

Incidencia y distribución de hongos filamentosos durante el proceso de beneficio húmedo del café

Andrea Alejandra Arrúa Alvarenga^{1,3}, Martha Yolanda Quezada Viay², Danilo Fernández Ríos³, Ernesto Moreno Martínez², Alberto Flores Olivas⁴

¹Laboratorio de Biotecnología, Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT), Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica (DGICT), Universidad Nacional de Asunción (UNA).

²Escuela de Postgrado, Unidad de Investigación en Granos y Semillas (UNIGRAS), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

³Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FACEN), Universidad Nacional de Asunción (UNA).

⁴Laboratorio de Parasitología Molecular, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN).

E-mail del autor: aaarrua@gmail.com

Incidencia y distribución de hongos filamentosos durante el proceso de beneficio húmedo del café. El café es una de las bebidas más tradicionalmente consumidas a nivel mundial. Durante su cultivo y procesamiento puede ser contaminado por diversos microorganismos, entre ellos los hongos filamentosos. En este trabajo se identificaron las especies presentes a lo largo del beneficio húmedo. Además se analizó la correlación entre el origen de la muestra, las especies presentes y la capacidad de producir micotoxinas; el manejo de la muestra, las especies presentes y la capacidad de producir micotoxinas; y la etapa de procesamiento de las muestras, las especies presentes y la capacidad de producir micotoxinas. Se determinó el contenido de Ocratoxina A y se estudió la relación entre origen y manejo de la muestra y el contenido de micotoxinas en los granos.

Palabras Claves: *Aspergillus*, inocuidad, micotoxinas, aflatoxinas, ocratoxinas, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Rhizopus*.

Incidence and distribution of filamentous fungi during the wet milling process of coffee. Coffee is one of the most traditionally consumed beverages worldwide. It can be contaminated by a wide variety of microorganisms during growth and processing, among which filamentous fungi can be found. In this work we identified species present throughout the wet milling process. We analyzed the correlation between origin of the sample, species present and ability to produce mycotoxins; management of the sample, species present and ability to produce mycotoxins; and stage of processing, species present and ability to produce mycotoxins. We also determined the content of Ochratoxin A and studied the relationship between the origin and management of the sample and the content of mycotoxins in the beans.

Keywords: *Aspergillus*, safety, mycotoxins, aflatoxins, ochratoxins, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Rhizopus*.

INTRODUCCIÓN

El café es una de las bebidas más tradicionales en el mundo, e ingrediente de una gran cantidad de alimentos. Su calidad está condicionada por una serie de factores entre los que se incluyen variedad, condiciones climáticas, método de cultivo, procesamiento y almacenamiento (Batista et al. 2009; Soliman 2005). El objetivo del proceso de beneficio del café

es remover la pulpa, el mucílago, el pergamiño y la película plateada que rodean la semilla para la obtención del grano limpio conocido como café oro (Batista et al. 2009). La contaminación microbiana puede ocurrir a lo largo del cultivo, el procesamiento el almacenamiento y la vida de anaquel de los granos. La acción microbiana opera en detrimento de la calidad e inocuidad del producto final; ella depende principalmente de factores ambienta-

les que se dan durante el cultivo y almacenamiento del producto (Batista et al. 2003; Soliman 2005; Perrone et al. 2007; Almeida et al. 2007). Bacterias y hongos filamentosos han sido reportados en pulpa y granos de café procesados en países productores y consumidores de café, por lo cual, la acumulación de micotoxinas representa un riesgo constante (Almeida et al. 2007; Magnoli et al. 2007; Luna, Lozada, y Trigos 2010). La principal preocupación de estos reportes son las micotoxinas, metabolitos secundarios tóxicos de ciertas especies de hongos, que producen en seres humanos y animales síndromes llamados micotoxicosis. Son neuro y nefrotóxicas, oncogénicas, teratogénicas, y afectan a los sistemas inmunológico, neurológico y respiratorio (Perrone et al. 2007; Arrúa Alvarenga, Moura Mendez y Fernández Ríos, 2013). En el café se ha reportado frecuentemente la presencia de ocratoxina A (OTA), aflatoxinas (AF) y patulina (PAT) (Magnoli et al. 2007; Luna, Lozada, y Trigos 2010). Debido a que durante el proceso de beneficio el café es transformado a través de la exposición a una serie de condiciones diferentes de humedad y temperatura que predisponen a la aparición de microorganismos, especialmente hongos filamentosos, la acumulación de micotoxinas representa un riesgo constante. Especies del género *Aspergillus*, incluyendo *A. niger*, *A. flavus*, *A. ochraceus* y *Penicillium* han sido reportadas como las aisladas con mayor frecuencia en las muestras de café (Almeida et al. 2007; A. P. Magnoli et al. 2008; Batista et al. 2009; Luna, Lozada y Trigos 2010). Considerando todo lo anteriormente expuesto, la presente investigación se realizó con el objetivo de determinar la presencia de hongos potencialmente micotoxigénicos asociados al proceso de beneficio húmedo del café. La identificación de la microbiota es fundamental para determinar el potencial y la habilidad de los aislados de producir micotoxinas. Se pue-

