow Trout (*Salmo gairdnerii*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43:1149-1155.

**JAUNCEY, K. AND ROSS, B.** 1982. A Guide to Tilapia Feeds and Feeding. Institute of Aquaculture University of Stirling, Scotland, 111 pp.

**JOBLING, M.**1994. Fish Bioenergetics. Chapman Y Hall (eds.), London, UK. 309 p.

**KETOLA, H.G.** 1982. Amino acid nutrition of fishes, requeriments and supplementation of diets. *Comp. Biochem. Physiol*, 73: 17-24.

**KIHLBERG, R.** 1972. The microbe as source of food. *Annual review of Microbiology*, 26: 427-466.

**LE ROUX, P.J.** 1956. Feeding habits of young of four species of tilapia. *S. Afr. J. Sci.* 53 (2): 33-37.

**LINDGREN, S., PETTERSSON, K., KASPARSOON, A., JHONSSON, A. AND LINGVALL, P.** 1985. Microbial dynamics during aerobic deterioration of silages. *J. Sci. Food Agric.* 36: 765-774.

**LOVELL, T., 1989.** Nutrition and feeding of fishes. Van Nostrand Reinhold, New York, 260 p.

**LUQUET, P. BERGOT, F.** 1976. evaluation de divers traitements technologiques des cereals. VII. Utilisation de mais presse, floconne, expanse et extrude dans l'alimentation de la truit are-en-ciel. Ann. Zootech, 25 (1): 63-69.

**MARTÍNEZ-CARRERA, D., MORALES, P Y SOBAL M.** 1989. Producción de hongos comestibles sobre pulpa de café a nivel comercial. In Memorias I Sem. Intern. Biotecnol. Agroindust. Café (ISIBAC), Roussos, Licona y Gutiérrez (EDS), Jalapa, México, 177-184.

**Mc CULLOUGH, M.E.** 1977. Silage and Silage Fermentation. *Feedstuffs*. 49-52.

**MCDONALD, P., HENDERSON, A.R. AND HERON, S.J.C.** 1991. Additives. In: The Biochemistry of Silage, 2nd. Edn. Chalcombe Publications. Aberystwyth. UK.

**MERTZ, E.T.** 1969. Amino acid and protein requirements of fish. En: Fish in Research. Newhaus, O y Halver, J.E. Eds. Academic Press, New York, pp. 233-244.

**MERTZ, E.T.** 1972. The protein and amino acid needs. En: Fish Nutrition. Halver, J. E. Ed. Academic Press. New York, pp. 106-143.

**MOLINA, M.R., DE LA FUENTE, G., BATTEN, M.A Y BRESSANI, R.** 1974. Decaffeination. A process to detoxify coffee pulp. J. Agr. Food Chem., 22(6): 1055-1059.

**MORALES, A.** 1974. El cultivo de la Tilapia de México. Datos Biológicos. Instituto Nacional de la Pesca. INP/SI.

**MOO-YOUNG, M., MOREIRA, A.R., TENDERGY, R.P.** 1983. Principles of solid-substrate fermentation. In The filamentous fungi. Fungal technology. Edward Arnold Publisher, London, 4, 117-144.

**MOYANO, F. J.** 1985. Evaluación de la harina cocida de altramuz como fuente proteica alternativa en la alimentación de trucha arco iris (*Salmo gairdneri*). Tesina Licenciatura en Ciencias Biológicas, Fac. ciencias, univ. Granada, 71 pp.

**MUCK, R.E. AND HUHNKER, R.L.** 1995. Oxygen infiltration from horizontal silo unloading practices. Trans. ASAE. 38,23-31.

**MURILLO, B.** 1979. Ensilaje de pulpa de café. En Braham, J.E. y Bressani, R. (Eds), Pulpa de café, composición, tecnología y utilización. INCAP, 97-110.

**NOSE, T.** 1979. Diet compositions and feeding techniques in fish culture with complete diets. En: *Finfish Nutrition and Fishfeed Tecnology*. Halver, J. E. Y Tiews, K. Eds. Heeneman Verlag, Berlin, Vol. I, pp. 283-296.

**NRC (National Research Council).**1983. Nutrient requirement of Warmwater fishes and Shellfishes. Revised Edition, National Academy Press, Washington DC., USA. P 95.

