

OlarteRaisbeck



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-029088-00001-0000

Fecha: 2008-12-29 17:10:04

Dep. 2020 NUECREACION

Tra. 2 PATENTES

Eve: 1

REGDEPOSITO

Act. 400 OPOSIOBSERVTER

Folios: 49

FORMULARIO ÚNICO DE OPOSICIÓN

OPOSICIÓN A:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Marcas de Productos o Servicios.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☐

Marca Colectiva.

☐

Diseño Industrial.

☐

Marca de Certificación.

☐

Esquema de Trazado para Circuitos Integrados.

☐

Lema Comercial.

2

SOLICITUD PUBLICADA

Número del expediente: **08.029088**

Solicitante: JUAN CARLOS JARAMILLO GOMEZ y ANDRÉS RAMÍREZ VELEZ

Apoderado: LUISA CAROLINA SABAS

Título de la nueva creación o denominación del signo: CONCENTRADO DE MUCÍLAGO DE CAFÉ Y SU MÉTODO DE OBTENCIÓN

Gaceta: 596

3

OPOSICIÓN PRESENTADA POR:

SOLICITANTE (71)

Nombre: FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS

Dirección: Calle 73 N° 8 - 13, Bogotá D.C.

Nacionalidad o Domicilio: COLOMBIA

Lugar de Constitución: BOGOTA D.C

Teléfono: _____ Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☒

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 860007538-2

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center Torre A, Calle 100 No. 8A-37 Piso 10

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747

TP 74.295

4

FUNDAMENTOS DE LA OPOSICIÓN:

Causal: FALTA DE NOVEDAD y NIVEL INVENTIVO SEGÚN ART. 16 y 18 DE LA DECISION 486.

Signo opositor: _____

Justificación: VER ADJUNTO

5

Comprobante de pago No. 08-99.694, 08-

Fecha 23 Diciembre 2008

6

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa.

☒

Poderes, si fuere el caso.

☒

Pruebas de los fundamentos de la oposición.

☐

Documentos que acrediten el legítimo interés, si fuere el caso.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.

7

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:


C.C. 79.782.747 T.P. 74.295

3

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

Re: Expediente No. 08.029088

Solicitud de Patente de Invención Titulada: "CONCENTRADO DE MUCÍLAGO DE CAFÉ Y SU MÉTODO DE OBTENCIÓN"

Solicitante: JUAN CARLOS JARAMILLO GOMEZ y ANDRÉS RAMÍREZ VELEZ

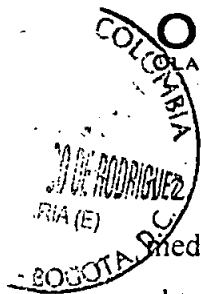
Opositor: Federación Nacional de Cafeteros

OPOSICIÓN SEGÚN EL ARTÍCULO 42 DE LA DECISIÓN 486 Y
SOLICITUD DE PRORROGA PARA SUSTENTAR

CARLOS R. OLARTE, mayor de edad y vecino de Bogotá, identificado como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, tal como consta en el poder que adjunto como ANEXO A, me permito presentar **OPOSICIÓN** fundamentada a la solicitud de Patente de la referencia, según el artículo 42 de la Decisión 486. Igualmente solicito la prórroga legal contemplada en el mismo artículo, en concordancia con el artículo 85, para sustentar la oposición.

1. ANTECEDENTES

1.1 La solicitud de Patente de Invención No. 08.029088 fue presentada ante la Superintendencia de Industria y Comercio ("SIC") el 25 de marzo de 2008 sin reclamar prioridad, por lo que el estado de la técnica, al evaluarse los requisitos de patentabilidad, deberá entenderse que lo comprende cualquier divulgación hecha con anterioridad a dicha fecha.



V

La solicitud de Patente de Invención No. **08.029088** contiene 10 reivindicaciones, por medio de las cuales se pretende reclamar un “Concentrado de Mucílago de Café y su método de obtención”.

1.3 La solicitud de Patente de Invención No. **08.029088** fue publicada en la Gaceta No. 596 de fecha 30 de septiembre de 2008, dando inicio al término legal de 60 días hábiles para presentar oposiciones fundamentadas.

2. PRETENSIÓN

Que se declare fundada esta oposición y en consecuencia, se niegue el derecho solicitado en este expediente.

3. FUNDAMENTOS DE LA OPOSICIÓN

3.1 Falta de Claridad

“**Artículo 30.-** Las reivindicaciones definirán la materia que se desea proteger mediante la patente. Deben ser claras y concisas y estar enteramente sustentadas por la descripción...”

La reivindicación 1 de la solicitud reza:

“Concentrado de mucílago de café, caracterizado porque su composición contiene altos niveles de azúcares, proteínas, grasas y minerales” (subrayado es nuestro).

La expresión de la reivindicación 1 arriba resaltada debe ser limitada, ya sea en el texto de las Reivindicaciones o explicada por el solicitante en la descripción, de tal forma que una persona del nivel medio pueda comprender y entender claramente el alcance de la exclusividad solicitada. En este caso, la descripción remitida a la SIC no contiene en ninguno de sus apartes ninguna referencia específica sobre que se debe entender por “altos niveles de azúcares, proteínas, pectinas y minerales”. Si bien la descripción se refiere a los contenidos de azúcares y de grasa, proteínas y minerales del mucílago, no es claro cuál es el alto nivel de los mismos en el concentrado que se reivindica.

9

En otras palabras, para un técnico no es claro cuándo un mucilago cumpliría o no con el supuesto de tener “altos niveles de azúcares, proteínas, grasas y minerales”.

De esta forma, creemos que la solicitud debe ser objetada por falta de claridad en la Reivindicación independiente 1 de la cual dependen así mismo las Reivindicaciones 2 a 6.

3.2. Falta de suficiencia

“Artículo 28.- La descripción deberá divulgar la invención de manera suficientemente clara y completa para su comprensión y para que una persona capacitada en la materia técnica correspondiente pueda ejecutarla....”

La solicitud de patente en comento no cumple con el artículo 28 de la Decisión 486, puesto que no divulga de manera suficientemente clara y completa la invención, para que una persona capacitada en la materia pueda ejecutarla.

El Manual Andino de Patentes (MAP) es bastante claro en señalar que el propósito de la Descripción es asegurar que, por un lado, la solicitud contenga la suficiente información técnica para que una persona con conocimiento medio en el arte pueda poner en práctica la invención, y por el otro, que esta divulgación será suficiente para conocer el aporte que se está haciendo a la tecnología.

Sin embargo, la solicitud en mención no divulga todas las condiciones a las cuales se llevan a cabo las distintas operaciones del procedimiento reclamado. Específicamente, no se indican cuáles son las enzimas con las que se tratan tanto el mucilago como la pulpa de la cereza del café, previa concentración.

Por otra parte, en la Descripción se menciona que se efectúa una evaporación o deshidratación al vacío de los desechos del proceso del beneficio del café; sin especificar cuáles son las condiciones de presión (vacío), y cómo se alcanzan, de tal forma que se logra la deshidratación del materia a una temperatura inferior a la acostumbrada (Descripción, página 8, líneas 12 a 14).

En conclusión, una persona medianamente versada en la materia motivada a reproducir la invención se vería en la tarea de desarrollar numerosos ensayos para intentar obtener resultados similares a los divulgados en la solicitud, si ninguna garantía de que pueda llegar efectivamente a ellos.

3.3. Falta de Novedad

Artículo 16: “Una invención se considerará nueva cuando no está comprendida en el estado de la técnica. El estado de la técnica comprenderá todo lo que haya sido accesible al público por una descripción escrita u oral, utilización, comercialización o cualquier otro medio antes de la fecha de presentación de la solicitud de patente o, en su caso, de la prioridad reconocida”

El Tribunal Andino de Justicia ha establecido que se requiere novedad absoluta para la concesión de una patente, la cual ha definido de la siguiente manera:

“El concepto de novedad absoluta respecto de una invención implica que para que un invento sea nuevo y no se encuentre en el estado de la técnica, no puede haber sido conocido ni dentro del territorio en el que se solicita la patente, ni en ningún otro país. Es lo que se conoce como el alcance universal de la novedad, pues no basta que un invento sea nuevo y no esté en el estado de la técnica de un territorio dado, sino que tampoco lo esté en el resto del mundo, salvo el año de prioridad a que se refiere el artículo 12 de la Decisión 344.”¹

Aplicando el anterior articulado y lo definido por el Tribunal al presente caso, el producto concentrado de mucílago de café, reclamado en las Reivindicaciones 1 y dependientes, no cumple con el requisito de novedad porque ya se encuentra comprendido en el estado de la técnica, es decir, ya ha sido divulgado y por lo tanto no cumple con las condiciones del artículo 16.

En efecto, la tesis de grado publicada en la Universidad Nacional de Medellín en el año 2003 titulada “Manejo de las mieles generadas en la tecnología BECOLSUB², para eliminar el impacto ambiental ocasionado por los lixiviados”³, del cual anexamos copia para la referencia del señor examinador, revela un concentrado de mucílago de café que presenta un alto contenido de azúcares (35° Brix), proteínas, grasas, fibras y minerales, producto del incremento del porcentaje de sólidos totales, mediante concentración por evaporación.

¹ Proceso N° 1-AI-1996. Sentencia de 30 de octubre de 1996, publicada en Gaceta Oficial del Acuerdo de Cartagena N° 234 de 21 de abril de 1997.

² Tecnología de Propiedad de la Federación Nacional de Cafeteros.

³ NARVAEZ M., L.H.; RAMIREZ G., C.A.; OLIVEROS, T., C.E.; ALVAREZ, M. F. Manejo de mieles generadas en la tecnología Becolsub para eliminar el impacto ambiental ocasionado por los lixiviados de café. Facultad Nacional de Agronomía. Medellín. 56(2): 1969-1981. 2003.

Es decir, los altos niveles de concentración de azúcar a que refieren las reivindicaciones señaladas ya se conocían en el estado de la técnica para la fecha de la presentación de la invención y por lo tanto carecen de novedad.

Por otro lado, es bien conocido en la técnica el uso del mucílago de café como alimento para animales, abono para plantas o para la producción de etanol. Específicamente, la Revista de Investigación del Café. Vol 49 #3 de septiembre de 1998⁴, divulga el uso de los productos del café, entre ellos el mucílago, como alimento para cerdos, como ingrediente del compostaje para abonos y como materia prima para la producción de etanol. En este sentido, los usos de la miel de café que son divulgados por la solicitud de la referencia no son novedosos.

Por último, el control de la contaminación resultante del proceso de desmucilagínación del café ha sido objeto de múltiples publicaciones por parte de CENICAFE⁵ y es así mismo el propósito del trabajo de investigación plasmado en la tesis de grado de Luis H. Narvaez arriba mencionada.

3.4 Falta de Nivel Inventivo

El artículo 18 de la Decisión 486 define nivel inventivo en los siguientes términos:

“Artículo 18.- Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica.”

Adicionalmente, el Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina ha manifestado lo siguiente:

Con el requisito del nivel inventivo, lo que se pretende es dotar al examinador técnico de un elemento que le permita afirmar o no si a la invención objeto de estudio no se habría podido llegar a partir de los conocimientos técnicos que existían en ese momento dentro del estado de la técnica... En este punto conviene advertir que uno es el examen que realiza el técnico medio respecto de la novedad y otro el que se efectúa con respecto al nivel inventivo; si bien en uno y

⁴ Este documento será adjuntado con el complemento de información que se presentará dentro del periodo de prórroga solicitado.

⁵ A manera de ejemplo:

ZAMBRANO F., D.A. Evaluación de un sistema para el tratamiento de los lixiviados de pulpa y mucílago producidos en la tecnología becolsub, STL.B. In: CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFÉ. CENICAFE. Informe Anual de Actividades de la Disciplina de Química Industrial, Octubre 1998 – Septiembre 1999. Chinchiná, Cenicafé, 1999. p. 1-19 (Proyecto QIN - 0150); y

ZAMBRANO F., D.A.; ISAZA H., J. D.; RODRIGUEZ V., N.; LOPEZ P. U. Tratamiento de aguas residuales del lavado del café. Chinchiná, CENICAFÉ, 1999. 26 p. (Boletín Técnico No. 20).

otro se utiliza como parámetro de referencia el 'estado de la técnica', en el primero, se coteja la invención con las 'anterioridades' existentes dentro de aquella, cada uno (sic) por separado, mientras que en el segundo (nivel inventivo) se exige que el técnico medio que realiza el examen debe partir del conocimiento general que él tiene sobre el estado de la técnica y realizar el cotejo comparativo con su apreciación de conjunto, determinando si con tales conocimientos técnicos existentes ha podido o no producirse tal invención"

Las reivindicaciones 7 a la 10 reclaman un procedimiento para el tratamiento de los contaminantes generados durante el beneficio húmedo del café, mediante la generación de un concentrado del mucílago o miel de café que presenta entre 20 a 75° brix (% sólidos).

El procedimiento en mención abarca dos etapas principales:

- a) Tratamiento enzimático del mucílago y la pulpa con pectolíticas; y
- b) Evaporación al vacío para obtener un incremento en el porcentaje de sólidos del 12% al 70 % (70° brix).

En el estado del arte existen numerosos documentos en los que se revela el frecuente uso de microorganismos pectinolíticos y de enzimas pectolíticas, en la degradación de la capa de mucílago durante la fermentación del café⁶. Es decir, cualquier persona versada en la materia conoce a fondo el efecto de las enzimas pectolíticas en la remoción de la capa mucilaginosa de la cereza de café durante el beneficio, y por lo tanto sabe que un procedimiento efectivo en la degradación de los componentes complejos del mucílago es justamente el tratamiento con dichas enzimas.

Así pues, que la persona capacitada en la técnica basada en su experiencia en el beneficio por vía húmeda del café, o en cualquiera de los documentos citados, estaría motivado a emplear enzimas pectolíticas (disponibles comercialmente, así como sus recomendaciones de uso) para disminuir la complejidad del mucílago (desdoblamiento de pectinas) y así facilitar su posterior tratamiento.

Por otra parte, el documento citado "Manejo de las mieles generadas en la tecnología de BELCOSUB para eliminar el impacto ambiental ocasionado por los lixiviados" (ver nota de pie

⁶ Agate, A.D., and Bhat J.V., "Role of pectinolytic yeast in the degradation of mucilage layer of Coffea robusta Cherries", Applied Microbiology, Mar. 1996, Vol. 14 No 2, pp 256-260;
Hoondal G.S., Tiwari R.P., Tewari R., Dahiya N. "Microbial alkaline pectinases and their industrial applications a review". Applied. Microbiological Biotechnology (2002) 59:409-418;
Boccass F. Roussos s., Gutierrez m., Serrano L., Viniegra G.G. "Production of pectinase from coffe pulp in solid state fermentation system: selection of wild fungal isolate of high potency by a simple three step screening technique". J- Food Sci., Technology, 1994, vol. 31, 22-26.

27.000A.1.
No. 3), revela un proceso para reducir el impacto ambiental de los desechos generados durante el beneficio del café, en el que se evaporan los lixiviados generados durante el beneficio, empleando un evaporador, obteniendo un concentrado con 35° brix.

En particular, el método de reducir la presión del evaporador por debajo de la presión atmosférica para reducir la temperatura de ebullición del líquido y reducir la cantidad de calor necesario para alcanzar el punto de ebullición es bien conocido en el estado de la técnica

En este sentido, la solicitud no presenta evidencia alguna que logre desvirtuar la conclusión que resultaría obvio para una persona del nivel medio versada en el área técnica del desmucilaginado del café y del control y reducción de la contaminación de los subproductos derivados del proceso de desmucilaginación del café, usar tanto las enzimas pectolíticas como la evaporación de lixiviados y desechos con el objeto de: i) tratar y procesar el mucílago del café para reducir la contaminación que éste representa para el ambiente y ii) obtener un producto útil como materia prima para procesos de obtención de biocombustibles o como fuente de alimento para animales.

4. PRUEBA

Solicito se tengan en cuenta como pruebas los documentos aportados en el presente memorial.

Adicionalmente, solicito se tengan en cuenta las pruebas documentales que se aportarán dentro del período de prórroga solicitado a continuación.

5. SOLICITUD DE PRÓRROGA

De manera respetuosa solicito al Despacho conceder la prórroga contemplada en el artículo 42 de la Decisión 486, en concordancia con el artículo 85, a efecto de presentar pruebas adicionales para efectos de sustentar la oposición. Para tales efectos, adjunto el recibo de pago de la tasa correspondiente (ANEXO C).

10

ALIA 27 - R.C. OTA

INTERÉS PARTICULAR

Mi representada, la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, una organización privada conformada bajo las leyes de Colombia que representa a los caficultores del país y es también la administradora designada por el Gobierno Nacional para la administración de los recursos públicos del Fondo Nacional del Café, ha dedicado recursos y esfuerzos a desarrollar tecnologías para el mejoramiento de la calidad del café y de la calidad de vida de los productores de café de Colombia. En consecuencia, es de su legítimo interés oponerse a cualquier solicitud de patente sobre tecnologías que se encuentran en el dominio público y que tienen relación directa o indirecta con la producción, beneficio y/o mejoramiento del café y la utilización de los residuos derivados del proceso de beneficio y su comercialización.

7. NOTIFICACIONES

- 7.1 Mi poderdante podrá ser notificado en la Calle 73 No. 8 -13 de Bogotá, D.C.
- 7.2 El suscrito recibirá notificaciones en la Secretaría de la Superintendencia de Industria y Comercio, o en mi oficina de abogado ubicada en el World Trade Center, Calle 100 No. 8A-37, Torre A, Piso 10, de Bogotá, D.C.

Atentamente,


CARLOS R. OLARTE
C.C. No. 79.782.747 de Bogotá
T.P. 74.295 del C.S. de la J.

Adjunto: **ANEXO A** – Poder y Certificado de Existencia y Representación Legal de Federación Nacional de Cafeteros de Colombia

ANEXO B – Recibo de pago de tasa oficial por concepto de presentación de oposición.

ANEXO C - Recibo de pago de tasa oficial por concepto de prórroga.

BOGOTÁ, D.C.

ANEXO D - NARVAEZ M., L.H.; RAMIREZ G., C.A.; OLIVEROS, T., C.E.; ALVAREZ, M. F. Manejo de Mieles Generadas en La Tecnología BECOLSUB para Eliminar el Impacto Ambiental Ocasionado por los Lixiviados de Café. Facultad Nacional de Agronomía. Medellín. 56(2): 1969-1981. 2003

ANEXO E- Agate, A. D, and BHAT J.V, "Role of pectinolytic Yeasts in the degradation of mucilage layer of Coffea Robusta Cherries", Applied Microbiology, Mar. 1996, Vol. 14 No 2, pp 256-260.

ANEXO F- Hoondal G.S., Tiwari R.P., Tewari R., Dahiya N. "Microbial alkaline pectinases and their industrial applications a review". Applied. Microbiological Biotechnology (2002) 59:409-418

ANEXO G- Boccass F., Roussos s., Gutierrez m., Serrano L., Viniegra G.G. "production of pectinsase from cofee pulp in solid state fermentation system: selection of wild fungal isolate of high potency by a simple three-step screnning technique". J. Food Sci, Technol., 1994, Vol 31, No. 1, 22-26.

DILIGENCIA DE PRESENTACION PERSONAL Y RECONOCIMIENTO DE CONTENIDO FIRMA.

NOTARIA EL ANTERIOR ES RITO DIRIGIDO A:

27 FUE PRESENTADO PERSONALMENTE ANTE EL SUSCRITO EL DIA VEINTISiete DEL MES DE DICIEMBRE DEL AÑO 2008

Con C.C. 29.782.747 y 10.729.51

Y ADENAS OTRAS DEL CONTENIDO DEL ANTERIOR DOCUMENTO Y QUE LA FIRMA QUE LO AUTORIZA FUE PUESTA POR EL EL DELEGANTE

29 DEC 2008

REPUBLICA DE COLOMBIA

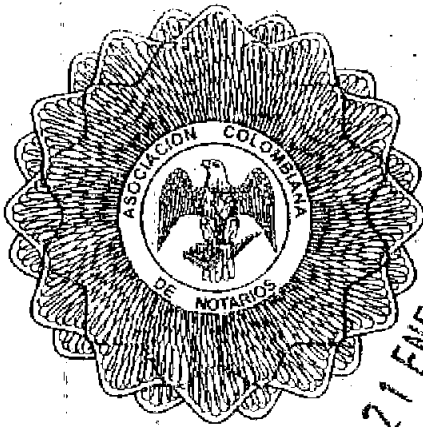
MARIA THERESA DE RODRIGUEZ

NOTARIA (E)

BOGOTÁ, D.C.

WK

6301800



21 ENF 2008

ESCRITURA PUBLICA NUMERO = = = = =

CERO CUARENTA (040) = = = = =

En la ciudad de Bogotá, Distrito Capital, República de Colombia, a los

Veintiuno = = = = = (21) días del mes de

Enero = = = = = del año dos mil ocho

(2008), ante mi, MARIA EUGENIA ROJAS DE

URUELA = = = = = NOTARIA VEINTISIETE (27) DEL

CIRCULO DE BOGOTA, = = = se otorgó la escritura pública que

se consigna en los siguientes términos: -----

CLASE DE ACTO: PODER ESPECIAL PARA REPRESENTACIÓN EN ASUNTOS VARIOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL. -----

FEDERACIÓN NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA

NIT: 860007538-2 -----

A: CARLOS OLARTE, J. IAN RAISBECK y/o JUAN GUILLERMO MOURE. -----

C O M P A R E C I Ó: LUIS GENARO MUÑOZ ORTEGA

mayor de edad, vecino y domiciliado en Colombia,

identificado con cédula de ciudadanía N° 10.536.679, obrando

en nombre y representación de la FEDERACIÓN NACIONAL

DE CAFETEROS DE COLOMBIA, persona jurídica de derecho

privado, sin ánimo de lucro, con domicilio en la ciudad de

Bogotá D.C., con personería jurídica reconocida por el

Gobierno Nacional de la República de Colombia mediante

resolución ejecutiva número 33 del 2 de septiembre de 1928

publicada en el Diario Oficial N° 20.894 de 1928 (en

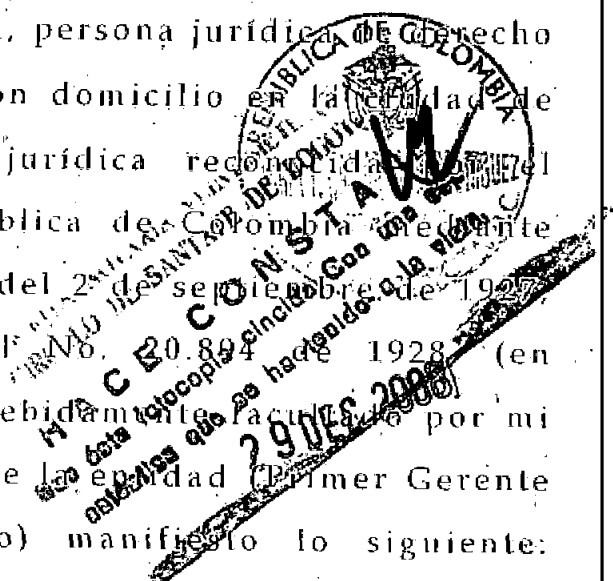
adelante la "PODERDANTE"), debidamente facultado por mi

calidad de representante legal de la entidad (Primer Gerente

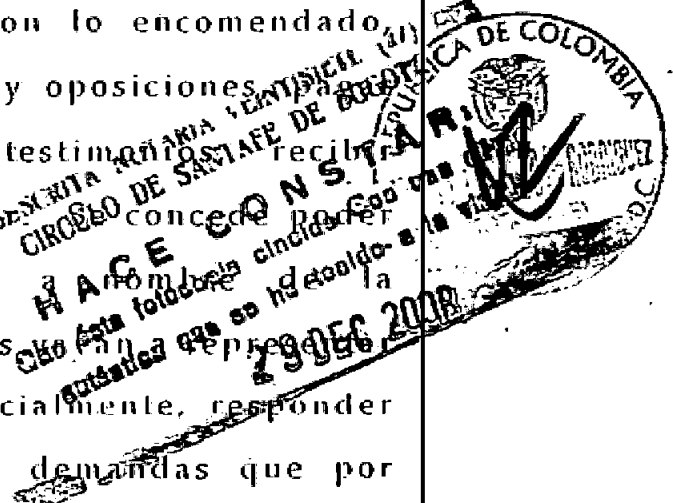
Auxiliar-Gerente Administrativo) manifiesto lo siguiente:

NOTARIA VEINTISIETE

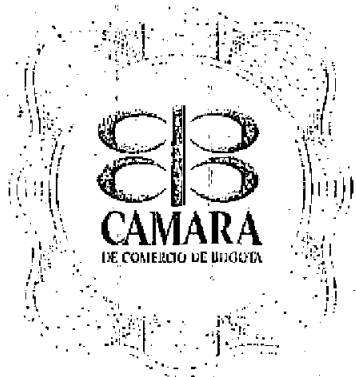
Maria Eugenia Rojas de Urueña



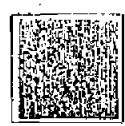
PRIMERO.- Que mediante el presente instrumento público, confiere PODER ESPECIAL, pero amplio y suficiente a CARLOS OLARTE, mayor de edad, vecino y domiciliado en Bogotá D.C., identificado con la cédula de ciudadanía No. 79.782.747 de Bogotá y con Tarjeta Profesional número 74.295, J. IAN RAISBECK, mayor de edad, vecino y domiciliado en Bogotá, D.C., identificado con la cédula de ciudadanía No. 79'376.996 de Bogotá y con Tarjeta Profesional número 135.799 y/o JUAN GUILLERMO MOURE, mayor de edad, vecino y domiciliado en Bogotá, D.C., identificado con la cédula de ciudadanía No. 80'412.281 de Usaquén y con Tarjeta Profesional número 67.343, para que a nombre de la PODERDANTE, presenten, tramiten, obtengan, defiendan y hagan respetar todo derecho o título de propiedad intelectual de la PODERDANTE, tal como Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual de la PODERDANTE en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, copias, recibos, documentos y valores, desistir y percibir costas, ser suficiente para recibir notificaciones, otorgar poderes a quienes a la PODERDANTE judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por



13



01



CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE NORTE

3 DE ENERO DE 2008

HORA : 09:33:51

02C250103046

HOJA : 1 DE 6

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL DE LA ENTIDAD SIN ANIMO DE LUCRO: FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA. NUMERO: S0002579

N.I.T. : 860007538-2

EL SUSCRITO SECRETARIO DE LA CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA, EN EJERCICIO DE LA FACULTAD CONFERIDA POR LOS ARTICULOS 43 Y 144 DEL DECRETO NUMERO 2150 DE 1995.

CERTIFICA :

DOMICILIO: BOGOTA D.C.

DIRECCION: CLL. 73 NO. 8-13

TELEFONO: 3456600 FAX: 2171021

CERTIFICA :

QUE POR CERTIFICACION DEL 28 DE FEBRERO DE 1997 , OTORGADO(A) EN MINISTERIO DE AGRICULTURA , INSCRITA EN ESTA CAMARA DE COMERCIO EL 5 DE MARZO DE 1997 BAJO EL NUMERO: 00002809 DEL LIBRO I DE LAS ENTIDADES SIN ANIMO DE LUCRO, FUE INSCRITA LA ENTIDAD DENOMINADA: FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA

CERTIFICA :

QUE DICHA ENTIDAD OBTUVO SU PERSONARIA JURIDICA NO. 0033 EL 02 DE SEPTIEMBRE DE 1927.

