



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

1 de 1

Neiva, 14 de junio de 2017

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Ciudad

El (Los) suscrito(s):

Jairo Smith Triviño Pineda, con C.C. No. 1.077.870.231 de Garzón (H) y José Contreras García, con C.C. No. 1.082.154.792 de Pital (H), autor(es) de la tesis y/o trabajo de grado titulado "APLICACIÓN DEL CONCEPTO DE BIORREFINERÍA A LOS RESIDUOS GENERADOS EN EL BENEFICIO HÚMEDO DEL CAFÉ" presentado y aprobado en el año 2017 como requisito para optar al título de Ingeniero Agrícola;

Autorizo (amos) al CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN de la Universidad Surcolombiana para que con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales "open access" y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.
- Permita la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia.
- Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, "Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores", los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma:

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma:

Vigilada Mineducación



TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO:

“APLICACIÓN DEL CONCEPTO DE BIORREFINERÍA A LOS RESIDUOS GENERADOS EN EL BENEFICIO HÚMEDO DEL CAFÉ”

AUTOR O AUTORES:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Triviño Pineda	Jairo Smith
Contreras García	José

DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Amorocho Cruz	Claudia Milena
Sánchez Ramírez	Javier Eduardo

ASESOR (ES):

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Gutiérrez Guzmán	Nelson
Castro Camacho	Jennifer Katiusca

PARA OPTAR AL TÍTULO DE: Ingeniero Agrícola

FACULTAD: Ingeniería

PROGRAMA O POSGRADO: Ingeniería Agrícola

CIUDAD: **AÑO DE PRESENTACIÓN:** **NÚMERO DE PÁGINAS:**

TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una X):

Diagramas___ Fotografías__x_ Grabaciones en discos___ Ilustraciones en general___ Grabados___
Láminas___ Litografías___ Mapas___ Música impresa___ Planos___ Retratos___ Sin ilustraciones___
Tablas o Cuadros_x_



SOFTWARE requerido y/o especializado para la lectura del documento:

MATERIAL ANEXO:

PREMIO O DISTINCIÓN (*En caso de ser LAUREADAS o Meritoria*):

PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:

Café, Pulpa de café, mucilago de café, bioetanol.

Coffee, Coffee pulp, coffee mucilage, bioethanol.

RESUMEN DEL CONTENIDO: (Máximo 250 palabras)

El estudio llevado a cabo en este trabajo permitió aplicar el concepto de Biorrefinería para el tratamiento de los residuos generados en el beneficio húmedo del café (pulpa y mucílago). Este concepto permite dar un valor agregado a estos residuos, ya que es posible obtener compuestos de valor añadido como el biogás o el bioetanol.

Uno de los objetivos principales en este estudio es determinar la producción potencial de bioetanol y de biogás a partir de los residuos generados en el beneficio húmedo del café, mediante la aplicación de procesos biotecnológicos como la fermentación. Con el fin de determinar los rendimientos del proceso se realizó un seguimiento microbiológico a estos residuos y un posterior análisis económico de la tecnología planteada.

Durante el estudio se realizaron varios ensayos empleando pulpa y mucilago. Los ensayos realizados mostraron grandes variaciones en cuanto a tiempo y estabilización de los grados Brix, estos ensayos permitieron realizar ajustes importantes en los parámetros del proyecto definitivo; además, los resultados obtenidos permitieron determinar que el tiempo de fermentación es importante ya que depende de la hidrólisis de la biomasa, el consumo de los azúcares presentes y disponibles para la conversión a bioetanol. Trabajar con tiempos de fermentación más cortos, biomasa parcialmente hidrolizada (Trituración previa) permite maximizar la producción de bioetanol y controlar mejor el proceso fermentativo.

La materia prima (pulpa y mucilago) utilizada en este estudio se obtuvo del beneficio vía húmeda de café variedad Castillo, de este proceso se obtuvieron 15 kilogramos de Pulpa obtenida en la etapa de despulpado y 15 litros de Mucilago el cual se extrajo con el equipo desmucilagador mecánico. En este estudio se realizaron 4 tratamientos empleando pulpa y mucilago como sustrato en el proceso fermentativo. A continuación se describen los ensayos realizados: tratamiento 1: Pulpa (P) con 4 kilogramos de Pulpa diluida en 1 litro de agua destilada; tratamiento 2: Mucilago (M) 5 litros de Mucilago; tratamiento 3: Pulpa triturada con levadura (PL) y tratamiento 4: Mucilago con levadura (T4). En todos los ensayos se realizaron pruebas físico-químicas y microbiológicas con el fin de monitorear los cambios en el proceso y determinar el estado del mismo.

Durante el trabajo desarrollado se midieron diversos parámetros tales como el pH, °Brix, acidez titular, color, sólidos solubles y sólidos volátiles siguiendo los métodos, AOAC y Standard Methods para cada uno de los



ensayos que permitieron en todo momento conocer el estado del proceso. En general se pudo observar que en todos los tratamientos, el pH tiende a disminuir debido a la producción de ácidos de cadena corta y por consiguiente la acidez tiende a aumentar, este cambio puede beneficiar o evitar el crecimiento de levaduras, pues éstas son las encargadas de la fermentación y por ende la degradación de azúcares presentes. Debido a esto, se evidenció que a medida que se aumenta el tiempo de fermentación la cantidad de grados Brix disminuye y al momento que se estabilizan indica la terminación del proceso fermentativo y sería el punto de máxima producción de bioetanol. Paralelo a esto se realizó un monitoreo a la evolución del color para lo cual se empleó el método de colorimetría que usa coordenadas $L^* a^* b^*$.

El seguimiento microbiológico del proceso mediante el análisis del cultivo permitió determinar de manera efectiva el crecimiento de microorganismos durante la fermentación, lo cual indica que se lleva un buen proceso, para la posterior obtención y producción de bioetanol pues esta se lleva a cabo por levaduras. El crecimiento de estos organismos presenta dos fases claramente definidas, la primera es exponencial debido al máximo consumo de sustrato y la segunda de muerte (Lisis) indicando una terminación del sustrato disponible y el cese de la actividad microbiológica. Una vez se ha agotado el sustrato el proceso entra en una fase endógena o de hambre.

Cuando el proceso fermentativo culmina, es decir los °Brix se han estabilizado, se separó la fracción líquida y se sometió a un proceso de destilación simple a una temperatura entre 78 a 80 ° C para la obtención del bioetanol.

También, se evaluó teóricamente la producción de biogás en un proceso de digestión anaerobia utilizando las vinazas obtenidas después del proceso de fermentación cuyo contenido en materia orgánica es elevado.

ABSTRACT: (Máximo 250 palabras)

The study carried out in this work allowed the application of the concept of biorefinery for the treatment of residues generated in the wet coffee (pulp and mucilage) benefit. This concept gives added value to these wastes, as it is possible to obtain added value compounds such as biogas or bioethanol.

One of the main objectives in this study is to determine the potential production of bioethanol and biogas from residues generated in the coffee benefit, through the application of biotechnological processes such as fermentation. In order to determine the processes of the process, a microbiological follow-up of these residues and a subsequent economic analysis of the technology were carried out.

During the study several tests were carried out using pulp and mucilage. The tests showed large variations in the time and the stabilization of the Brix grades, these tests allowed to make important adjustments in the parameters of the definitive project; In addition, the results obtained allowed to determine that the fermentation time is important and depends on the hydrolysis of the biomass, the consumption of the sugars present and available for the conversion of a bioethanol. Working with shorter fermentation times, hydrolyzed partial biomass (previous shredding) allows to maximize bioethanol production and better control the fermentation process.

The raw material (pulp and mucilage) used in this study obtained the benefit via the coffee cup. The castle, from this process was obtained 15 kilograms of pulp obtained in the pulping stage and 15 liters of mucilage which was extracted with The machine Mechanical demountable. In this study, 4 treatments were performed using pulp and mucilage as a substrate in the fermentation process. The following tests are described: treatment 1: Pulp (P) with 4 kg of Pulp diluted in 1 liter of distilled water; Treatment 2: mucilage (M) 5 liters of mucilage; Treatment 3: Yeast crushed pulp (PL) and treatment 4: Mucilage with yeast (T4). In all the tests



chemical-chemical and microbiological tests were carried out to monitor the changes in the process and determine the condition.

During the work developed several parameters were measured, such as pH, brix, titrant acidity, color, solid solids and volatile solids following the methods, AOAC and standard methods for each of the tests that allowed to know the state of the process at all times. In general, it can be observed that in all treatments, the pH tends to decrease due to the production of short chain acids and because the acidity tends to increase, this change can benefit or avoid the growth of the yeast, since these are the ones in charge Of fermentation and the effort for the degradation of sugars present. Due to this, it is evident that a measure that increases the fermentation time of the amount of Brix degrees decreases and it is time that the fermentation process termination and the serious point of production of bioethanol is stabilized. Parallel to this a monitoring of the color evolution was carried out for which the colorimetric method was used as the coordinates of the USA L * a * b *.

The microbiological monitoring of the process in the analysis of the crop allowed to effectively determine the growth of microorganisms during fermentation, which indicates that it takes a good process, for the subsequent production and production of bioethanol so this leads a yeast. The growth of these organisms presents two clearly defined phases, the first one being exponential due to the maximum consumption of substrate and the second of death (Lysis) indicating a termination of the available substrate and the cessation of the microbiological activity. Once the substrate has run out the process enters an endogenous or starving phase.

When the fertile process culminates, is the ° Brix has stabilized, the liquid fraction was separated and subjected to a simple distillation process at a temperature between 78 to 80 ° C to obtain the bioethanol.

Also, the biogas production was theoretically evaluated in an anaerobic digestion process using the vinasse obtained after the fermentation process with high organic matter content.

APROBACION DE LA TESIS

Nombre Presidente Jurado: Claudia Milena Amorcho Cruz

Firma:

Nombre Jurado: NELSON GUINER

Firma:

Nombre Jurado: Jennifer Katusca Castro C.

Firma:

**APLICACIÓN DEL CONCEPTO DE BIORREFINERÍA A LOS RESIDUOS
GENERADOS EN EL BENEFICIO HÚMEDO DEL CAFÉ**

**JAIRO SMITH TRIVIÑO PINEDA
JOSÉ CONTRERAS GARCÍA**

**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE INGENIERÍA
PROGRAMA INGENIERÍA AGRÍCOLA
GARZÓN - HUILA**

2017

**APLICACIÓN DEL CONCEPTO DE BIORREFINERÍA A LOS RESIDUOS
GENERADOS EN EL BENEFICIO HÚMEDO DEL CAFÉ**

**JAIRO SMITH TRIVIÑO PINEDA
JOSÉ CONTRERAS GARCÍA**

**Trabajo de grado que se presenta como requisito parcial para optar el título
de Ingeniero Agrícola**

Directora

**Ph.D. CLAUDIA MILENA AMOROCHO CRUZ
Docente del programa de Ingeniería Agrícola**

Codirector

Ph.D. JAVIER EDUARDO SANCHEZ RAMIREZ

Investigador externo

Depto. de I+D Depuración de Aguas del Mediterráneo (DAM)

Valencia-España

**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE INGENIERÍA
PROGRAMA INGENIERÍA AGRÍCOLA
GARZÓN - HUILA**

2017

Nota de aceptación

Firma presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Agradezco a Dios por permitirme vivir este momento en el cual se refleja todo el esfuerzo y dedicación que he tenido a lo largo de mi carrera profesional. A mis padres Jairo Triviño Calderón y Maber Pineda Méndez que con su amor y apoyo me han formado e inculcado los valores de disciplina y respeto y que con constante sacrificio me forjaron el camino para seguir adelante.

A mis abuelos por su amor y entrega y poder contar con una familia tan valiosa y unida.

A la Doctora Claudia Milena Amorocho Cruz, Directora de tesis, por su conocimiento, a todo el apoyo que estuvo en sus manos, su tiempo, paciencia, orientación, consejos, su fe en mí, el cariño que siento y múltiples valores.

Al Doctor Javier Eduardo Sánchez Ramírez, Co-director de tesis, por su calidez, consejo, asesorías, conceptos, confianza y por todo el apoyo brindado.

A todos los compañeros y amigos de Cesurcafé y en especial a Erika Tatiana Cortes, Wilmer ladino, Dayana Blanco, Diana Medina, Ricardo Bernal, Bryan Leal, Marcos Ramírez, Jeison, Andrés Bahamon y Daniel Castro y a todos los profesores como Nelson Gutiérrez Guzmán, Joel Girón Hernández y Bertulfo Delgado Joven y Jennifer Katusca demás que me apoyaron de manera directa o indirecta en la ejecución de la presente investigación.

A mis compañeros de la sede Garzón que confiaron en mis capacidades y me dieron una voz de aliento y de una u otra manera hicieron posible alcanzar esta meta.