**OLVERA, M. A.** 1985. Efectos de la sustitución de harina de pescado en la dieta de *Oreochromis mossambicus* por granos de *Sesbania grandiflora leguminosae*. Tesis de Maestría, CINVESTAV-IPN, México. 31 pp.

**OLVERA, M. A. Y OLIVERA, C. L.** 1996. Nutrición y alimentación de tilapia. "Primer curso Internacional De Producción de Tilapia. UNAM. 158-180 pp.

**PANDEY, A.** 1992. Recent Process Developments in Solid-State Fermentation. *Process Biochemistry*, 27, 109-117.

**PERRAUD-GAIME I.** 1995. Cultures mixtes en milieu solide de bactéries lactiques et de champignons filmenteux pour la conservation et la décaféination de la pulpe de café. Thèse de Doctorat, Université Montpellier, II, 210 p.

**PIPER, R., McLEWAIN, i. Y ORME, L.** 1989. Fish hatchery managment. Department of the Interior, U.S. Fish and Wildlife Service, U.S.A. 517 p.

**PITT, R.E., MUCK, R.E. AND LEIBESPERGER, R.Y.** 1985. A quantitative model of the ensilage process in lactate silages-Grass forage *Sci.* 40, 279-303.

**RAIMBAULT, M. AND ALAZARD, D.** 1980. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnology* 9.199-209.

**REFSTIE, T., Y AUSTRENG, E.** 1981. Carbohydrates in rainbow trout diets. III. Growth and chemical compstion of fish from different families fed four levels of carbohydrates in the diet. *Aquaculture*, 25: 35-49.

**RIBEREAU-GAYON, P.** 1968. Les composes phenoliques des végétaux. Dunod (Ed), París, 254 p.

**ROMANO-MACHADO, J. M.** 1996. Producción y extracción de esporas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (BÁLSAMO) por Fermentación en Medio Sólido. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F. 114 p.

**ROMANO-MACHADO, J; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G; GUTIÉRREZ-ROJAS, M; PERRAUD-GAIME I; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.** 1999. Degradación de cafeína en pulpa de café fresca y ensilada por fermentación en medio sólido: influencia del tratamiento del sustrato y el nivel del inóculo. En: III International Seminar on Biotechnology in the Coffe Agroindustry, mayo, 24-24. Londrina, Brasil.

**ROUSSOS, S., AQUIAHUATHL, A., CASSAIGNE, J., FAVELA, E., GUTIÉRREZ, M., HANNIBAL, L., HUERTA, S., NAVA, G., RAIMBAULT, M., RODRIGUEZ, W., SALAS, J.A., SÁNCHEZ, R., TREJO, M Y VINIEGRA-GONZÁLEZ G.** 1989. Detoxificación de la pulpa de café por fermentación sólida. In: Memorias I Sem. Inter. Biotechnol. Agroindust. Café (ISIBAC9, Jalapa, México, 121-143.

**ROUSSOS, S., AQUIAHUATHL, A., TREJO-HERNÁNDEZ, M.R., GAIME-PERRAUD, I., FAVELA, E., RAMAKRISHNA., RAIMBAULT, M., Y VINIEGRA-GONZÁLEZ G.** 1995. Biotechnological management of coffee pulp-isolation, screening, characterization, selection of caffeine-degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk. *Appl. Microbiol. Biotechnology.*, 22 (6):1055-1059.

**SATOH, SH.** 1991. Common Carp, *Cyprinus carpio*. P. 55-68. In: Handbook of Nutrient Requirement of Finfish. R.Wilson (ed). CRC Press, INC., USA.

**SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; MR. TREJO HERNÁNDEZ; BK. LONSANE; J.M. NAVARRO; S. ROUSSOS Y M. RAIMBAULT.** 1994. On-line automated monitoring and control systems for CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> in aerobic and anaerobic solid-state fermentations.

**SING, R.P. NOSE, T.** 1967. Digestibility of carbohydrates in young rainbow trout. Bull. Freshwater Fish. Res. Lab. 17:21-25.

**SMITH, R.R.** 1971. a method for measuring digestibility and metabolizable energy of fish feeds. Prog. Fish-Cult. 33:132-134.