CERTIFICA :

ENTIDAD QUE EJERCE LA FUNCION DE INSPECCION, VIGILANCIA Y CONTROL: MINISTERIO DE AGRICULTURA

CERTIFICA :

QUE DICHA ENTIDAD HA SIDO REFORMADA POR LOS SIGUIENTES DOCUMENTOS:

NUMERO	FECHA	ORIGEN	INSCRIP	FECHA
	1998/12/03	CONGRESO	00023670	1999/06/21
0000003	2000/12/13	CONGRESO	00040882	2001/06/04
0000001	2003/12/10	CONGRESO NACIONAL	00069444	2004/03/16

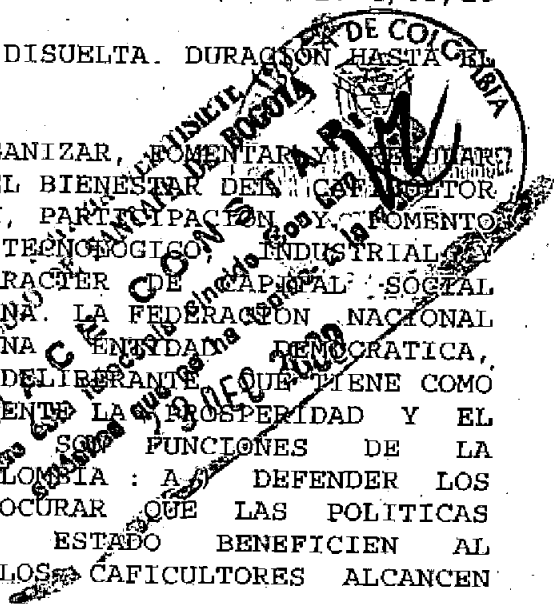
CERTIFICA :

VIGENCIA: QUE LA ENTIDAD NO SE HALLA DISUELTA. DURACION HASTA EL 1 DE DICIEMBRE DE 2094.

CERTIFICA :

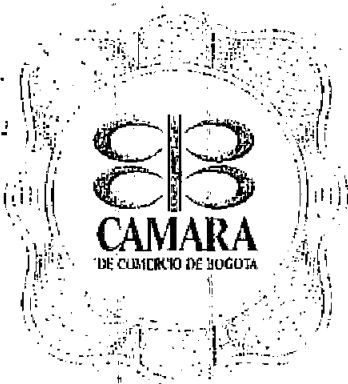
OBJETO: TIENE POR OBJETO ORIENTAR, ORGANIZAR, FOMENTAR Y REGULAR LA CAFICULTURA COLOMBIANA PROCURANDO EL BIENESTAR DEL CAFICULTOR A TRAVES DE MECANISMOS DE COLABORACION, PARTICIPACION Y FOMENTO DE CARACTER ECONOMICO, CIENTIFICO, TECNOLÓGICO, INDUSTRIAL Y COMERCIAL, BUSCANDO MANTENER EL CARACTER DE CAPITAL SOCIAL ESTRATEGICO DE LA CAFICULTURA COLOMBIANA. LA FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA ES UNA ENTIDAD DEMOCRATICA, PARTICIPATIVA, PLURALISTA, FEDERADA Y DELIBERANTE QUE TIENE COMO MISION PROMOVER PRIMERO Y PRIORITARIAMENTE LA PROSPERIDAD Y EL INTERES GENERAL DE LOS PRODUCTORES. SUS FUNCIONES DE LA FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA : A) DEFENDER LOS DERECHOS DE LOS CAFICULTORES. B) PROCURAR QUE LAS POLITICAS MACROECONOMICAS Y SECTORIALES DEL ESTADO BENEFICIEN AL CAFICULTOR. C) TRABAJAR PARA QUE LOS CAFICULTORES ALCANCEN

NOTARIA VEINTISIETE
María Eugenia Rojas de Uruea



NIVELES DE COMPETITIVIDAD QUE LES PERMITA MANTENER UN ADECUADO NIVEL DE VIDA Y CONTINUAR SIENDO EL CAPITAL SOCIAL ESTRATEGICO DEL CAMPO COLOMBIANO. D) CELEBRAR CONVENIOS O CONTRATOS CON EL GOBIERNO NACIONAL, DEPARTAMENTAL O MUNICIPAL Y CON OTRAS ENTIDADES DE CARACTER PUBLICO Y PRIVADO, PARA LA GESTION, ADMINISTRACION Y MANEJO DE PROGRAMAS DE INVERSION E IMPUESTOS, NORMAS, CONTROLES, PRESTACION DE SERVICIOS, PROPAGANDA Y, EN GENERAL, SOBRE TODO LO QUE TIENDA A BENEFICIAR AL CAFICULTOR. E) CELEBRAR PACTOS O CONVENIOS CON ORGANIZACIONES SIMILARES DE OTROS PAISES PRODUCTORES, CON INSTITUCIONES INTERNACIONALES, CON ORGANIZACIONES NO GUBERNAMENTALES Y CON EMPRESAS PRIVADAS PARA LA DEFENSA DE LOS INGRESOS DE LOS CAFICULTORES Y EL FOMENTO DEL CONSUMO, DEL CULTIVO, PROPAGANDA, CUOTAS DE EXPORTACION, PRECIOS, TRANSPORTE, BANCA, IMPUESTOS Y COMERCIO CAFETERO. F) ENTREGAR FONDOS EN FIDEICOMISO, O BAJO CUALQUIER MODALIDAD, A ENTIDADES NACIONALES O DEL EXTERIOR, PARA FINANCIAR ACTIVIDADES RELACIONADAS CON EL CAFICULTOR Y LA INDUSTRIA CAFETERA EN GENERAL. G) CON ARREGLO A LOS REGLAMENTOS ESPECIFICOS ADOPTADOS POR LOS ORGANOS COMPETENTES, PRESTAR ASISTENCIA A LOS CAFICULTORES, CON EL FIN DE MEJORAR SU NIVEL DE INGRESOS. H) DIVULGAR ENTRE LOS CAFICULTORES LOS AVANCES TECNICOS Y LA INFORMACION CORRESPONDIENTE SOBRE EL CULTIVO, BENEFICIO Y COMERCIO DEL CAFE Y MANTENERLOS ACTUALIZADOS EN RELACION CON EL COMPORTAMIENTO DE LAS VARIABLES ECONOMICAS, SOCIALES Y PRODUCTIVAS QUE INCIDEN SOBRE LA ACTIVIDAD. I) APOYAR AL CAFICULTOR MEDIANTE LA ADQUISICION, VENTA, PRESTAMO, ALQUILER O DISTRIBUCION DE LOS ELEMENTOS NECESARIOS O UTILES PARA LA CAFICULTURA. J) ORGANIZAR, ADMINISTRAR O PROMOVER OBRAS DE UTILIDAD COMUN, EN CUANTO FAVOREZCAN LA CAFICULTURA DEL PAIS. K) ORGANIZAR, ADMINISTRAR O PROMOVER, CON SUS RECURSOS O CON EL CONCURSO DE ORGANIZACIONES CAFETERAS O ENTIDADES OFICIALES O PARTICULARES DE COLOMBIA O DE OTROS PAISES, ESTABLECIMIENTOS DE COMERCIO DEDICADOS A LA VENTA, DISTRIBUCION Y DIVULGACION DEL CONSUMO DE CAFE, ALMACENES GENERALES DE DEPOSITO DE CAFE, BODEGAS, PLANTAS DE PROCESAMIENTO DE CAFE Y EMPRESAS DE COMERCIALIZACION, ALMACENES DE PROVISION AGRICOLA, SOCIEDADES COOPERATIVAS, ENTIDADES SOLIDARIAS O ASOCIATIVAS DE AHORRO Y CREDITO, ESQUEMAS DE COBERTURA Y CONTROL DE RIESGO, TOSTADORAS Y TRILLADORAS DE CAFE, CENTRALES DE BENEFICIO, QUE TENGAN POR OBJETO MEJORAR EL INGRESO DEL CAFICULTOR, DISMINUIR LOS COSTOS DE PRODUCCION, HACER MAS EFICIENTE SU COMERCIALIZACION Y MEJORAR LAS CALIDADES DEL CAFE; L) CREAR OFICINAS DE PROPAGANDA, VENTA, COMISION DEPOSITO DE CAFE, EN EL INTERIOR Y EN EL EXTERIOR Y ORGANIZAR, ADMINISTRAR O PARTICIPAR EN BOLSAS CAFETERAS. M .) ORGANIZAR Y SOSTENER UNA ACTIVA Y ADECUADA PROPAGANDA DE CAFE COLOMBIANO EN EL INTERIOR Y EN EL EXTERIOR, BUSCANDO GENERAR MAYOR RECONOCIMIENTO Y VALOR AGREGADO AL PRODUCTOR Y PROMOVER EL AUMENTO DEL CONSUMO. N) COMPRAR CAFE, PROCESARLO Y VENDERLO EN EL MERCADO INTERIOR Y DEL EXTERIOR, O RETENERLO EN EL PAIS. O) REALIZAR UN SEGUIMIENTO DE LA INDUSTRIA CAFETERA MUNDIAL, Y SUS AGENTES, LOS PAISES PRODUCTORES, LOS PAISES CONSUMIDORES, Y, EN GENERAL, DE TODOS AQUELLOS ASPECTOS NACIONALES O INTERNACIONALES QUE SEAN RELEVANTES PARA EL DESARROLLO DE LA INDUSTRIA CAFETERA COLOMBIANA. P) LLEVAR UNA COMPLETA ESTADISTICA DE LA ACTIVIDAD CAFETERA Y MANTENER PERMANENTEMENTE INFORMADO AL GRENIO ENDE SUS DIVERSAS INSTANCIAS, SOBRE LO CONCERNIENTE A LOS VENTAS EN LOS PRINCIPALES MERCADOS, EXISTENCIAS O VENTAS EN LOS IMPORTANTES

AA SUSCRITA NOTARIA VENTURA ENDE SUS
CIRCULO DE SANTA FE DE BOGOTA ENDE SUS
HACE CONST
Que esta fotocopia elncido Con
satbales quo se ha tonido a
29 DEC. 2008



01



* 5 6 3 2 6 5 8 6 *



CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE NORTE

3 DE ENERO DE 2008

HORA : 09:33:51

02C250103046

HOJA : 2 DE 6

* * * * *

CENTROS DE DISTRIBUCION O CONSUMO MUNDIAL Y SOBRE LOS PRONOSTICOS RELATIVOS A LA PRODUCCION DE CAFE, Y, EN GENERAL, A TODO LO QUE PUEDA CONVENIR PARA LA BUENA ORGANIZACION DE LA INDUSTRIA CAFETERA. IGUALMENTE CORRESPONDE A LA FEDERACION, EN EL PAIS, LA ESTADISTICA DE PRODUCTORES, DE PREDIOS CAFETEROS, DE PRODUCCION Y COSTOS, DE PRODUCTIVIDAD, Y, EN GENERAL, DE TODAS LAS ACTIVIDADES CAFETERAS QUE PUEDAN SERVIR PARA LA MEJOR ORIENTACION DE LA INDUSTRIA EN COLOMBIA, ASI COMO LOS INDICADORES SOCIALES DE LA ACTIVIDAD CAFETERA. Q) PROMOVER Y EJECUTAR PROGRAMAS DE DESARROLLO ECONOMICO Y DE COMPLEMENTACION DEL INGRESO DEL CAFICULTOR. R) APOYAR LA INVESTIGACION Y LA TRANSFERENCIA DE TECNOLOGIA, PARA EL CULTIVO, EL PROCESAMIENTO Y LA COMERCIALIZACION DEL CAFE PROCURANDO, EN TODO CASO, LA PRESERVACION DEL MEDIO AMBIENTE Y LA CONSERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES. S) FOMENTAR, APOYAR E INTENSIFICAR EL ESTABLECIMIENTO DE INDUSTRIAS COMPLEMENTARIAS O QUE TIENDAN A INCREMENTAR EL INGRESO DE LOS CAFICULTORES. T) CONTRATAR EMPRESTITOS O PRESTAMOS CON ENTIDADES NACIONALES O EXTRANJERAS, TENIENDO EN CUENTA LAS DISPOSICIONES DE LOS ESTATUTOS Y DE LOS CONTRATOS CELEBRADOS CON EL GOBIERNO NACIONAL, SI FUERE EL CASO, Y CONSTITUIR LAS GARANTIAS PERTINENTES. U) CON RECURSOS PROPIOS U OBTENIDOS DE ENTIDADES OFICIALES, SEMIOFICIALES O PARTICULARES, PROCURAR LA DOTACION DE LA INFRAESTRUCTURA FISICA Y SOCIAL INDISPENSABLE PARA LOGRAR EL DESARROLLO SOCIAL Y ECONOMICO DE LOS HABITANTES DE LA ZONA DE INFLUENCIA CAFETERA. V) PROCURAR POR LOS MEDIOS QUE SE CONSIDEREN MAS ADECUADOS EL ESTABLECIMIENTO DE UNA POLITICA INTEGRAL DE PROTECCION SOCIAL A LOS CAFICULTORES. W) ORGANIZAR FUNDACIONES O ASOCIACIONES SIN ANIMO DE LUCRO, PARA ATENDER LA PRESTACION DE SERVICIOS A SUS FEDERADOS, TALES COMO LA EDUCACION Y LA SALUD. X) REALIZAR INVERSIONES PERMANENTES CON SUS RECURSOS SOLO EN ACTIVOS QUE PERTENEZCAN A LA INDUSTRIA CAFETERA. EFECTUAR INVERSIONES TEMPORALES, PARA OBTENER BENEFICIOS Y RENDIMIENTOS QUE GARANTICEN LA SOLIDEZ PATRIMONIAL DE LA FEDERACION Y LE PERMITAN ATENDER OPORTUNA Y ADECUADAMENTE SUS PROGRAMAS A FAVOR DE SUS ASOCIADOS Y DE BIENESTAR PARA SUS SERVIDORES. Y) REALIZAR TODA CLASE DE ACTOS O NEGOCIOS JURIDICOS PODRAN EN CONSECUENCIA, ADQUIRIR Y ENAJENAR TODA CLASE DE BIENES, EN CUANTO LA ADQUISICION O ENAJENACION CORRESPONDAN AL OBJETO.

CERTIFICA

PATRIMONIO : \$ 1,314,923.00

CERTIFICA :

** ORGANO DIRECTIVO

NOMBRE

MIEMBRO PRINCIPAL COMITE EJECUTIVO

RESTREPO SALAZAR JUAN CAMILO

MIEMBRO PRINCIPAL COMITE EJECUTIVO

GOMEZ ESTRADA MARIO

IDENTIFICACION

C. 00017157059

C.C. 00010211732

NOTARIA VENTISIELE
Maria Eugenia Rojas de Urueta

COLOMBIA
CIRCULO NOTARIAL DE BOGOTA
MACE
Esta fotocopia circula con el mismo valor que se ha otorgado
29 DEC 2008

MIEMBRO PRINCIPAL COMITE EJECUTIVO CAMPOS ARANA CESAR BLADIO	C.C. 00005881550
MIEMBRO PRINCIPAL COMITE EJECUTIVO RAMIREZ MONTOYA CARLOS ROBERTO	C.C. 00092937864
MIEMBRO PRINCIPAL COMITE EJECUTIVO ECHEVERRY CASTAÑO CESAR AUGUSTO	C.C. 00009956514
MIEMBRO PRINCIPAL COMITE EJECUTIVO GOMEZ BUENDIA CARLOS ALBERTO	C.C. 00017057077
MIEMBRO PRINCIPAL COMITE EJECUTIVO AZÚERO RAMIREZ CARLOS FLORESMIRO	C.C. 00012090307
MIEMBRO PRINCIPAL COMITE EJECUTIVO CASTRILLON M FERNANDO	C.C. 00010518013
MIEMBRO PRINCIPAL COMITE EJECUTIVO CALA ROBAYO JORGE	C.C. 00000160838
MIEMBRO PRINCIPAL COMITE EJECUTIVO CAMPO GONZALEZ RAMON ALBERTO	C.C. 00012558183
MIEMBRO PRINCIPAL COMITE EJECUTIVO CAMPO SOTO RODOLFO JOSE	C.C. 00005131927
MIEMBRO PRINCIPAL COMITE EJECUTIVO ROMAN CALDERON HERNAN MIGUEL	C.C. 00017197691
MIEMBRO PRINCIPAL COMITE EJECUTIVO YAÑEZ CARVAJAL ALFREDO	C.C. 00013223632
MIEMBRO PRINCIPAL COMITE EJECUTIVO GARCIA PARRA JAIME	C.C. 00000001394
MIEMBRO PRINCIPAL COMITE EJECUTIVO BOHORQUEZ BOHORQUEZ JAVIER	C.C. 00017066695

CERTIFICA :

REPRESENTACION LEGAL: LA REPRESENTACION LEGAL DE LA FEDERACION PARA ASUNTOS JUDICIALES, EXTRAJUDICIALES Y ADMINISTRATIVOS DE CARACTER LABORAL INDIVIDUAL O COLECTIVO, LA TENDRA EL DIRECTOR DE RELACIONES INDUSTRIALES Y EN SU DEFECTO A QUIEN PARA ESOS PROPOSITOS DESIGNE EL GERENTE GENERAL. LA DESIGNACION DE DOS REPRESENTANTES LEGALES SUPLENTE, QUIENES TENDRAN LA DISTINCION DE PRIMER GERENTE AUXILIAR Y SEGUNDO GERENTE AUXILIAR, Y DEL SECRETARIO GENERAL ESTARA A CARGO DEL GERENTE GENERAL, PREVIA CONSULTA CON EL COMITE DIRECTIVO. EN CASO DE AUSENCIAS TEMPORALES, EL GERENTE GENERAL ENCARGARA A UNO DE SUS SUPLENTE. CUANDO SE TRATE DE AUSENCIAS PERMANENTES O GENERADAS POR UN IMPEDIMENTO DEL GERENTE GENERAL, SERA EL COMITE DIRECTIVO QUIEN ENCARGUE A UNO DE LOS DOS REPRESENTANTES LEGALES SUPLENTE, MIENTRAS SE DESIGNA UN NUEVO TITULAR EN PROPIEDAD.

CERTIFICA :

REPRESENTACION LEGAL

PRINCIPAL(ES) : - GERENTE GENERAL

SILVA LUJAN GABRIEL

C.C. 00079142102

SUPLENTE(ES) : - PRIMER GERENTE AUXILIAR

MUÑOZ ORTEGA LUIS GENARO

C.C. 00010536679

- SEGUNDO GERENTE AUXILIAR

DURAN CATALINA CRANE DE

C.C. 00035460200

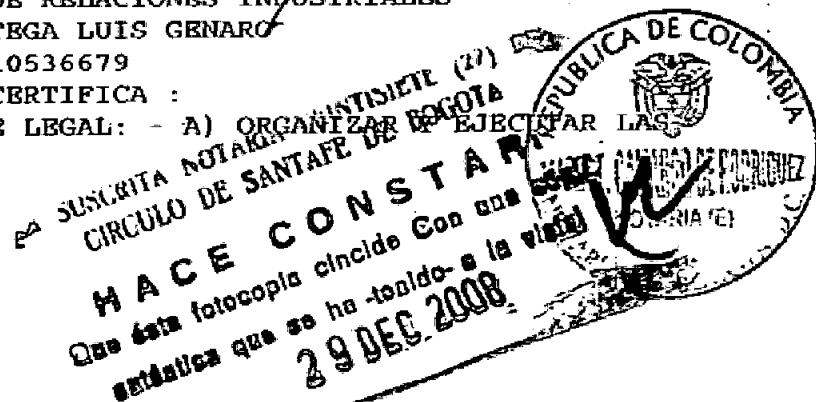
- DIRECTOR DE RELACIONES INDUSTRIALES

MUÑOZ ORTEGA LUIS GENARO

C.C. 00010536679

CERTIFICA :

FACULTADES DEL REPRESENTANTE LEGAL: - A) ORGANIZAR Y EJECUTAR LAS





CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE NORTE

3 DE ENERO DE 2008

HORA : 09:33:51

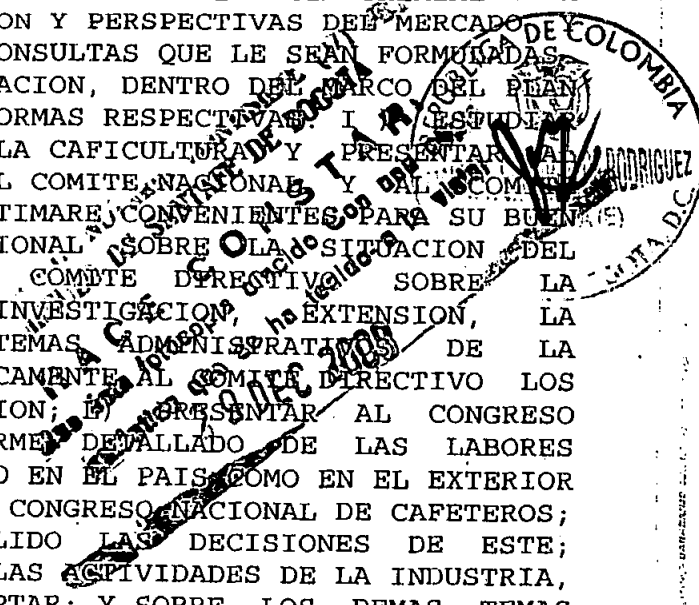
02C250103046

HOJA : 3 DE 6

* * * * *

POLITICAS Y LOS PROGRAMAS DE LA FEDERACION, DE ACUERDO CON LOS ESTATUTOS, LOS CONTRATOS CELEBRADOS CON EL GOBIERNO NACIONAL, LOS ACUERDOS Y RESOLUCIONES DE LOS CONGRESOS NACIONALES DE CAFETEROS Y LAS ORDENES E INSTRUCCIONES DEL COMITE NACIONAL COMO ORGANISMO ADMINISTRADOR DEL FONDO NACIONAL DEL CAFE Y DEL COMITE DIRECTIVO COMO MAXIMA AUTORIDAD ADMINISTRATIVA DE LA FEDERACION; - B.) REPRESENTAR LEGALMENTE A LA FEDERACION Y ACTUAR COMO SU VOCERO ANTE TODAS LAS AUTORIDADES DE LA REPUBLICA O DE CUALQUIER PAIS Y ANTE TERCEROS, CON FACULTAD PARA DELEGAR EN OTROS EMPLEADOS O EN APODERADOS ESPECIALES; EL GERENTE GENERAL O SUS SUPLENTE PODRAN CONFERIR PODERES GENERALES A LOS DIRECTORES EJECUTIVOS DE LOS COMITES DEPARTAMENTALES DE CAFETEROS PARA QUE REPRESENTEN A LA FEDERACION ANTE LAS AUTORIDADES DEL RESPECTIVO DEPARTAMENTO Y ATIENDAN TODO LO RELACIONADO CON LOS EMPLEADOS DE CADA COMITE; C) DIRIGIR LAS RELACIONES DE LA FEDERACION CON LAS ENTIDADES PUBLICAS Y PRIVADAS. - D) ELABORAR DE MANERA QUINQUENAL UN PLAN ESTRATEGICO EN CONCORDANCIA CON EL OBJETO DE LA FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS, AL CUAL DEBERAN ADECUARSE LOS PLANES Y PROGRAMAS DE LOS COMITES DEPARTAMENTALES Y MUNICIPALES. DICHO PLAN ESTRATEGICO SERA LLEVADO PARA SU APROBACION AL COMITE DIRECTIVO PARA SU ADOPCION POR EL CONGRESO NACIONAL DE CAFETEROS. E) PROVEER LOS CARGOS EN LA OFICINA CENTRAL DE LA FEDERACION, DE ACUERDO CON EL ORGANIGRAMA, LA POLITICA SALARIAL Y LA PLANTA DE CARGOS APROBADOS POR EL COMITE DIRECTIVO. F) CELEBRAR TODA CLASE DE ACTOS, CONTRATOS O NEGOCIOS JURIDICOS, CUYA CUANTIA NO EXCEDA DE MIL QUINIENTOS CINCUENTA SALARIOS MINIMOS MENSUALES LEGALES VIGENTES (1.550 SMMVLV) EN CONCORDANCIA CON EL LITERAL P) DEL ARTICULO 23. G) MANTENER INFORMADOS A LA DIRIGENCIA GREMIAL Y A LOS CAFICULTORES SOBRE LA SITUACION Y PERSPECTIVAS DEL MERCADO Y COSECHAS DE CAFE, Y ATENDER LAS CONSULTAS QUE LE SEAN FORMULADAS. H) ORDENAR LOS GASTOS DE LA FEDERACION, DENTRO DEL MARCO DEL PLAN ESTRATEGICO, LOS PRESUPUESTOS Y NORMAS RESPECTIVAS. I) ESTUDIAS LAS CIRCUNSTANCIAS QUE CONFRONTE LA CAFICULTURA Y PRESENTAR AL CONGRESO NACIONAL DE CAFETEROS, AL COMITE NACIONAL Y AL COMITE DIRECTIVO, LAS INICIATIVAS QUE ESTIMARE CONVENIENTES PARA SU BUEN MANEJO. J) INFORMAR AL COMITE NACIONAL SOBRE LA SITUACION DEL FONDO NACIONAL DEL CAFE Y AL COMITE DIRECTIVO SOBRE LA PRODUCCION, COMERCIALIZACION, INVESTIGACION, EXTENSION, LA SITUACION FINANCIERA Y DEMAS TEMAS ADMINISTRATIVOS DE LA FEDERACION; K) PRESENTAR PERIODICAMENTE AL COMITE DIRECTIVO LOS ESTADOS FINANCIEROS DE LA FEDERACION; L) PRESENTAR AL CONGRESO NACIONAL DE CAFETEROS UN INFORME DETALLADO DE LAS LABORES REALIZADAS POR LA FEDERACION TANTO EN EL PAIS COMO EN EL EXTERIOR A PARTIR DE LA REUNION DEL ULTIMO CONGRESO NACIONAL DE CAFETEROS; SOBRE LA MANERA QUE SE HAYAN CUMPLIDO LAS DECISIONES DE ESTE; SOBRE LOS PROBLEMAS PRINCIPALES, LAS ACTIVIDADES DE LA INDUSTRIA, LAS SOLUCIONES QUE CONVENDRIA ADOPTAR; Y SOBRE LOS DEMAS TEMAS

Notaria Eugenia Rojas de Uribe



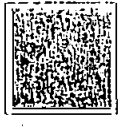
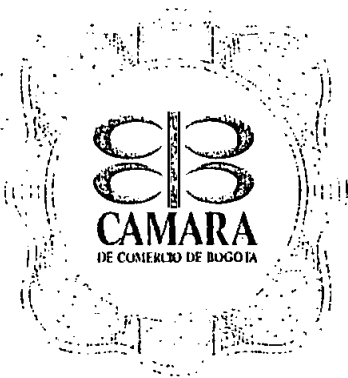
PERTINENTES DE ACUERDO CON LA SITUACION Y PERSPECTIVAS DE LA FEDERACION Y DE LA ECONOMIA CAFETERA; M) ELABORAR EL PROYECTO DE PRESUPUESTO DE LA FEDERACION PARA LA VIGENCIA SIGUIENTE, SOMETERLO A CONSIDERACION DEL COMITE DIRECTIVO Y PRESENTARLO OPORTUNAMENTE AL CONGRESO NACIONAL DE CAFETEROS, PARA SU ESTUDIO Y APROBACION. N) MANTENER OPORTUNAMENTE INFORMADOS A LOS COMITES DEPARTAMENTALES SOBRE LAS PRINCIPALES ACTIVIDADES DESARROLLADAS POR EL COMITE NACIONAL, EL COMITE DIRECTIVO, LA GERENCIA GENERAL Y DEMAS DEPENDENCIAS; O) ORIENTAR LA POLITICA SALARIAL APLICABLE A LOS EMPLEADOS ADSCRITOS A LA GERENCIA GENERAL Y DEMAS GERENCIAS, OFICINAS DEL EXTERIOR Y DE LOS DIRECTORES EJECUTIVOS, UNA VEZ APROBADA POR EL COMITE DIRECTIVO. P) COORDINAR LA POLITICA DE INVERSIONES, GASTOS, PROGRAMAS Y ACTIVIDADES DE LOS COMITES DEPARTAMENTALES EN CONSONANCIA CON LOS LINEAMIENTOS ESTABLECIDOS POR EL CONGRESO NACIONAL DE CAFETEROS, EL COMITE NACIONAL Y EL COMITE DIRECTIVO. Q) COORDINAR LA ACCION GREMIAL PARA LA EFICAZ DEFENSA DE LOS PRODUCTORES Y DE LA ACTIVIDAD CAFETERA Y LAS DISTINTAS CAMPAÑAS QUE DEBAN EJECUTAR LOS COMITES DEPARTAMENTALES A TRAVES DE SUS DIRECTORES EJECUTIVOS. R) OTORGAR EL VISTO BUENO A LA DESIGNACION DE LOS DIRECTORES EJECUTIVOS QUE REALICEN LOS COMITES DEPARTAMENTALES Y SOLICITAR SU REMOCION CUANDO SE PRESENTEN LAS CIRCUNSTANCIAS PREVISTAS EN EL LITERAL D) DEL ARTICULO 30. EN CASO QUE EL COMITE DEPARTAMENTAL NO PROCEDA A LA REMOCION SOLICITADA POR EL GERENTE GENERAL, SE CONSULTARA AL COMITE DIRECTIVO PARA SU DECISION FINAL. EL GERENTE GENERAL PODRA APLAZAR, INFORMANDO DE MANERA OPORTUNA AL COMITE DIRECTIVO, EL ENVIO DE LOS DINEROS QUE CORRESPONDEN A LOS COMITES DEPARTAMENTALES CUANDO ESTOS NO HAYAN PRESENTADO OPORTUNAMENTE LAS CUENTAS CORRESPONDIENTES, O HABIENDOLAS PRESENTADO NO FUEREN SATISFACTORIAS O HAYAN INCURRIDO EN VIOLACION DE LAS NORMAS ESTATUTARIAS O REGLAMENTARIAS, O DE LAS POLITICAS GENERALES DE LA FEDERACION, CASO EN EL CUAL LA GERENCIA GENERAL PODRA ORDENAR LA INTERVENCION DE DICHO COMITE DEPARTAMENTAL. CORRESPONDE AL COMITE DIRECTIVO AUTORIZAR LA CELEBRACION DE CONTRATOS CON EL GOBIERNO NACIONAL, CON ENTIDADES TERRITORIALES, CON INSTITUCIONES PUBLICAS Y PRIVADAS, CON ORGANISMOS INTERNACIONALES Y CON ORGANIZACIONES NO GUBERNAMENTALES A NOMBRE DE LA FEDERACION; AUTORIZAR AL GERENTE GENERAL PARA LA CELEBRACION DE ACTOS, CONTRATOS O NEGOCIOS JURIDICOS A NOMBRE DE LA FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS, INCLUIDOS PERO NO LIMITADOS A LA ADQUISICION, ENAJENACION, GRAVAMENES O LIMITACIONES DEL DOMINIO DE INMUEBLES, A CUALQUIER TITULO, QUE SE HAGAN POR LA OFICINA CENTRAL O POR LOS COMITES DEPARTAMENTALES, LO MISMO QUE LA PARTICIPACION EN SOCIEDADES, CUYA CUANTIA EXCEDA DE MIL QUINIENTOS CINCUENTA SALARIOS MINIMOS MENSUALES LEGALES VIGENTES (1.550 SMMLV).