JAIRO SMITH TRIVIÑO PINEDA

El presente proyecto de investigación se lo dedico especialmente a Dios, por darme la oportunidad de cumplir uno de mis más grandes sueños.

A mi madre Marie Evangelista García Median, por ser el motor de mi vida, por su amor, comprensión y apoyo incondicional, por la dedicación en cada uno de los proyectos que continuó emprendiendo. Mi agradecimiento hacia usted es infinito.

A mis hermanos, Carolina, Marcela, Jairo y Carlos (Q.E.P.D), por permitirme tomar lo mejor de cada una.

A mis abuelos (Q.E.P.D) por la constancia en mi vida, por su amor y entrega, por darme la posibilidad de contar con una familia tan valiosa y unida.

A los profesores, Claudia Milena Amorocho, Nelson Gutiérrez Guzmán, Javier Eduardo Ramírez Sánchez, Joel Girón Hernández, Bertulfo Delgado Joven y Jennifer katusca por creer en mí, por todo lo que he aprendido y por la gran admiración y cariño que siento hacia cada uno.

A Lorena López, por hacer parte incondicional de los momentos más importantes de mi vida.

A mis amigos de universidad, sede Garzón, sede Neiva, por tantos momentos de sincera amistad.

A todas las personas que me alentaron durante el desarrollo del presente trabajo, especialmente a Wilmer ladino, Diana Medina, Carolina Buesaquillo, Ricardo Bernal, Natalia Quevedo, Andrés Bahamón, Daniel Castro, Dayana Blanco, Bryan Leal, Marco Ramírez, Andrés Escobar, Martha Ramírez, Jenny Delgado, Fabián Ramírez,

A cada una de las personas que de una u otra forma estuvieron allí a lo largo de la carrera, muchísimas gracias.

JOSE CONTRERAS GARCIA

AGRADECIMIENTOS

A nuestros padres por la dedicación y apoyo incondicional.

A la Universidad Surcolombiana por financiarnos y permitirnos realizar el proyecto.

Al centro Surcolombiano de investigación de café, Cesurcafé por la paciencia, apoyo, dedicación y por el voto de confianza.

A nuestra directora Claudia Milena Amorocho Cruz por brindarnos una idea en la cual pudiéramos realizar esta investigación y permitirnos culminar esta etapa.

Al Co-director Javier Eduardo Sánchez Ramírez por la paciencia, tiempo y dedicación brindada en todo el desarrollo de la tesis.

Los jurados Jennifer Katiusca Castro Camacho, Nelson Gutiérrez Guzmán y Sonia Echeverry Hernández por la revisión oportuna de nuestra investigación.

Y a todas las personas que de una u otra forma hicieron parte de este proyecto e hicieron posible alcanzar esta meta.

CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	17
2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	19
3. JUSTIFICACIÓN.....	20
4. OBJETIVOS.....	21
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	21
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
5. MARCO TEÓRICO.....	21
5.1. BIORREFINERÍA.....	22
5.2. CAFÉ.....	24
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
6.1. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE RECOLECCIÓN DE CAFÉ PARA EL ESTUDIO	
33	
6.1.1. Localización.....	33
6.1.2. Aspectos climáticos.....	33
6.2. TOMA Y ANÁLISIS DE LA MUESTRA.....	34
6.2.1. ENSAYO PRELIMINAR.....	34
6.2.1.1. Materia prima.....	34
6.2.1.2. Tratamientos.....	34
6.2.2. ENSAYO DE VERIFICACIÓN A MAYOR ESCALA.....	35
6.2.2.1. Materia prima.....	35
6.2.2.2. Tratamientos.....	35
6.3. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO.....	36
6.3.1. ENSAYO PRELIMINAR.....	36
6.3.2. ENSAYO DE VERIFICACIÓN A MAYOR ESCALA.....	36
6.3.2.1. pH.....	36
6.3.2.2. Sólidos disueltos.....	37
6.3.2.3. Acidez titulable.....	38
6.3.2.4. Color.....	38

6.3.2.5.	DQO total y DQO soluble.....	39
6.3.2.6.	Sólidos totales y sólidos volátiles.....	39
6.4.	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS	40
6.4.1.	Recuento de BAL (Bacterias Acido Lácticas)	40
6.4.2.	Recuento de levaduras	41
6.5.	FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.....	41
6.6.	DESTILACIÓN SIMPLE	41
7.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	42
8.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	43
8.1.	Caracterización de la biomasa.....	43
	ENSAYO PRELIMINAR CON PULPA Y MUCILAGO DE CAFÉ.....	43
	ENSAYO DE VERIFICACIÓN A MAYOR ESCALA CON PULPA Y MUCILAGO DE CAFÉ	45
8.2.	Ensayos de fermentación.....	47
	ENSAYO PRELIMINAR CON PULPA Y MUCILAGO DE CAFÉ.....	47
8.2.1.	pH	48
8.2.2.	Solidos disueltos.....	49
8.2.3.	Acidez.....	51
8.2.4.	Color	53
	ENSAYO DE VERIFICACIÓN A MAYOR ESCALA CON PULPA Y MUCILAGO DE CAFÉ	58
8.2.5.	pH	58
8.2.6.	Solidos disueltos.....	60
8.2.7.	Acidez.....	62
8.2.8.	Color	64
8.2.9.	DQO total y DQO soluble	68
8.2.10.	Solidos totales y solidos volátiles.....	69
8.2.11.	Análisis microbiológicos.....	71
8.2.12.	Recuento de BAL.....	71
8.2.13.	Recuento de levadura	73
8.3.	Destilación	75

ENSAYO PRELIMINAR CON PULPA Y MUCILAGO DE CAFÉ	75
ENSAYO DE VERIFICACIÓN A MAYOR ESCALA CON PULPA Y MUCILAGO DE CAFÉ	76
8.4. Bioetanol obtenido	76
ENSAYO PRELIMINAR CON PULPA Y MUCILAGO DE CAFÉ	76
ENSAYO DE VERIFICACIÓN A MAYOR ESCALA CON PULPA Y MUCILAGO DE CAFÉ	77
8.5. Biogás teórico.....	78
ENSAYO DE VERIFICACIÓN A MAYOR ESCALA CON PULPA Y MUCILAGO DE CAFÉ	78
8.6. Caracterización de las vinazas y tratamientos	79
ENSAYO PRELIMINAR CON PULPA Y MUCILAGO DE CAFÉ	79
ENSAYO DE VERIFICACIÓN A MAYOR ESCALA CON PULPA Y MUCILAGO DE CAFÉ	80
9. DIAGRAMA GENERAL DE LA BIORREFINERÍA A PARTIR DE RESIDUOS DEL CAFE	81
10. CONCLUSIONES	84
11. RECOMENDACIONES	86
BIBLIOGRAFÍA.....	87
ANEXOS	92

Índice de figuras

Figura 1: Consumo mundial de energía primaria.....	24
Figura 2: Planta de café en la etapa de floración y producción.....	25
Figura 3: Clasificación de las partes del café	26
Figura 4: Aplicaciones con el uso del biogás.....	30
Figura 5: Área de estudio. Municipio de Garzón en el Departamento del Huila.....	33
Figura 6: Montaje de fermentación anaerobia para Pulpa y Mucilago de café ensayo preliminar..	34
Figura 7: Montaje de fermentación anaerobia para Pulpa y Mucilago de café, ensayo de verificación a gran escala	36
Figura 8: Equipo de medición de pH	37
Figura 9: Medición del parámetro de °Brix	37
Figura 10: Montaje de acidez titulable.....	38
Figura 11: Equipo de medición de colorimétrico.....	38
Figura 12: Montaje en estufa a 105°C durante 24 horas	39
Figura 13: Montaje de filtrado para el tratamiento del mucilago	40
Figura 14: (a) Disposición cajas de Petri para siembra en profundidad, (b) Vertimiento de medio de cultivo solido.....	40
Figura 15: (a) Proceso de fermentación con Pulpa, (b) Proceso de fermentación con Mucilago	41
Figura 16: Montaje de destilación simple	42
Figura 17: Perfil de la evolución de pH con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación	48
Figura 18: Perfil de la evolución de pH con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación	49
Figura 19: Perfil de la evolución de °Brix de la pulpa con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación	50
Figura 20: Perfil de la evolución de °Brix del mucilago con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación	51
Figura 21: Perfil de la evolución de la acidez de la pulpa con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación	52
Figura 22: Graficas de la evolución de la acidez, para tratamiento de mucilago de café	53
Figura 23: Perfil de la evolución de la coordenada L del mucilago con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación	54
Figura 24: Perfil de la evolución de la coordenada a* del pulpa con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación	55
Figura 25: Perfil de la evolución de la coordenada L del mucilago con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación	56
Figura 26: Perfil de la evolución de la coordenada b* del mucilago con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación	57
Figura 27: Perfil de la evolución de pH de la pulpa con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación	59

Figura 28: Perfil de la evolución de pH del mucilago con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación	60
Figura 29: Perfil de la evolución de °Brix de la pulpa con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación	61
Figura 30: Perfil de la evolución de °Brix del mucilago con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación	62
Figura 31: Perfil de la evolución de acidez de la pulpa con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación	63
Figura 32: Perfil de la evolución de acidez del mucilago con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación	64
Figura 33: Perfil de la evolución de la coordenada L, para los tratamientos de pulpa con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación	64
Figura 34: Perfil de la evolución de la coordenada a*, para los tratamientos de pulpa con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación	65
Figura 35: Perfil de la evolución de la coordenada L, para los tratamientos de mucilago con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación	66
Figura 36: Perfil de la evolución de la coordenada b*, para los tratamientos de mucilago con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación	67
Figura 37 Perfil de la evolución de solidos solubles totales durante el proceso de fermentación para los tratamientos de mucilago con respecto al tiempo	70
Figura 38: Perfil de la evolución de solidos solubles volátiles durante el proceso de fermentación para los tratamientos de mucilago con respecto al tiempo	71
Figura 39: Recuento de bacterias acido lácticas durante el proceso de fermentación con la biomasa de pulpa de café.....	72
Figura 40: Recuento de bacterias acido lácticas durante en el proceso de fermentación de la biomasa del mucilago.....	73
Figura 41: Recuento de levaduras durante el proceso de fermentación con la biomasa de pulpa de café.....	74
Figura 42: Recuento de levaduras durante el proceso de fermentación de la biomasa de mucilago	75
Figura 43: Volumen de vinazas para el tratamiento con pulpa de café	80
Figura 443: Volumen de vinazas para el tratamiento del mucilago de café	81
Figura 45: Esquema general de una planta de biorrefinería de residuos industriales del beneficio húmedo del café	83

Índice de tablas

Tabla 1: Residuos obtenidos en el proceso de beneficio e industrialización de 1 kg de café cereza en Colombia.....	27
Tabla 2: Bioetanol obtenido por cada millón de sacos café verde producido.	30
Tabla 3: Capacidad calorífica de los subproductos del café.	31
Tabla 4: Tratamientos de la materia prima de Pulpa y Mucilago de café ensayo preliminar	35
Tabla 5: Tratamientos de la materia prima (Pulpa y Mucilago), ensayo de verificación a gran escala	35
Tabla 6: Caracterización con la pulpa de café	43
Tabla 7: caracterización con el mucilago de café	44
Tabla 8: caracterización de la pulpa a mayor escala.....	45
Tabla 9: caracterización del mucilago de café a mayor escala	46
Tabla 10: Valores de medias de los parámetros experimentales y cálculo de coordenadas CIELab, con respecto al tratamiento con pulpa de café en el ensayo preliminar.....	55
Tabla 11: Valores medias de los parámetros experimentales y cálculo de coordenadas CIELab, con respecto al tratamiento con mucilago de café para el ensayo preliminar.....	57
Tabla 12: Valores de medias de los parámetros experimentales y cálculo de coordenadas CIELab, con respecto al tratamiento con pulpa de café	66
Tabla 13: Valores de medias de los parámetros experimentales y cálculo de coordenadas CIELab, con respecto al tratamiento con mucilago de café	68
Tabla 14: Valores de medias del parámetro experimental DQO Total, con respecto al tratamiento de pulpa y mucilago de café	68
Tabla 15: Valores de medias del parámetro experimental solidos solubles totales y solidos solubles volátiles, con respecto al tratamiento de pulpa y mucilago de café	70
Tabla 16: Valores de volúmenes en el proceso de destilación con la biomasa de pulpa y pulpa triturada de café	75
Tabla 17: Valores de volúmenes en el proceso de destilación con la biomasa de pulpa de café	76
Tabla 18: Valores de volúmenes en el proceso de destilación con la biomasa de mucilago de café	76
Tabla 19: Bioetanol obtenido de la biomasa de pulpa y pulpa triturada de café.....	77
Tabla 20: Bioetanol obtenido de la biomasa de mucilago de café	77
Tabla 21: Bioetanol obtenido de la biomasa de pulpa de café.....	77
Tabla 22: Bioetanol obtenido con la biomasa de mucilago de café.....	78
Tabla 23: Resultado del cálculo de biogás teórico	79
Tabla 24: caracterización de las vinazas con pulpa y pulpa triturada de café.....	79
Tabla 25: caracterización de las vinazas del mucilago de café	79

RESUMEN

El estudio llevado a cabo en este trabajo permitió aplicar el concepto de Biorrefinería para el tratamiento de los residuos generados en el beneficio húmedo del café (pulpa y mucílago). Este concepto permite dar un valor agregado a estos residuos, ya que es posible obtener compuestos de valor añadido como el biogás o el bioetanol.