de presuponer que los aislados obtenidos tendrán potencial para producir micotoxinas que contaminen el café. En este trabajo se estudió la incidencia de hongos presentes a lo largo del proceso de beneficio húmedo de los granos en cuatro fracciones, a mitad del proceso de secado y en café seco.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de muestras

Se colectaron 25 submuestras de 250 gramos cada una de la cosecha del día de la variedad **Oro Azteca** (*Coffea arabica*), de dos puntos en el Estado de Veracruz: Teocelo (manejo convencional, con uso de productos fitosanitarios) e Ixuatlán del Café (manejo orgánico, sin aplicación de productos fitosanitarios). Café de altura, en ambos casos, bajo sombra boscosa. Una vez etiquetadas y empaquetadas de forma adecuada, en bolsas de papel madera y embaladas en cajas, las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Parasitología Molecular de la UAAAN, en Buenavista, Coahuila, donde fueron procesadas según el sistema de beneficio húmedo del café 24 horas después de la toma de muestras. En el estado de Coahuila fue realizado todo el trabajo posterior a la toma de muestras.

Aislamiento e identificación de hongos

Se estudió la incidencia de hongos presentes luego de la finalización del proceso de fermentación, a los seis días de secado, a los 12 días de secado en pista de cemento y en café oro. Los granos fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 1% siguiendo el protocolo de Batista et al. (2003). Posteriormente diez granos fueron sembrados por triplicado en placas de Petri con PDA (papa dextrosa agar) y MSA60% (malta sal agar 60 gramos por litro de medio de cultivo). Se incubaron a 27 °C y luz constante por siete días. Todas las

colonias fueron identificadas a nivel de género por medio de la observación de características macro y microscópicas y el uso de claves taxonómicas (Barnett y Hunter 1998). Los resultados de la microbiota se expresaron como porcentaje de hongos presentes en las distintas partes del grano y etapa de procesamiento del café, en el pergamino, exocarpo, endocarpo y endospermo de los granos (Marasas y Nelson 1987).

Identificación de hongos potencialmente micotoxigénicos

Todos los hongos con características macroscópicas consistentes con los géneros *Aspergillus* fueron purificados en Czapek agar. Se realizaron cultivos monoconidiales por medio de diluciones seriadas, que se identificaron por medio del uso de claves taxonómicas (Samson and Pitt 2000; Klich 2002; Abarca et al. 2004; Samson et al. 2007).

Cuantificación de micotoxinas y determinación de potencia toxigénica

La cuantificación de AF y OTA en café pergamino y verde se realizó en el Laboratorio de la Unidad de Granos y Semillas de la Escuela de Postgrado en Cuautitlán Izcali, Estado de México, utilizando los kits *Aflatest* y *Ochratest* de Vicam Technologies (Vicom 1999a; Vicam 1999b). Las cepas de la Sección Flavi además fueron sembradas en Agar Coco para su observación bajo luz ultravioleta (Davis, Iyer and Diener 1987).

Análisis estadístico

El diseño estadístico fue completamente al azar. Se estudió el porcentaje de incidencia de cada hongo a lo largo del proceso de beneficio húmedo del café. Se realizó un ANAVA con el uso del Test LSD Fisher. Se analizó además la correlación entre la incidencia de hongos presentes y la parte del grano analizada, y

entre la incidencia de hongos presentes y la etapa del proceso, por medio del coeficiente de Spearman.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las muestras analizadas se identificaron: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus niger*, *Geotrichum* sp., *Penicillium* sp. y *Rhizopus* sp. en PDA (Tabla 1) y *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus glaucus*, *Geotrichum* sp., *Penicillium* sp. y *Rhizopus* sp. en MSA60% (Tabla 2). En MSA se observó una mayor diversidad de especies presentes probablemente debido a que al retener agua como consecuencia de la presencia de sal en su constitución, permite el crecimiento de especies con necesidades de agua inferiores (Mazzeni, Luzón and Chavarri 2007). Los hongos identificados coinciden con lo reportado en trabajos anteriores, siendo los de género *Aspergillus*, Secciones Nigri y Flavi, los más frecuentemente aislados. El objetivo fue identificar *Aspergillus* de las Secciones Flavi y Nigri dada su alta frecuencia de aparición en granos de café y su capacidad de producción de micotoxinas, especialmente OTA y AF (Abarca et al. 2004; Horn 2007).