**SMITH, J.E.** 1975. The Structure and Development of filamentous Fungi. The Filamentous fungi. Industrial mycology. Volume 1, 2-4 pp.

**SPANNHOF, L., PLANTIKOW, H.** 1983. Studies on carbohydrate digestion in rainbow trout. *Aquaculture*, 30: 95-108.

**SPOELSTRA, S.F., COURTIN, M.G. AND VAN BEERS, J.A.C.** 1988. Acetic acid bacteria can initiate aerobic deterioration of maize silage. *J. Agric. Sci. Camb.* 111:127-132.

**SPOELSTRA, S.F.** 1991. Chemical and Biological additives in forage conservation. In: Proceedings of a conference on Forage conservation Towards 2000 (Pahlow, G. and Honing, H. Eds), pp. 48-70. Braunschweig, Germany.

**TACON, A.G.J., STAFFORD, E. AND EDWARDS, C.A.** 1983. A preliminary investigation of the nutritive value of three terrestrial lumbricid worms for rainbow trout. *Aquaculture*, 35:187-199.

**TACON, A.G.J.** 1979. Use of activated-sludge single cell protein (ASCP) derived from the treatment of domestic sewage in trout diets. Proc. World Symp. On Finfish Nutrition and Fishfeed Technology, Hamburg, 2:249-267.

**TACON, A.G.J., WEBSTER, J.L. AND MARTÍNEZ, C.A.** 1984. Use of solvent extracted sunflower seed meal in complete diets for fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 43:381-389.

**TACON, A.G.J.** 1990. Standard Methods for the nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. Vol. 1. The essential nutrients. Argent Laboratories Press, Washington, USA. P. 1-117.

**TACON, A.G.J.** 1993. Feed ingredients for warmwater fish, fish meal and other processed feedstuffs. FAO, Fish. Circ. N 856. 64 p.

**TACON, A.G.J., COWEY, C.B.** 1985. Protein and amino acid requirements. En Fish energetics, New Perspectives. Tytler, P. y Calow, P. Eds. Croom Helm, Sydney, pp. 155-183.

**TACON, A.G.J., JACKSON, A.J.** 1985. Utilization of convencional and unconventional protein sources in practical fish feeds. En: Nutrition and Feeding in Fish.

**TAPIA, I.M., HERRERA-SALDAÑA, R., VINIEGRA, G.G., GUTIÉRREZ, M. Y ROUSSOS, S.** 1989. Pulpa de café fermentada: su uso como aditivo en la alimentación de rumiantes. *In* memorias I. Sem. Intern. Biotecnol. Agroindust. Café (ISIBAC), Roussos, Licona y Gutiérrez (EDS), Jalapa, México, 153-175.

**TREWAVAS, E.** 1983. Tilapiini. Fishes of the genera *Saratherodon* *Oreochromis* and *Danakilia*. Britieso Museum (Natural History)

**ULLOA ROJAS, J. B.** 1995. Nutrición de Tilapia. 1er Simposio Centroamericano sobre cultivo de Tilapia. Aquacorporation San José Costa Rica.

**VIOLA, S. MOKADY, S., ARIELY, Y.** 1983. Effects of soybean processing methods on the growth of carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 32: 27-38.

**WATANABE, T.** 1982. Lipid nutrition in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73 B: 3-15.

**WEINBERG, Z.G Y MUCK, R.E.** 1996. New Trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiology Reviews*, 19,53-68.

**WILSON, R.P. AND POE, W.E.** 1989. Effects of feeding soybean meal with varying trypsin inhibitor activities on growth of fingerling channel cat fish. *Aquaculture*, 46:19-25.

**WILSON, R.P.** 1994. Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture*, 124: 67-80.

**WOOLFORD, M.K.** 1990. The detrimental effects of air on silage. *J. Appl. Bacteriol.* 68,101-116.

**YAKUPI-TIYAGE, A.** 1993. On-farm feed preparation and feeding strategies for carps and tilapias. P. 87-100. In: *Farm-made aquafeeds*. M. New, A. Tacon and I. Casavas (eds). Proceedings of the FAO/AA DCP. Regional Expert Consultation on Farm-Made. Aquafeeds, December, 1992, Bangkok, Thailand.