CERTIFICA:

QUE POR RESOLUCION NO. 002 DEL 12 DE MARZO DE 1990, INSCRITA EL 3 DE JUNIO DE 1997, BAJO EL NO. 5857 DEL LIBRO 51, EL GERENTE GENERAL DE LA FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA, EN USO DE SUS ATRIBUCIONES, Y CONFORME AL ARTICULO 23 DE LOS ESTATUTOS, FACULTO A CADA UNO DE LOS SEÑORES SUBGERENTE GENERAL, PRIMER GERENTE AUXILIAR Y SEGUNDO GERENTE AUXILIAR, GERENTE ADMINISTRATIVO PARA QUE, ACTUANDO SEPARADAMENTE, REPRESENTEN A LA FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA, EJERCIENDO SU PERSONERIA, ANTE TERCEROS AUTORIDADES CIVILES, JUDICIALES Y ADMINISTRATIVAS DE LA REPUBLICA O DE CUALQUIER OTRO PAIS.



16



01

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE NORTE

3 DE ENERO DE 2008

HORA : 09:33:51

02C250103046

HOJA : 4 DE 6

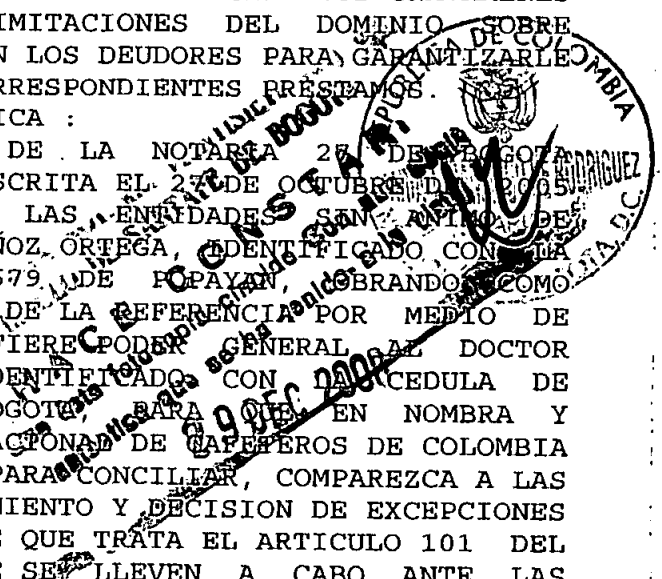
CERTIFICA :

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 102 DE LA NOTARIA 06 DE BOGOTA D.C., DEL 16 DE ENERO DE 2002, INSCRITA EL 23 DE JULIO DE 2002 BAJO EL NO. 52475 DEL LIBRO I, DE LOS LIBROS DE LAS ENTIDADES SIN ANIMO DE LUCRO, COMPARECIO EMILIO ECHEVERRI MEJIA IDENTIFICADO CON LA CEDULA DE CIUDADANIA NO. 4.317.954 DE MANIZALES, EN SU CALIDAD DE REPRESENTANTE LEGAL DE LA SOCIEDAD DE LA REFERENCIA, POR MEDIO DE LA PRESENTE ESCRITURA PUBLICA, OTORGA PODER GENERAL A LUIS GENARO MUÑOZ ORTEGA, IDENTIFICADO CON LAS CEDULA DE CIUDADANIA NO. 10.536.679 DE BOGOTA, PARA QUE EN NOMBRE DE LA ENTIDAD REALICE LOS SIGUIENTES ACTOS: 1. SUSCRIBA LA ESCRITURA PUBLICA MEDIANTE LA CUALES LA FEDERACION ACEPTE LAS HIPOTECAS QUE LOS CITADOS EMPLEADOS DE LA FEDERACION O DE LOS ALMACENES GENERALES DE DEPOSITO DE CAFE ALMACAFE, CONSTITUYAN EN FAVOR DE LA FEDERACION PARA GARANTIZAR EL PAGO DE LOS PRESTAMOS. 2. SUSCRIBA LAS ESCRITURAS PUBLICAS DE CANCELACION DE LAS HIPOTECAS, QUE COMO GARANTIA DE LOS PRESTAMOS DE VIVIENDA OTORGADOS TANTO A LOS EMPLEADOS DE LA FEDERACION COMO A LOS DE LOS ALMACENES GENERALES DE DEPOSITO DE CAFE ALMACAFE, HAYAN SIDO CONSTITUIDOS A FAVOR DE LA FEDERACION. 3. CONFIERE PODERES ESPECIALES, CON LOS MISMOS FINES A LOS SEÑORES GERENTES REGIONALES DE LOS ALMACENES GENERALES DE DEPOSITO DE CAFE ALMACAFE. 4. ASUMA EL MANEJO DE TODAS LAS GESTIONES NOTARIALES PARA EL BUEN EXITO DE LA GESTION QUE SE ENCOMIENDA. SOLICITE Y RETIRE LAS COPIAS DE LAS ESCRITURAS. 5. REPRESENTA A LA FEDERACION EN LA CELEBRACION DE CONTRATOS DE MUTUO, POR CONCEPTO DE PRESTAMOS DE DINERO OTORGADOS POR LA FEDERACION A SUS EMPLEADOS O A LOS DE ALMACAFE EN EL DESARROLLO DEL PROGRAMA DE BIENESTAR SOCIAL, Y ACEPTE Y EN SU MOMENTO CANCELE LOS GRAVAMENES DE PRENDA O SIN TENENCIA O LIMITACIONES DEL DOMINIO SOBRE VEHICULOS AUTOMOTORES, CONSTITUYAN LOS DEUDORES PARA GARANTIZARLE A LA FEDERACION EL PAGO DE LOS CORRESPONDIENTES PRESTAMOS.

CERTIFICA :

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 657 DE LA NOTARIA 27 DE BOGOTA D.C., DEL 01 DE JUNIO DE 2004, INSCRITA EL 27 DE OCTUBRE DE 2005 BAJO EL NO. 91131 DEL LIBRO I DE LAS ENTIDADES SIN ANIMO DE LUCRO, COMPARECIO LUIS GERARDO MUÑOZ ORTEGA, IDENTIFICADO CON LA CEDULA DE CIUDADANIA NO. 10.536.679 DE BOGOTA, REPRESENTANTE LEGAL DE LA ENTIDAD DE LA REFERENCIA, POR MEDIO DE LA PRESENTE ESCRITURA PUBLICA CONFIERE PODER GENERAL AL DOCTOR GABRIEL AUGUSTO ROJAS GIRALDO, IDENTIFICADO CON LA CEDULA DE CIUDADANIA NO. 19.366.099 DE BOGOTA, PARA QUE EN NOMBRE Y REPRESENTACION DE LA FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA Y REVESTIDO DE PLENAS FACULTADES PARA CONCILIAR, COMPAREZCA A LAS AUDIENCIAS DE CONCILIACION, SANEAMIENTO Y DECISION DE EXCEPCIONES PREVIAS Y FIJACION DEL LITIGIO, DE QUE TRATA EL ARTICULO 101 DEL CODIGO DE PROCEDIMIENTO CIVIL, QUE SE LLEVEN A CABO ANTE LAS

NOTARIA VEINISIETE
María Eugenia Rojas de Urueta

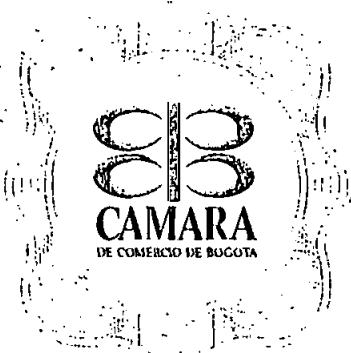


AUTORIDADES JURISDICCIONALES DEL ORDEN CIVIL, EN TODO EL TERRITORIO DE LA REPUBLICA, DENTRO DE LOS PROCESOS CIVILES ORDINARIOS ABREVIADOS Y DE EJECUCION (EJECUTIVO SINGULAR, EJECUTIVO HIPOTECARIO Y EJECUTIVO CON TITULO PRENDARIO), EN LOS CUALES LA FEDERACION SEA PARTE COMO DEMANDANTE O COMO DEMANDADA, E IGUALMENTE PARA QUE COMPAREZCA EN LA MISMA CLASE DE PROCESOS, REVESTIDO DE PLENA FACULTAD PARA CONFESAR, A ABSOLVER LOS INTERROGATORIOS A INSTANCIA DE PARTE QUE DEBA ABSOLVER EL REPRESENTANTE LEGAL DE LA FEDERACION. PRESENTE EL DOCTOR GABRIEL AUGUSTO ROJAS GIRALDO, DE LAS CONDICIONES CIVILES ANTERIORMENTE ANOTADAS, MANIFIESTA QUE ACEPTA EL PODER GENERAL QUE MEDIANTE LA PRESENTE ESCRITURA SE CONFIERE.

CERTIFICA :

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 925 DE LA NOTARIA 27 DE BOGOTA D.C., DEL 08 DE AGOSTO DE 2005, INSCRITA EL 27 DE OCTUBRE DE 2005 BAJO EL NO. 91130 DEL LIBRO I DE LAS ENTIDADES SIN ANIMO DE LUCRO, COMPARECIO LUIS GERARDO MUÑOZ ORTEGA, IDENTIFICADO CON LA CEDULA DE CIUDADANIA NO. 10. 536. 679 DE POPAYAN, OBRANDO COMO REPRESENTANTE LEGAL DE LA ENTIDAD DE LA REFERENCIA POR MEDIO DE LA PRESENTE ESCRITURA PUBLICA CONFIERE PODER GENERAL AL DOCTOR GABRIEL AUGUSTO ROJAS GIRALDO, MAJOR VECINO DE ESTA CIUDAD, IDENTIFICADO CON CEDULA DE CIUDADANIA NUMERO 19.366.099 DE BOGOTA Y LIBRETA MILITAR NUMERO 19.366. 099, DISTRITO MILITAR NUMERO TREINTA Y OCHO (38), JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PERSONAL DE LA ENTIDAD, PARA QUE REVESTIDO DE LA PLENITUD DE LAS FACULTADES QUE LOS ESTATUTOS CONFIEREN A QUIEN OTORGA ESTE PODER, REPRESENTA A LA FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA, POR, UNA PARTE, EN TODA CLASE DE PROCESOS ORDINARIOS, EJECUTIVOS Y DE FUERO SINDICAL QUE SE ADELANTEN ANTE LA JUSTICIA LABORAL EN CUALQUIER PARTE DEL TERRITORIO NACIONAL Y CUALQUIERA QUE SEA LA ; JERARQUIA DEL JUZGADO O TRIBUNAL QUE CONOZCA DE ELLOS, EN LOS CUALES DEBA INTERVENIR A LA FEDERACION COMO DEMANDANTE O COMO DEMANDADA, Y, POR OTRA PARTE, EN AUDIENCIAS DE CONCILIACION PROCESAL EXTRAPROCESAL DE CARACTER LABORAL QUE LA FEDERACION QUIERA LLEVAR A CABO, CON LA INTERVENCION DE CUALQUIER JUEZ LABORAL. IGUALMENTE LE CONFIERE PODER PARA QUE, DENTRO DE LA MISMA ORBITA LABORAL REPRESENTA A LA FEDERACION ANTE EL MINISTERIO DE PROTECCION SOCIAL, EN TODAS LAS DILIGENCIAS DE CARACTER ADMINISTRATIVO LABORAL INDIVIDUAL Y DE FUERO SINDICAL EN AQUELLA DEBA FORMAR PARTE, EN VIRTUD DE TODO LO ANTERIOR, EL DOCTOR ROJAS GIRALDO PODRA RECIBIR TODA CLASE DE NOTIFICACIONES TANTO ADMINISTRATIVAS COMO JUDICIALES, CONCURRIR, CON PLENA FACULTAD PARA CONCILIAR, A AUDIENCIAS DE CONCILIACION TANTO PROCESALES COMO EXTRAPROCESALES, JUDICIALES O ADMINISTRATIVAS ABSOLVER, CON PLENA FACULTAD PARA CONFESAR, INTERROGATORIOS DE PARTE QUE SE LE FORMULEN AL REPRESENTANTE LEGAL DE LA FEDERACION DENTRO DE PROCESOS ORDINARIOS LABORALES PROCESOS EJECUTIVOS LABORALES Y PROCESOS DE FUERO SINDICAL. TAMBIEN SE LE CONFIERE PODER PARA INSTAURAR Y CONTESTAR LAS ACCIONES DE TUTELA ANTE TODAS LAS JURISDICCIONES EN LAS QUE SEA PARTE O INTERVENGA LA FEDERACION. IGUALMENTE SE LE CONFIERE PODER PARA ADELANTE TRAMITES ADMINISTRATIVOS ANTE EL INSTITUTO DE SEGURO SOCIAL ISS, Y DEMAS ENTIDADES DE SEGURIDAD SOCIAL COMO EMPRESAS DE RIESGOS PROFESIONALES, CAJAS DE COMPENSACION FAMILIAR, SENA, INSTITUTO COLOMBIANO DE BIENESTAR FAMILIAR Y SUPERINTENDENCIA DE SALUD, TALES COMO RADICAR DOCUMENTOS, RECIBIR NOTIFICACIONES, Y DEMAS ACTIVIDADES; . QUE REQUIERAN ACREDITAR LA REPRESENTACION LEGAL DE

NOTARIA VENTISQUERO
CIRCULO DE SANTA FE DE BOGOTA
HACE CONSTAR
Que esta fotocopia coincide con una copia
autentica que se ha tomado de la misma
29 DEC 2008
REPUBLICA DE COLOMBIA
NOTARIO
GABRIEL AUGUSTO ROJAS GIRALDO
NOT. (M)



01



* 6 6 3 2 6 6 8 9 *



CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE NORTE

3 DE ENERO DE 2008

HORA : 09:33:51

02C250103046

HOJA : 5 DE 6

LA : FEDERACION, ANTE DICHAS ENTIDADES. ASI COMO INTERPONER, RECURSOS Y NOTIFICARSE DE LAS DECISIONES QUE SE ADOPTEN ANTE LAS; JUNTAS REGIONALES DE CALIFICACION DE INVALIDEZ Y LA JUNTAY; NACIONAL DE CALIFICACION DE INVALIDEZ. EL PRESENTE PODER DEJA SIN EFECTOS EL CONFERIDO MEDIANTE ESCRITURA PUBLICA NUMERO SEISCIENTOS CUARENTA Y SIETE (647) DEL CATORCE (14) DE FEBRERO DE DOS MIL DOS (2002) Y EL CONFERIDO MEDIANTE ESCRITURA PUBLICA NUMERO TRES MIL DOSCIENTOS VEINTISIETE (3227) DEL NUEVE (9) DE JULIO DE DOS MIL TRES (2003), EXPEDIDOS LOS DOS (2) POR LA NOTARIA SEXTA (6A.) DEL CIRCULO DE BOGOTA.

CERTIFICA :

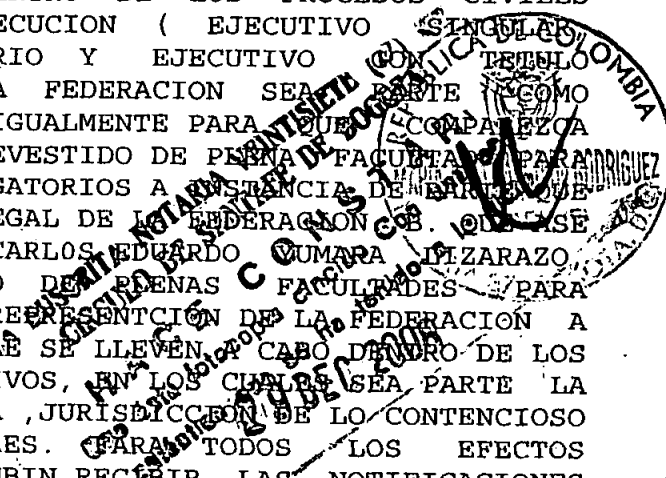
QUE MEDIANTE ESCRITURA PUBLICA NO. 3041 DE LA NOTARIA 6 DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE JULIO DE 2001, INSCRITA EL 31 DE JULIO DE 2006 BAJO EL NO. 104760 DEL LIBRO V, COMPARECIO EMILIO ECHEVERRI MEJIA, MAYOR DE EDAD Y ESTA DOMICILIADO EN ESTA CIUDAD, QUIEN SE IDENTIFICA CON LA CEDULA DE CIUDADANIA NO. 4. 317. 954 DE MANIZALES QUE ACTUANDO EN SU CONDICION DE PRESENTANTE LEGAL DE LA FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA CONFIERE PODER GENERAL AL DOCTOR CARLOS EDUARDO UMAÑA LIZARAZO, QUEN ES MAYOR DE EDAD Y DOMICILIADO ES ESTA CIUDAD Y SE IDENTIFICA CON LA CEDULA DE CIUDADANIA NO. 74. 281. 101 DE GUATEQUE TARJETA PROFESIONAL DE ABOGADO NO.86. 022 DEL CONSEJO SUPERIOR DE LA JUDICATURA, PARA QUE EN NOMBRE Y REPRESENTACION DE LA FEDERACION Y REVESTIDO DE PLENAS FACULTADES PARA CONCILIAR, COMPAREZCA A LAS AUDIENCIAS DE CONCILIACION, SANEAMIENTO, DECISION DE EXCEPCIONES PREVIAS Y FIJACION DEL LITIGIO, DE QUE TRATA EL ARTICULO 101 DEL CODIGO DE PROCEDIMIENTO CIVIL, QUE SE LLEVEN A CABO ANTE LAS AUTORIDADES JURISDICCIONALES DEL ORDEN CIVIL, EN TODO EL TERRITORIO DE LA REPUBLICA, DENTRO DE LOS PROCESOS CIVILES ORDINARIOS, ABREVIADOS DE EJECUCION (EJECUTIVO SINGULAR, EJECUTIVO CON TITULO HIPOTECARIO Y EJECUTIVO CON TITULO PRENDARIO), EN LOS CUALES LA FEDERACION SEA PARTE COMO DEMANDANTE O COMO DEMANDADA, E IGUALMENTE PARA QUE COMPAREZCA EN LA MISMA CLASE DE PROCESOS, REVESTIDO DE PLENAS FACULTADES PARA CONFESAR A ABSOLVER LOS INTERROGATORIOS A INSTANCIA DE PARTE QUE DEBA ABSORVER EL REPRESENTANTE LEGAL DE LA FEDERACION. QUE SE MISMO, CONFIERE PODER AL DOCTOR CARLOS EDUARDO UMAÑA LIZARAZO PARA QUE, IGUALMENTE REVESTIDO DE PLENAS FACULTADES PARA CONCILIAR, COMPAREZCA EN NOMBRE REPRESENTACION DE LA FEDERACION A LAS AUDIENCIAS DE CONCILIACION QUE SE LLEVEN A CABO DENTRO DE LOS PROCESOS CONTENCIOSO ADMINISTRATIVOS, EN LOS CUALES SEA PARTE LA ENTIDAD. QUE SE ADELANTEN ANTE LA JURISDICCION DE LO CONTENCIOSO ADMINISTRATIVO, EN TODO EL PAIS. PARA TODOS LOS EFECTOS ANTERIORES EL APODERADO PODRA TAMBIN RECIBIR LAS NOTIFICACIONES QUE SEAN DEL CASO.

CERTIFICA:

QUE MEDIANTE ESCRITURA PUBLICA NO.4176 DE LA NOTARIA 6 DE BOGOTA

NOTARIA VEINTISIETE

Agencia Regional de Bogotá



D.C. DEL 23 DE AGOSTO DE 2000, INSCRITA EL 31 DE JULIO DE 2006 BAJO EL NO. 104761 DEL LIBRO V, COMPARECIO EMILIO ECHEVERRI MEJIA, MAYOR DE EDAD Y ESTA DOMICILIADA EN ESTA CIUDAD, QUIEN SE IDENTIFICA CON LA CEDULA DE CIUDADANIA NO. 4.317.954 DE MANIZALES QUE ACTUANDO EN SU CONDICION DE REPRESENTANTE LEGAL DE LA FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA. PRIMERO : QUE ACTUANDO EN SU CONDICION DE SEGUNDO GERENTE AUXILIAR - GERENTE ADMINISTRATIVO DE LA FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA Y COMO REPRESENTANTE LEGAL DE LA ENTIDAD, CONFIERE PODER GENERAL A CARLOS EDUARDO UMAÑA LIZARAZO MAYOR DE EDAD, DE ESTADO CIVIL SOLTERO, IDENTIFICADO CON LA CEDULA DE CIUDADANIA NUMERO 74.281.101 DE GUATEQUE TARJETA PROFESIONAL DE ABOGADO NO. 86.022 DEL CONSEJO SUPERIOR DE LA JUTICATURA, VECINO Y DOMICILADO EN SANTA FE DE BOGOTA, D. C, PARA QUE EN NOMBRE Y REPRESENTACION DE LA FEDERACION DE CAFETEROS DE COLOMBIA . 1. LA REPRESENTANTE ANTE LAS DISTINTAS AUTORIDADES JUDICIALES, CON JURISDICCION EN TODO EL PAIS, EN CUALQUIER ACTUACION O DILIGENCIA QUE COMO CONSECUENCIA DE DEMANDAS DE ACCION DE TUTELA INSTAURADAS CONTRA ELLA HAYA LUGAR. 2) RECIBIR EN NOMBRE DE ELLA TODAS LAS MODIFICACIONES QUE SEAN DEL CASO DENTRO DE LAS DEMANDAS DE ACCION DE TUTELA QUE INTERPONGAN 3) CONTESTAR EN SU NOMBRE TODOS LOS REQUERIMIENTOS QUE EN DESARROLLO DE LAS ACCIONES DE TUTELA QUE SE INTERPONGAN SE REALICEN POR PARTE DE LOS DESPACHOS JUDICIALES 4) INTERPONER EN CONTRA DE LAS PROVIDENCIAS O FALLOS QUE RESUELVAN LAS DEMANDAS DE ACCION DE TUTELA, LOS RECURSOS O IMPUGNACIONES A QUE HAYA LUGAR, DE CONFORMIDAD CON LAS NORMATIVIDAD VIGENTE 5) REALIZAR TODAS LAS DEMAS ACTUACIONES QUE SE DERIVEN DE LAS DEMANDAS DE ACCION DE TUTELA DONDE LA FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA SEA ACCIONADA

CERTIFICA :

** ORGANO DE FISCALIZACION **

NOMBRE	IDENTIFICACION
REVISOR FISCAL - FIRMA AUDITORIA	
DELOITTE & TOUCHE LTDA	N.I.T. 08600058134
REVISOR FISCAL	
DUQUE MONTENEGRO ISMAEL	P.P 00000003270
REVISOR FISCAL SUPLENTE	
CARRILLO CAICEDO WILSON OSWALDO	C.C. 00080373219
SUBORDINADA EN SITUACION DE CONTROL	
COFFEA ARABICAS LTDA	N.I.T. 00900057955

CERTIFICA :

QUE POR DOCUMENTO PRIVADO DEL 21 DE MARZO DE 2002 Y RESOLUCION NO. 0103 DEL 22 DE FEBRERO DE 2002 DE LA SUPERINTENDENCIA DE VALORES, INSCRITAS EL 23 DE ABRIL DE 2002 BAJO EL NO. 49020 DEL LIBRO I DE LOS LIBROS DE LAS ENTIDADES SIN ANIMO DE LUCRO, SE NOMBRO A FIDUCOLOMBIA S A, COMO REPRESENTANTE LEGAL DE LOS TENEDORES DE BONOS DE LA EMISION DE 225,000,000,000.00.

CERTIFICA :

QUE POR DOCUMENTO PRIVADO DE BOGOTA D.C. DEL 07 DE SEPTIEMBRE DE 2004, INSCRITO EL 07 DE OCTUBRE DE 2004 BAJO EL NUMERO 0077945 DEL LIBRO I DE LAS ENTIDADES SIN ANIMO DE LUCRO, COMUNICO LA SOCIEDAD DE LA REFERENCIA (MATRIZ), QUE HA CONFIGURADO SITUACION DE CONTROL CON LAS SIGUIENTES SOCIEDADES SUBORDINADAS:

- PROMOTORA DE CAFE COLOMBIA S.A. LA CUAL PODRA TAMBIEN UTILIZAR LA SIGLA PROCAFECOL S.A.
DOMICILIO : BOGOTA, D.C.

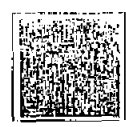
CERTIFICA :

LA SUSCRITA NOTARIA VEINTISIETE (27)
CIRCULO DE SANTA FE DE BOGOTA

HACE CONSTAR
Que esta fotocopia coincide con el original

29 DEC 2008





01

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE NORTE

3 DE ENERO DE 2008

HORA : 09:33:51

02C250103046

HOJA : 6 DE 6

QUE POR DOCUMENTO PRIVADO DE BOGOTA D.C. DEL 28 DE DICIEMBRE DE 2005, INSCRITO EL 05 DE ENERO DE 2006 BAJO EL NUMERO 93498 DEL LIBRO I DE LAS ENTIDADES SIN ANIMO DE LUCRO, COMUNICO LA ENTIDAD DE LA REFERENCIA (MATRIZ), QUE HA CONFIGURADO SITUACION DE CONTROL SOBRE LA SOCIEDAD:

- ALMACENES GENERALES DE DEPOSITO DE CAFE S A ALMACAFE.
DOMICILIO : BOGOTA, D.C.

CERTIFICA :

QUE POR DOCUMENTO PRIVADO DE BOGOTA D.C. DE MAYO DE 2006, INSCRITO EL 14 DE JUNIO DE 2006 BAJO EL NUMERO 102413 DEL LIBRO I DE LAS ENTIDADES SIN ANIMO DE LUCRO, COMUNICO LA ENTIDAD DE LA REFERENCIA (MATRIZ), QUE HA CONFIGURADO SITUACION DE CONTROL SOBRE LA SOCIEDAD:

- COOFFE ARABICAS LTDA
DOMICILIO : BOGOTA, D.C.

CERTIFICA :

DIRECCION DE NOTIFICACION JUDICIAL : CLL. 73 NO. 8-13
MUNICIPIO : BOGOTA D.C.