Uno de los objetivos principales en este estudio es determinar la producción potencial de bioetanol y de biogás a partir de los residuos generados en el beneficio húmedo del café, mediante la aplicación de procesos biotecnológicos como la fermentación. Con el fin de determinar los rendimientos del proceso se realizó un seguimiento microbiológico a estos residuos y un posterior análisis económico de la tecnología planteada.

Durante el estudio se realizaron varios ensayos empleando pulpa y mucílago. Los ensayos realizados mostraron grandes variaciones en cuanto a tiempo y estabilización de los grados Brix, estos ensayos permitieron realizar ajustes importantes en los parámetros del proyecto definitivo; además, los resultados obtenidos permitieron determinar que el tiempo de fermentación es importante ya que depende de la hidrólisis de la biomasa, el consumo de los azúcares presentes y disponibles para la conversión a bioetanol. Trabajar con tiempos de fermentación más cortos, biomasa parcialmente hidrolizada (Trituración previa) permite maximizar la producción de bioetanol y controlar mejor el proceso fermentativo.

La materia prima (pulpa y mucílago) utilizada en este estudio se obtuvo del beneficio vía húmeda de café variedad Castillo, de este proceso se obtuvieron 15 kilogramos de Pulpa obtenida en la etapa de despulpado y 15 litros de Mucílago el cual se extrajo con el equipo desmucilagador mecánico. En este estudio se realizaron 4 tratamientos empleando pulpa y mucílago como sustrato en el proceso fermentativo. A continuación se describen los ensayos realizados: tratamiento 1: Pulpa (P) con 4 kilogramos de Pulpa diluida en 1 litro de agua destilada; tratamiento 2: Mucílago (M) 5 litros de Mucílago; tratamiento 3: Pulpa triturada con levadura (PL) y tratamiento 4: Mucílago con levadura (T4). En todos los ensayos se realizaron pruebas físico-químicas y microbiológicas con el fin de monitorear los cambios en el proceso y determinar el estado del mismo.

Durante el trabajo desarrollado se midieron diversos parámetros tales como el pH, °Brix, acidez titular, color, sólidos solubles y sólidos volátiles siguiendo los

métodos, AOAC y Standard Methods para cada uno de los ensayos que permitieron en todo momento conocer el estado del proceso. En general se pudo observar que en todos los tratamientos, el pH tiende a disminuir debido a la producción de ácidos de cadena corta y por consiguiente la acidez tiende a aumentar, este cambio puede beneficiar o evitar el crecimiento de levaduras, pues éstas son las encargadas de la fermentación y por ende la degradación de azúcares presentes. Debido a esto, se evidenció que a medida que se aumenta el tiempo de fermentación la cantidad de grados Brix disminuye y al momento que se estabilizan indica la terminación del proceso fermentativo y sería el punto de máxima producción de bioetanol. Paralelo a esto se realizó un monitoreo a la evolución del color para lo cual se empleó el método de colorimetría que usa coordenadas $L^* a^* b^*$.

El seguimiento microbiológico del proceso mediante el análisis del cultivo permitió determinar de manera efectiva el crecimiento de microorganismos durante la fermentación, lo cual indica que se lleva un buen proceso, para la posterior obtención y producción de bioetanol pues esta se lleva a cabo por levaduras. El crecimiento de estos organismos presenta dos fases claramente definidas, la primera es exponencial debido al máximo consumo de sustrato y la segunda de muerte (Lisis) indicando una terminación del sustrato disponible y el cese de la actividad microbiológica. Una vez se ha agotado el sustrato el proceso entra en una fase endógena o de hambre.

Cuando el proceso fermentativo culmina, es decir los °Brix se han estabilizado, se separó la fracción líquida y se sometió a un proceso de destilación simple a una temperatura entre 78 a 80 ° C para la obtención del bioetanol.

También, se evaluó teóricamente la producción de biogás en un proceso de digestión anaerobia utilizando las vinazas obtenidas después del proceso de fermentación cuyo contenido en materia orgánica es elevado.

Finalmente, se analizó la viabilidad económica del proyecto mediante un balance económico del proceso planteado. La alternativa de tratamiento propuesta en este proyecto permite obtener 319.142 litros/día de bioetanol por cada 258ton de los residuos generados en el beneficio húmedo del café cereza, hecho que hace atractivo este proceso.

Palabras clave: Café, Pulpa de café, mucilago de café, bioetanol.

ABSTRACT

The study carried out in this work allowed the application of the concept of biorefinery for the treatment of residues generated in the wet coffee (pulp and mucilage) benefit. This concept gives added value to these wastes, as it is possible to obtain added value compounds such as biogas or bioethanol.

One of the main objectives in this study is to determine the potential production of bioethanol and biogas from residues generated in the coffee benefit, through the application of biotechnological processes such as fermentation. In order to determine the processes of the process, a microbiological follow-up of these residues and a subsequent economic analysis of the technology were carried out.

During the study several tests were carried out using pulp and mucilage. The tests showed large variations in the time and the stabilization of the Brix grades, these tests allowed to make important adjustments in the parameters of the definitive project; In addition, the results obtained allowed to determine that the fermentation time is important and depends on the hydrolysis of the biomass, the consumption of the sugars present and available for the conversion of a bioethanol. Working with shorter fermentation times, hydrolyzed partial biomass (previous shredding) allows to maximize bioethanol production and better control the fermentation process.

The raw material (pulp and mucilage) used in this study obtained the benefit via the coffee cup. The castle, from this process was obtained 15 kilograms of pulp obtained in the pulping stage and 15 liters of mucilage which was extracted with The machine Mechanical demountable. In this study, 4 treatments were performed using pulp and mucilage as a substrate in the fermentation process. The following tests are described: treatment 1: Pulp (P) with 4 kg of Pulp diluted in 1 liter of distilled water; Treatment 2: mucilage (M) 5 liters of mucilage; Treatment 3: Yeast crushed pulp (PL) and treatment 4: Mucilage with yeast (T4). In all the tests chemical-chemical and microbiological tests were carried out to monitor the changes in the process and determine the condition.

During the work developed several parameters were measured, such as pH, brix, titrant acidity, color, solid solids and volatile solids following the methods, AOAC

and standard methods for each of the tests that allowed to know the state of the process at all times. In general, it can be observed that in all treatments, the pH tends to decrease due to the production of short chain acids and because the acidity tends to increase, this change can benefit or avoid the growth of the yeast, since these are the ones in charge Of fermentation and the effort for the degradation of sugars present. Due to this, it is evident that a measure that increases the fermentation time of the amount of Brix degrees decreases and it is time that the fermentation process termination and the serious point of production of bioethanol is stabilized. Parallel to this a monitoring of the color evolution was carried out for which the colorimetric method was used as the coordinates of the USA L * a * b *.

The microbiological monitoring of the process in the analysis of the crop allowed to effectively determine the growth of microorganisms during fermentation, which indicates that it takes a good process, for the subsequent production and production of bioethanol so this leads a yeast. The growth of these organisms presents two clearly defined phases, the first one being exponential due to the maximum consumption of substrate and the second of death (Lysis) indicating a termination of the available substrate and the cessation of the microbiological activity. Once the substrate has run out the process enters an endogenous or starving phase.

When the fertile process culminates, is the ° Brix has stabilized, the liquid fraction was separated and subjected to a simple distillation process at a temperature between 78 to 80 ° C to obtain the bioethanol.

Also, the biogas production was theoretically evaluated in an anaerobic digestion process using the vinasse obtained after the fermentation process with high organic matter content.

Finally, the economic viability of the project was analyzed through an economic balance of the proposed process. The alternative treatment proposed in this project can get 319,142 liters / day of bioethanol per 258ton of the waste generated in the benefit of the coffee cherry, a fact that makes this process attractive.

Key words: Coffee, Coffee pulp, coffee mucilage, bioethanol.

1. INTRODUCCIÓN

El café es uno de los productos agrícolas de mayor importancia de producción en Colombia, ha sido reconocido mundialmente por la producción en calidad y en cantidad. En las fincas del sur del Huila se ha cultivado una variedad de los mejores café del mundo y han sido calificados por la prueba de la taza, como café de excelencia, este calificativo es otorgado por la organización que se encarga de premiar a los productores del mejor grano de café en Colombia y varios países de Latinoamérica. De este modo, el café del Huila es admirado y demandado por diversos países del mundo tales como: Japón, Italia, España y en general en Europa y Estados Unidos en donde el café del Huila se ha ganado cuatro premios desde el año 2005.

En la producción de café existen varias etapas que dependen del proceso empleado antes de obtener el grano final. Inicialmente el café recogido es llevado a la zona de beneficio en donde se encuentran dos métodos diferentes usados en el procesamiento del café: beneficio vía húmeda y vía seca. En Colombia, Costa Rica, Guatemala, México, El Salvador y algunos países del centro de África como Kenia, se beneficia el café por vía húmeda. Este proceso comprende las siguientes etapas: recolección, despulpado, remoción del mucilago, lavado y secado. El café Colombiano se ha categorizado como **suave lavado**, debido a que se obtiene de variedades de la especie *Coffea arabica*, café arábigo, y se procesa por vía húmeda (Brando, 2008; Puerta, 1996). En cambio en Brasil, Etiopia y Yemen predominan el procesamiento o beneficio por vía seca para el café tipo arábica y robusta. Este proceso de beneficio vía seca consta de menos etapas que el proceso por vía húmeda, pero se requiere de más tiempo hasta obtener la almendra de café tipo exportación, ya que el café cereza se seca directamente y luego se retira la cascara seca que comprende la pulpa, el mucilago y el pergamino (Clarke & Macrae, 1987; Illy & Viani, 1995; Brando, 2008).

En el proceso de beneficio por vía húmeda existe una etapa de despulpado donde mediante un proceso mecánico el fruto maduro es sometido a la eliminación de la pulpa (epicarpio). En esta etapa se obtienen como residuo la pulpa fresca.

La siguiente etapa es el desmucilaginado que es un proceso por el cual se desprende la mucosidad que se encuentra entre el grano y la cereza de café. En este proceso el residuo obtenido es el mucílago.

En el beneficio por vía húmeda se genera aproximadamente por cada 1 kilogramo de café cereza seca, cerca de 436 gramos de pulpa, que representa alrededor del 43.6% en base húmeda del peso del fruto fresco y 149 gramos de mucílago, que representa alrededor de 14.85% en base húmeda del peso del fruto fresco (Calle, 1977). Estos dos subproductos son considerados residuos con un alto valor

contaminante debido a la elevada cantidad de materia orgánica que suelen aportar a los medios receptores (Ríos, lagos etc.), siendo necesario su tratamiento o reutilización.

Actualmente hay preocupaciones sobre el uso de los recursos y los impactos generados en la transformación de los bienes y servicios, que están englobados dentro del concepto de la economía circular. Por esta razón se han realizado numerosos estudios sobre el uso y aprovechamiento de diversos residuos de origen agroalimentario a nivel mundial que permitan obtener mediante la aplicación de diversos tratamientos, subproductos con un valor añadido, dando solución a una problemática y generando beneficios ambientales y económicos.

Teniendo en cuenta que el departamento del Huila es el primer productor de café en Colombia, las cifras de producción de residuos son alarmantes. Se tiene en cuenta que la producción de café en los últimos años en la región del Huila supera el 1'500.000 sacos de café (60 kg) de forma paralela a la producción de estos residuos aumentando considerablemente; en dicho lugar no se ha implementado ningún tipo de tratamiento a estos residuos y por tanto, el impacto ambiental en las fuentes hídricas es bastante preocupante.

Una de las alternativas poco estudiadas hasta el momento para el tratamiento y reutilización de estos residuos, es la producción mediante procesos fermentativos de alcoholes comercialmente interesantes como el bioetanol o para la producción de biogás mediante procesos anaerobios que permite aprovechar este biogás para producir energía o calor. Las características físico-químicas del mucílago y la pulpa del café los hacen susceptibles de ser tratados mediante procesos biológicos e incorporarlos dentro de una serie de etapas para su aprovechamiento, todos estos procesos pueden integrarse dentro del concepto de Biorrefinería, utilizado actualmente a nivel mundial para la valorización de residuos.