Se observaron diferencias significativas en cuanto a la incidencia de hongos presentes en PDA y MSA60%. *Rhizopus* sp. fue el hongo con mayor incidencia de aislamiento tanto en PDA como en MSA; a pesar de ser considerado como un contaminante de poca importancia dado que no es productor de micotoxinas al crecer y desarrollarse sobre los granos, produce diversos metabolitos asociados a estos procesos. Además, la liberación de agua y gases producto de su respiración aumentaría el contenido de humedad del grano, lo que podría posibilitar la contaminación con otros microorganismos secundarios. Una alta incidencia de *Rhizopus* sp. podría además indicar

deficiencias en el proceso de secado del grano.

Tabla 1. Incidencia de hongos filamentosos en el proceso de beneficio húmedo de café en PDA.

Hongo	Media	
<i>Geotrichum</i> sp.	0,87	A
<i>Aspergillus flavus</i>	0,99	A
<i>Aspergillus glaucus</i>	1,35	A
<i>Aspergillus niger</i>	1,92	A
<i>Penicillium</i> sp.	2,93	A
<i>Rhizopus</i> sp.	17,44	B

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Tabla 2. Incidencia de hongos filamentosos en el proceso de beneficio húmedo de café en MSA60%.

Hongo	Media	
<i>Aspergillus carbonarius</i>	0,05	A
<i>Geotrichum</i> sp.	0,16	A
<i>Aspergillus glaucus</i>	0,63	A B
<i>Aspergillus niger</i>	1,90	A B C
<i>Penicillium</i> sp.	2,78	B C
<i>Aspergillus flavus</i>	4,29	C
<i>Rhizopus</i> sp.	8,02	D

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

No se observaron diferencias significativas en cuanto al origen de la muestra (Teocelo o Ixuatlan) y la incidencia de los diferentes hongos presentes a lo largo del proceso de beneficio húmedo en PDA. Tampoco se observaron diferencias significativas en cuanto al sistema de manejo de la muestra (convencional en Teocelo y orgánico en Ixualtán) en

PDA. Sin embargo en MSA 60% las diferencias fueron significativas; esto podría deberse a que MSA 60% permite el crecimiento de especies con menores necesidades de agua, y a que el crecimiento de los hongos aflatoxigénicos y ocratoxigénicos está condicionado por factores de pH, humedad y actividad del agua (Spadaro et al. 2010).

En lo que respecta a las etapas del proceso de beneficio, en PDA se observaron diferencias significativas entre partes del grano y días de secado. La incidencia de hongos filamentosos fue menor a medida que el grano disminuyó su contenido de humedad. En el pergamino que rodea a la semilla se observó una alta contaminación por *Rhizopus* sp. en la primera etapa de secado, probablemente debido a su elevado contenido de humedad; la incidencia más alta de patógenos se dio en el pergamino del grano a los seis días de secado. En MSA 60% también se presentaron diferencias significativas al analizar las diversas etapas del proceso de beneficio húmedo. Coincidentemente con lo obtenido en PDA, la mayor contaminación se dio en el pergamino a los seis días de secado. Esto podría deberse a que el pergamino es la capa más externa que rodea al grano y por tanto sufre mayor exposición a las condiciones del ambiente y hongos contaminantes secundarios.

El pergamino de café se encuentra principalmente constituido por fibras, proteínas y grasas, por tanto es sustrato propicio para el crecimiento de hongos saprófitos.

Se ha indicado que las mayores contaminaciones en el grano de café se producen en su parte externa, siendo la contaminación interna hasta un tercio inferior (Batista et al. 2003).

Al estudiar los factores que podrían influenciar a la microbiota durante el proceso de beneficio húmedo no se observó correlación entre la incidencia de los hongos filamentosos

Tabla 3. Incidencia de hongos filamentosos durante el proceso de beneficio húmedo del café.