CERTIFICA :

QUE EN ESTA CAMARA DE COMERCIO NO APARECEN INSCRIPCIONES POSTERIORES DE DOCUMENTOS REFERENTES A REFORMA, DISOLUCION, LIQUIDACION O NOMBRAMIENTOS DE REPRESENTANTES LEGALES DE LA MENCIONADA ENTIDAD.

I M P O R T A N T E

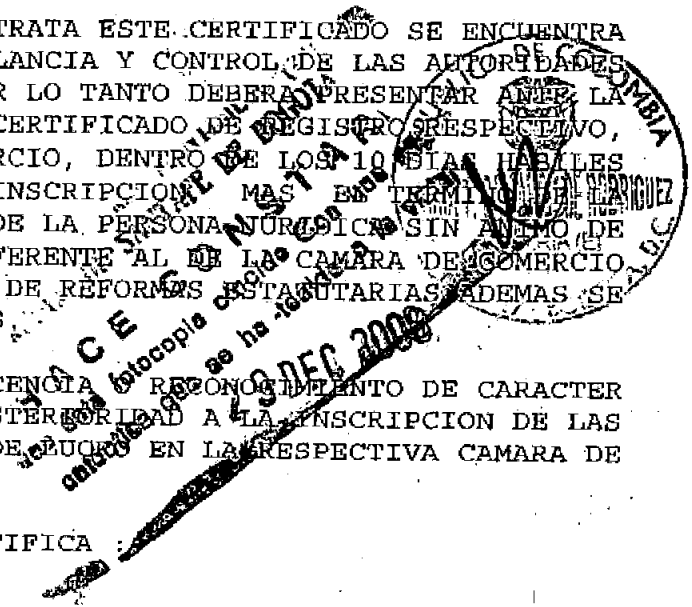
EL REGISTRO ANTE LAS CAMARAS DE COMERCIO NO CONSTITUYE APROBACION DE ESTATUTOS. (DECRETO 2150 DE 1995 Y DECRETO 427 DE 1996).

LA PERSONA JURIDICA DE QUE TRATA ESTE CERTIFICADO SE ENCUENTRA SUJETA A LA INSPECCION, VIGILANCIA Y CONTROL DE LAS AUTORIDADES QUE EJERCEN ESTA FUNCION, POR LO TANTO DEBERA PRESENTAR ANTE LA AUTORIDAD CORRESPONDIENTE, EL CERTIFICADO DE REGISTRO RESPECTIVO, EXPEDIDO POR LA CAMARA DE COMERCIO, DENTRO DE LOS 10 DIAS HABILES SIGUIENTES A LA FECHA DE INSCRIPCION, MAS EL TERMINO DE LA DISTANCIA CUANDO EL DOMICILIO DE LA PERSONA JURIDICA SIN ANIMO DE LUCRO QUE SE REGISTRA ES DIFERENTE AL DE LA CAMARA DE COMERCIO QUE LE CORRESPONDE. EN EL CASO DE REFORMAS ESTATUTARIAS, ADEMAS SE ALLEGARA COPIA DE LOS ESTATUTOS.

TODA AUTORIZACION, PERMISO, LICENCIA RECONOCIMIENTO DE CARACTER OFICIAL, SE TRAMITARA CON POSTERIORIDAD A LA INSCRIPCION DE LAS PERSONAS JURIDICAS SIN ANIMO DE LUCRO EN LA RESPECTIVA CAMARA DE COMERCIO.

CERTIFICA :

NOTARIA VENTISIEETE
Marta Lucena Torres de Uribe



DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO POR LA LEY 962 DE 2005, LOS ACTOS DE REGISTRO AQUI CERTIFICADOS QUEDAN EN FIRME CINCO (5) DIAS HABILES DESPUES DE LA FECHA DE INSCRIPCION, SIEMPRE QUE NO SEAN OBJETO DE RECURSOS EN LA VIA GUBERNATIVA.

* * * EL PRESENTE CERTIFICADO NO CONSTITUYE PERMISO DE
* * * FUNCIONAMIENTO EN NINGUN CASO

EL SECRETARIO DE LA CAMARA DE COMERCIO,

VALOR : \$ 3,200.00

DE CONFORMIDAD CON EL DECRETO 2150 DE 1995 Y LA AUTORIZACION IMPARTIDA POR LA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO, MEDIANTE EL OFICIO DEL 18 DE NOVIEMBRE DE 1996, LA FIRMA MECANICA QUE APARECE A CONTINUACION TIENE PLENA VALIDEZ PARA TODOS LOS EFECTOS LEGALES.

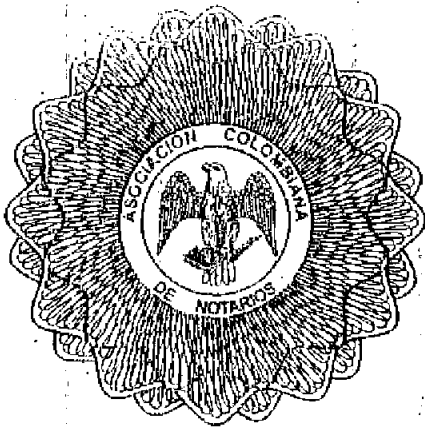
M. L. A.

LA JUNTA NOTARIA VEINTISIETE (27)
CIRCULO DE SANTA FE DE BOGOTA
HACE CONSTAR:
Que esta fotocopia coincide con una copia
auténtica que se ha tenido a la vista.

29 DEC 2008

ESPACIO EN BLANCO

WK 6301790



motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y en caso necesario revocar dichas sustituciones.

Presentes CARLOS OLARTE, J. IAN RAISBECK y JUAN GUILLERMO MOURE, de las condiciones civiles ya anotadas y manifestaron: que aceptan el poder que mediante esta escritura se les otorga. (HASTA AQUÍ LA MINUTA PRESENTADA EN DISCO)

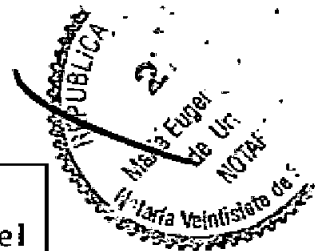
El(los) compareciente(s) hace(n) constar que han verificado cuidadosamente sus nombres completos el número(s) de su documento de identidad. Declara(n) que todas las informaciones consignadas en el presente instrumento son correctas y, en consecuencia, asume la responsabilidad que se derive de cualquier inexactitud en los mismos. Conoce la ley y sabe que el Notario responde de la regularidad formal de los instrumentos que autoriza, pero no de la veracidad de las declaraciones de los interesados.

ADVERTENCIA, OTORGAMIENTO Y AUTORIZACIÓN.- Leído el presente instrumento por el (los) compareciente(s) y advertido (s) sobre la obligación de inscripción en el Registro (Art.226 y s.s. ley 223 del 1995) y la formalidad del registro dentro del término perentorio de 2 meses contados a partir de la fecha de otorgamiento de este instrumento, cuyo incumplimiento causará intereses moratorios por mes o fracción de mes de retardo, lo prueban y firman conmigo y ante mí la(el) Notaria(o) quien lo autoriza. A los

NOTARIA VENTISIELE

Notario Público de Bogotá

COLOMBIA
DEPARTAMENTO DE BOGOTÁ
BOGOTÁ
9 DEC 2008
NOTARIA VENTISIELE (27) 811
CÓDULO DE SANTA FE DE BOGOTÁ
A C E CON T A R A
Bo en fotocopia chido - 2008



otorgantes se les advirtió finalmente que una vez firmado el presente instrumento, la(el) Notaria(o) no aceptará correcciones o modificaciones sino en la forma y casos previstos por la Ley. - Se extendió el presente instrumento público en las hojas de papel Notarial Nos. HK 6301800, HK 6301760, HK 6301804 - - - - -

DERECHOS LEGALES: \$ 39.630.00

RESOLUCIÓN No. 8850 DE 2007

IVA \$ 12.557.00



LUIS GENARO MUÑOZ ORTEGA

CC. 10.536.679 de Popayán

TELÉFONO:

CARLOS OLARTE

C.C. No. 79.782.747 de Bogotá

TP No 74.295

TELÉFONO: 6017700

J. IAN RAISBECK

C.C. No. 79'376.996 de Bogotá

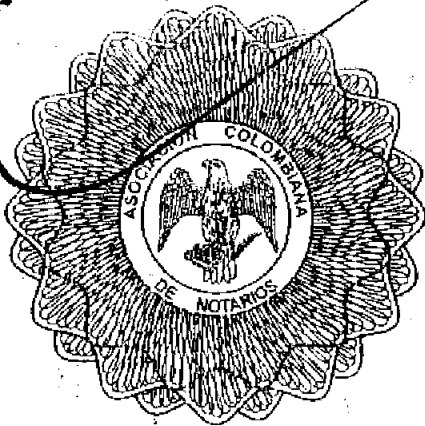
TP No. 135.799

TELÉFONO: 6017700



WK

6301804



ESTA HOJA HACE PARTE DE LA
ESCRITURA PUBLICA NÚMERO = = = =
DEL 21 DE ENERO DE 2008 = = = = =
NOTARIA 27 DE BOGOTÁ = = = = =
REFERENTE AL PODER DE
FEDERACIÓN NACIONAL DE
CAFETEROS DE COLOMBIA A:

CARLOS OLARTE, J. IAN RAISBECK y/o JUAN
GUILLERMO MOURE

Juan Guillermo Moure

JUAN GUILLERMO MOURE PEREZ

C.C. No. 80.412.281 de Usaquén

TP No. 67.343

TELEFONO: 6017700



NOTARIA VEINTISIETE (27) DE
SANTAFÉ DE BOGOTÁ
HACE CONSTAR
esta fotocopia cinclo con que
se ha tenido a la vista
9 DEC 2008



Maria Eugenia Rojas de Urueta

MARIA EUGENIA ROJAS DE URUETA

NOTARIA VEINTISIETE (27) DE BOGOTÁ

redb.

Es fiel y Primera (1°)
fotocopia de la Escritura Pública No. 40
de fecha 21 de Enero de 2.008
tomada de su original que expido en
Nueve (9) hojas útiles de papel
común autorizado (Decreto 1343 de 1970) con destino a

Interesado

Dado en Santafé de Bogotá D.C., a 22 ENE 2008

El Notario Veintisiete de Santafé de Bogotá

Maria Eugenia Rojas de Urueta



NOTARIA VEINTISIETE
Maria Eugenia Rojas de Urueta

ESPACIO EN BLANCO

ESPACIO EN BLANCO

Handwritten signature

91

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 99,694
FECHA : DICIEMBRE 23 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-029088- -00001-0000

Fecha: 2008-12-29 17:10:04 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 400 OPOSIOBSERVTER Folios: 49

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754397	14443951	23/12/2008	8,092,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-04	PRESENTACION DE OBSERVACIONES	
		12 MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	266,000.00
		TOTAL :	\$ 266,000.00

SON: DOSCIENTOS SESENTA Y SEIS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

MANEJO DE LAS MIELES GENERADAS EN LA TECNOLOGÍA BECOLSUB PARA ELIMINAR EL IMPACTO AMBIENTAL OCASIONADO POR LOS LIXIVIADOS

Luis Hernando Narváez-Morales¹ ; Cesar Augusto Ramírez-Gómez² ;
Carlos Eugenio Oliveros-Tascón³ ; Fernando Alvarez M⁴

RESUMEN

En CENICAFE se evaluó una alternativa para eliminar el impacto ambiental generado por los lixiviados producidos en la tecnología para el beneficio ecológico del café denominada BECOLSUB, la cual consistió de dos etapas: en la primera, se mezclan con la pulpa el 61.23% de los fluidos resultantes del proceso de desmucilaginado mecánico (básicamente mucilago, agua adicionada e impurezas) y en la segunda se retiran manualmente los insolubles presentes en el fluido no mezclado con la pulpa y se aumenta la concentración de sólidos, utilizando un evaporador rústico operado con energía térmica proveniente de una estufa campesina. Con el evaporador operado en las condiciones de trabajo de la estufa (15 horas al día) se logra controlar el 100% de la contaminación generada por los lixiviados en una finca con producción anual de 240@ cps/año (15000 kg de cc) que utilice la tecnología BECOLSUB. La eficiencia térmica del evaporador y del sistema global fueron 57,01% y 20,74%, respectivamente. El fluido concentrado presentó 295000 ppm de DQO y 164254 ppm de ST, 35% de grados brix.

Palabras claves: beneficio, contaminación, lixiviados, evaporador, coffea arabica.

ABSTRACT

At CENICAFE it was evaluated a two-step procedure to eliminate the environmental impact caused by lixiviates generated by the ecological wet coffee process called BECOLSUB. The first step consisted of mixing only 61,23% of the fluids resulting from the demucilaging process (mucilage, added water and impurities) with the coffee pulp. The second step consisted of elimination of the suspended solids contained in the remaining fluid by hand and increasing of its concentration of soluble solids by using a rustic evaporator driven with the remaining thermal energy obtained from a farm stove. The evaporator was operated in the actual working conditions of the farm stove (15 h per day). Thus, this procedure became a perfect match to the BECOLSUB technology since it was able to control 100% of the pollution generated by the lixiviates in farms with annual productions of up to 3.000 kg of dry parchment per year. The thermal efficiencies of the evaporator and entire system were 57,01% and 20,74%, respectively. The concentrated fluid obtained after evaporation contained 295.000 ppm of COD, 162.454 ppm of total solids and 35 % of Brix degrees.

Key words: wet coffee process, pollution, lixiviates, coffea arabica, Becolsub

Key words: wet coffee process, pollution, lixiviates, evaporator, coffea arabica

El uso de la tecnología para el beneficio ecológico con manejo de subproductos (BECOLSUB), desarrollada en Cenicafe (1995,1997,1999), ha permitido disminuir drásticamente el consumo de agua en el beneficio de café, pasando de consumos mayores de 40 l/kg cps a menos de 1 l/kg cps. Adicionalmente, ha facilitado el manejo de uno de los subproductos resultantes del proceso, la pulpa, que al no entrar en contacto con el agua conserva todas sus propiedades físico-químicas, potenciando su uso como abono orgánico.

24

INTRODUCCIÓN

La contaminación controlada con el uso de la tecnología para el beneficio ecológico del café-BECOLSUB, desarrollada en Cenicafé (Oliveros y Roa, 1999; Roa *et al.* (1997, 1999)), es del 90%, la contaminación remanente es producida por los lixiviados o drenados de la pulpa más mucílago no retenido, los cuales por su alta Demanda Química de Oxígeno (DQO) generan gran impacto ambiental en el ecosistema.

Matuk, V. (1997), encontró que los lixiviados en concentraciones superiores a 300 ppm inhiben en 23% el crecimiento del alga *Chlorella vulgaris*, y causan mortalidad del 42 y 64% de la población del microcrustáceo *Daphnia pulex* y el pez *Lebistes reticulatus* respectivamente.

En Cenicafé se han adelantado estudios en busca de alternativas que permitan el tratamiento o la disminución de estos lixiviados. Esta investigación tuvo como objetivo, aportar alternativas que permitan incrementar el control de la contaminación generada con la tecnología Becolsub.

MATERIALES Y METODOS

Localización. El trabajo se desarrolló en el beneficiadero para experimentación de la Disciplina de Ingeniería Agrícola del Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé, localizado en Chinchiná, Caldas, a 1400msnm, con un promedio de temperatura de 20.8°C y precipitación anual de 2656mm.

Materiales. En el desarrollo de este experimento se utilizaron los siguientes materiales:

Módulo BECOLSUB 100.

Balanzas electrónicas, marca PRO 2000, con rango de sensibilidad de 0.01 kg.

Cronómetro digital, marca CASSIO, sensibilidad de 0.01s.

Probeta graduada de 2000 ml.

Viales para DQO (HR)

Papel filtro WHATMAN Ref. GF/C de 70 mm de diámetro.

Guadua (basas y sobrebasas).

Plástico Agroleno (transparente) calibre 4.

Estufa campesina modificada por Martínez (2000), con cuatro fogones, cenicero y chimenea.

Cámara de video Panasonic

Para llevar a cabo este experimento se tomó como referencia una finca cafetera de tres hectáreas con producción media de 240@ de cps/año dado que, según el SICA (1997), el 88,43% de los caficultores poseen predios menores a tres hectáreas. Para la finca propuesta se diseñó y construyó en Cenicafé un beneficiadero, utilizando materiales de la propia finca como la guadua y un techo en forma parabólica con plástico transparente, que permite aprovechar la radiación difusa y directa del sol para crear un efecto invernadero al interior del beneficiadero que junto a la ventilación natural aumentan la tasa de evaporación de la mezcla de subproductos del beneficio de café ahí depositados.

El beneficiadero consta de cuatro compartimentos en forma lateral (o de almacenamiento definitivo) para depositar la pulpa; cada compartimento tiene 2 m de largo por 1m de ancho por 1m de alto; la capacidad de almacenamiento es de 6000 kg de pulpa; cuenta además, con una cama recolectora de lixiviados (o de almacenamiento temporal), de dimensiones 1.6m x 1.2m x 0.6 m (largo, ancho y alto respectivamente), para un volumen de 1.15 m³.

Metodología

Se realizaron un total de 20 pruebas y en cada una de ellas se benefició entre 50 y 225 kg de café cereza. La máxima cantidad de café procesada, 225 kg de café cereza, corresponde a la producción de café cereza en el día pico (1.5% de la cosecha) para la finca propuesta.

Para reducir el volumen de lixiviados, se mezcló con la pulpa un volumen de miel cercano al que esta es capaz de retener *es este el 65% Brix* (65% de las mieles generadas), para lo cual se modificó el diseño original de la bandeja del módulo BECOLSUB, encargada de transportar las mieles hasta el tornillo sinfín (Figuras 1 y 2). Las mieles que no se mezclaron con la pulpa (35% del total) se colocaron en un tanque durante 18 horas para permitir la flotación de los sólidos suspendidos, los cuales fueron retirados manualmente. La bandeja modificada posee en su parte inferior un orificio de una pulgada de diámetro el cual permite la evacuación del fluido que cae en esta zona hacia el exterior.

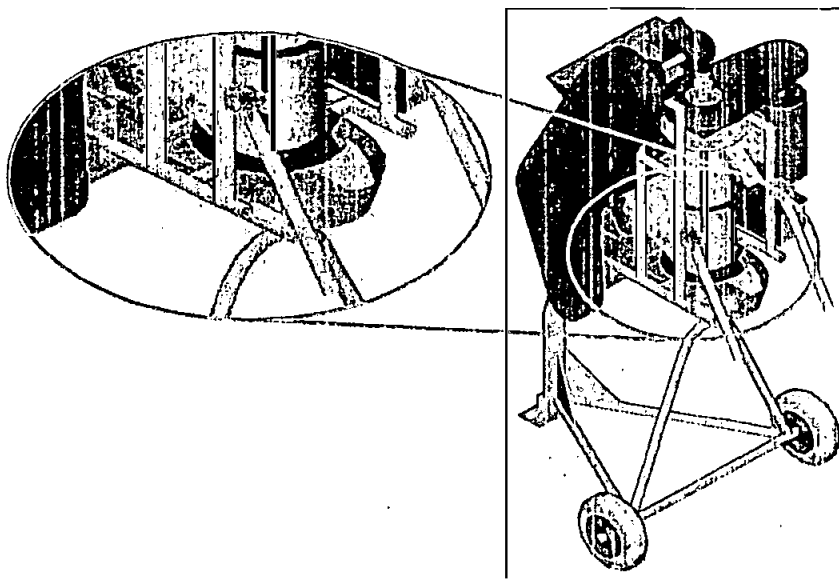
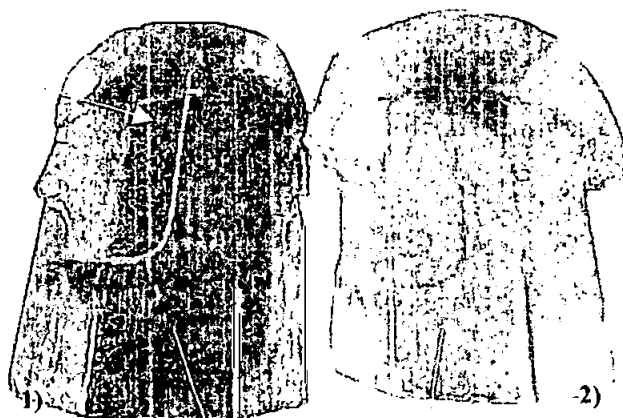


Figura 1. Zona de recolección de mieles en el módulo Becolsub 100

Zona para desvío de
mieles (parte B)



Salida de mieles que se mezclan
con la pulpa (parte A)

1) *Bandeja modificada* 2) *Bandeja tradicional*
Figura 2. Bandejas recolectoras de mieles (Becolsub 100)

La metodología utilizada se dividió en tres etapas:

Etapas A

La estructura utilizada para depositar la mezcla, mieles-pulpa de café, con capacidad para almacenar hasta 500kg, se construyó en guadua (Figura 3); en su base se colocó un filtro fabricado con 3 mallas plásticas superpuestas, conocidas comercialmente como mosquiteras, con el fin de disminuir la cantidad de sólidos suspendidos presentes en los drenados. En la base de la estructura se colocó una tolva para recoger los lixiviados. El tiempo de permanencia de la mezcla en la estructura fue 5 días.



Figura 3. Fosas y recolección de drenados.

Se registró diariamente el volumen de los drenados producidos después de 120 horas de haber sido colocada la mezcla pulpa-mucílago en la fosa. Después de este tiempo se pasó la pulpa a las fosas laterales donde se realizaron volteos quincenales para acelerar su descomposición.

Etapas B

Las mieles que no se mezclaron con la pulpa se depositaron en un recipiente por un tiempo mayor a 18 horas, donde debido a procesos de fermentación y flotación se produce una separación de fases, un sobrenadante (o nata), constituido por sólidos insolubles de mayor tamaño y un líquido

clarificado en la parte inferior. Con la ayuda de un colador, se retiró manualmente el sobrenadante el cual se adicionó posteriormente a la pulpa.

Etapa C

Los líquidos desnatados resultantes de la Etapa B, fueron concentrados utilizando un evaporador rústico (Figura 4), el cual aprovecha parte de la energía térmica no utilizada en las estufas campesinas que se entrega al ambiente con los gases de combustión. El sistema evaporador está compuesto por una estufa campesina modificada por Martínez (2000) con su respectiva chimenea (Figura 5), la cual utiliza leña de café como fuente de combustible y un recipiente (evaporador) donde se colocan los líquidos desnatados. (Figura 6.)

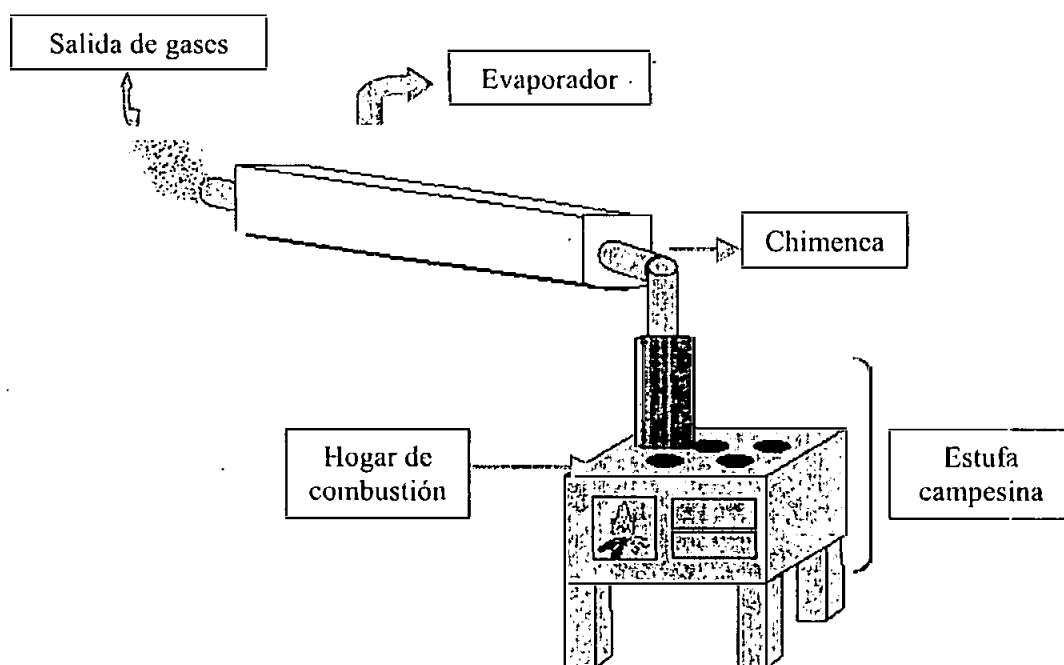


Figura 4. Sistema evaporador de mieles

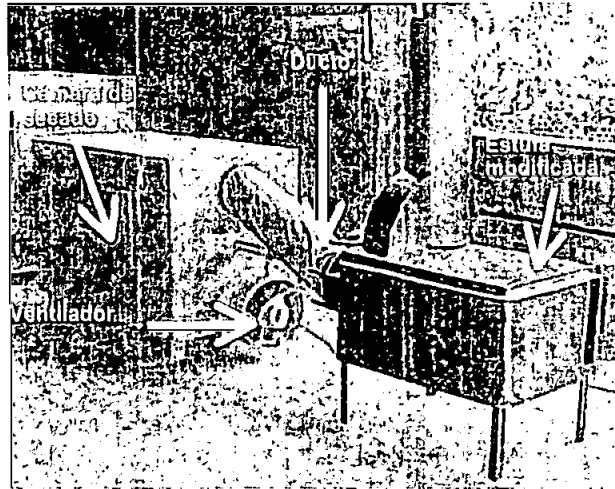


Figura 5. Equipo para el secado del café, ESCAFE, diseñado por Martínez (2000), en el cual se aprovecha parte de la energía térmica que se disipa al ambiente en una estufa rústica.



Figura 6. Canal para evaporar aguas residuales utilizado en las pruebas

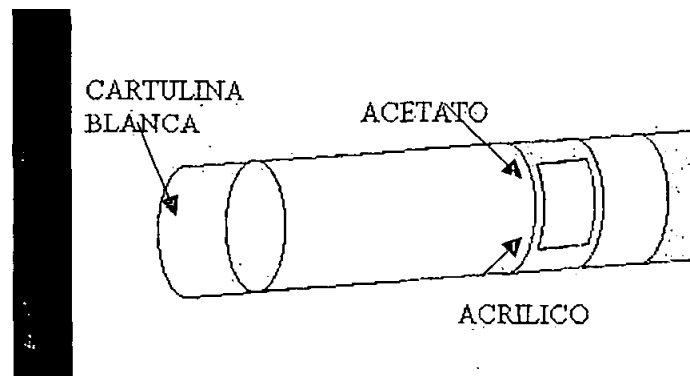


Figura 7. Extensión del ducto de la chimenea utilizado para la medición del flujo de gases de combustión

En el diseño del evaporador se tuvo en cuenta el volumen de líquidos desnatados resultantes en el día pico de la finca propuesta. Para facilitar la transferencia de calor por convección al evaporador, este se construyó en forma de canal, con la chimenea dispuesta longitudinalmente.

99

Durante las pruebas se colocaron los líquidos desnatados en el canal evaporador y se registraron las temperaturas de los gases tanto a la entrada como a la salida de este, la temperatura del ducto de la chimenea y del agua almacenada, utilizando termocuplas tipo J y un datalogger EXTECH®. Adicionalmente se midió el volumen de líquido desnatado al inicio y al final en el evaporador y el tiempo de operación, teniendo en cuenta que 15 horas al día es el tiempo máximo de uso, tiempo durante el cual permanece encendida una estufa campesina (Martínez, 2000). El líquido concentrado se adicionó a la pulpa depositada en las fosas de almacenamiento definitivo, de él se tomó una muestra para la determinación de DQO, ST y pH.

Con la información obtenida se determinó la eficiencia térmica del evaporador y la eficiencia térmica global del sistema. Para determinar la eficiencia del evaporador se utilizó la siguiente expresión:

$$\eta_1 = \frac{Q_{\text{evaporización}}}{Q_{\text{epg}}} \times 100 \quad (1)$$

Donde :

- η_1 : Eficiencia térmica del evaporador (%)
- $Q_{\text{evaporización}}$: Energía de vaporización en kJ
- Q_{epg} : Energía transportada por los gases en kJ

Para determinar la eficiencia global del sistema se utilizó la siguiente expresión:

$$\eta_{\text{sistema}} = \frac{Q_{\text{evaporización}}}{Q_{\text{dac}}} \times 100 \quad (2)$$

Donde:

- η_{sistema} : Eficiencia térmica del sistema (%)
- $Q_{\text{evaporización}}$: Energía de vaporización, kJ
- Q_{dac} : Energía disponible en el aire caliente, kJ

En las expresiones anteriores se requiere conocer el caudal de los gases de combustión en la chimenea, el cual se obtuvo a partir de la velocidad de los gases y el área del ducto de la chimenea.