2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

En las zonas cafeteras del departamento del Huila en especial el municipio de Garzón, los residuos obtenidos en la etapa del beneficio húmedo del café no son tratados, por lo cual en su mayoría son arrojados a las fuentes hídricas y en ocasiones utilizados como enmiendas agrícolas en los cultivos sin ningún tipo de control. Es bien sabido que estas prácticas pueden causar graves problemas de contaminación por lo que es necesario estudiar alternativas que permitan su tratamiento o aprovechamiento.

El estudio que se plantea en este trabajo consiste en analizar y determinar la viabilidad del tratamiento de estos residuos mediante procesos biotecnológicos de fermentación que permitan obtener subproductos de valor añadido tales como el bioetanol o el biogás. De igual forma el estudio propone despertar el interés en el aprovechamiento de esta biomasa que hasta el momento ha sido considerada como un residuo. Además, pretende marcar un precedente en la región para la valorización de los residuos procedentes de la industria agroalimentaria.

Los procesos planteados en este estudio pueden ser de gran interés y aportar soluciones medioambientalmente viables al sector agroalimentario y en especial al cafetero, enfocadas al tratamiento de los residuos generados en la producción de café. Actualmente existe un creciente interés en el estudio de energías alternativas a partir de biomasa y en especial de residuos.

3. JUSTIFICACIÓN

La Agencia Internacional de la Energía (AEI), en su informe 2006 sobre Perspectivas Energéticas en el Mundo, en su escenario de referencia para el año 2030, apunta a que la demanda total de energía va a superar a la actual en un 50% y que la participación de los combustibles fósiles prácticamente se va a mantener en los mismos niveles de hoy siendo necesario estudiar la utilización de otras fuentes de energía como la biomasa.

La biomasa es el resultado del crecimiento de organismos fotosintéticos que realizan la fijación del CO₂ atmosférico en forma de compuestos orgánicos y biopolímeros a expensas de la energía solar. Las biorrefinerías, al igual que ocurre con las refinerías de petróleo, consisten en una estructura enfocada hacia la producción de diversas formas de energía (entre las que se encuentran los combustibles) y productos químicos derivados, de modo que se parte de biomasa (residuos agrícolas, agroindustriales, residuos orgánicos municipales, etc.) en lugar de petróleo. El término 'Biorrefinería' supone la valorización, el fraccionamiento, o la extracción de varias fuentes de biomasa a través de procesos físicos, biológicos y químicos para la producción de diversos productos de alto valor económico para diversas industrias.

Es decir, actualmente la pulpa y el mucílago generados en el beneficio del café, son considerados y tratados como residuos. Desde este trabajo se pretende evaluar otro enfoque y estudiar el tratamiento de estos residuos aplicando un concepto nuevo "Biorrefinería" que permitirá proponer una solución o alternativa a una problemática ambiental y obtener subproductos con un alto valor añadido como el bioetanol y el biogás.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

- ✓ Estudiar el acoplamiento de diversos procesos dentro del concepto de Biorrefinería que permita el tratamiento de los residuos generados en el beneficio húmedo del café (Pulpa y Mucílago).

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterizar física, química y microbiológica los residuos a tratar: la pulpa y el mucilago obtenidos del proceso de beneficio húmedo del café.
- ✓ Estudiar el proceso de fermentación de estos residuos con el objetivo de obtener Bioetanol, mediante el uso de levaduras nativas y levaduras comerciales.
- ✓ Proponer un tratamiento de las vinazas generadas en la fermentación mediante digestión anaerobia para la obtención de biogás.

5. MARCO TEÓRICO

5.1. BIORREFINERÍA

En la mitad del siglo XIX, el petróleo empezó a surgir después de la extracción de la parafina o queroseno, en donde era un combustible más económico ya que solo se utilizaban como betún o impermeabilizante en los barcos, que posteriormente fue convertida en energía de alimento para las industrias y con una mejora en la tecnología para la extracción y en el refinado; el petróleo fue proporcionando sustancias combustibles cada vez más eficaces como la gasolina, gas, plásticos entre otros (García Laureiro, 2014). El siglo XX fue considerado el “BOOM expansivo y explosivo del petróleo”; la industria petroquímica creció rápidamente y miles de productos plásticos, químicos y farmacéuticos entre otros, fueron desarrollados a partir de los combustibles fósiles como los hidrocarburos (Gómez Millán, 2015).

Según (García Laureiro, 2014), existen dos tipos de biocombustibles de primera y de segunda generación; los de primera generación son los que dieron avances hacia el futuro como son los de materia orgánica fermentada, ya sea uva, caña de azúcar o cualquier otro origen. El responsable es el etanol, un alcohol que los seres humanos beben, pero si en vez de beberlo es destilado para purificarlo se obtiene bioetanol. Otro combustible es el biodiesel que puede ser obtenido a partir de aceites vegetales de girasol, soja, colza o palma. La segunda generación son más difíciles de obtener porque en lugar de utilizar la glucosa existente en el almidón de los frutos como el maíz, la soja, se obtiene a partir de materia vegetal no comestible como la madera o los residuos agrícolas. El inconveniente es que el material base es la celulosa una molécula muy difícil de romper, ni siquiera el sistema digestivo del hombre lo puede realizar. La celulosa compone la fibra que expulsa el ser humano sin digerir. Para romper la celulosa y recuperar la glucosa que la compone, hay que emplear ácidos y enzimas que encarecen notablemente el proceso. De ella se obtiene bioalcoholes que tienen ventajas como: no compiten con la producción de alimentos ya que no se extraen de las semillas sino de lo que sobra de la cosecha. Algunos como el “bio-oil” pueden obtenerse a partir de la transformación del carbono o del reciclado de neumáticos, plásticos y el petróleo estos son también “bio”, pero el petróleo no se recicla.

Las plantas de tratamiento de los residuos para un futuro tendrán que ser capaces de clasificar y tratar la biomasa de distintos orígenes y composición para obtener una variedad de productos mediante tratamientos químicos diferenciados; de aquí se habla entonces de una biorrefinería (García Laureiro, 2014); además de que el sentido de las biorrefinerías son las respuestas a los beneficios económicos, ambientales y sociales (Gómez Millán, 2015).

Este concepto de biorrefinería es reciente, tomado en diversos ámbitos como la agricultura, la industria de alimentos y la obtención de la materia prima. Se ha notado que muchos residuos son convertidos en una serie de productos, cada uno con una aplicación final diferente. La biorrefinería trata de potencializar en la no

utilización como materia prima o cultivos susceptibles de convertirse en alimentos sino por el contrario utilizar los residuos de la industria alimenticia, papeleras, forestales y agrícolas (Gómez Millán, 2015). Albert Einstein, estaba en lo correcto, “se puede convertir la materia en energía”.

La biorrefinería se caracteriza por transformar la biomasa en varios productos finales incluyendo bioenergía en forma de electricidad o calor, biocombustibles sólidos, líquidos como bioetanol o biodiesel, y compuestos gaseosos como biogás, entre otros productos (Pascual *et al.*, 2015).

En este sentido el desarrollo de la sociedad se ha basado en el aprovechamiento de fuentes energéticas de tipo primaria como el carbón, petróleo y gas natural. Su mal uso ha generado un deterioro ambiental en todos los ámbitos que si no se toman correctivos podemos llegar a niveles críticos. Hay evidencias claras de la degradación del ecosistema como son: el calentamiento global, la disminución de la capa de ozono y las lluvias ácidas; por esta razón y muchas otras se deben desarrollar tecnologías que permitan obtener otras fuentes de energía que sustituyan a las convencionales (Posso, 2004).

Actualmente el 84% del consumo total mundial de energía primaria proviene de los combustibles fósiles, sin embargo las reservas de petróleo y de gas natural se están agotando por lo que ha perdido protagonismo por sus fluctuaciones en sus precios y su constantes demandas en la economía mundial (pone muchas dificultades), los biocombustibles por el contrario poco a poco han ganado presencia (Gómez Millán, 2015; García Laureiro, 2014).

Mundialmente la producción de bienes y servicios deben principalmente de los hidrocarburos, el ritmo del deterioro ambiental del planeta, generado en gran medida por la quema de combustibles fósiles, ha obligado a sus habitantes a replantear no solo los modelos de producción sino el modo de vida (Chinappi & Jerez, 2008).

La implementación de sistemas energéticos empleando la biomasa, ofrece ventajas ambientales, sin embargo se requiere cambiar políticas, actitudes y hábitos en diferentes sectores de la sociedad y las instituciones vinculadas a los procesos productivos (Posso, 2004).

En el informe 2006, la “Perspectiva Energéticas en el Mundo”, la (AIE, 2006), en su escenario de referencia para el año 2030, apunta que la demanda total de energía va a superar a la actual en un 50% y que la participación de los combustibles fósiles practicamente se va a mantener en los mismos niveles de hoy como se observa en la siguiente (Figura 1) (AIE, 2006).

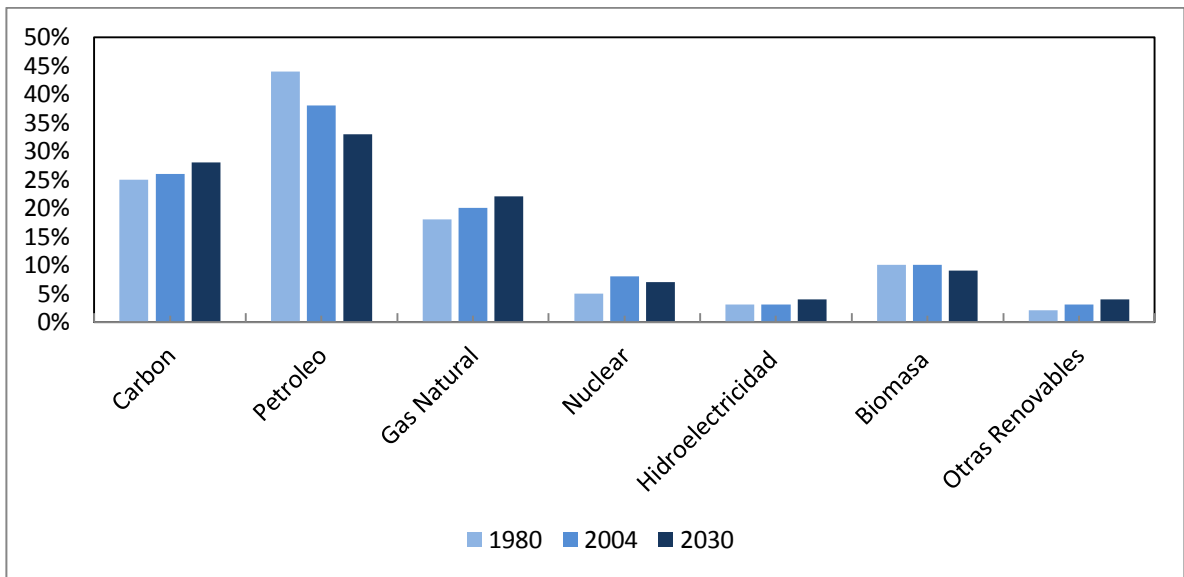


Figura 1: Consumo mundial de energía primaria

Debido a esto, los países industrializados han comenzado a considerar la biomasa como una materia prima idónea en la producción de energía y productos químicos dando sus características renovables y su amplia distribución. Asociado este nuevo planteamiento nace el concepto de biorrefinería como la industria de refino para la producción de energía, combustibles, materiales y productos químicos a partir de biomasa vegetal (Martín Gil, 2009).

Hay industrias que poseen una amplia gama de productos obtenidos a partir de las biorrefinerías, adaptando una serie de instalaciones de distintos procesos que pueden ser físicos, químicos, termo-químicos o biotecnológicos. Los productos intermedios que se generan en la transformaciones primarias de la biomasa se denominan “plataformas”, a partir de las cuales se aplican procesos de transformación o refinado secundarios hasta alcanzar los productos finales (Pascual *et al.*, 2015).

5.2. CAFÉ

En Colombia el café es uno de los productos agrícolas que ha aportado al desarrollo económico, social e institucional del país, además de lograr estabilizar el crecimiento económico a través de las exportaciones a pesar de las constantes variaciones del precio en el mercado internacional (Machado, 2001). La producción de café ha ayudado al desarrollo de diferentes ciudades, aumentando el presupuesto de la ciudad, las inversiones en transporte, almacenes, entre otros y mejorando al desarrollo del sector rural, logrando el crecimiento, modernización de la industria y el comercio nacional e internacional (Urueña Gómez, 2013).

El continente americano (América Central y del Sur) continúa siendo el mayor productor de café verde en el presente siglo con cerca del 60% de la producción total en 2012, seguido por el continente asiático con el 30% y el africano con el 10% restante. Por países, a nivel mundial, cerca del 60% de la producción está concentrada en los siguientes países con sus respectivos aportes: Brasil, quien aporta el 36%; Vietnam el 19%; Colombia el 5%; e Indonesia el 4% (Esguerra & McAllister, 2014).