Etapa del proceso	Media		Etapa del proceso	Media	
Pergamino 12 días de secado	1,11	A	Endocarpo 6 días de secado	1,19	A
Endocarpo 12 días de secado	1,94	A B	Pergamino 12 días de secado	1,51	A
Endospermo 12 días de secado	2,27	A B	Endospermo 12 días de secado	1,67	A B
Post fermentación	3,62	A B	Endocarpo 12 días de secado	2,14	A B C
Endocarpo 6 días de secado	3,89	A B	Endospermo 6 días de secado	2,30	B C
Endospermo 6 días de secado	5,21	B	Post fermentación	3,33	C
Pergamino 6 días de secado	10,46	C	Pergamino 6 días de secado	5,71	D

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (($p > 0,05$)).

presentes con respecto a su origen geográfico, manejo y etapa del proceso de beneficio en PDA ni en MSA60%.

Es importante destacar que la contaminación microbiana puede ocurrir desde la cereza hasta la finalización del proceso de beneficio húmedo del café. Al identificar los diferentes tipos de hongos filamentosos presentes a lo largo del proceso de beneficio húmedo y tomar acciones encaminadas a la reducción de aquellos potencialmente micotoxigénicos, se asegura la calidad e inocuidad del producto final (Bucheli y Taniwaki 2002; Batista et al. 2009).

Finalmente, se cuantificó el nivel de AF y OTA en café pergamino y verde. En las muestras analizadas no se detectó la presencia de AF a pesar de la importante incidencia de hongos de la Sección Flavi. Sorprendentemente los resultados difieren de lo reportado por Nakajima et al. (1997) y Soliman (2002), quienes cuantificaron niveles de AF variables en hasta 75% de las muestras analizadas en café verde. La ausencia de AF en las muestras de grano analizado podría explicarse por el hecho de que en café existen ciertos compuestos, como diterpenos, cafeína y taninos, que tienen acción protectora contra las AF (Cavin et al. 1998; Hasan 1999). Otro aspecto llamativo es que en 100% de los aislamientos de *A. flavus* sembrados en Agar Coco se observó fluorescencia bajo luz ultravioleta, lo que indica de manera cualitativa su potencial productor de AF.

En cuanto a OTA en Teocelo se detectaron niveles promedio de 1,73 ppm en café pergamino y 0,8 ppm en café verde. En Ixuatlán, 0,79 y 0,49 respectivamente, lo que indica menor contenido de OTA en café orgánico. La diferencia en estos valores, en cuanto a contenido absoluto de OTA podría deberse a que en los cafetales manejados orgánicamente se utilizaron bioproductos a base de *Bacillus* sp. y *Trichoderma* sp. Estos organismos poseen diferentes mecanismos para competir con otros hongos, entre ellos los productores de micotoxinas. A pesar de estos valores, no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

CONCLUSIONES

Durante el proceso de beneficio húmedo del café tanto en cafetales de manejo convencional como orgánico se observó la presencia de siete especies de hongos filamentosos, entre ellas especies potencialmente micotoxigénicas: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Penicillium* sp. No se encontró relación entre el origen de la muestra, el tipo de manejo y las especies de hongos presentes. Tampoco se pudo determinar la presencia de correlación entre la acumulación de OTA y el manejo y origen de la muestra. No se detectó la presencia de AF en los granos de café estudiados, de acuerdo a las condiciones de este estudio. Aun así, no existen diferencias significativas al analizar los datos estadísticamente.