La velocidad de los gases se determinó a partir del tiempo utilizado por estos para recorrer una distancia de 1,0m del ducto de la chimenea. La extensión en tubo de PVC de 6" de diámetro utilizada (Figura 7), posee dos miras en acrílico que permiten observar el paso de los gases. Para observar el avance de los gases a lo largo del ducto de medición se utilizó una cámara de video, una tarjeta digitalizadora de vídeo y software para el procesamiento de imágenes.

La cámara de video se ubicó en un punto fijo; se adicionó ACPM a la cámara de combustión creando un contraste entre el color casi transparente del CO₂ producido por la combustión de la madera y el humo intenso de color negro producido por el ACPM. Se filmó 20 veces el paso de los gases de combustión por las miras de acrílico en la extensión del ducto. Luego con la ayuda

del editor de vídeo (a una velocidad de 30 cuadros por segundo) se obtuvo el tiempo que tardan los gases en recorrer la extensión de la chimenea (1m), con estos valores se calculó la velocidad promedio de los gases de combustión, los cuales se relacionaron con el tiempo de residencia de los gases desde la adición de ACPM al hogar de combustión hasta la salida de estos por la chimenea.

Mediante análisis de regresión lineal se determinó una expresión que relaciona la velocidad de los gases a partir del tiempo de residencia de los mismos.

Debido al opacamiento de las miras de acrílico por la acción de los gases de combustión del ACPM, fue necesario reemplazar una sección de la mira por lámina de acetato, la cual se cambiaba cada vez que se opacaba, facilitando la observación y filmación de los gases.

RESULTADOS Y DISCUSION

Operación general del sistema

De la información presentada en la Tabla 1, teniendo en cuenta una conversión de cc a cps de 5:1, el consumo específico de agua (CEA) en las pruebas fue 1.21 l/kg cps, valor superior a los recomendados por Pascuas (1996) y Cárdenas (1998), para disminuir el impacto ambiental ocasionado por los lixiviados con la tecnología BECOLSUB. Este CEA, es superior a los obtenidos en módulos de mayor capacidad.

Tabla 1. Condiciones promedias de operación del módulo BECOLSUB-100 utilizado en la investigación.

CAFÉ CEREZA (kg)	AGUA SUMINISTRADA (l/min)	TIEMPO DE OPERACION (min)	RENDIMIENTO (kg/h)
152.55	0.38	96.57	96.10

Como se indica en la Tabla 2, el café utilizado en las pruebas fue de baja calidad, principalmente por el alto porcentaje de flotes (frutos con densidad inferior a la del agua).

Tabla 2. Caracterización del café cereza utilizado en las pruebas.

VERDE %	PINTÓN %	MADURO %	SOBREMADURO %	GUAYABA Y MEDIA CARA %	IMPUREZAS %	FLOTES %
0.72	2.39	41.60	9.70	5.92	0.16	39.51

Parte A

En la Tabla 3 se observa que la bandeja modificada permite mezclar con la pulpa un 61.78% de las mieles generadas, obteniéndose una retención del 88.32% de ellas, produciendo únicamente 2.35 litros de drenados por cada 100 kg de café cereza (cc) beneficiados, que representan un 84% menos del volumen del que se obtiene al mezclar el total de mieles a la pulpa (14 a 15 l). Como el

volumen de lixiviados fue bajo se utilizó para humedecer la pulpa deshidratada depositada en las fosas laterales del beneficiadero.

21

Tabla 3. Retención de mieles mezcladas con la pulpa.

MIELES MEZCLADAS A LA PULPA (%)	MIELES DESVIADAS (%)	RETENCIÓN POR LA PULPA (%)
61.78	38.22	88.33

La retención obtenida fue superior a la encontrada en pruebas preliminares empleando la misma metodología con el uso del módulo BECOLSUB 300, este aumento podría deberse a que la mezcla pulpa-mieles obtenida diariamente se depositó en forma sucesiva en la fosa construida para medir lixiviados, en capas con espesor no mayor a 20 cm, facilitando la deshidratación de la mezcla fresca por efecto principalmente de la circulación del aire.

Parte B

Las mieles no mezcladas con la pulpa (38.22%), se sometieron al proceso de desnatado indicado anteriormente. En la Tabla 4 se presentan los porcentajes de nata y líquido desnatado obtenidos. El sobrenadante o nata representa el 41.27% del volumen total, posee alta viscosidad y está constituido principalmente por sólidos insolubles, lo cual permite adicionarlo a la pulpa sin que se presenten procesos de lixiviación.

El líquido desnatado representa el restante 58.73%, es ligeramente amarillento, con alta acidez y, como se señala en la Tabla 6, posee el contenido más bajo de ST y DQO de los fluidos generados, característica que puede aprovecharse para su concentración mediante procesos de evaporación.

se concentra para qué?

Tabla 4. Separación de sólidos suspendidos en las mieles no mezcladas con la pulpa.

MIELES PARTE B LITROS	NATAS LITROS	%	LIQUIDO DESNATADO LITROS	%
20.275	8.053	41.27	11.345	58.73

Parte C

Se determinó en algunas de las pruebas de evaporación el suministro promedio de combustible a la estufa, 5.2 kg de zoca/hora; la temperatura de los gases de combustión estuvo alrededor de 300°C durante el tiempo de operación, permitiendo que el ducto de la chimenea alcanzara temperaturas superiores a los 100°C. La Tabla 5 presenta las condiciones generales de operación del sistema evaporador, determinadas a partir de la información recolectada durante 16 días de operación del evaporador. Con la información recolectada se comprobó que los gases de combustión producidos por la combustión de la zoca de café, entregan la energía suficiente para realizar los procesos de evaporación.

Eficiencia Térmica del Evaporador

Determinación de la velocidad de salida de los gases de combustión

El análisis de regresión lineal efectuado para calcular la velocidad de los gases de combustión en función del tiempo cronometrado entre la adición de ACPM y la salida de los gases negros por la chimenea, dio como resultado la siguiente expresión:

$$Y = 4.4573 - 0.9701X \quad R^2 = 0.9153 \quad (3)$$

Donde:

Y= Velocidad de los gases de combustión (m/s).

X= Tiempo cronometrado (s).

R²= Coeficiente de determinación.

Tabla 5. Condiciones promedias de operación del evaporador diseñado para evaporar mieles resultantes del beneficio del café con la tecnología BECOLSUB.

TEMPERATURA DE ENTRADA AL EVAPORADOR (°C)	TEMPERATURA DE SALIDA DEL EVAPORADOR (°C)	TEMPERATURA DE LA PARED DE LA CHIMENEA (°C)	TIEMPO DE OPERACIÓN (h)	PESO INICIAL DE LAS MIELES (kg)	PESO FINAL DE LAS MIELES (kg)	TASA DE EVAPORACIÓN (kg/h)
288.60	193.38	104.80	8.11	14.68	2.05	1.59

Eficiencia del evaporador y global del sistema

A partir de la información presentada en la Tabla 5 y utilizando la ecuación (3), se obtuvo las eficiencias promedias del evaporador (57.01%) y global del sistema (20.74%), como se presenta en la Figura 8.

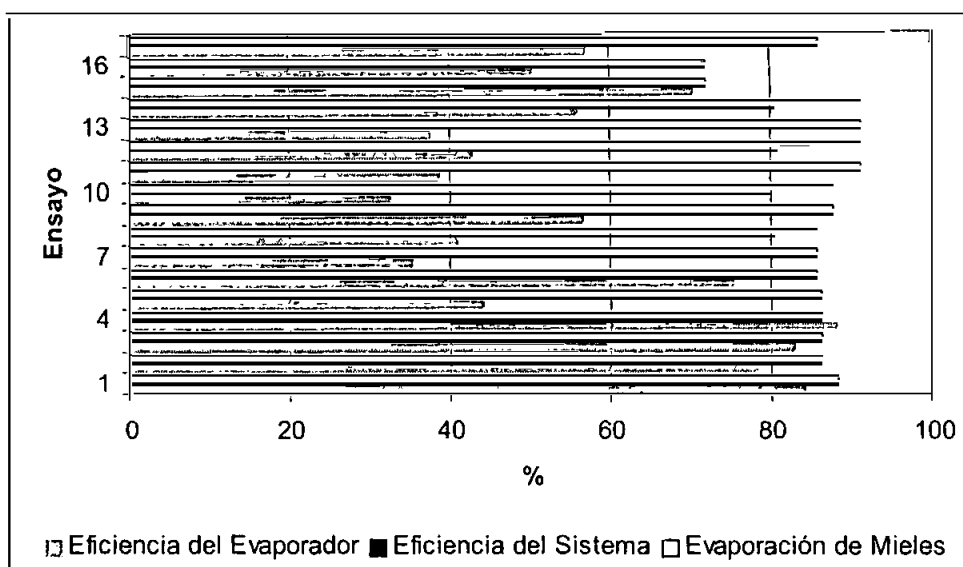


Figura 8. Eficiencias térmicas del evaporador y del sistema diseñado para evaporar líquidos desnatados resultantes del Beneficio Ecológico del Café-BECOLSUB y evaporación de mieles.

Los mayores valores de eficiencia térmica del evaporador y del sistema se lograron cuando se llenó al máximo el recipiente, lo cual permitió cubrir completamente el ducto de la chimenea, aprovechar mejor el área de transferencia de calor y alcanzar mayores tasas de evaporación.

En general, la evaporación de líquidos alcanzada, 72% a 91.3%, es alta, por lo cual se considera que el dispositivo rústico diseñado es adecuado para controlar la contaminación generada en el proceso de beneficio ecológico del café en una finca con producción anual de 240@ de café pergamino seco/año utilizando la tecnología propuesta en esta investigación.

Caracterización de los efluentes del beneficio

En la Tabla 6 se presenta la caracterización de los fluidos resultantes en las etapas A y B de este experimento. Se observa que el contenido de sólidos totales (ST) y demanda química de oxígeno (DQO) en las muestras analizadas es mayor a los encontrados siguiendo la misma metodología en las pruebas preliminares empleando el módulo BECOLSUB 300.

Tabla 6. Caracterización de los efluentes resultantes del beneficio ecológico del café.

EFLUENTE	PH		D.Q.O (mg/l)		S.T. (mg/l)	
	Media	C.V.%	Media	C.V. %	Media	C.V. %
Mieles	4.13	2.3	118,483.4	13.5	95,553.2	10.0
Líquidos desnatados	3.74	4.8	103,019.3	16.8	66,717.6	18.5
Natas	3.69	3.9	125,970.6	16.5	132,572.0	11.6
Drenados (lixiviados)	4.02	7.5	131,811.8	17.7	104,217.2	15.5
Residuo evaporación	4.01	3.9	246,260.0	17.3	182,295.4	35.8

Características

El aumento en los valores de ST y DQO posiblemente se debe a la calidad del café cereza beneficiada (inferior al promedio) y al secado que se presenta en el interior del beneficiadero construido para los ensayos.

Los residuos del proceso de evaporación presentaron una alta carga orgánica, con una concentración superior a 250,000 ppm de DQO y un pH ácido, posiblemente debido a que provienen de sólidos solubles y suspendidos presentes en los líquidos desnatados, los que aportan a DQO del fluido. Los residuos se adicionaron a las fosas de almacenamiento de pulpa.

En un intento por conocer la carga contaminante de los fluidos evaporados con el equipo diseñado, al nivel de laboratorio se realizó un montaje que permitió condensar los vapores liberados al ambiente. El valor obtenido fue 3,970 ppm de DQO.

Balance de masa

Teniendo en cuenta el contenido de ST de las muestras analizadas se realizó un balance de masa tomando como base el beneficio de 100 kg de café cereza. En la Figura 9 se presenta el diagrama de flujo utilizado para el balance de masa realizado.

Se utilizaron 22.8 l de agua para el beneficio de 100 kg de cc en el módulo BECOLSUB 100. Los subproductos resultantes fueron 40 kg de pulpa y 34.85 l de mieles con un contenido promedio de 95,553.2 ppm de ST. Con la bandeja modificada se dividió las mieles generadas en dos partes: 21.6 l se mezclaron con la pulpa (parte A), y 13.25 l, se separaron y sometieron al proceso de desnatado (parte B).

La pulpa, la cual actúa como lecho filtrante, retiene el 88.19% de los ST. En volumen retiene un 88.32% de las mieles, drenando únicamente 2.34 l.

Durante el tiempo que se dejó en reposo las mieles para permitir la separación de las natas (sobrenadante) de las mieles se pierde aproximadamente un 6% del contenido de los ST, debido al proceso de fermentación del mucilago y a la consecuente liberación de CO₂.

En el proceso de evaporación del agua residual se volatilizan el 58.22% de los ST presentes en el líquido desnatado, posiblemente estos forman parte de ácidos y alcoholes de menor punto de ebullición que el agua.

Sobre la base del balance de masa realizado y teniendo en cuenta que un kg de café en cereza posee un potencial contaminante de 115.1 g DQO y 96 g ST (Zambrano, 1999), se obtuvo un control del 97.32% y 97.46% de DQO y ST, respectivamente. La contaminación remanente correspondió a los drenados ó lixiviados, los cuales se recogieron y utilizaron para humedecer la pulpa semidescompuesta depositada en las fosas laterales. Con este procedimiento se evitó completamente el vertimiento de fluidos producidos por el PBHC a las fuentes naturales de agua.

Variación de la metodología

Con el fin de facilitar la implementación de la anterior metodología en las fincas cafeteras y mejorar el aprovechamiento del evaporador, se mezcló la totalidad de las mieles generadas durante el proceso de beneficio ecológico con la pulpa, superponiendo las capas que resultarían diariamente. Se observó un incremento en la retención de las mieles en la pulpa con relación a

valores obtenidos en esta investigación y en otros trabajos realizados en Cenicafe (Pascuas, 1996; Roa *et al.*, 1999), alcanzado valores de hasta el 79%.

Se realizaron 4 pruebas utilizando un promedio de 176.5 kg de cc y se tomaron muestras de los efluentes para su caracterización. A partir de los análisis de las muestras, se realizó un balance de masa tomando como base el beneficio de 100 kg de café cereza el cual se resume en la **Figura 9**.

Para el beneficio de los 100 kg de cc en el módulo BECOLSUB 100 se utilizó 22.8 l de agua. Los subproductos resultantes fueron: 40 kg de pulpa y 31.95 l de mieles con un contenido promedio de 88,062.6 ppm de ST. La totalidad de las mieles resultantes se mezclaron con la pulpa lográndose una retención del 79% de ellas.

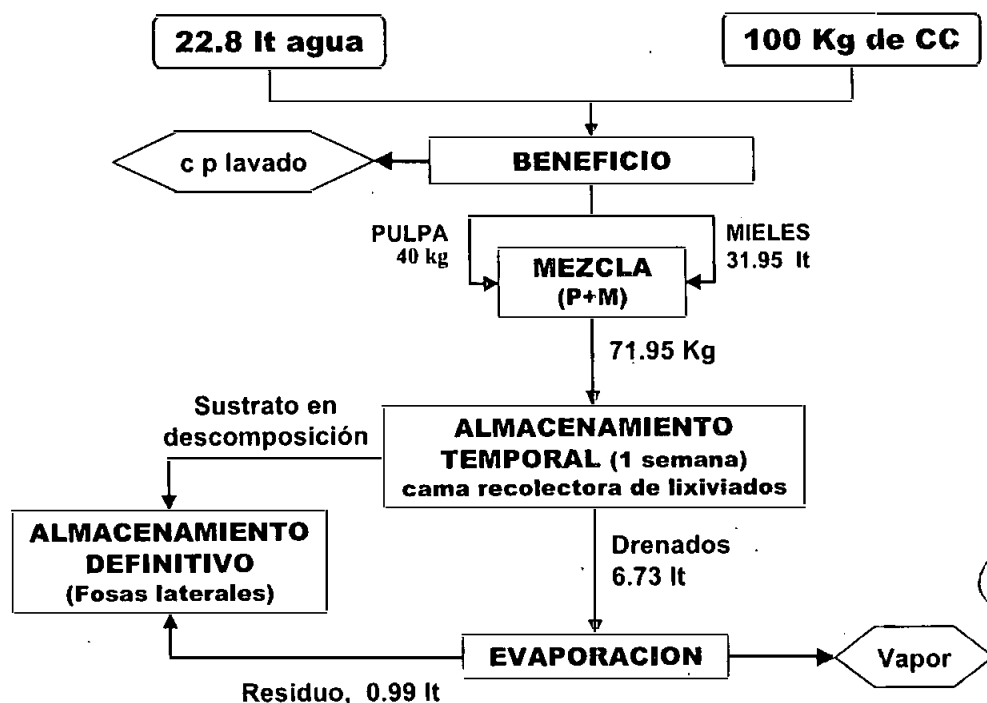


Figura 9. Flujograma utilizado para el balance de masa en la tecnología para el control de la contaminación generada en el beneficio ecológico del café, propuesta en esta investigación.

Cuando la mezcla pulpa-mieles es colocada diariamente en la fosa, superponiendo las capas, parte de los drenajes o lixiviados pueden ser retenidos en la pulpa más descompuesta, la cual ha sido deshidratada al entrar contacto con el aire pasa a través de ella. Adicionalmente el lecho de pulpa actúa como filtrante, reteniendo el 78.79% de los ST.

A partir del balance de materia realizado y teniendo en cuenta la contaminación potencial de un kg de cc (115.1 g DQO y 96 g ST), se obtuvo un control del 91.36% y 93.79% de DQO y ST, respectivamente, sin utilizar el proceso de evaporación.

Al utilizar el evaporador de aguas residuales para concentrar los drenados se produce una pérdida del 10% de ST, representados por sólidos volátiles presentes en estos, con lo cual se evita el vertimiento de fluidos a las fuentes de agua, ya que el residuo obtenido de este proceso se vierte sobre la pulpa semidescompuesta sin que se registren procesos de lixiviación.

36

Con la anterior metodología se consigue controlar el 99.5% de la contaminación producida por el beneficio húmedo de café.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La evaporación de residuos líquidos provenientes del beneficio ecológico del café es posible realizarla utilizando la energía térmica no aprovechada en las estufas campesinas o en secadores que utilicen carbón o leña como combustible, ya que los gases de combustión resultantes poseen suficiente energía para este proceso. Con lo anterior se puede controlar hasta el 99.5% de la contaminación producida en el beneficio ecológico del café-BECOLSUB, desarrollado en Cenicafé.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen los aportes de las personas de las disciplinas de Ingeniería Agrícola, Química Industrial y Biometría de Cenicafé.

BIBLIOGRAFÍA

1. CARDENAS C., J. Evaluación de un sistema para el tratamiento de los lixiviados de pulpa y mucílago producidos en la tecnología Becolsub, STL.B. *In*: CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFÉ. CENICAFE. Informe Anual de Actividades de la Disciplina de Química Industrial, Octubre 1998 – Septiembre 1999. Chinchiná, Cenicafé, 1999. p. 1-19 (Proyecto QIN - 0150).
2. DAVILA A., M.T.; RAMIREZ G., C.A. Lombricultura en pulpa de café. Avances Técnicos Cenicafé N°. 225:1-11. 1996.
3. FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA. FEDERACAFE. Sistema de Información Cafetera. Encuesta Nacional Cafetera SICA. Estadísticas Cafeteras. Informe final. Santafé de Bogotá, FEDERACAFE, 1997. 178 p.
4. MARTINEZ T., D. G. Aprovechamiento de la energía calórica no utilizada en las estufas campesinas, para el secado mecánico del café. *In*: CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFÉ. CENICAFE. Informe Anual de Actividades de la Disciplina de Ingeniería Agrícola, Octubre 1998 – Septiembre 1999. Chinchiná, Cenicafé, 1999. 53 p. (Proyecto ING - 0816).
5. MATUK, V., V.; PUERTA Q., G.I.; RODRIGUEZ V., N. Impacto biológico de los efluentes del beneficio húmedo del café. Cenicafé 48(4): 234-252. 1997.
6. OLIVEROS, C.E. Desarrollo de la tecnología DESLIM. Chinchiná, Cenicafé, 1997. 1 p. (Seminario Marzo 7, 1997).
7. OLIVEROS, C.E. ÁLVAREZ G., J.; ÁLVAREZ M., F.; RAMÍREZ G., C.A.; ÁLVAREZ H., J.R. El BECOLSUB 100; Beneficio ecológico para pequeños caficultores. Avances Técnicos Cenicafé N°. 261: 1-4. 1999.
8. OLIVEROS, C.E. ROA M., G. El desmucilaginado mecánico del café. Avances Técnicos Cenicafé N° 216: 1-4. 1995.

- 27X
9. PASCUAS L., R.T. Estudio de la retención en la pulpa del afluente líquido sólido resultante de beneficio ecológico de café. Neiva, universidad Sur Colombiana. Facultad de Ingeniería, 1996. 92 p. (Tesis: Ingeniero Agrícola).
 10. ROA M., G. OLIVEROS, C.E.; SANZ U., J.R.; ALVAREZ G., J.; RAMIREZ G., C.A.; ALVAREZ H., J.R. Desarrollo de la tecnología BECOLSUB para el beneficio ecológico del café. Avances Técnicos Cenicafé N°. 238: 1-6. 1997.
 11. ROA, M. G; OLIVEROS, T. C.E.; ALVAREZ G. J.; RAMIREZ, G. C.A.; SANZ, U. J.R.; ALVAREZ, H.J.R.; DAVILA, A.M.T.; ZAMBRANO, F. D.A.; PUERTA, Q. G.I.; RODRIGUEZ, V. N. Beneficio ecológico del café. Chinchiná (Colombia), Cenicafé, 1999. 300p.
 12. ZAMBRANO F., D.A. Evaluación de un sistema para el tratamiento de los lixiviados de pulpa y mucilago producidos en la tecnología becolsub, STL.B. In: CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFÉ. CENICAFE. Informe Anual de Actividades de la Disciplina de Química Industrial, Octubre 1998 – Septiembre 1999. Chinchiná, Cenicafé, 1999. p. 1-19 (Proyecto QIN - 0150).
 12. ZAMBRANO F., D.A.; ISAZA H., J. D.; RODRIGUEZ V., N.; LOPEZ P. U. Tratamiento de aguas residuales del lavado del café. Chinchiná, Cenicafé, 1999. 26 p. (Boletín Técnico No. 20).

Role of Pectinolytic Yeasts in the Degradation of Mucilage Layer of *Coffea robusta* Cherries

A. D. AGATE AND J. V. BHAT

Fermentation Technology Laboratory, Indian Institute of Science,
Bangalore, India

Received for publication 25 October 1965

ABSTRACT

AGATE, A. D. (Indian Institute of Science, Bangalore, India), AND J. V. BHAT. Role of pectinolytic yeasts in the degradation of mucilage layer of *Coffea robusta* cherries. Appl. Microbiol. 14:256-260, 1966.—Pectinolytic yeasts, *Saccharomyces marxianus*, *S. bayanus*, *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, and *Schizosaccharomyces* sp., predominated in the natural fermentation of coffee cherries of *Coffea robusta* variety grown in Chikmagalur district of Mysore State, India. These yeast species were found on the cherry surfaces, and evidence was adduced to show that the natural fermentation of coffee was the result of activity of microflora from the cherry surface itself rather than that of flora of air or water. Incorporation of pure cultures of *Saccharomyces* species was shown to aid the process when a mixture of all three species was used. An enzyme preparation from the *Saccharomyces* species was observed to hasten the mucilage-layer degradation.

An important and noticeable change occurring in the fermentation of coffee is the degradation of the mucilage layer that surrounds the beans. In fact, the fermentation is adjudged "finished" when the parchment on touch "feels hard" and is free from slippery mucilage. The mucilage layer contains a large amount of pectic substances which are degraded during the fermentation. Whether or not this degradation was brought about by the enzymes from cherries themselves or by the microbial load on the exterior surfaces was not clear at the time this investigation was undertaken 2 years ago. From the reports of Frank and Dela Cruz (2) and Frank, Lum, and Dela Cruz (3), it appeared that microorganisms on the cherry surfaces have a part to play and that the decomposition of the mucilage layer is attributable to certain gram-negative, lactose-fermenting bacteria present on the cherry surface as well as in the plantation soil of Kona district of Hawaii. They identified the demucilaging strains as *Erwinia dissolvens*, and demonstrated the ability of the supernatant fluid of liquid cultures to decompose the mucilage layer of coffee cherries. This observation is in agreement with that of Vaughn et al. (14), who first reported on the pectinolytic activity of coliform bacteria associated with Brazilian coffee cherries.

The method in practice for demucilaging coffee beans in Chikmagalur district of Mysore (India) is

unblemished cherries, eight in each tube and in du-

is the wet method of fermentation. With this procedure, the deskinned coffee cherries are allowed to undergo a natural fermentation for about 70 hr, during which period the mucilage layer is degraded adequately to be easily detached from the beans in the running water. The beans then are ready for drying operations (1).

The purpose of the present communication is to show that certain yeasts associated with the coffee cherries not only possess high pectinolytic activity but do seem to have a vital role in the demucilaging of coffee as practiced in this country. Mention is made here of the reported presence of yeasts in the process (7, 9), though their role has so far remained obscure.

MATERIALS AND METHODS

Coffee cherries and mucilage. Three samples of cherries of *C. robusta* (75 to 100 cherries weighing 500 to 600 g in each sample) and eight mucilage samples (each approximately 50 ml) at different stages of fermentation were collected directly into sterile tubes from the Central Coffee Research Station, Balehonnur, Chikmagalur District of Mysore State, India. The cherries were picked from the several shrubs scattered in three different areas of the farm. The samples were examined within 24 hr of collection, and when this was not possible the samples were stored in the cold prior to testing.

Microflora of cherry surface and mucilage. Ripe,

plicate sets, were shaken in sterile tap water, suitably diluted, and plated on nutrient agar, pH 7.0 (NA) and glucose yeast-extract-agar, pH 5.0 (GYE). After 24 to 48 hr of incubation at 30°C, enumeration and isolation of representative colonies of yeasts was achieved from these plates. All the mucilage samples in 5-ml portions were examined in the same manner.

Enrichments were set up with portions of mucilage samples as inocula in a medium containing Setz-filtrated pectin or polygalacturonic acid (both from Eastman Organic Chemicals, Rochester, N.Y.) at the 1% level as the only carbon source in a mineral-based medium.

Fermentation of coffee cherries. The skin was removed from the coffee cherries under aseptic conditions, and the beans were placed in sterile flasks. Perfect skinning could not be achieved, as tiny bits of skins adhered to the beans. The skinned cherries were covered with sterile water and allowed to undergo fermentation at room temperature (20 to 26°C). At regular intervals, samples were removed for pH measurements, microbial counts, and evaluation of mucilage-layer degradation. The extent of mucilage degradation was evaluated quantitatively by estimating the percentage loss in the total pectic substances obtained as calcium pectate (5).

Microflora of air or tap water in the fermentation of coffee cherries. The cherries were surface-sterilized by immersion in a 1:500 solution of mercuric chloride for 10 min, followed by thorough rinsing in sterile water to remove traces of mercuric chloride (Kham-bata, Ph.D. Thesis, Univ. of Bombay, Bombay, India, 1954). One set of aseptically skinned cherries was allowed to ferment in sterile tap water under aseptic conditions, and the other was exposed to air for 10 min prior to incubation. A third set was prepared for fermentation with tap water instead of sterile water. The extent of mucilage-layer degradation and microbial population of each set was determined by the methods described above.

Identification of the isolates. The yeast isolates were identified by reference to the work of Wickerham (15) and Lodder and Kreger Van-Rij (6). Their morphological and growth characteristics were followed for 4 days at 30°C and for 30 days at room temperature in malt extract broth and on malt extract-agar. Slide cultures were also prepared for the purpose. The sporulation was tested in the various recommended media. For sugar assimilation and fermentation studies, glucose, galactose, sucrose, maltose, lactose, and raffinose were used. Assimilation of potassium nitrate, utilization of ethyl alcohol as a sole carbon source, and splitting of arbutin were the other tests made. In addition, formation of starch by germinating spores, ability to grow at 40°C, and fermentation of inulin were also studied.