**ZAMORA, S., ECHEVARRÍA, G.** 1987. Los hidratos de carbono en la nutrición de los peces. En: *Nutrición y alimentación, Acuicultura*. Espinoza. J y Labarta. U Eds. Comisión y asesoría de Investigación Científica Y Técnica. Madrid. Vol. 1.

**ZULUAGA, V.J.** 1989. Utilización integral de los subproductos del café. In. *Memorias I. Sem. Intern. Biotecnol. Agroindust. Café (ISIBAC)*, Roussos, Liconá y Gutiérrez (EDS), Xalapa, México, 63-76.

**ZULUAGA, V.J.** 1981. Contribution à l'étude de la composition chimique de la pulpe de café (*Coffea arabica*). Thèse de Doctorat es Science, Faculté des Sciences Université de Neuchatel, Suisse. 93 p.



# ANEXOS

**Anexo 01**

**Tabla 1.2. Diseño experimental**

<b>Tratamiento</b>	<b>Réplicas</b>	<b>Tasa de siembra (Num. de organismos)</b>
Testigo	2	300
Gallinaza	2	300
Pulpa de café	2	300

**Tabla 1.3 Datos sobre longitud y peso promedio de los peces sembrados**

<b>Tratamiento</b>	<b>Corral No.</b>	<b>Long. inicial (cm)</b>	<b>Peso inicial (g)</b>	<b>Long. final (cm)</b>	<b>Peso final (g)</b>
Testigo	1	9.7	16.5	16.2	85
Testigo	4	9.2	13.5	17.5	91.7
Gallinaza	2	8.7	12.9	16.2	80
Gallinaza	3	8.9	11.7	17.6	94
Pulpa de café	5	7.6	10.0	18	109
Pulpa de café	6	8.0	8.3	19.6	134.3

**Tabla 1.4. Tasas de alimentación**

<b>Período</b>	<b>Tasa de alimentación (%) peso total</b>
Primer mes	5
Segundo mes	4
Tercer mes	3
Cuarto mes	3
Quinto mes	3

## Anexo 01

**Tabla 1.5 Composición de la dieta adicionada con pulpa de café**

<b>Ingredientes</b>	<b>Por ciento</b>
<b>Pulpa de café</b>	<b>30</b>
Afrecho de trigo	10
Maíz molido	24
Melaza	20
Harina de algodón	14
Urea	1
Harina de hueso	1
<b>Total</b>	<b>100</b>

**Tabla 1.6 Composición química del alimento preparado con 30 % de pulpa de café.**

<b>Parámetro (%)</b>	<b>Estimada del alimento</b>	<b>Analizada del alimento</b>	<b>Analizada de la pulpa de café seca</b>
Materia seca	-	90.73	87.74
Humedad	-	9.27	12.26
<b>Proteína total</b>	<b>15.8</b>	<b>20.74</b>	<b>14</b>
Proteína digestible	11.3	-	-
Nutrientes totales digestibles	69.7	-	-
Fibra cruda	9.1	7.72	8.23
Grasa	-	2.05	1.22
Cenizas	-	7.97	8.23
Constituyentes de la pared celular	-	29.88	54.19
Fósforo	0.54	-	-
Calcio	0.64	-	-

**Anexo 02**

**Tabla 1.7 Crecimiento y utilización del alimento conteniendo diferentes niveles de pulpa de café utilizado con *O aureus*.**

<b>Variable/Dieta</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
Peso inicial (g)	23.90	19.20	28.30	29
Peso final (g)	55.71	40.41	54.75	49.43
Tasa de crecimiento (g/Kg/d)	16.80	13.40	12.20	11.50
Incremento de peso (g/pez/d)	1.13	0.75	0.82	0.79
Alimento consumido (g/pez/d)	1.41	1.13	1.28	1.34
Factor de Conversión Alimenticia	1.26	1.55	1.55	1.71
Tasa de eficiencia de la proteína	2.00	1.74	1.70	1.53
Sobrevivencia (%)	88.90	75.00	75.00	83.33

**Anexo 03**

**Tabla 1.9. Composición química de la pulpa de café**

<b>Parámetro</b>		<b>Pulpa fresca</b>	<b>Pulpa deshidratada</b>
Humedad	(%)	76.7	12.6
Materia seca	(%)	23.3	87.4
Extracto etéreo	(%PMS)	0.48	2.5
Fibra cruda	(%PMS)	3.4	21.0
Proteína cruda (Nx6.25)	(%PMS)	2.1	11.2
Cenizas	(%PMS)	1.5	8.3
Hidratos de Carbono	(%PMS)	15.8	44.4