Figura 2: Planta de café en la etapa de floración y producción

Los granos o semillas de café crecen en la planta después de la floración como se muestra en la Figura 2. Las semillas están en el arbusto, su crecimiento inicia con el florecimiento, siendo polinizada y luego fecundada por un embrión hasta completar su estado de madurez, donde adquiere un color rojizo o amarillo dependiendo de la variedad, al fruto se le denomina “cereza de café”. El fruto está compuesto por exocarpio, mesocarpio, endocarpio, como se muestra en la figura 3 (Cafeteros, 2010).

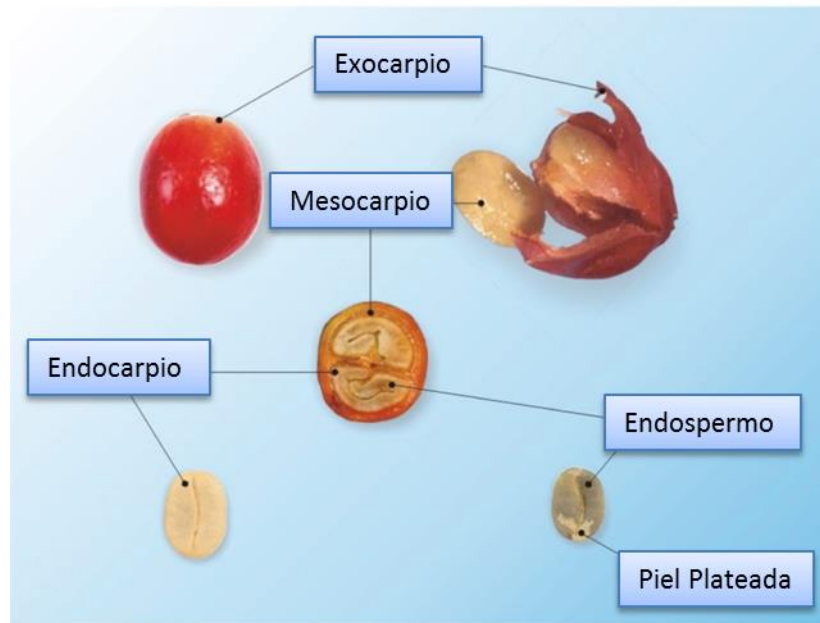


Figura 3: Clasificación de las partes del café

Exocarpio

El exocarpio, también conocido como cascara o pulpa, es el tejido más externo del fruto, este consiste de una camada de células compactas, poligonal y parenquimatosas, con varios cloroplastos, presentando estomas regularmente distribuidos en su superficie, la estructura celular del exocarpio constituyen barreras de transferencia de agua de los frutos durante el secado del café (Salazar *et al.*, 1994). El color de la pulpa varía de verde a rojo o amarillo, dependiendo de la variedad del café y los grados de maduración del fruto (Montilla, 2006).

Mesocarpio

El mesocarpio, también conocido como mucílago, es un tejido formado por células parenquimatosas formado por xilema en su interior y floema en la parte externa encontrándose por todo el tejido, constituyen un tejido rígido (Salazar *et al.*, 1994).

Endocarpio

El endocarpio, también conocido como pergamino, es la estructura más interna del pericarpio. Está formado por células esclerenquimatisas, de forma irregular envolviendo completamente la semilla (Salazar *et al.*, 1994).

Actualmente hay preocupaciones sobre el uso de los recursos y los impactos generados en la transformación de los bienes y servicios, por esta razón se han realizado numerosos estudios sobre el uso, aprovechamiento de estos residuos a nivel mundial que permitan obtener mediante diversos tratamientos de estos subproductos con un valor añadido, dando solución a una problemática y generando beneficios ambientales y económicos. En la región del Huila no se ha implementado ningún tipo de tratamiento a estos residuos como son la pulpa fresca (exocarpo) y el mucílago (mesocarpo); y por tanto, el impacto ambiental en las fuentes hídricas, que conlleva a graves problemas como la desaparición de especies acuáticas es bastante preocupante.

Analizando todo los procesos que tiene el café para poder obtener un pergamino seco, se encuentra que la cantidad de material vegetal que queda en forma de residuos es superior al que se aprovecha directamente en la preparación de la bebida. En la Tabla 1 se muestra el peso de cada una de los residuos generados durante cada una de las etapas del proceso de beneficio e industrialización el café.

Tabla 1: Residuos obtenidos en el proceso de beneficio e industrialización de 1 kg de café cereza en Colombia.

Etapas	Proceso	Residuo obtenido	Perdidas (gramos)
Beneficio	Despulpado	Pulpa fresca	436
	Desmucilaginado	Mucílago	149
Industrialización	Secado	Agua	171
	Trilla	Pergamino	42
		Película plateada	
	Torrefacción	Volátiles	22
	Preparación de la bebida	Borra	104
Pérdidas acumuladas			924

Fuente: (Calle, 1977)

Tal y como se mencionó anteriormente, por cada 1 kilogramo de café cereza se obtiene 436 gramos de pulpa fresca y 149 gramos de mucílago, con la producción nacional del año pasado de 12.140 miles de sacos de 60 Kg, se generan 317582,4 toneladas de pulpa fresca y 108531,6 toneladas de mucílago. Estas cifras son alarmantes teniendo en cuenta que en su mayoría estos residuos no están siendo reutilizados como enmienda agrícola y su disposición final son los ríos o lagos.

Normalmente, después del proceso de recolección del café se realiza el proceso conocido como beneficio húmedo, en este proceso se realizan dos etapas que son: despulpado donde se obtienen como residuo la pulpa fresca, y desmucilaginado, en el que se obtiene mucílago. Es de resaltar que estos dos

residuos son muy contaminantes.

En el caso de la pulpa el promedio de la producción para Colombia, es de 2.25 ton/ha-año (Rodríguez Valencia, 2007a). Por cada millón de sacos de 60 kg de café almendra que Colombia exporta, se genera 162.900 toneladas de pulpa fresca, que si no se utiliza adecuadamente producirían una contaminación en excretas y orina equivalente a la generada durante un año, por una población de 868.736 habitantes (Rodríguez Valencia, 2009).

El mucílago se genera en la etapa del desmucilaginado, y en base húmeda representa alrededor de 14.85% del peso del fruto fresco (Montilla, 2006). En términos de volumen, por cada kilogramo de café cereza sin seleccionar se producen 91 ml de mucílago fermentado (Zambrano F. & Isaza H., 1994). Su producción media es de 768 kg/ha-año (Rodríguez Valencia, 2007a). Por cada millón de sacos de 60 kg de café que Colombia exporta, se genera aproximadamente 55.500 toneladas de mucílago fresco que si no se utiliza adecuadamente produciría una contaminación equivalente a la generada en año, en excretas y orina por una población de 310.000 habitantes (Rodríguez Valencia, 2009).

Teniendo en cuenta la contaminación, el impacto ambiental que se genera y la necesidad de los países de aumentar su matriz energética sin afectar los productos de la canasta familiar o alimentos para los animales; tales como la caña de azúcar, cereales, aceite de palma entre otros (Rodríguez Valencia & Zambrano Franco, 2010); se han enfocado en realizar investigaciones en la producción de biocombustibles. De esta manera la Universidad Surcolombiana tiene interés en el aprovechamiento de los residuos que no se utilizan para la alimentación, como es el caso la pulpa y mucilago de café.

Las características químicas de estos residuos son muy interesantes y favorables para llevar a cabo el proceso fermentativo y obtener subproductos como el bioetanol. Por ejemplo, en el caso de la pulpa contiene azúcares reductores que corresponden aproximadamente con el 17% en base seca, la pulpa seca posee un poder calorífico de 15.88 MJ/Kg y un consumo en el secado mecánico de 36.92 MJ, con un balance energético negativo en el proceso debido a que cada unidad de energía aplicada en el secado de la pulpa solo se genera 0.43 unidades en la combustión del producto seco (Rodríguez & Zambrano, 2010; Rodríguez Valencia, 1999; Porres *et al.*, 1987).

En el mucílago se encuentran azúcares reductores, representan aproximadamente el 64% en peso seco (Rodríguez Valencia, 1999), lo cual representa cerca del 15 % del peso fresco; además, se tiene en cuenta el principio activo que son los °Brix, los que actúan en el proceso de fermentación en donde los carbohidratos son transformados en azúcares simples por medio de la levadura del genero *Saccharomyces*, que lo convierten en etanol; luego pasando

por el proceso de destilado (Funes *et al.*, 2011; Rodríguez Valencia, 2007a; Rodríguez Valencia, 2007b).

La fermentación es una actividad biológica en ausencia de oxígeno, donde la actividad de algunos microorganismos procesan los azúcares presentes hasta obtener un producto final: un alcohol que corresponde principalmente a etanol, que suele formarse después de la fermentación, en torno a un 15%-25%, que posteriormente puede concentrarse por destilación y obtener alcohol hidratado (4-5% de agua) hasta llegar al alcohol absoluto (99,4% de pureza) (Rodríguez Valencia & Zambrano Franco, 2010).

Algunos autores (Calle, 1977) encontraron en un estudio desarrollado en Cenicafé, que “de 100Kg de café cereza se puede obtener 6% de melaza” por extracción y concentración de jugo de la pulpa y del mucílago, con un contenido del 35% de azúcares totales y 6.19% de cenizas, y por fermentación alcohólica se pueden obtener, en promedio 1.2 litros de alcohol etílico de 85° equivalentes a 500 litros de etanol por 1000 arrobas de café pergamino seco (Rodríguez Valencia & Zambrano Franco, 2010).

(Sánchez, 2003) en su reporte afirma que en la fermentación alcohólica utilizando varias cepas de levaduras, se encontró un promedio de 25.17 ml de etanol, proveniente de la fermentación de 1Kg de pulpa fresca, la capacidad calorífica del etanol es de 21.08 MJ/L, por lo que se alcanzó un valor de 0.53 MJ/kg de pulpa fresca, similar al de forma de biogás.

En el caso mucílago de café en base húmeda, representa alrededor del 14.85% del peso del fruto fresco (Montilla, 2006); que en términos de volumen se puede decir que por cada kilogramo de café cereza sin seleccionar se producen 91 ml de mucílago fermentado (Zambrano & Isaza, 1994). En fermentación alcohólica se encontró un valor promedio de 58,37 ml de etanol obtenido a partir de 1kg de mucílago fresco (Rodríguez Valencia & Zambrano Franco, 2010); equivalentes, en unidades en energía a 1,23 MJ/kg de mucílago (Rodríguez Valencia & Zambrano Franco, 2010).

Los rendimientos de etanol que podría esperarse en la pulpa y el mucilago generados en la obtención de millón de sacos de café verde se presentan en la (Tabla 2).

Tabla 2: Bioetanol obtenido por cada millón de sacos café verde producido.

Subproductos	Toneladas generadas	Litros de etanol/toneladas de subproductos	Galones de etanol (galus) ¹
Pulpa fresca	162.900	25,17	1.083.274
Mucilago fresco	55.500	58,37	855.888
Galones de etanol/millón de sacos de café verde			1.939.162

Fuente: (Rodríguez Valencia & Zambrano Franco, 2010)

En la tabla 3, se presentan los datos mencionados por diversos autores respecto a la energía disponible en los subproductos generados en las fincas como son biogás y bioetanol. En principio el biogás puede ser utilizado en cualquier equipo comercial diseñado para uso con gas natural. La Figura 4, se encuentra el resumen de las posibles aplicaciones.



Figura 4: Aplicaciones con el uso del biogás

Haciendo un análisis respecto a la cantidad de energía que puede obtenerse, se considera que el poder calorífico de la gasolina es de 34MJ/kg, equivalente a

¹ gal_{us} equivalente a Galones estadounidenses

128,69MJ/gal_{us}, se puede estimar que la energía disponible en los subproductos del café generados por 1 ha/año, es equivalente a la contenida en 513 gal_{us} de gasolina.

Tabla 3: Capacidad calorífica de los subproductos del café.