The bacterial isolates were studied by procedures described in the *Manual of Microbiological Methods* (13). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* was used for their identification.

Pectinolytic activity of the isolates. The organisms were grown in media containing pectin or polygalacturonic acid (0.5%) for 4 days at 30°C, and the

culture fluids thereafter were tested for pectinolytic activity after 6 hr of incubation.

The polygalacturonase (PG) activity was determined by a modification of the Wilstatter-Schudel method (5) and that of pectin methylesterase (PE) by a method similar to Smith's modification (12). Pectin/polygalacturonic acid *trans*-eliminase (PTE/PATE) was detected by the method of Nagel and Vaughn (8). The percentage decomposition of pectin was estimated by Kaiser's (D.Sc. Thesis, Univ. of Paris, Paris, France, 1961) method.

Ability of pure cultures of yeasts to degrade mucilage. The dominant, strongly pectinolytic *Saccharomyces* cultures were inoculated individually or in various combinations into tubes of surface-sterilized skinned cherries kept in sterile tap water under aseptic conditions. The external appearance of the beans, along with the disappearance of stickiness from seeds, and the flavor of the ferment were considered as markers of an efficient fermentation. Chemically, estimation of pectic substances as calcium pectate (5) before and after the fermentation was considered a useful guide in following the process.

Yeast enzyme preparation in the process. *S. marxianus*, *S. bayanus*, and *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, isolated from the cherries, were grown in a medium containing polygalacturonic acid (0.5%) for 4 days at room temperature. The growth was hastened by keeping the cultures on a rotary shaker (250 rev/min; 5-cm eccentric throw). Acetone powder extracts were obtained from these culture filtrates (10). The preparations from each species were dialyzed against distilled water for 24 hr at 4°C, and were then pooled together. The pooled yeast enzyme preparation (0.2%) was incorporated into skinned cherries undergoing natural fermentation. For comparison, commercial mold enzyme preparations, Benefax and Pectinase (Nutritional Biochemicals Corp., Cleveland, Ohio), were used at the 0.2% level on two other sets of cherries. The same criteria used previously were employed for recording the progress of fermentation, except that in the present experiment the rate of decomposition was measured at every 2-hr period.

RESULTS AND DISCUSSION

Microflora of mucilage and cherry surface. At every stage, there were more yeasts than bacteria in mucilage samples. On NA and GYE plates, the proportion of yeast to bacterial colonies at the end of 70 hr was of the order of 10:1 (Table 1). The yeast isolates were identified as *S. marxianus*, *S. bayanus*, *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*, and *Schizosaccharomyces* sp., in that order of dominance. The bacteria encountered belonged to the genera *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, and *Proteus*.

The yeasts were dominant on the cherry surfaces. The proportion of yeasts varied from 47 to 52% of the total surface population, and the species were identical to those obtained from mucilage.

Anexo E

52

TABLE 1. Microbial population of mucilage and coffee cherries*

Samples	No. of organisms			
	Nutrient agar		Glucose yeast-extract-agar	
	Yeast	Bac- teria	Yeast	Bac- teria
Mucilage				
Initial, pH 6.8	64	66	125	156
4 hr, pH 6.4	180	80	292	281
12 hr, pH 6.2	586	156	648	392
24 hr, pH 6.0	823	351	923	350
36 hr, pH 5.9	1,260	436	1,520	300
48 hr, pH 5.8	2,650	510	2,360	278
60 hr, pH 5.5	4,850	528	2,950	264
70 hr, pH 5.1	6,010	569	3,000	255
Cherry				
Sample 1	255	250	260	236
Sample 2	230	247	253	240
Sample 3	237	238	240	232

* Results with mucilage samples are expressed as organisms per milliliter of liquid $\times 10^4$; with cherry samples, as organisms per cherry $\times 10^4$.

Fermentation of coffee cherries. The fluctuation in microbial population presented a typical pattern (Table 2). During the later stages, the bacterial counts remained more or less constant, whereas the yeast counts increased steadily. The population densities recorded in the laboratory tallied with those of mucilage samples brought for analysis from the Coffee Research Station, Balehonnur. The yeasts encountered in the liquor were also identical to those occurring in the processing plants. The fermentation was accompanied by a slow fall in pH from 6.4 to 5.4, during which gradual degradation of pectic substances from the mucilage was evidenced.

Bacterial populations of fermenting cherries exposed to air or in tap water were high compared with those encountered on beans fermenting under aseptic conditions. However, the process in either case was neither normal nor complete at the end of 70 hr, inasmuch as the parchment was sticky, the beans were discolored, and the fermentation was gassy with an obnoxious odor. In other words, whereas the normal surface flora of cherries brought about a normal fermentation, introduction of flora from air or water had an adverse effect on the process. The observation that the fermentation was not progressive in the case of surface-sterilized cherries kept under sterile water lent further support to the conclusion that the process surface flora was, in fact, involved in the process, and that cherry enzymes were not active in the degradation of mucilage layer.

The pectinolytic ability displayed by the yeasts

(Table 3) is clearly indicative of their role in the process. It must be mentioned that the strains grouped together as belonging to a particular species were essentially similar with respect to their growth characteristics and enzyme content, and therefore only their averages are presented in the table. The three *Saccharomyces* species were indeed highly pectinolytic in comparison with the *Schizosaccharomyces* species. Hence, the latter species was not studied further. Surprisingly, except for a solitary strain of *Flavobacterium*, none of the 22 bacterial isolates possessed any pectinolytic activity. In contrast to the observations of Vaughn et al. (14) and Frank, Lum, and De la Cruz (3), coliform bacteria or *Erwinia* species were not encountered in these units. In the absence of other pectinolytic organisms and in the presence of large numbers of pectinolytic yeasts, it is reasonable to assume that the yeasts have a vital role in the degradation of mucilage layer. A parallel to this may be found in the results of Roelofsen (11), who succeeded not only in isolating pectinolytic yeasts from the fermenting cacao beans but in correlating the production of their pectic enzymes with the maceration of collenchyma tissue. However, he concluded that the fermentation of cacao may be the result of activity of several other organisms as well. It is possible that in coffee fermentation, also, other organisms may be involved.

Demucilaging studies. The results of inoculation experiments with pure cultures of yeasts are illustrated in Table 4. *S. marxi* could no doubt demucilage the seeds, but judging from other criteria the fermentation cannot be regarded as fully satisfactory. Among the various other combinations of yeasts tried, the fermentation brought about by the mixture of the three *Saccharomyces* species was the nearest approach

TABLE 2. Population changes occurring during the natural fermentation of coffee cherries

Time hr	pH	Pectin de- composed %	No. of organisms per ml X 10 ⁴					
			Nutrient agar		Glucose yeast- extract-agar		Bac- teria	
			Yeasts	Bac- teria	Yeasts	Bac- teria	Yeasts	Bac- teria
0	6.4	0	43	32	107	112		
4	6.2	4.4	124	58	396	386		
12	6.1	13.6	456	185	688	402		
24	5.9	25.2	923	302	1,120	386		
36	5.8	38.4	1,250	451	1,800	378		
48	5.7	58.6	2,350	863	2,100	359		
60	5.6	70.0	2,790	785	3,110	324		
70	5.4	98.3	5,500	659	3,480	316		

TABLE 3. Pectinolytic activity of isolates from coffee fermentation*

Isolate	Enzyme activity ^a							Pectin decomposed %	
	PG		PE		PTE		PATE		
	p ^a	PA ^c	P	P	P	P	PA		
<i>Saccharomyces marxianus</i> (6) ^d	0.5	3.5	0.5	0	0	0	0	90.5	
<i>S. bayanus</i> (4)	0.3	3.0	0.42	0	0	0	0	65.5	
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>ellipsoides</i> (15)	0.5	2.2	0.45	0	0	0	0	25.3	
<i>Schizosaccharomyces</i> sp. (6)	0.1	0.3	0.1	0	0	0	0	10.6	
<i>Flavobacterium</i> sp. (1)	0.9	0.6	0.18	0.4	0.4	0.2	0.2	76.8	

* Isolates identified as *Streptococcus* sp. (6), *Flavobacterium* sp. (3), *Pseudomonas* sp. (6), and *Proteus* sp. (7) were nonpectinolytic.

^b PG measured as increase in reducing power in terms of milliliters of 0.5 N sodium thiosulfate. PTE as milliliters of 0.02 N sodium hydroxide, and PTE/PATE as units of optical density at 230 to 235 m μ .

^a P = pectin; PA = polygalacturonic acid.

^c Numbers in parenthesis indicate number of strains.

TABLE 4. Fermentation of coffee cherries by pure cultures of yeasts

Sample no.	Yeast tested	Criteria observed				Pectin decomposed %
		External appearance of beans	Flavor of ferment	Disappearance of stickiness		
1	<i>Saccharomyces marxi</i>	Grayish-brown	Pungent	Almost complete		86.4
2	<i>S. bayanus</i>	Cream to yellow	Vinegar-like	Partial		59.0
3	<i>S. cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i>	White till 48 hr, black after 70 hr	Cheesy	Nil		27.6
4	Mixture of 1 and 2	Yellowish-brown	Vinegar-like	Almost complete		70.8
5	Mixture of 2 and 3	Brownish-black	Nil	Nil		38.5
6	Mixture of 1 and 3	Grayish	Pungent	Partial		53.3
7	Mixture of 1, 2, and 3	Blackish	Vinegar-like	Complete		94.6
8	Natural process	Original color retained with brown tinge	Vinegar-like	Complete		98.2

TABLE 5. Effect of pectic enzymes on coffee fermentation

Enzymes	Criteria observed			Percentage of pectin decomposed at				
	External appearance of beans	Flavor of the ferment	Disappearance of stickiness	2 hr	4 hr	6 hr	8 hr	10 hr
Yeast enzymes	Whitish to cream yellow	Vinegar-like	Complete	20.5	46.3	78.4	95.0	96.2
Benefax	Brownish-black	Nil	Complete	23.3	48.5	69.6	94.5	98.0
Pectinase	No change	Nil	Partial	8.3	20.4	36.7	43.3	56.9
No added enzymes (natural process)	Original color retained with brown tinge	Vinegar-line	Slight	3.8	4.4	5.6	8.9	13.7

to the natural process, although it left signs of discoloration on the beans. It is likely that under the natural conditions other microorganisms contribute in making the overall fermentation run a desirable course.

The pooled yeast enzyme preparation from the three *Saccharomyces* species was indeed very effective in the sense that it brought about complete elimination of pectic substances within 7 to 8 hr at room temperature. In fact, this crude

239

pooled enzyme was comparable in activity to the commercial mold pectinases (Table 5). The resultant product, moreover, was not only normal in appearance but was free from any off flavors. In other words, use of yeast enzymes in the processing of coffee can expedite its curing without affecting in any way its color or general appearance. It is difficult to infer from the present series of experiments whether the use of enzyme has any effect on the aroma of the final product. This possibility, however, exists, in the light of the report by Frazier (4) that cacao produced by enzymatic fermentation was inferior in flavor to the resultant product of natural fermentation. At the same time, it is clear that controlled and mild enzymatic degradation would not only hasten the separation of the seeds from the pulp but would obviate tainting ("onion flavor") occurring occasionally under prolonged natural fermentations. Use of enzyme preparation on a large scale for the curing of coffee beans is contemplated during the next season.

In contrast to the results of Frank, Lum, and Dela Cruz (3), in the present study only yeasts were found to dominate and possess the pectinolytic properties. The reason for this discrepancy is not clear. It is possible that environmental and procedural conditions prevailing at Kona (Hawaii) differ from those obtaining at Chikmagalur (Mysore, India), and these possibly influence the selection of a particular group of organisms. It may even be that soil, which presumably contributes the organisms involved in the process (some evidence for this has been adduced for Kona coffee by Frank and Dela Cruz and for Chikmagalur coffee by the authors, unpublished data), harbors a different population, or that the variety of cherries used may be of different composition, thereby selecting one particular group of organisms. Significantly, both the studies have shown that the cherry surface is inhabited by a large number of pectinolytic organisms which take part in the process, and that the cherry enzyme is not responsible for mucilage-layer degradation.

ACKNOWLEDGMENT

We thank N. G. Chokkanna, Central Coffee Research Institute, Balehonnur, for facilities provided for the collection of material.

LITERATURE CITED

1. COUNCIL OF SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH. 1950. Wealth of India, vol. 2. Council of Scientific and Industrial Research, India.
2. FRANK, H. A., AND A. S. DELA CRUZ. 1964. Role of incidental microflora in natural decomposition of mucilage-layer in Kona coffee cherries. *J. Food Sci.* 29:850-853.
3. FRANK, H. A., N. A. LUM, AND A. S. DELA CRUZ. 1965. Bacteria responsible for mucilage-layer decomposition in Kona coffee cherries. *Appl. Microbiol.* 13:201-207.
4. FRAZIER, W. C. 1958. Food microbiology. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York.
5. KERTSZ, Z. I. 1951. The pectic substances. Interscience Publishers, Inc., New York.
6. LONDER, J., AND N. J. W. KASGER-VAN RU. 1952. The yeasts, a taxonomic study. Interscience Publishers, Inc., New York.
7. LOEW, O. 1907. The fermentation of coffee, p. 58-65. In H. H. Smith [ed.], The fermentation of cacao. John Bale Sons and Danielsson, Ltd., London.
8. NAGEL, C. W., AND R. H. VAUGHN. 1961. The degradation of oligogalacturonides by the polygalacturonase of *Bacillus polymyxa*. *Arch. Biochem. Biophys.* 94:328-332.
9. PEDERSON, C. S., AND R. S. BREED. 1946. Fermentation of coffee. *Food Res.* 11:99-106.
10. PALCZAR, M. J., P. A. HANSEN, AND W. A. KONETZKA. 1956. Quantitative bacterial physiology, laboratory experiments. Burgess Publishing Co., Minneapolis.
11. ROELOFSEN, P. A. 1953. Polygalacturonase activity in yeast, *Neurospora* and tomato extract. *Biochim. Biophys. Acta* 10:410-413.
12. SMITH, W. K. 1958. A survey of the production of pectic enzymes by plant pathogenic and other bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 18:33-41.
13. SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS. 1957. Manual of microbiological methods. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York.
14. VAUGHN, R. H., R. DE CAMARGO, H. FALLANGHE, G. MELLO-AVRES, AND A. SERZEDELLO. 1958. Observations on the microbiology of the coffee fermentation in Brazil. *Food Technol. Suppl.* 4:12-57.
15. WICKERHAM, L. J. 1951. Taxonomy of yeasts. U.S. Dept. Agr. Tech. Bull. 1029.

G. S. Hoondal · R. P. Tiwari · R. Tewari · N. Dahiya
Q. K. Beg

Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review

Received: 3 April 2002 / Revised: 27 May 2002 / Accepted: 1 June 2002 / Published online: 3 July 2002
© Springer-Verlag 2002

Abstract The biotechnological potential of pectinolytic enzymes from microorganisms has drawn a great deal of attention from various researchers worldwide as likely biological catalysts in a variety of industrial processes. Alkaline pectinases are among the most important industrial enzymes and are of great significance in the current biotechnological arena with wide-ranging applications in textile processing, degumming of plant bast fibers, treatment of pectic wastewaters, paper making, and coffee and tea fermentations. The present review features the potential applications and uses of microbial alkaline pectinases, the nature of pectin, and the vast range of pectinolytic enzymes that function to mineralize pectic substances present in the environment. It also emphasizes the environmentally friendly applications of microbial alkaline pectinases thereby revealing their underestimated potential. The review intends to explore the potential of these enzymes and to encourage new alkaline pectinase-based industrial technology.

Introduction

Enzymes were discovered in the second half of the nineteenth century, and since then have been extensively used in several industrial processes. Enzymes are extremely efficient and highly specific biocatalysts. With the advancement in biotechnology over last three decades, especially in the area of genetics and protein engineering, enzymes have found their way into many new

G. S. Hoondal (✉) · R. P. Tiwari
Department of Microbiology, Panjab University,
Chandigarh 160 014, India
e-mail: gshoondal@rediffmail.com
Tel.: +91-172-541770

R. Tewari · N. Dahiya
Department of Biotechnology, Panjab University,
Chandigarh 160 014, India

Q. K. Beg
Department of Microbiology, University of Delhi South Campus,
Benito Juarez Marg, New Delhi 110 021, India

rial (Tanabe et al. 1987, 1988), and processing and degumming of plant fibers such as ramie (*Bombyx mori*), sun hemp (*Crotalaria juncea*), burl (*Grevia opulenta*), flax (*Linum usitatissimum*), and jute (*Corchorus capsularis*) (Brühlmann et al. 2000; Cao et al. 1992; Henriksson et al. 1999; Kapoor et al. 2001; Kashyap et al. 2001a, b; Sreenath et al. 1996), as well as depolymerizing and debarking (Vilkari et al. 2001). Plant fibers are commonly used for making ropes, bags, nets etc. in developing countries. In these endeavors there is a great need to compile detailed information on microbial alkaline pectinases related to potential industrial applications, which will in turn dictate the direction of research into alkaline pectinases. This review will focus briefly on the different types of pectic substances and their utilization followed by a detailed discussion of the technological innovations and benefits of environmentally friendly industrial applications of alkaline pectic enzymes.

Pectin and pectic substances

Pectic substance consists of pectin and pectic acid. The main chain of pectin is partially methyl-esterified 1,4- α -galacturonan. Demethylated pectin is known as pectic acid or polygalacturonic acid. Pectic substances are commonly amorphous, with a degree of polymerization of about 200–400. Substituents can be found at the C-2 or C-3 positions of the main chain. Substituents can be either non-sugar (acetyl) or sugar (α -glucose, α -xylose, L-arabinose, and L-rhamnose). The degree and type of branching varies depending on the source of the pectic substance. The synthesis of pectic substances occurs in the Golgi apparatus from UDP-D-glacturonic acid during early stages of growth in young enlarging cell walls (Sakai et al. 1993). Compared with young, actively growing tissues, lignified tissues have a low content of pectic substances. The content of pectic substances is very low in higher plants – usually less than 1%. They are mainly found in fruits and vegetables, constitute a large part of some algal biomass (up to 30%), and occur in low concentrations in forestry or agricultural residues. Polysaccharides from cell walls of ripe peats were reported to contain 11.5% pectic substances, 16.1% lignin, 21.4% glucosan, 3.5% galactan, 1.1% mannans, 21% xylan and 10% arabinan (Horikoshi 1990). Pectic substances are classified into four main types: pectic acid, pectinic acid, protopectin and pectin. Pectic acid is a group designation applied to pectic substances mostly composed of colloidal polygalacturonic acids and essentially free from methoxy groups. The salts of pectic acid are either normal or acid pectates. The pectinic acids contain up to 75% methylated galacturonate units. Under suitable conditions, pectinic acids are capable of forming gels with sugars and acid or, if suitably low in methoxyl content, with certain metallic ions. The salts of pectinic acid are either normal or acid pectinates. Protopectin is the water-insoluble parent pectic substance, located primarily in the middle lamella that serves as the glue to

hold cells together in the cell walls. It yields pectin or pectinic acids upon restricted hydrolysis. Some of the reasons for insolubility of protopectin are: (1) its large molecular weight, (2) ester bond formation between carboxylic acid groups of the pectin and hydroxyl group of the other cell wall constituents, or (3) salt bonding between the carboxyl groups of pectic substances and basic groups of proteins. A model for the chemical structure of protopectin has been proposed (Yoshihake et al. 1994) in which neutral sugar side chains are arranged in blocks (hairy regions) separated by unsubstituted regions containing almost exclusively galacturonic acid residues (smooth regions). Pectin is the soluble polymeric material in which approximately 75% of the carboxyl groups of the galacturonic units are esterified with methanol. Like pectinic acids, pectin is capable of forming gels with sugar and acid under suitable conditions.

The chief raw materials for the production of pectin are the residues from the manufacture of fruit juices, apple pomace and citrus fruits (Alkorta et al. 1998; Blanco et al. 1999). The extraction of pectin is carried out by acid hydrolysis at a pH range of 2–3 for 5 h at high temperature (70–100°C). The solid to liquid ratio is normally about 1:18. The pectin extract is separated from the pomace using a hydraulic press or by centrifugation. The extract is filtered, and finally concentrated to a standard setting strength. For powdered pectin preparation, the concentrated liquor is treated with organic solvents or certain metallic salts to precipitate the polymers (Sakai et al. 1993). Pectins are used in the pharmaceutical sector as detoxifying agents, and are well known for their anti-diarrhoeal effects. Pectin, being a colloidal carbohydrate, acts as a lubricant in the intestines, coating the mucosa with uncharged polysaccharide and promoting normal peristalsis without causing irritation, making it suitable as a standard additive in baby foods (Chenoweth and Leveille 1975). It decreases the toxicity of some pharmaceuticals and prolongs their activity without lessening their therapeutic effects (Pitlik and Vongvan 1970). Pectin-gelatin micro globules are also used in regional cancer chemotherapy as an intravascular biodegradable drug delivery system (Bechard and McMullen 1986). In food industries, pectin is used as a jellying agent in jams and jellies. Gelation by pectin in fruit drink concentrates provides stabilization of emulsions, suspensions and foam (Sakai et al. 1993). Pectin is also used for the production of single cell protein in a modified 'syntha' process (Fellows and Worgan 1986), as well as in cosmetics as gels and pastes (Sakai et al. 1993).

Microbial pectinases

Pectolysis is one of the most important processes for plants, as it plays a role in cell elongation and growth, as well as in fruit ripening. Pectolytic enzymes are widespread in nature and are produced by bacteria, fungi, yeasts, insects, nematodes, and protozoa. Microbial pectolysis is important in plant pathogenesis, symbiosis, and

221

Table 1 Microbial sources of alkaline pectinases, their properties and applications

Microorganism	pH (optimum/stability)	Optimum temperature (°C)	Application	Reference
<i>Bacillus</i> sp. DT-7	8	60	Degumming of fuel	Kashyap et al. 2000; 2001b
<i>Bacillus</i> sp. GK-8	5.4–10.4	60	n.s.	Domenburg and Dommenburg 1996
<i>Bacillus</i> sp. KSM-P15	10.5	50–55	n.s.	Kobayashi et al. 1999
<i>Bacillus</i> sp. MG-cp-2	10	60	Degumming of ramie	Kapoor et al. 2000, 2001
<i>Bacillus</i> sp. NT-33	10.5	75	Degumming of ramie	Cao et al. 1992
<i>Bacillus</i> sp. no. P-4-N	10–10.5	65	Degumming of ramie	Horiuchi 1980
<i>Bacillus</i> sp. RK9	10	70	Degumming, retting	Fogarty and Kelly 1983
<i>Bacillus</i> sp. TS-47	8	70	n.s.	Takano et al. 2000, 2001
<i>B. licheniformis</i>	10	70	n.s.	Singh et al. 1999
<i>B. pumilus</i>	8.4–9.4	65	n.s.	Sage and Vaughan 1984
<i>B. pasteurii</i>	8–8.5	70	n.s.	Sage and Vaughan 1971
<i>B. thermophilus</i>	9	70	n.s.	Kapoor et al. 2000
<i>B. subtilis</i>	8.5	60–65	Vegetable maceration	Kapoor et al. 2000
<i>Pseudomonas marginalis</i> CIBP 1287	8.5–9	30	n.s.	Chen and Cohen 1978
<i>P. marginalis</i> MAFF03-01173	8.3	37	n.s.	Chen and Cohen 1978
<i>P. striagosa</i> pv. <i>glyceria</i>	8	30–40	n.s.	Magro et al. 1997
<i>Acetivibrio</i>	9.5	25–30	n.s.	Hayashi et al. 1994
<i>Acetivibrio</i>	8	50	Food industry	Nasrino and Starr 1967
<i>Penicillium italicum</i>	3–9	65	Degumming of ramie	Alana et al. 1991
<i>Aspergillus fumigatus</i>	8.5	50	n.s.	Barakat et al. 1993
<i>Actinomyces</i>	10.25	70	Degumming of ramie	Gomes et al. 1992
<i>Aspergillus</i> sp. OC-11-3	3–9	60	Biobleaching	Brühlmann et al. 1994
<i>Streptomyces</i> sp. OC-11-3	3–9	60	Biobleaching	Beg et al. 2000a, 2001

decomposition of plant deposits (Lang and Domenburg 2000); thus, by breaking down pectin polymer for nutritional purposes, microbial pectinolytic enzymes play a hugely important role in nature. The enzymes are inducible, i.e., produced only when needed, and they contribute to the natural carbon cycle. Microbial pectinolytic enzymes are not the only enzymes available to attack plant polysaccharides. However, pathogenic attack on plant tissue is normally initiated by pectic enzymes because pectic substances are the most readily accessible. Other carbohydrates appear sequentially and attack the available polysaccharides. This results in a sequence of appearance of microbial carbohydrases during microbial attack on plant cell walls. Pectinolytic enzymes or pectinases are classified according to their activity on the main polygalacturonan backbone chain (Sakai et al. 1993). Although the substrates are known to hinder enzymatic attack, information on the specific effects of substitution on pectinase activities remains unavailable.

Pectinases comprise a group of enzymes that catalyze the breakdown of substrates containing pectin. Pectinases are classified into three classes: pectin esterases, depolymerizing enzymes (hydrolases, lyases), and protopectinases according to the following criteria: (1) whether pectin, pectic acid or oligo-D-galacturonate is the preferred substrate; (2) whether they act by trans-elimination or hydrolysis; or (3) whether the cleavage is random (endo-, liquefying or depolymerizing enzymes) or end-wise (exo- or saccharifying enzymes) (Alkorta et al. 1998). Detailed classification and properties of pectinolytic enzymes are discussed in other literature on pectinases (Alkorta et al. 1998; Kashyap et al. 2001a; Sakai et al.

lite repression (Beg et al. 2000a). However, in *Thermomonospora fuscus*, polygalacturonate lyase was induced in the presence of glucose and cellulose but not in the presence of cellobiose (Sturenberger 1987). The addition of amino acids and their analogues, such as DL-norleucine, L-leucine, DL-isoleucine, L-lysine, monohydrochloride and DL-β-phenylalanine to the growth medium stimulated pectinase production from *Streptomyces* sp. QG-11-3 by up to 2.78-fold (Beg et al. 2000b), whereas DL-norleucine, L-leucine and DL-isoleucine synergistically stimulated pectinase production by up to 5.62-fold. Similarly, another study found that the production of an alkaline polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2 was also influenced in the presence of amino acids, vitamins and surfactants in both SmF and SSF (Kapoor and Kuhad 2001).

For practical applications, immobilization of microorganisms on solid materials offers several advantages, including repeated usage of enzyme, ease of product separation and improvement of enzyme stability. In immobilization studies, whole cell immobilization of an organism to a solid support is applied. In a recent study, the effectiveness of polyurethane foam (PUF) as an inert support material for *Bacillus* sp. MG-cp-2 immobilization was investigated (Kapoor et al. 2000). Polygalacturonase production was enhanced up to 1.5-fold over a period of 20 days using PUF as an immobilization matrix compared to the polygalacturonase yield in SmF. The bacterial cells adhere to the surface of PUF and also partially infuse into the pores as a consequence of bacterial growth. Unlike other techniques involving active immobilization, the use of PUF does not require the growth of cells prior to immobilization. The inert particles are simply placed in the fermentor before sterilization and the fermentor is inoculated in the normal way. Cells become immobilized within the PUF pores as a natural consequence of growth during an initial growth period. This technique has also been applied successfully to a wide variety of other microbial cell systems for immobilization.

SSF is the growth of organisms on solid substrates in systems with continuous gas phase and no free-flowing water. Some of the advantages of SSF processes over liquid batch fermentation are that a lower volume of liquid is required for product recovery, cheap media can be used for fermentation, and there is a lower risk of contamination due to the inability of most contaminants to grow in the absence of free-flowing substrate. Agro-industrial residues such as wheat bran, rice bran, sugarcane bagasse, corn cobs, and apple pomace are generally considered the best substrates for SSF processes (Pandey et al. 1999). Although production of acidic pectinase in SSF has been reported extensively (Blundino et al. 2002; Maldonado and Saad 1998), most researchers have used *Aspergillus* sp. as the major pectinase producer in this system. Enzyme production in SSF using *Bacillus* sp. has been reported for other enzymes such as xylanases and amylases; however only scattered reports are available on alkaline pectinase production by SSF using bacteria. This might be due to the general belief that the SSF

technique is applicable only to filamentous fungi (Pandey et al. 1999). In a recent study using *Bacillus* sp. MG-cp-2 (Kapoor et al. 2000), high yields of alkaline pectinase were reported in SSF using cheap agro-residues such as decorticated ramie fibers and wheat bran as primary solid substrates.