Es importante profundizar estudios sobre micotoxinas en café en México, sobre todo aquellos destinados a la identificación de puntos críticos de contaminación a lo largo de la cadena productiva y así prevenir la ocurrencia de las mismas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abarca, M. L., F. Accensi, J. Cano, y F. J. Cabañes. 2004. «Taxonomy and Significance of Black Aspergilli». *Antonie van Leeuwenhoek* 86 (1): 33-49.
- Almeida, A. P., J. de Alaburda, L. Shundo, V. Ruvieri, S. A. Navas, C. A. Leda Lamedo, y M. Sabino. 2007. «Ochratoxin A in brazilian instant coffee». *Brazilian Journal of Microbiology* 38 (2): 300-303.
- Arrúa Alvarenga, A. A., J. Moura Mendez, y D. Fernández Ríos. 2013. «Aflatoxins, a Real Risk». *Reportes Científicos de la FACEN* 4 (1): 68-81.
- Barnett, H. L., and B. B. Hunter. 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4.^a ed. St. Paul, Minn: APS Press.
- Batista, L. R., S. M. Chalfoun, G. Prado, R. Freitas Schwan, y A. E. Wheals. 2003. «Toxicogenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.)». *International Journal of Food Microbiology* 85 (3): 293-300.
- Batista, L. R., S. M. Chalfoun, C. Ferreira Silva, M. Cirillo, E. Azevedo Varga, and R. Freitas Schwan. 2009. «Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods». *Food Control* 20 (9): 784-90.
- Bucheli, P., y M. H. Taniwaki. 2002. «Research on the origin, and on the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee». *Food Additives and Contaminants* 19 (7): 655-65.
- Cavin, C., D. Holzhäuser, A. Constable, A. C. Huggett, y B. Schilter. 1998. «The Coffee-Specific Diterpenes Cafestol and Kahweol Protect against Aflatoxin B1-Induced Genotoxicity through a Dual Mechanism.» *Carcinogenesis* 19 (8): 1369-75.
- Davis, N. D., S. K. Iyer, y U. L. Diener. 1987. «Improved Method of Screening for Aflatoxin with a Coconut Agar Medium». *Applied and Environmental Microbiology* 53 (7): 1593-95.
<http://aem.asm.org/content/53/7/1593>.
- Hasan, H. A. H. 1999. «Role of caffeine and tannin in anti-toxicogenic properties of coffee and tea». *Cryptogamie Mycologie* 20 (1): 17-21. doi:10.1016/S0181-1584(99)80004-9.
- Horn, B. W. 2007. «Biodiversity of Aspergillus section Flavi in the United States: A review». *Food Additives & Contaminants* 24 (10): 1088-1101.
- Klich, M. A. 2002. *Identification of Common Aspergillus Species*. New Orleans, Louisiana USA: United States Department of Agriculture Agricultural Research Service, Southern Regional Research Center.
- Luna, M., y Lozada, y A. Trigos. 2010. «Aislamiento de cepas de *Aspergillus niger*, productoras de ocratoxina A, en café verde (*Coffea arabica*) almacenado». *Revista mexicana de micología* 32 (diciembre): 63-68.
- Magnoli, A. P., L. Tallone, C. A. R. Rosa, A. M. Dalcerro, S. M. Chiacchiera, y R. M. Torres Sánchez. 2008. «Commercial bentonites as detoxifier of broiler feed contaminated with aflatoxin». *Applied Clay Science* 40 (1-4): 63-71.
- Magnoli, C., A. Astoreca, M. L. Ponsone, M. G. Fernández-Juri, C. Barberis, y A. M. Dalcerro. 2007. «Ochratoxin A and *Aspergillus* section Nigri in peanut seeds at different months of storage in Córdoba,

- Argentina». *International Journal of Food Microbiology* 119 (3): 213-18.
- Marasas, W. F. O., y P. E. Nelson. 1987. *Mycotoxicology: Introduction to the Mycology, Plant Pathology, Chemistry, Toxicology, and Pathology of Naturally Occurring Mycotoxins in Animals*. Edinburgh: Pennsylvania State University Press.
- Mazzani, C., O. Luzón, y M. Chavarri. 2007. «*Aspergillus flavus* asociado a *Epitragus* sp. (Coleoptera: Tenebrionidae) en maíz bajo riego en Turén, estado Portuguesa, Venezuela». *Entomotropica* 19 (3): 157-59.
- Nakajima, M., H. Tsubouchi, M. Miyabe, y Y. Ueno. 1997. «Survey of aflatoxin B1 and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography». *Food and Agricultural Immunology* 9 (2): 77-83.
- Perrone, G., A. Susca, G. Cozzi, K. Ehrlich, J. Varga, J. C. Frisvad, M. Meijer, P. Noonim, W. Mahakarnchanakul, y R. A. Samson. 2007. «Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products». *Studies in Mycology* 59: 53-66.
- Samson, R. A., P. Noonim, M. Meijer, J. Houbraeken, J. C. Frisvad, y J. Varga. 2007. «Diagnostic Tools to Identify Black Aspergilli». *Studies in Mycology* 59 (1): 129-45.
- Samson, R. A., y J. I. Pitt, eds. 2000. *Integration of Modern Taxonomic Methods For Penicillium and Aspergillus Classification*. Amsterdam: CRC Press.
- Soliman, K. M. 2002. «Incidence, Level, and Behavior of Aflatoxins during Coffee Bean Roasting and Decaffeination». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (25): 7477-81.
- . 2005. «Effect of variety, locality and processing of coffee beans on the detection and determination of aflatoxins». *International Journal of Agriculture and Biology* 7 (1): 5-10. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=PK2005000382>.
- Spadaro, D., A. Lorè, A. Garibaldi, y M. L. Gullino. 2010. «Occurrence of ochratoxin A before bottling in DOC and DOCG wines produced in Piedmont (Northern Italy)». *Food Control* 21 (9): 1294-97.
- Vicam. 1999a. *OchraTest Instruction Manual*. Watertown, MA: Vicam.
- . 1999b. *Aflatest Instruction Manual*. Watertown, MA: Vicam.