Subproducto	Poder calorífico	Producción	Referencia
Pulpa	15,88MJ*kg ⁻¹ pulpa seca. Combustible sólido (pulpa seca)	2.258 kg/ha-año (Rodríguez Valencia, 2007b)	(Porres <i>et al.</i> , 1987)
	0,54 MJ*kg ⁻¹ pulpa fresca. Combustible gaseoso (Biogás)		(Arcila, 1979)
	0,53 MJ*kg ⁻¹ pulpa fresca. Combustible líquido (bioetanol)		(Rodríguez Valencia, 2007a; Rodríguez Valencia, 2007b)
Mucílago	2 MJ*kg ⁻¹ mucílago fresco. Combustible gaseoso (biogás)	768 kg/ha-año (Rodríguez Valencia, 2007b)	(Zambrano, 1994)
	1,23 MJ*kg ⁻¹ mucílago fresco. Combustible líquido (bioetanol)		(Rodríguez Valencia, 2007a; Rodríguez Valencia, 2007b)
Cisco	17,90 MJ*kg ⁻¹ . Combustible solido	227 kg/ha-año (Rodríguez Valencia, 2007b)	(Roa <i>et al.</i> , 1999)
Borra	29,01 MJ*kg ⁻¹ borra seca. Combustible solido	22.300 t/año (Agudelo, 2002)	(Federacafé, 1997)
	5,90 MJ*kg ⁻¹ borra seca. Combustible gaseoso (biogás)		(Kostenberg <i>et al.</i> , 1995)
	4,38 MJ*kg ⁻¹ borra seca. Combustible líquido (bioetanol)		(Agudelo, 2002)
	5,76 MJ*kg ⁻¹ borra seca. Combustible líquido (biodiesel)		(Kondamudi <i>et al.</i> , 2008)
Ripios	15,60 MJ*kg ⁻¹ ripio. Combustible solido	Sin datos	(Rodríguez Valencia, 2007a; Rodríguez Valencia, 2007b)
	3,46 MJ*kg ⁻¹ ripio. Combustible líquido		(Oliveira <i>et al.</i> , 2003)

	(biodiesel)		
Tallos	19,75 MJ*kg ⁻¹ tallo seco. Combustible solido	1.200 kg/ha-año	(Roa, 2003; Rodríguez Valencia, 2007b)

Fuente: (Rodríguez Valencia & Zambrano Franco, 2010)

Teniendo en cuentas todas las propiedades químicas de los residuos producidos en el beneficio húmedo del café se puede pensar en el planteamiento de varios procesos que permitan su aprovechamiento y enmárcalos dentro del concepto de Biorrefinería. Este concepto puede aplicarse a diversos residuos agroindustriales. Las biorrefinerías permiten obtener productos para la producción de fuentes de energía limpias, biocombustibles amigables con el medio ambiente y productos de valor añadido entre otros.

La producción de bioetanol ha experimentado un crecimiento en los últimos años en Colombia, por lo que se puede empezar a implementar los conocimientos adquiridos y desarrollar tecnología haciendo así que Colombia sea competitivo y contribuya en la conservación del medio ambiente, dando alternativas de desarrollo, como la generación de biocombustible que pueden ser una alternativa de combustible fósiles.

La producción de bioetanol beneficiara a todos los productores de las zonas cafeteras, ya que en el proceso de beneficio húmedo del café los residuos no son aprovechados, sabiendo el alto grado de contaminación al medio ambiente que generan estos residuos en el país.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE RECOLECCIÓN DE CAFÉ PARA EL ESTUDIO

6.1.1. Localización.

Garzón es un municipio Colombiano, localizado en el suroriente del Departamento del Huila con una distancia de 113 kilómetros de la capital (Neiva) y a 73 kilómetros del municipio de Pitalito, en las estribaciones de la cordillera central, geográficamente se encuentra situada en las coordenadas 2°23'00" de latitud Norte y 75°56'00" de longitud Oeste, limitada por el norte con el municipio de Gigante, por el sur con el municipio de Guadalupe, al sur-oeste con el municipio de Altamira; por el Oriente con el departamento del Caquetá y por el occidente con el municipio del Agrado (IGAC, 2015) (Figura 5).

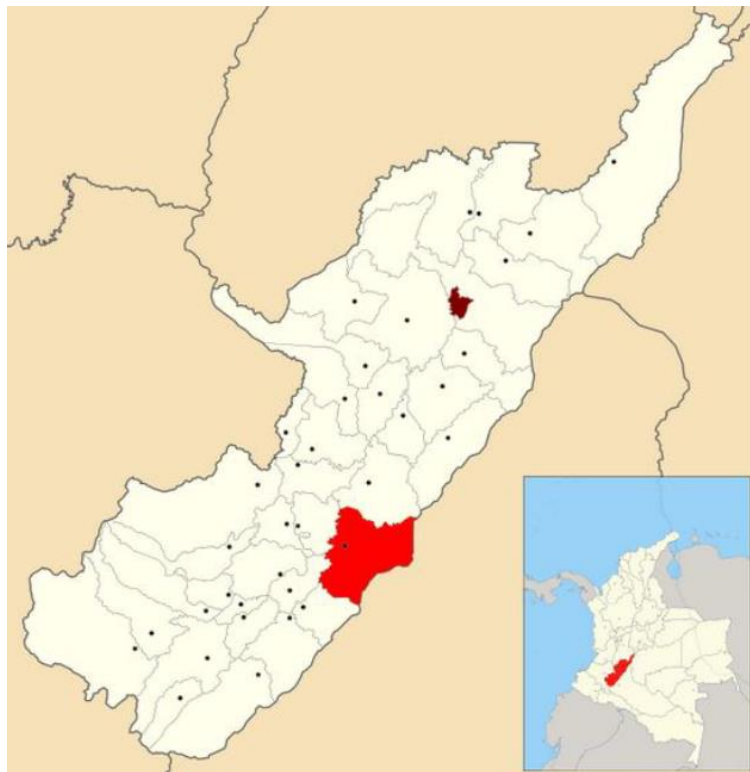


Figura 5: Área de estudio. Municipio de Garzón en el Departamento del Huila

6.1.2. Aspectos climáticos.

El clima del municipio de Garzón es muy diverso, la temperatura varía de acuerdo con la altitud y el relieve de cada lugar, alterada por los vientos y las lluvias. Los

periodos de lluvia son en los meses de abril, mayo y de octubre a diciembre; el resto de año se considera como época seca, aun cuando presentan lluvias esporádicas. Sus tierras se distribuyen en los pisos térmicos cálido (4,1km²), templado (369,11 km²), frío (584,68 km²) y el piso bioclimático paramo (380,39 km²) (Rodríguez, 2015).

6.2. TOMA Y ANÁLISIS DE LA MUESTRA

6.2.1. ENSAYO PRELIMINAR

6.2.1.1. Materia prima

Como materia prima se utilizó café variedad Castillo, procedente de la vereda Alto Fátima del municipio de Garzón departamento del Huila, se obtuvieron del proceso de beneficio húmedo 4 kilogramos de Pulpa obtenida en la etapa de despulpado, y 2 litros de Mucilago obtenidas de forma manual.

6.2.1.2. Tratamientos

Se realizaron 3 tratamientos; (T1) 2 kilogramos de Pulpa, diluida en 2 litro de agua destilada, (T2) 2 kilogramos de Pulpa triturada, diluida en 2 litros de agua destilada y (T3) 2 litros de Mucilago con 2 litros de agua destilada. Que posteriormente fueron transportados al laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad Surcolombiana (Neiva), en donde se realizó la fase experimental como se muestra en la siguiente figura 6.



Figura 6: Montaje de fermentación anaerobia para Pulpa y Mucilago de café ensayo preliminar

Para cada uno de los tratamientos realizados se llevó a cabo una caracterización exhaustiva del líquido fermentado con pruebas físicas, químicas y microbiológicas

durante la fase de fermentación a los tiempos 0, 8, 15 y 20 días de fermentación natural a temperatura ambiente, (Tabla 4).

Tabla 4: Tratamientos de la materia prima de Pulpa y Mucilago de café ensayo preliminar

Tratamiento	Tratamiento con Pulpa	Tratamiento con Pulpa	Tratamiento con Mucilago
Dilución	1:1	1:1	1:1
Tiempos de pruebas (días)	0, 8, 15 y 20	0, 8, 15 y 20	0, 8, 15 y 20
Nomenclatura de los Triplicados	T1	T2	T3

6.2.2. ENSAYO DE VERIFICACIÓN A MAYOR ESCALA

6.2.2.1. Materia prima

Como materia prima se utilizó café variedad Castillo, procedente de la vereda El Mesón del municipio de Garzón departamento del Huila, de 34kg de café cereza se obtuvieron del proceso de beneficio húmedo 15 kilogramos de Pulpa obtenida en la etapa de despulpado, y de 100 kg de café cereza se obtuvieron 15 litros de Mucilago obtenidas mediante el equipo desmucilagador mecánico (ECOMIL, con caudal de 550ml/min).

6.2.2.2. Tratamientos

Se realizaron 4 tratamientos por triplicado; (T1) 4 kilogramos de Pulpa diluida en 1 litro de agua destilada (T2) 5 litros de Mucilago, (T3) 4 kilogramos de Pulpa triturada más levadura diluida en 1 litro de agua destilada (T4) 5 litros de Mucilago más levadura, posteriormente fueron transportados al laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad Surcolombiana (Neiva), en donde se realizó la fase experimental (Figura 7); durante el proceso fermentativo se realizó una caracterización físico-química y microbiológica en los tiempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 8 y 10 días de fermentación natural a temperatura ambiente (Tabla 5).

Tabla 5: Tratamientos de la materia prima (Pulpa y Mucilago), ensayo de verificación a gran escala

Tratamiento	Tratamiento con Pulpa (T1)	Tratamiento con Mucilago (T2)	Tratamiento con Pulpa más levadura (T3)	Tratamiento con Mucilago más levadura (T4)
Dilución	4:1	5:1,5	4:1	5:1,5
Tiempos de pruebas (días)	0, 1, 2, 3, 4, 5, 8 y 10	0, 1, 2, 3, 4, 5, 8 y 10	0, 1, 2, 3, 4 y 5	0, 1, 2, 3, 4 y 5

Nomenclatura de los Triplicados	T1-P1	T2-M1	T3-PL1	T4-ML1
	T1-P2	T2-M2	T3-PL2	T4-ML2
	T1-P3	T2-M3	T3-PL3	T4-ML3



Figura 7: Montaje de fermentación anaerobia para Pulpa y Mucilago de café, ensayo de verificación a gran escala

Los análisis de pH, °Brix, acidez, color, DQO, sólidos totales y sólidos volátiles, se realizaron por triplicado y los microbiológicos por duplicado.

6.3. ANÁLISIS FISICOQUÍMICO

6.3.1. ENSAYO PRELIMINAR

La metodología aplicada se encuentra consignada en los numerales 6.3.2.1, 6.3.2.2, 6.3.2.3. y 6.3.2.4.

6.3.2. ENSAYO DE VERIFICACIÓN A MAYOR ESCALA

6.3.2.1. pH

Para la determinación de pH, se tomó de los tanques de fermentación tanto para el tratamiento con la pulpa como para el tratamiento con el mucilago, una muestra de 10 ml, la lectura se realizó con el potenciómetro Ohaus Starter5000 previamente calibrado de acuerdo con el protocolo y análisis descrito por la AOAC y Standard Methods, método potenciómetro (AOAC-981.12).



Figura 8: Equipo de medición de pH

6.3.2.2. Solidos disueltos

Se determinó usando un refractómetro de tipo Atago PR-201α comprobando su valor en cada muestra por triplicado, en los diferentes tratamientos (pulpa y mucilago), a lo largo del proceso de fermentación teniendo en cuenta el método (AOAC932.12) (Figura 9).



Figura 9: Medición del parámetro de °Brix

6.3.2.3. Acidez titulable

De acuerdo a la norma (AOAC-942.15), se tomó 20 ml de los tanques de fermentación tanto para el tratamiento de la pulpa como para el tratamiento del mucilago, se añadieron 3 gotas de fenolftaleína y se tituló con hidróxido de sodio a 0.1N; el cálculo de la acidez titulable se realizó en función del equivalente al ácido láctico (ANEXO A) (Figura 10).



Figura 10: Montaje de acidez titulable

6.3.2.4. Color

Para la medición de los parámetros del método CIE (Comisión Internacional Eclairage), se utilizó un colorímetro para líquidos Konica Minolta, modelo CR-410



Figura 11: Equipo de medición de colorimétrico

Se realizó la medición con 20 ml tanto del tratamiento de la pulpa como para el tratamiento del mucilago con en el colorímetro y se obtuvieron coordenadas de CIE L*, a* y b*, (Figura 11).

6.3.2.5. DQO total y DQO soluble

Para la determinación del parámetro de DQO, se tomaron muestras de 60 ml en frascos estériles, se tomó 2,5ml de la muestra en un tubo de cultivo al igual que 2,5 ml de agua destilada, luego se adicionó Dicromato de potasio a 0,0167M ($K_2Cr_2O_7$) y seguidamente se agregó solución catalizadora de ácido sulfúrico, el procedimiento y los cálculos basados en el Método reflujó cerrado (Standard Methods-5220D).

6.3.2.6. Sólidos totales y sólidos volátiles

En la determinación de sólidos totales y volátiles para el tratamiento con el mucilago, tomando una muestra de 10 ml en una capsula, se tuvo en cuenta los pesos a temperatura de 105°C y 550°C según (Standard Methods-10406) (Figura 12).