Biotechnological applications of alkaline pectinases

Over the years alkaline pectinases have been used in several conventional industrial processes, such as textile and plant fiber processing, coffee and tea fermentation, oil extraction, and treatment of industrial wastewater containing pectinaceous material. With increased understanding and knowledge of the mechanism of pectin-degrading microorganisms and their enzymes, alkaline pectinases have made their way into several other biotechnological processes, such as purification of plant viruses (Salazar and Jayasinghe 1998), and paper making (Reid and Reid 2000; Vilkari et al. 2001), most of which, despite sounding interesting, have yet to be commercialized. The following sections discuss some of the conventional and new applications of alkaline pectinolytic enzymes.

Pectinases in textile processing and biostouring of cotton fibers

Textile processing has benefited greatly in both environmental and product quality aspects through the use of enzymes. Prior to weaving of yarn into fabric, the warp yarns are coated with a sizing agent to lubricate and protect the yarn from abrasion during weaving. Historically, the main sizing agent used for cotton fabrics has been starch because of its excellent film-forming capacity, availability, and relatively low cost. Before the fabric can be dyed, the applied sizing agent and the natural non-cellulosic materials present in the cotton must be removed. Before the discovery of amylase enzymes, the only way to remove the starch-based sizing was extended treatment with caustic soda at high temperature. The chemical treatment was not totally effective in removing the starch (which leads to imperfections in dyeing) and also results in a degradation of the cotton fiber resulting in destruction of the natural soft feel, or 'hand', of the cotton. The use of enzymes such as pectinases in conjunction with amylases, lipases, cellulases and other hemi-cellulosic enzymes to remove sizing agents has decreased the use of harsh chemicals in the textile industry, resulting in a lower discharge of waste chemicals to the environment, improving both the safety of working conditions for textile workers and the quality of the fabric.

A cotton fiber is comprised of a lumen, a secondary and a primary wall. The primary wall is responsible for the lack of absorbance of unprepared fiber. Noncellulosic impurities, such as fats, waxes, proteins, pectins, natural colorants, minerals and water-soluble compounds – found to a large extent in the cellulose matrix of the pri-

moisture. The harvested crop is allowed to dry in the sun so that the leaves are shed and the stem becomes partially bleached. The fiber is peeled by breaking the lower ends when the stalks have softened after being kept in clear, stagnant or running water for retting. The stripped fibers are cleaned and then sun-dried.

The removal of heavily coated, non-cellulosic gummy material from the cellulosic part of plant fibers is called 'degumming' and is necessary prior to the industrial utilization of fibers (Said et al. 1991). There are several types of degumming, in dew retting, fungal or bacterial enzymes attack the plant pectic substances, while the stems are spread on the ground. The advantages of the process are its simplicity and low cost; however, the extent of degumming varies on environmental factors such as temperature, moisture etc. The main disadvantage of this process is the risk of fiber damage by cellolytic enzymes secreted by the microbial flora acting on the fibers. In tank retting, the degumming of fibers is carried out in large tanks with warm water using anaerobic microflora capable of degrading pectic substances. In the classical degumming process, the heavy coating of gums, waxes and pectin that remains on the processed bast fibers is removed by chemical means. On an industrial scale, the degumming of bast fibers is carried out by treating the crude fibers with dilute lye solutions (12–20% NaOH and 2% NaOH in case of ramie and sunn hemp, respectively) containing wetting and reducing agents (Cao et al. 1992). Following a 24 h soaking period, the fibers are boiled for 1–4 h, rinsed, neutralized, washed and centrifuged several times. The fibers are then dried over charcoal fire and treated with softeners such as glycerin, wax, soap etc. to prevent the fibers from becoming brittle. The cleaned fibers are further grinded and processed. The chemical treatment of fibers is believed to produce polluting, toxic and nonbiodegradable effluents and causes serious environmental threats and biological disturbances, not to mention the high consumption of energy (Brühlmann et al. 1994; Cao et al. 1992). With rising energy costs due to scarcity of energy resources, and deterioration of the environment beyond a tolerable level, there is an urgent need to develop alternate, environmentally friendly, processes for degumming and processing of bast fibers (Zheng et al. 2001).

Effective harnessing of the biochemical activities of microorganisms for degumming processes is becoming ever more imperative today due to the deficiencies in present conventional processes. Polysaccharide-degrad-

ing microorganisms and enzymes such as pectinases (Barakat et al. 1993) or a combination of pectinases and xylanases (Brühlmann et al. 1994; Cao et al. 1992) could be used to remove the gummy material from plant fibers. The processing of fiber is fast and degumming is much more specific. Pectinases are believed to play a leading role in the processing of these fibers, since 40% of the dry weight of plant cambium cells is comprised of pectin (Bajpai 1999). Pectinases effectively assist in degumming, maceration and retting of jute, flax, hemp and ramie bast fibers by degrading the pectin located in the middle lamella and primary cell wall (Barnack-Pereira et

al. 1989; Henriksson et al. 1997). In a recent study by our group, an alkaline and thermostable polygalacturonase from *Bacillus* sp. NG-ep-2 (Kapoor et al. 2001) has been used for the degumming of ramie (*B. nivea*) and sunn hemp (*C. juncea*) bast fibers in comparison to the conventional chemical degumming process. Of the three treatments tested i.e., enzymatic, chemical (2% NaOH), and 'chemical plus enzyme', the third treatment was found to be the most promising for degumming. The maximum amounts of reducing sugar released from the ramie and sunn hemp fibers were 9.4 and 7.6 µmol/ml, respectively, whereas the percent reduction in fiber weight was 37% and 56% for ramie and sunn hemp fibers, respectively, after 11 h of 'chemical plus enzyme' treatment. Scanning electron microscopic studies also revealed a complete removal of non-cellulosic gummy material from the surface of ramie and sunn hemp fibers (Kapoor et al. 2001). This study proved that a mild chemical treatment of plant fibers is necessary before enzymatic treatment, since neither chemical nor enzymatic treatment alone is sufficient. Similarly, in another study, the effectiveness of an alkaline pectinase from *Bacillus* sp. DT7 (Kashyap et al. 2001b) in degumming of buel (*Grewia optiva*) bast fibers was studied. The present shift towards a preference for biological tools i.e., enzymes, rather than conventional chemical methods for degumming of plant fibers is due to several factors, e.g., high consumption of energy by conventional chemical process, environmental pollution caused by toxic effluents from chemical degumming units, the low cost of enzymatic treatment of plant fibers, the lack of damage to fibers caused by enzymatic degumming as compared to the chemical method and, finally, savings made on chemicals can pay for the enzymatic treatment.

There are several essential factors determining the efficacy of a potential pectinase producer to be used for degumming of plant fibers. In addition to the complete removal of pectic substances by the pectinase preparation from the potential degumming strains, there should not be any reduction in the tenacity and strength of plant fibers i.e., the strains should be cellulase-negative (Cao et al. 1992; Zheng et al. 2001). Furthermore, a high pH optimum of pectinase from microorganisms is reported to be desirable for degumming of plant fibers since a high pH not only prevents contamination but also allows an open fermentation system to be adopted.

Retting of plant fibers

Pectinases have been used in the treatment (retting) of jute and flax to separate the fibers and eliminate pectins. Recently, it was found that the treatment of jute, flax and ramie with cellulases improves the mechanical properties of the fibers, increasing flexibility with good retention of tensile strength. To date, pulping wood with isolated enzymes has not been accomplished, and is not to be expected, because enzymes cannot penetrate the lignified cell walls. Enzymes can, however, pulp herbaceous fi-

mary wall and to a lesser extent in the secondary wall (Buschle-Diller 2001; Yamamoto et al. 2001) – strongly limit the water absorbency and whiteness of the cotton fiber. Pectin is like a powerful biological glue; the most water-insoluble pectin salts serve to bind the waxes and proteins together to form the fiber's protective barrier. The quantity and composition of this barrier varies with growing conditions, climatic factors and cotton variety. Additionally, 'neps' consisting of immature cotton and enclosed seed coat fragments present serious problems as they are basically undyeable. Scouring of cotton has traditionally been performed with caustic alkaline solution (3–4% aqueous sodium hydroxide) at high temperature to achieve uniform dyeing and finishing. Although very effective in removing impurities, the process requires huge amounts of water for rinsing once the process is complete, has a high-energy requirement and yields waste products that can be damaging to the environment. Excessive usage of water and water contamination are expensive and unacceptable. Seed coat fragments are removed for the most part as a result of the process, but neps remain unchanged.

Therefore, new efficient strategies for cotton wet processing that are cost-effective and reduce the impact on the environment are required. Hydrolysis by enzymes such as pectinases promotes efficient interruption of the matrix to achieve good water absorbency without the negative side effect of cellulose destruction. This process is called bio-scouring. Bio-scouring is a novel process based on the idea of specifically targeting the non-cellulosic impurities with specific enzymes. For example, pectinases can be used for the decomposition of pectic substances, proteases for proteins, lipases for fats. Some of the natural pigments associated with the non-cellulosic compounds could be lifted off the fiber during bio-scouring. An additional asset of this process is that besides being energy conservative and more environmentally friendly, enzymes used for bio-scouring do not affect the cellulose backbone, thus drastically limiting fiber damage. Pectinases to be used for bio-scouring are selected based on their pH and temperature compatibility taking into account the required time of treatment, end-product quality, water absorbency, whiteness and residual pectin.

Degumming of plant bast fibers

The most upcoming application of pectinolytic enzymes is their use in the degumming of plant fibers such as ramie, sunn hemp, jute, flax and hemp (Brühlmann et al. 1994; Cao et al. 1992; Henriksson et al. 1997, 1999; Kapoor et al. 2001). The enzymatic processing results in no damage to the fibers and – most importantly – in addition to being energy conservative is environmentally friendly (Gurucharanam and Deshpande 1986). Plant fibers are long, narrow, thick-walled and lignified sclerenchymatous cells, which are dead and therefore serve the purely mechanical function of giving strength and rigidity to the plant body (Dutta 1986). Plant fibers are classi-

fed into three main types according to their origin and structure: surface fiber, which is produced on the surface of stems, leaves etc. e.g., cotton (*Gossypium* sp.); hard or structural fibers, which are supportive and conductive fibrous bundles, chiefly found in monocots e.g., Manilla hemp (*Musa textilis*), and soft or bast fibers, formed in groups outside xylem in the cortex, phloem or pericycle, e.g., ramie and sunn hemp. Ramie fibers are excellent natural textile material but decorticated ramie fibers contain 20–30% ramie gum, which consists mainly of pectic- and hemicelluloses, and degumming is necessary to meet textile requirements (Cao et al. 1992).

Flax fiber is obtained from the stalk of the flax plant (bast fiber). The fiber has a small size lumen and is composed mainly of cellulose (70–75%) and pectins (25–30%). Flax fibers are relatively smooth, straight and lustrous. They are more brittle and less flexible than those of cotton. The yarn produced, however, has a higher tensile resilience than cotton yarn. Flax is frequently cropped and singled before bleaching and dyeing. This may be followed by dampening to adjust moisture content, calendaring, beetling (pounding the fabric with wooden hammers) and stentering. Different treatments produce embroidery linen, damask and dress linens. Ramie (*B. nivea*), a native of China, Japan and the Malayan peninsula has been in cultivation for thousands of years and was probably used by ancient Egyptians for wrapping mummies. The fibers were known to the Chinese as early as 2200 BC. Other ramie-growing countries are Japan, Taiwan, The Philippines, Indonesia and India. In India, it is grown on a small scale in Assam and northern parts of Bengal. The cellulosic fibers obtained from ramie are the toughest, longest (40–200 mm), strongest and most durable, vegetable fibers known (Brühlmann et al. 1994; Deshpande and Gurucharanam 1985). The fiber has a permanent silky luster and good affinity for dyes and can be bleached to extreme whiteness. Fabric made from ramie fibers can be laundered easily. It absorbs and liberates moisture quickly without shrinking or stretching, and becomes smoother and more lustrous with repeated washings (Bhatnagar and Paul 1976). Despite its excellent properties, the fiber has so far not been utilized on any large scale outside China and Japan due to expensive production costs, the hairy surface of the yarn and its lack of elasticity. The fibers are contained in the secondary phloem, heavily coated with a gummy substance that makes the fiber extraction process difficult. The outer bark and adhering fibers are stripped from the woody core of the stem either by hand, as practiced in China and Japan, or by decortimating machines as in the United States. The processed and degummed ramie fiber is used for making cloth known as 'grass cloth' or 'Chinese linen', which is used for clothing, tablecloths, handkerchiefs, towels and other household items. Sunn hemp (*C. juncea*), an Asiatic species has been grown in nearly all parts of India since pre-historic times. Sunn hemp fiber possesses great tensile strength and is more durable upon exposure than jute. Fiber strands are generally 1.2–1.5 m long, lustrous and fairly resistant to microorganisms and

bers. Microbial retting is an ancient process dating to the beginning of civilization. Traditional retting uses mixed microbial populations – mainly soft-rot bacteria – introduced with crude inocula. Fibers that are retted include flax, jute, and coconut hulls. In this process, microbial pectinases (pectin-depolymerizing enzymes) release cellulosic fibers from fiber bundles.

Enzymatic retting is faster than traditional retting, readily controlled, and produces fewer odors, but further development is required to make it competitive with traditional methods. Commercial enzymes such as cellulases, hemicellulases, pectinases, and other polysaccharidases have been applied to flax at various levels and compared to traditional retting methods (Sharma 1987). Pectinolytic enzymes secreted by soft-rot bacteria also cause maceration of woody bast fibers derived from the phloem of plants. These fibers, used to make cordage, matting and various fabrics, are long, strong, and usually stiff. Pectinolytic and xylanolytic enzymes help in softening of these fibers. The combined alkali and enzyme treatment improves fiber quality (Bajpai 1999; Beg et al. 2001; Kirk and Jeffries 1996). Enzymatic pulps prepared with pectinolytic enzymes produce bulkier paper with higher opacity and better printability than pulps prepared from the same stock solely by an alkaline process. Chemical and enzymatic retting have both been carried out on a semi-industrial scale, and the characteristics of fibers produced by these two methods are not significantly different (Kirk and Jeffries 1996). Combinations of cellulases, xylanases and pectinases have been used to soften and smooth the surfaces of jute-cotton blended fabrics. By obtaining an optimum balance of enzymes, it is possible to lower the dosing rate of enzyme and improve efficiency.

In recent years, a few fundamental studies have been initiated on the enzymatic retting process. These employ purified enzymes on defined substrates, and characterization of the resulting products. A pectinase from *Rhizomucor pusillus* was used for flax retting (Henriksson et al. 1999). To ensure maximum strength of the thread manufactured from retted flax, only a small fraction of the pectins belonging to the fiber bundles needs to be hydrolyzed. In developing nations, and particularly in countries where forest lands are endangered from over exploitation, better use might be made of herbaceous fibers for paper production. Such feedstocks should be amenable to enzymatic pulping, and the resulting processes should give higher yields with fewer environmental problems.

Pretreatment of pectic wastewaters

Conventionally, the treatment of wastewater from citrus processing industries containing pectic substances is carried out in multiple steps, including physical dewatering, spray irrigation, chemical coagulation, direct activated sludge treatment and chemical hydrolysis, which leads to formation of methane. This has several disadvantages, such as the high cost of treatment and longer treatment times in addition to environmental pollution from the use

of chemicals. Thus, an alternative, cost-effective, and environmentally friendly method is the use of pectinases from bacteria, which selectively remove pectic substances from the wastewater. The pretreatment of pectic wastewater from vegetable food processing industries with alkaline pectinase and alkalophilic pectinolytic microbes facilitates removal of pectinaceous material and renders it suitable for decomposition by activated sludge treatment (Horikoshi 1990; Tanabe et al. 1987, 1988). An extra-cellular endopeptidase (optimally active at pH 10.0) from an alkalophilic soil isolate, *Bacillus sp. GIR 621*, was used effectively to remove pectic substances from industrial wastewater (Tanabe et al. 1987).

Coffee and tea fermentations

Pectinase treatment accelerates tea fermentation and also destroys the foam forming property of instant tea powders by destroying the pectins (Carr 1985). Pectinolytic microorganisms are used in the fermentation of coffee to remove the mucilaginous coat from the coffee beans. Pectinases are sometimes added to remove the pulpy bean layer consisting of pectic substances. The role of cellulase and hemicellulase enzyme preparations in enhancing digestion has also been exploited to help in digestion of the mucilage (Carr 1985; Godfrey 1985). Alkaline fungal pectinases are also reported to be used in tea manufacture.

Paper and pulp industry

With the advancement of biotechnology and increased reliance of paper and pulp industries on the use of microorganisms and their enzymes for biobleaching and lignin making, the use of enzymes other than xylanases and ligninases, such as mannanase, pectinases, and α -galactosidase is increasing in the paper and pulp industries in many countries (Bajpai 1999; Kirk and Jeffries 1996). During papermaking, pectinase can depolymerize polymers of galacturonic acids, and subsequently lower the cationic demand of pectin solutions and the filtrate from peroxide bleaching (Reid and Ricard 2000; Vikari et al. 2001). An overall bleach-boosting of eucalyptus kraft pulp was obtained when alkaline pectinase from *Stryphomyces sp. QG-11-3* was used in combination with xylanase from the same organism for biobleaching (Beg et al. 2001). The ability of polygalacturonic acids to complex cationic polymers depends strongly on the degree of polymerization. Pectinases depolymerise polygalacturonic acids and consequently decrease the cationic demand in the filtrate from peroxide bleaching of thermomechanical pulp (Vikari et al. 2001).

Poultry feed

Intensive research into the use of various enzymes in animal and poultry feed started in the early 1980s. The first

commercial success was addition of β -glucanase into barley-based feed diets. Subsequently, enzymes were tested also in wheat-based diets. Xylanase enzymes were found to be the most effective in this case. The net effect of enzyme usage in feed is increased animal weight gain with the same amount of barley resulting in an increased feed conversion ratio. Usually a feed enzyme preparation is a multienzyme cocktail containing glucanases, xylanases, proteinases, pectinases and amylases. Enzyme addition reduces viscosity, which increases absorption of nutrients, liberates nutrients either by hydrolysis of non-degradable fibers, or by liberating nutrients blocked by these fibers, and reduces the amount of faeces. Recent studies in broilers conducted with and without the use of antibiotics suggest that feed additives significantly modify the immune-derived inflammatory response under stress conditions resulting in better mortality, weight gain, feed conversion and bone strength in the broilers. Petersen (2001) studied multi-enzyme preparations containing pectinases, β -glucanases and a variety of hemicellulases to test their efficacy for improving the digestibility of a vegetable protein mixture consisting of sorghum, soy and canola in broilers for 49 days. Enzyme supplementation improved weight gain and feed conversion significantly.

Purification of plant viruses

Knowledge about a virus prior to purification is very limited. Very pure preparations of viruses are required in order to carry out chemical, physical, and other biological studies. There are numerous purification procedures that can be adapted to many of the viruses that infect plants. However, there are several different purification systems that can be selected for use according to the type of virus. In those cases in which the virus is restricted to the phloem, certain enzymes, such as alkaline pectinases and cellulases, can be used to liberate the virus from the tissues (Salazar and Jayasinghe 1999).

Oil extraction

Citrus oils such as lemon oil can be extracted with pectinases, as these enzymes destroy the emulsifying properties of pectin, which interfere with the collection of oils from citrus peel extracts (Scott 1978). Plant cell-wall-degrading enzyme preparation has begun to be used in olive oil preparation. The enzyme is added during the process of grinding of olives by which easy removal of oil is accomplished in subsequent separation procedures.

Conclusions

The studies performed so far on alkaline pectinolytic systems from microorganisms have generally focused on induction of enzyme production under different conditions,

purification, characterization and use of enzymes for different industrial process. These examples are just a few of the many ways commercial enzymes touch our lives. They are tools of nature that help provide everyday products in an environmentally conscious manner. The development of enzyme products often relies on screening a large number of organisms for an enzyme activity with a specific set of biochemical and physical characteristics that suit the targeted population. By combining enzyme screening with modern techniques of protein engineering, directed evolution and metagenome approaches, new and novel biocatalysis with improved performance under specific applications and conditions can be generated. Current commercial use of enzymes, together with new applications, will continue to play an important role in maintaining and enhancing the quality of life we enjoy today while protecting the environment for generations to come. Rational approaches to achieve these goals require a detailed knowledge of the regulatory mechanisms governing enzyme production, and thus more advanced studies are required to achieve a complete understanding of the mechanism of pectin degradation by microorganisms and their enzymes. The use of molecular biology techniques to study the biochemical, regulatory, and molecular aspects of pectinases, and engineering of enzymes that are more robust with respect to their pH and temperature kinetics by the techniques of protein engineering and site-directed mutagenesis could have significant impact on their use on an industrial scale. The enzyme systems used by microbes for metabolizing and for complex breakdown of pectin are the most important tools for elaborating the economical, ecofriendly and green chemical technology for using pectin polysaccharide in nature.

In order for pectinases to have a significant impact on industrial processes, they will need to be effective in a consistent manner under various operating conditions. It seems likely, therefore, that future research will be directed toward the discovery or engineering of enzymes that are more robust with respect to pH and temperature tolerance. Much progress is still required to understanding the basic mechanisms of pectinases and in engineering their properties. Pectin-degrading enzymes and the mechanisms they employ should receive increased research attention, with emphasis on how they might point to new applications in ecofriendly processes.

Acknowledgement The authors thank the University Grants Commission, Government of India for financial assistance in carrying out these investigations.

References

- Alana A, Llana M, Serra JL (1991) Purification and some properties of the pectin lyase from *Penicillium*. *FEBS Lett* 280: 355–358
- Alkorta I, Garbisa G, Llana MJ, Serra JL (1998) Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochem* 33: 21–28
- Bajpai P (1999) Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biochemical Prog* 12:147–157

- Ramirez MC, Vazquez MCD, Aranjio EFD, Silva DO (1993) Partial characterization of *Aspergillus fumigatus* polygalacturonase for the biodegradation of pectin. *Enzyme Microb Technol* 15:139-142
- Barcelo-Ferraz MC, Vazquez M, Aranjio EFD, Silva DO (1989) Selection of pectinolytic fungi for degumming of natural fibers. *Microbiol Lett* 11:899-902
- Beckard S, Meekullen JN (1986) Pectin-gelation microgelules: effect of a cross-linking agent (formaldehyde) or in vitro digestion rate. *Int J Pharm* 31:91-98
- Beg OK, Bhushan B, Kapoor M, Hoodal GS (2000a) Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from a *Streptomyces* sp. QG-11-3. *J Ind Microbiol Biotechnol* 24:396-402
- Beg OK, Bhushan B, Kapoor M, Hoodal GS (2000b) Effect of amino acids on production of xylanase and pectinase from a *Streptomyces* sp. QG-11-3. *World J Microbiol Biotechnol* 16:211-213
- Beg OK, Kapoor M, Tiwari RP, Hoodal GS (2001) Bleach-boosting of eucalyptus leaf pulp using combination of xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3. *Res Bull Punjab Univ Sci* 31:71-78
- Bhattacharya SK, Paul NB (1976) Susceptibility of ramie with different gum contents to microbial damage. *Curr Sci* 45:395-396
- Blanco P, Serrano C, Villa TG (1999) Production of pectic enzymes in *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb Technol* 25:175-179
- Blanchard A, Ishiyoshi T, Pandella SS, Cantero D, Webb C (2002) Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 58:164-169
- Brodinano F (1995) Purification and characterization of an extracellular pectate lyase from an *Amylomyces* sp. *Appl Environ Microbiol* 61:3580-3585
- Bruhmanam F, Kim KS, Zimmermann W, Frecher A (1994) Pectinolytic enzymes from actinomycetes for the degumming of ramie bast fibers. *Appl Environ Microbiol* 60:2107-2112
- Bruhmanam F, Loupin M, Ertmann KH, Frecher A (2000) Enzymatic degumming of ramie bast fibers. *J Biotechnol* 76:41-50
- Buschle-Diller G (2001) Environmentally friendly bioconverting processes. In: *Proceedings of the Seminars International Association Bioconologia Na Industria Textil*, workshop for the textile industry, May 16-19, 2001, Santa Catarina, Brazil
- Cao J, Zheng L, Chen S (1992) Screening of pectinase producer from alkalophilic bacteria and study on its potential application in the degumming of ramie. *Enzyme Microb Technol* 14:1013-1016
- Caru JG (1985) Tea, coffee and cocoa. In: Wood BJH (ed) *Microbiology of fermented food vol 2*. Elsevier, London, pp 131-154
- Chenoweth WL, Leveille GA (1973) Physiological effects of food carbohydrates. In: *James A, Hodge J (eds) American Chemical Society*, Washington, D.C., pp 312-324
- Chesson A, Codner RC (1978) Maceration of vegetable by a strain of *Bacillus subtilis*. *J Appl Bacteriol* 44:347-364
- Clarke JH, Davidson K, Ritton JE, Halstead JR, Franzen MP, Gilbert III, Hazlewood GP (2000) A comparison of enzyme-aided bleaching of softwood pulp using a combination of xylanase, mannanase and α -galactosidase. *Appl Microbiol Biotechnol* 53:661-667
- Dave BA, Vaughn RH (1971) Purification and properties of a polygalacturonase acid trans-eliminase from *Bacillus pumilus*. *J Bacteriol* 103:166-173
- Deshpande KS, Anuradham K (1985) Degumming of ramie fibers: role of cell wall degrading enzymes of *Aspergillus versicolor*. *Indian J Bot* 17:9-18
- Deshpande KS, Hoodal GS (1996) Production of constitutive, thermostable, hyperactive xylanase from *Bacillus GR-8*. *Bacteriotechnol* 14:135-143
- Dutta AC (1980) Textile. In: *Dutta AC (ed) A class-book of botany*. Oxford University Press, London, pp 182-194
- Fellows PJ, Worron JT (1986) Studies on the growth of *Candida utilis* on D-galactonic acid and the products of pectin-hydrolysis. *Enzyme Microb Technol* 9:537-540
- Figary MV, Kelly CT (1983) Pectic enzymes. In: *Enzyme Microb Technol* 5:181-182
- Ganvius A, Kanan N, Legant C, Balbani A (1994) Use of *Saccharomyces cerevisiae* for the clarification of fruit juices. *Biotechnol Lett* 16:1329-1334
- Goelicy A (1985) Production of industrial enzymes and some applications in fermented foods. In: Wood BJH (ed) *Microbiology of fermented foods*, vol 1. Elsevier, London, pp 345-371
- Gomes I, Sara RK, Mohindin G, Hoq MN (1992) Isolation and characterization of a cellulase-free pectinolytic and hemichelolytic thermophilic fungus. *World J Microbiol Biotechnol* 8:589-592
- Gurucharanan K, Deshpande KS (1986) Polygalacturonase of *Candida utilis* - use in degumming of ramie fibers. *Indian Phytopathol* 33:385-389
- Hayashi K, Inoue Y, Shiga M, Sato S, Tokano R, Miyazaki K, Hibi T, Hara S (1997) Pectinolytic enzymes from *Pseudomonas marginalis* MAFD-0173. *Physicochemistry* 43:1359-1363
- Hemlanson G, Alin DL, Rutlin RL, Rodriguez C, Archibald D, Aggrey LL, Eriksson K-EL (1997) Identification and testing of characteristics of fungi isolated from degraded ramie in United States and Europe. *Appl Environ Microbiol* 63:3949-3956
- Hemlanson G, Alin DE, Slumczynski D, Eriksson K-EL (1999) Production of highly efficient enzymes for flax retting by *Rhizopus purilatus*. *J Biotechnol* 68:115-123
- Hartshorn K (1990) Enzymes from alkaliphiles. In: Fogarty WM, Kelly CT (eds) *Microbial enzymes and biotechnology*. 2nd edn. Elsevier, Ireland, pp 275-295
- Huang LC, Mahoney RR (1999) Purification and characterization of an endopolygalacturonase from *Pirithium albidum*. *J Appl Microbiol* 86:145-156
- Kapoor M, Kishor R (2001) Improved polygalacturonase production from *Bacillus* sp. MG-cp-2 using amino acids, vitamins and surfactants under submerged and solid state fermentation. In: *Proceedings of the national symposium on lignocellulose biotechnology: present and future prospects*. New Delhi, India, December 2001, p 11
- Kapoor M, Beg OK, Bhushan B, Daddish KS, Hoodal GS (2000) Production and partial purification and characterization of a thermophilic stable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2. *Enzyme Microb Technol* 26:167-170
- Kapoor M, Beg OK, Bhushan B, Singh K, Daddish KS, Hoodal GS (2001) Application of an alkaline and thermostable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2 in degumming of ramie (*Bombyx mori*) and sun hemp (*Crotalaria juncea*) bast fibers. *Process Biochem* 36:803-807
- Karpassi A, Vaughn RH (1980) Purification and properties of polygalacturonase acid trans-eliminase from *Bacillus streptomophilus*. *Can J Microbiol* 26:377-384
- Kashyap DR, Chandra S, Kaul A, Tewari R (2000) Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. *World J Microbiol Biotechnol* 16:277-282
- Kashyap DR, Vohra P, Chopra S, Tewari R (2001a) Biotechnological applications of microbial pectinases. *Bioresour Technol* 77:215-227
- Kashyap DR, Vohra P, Soni SK, Tewari R (2001b) Degumming of beel (*Grevia optima*) bast fibers by pectinolytic enzyme from *Bacillus* sp. DT7. *Biotechnol Lett* 23:1297-1301
- Kulk TK, Jefferies TW (1996) Role of microbial enzymes in pulp and paper processing. In: Jefferies TW, Vikari L (eds) *Enzymes for pulp and paper processing*. ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, D.C., pp 1-18
- Kobayashi T, Honda Y, Ito S (1999) Purification and properties of a molecular weight, high-alkaline pectate lyase from an alkaliphilic strain of *Bacillus*. *Biosci Biotechnol Biotechnol* 63:75-72
- Lang C, Dornenburg H (2000) Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. *Appl Microbiol Biotechnol* 53:166-175
- Sharma HS (1987) Enzymatic degradation of residual non-cellulosic polysaccharides present on dew-retted flax fibers. *Appl Microbiol Biotechnol* 26:358-362
- Singh SA, Plattner H, Dickmann HJ (1999) Exopolysaccharonate lyase from a thermophilic *Bacillus* sp. *Enzyme Microb Technol* 24:420-423
- Sreenath HK, Shah AB, Yang VW, Gharia NM, Jefferies TW (1996) Enzymatic polishing of jute-cotton blended fabrics. *J Ferment Bioeng* 81:18-20
- Stratillova E, Brezova E, Vackertova R (1996) Effect of cultivation and storage pH on the production of multiple forms of polygalacturonase by *Aspergillus niger*. *Biotechnol Lett* 18:41-44
- Surzenberger EJ (1987) Inducible thermotolerant polygalacturonase lyase from *Thermoplasma Yarrowii*. *J Bacteriol* 169:2774-2780
- Takao M, Nakaiwa T, Yoshikawa K, Terashita T, Sakai T (2000) Purification and characterization of thermostable pectate lyase with neopectinase activity from thermophilic *Bacillus* sp. TS 47. *Biosci Biotechnol Biotechnol* 64:2160-2167
- Takao M, Nakaiwa T, Yoshikawa K, Terashita T, Sakai T (2001) Molecular cloning, DNA sequence, and expression of the gene encoding for thermostable pectate lyase of thermophilic *Bacillus* sp. TS 47. *Biosci Biotechnol Biotechnol* 65:322-329
- Tanabe H, Yoshikawa Y, Tamura K, Kobayashi Y, Akamatsu T (1987) Pretreatment of pectic wastewater from orange canning process by an alkalophilic *Bacillus* sp. *J Ferment Technol* 65:243-246
- Tanabe H, Kobayashi Y, Akamatsu T (1988) Pretreatment of pectic waste water with pectate lyase from an alkalophilic *Bacillus* sp. *Appl Biochem* 52:1851-1856
- Vikari L, Tenkanen M, Suurkari A (2001) Biotechnology in the pulp and paper industry. In: *Rich JD (ed) Biotechnology*. 2nd edn, vol 10. VCH-Wiley, pp 523-546
- Yamamoto R, Buschle-Diller G, Takagishi T (2001) Eco-friendly processing of cotton application of chemical and enzymatic treatments. In: *Proceedings of the American Chemical Society National Meeting*, 2001, San Diego, Calif. ACS, Washington D.C.
- Yoshikawa K, Nishida T, Katsuragi T, Hara S, Sakai T (1994) Purification and characterization of a pectin-releasing enzyme produced by *Micrococcus nishidaei*. *J Ferment Biotechnol* 77:370-375
- Zheng L, Du Y, Zhang J (2001) Degumming of ramie fibers by alkalophilic bacteria and their polygalacturonase-degrading enzymes. *Bioresour Technol* 78:89-94