FUENTE (ELÍAS,1978)

**Anexo 04**

**Tabla 1.10. Contenido de azúcares libres de la pulpa de café (Zuluaga,1989).**

AZÚCARES	PULPA LIOFILIZADA		PULPA SECADA AL SOL	
	mg/100mg	% total	mg/100mg	% total
$\alpha$ + $\beta$ -D-Fructuosa	9.92	43.8	15.20	57.1
D-Galactosa	2.40	10.6	1.58	7.0
$\alpha$ -D-Glucosa	3.42	15.1	4.52	17.0
$\beta$ -D-Glucosa	3.42	15.1	3.11	11.7
Inositol	0.28	1.2	0.10	0.4
Sacarosa	3.21	14.2	1.83	6.8
Total	22.65	100	26.64	100

**Anexo 05**

**Tabla 1.11. Composición de aminoácidos de la pulpa de café.**

<b>Aminoácidos (AA)</b>	<b>Mm AA/gn</b>	<b>mmAA/100g muestra</b>	<b>gAA/100g proteína</b>
Lisina	224.2	287	3.59
Histidina *	Presente	Presente	Presente
Arginina	235.5	302	3.76
Acido glutámico	721.9	926	11.58
Acido aspártico	328.0	420	5.25
Treonina	232.9	299	3.74
Serina	552.5	708	8.85
Prolina	292.0	374	4.68
Glicina	271.0	348	4.35
Alanina	269.7	346	4.32
Cistina	Trazas	Trazas	Trazas
Valina	346.7	444	5.55
Metionina	48.5	62	0.78
Isoleucina	167.9	215	2.69
Leucina	239.0	307	3.34
Fenilalanina	241.0	309	3.86
Triptófano	246.9	316	3.95

\*La Histidina no se evaluó por no separar el amoniaco

Fuente: (Zuluaga, 1989)

## Anexo 07. PREPARACIÓN DEL ENSILAJE



Mezcla de la pulpa de café con el inóculo.



Pulpa de café con *L. plantarum*



Empacamiento de silos



Silos



**Anexo 08**

**COMPOSICIÓN DEL MEDIO CAFÉ CMS**

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad (g/l)</b>
Café (Grand Mère)	40
Sacarosa	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.3
NaHPO <sub>4</sub> (Anhídrido)	0.12
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.3
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.3
Agar Bacteriológico	20

Perraud-Gaime, 1995.

pH final (con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) = **5.6**

**Preparación:**

1. Hacer una infusión de café en el volumen total de agua.
2. Filtrar a vacío y restituir el volumen con agua.
3. Disolver las sales en la infusión (Menos el Agar).
4. Ajustar el pH.
5. Disolver el Agar.
6. Fundir (1 min en ebullición)
7. Verter los volúmenes en los matraces y/o tubos.
8. Esterilizar.

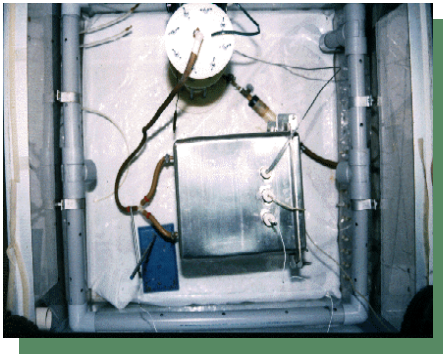
**Anexo 09. PREPARACIÓN DE LA FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO.**



**Empacamiento de la pulpa en charolas**



**Fermentador de charolas**



**Vista superior del fermentador en cámara termostática**



**Muestreo de CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y T°C en cromatógrafo de gases Gow-Mac**



**Vista de una charola al final de la FMS**

**Anexo 10. ACONDICIONAMIENTO DEL SISTEMA Y PREPARACIÓN DE LAS DIETAS.**



Sistema de recirculación



Crías de tilapia (Cap. 20 l)  
flujo 1.5 ml/min



Ingredientes de las dietas



Peletizadora



Biometría



Determinación de Biomasa