Figura 12: Montaje en estufa a 105°C durante 24 horas

6.3.2.7. Sólidos suspendidos

Se realizó un filtrado con un volumen de 10 ml, luego se depositó en una capsula teniendo en cuenta los pesos a temperatura de 105°C y 550°C según (Standard Methods-10406) (Figura 13).

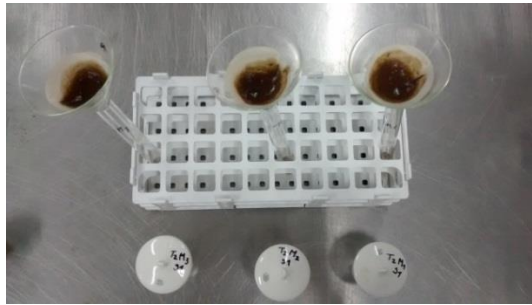


Figura 13: Montaje de filtrado para el tratamiento del mucilago

6.4. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

Se tomaron 2 muestras de cada tratamiento y por cada tanque de fermentación, se efectuaron diluciones seriadas en tubos de ensayo con 9 ml de agua de peptona (Merck KGaA) y caldo MRS (OXOID), luego se realizó siembra en profundidad en medios de cultivo selectivo agar MRS (de Man, Rogosa y Sharpe-OXOID) y agar YGC (Chloramphenicol Glucose Agar-Merck KGaA), después de 24 y 48 horas se realizaron los correspondientes recuentos (Figura 14) (ANEXO B). En los tratamientos a los que se adicionó levadura se empleó la cepa *Saccharomyces Cerevisiae var Bayanus* (Oneoferm), tantos gramos para los tratamientos de pulpa y tantos gramos para los tratamientos con mucilago.

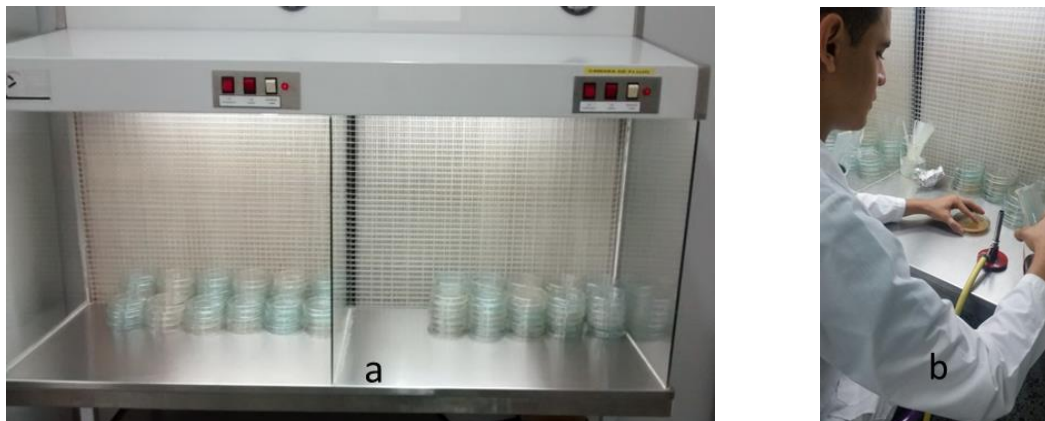


Figura 14: (a) Disposición cajas de Petri para siembra en profundidad, (b) Vertimiento de medio de cultivo solido

6.4.1. Recuento de BAL (Bacterias Acido Lácticas)

Luego de realizar siembra por duplicado en agar MRS, se incubó a 37°C durante 48 horas en condiciones de aerobiosis en la incubadora digital (Thermo Scientific Heratherm IMH60-S), finalmente se realizó el respectivo recuento y se hizo una

identificación morfológica de las unidades formadoras de colonia a las 24 y 48 horas. Luego, se realizó descripción morfológica, tinción Gram y prueba de catalasa.

6.4.2. Recuento de levaduras

Luego de realizar siembra por duplicado en agar YGC, se incubó a 30°C en condiciones de aerobiosis, durante 48 horas en la incubadora de precisión digital (Thermo Scientific Heratherm IMH100), finalmente se realizó el respectivo recuento y se hizo una identificación morfológica de las unidades formadoras de colonia a las 24 y 48 horas. Después, se hizo descripción morfológica y tinción Gram.

6.5. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

La fermentación de los residuos se realizó en tanques de plásticos cerrados con capacidad de 6 litros, en la parte superior se adaptó una trampa de gases con el fin de facilitar la salida de los gases producidos en la fermentación y evitar presiones excesivas. El tiempo del proceso tuvo una duración de 10 días, momento en el que los °Brix se estabilizaron, indicando la finalización de la fermentación (Figura 15).



Figura 15: (a) Proceso de fermentación con Pulpa, (b) Proceso de fermentación con Mucilago

6.6. DESTILACIÓN SIMPLE

Al terminar la fermentación con la materia prima (Pulpa y Mucilago de café), el sobrenadante fue sometido a evaporación, utilizando para esto el destilador simple a una temperatura de 80°C, hasta obtener una solución etanol-agua.

El calentamiento del sistema de destilación se llevó a cabo empleando la fuente de energía proporcionada por la placa calentadora, el equipo utilizado consta de un termómetro, balón y refrigerante (Figura 16).



Figura 16: Montaje de destilación simple

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se hizo con el software Statgraphics Centurion XV. Se realizó un análisis de varianza simple (ANOVA) para los datos de caracterización de cada uno de los tratamientos y se realizó un análisis de varianza multifactorial (ANOVA multifactorial) para los datos obtenidos entre tratamientos, para cada uno de ellos se efectuaron varios tests y gráficos para comparar los valores medios obtenidos para los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de los diferentes tratamientos. Las diferencias entre medias o medianas fueron consideradas significativas cuando el $p < 0.05$.

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

8.1. Caracterización de la biomasa

ENSAYO PRELIMINAR CON PULPA Y MUCILAGO DE CAFÉ

Antes de iniciar con el desarrollo experimental se realizó la caracterización de la pulpa y el mucilago con el fin de conocer la composición y características físico-químicas de estos residuos.

Las características físico-químicas y las condiciones operacionales se encuentran en la tabla 6 y 7. La temperatura no se controló y vario en función del ambiente. El tiempo de fermentación se fijó teniendo en cuenta recomendaciones bibliográficas.

En la tabla 6. Se muestran los resultados obtenidos en la caracterización de la pulpa y la pulpa triturada. Se realizaron tres replicas con el fin de reducir el valor de incertidumbre y obtener valores más representativos.

Tabla 6: Caracterización con la pulpa de café

Parámetros medidos	Pulpa de café			Pulpa de café Triturada		
pH	4,71±0,03			4,63±0,01		
°Brix	1,97±0,06			2,90±0,00		
Acidez (g/L)	0,72			1,08		
Color	L*	a*	b*	L*	a*	b*
	33,91±0,03	8,14±0,03	11,07±0,01	32,00±0,11	9,46±0,04	8,04±0,12

Para garantizar el proceso de fermentación uno de los parámetros importantes es el pH y los grados Brix, en la tabla 6 se observa que la pulpa presenta un pH de 4,71 (CV=0,62%) y 1,97 °Brix (CV=2,94%), en el caso de la pulpa tritura el pH vario ligeramente y fue de 4,63 (CV=0,29%), los grados Brix aumentaron hasta 2,90 °Brix (CV=0,0%) debido principalmente al rompimiento e hidrólisis parcial de la pulpa. No obstante, los promedios al inicio de la fermentación pH y °Brix están cercanos y concuerdan con (Rodríguez Valencia, 2013) quien sustenta a través de sus pruebas un valor promedio de pH 4,60 (CV=3,61%) y 2,90 °Brix (CV=9,34%), ya que la variedad de café utilizada por el autor es la misma empleada en esta investigación (var. castillo).

Por otra parte, los resultados iniciales en la acidez son bajos estando en un rango de 0,72 y 1,07g/L, de manera semejante (Acosta, 2012) en sus resultados reportan un rango inicial de acidez entre 1 y 2 g/L. Además mencionan que un elevado contenido de acidez inicial genera una baja velocidad de fermentación por lo cual en la presente investigación se observa que los ensayos inician con una baja acidez, se espera que aumente a medida que la pulpa se hidroliza y las bacterias acidogénicas generen ácidos grasos de cadena corta.

Se debe agregar, que en el parámetro de color al inicio del proceso de fermentación en la coordenada de luminosidad L* tomo un valor promedio de 33,91 para la pulpa de café y 32,00 para la pulpa triturada; el croma a* para el primer tratamiento con un valor promedio de 8,14 y 9,46 para el segundo tratamiento y en el croma b* se tiene un valor promedio de 11,07 y 8,04 respectivamente. Según (Carvajal *et al.*, 2011) menciona que este rango de color es proveniente de frutos sobremaduros con una tonalidad rojiza y amarillenta en menor cantidad. La tabla 7 muestra los resultados obtenidos en la caracterización del mucilago. En cuanto a los valores promedios al inicio del proceso fermentativo presentó un pH de 4,49 (CV=0,54) y 6,2 °Brix (CV=0,0%) datos comparables con los encontrados en los trabajos de (Rodriguez Valencia & Zambrano Franco, 2011); quienes obtuvieron un pH de 4,84 y 9,66 °Brix; siendo similar para el parámetro de pH pero se encontraron diferencias en el parámetro de °Brix ya que estos investigadores usaron mucilago de café variedad Colombia.

Tabla 7: caracterización con el mucilago de café

Parámetros medidos	Mucilago de café		
pH	4,49±0,03		
°Brix	6,20±0,00		
Acidez (g/L)	2,16		
Color	L*	a*	b*
	32,04±0,07	3,67±0,01	5,93±0,05

En el parámetro de acidez al inicio del proceso de fermentación (Acosta, 2012) reporta que en la producción de hidromieles por definición de concentración de nutrientes obtienen un valor de acidez entre 1,5 a 2 g/L, lo cual en esta investigación se obtienen valores similares en torno a 2,0 g/L. representando un nivel no muy alto.

Por otra parte, los resultados iniciales en el parámetro de color para el tratamiento con el mucilago tomo en la coordenada de luminosidad L* un valor promedio de

32,04; el croma a* un valor promedio de 3,67 y en el croma b* se tiene un valor promedio de 5,93. De acuerdo con (Quezada *et al.*, 2016) menciona que este rango de color es marrón amarillento grisáceo oscuro.

ENSAYO DE VERIFICACIÓN A MAYOR ESCALA CON PULPA Y MUCILAGO DE CAFÉ

Antes de iniciar con el desarrollo experimental a mayor escala se realizó la caracterización de la pulpa y el mucilago con el fin de verificar la composición y características físico-químicas de estos residuos.

Las características físico-químicas y las condiciones operacionales se encuentran en la tabla 8 y 9. La temperatura no se controló y vario en función del ambiente. El tiempo de fermentación se fijó de acuerdo a los datos obtenidos durante el proceso fermentativo.

En la tabla 8. Se muestran los resultados obtenidos para la pulpa de café (P) y pulpa triturada con levadura (PL). La pulpa de café presentó menor variabilidad que la pulpa triturada con levadura dado a la relación de dilución, y por tanto, su composición fue más homogénea. Para el análisis del material, se tomó una muestra representativa de la dilución realizando tres replicas con el fin de reducir el valor de la incertidumbre.

Tabla 8: caracterización de la pulpa a mayor escala

Parámetros medidos	Pulpa de café (P)			Pulpa triturada con levadura (PL)		
pH	4,42±0,07			4,41±0,01		
°Brix	6,56±0,21			10,27±0,44		
Acidez (g/L)	3,54±0,45			3,96±0,36		
Color	L*	a*	b*	L*	a*	b*
	27,42±0,14	6,08±1,00	2,31±0,54	26,92±0,42	4,96±0,13	3,72±0,43
DQO (mg/L)	93270,0±3222,28			332666,67±292333,33		

En el caso de la pulpa en este ensayo se obtuvo un pH de 4,42(CV=1,57%) y 6,56 °Brix (CV=3,16%); y para el tratamiento con pulpa triturada con levadura se obtuvo un pH de 4,41 (CV=0,28%) y 10,27 °Brix (CV=4,25%). Según lo establecido por (Peña *et al.*, 2016) reporta un pH de 4,7 y un contenido de 11,33 °Brix al inicio de la fermentación, encontrándose similitud para el parámetro

de pH, sin embargo, encuentran diferencias en el parámetro de °Brix lo cual puede atribuirse al estado de la madurez y la manipulación del fruto.

Por otra parte, los resultados iniciales en la acidez son bajos estando en un rango de 3,54 y 3,96 g/L, de manera semejante (Acosta, 2012) en sus resultados reportan un promedio inicial de acidez entre 3,5 g/L y en el mejor de los ensayos mostro un valor de 3,8 g/L; siendo estos resultados menores a los obtenidos en el ensayo preliminar, factor que podría favorecer un alto rendimiento en la obtención de bioetanol.