Production of Pectinase from Coffee Pulp in Solid State Fermentation System : Selection of Wild Fungal Isolate of High Potency by a Simple Three-step Screening Technique

F. BOCCAS¹, S. ROUSSOS², M. GUTIERREZ², L. SERRANO³ and G. G. VINIEGRA¹

¹ORSTOM, Centre Montpellier, Biotechnologie Unit, 9111, Av. Agropolis,

BP 5045, 34032 Montpellier, France.

²Department of Biotechnology, Autonomous Metropolitan University,

Izamalapa Campus, AP 55-535, CP 05340, Mexico DF, Mexico.

Screening of 248 cultures, isolated from Mexico's coffee growing areas, was carried out to select potent culture for production of pectinase from coffee pulp by solid state fermentation. A pectolytic strain of *Aspergillus niger* CH 4 was used as reference to evaluate the potential of the wild strains. The screening was carried out in three steps. The first step involved the selection of 248 fungal strains on a selective medium. The second step consisted of the cultivation of the pectolytic activities of selected 13 isolates in a submerged fermentation medium, with pectin as the sole carbon source. The third step involved the assay of four selected fungal isolates for their capacity to produce pectinase from coffee pulp by solid state fermentation. *Aspergillus niger* V 22 D 35, a wild strain, was found to produce 4 times more pectinase than the reference strain.

Keywords : Coffee pulp, Solid state fermentation, Wild fungi, Pectinase, Simple three-step screening technique, *Aspergillus niger*.

Wet processing of coffee cherries, involving solid state fermentation and the action of pectolytic microorganisms, has been the preferred method over the dry method in several countries, as it leads to the final product of better quality. The wet method, however, leads to generation of huge quantity of coffee pulp, which poses severe disposal problems. For example, the coffee plantations in Mexico, Central America and Columbia generate coffee pulp to the tune of approximately 40% of several million tonnes of coffee cherries processed (Martinez - Carrera et al. 1989). The coffee pulp is barely used in these countries for want of practical and economic avenues. Due to presence of 23-27% fermentable sugars on dry weight basis (Zuluaga-Vasco 1989), the coffee pulp forms a major source of the pollution of rivers and lakes, located near the coffee processing sites, as well as the environment.

Due to its rich organic matter content, the coffee pulp can form an excellent substrate for production of value-added microbial metabolites by solid state fermentation (SSF) system. Microbial enzymes constitute one of the industrially important groups of microbial metabolites. In fact, one such microbial enzyme, i.e. pectinase, plays an important role in the processing of coffee cherries. In the wet fermentation method of coffee cherries, the natural

pectolytic microflora present on the cherries are allowed to grow and metabolize for facilitating pectinase production. This enzyme, then, hydrolyses the mullage, that envelops the coffee bean and consists mainly of pectins. The degree of hydrolysis of this pectic envelope has an ultimate economical importance to the coffee processing industry, due to its significant role on the yield and the quality of the end product. The modern practice is to use externally added microbial pectinase for hydrolysing the pectic envelop of the coffee beans. Consequently, a large quantity of microbial pectinase is consumed by the coffee processing industry.

There will be a tremendous gain to the industry, if some by-product from coffee processing is used as substrate for microbial production of pectinase. Such an approach will be highly economical and may lead to cost reduction of the end product. Such possibility may also prove useful in overcoming the present economic difficulties faced by coffee processing industry. The presence of around 6.5% pectin in coffee pulp on dry basis (Pulgarin et al. 1991) and its moist solid nature allows such possibility, as pectinase is an inducible enzyme, which requires pectin as an inducer (Fogarty and Kelly 1983). The use of coffee pulp as a substrate for pectinase production may also lead to economy in the enzyme production, as isolated pectin is a rather costly chemical. In addition, pectinases also

find extensive applications in fruit processing industries for clarification of fruit juices and wines, in the manufacture of pectin-free starch and in the curing of cocoa and tobacco (Ghildyal et al. 1981; Joshi et al. 1991). It has been estimated that the pectinase market for various kinds of industrial processes is about 165 million pounds per annum (Fogarty and Kelly 1983).

It is worth mentioning that SSF system is preferred for production of pectinases due to a number of beneficial reasons (Ghildyal et al. 1981). Production of pectinase by SSF of wheat bran has been studied extensively in India (Ghildyal et al. 1981). It has been earlier reported that the pectinase productivity by SSF is much higher than that in submerged fermentation (SmF) process (Treglo-Hernandez et al. 1991). These facts justify the selection of SSF technique in the present studies.

Screening of large number of microorganisms is an important step in selecting a highly potent culture for developing efficient fermentation process. It, however, is highly time-and resource-consuming. A simple and rapid screening method will be of high utility. Since no such method is available, the present three-step approach has been designed by us for screening of potent pectolytic cultures.

The objectives of the present investigations, therefore, were to test the potential of using coffee pulp for production of pectinase in SSF system and to evaluate the efficiency of three-step approach for rapid screening of wild fungal isolates as well as selection of the potent strain.

Materials and Methods

Microorganisms : A total of 248 fungal cultures were isolated directly from coffee plants and the soil samples from coffee plantation areas in Mexico, as reported elsewhere (Aguilual et al. 1988). A pectolytic strain of *Aspergillus niger* CH 4, which is used as a reference culture, was provided by Dr Carlos Huiltron, Department Biotechnology, Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM, Mexico, and it was isolated from agave pulp (Saval et al. 1981). All these cultures were maintained on potato-dextrose-agar (PDA) slants at 4°C by subculturing every alternate month in the ORSTOM-UAM collection, ORSTOM, Montpellier, France. For inoculum development, the cultures were grown on PDA slants at 25°C or 35°C for 96 h and the conidia were dispersed in 0.01% Tween 80 solution. All the experiments were carried out in quadruplicate.

First-step screening technique : Agar medium, designated as medium I, was used and it contained (g/l) : pectin citrate 2.0, urea 0.05, ammonium sulphate 0.15, agar 20.0 and distilled water 1000. The pH of the medium was adjusted to 5.5 and it was autoclaved at 121°C for 15 min in 4 Erlenmeyer flasks of 500 ml capacity. The medium was allowed to cool to about 55°C, poured in 16 ml quantity in sterilized petri dishes and allowed to solidify. The medium in plates was streaked with the test cultures and the plates were incubated at 25°C and 35°C for 72 h.

At the end of the incubation, the diam of the hydrolyzed zone of pectate around the colony was measured, as an indicator of the pectinase activity (Antler et al. 1992). This activity was measured through a coefficient called A'. It represents % higher activity with respect to A. niger CH 4 (reference culture) and is defined as below :

$$A' = (H/C) - (H/C_0)/H/C_0$$

Where A' = coefficient of pectolysis; H = pectolysis zone diam of wild strain; C = growth diam of A. niger strain; Hc = pectolytic zone diam of A. niger CH 4; Cc = growth diam of A. niger CH 4.

The A' value of the reference strain was taken as zero. As a confirmative test and also to determine the apical growth, the selected isolates (13 Nos) were grown on the agar medium to note their apical growth, in comparison with the reference culture.

Second-step selection technique : A liquid medium, designated as medium II, was used. For its preparation, 50% of pectin citrate solution was pasteurized twice at 70°C for 30 min. In addition, stock solution of urea (5%) was sterilized by membrane filtration. Both the solutions were mixed to contain a final composition, consisting of 20 g pectin citrate and 0.5 g urea in 1 l medium. The pH of the mixture was adjusted to 5.8 with 1 N NaOH. The medium was, then, inoculated at a rate of 2×10^7 spores/ml medium, using the spore suspension from freshly grown PDA slants. The flasks were incubated at 25°C or 35°C (depending upon the results of the first-step screening technique) for 40 h on rotary shaker (220 rpm). At the end of incubation period, the culture broth was filtered through Whatman No. 1 filter paper to obtain cell-free liquor for assay of the enzyme by viscosity reduction method (Ghildyal et al. 1981). Pectinase activity was determined by using 18 ml of the culture filtrate in a Brookfield R. V. rotational viscometer at 45°C for 10 min. The substrate used was 1 ml of 2% pectin solution prepared in

0.1 M citrate-phosphate buffer (pH 5.5). One enzyme unit (U) was defined as the amount of the enzyme necessary to reduce the initial viscosity by 50%.

Third-step final selection technique: Coffee pulp-based solid state fermentation medium, designated as medium III, was used. It consisted of 34 g dry coffee pulp, 0.8 g urea, 3.3 g ammonium sulphate and 30 ml distilled water. Thoroughly mixed medium was autoclaved at 121°C for 20 min, as described elsewhere (Raimbault and Alazard 1980). After cooling to ambient temperature, it was inoculated with the spore suspension at a rate of 2×10^7 spores/g dry coffee pulp. The inoculated medium was packed in 2.0 cm diam and 15 cm long glass column fermenters, which were placed in a temperature controlled water bath (Raimbault and Alazard 1980). Humidified air, at the rate of 60 ml/min was passed through each column. The fermentation was carried out at 25°C or 35°C, based on the requirement of the culture under study. For extraction of the enzyme from moist fermented solids, 30 g portion of the fermented material was mixed with 30 ml of water and pressed in hydraulic press for 2 min at 1000 psi (Roussos et al. 1989). The extract, thus obtained, was filtered and used for enzyme assay, as per the methodology described above.

Statistical analysis: All the experiments were conducted in quadruplicate and the significance of data was tested by the analysis of variance (Snedecor and Cochran 1968).

Results and Discussion

Fungal isolates: Work on isolation of fungal cultures for their ability to grow on coffee pulp was undertaken earlier, with a view to isolate wild fungi capable of degrading organic matter and caffeine, with a view to reduce the pollution potential of the treated coffee pulp. A novel isolation strategy was designed for this purpose and is described elsewhere (Aguahual et al. 1988). It resulted in isolation of 248 wild fungi and the success of the strategy can be judged by the fact that it yielded a few cultures which were able to completely degrade caffeine in coffee pulp under SSF technique (Aguahual et al. 1988). Morphological study of these 248 isolates permitted to group them in ten different filamentous genera viz., *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* and *Zygomycetes* (Roussos et al. 1989). These isolates have been screened in the present studies to select the potent fungi, capable of producing pectinase in moist coffee pulp medium in SSF system.

Result of first-step screening programme: Data on the growth and enzyme production of the isolates on pectin-containing agar medium are summarized in Table 1. Out of 248 wild fungal isolates screened, 5% did not grow ($CI = 0$) on this selective medium. This might be due to the absence of pectolytic enzyme system in these isolates, which otherwise, is essential for growth on this medium, because of the use of pectin citrate as sole carbon source.

TABLE 1. SCREENING OF 248 WILD FUNGAL ISOLATES IN FIRST-STEP SCREENING TECHNIQUE INVOLVING CULTURING ON SELECTIVE AGAR MEDIUM IN PETRI DISHES

Airborne	Wild fungal isolates	
Growth	Number	Approximate % of total isolates screened
$CI = 0$	12	5
$HI/CI = 1$	117	47
$HI/CI > 1$	119	48
Coefficient of pectolysis, A'		
$A' < 0$	97	39
$A' = 0$	9	4
$A' > 0$	13	5

source. Further, 47% of the total strains screened were able to grow on this selective medium, but they did not produce any visible pectin hydrolysis zone ($HI/CI = 1$). Such behaviour is attributed to the ability of these isolates to use pectin citrate as a sole source of carbon to produce pectolytic enzymes, albeit at extremely poor levels. The remaining isolates (48%) grew profusely and produced a clear zone of pectolysis ($HI/CI > 1$). Among these good pectolytic enzyme producing isolates, the coefficient of pectolysis (A') values were < 0 , in case of 97 isolates (39% of total isolates screened). The value of these cultures for industrial exploitation was, therefore, ruled out in comparison with the reference culture. A total of 9 isolates showed the coefficient of pectolysis values, which were equal to those of the reference strain ($A' = 0$) and these cultures, therefore, do not offer any advantage over the reference culture. In contrast, 13 isolates showed the coefficient of pectolysis values, which were > 0 , thereby indicating their better pectolytic abilities, as compared to the reference culture.

It is, thus, evident that the strategy used for first-step screening programme proved highly efficient, as it was able to select a group of better enzyme producers, which amounted to merely 5.2% of the total isolates, for further studies. Rest of the 94.8% isolates were eliminated by the strategy, based on their worth, as compared to the reference

culture. The strategy is also quicker, simple and much less laborious, as compared to the conventional screening methods.

The selected isolates (13 Nos) were found to belong to two fungal genera (Table 2): *Aspergillus* (7 isolates) and *Penicillium* (6 isolates). These genera of filamentous fungi have been also reported to produce pectolytic enzymes (Fogarty and Kelly

TABLE 2. GROUPING OF 13 ISOLATES, SELECTED AFTER FIRST-STEP SCREENING TECHNIQUE, AND THEIR APICAL GROWTH AS COMPARED WITH REFERENCE CULTURE (*A. niger* CH 4)

Strain No.	Genus/Species	Apical growth as compared to reference culture
V 18 A 25	<i>Penicillium</i> sp	Inferior
V 23 A 25	<i>Penicillium</i> sp	Inferior
V 34 A 25	<i>Penicillium</i> sp	Inferior
C 14 A 25	<i>Penicillium</i> sp	Inferior
C 16 A 25	<i>Aspergillus niger</i>	Superior
V 13 A 35	<i>Aspergillus niger</i>	Equal
V 22 B 35	<i>Aspergillus niger</i>	Equal
V 23 B 35	<i>Aspergillus niger</i>	Equal
C 15 C 25	<i>Penicillium</i> sp	Inferior
C 16 C 25	<i>Aspergillus niger</i>	Equal
C 17 B 25	<i>Penicillium</i> sp	Inferior
C 26 B 25	<i>Aspergillus niger</i>	Superior

1983). When the apical growths of these selected 13 strains were compared to the reference culture, it was found that only two isolates (*A. niger* C 28 B 25 and C 16 A 25) colonised the solid surface more rapidly and better than that by the reference culture (Table 2). These characteristics are of importance in industrial fermentation, as the economy of the process is determined, to a large extent, by the batch time.

Results of the second-step selection technique: A total of 13 strains, selected after first-step screening programme, were further studied in liquid medium containing 2% pectin citrate under SSF for specific reasons. For example, the viscosity of the liquid medium will decrease significantly during growth of the selected culture, due to hydrolysis of pectin. Such decrease in viscosity by the selected isolates can be compared with that by the reference culture, with a view to select one or two cultures, which are most potent. The results of such studies indicated that only four isolates (three isolates of *A. niger*: C 16 C 25, C 28 B 25, V 22 B 35 and one isolate of *Penicillium* sp.: C 15 B 25) displayed a significant decrease in viscosity of the medium, than that by the reference culture (Table 3). Among these four isolates, the

TABLE 3. ABILITY OF THE SELECTED 13 WILD FUNGAL ISOLATES TO REDUCE THE VISCOSITY OF LIQUID MEDIUM SUBSTRATE DURING SECOND-STEP SELECTION TECHNIQUE

Genus/Species	Comparative pectolytic activity*	Comparative difference in final pH**	Classified in final pH**
<i>Aspergillus niger</i>			
V 22 B 35	$+1 \pm 0.17$	0.3	1
C 28 B 35	$+1 \pm 0.15$	0.1	2
C 15 C 25	0 ± 0.17	0.3	3
V 17 B 25	0 ± 0.14	0.1	4
V 32 B 25	-0.5 ± 0.17	0	6
V 12 A 35	-6.0 ± 0.13	-1.0	10
<i>Penicillium</i> sp			
C 15 B 25	0 ± 0.14	0.1	4
C 15 C 25	-0.5 ± 0.14	0	5
C 16 A 25	-1.0 ± 0.15	0	7
V 34 A 25	-1.0 ± 0.14	0	7
V 23 A 25	-1.5 ± 0.15	-0.3	8
V 16 A 25	-2.0 ± 0.15	-0.6	9
V 14 A 25	-84.0 ± 0.11	-4.0	11

* Values reported are units produced by the strain under studies (1) units produced by the reference strain. ** Values represent the differences in final pH of the strain under studies (1) that by the reference strain. ** The strains are classified based on their performance as compared to the reference strain. Class 1 strain scored highest difference and thus is most potent. Greater reduction in viscosity was given by two strains of *A. niger* i.e. V 22 B 35 and C 28 B 25 (Table 3).

Though the second-step selection technique allows efficient and reliable selection of two isolates (*A. niger* V 22 B 35 and C 28 B 35) as most potent cultures among the whole of 248 isolates screened, all the four isolates, which gave significant decreases in the viscosity of the medium, as compared to the reference culture, were selected for third step final selection technique. This was done by keeping in view the recent report that the cultures, which are the best producers of the metabolite in SSF are usually not efficient, when used in SSF and vice versa (Shankararaj et al. 1992). It was, thus, possible to eliminate more than 98% of the 248 isolates and zeroed down on selected four cultures in a most efficient way at the end of second-step screening, due to the screening strategy employed in the present studies.

Results of third-step final selection technique: The data in Table 4 give the comparative production of pectolytic enzyme at 72 h in coffee pulp medium under SSF technique by the four filamentous fungi, selected after second-step selection technique. It is evident that all the four wild fungal isolates studied were able to produce more pectolytic enzyme than

TABLE 4. ABILITY OF FOUR WILD FUNGAL ISOLATES, SELECTED AFTER SECOND-STEP SELECTION TECHNIQUE, TO PRODUCE PECTINOLYTIC ENZYME AT 72 h IN COFFEE PULP MEDIUM UNDER SOLID STATE FERMENTATION, AS COMPARED TO THE REFERENCE CULTURE (*A. niger* CH 4)

Culture	Pectinolytic activity in coffee pulp medium under SSP at 72 h
<i>A. niger</i> CH 4 (Reference culture)	12.1 ± 0.3
<i>Penicillium</i> sp. C 15 B 25	14.9 ± 0.4
<i>A. niger</i> C 16 C 25	20.5 ± 0.5
<i>A. niger</i> C 28 B 25	43.3 ± 1.1
<i>A. niger</i> V 22 B 35	47.7 ± 1.2

the reference culture (*A. niger* CH 4). The highest enzyme production was shown by *A. niger* V 22 B 35, followed by the strains C 28 B 25 and C 16 C 25, in decreasing order. The enzyme production by *Penicillium* sp. C 15 B 25 was slightly higher than that by the reference culture. The enzyme production by *A. niger* V 22 B 35 was about 4 times higher than that by the reference culture. It, therefore, has most potential for industrial exploitation.

The trend of data allows to infer that the three-step screening strategy used is most suitable for screening a large number of isolates in a simple, reliable and quick manner. The isolate selected was subsequently mutated to obtain pectinase hyper-producing mutants (Antier et al. 1992), which is being profitably used currently in the coffee curing industry (Roussos et al. 1993).

References

- Antier P, Mitjares A, Roussos S, Raimbault M, Viniegra-Gonzalez G (1992) Pectinase hyper-producing mutants of *Aspergillus niger* C 28 B 35 for solid state fermentation of coffee pulp. *Enzyme Microb Technol* 15:254-260
- Aquilar MA, Raimbault M, Roussos S, Trejo MR (1988) Coffee pulp detoxification by solid state fermentation: Isolation, identification and physiological studies. In: Raimbault M (ed) *Proceedings of the Seminar on Solid State Fermentation, Bioconversion of Agro-Industrial Raw Materials*. ORSTOM, Montpellier, France, pp. 13-26
- Forster WM, Kelly CT (1985) Pectic enzymes. In: *Proteolytic and Microbial Enzymes and Biotechnology*. Applied Science Publishers, London, pp. 131-182
- Guichard JP, Raimbault M, Trejo M, Viniegra-Gonzalez G, Antier P, Roussos S, Lecomte SV, Adamakis D, Lonsane BK, Athanas HN (1981) Large scale production of pectinase enzyme by solid state fermentation. *J Food Sci Technol* 19: 248-251
- Joishi VK, Chaudhan SK, Lal BB (1989) Extraction of pectin from peaches, plums and apricots by pectinolytic treatment. *J Food Sci Technol* 28: 64-65
- Martinez-Carrera D, Morales P, Sobal M (1989) Production de hongres comestibles sobre pulpa de café a nivel comercial. In: Roussos S, Lecomte SV, Guiterres Rojas M (ed) *Proceedings of I Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Calcahena (SIBAC)*, Xalapa, Mexico. ORSTOM, Montpellier, France, pp. 177-184
- Pulgarin C, Schwitzgubel JP, Tabacchi R (1991) Comment blanchir les résidus du café noir. *Biofutur* 6:43-50
- Raimbault M, Abazard D (1980) Culture method to study fungal growth in solid state fermentation. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 8:198-209
- Roussos S, Aquilar MA, Casagrande J, Favela E, Guiterres M, Hannibal L, Huerta S, Nava O, Raimbault M, Rodríguez W, Salas JA, Sanchez R, Trejo M, Viniegra-Gonzalez G (1989) Detoxification de la pulpa de café por fermentación sólida. In: Roussos S, Lecomte SV, Guiterres Rojas M (ed) *Proceedings of I Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Calcahena (SIBAC)*, Xalapa, Mexico. ORSTOM, Montpellier, France, pp. 121-143
- Roussos S, Raimbault M, Saucedo-Castaneda C, Lonsane BK (1992) Efficient leaching of cellulases produced by *Trichoderma harzianum* in solid state fermentation. *Biotecnol Techniques* 6:439-433
- Saval S, Solomano RM, Alpiar L, Coa A, Hultrom C (1981) Production de pectinases microbianas a partir de la pulpa de henequen. In: Hultrom C (ed) *Proceedings of the Primer Simposio Interamericano Sobre Biotecnología de Enzimas*, UNAM, Mexico City, pp. 203-215
- Shankarand VS, Ramiah MV, Lonsane BK (1992) Microencapsules of solid state fermentation systems in the biosynthesis of metabolites by some bacterial and fungal cultures. *Process Biochem* 27:33-38
- Snedecor GW, Cochran WO (1989) *Statistical Methods*, 6th ed. Oxford and IGH Publishing Co., Calcutta
- Trejo-Hernandez MR, Oval E, Lopez-Canales A, Roussos S, Viniegra-Gonzalez G, Raimbault M (1991) Production de pectinases de *Aspergillus niger* por fermentación sólida sobre asperos. *Revista Neotrop Apl* 4:49-53
- Zuniga-Vasquez J (1989) Utilización integral de los subproductos del café. In: Roussos S, Lecomte SV, Guiterres Rojas M (ed) *Proceedings of I Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Calcahena (SIBAC)*, Xalapa, Mexico. ORSTOM, Montpellier, France, pp. 63-76

Received 6 March 1992; revised 14 June 1993; accepted 14 June 1993



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-029088- -00001-0000

Fecha: 2008-12-29 17:10:04 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 400 OPOSIOBSERVTER Folios: 49

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 101,241
FECHA : DICIEMBRE 29 DE 2008

==== CONSIGNACION ====

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISSEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	14443995	29/12/2008	75,000.00

==== CONCEPTO ====

CANT. HISTORICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-08 PRORROGA DE TERMINOS	31 PRORROGA DE TERMINOS	75,000.00
	TOTAL :	5 75,000.00

SON: SETENTA Y CINCO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

2020
Bogotá, D.C.,

Doctora:
Luisa Carolina Sabas Echavarría
Apoderada

Oficio-Nº: ~ 3904

ASUNTO:	Radicación N°	08-29088
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	440
	Folios	129

Con fundamento en lo previsto por el artículo 43 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que la oposición presentada por el doctor Carlos Reinaldo Olarte García, en su calidad de apoderado de la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia., reúne los requisitos formales exigidos por la ley al momento de su presentación.

En cumplimiento de lo dispuesto en la citada norma, se le concede el término de sesenta (60) días hábiles siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, para que haga valer sus argumentaciones y presente pruebas.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior oficio fue notificado por fijación en lista de fecha, 03 ABR. 2009.

202021