Se debe agregar, que en el parámetro de color al inicio del proceso de fermentación en la coordenada de luminosidad L* tomo un valor promedio de 27,42 para la pulpa de café y 26,92 para la pulpa triturada con levadura; el croma a* para el primer tratamiento con un valor promedio de 6,08 y 4,96 para el segundo tratamiento y en el croma b* se tiene un valor promedio de 2,31 y 3,72 respectivamente. (Carvajal *et al.*, 2011) menciona que este rango de color es proveniente de frutos sobremaduros con una tonalidad rojiza y amarillenta en menor cantidad. En la tabla 9. Se muestran los resultados obtenidos en la caracterización del mucilago.

Tabla 9: caracterización del mucilago de café a mayor escala

Parámetros medidos	Mucilago de café (M)			Mucilago con levadura (ML)		
pH	4,69±0,05			5,03±0,14		
°Brix	11,4±0,22			11,36±0,91		
Acidez (g/L)	4,05±0,28			8,36±0,37		
Color	L*	a*	b*	L*	a*	b*
	30,09±0,15	2,68±0,17	4,09±0,17	30,32±0,16	2,09±0,12	4,71±0,12
DQO (mg/L)	175507±6931,01			481533,67±441539,00		
Solidos totales (g/L)	917,43±17,35			923,04±22,24		
Solidos volátiles (g/L)	977,70±18,64			980,93±27,65		

Los valores promedios al inicio del proceso fermentativo para el mucilago de café presento un pH de 4,69 (CV=1,17) y 11,4 °Brix (CV=2,01%); y para el tratamiento de mucilago con levadura se obtuvo un pH de 5,03 (CV=2,76%) y 11,36 °Brix (CV=8,02%). Comparando con los resultados obtenidos en el ensayo preliminar y otros autores se obtiene pH similares, que por el contrario en el parámetro de °Brix es mayor por el estado de maduración de los frutos (Rojas & Rojas, 2014). Según (Puerta Quintero, 2012) menciona que los °Brix para el mucilago de frutos pintones es de aproximadamente 14,1.

En el parámetro de acidez en esta investigación se obtiene un valor de 4,05 g/L y 8,36 g/L respectivamente. Siendo estos valores mayores a los obtenidos en los resultados preliminares, para lo cual (Puerta Quintero, 2012) reporta que los valores iniciales de acidez del café baba están entre 0,5 a 1,5 g/L. pero estos valores depende de la clasificación del fruto y del grano despulpado.

Por otra parte, los resultados en el parámetro de color para el tratamiento con el mucilago tomó en la coordenada de luminosidad L^* un valor promedio de 30,09 para mucilago de café y 30,32 para mucilago con levadura; el croma a^* para el primer tratamiento con un valor promedio de 2,68 y 2,09 para el segundo tratamiento y en el croma b^* se tiene un valor promedio de 4,09 y 4,71 respectivamente. (Carvajal *et al.*, 2011) menciona que este rango de color es proveniente de frutos sobremaduros con una tonalidad rojiza y amarillenta en menor cantidad. De acuerdo con (Quezada *et al.*, 2016) menciona que este rango de color es marrón amarillento grisáceo oscuro.

Existe otros parámetros de gran importancia a la hora de caracterizar los residuos y es el caso de la DQO, la cual representan toda la materia orgánica que puede ser susceptible de ser oxidada. En el presente caso se observaron valores de DQO para la pulpa fresca y el mucilago de 93.270 y 175.507 ppm, respectivamente. Estos valores son diferentes debido a que en la metodología planteada por algunos autores realizaron la combinación con diferentes estados de maduración de los frutos lo cual vario considerablemente, siendo 33.007 ppm para pulpa y 248.700 ppm para mucilago (Zambrano Franco & Isaza Hinestroza, 1998). Tal y como puede observarse, estas elevadas concentraciones de materia orgánica en estos residuos representan un problema medioambiental importante si son vertidos a los medios receptores.

8.2. Ensayos de fermentación

ENSAYO PRELIMINAR CON PULPA Y MUCILAGO DE CAFÉ

Luego de obtener los resultados de la caracterización de la pulpa y del mucilago durante el ensayo preliminar, se procedió a realizar los ensayos de fermentación siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.2. Tras la puesta en marcha de los ensayos se realizó el seguimiento de los parámetros descritos a continuación. Para cada parámetro se realizó un análisis con el fin de explicar los cambios que suceden durante el proceso fermentativo.

8.2.1. pH

El seguimiento del pH durante el tiempo de fermentación para la pulpa y pulpa triturada muestra un comportamiento similar durante el tiempo del ensayo. Durante los primeros días (0-8 días) se observa un descenso que puede ser debido a la transformación de los azúcares presentes en bioetanol y la desorción del CO₂ generado. Los resultados muestran que a medida que se incrementa el tiempo de fermentación disminuye el pH; esta disminución es debido a la salida de CO₂ y a la producción de ácidos, este comportamiento es similar a lo reportado por otros autores (Rodríguez Valencia, 2013; Puerta Quintero, 2013).

El análisis estadístico muestra que los valores medios para el tratamiento con la pulpa y pulpa triturada de café, durante los primeros 8 días no presentan tendencias similares, indicando una diferencia estadísticamente significativa entre las medias; pero desde el día 8 al día 20, la tendencia es similar indicando que no hay diferencias significativas entre las medias; por tal razón se encontraron 3 grupos homogéneos, (Figura 17). Para lo cual el pH es afectado significativamente con respecto al tiempo (días) con un nivel de confianza del 95%.

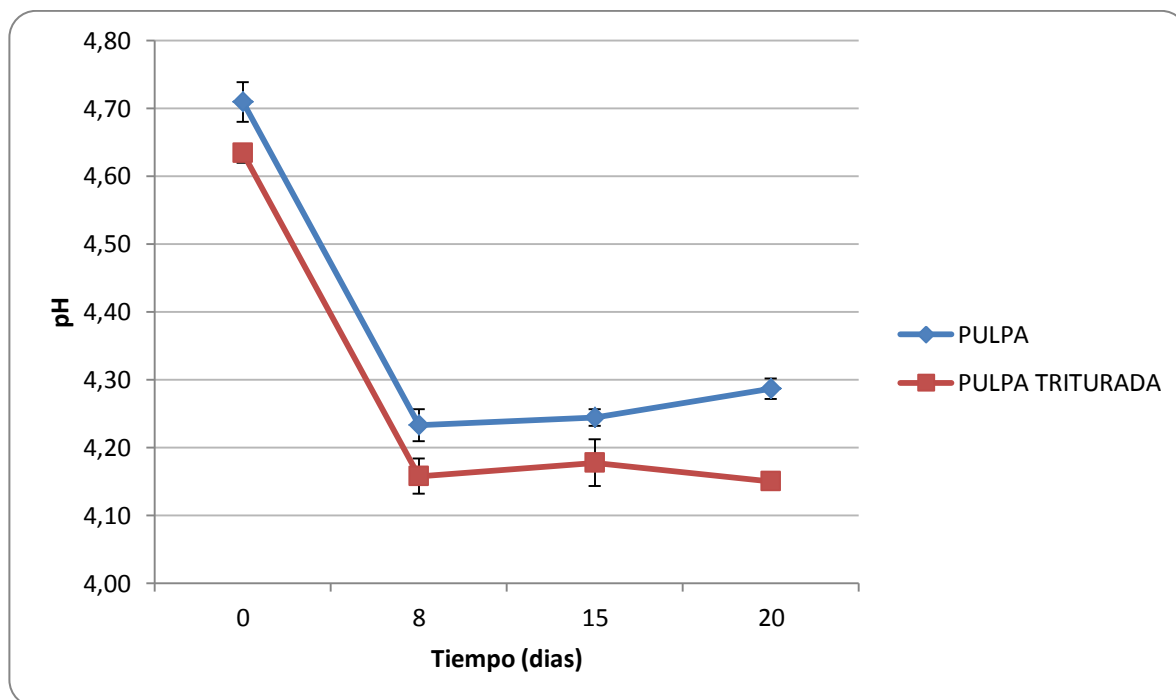


Figura 17: Perfil de la evolución de pH con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación

En el caso del pH para el tratamiento con el mucilago se presenta un descenso significativo lo cual es probable que debido al elevado tiempo de fermentación se formaran compuestos volátiles como aldehídos, acetato de etilo, éster, ácidos grasos entre otros, que provocaron la acidez del medio. Los ácidos que se suelen formar es ácido acético, butírico, propionico; lo cual sucede también con lo reportado por (Puerta Quintero, 2012). El análisis estadístico de los datos obtenidos muestra que el análisis de varianza del intervalo (0-8 días) la tendencia no se asemeja indicando una diferencia estadísticamente significativa entre las medias; además, del intervalo (8-20 días), su comportamiento se asemeja indicando que no presenta diferencias significativas entre las medias. Como era de esperarse, a medida que transcurre el proceso fermentativo disminuye el valor de pH (Figura 18).

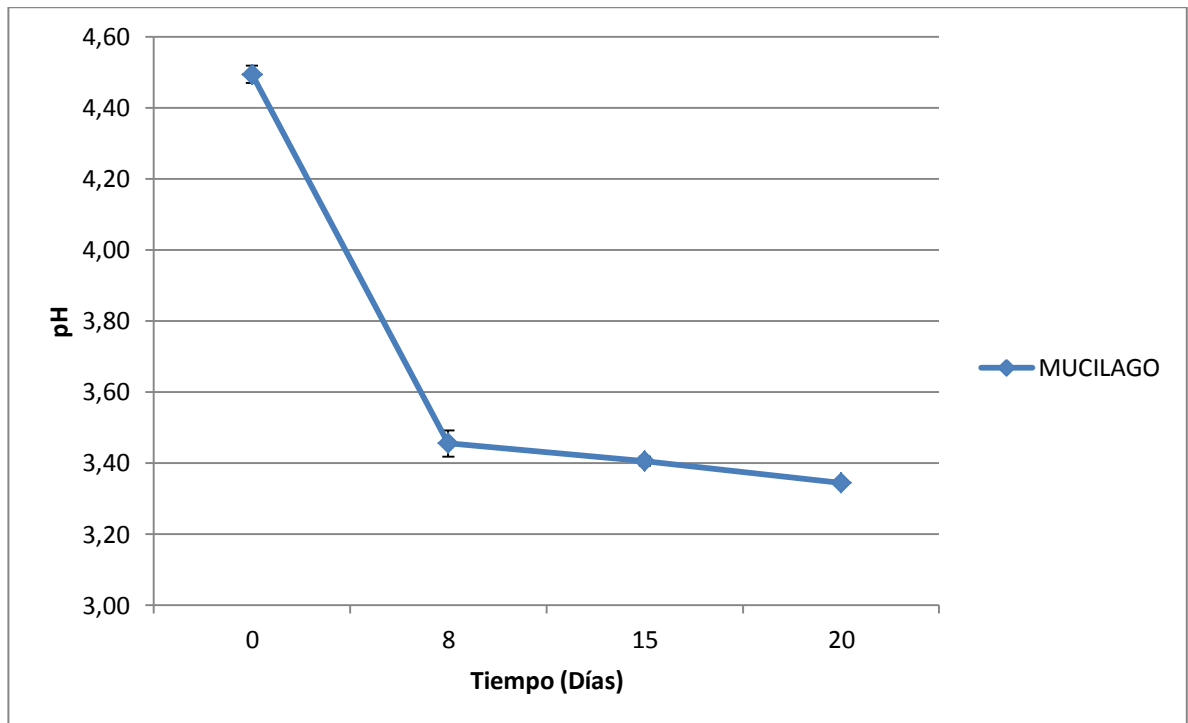


Figura 18: Perfil de la evolución de pH con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación

8.2.2. Solidos disueltos

En el caso de los grados Brix para los ensayos con pulpa y pulpa triturada de café, se observa que las curvas son similares ya que generan la misma tendencia

reportados por (Rodríguez Valencia, 2013; Guevara *et al.*, 2012). En el caso del tratamiento de la pulpa triturada, se observa un mayor descenso de los grados Brix, lo cual indica que el pretratamiento de este residuo antes de la fermentación favorece la hidrólisis y la conversión de los azúcares hasta bioetanol. El análisis estadístico de los datos obtenidos muestra que en la varianza las medias de los tratamientos son diferentes, es decir el contenido de azúcares durante la fermentación se ve influenciado por el tiempo, ya que estos son consumidos hasta que los grados brix se estabilizan entre los tratamientos con la biomasa de pulpa y pulpa triturada de café ($p < 0.05$). Los resultados manifiestan, a medida que se incrementa el tiempo, la curva de fermentación en la pulpa y pulpa triturada de café los °Brix varían de acuerdo a la descomposición de la biomasa, por tanto los °Brix disminuyen hasta estabilizarse (Figura 19).

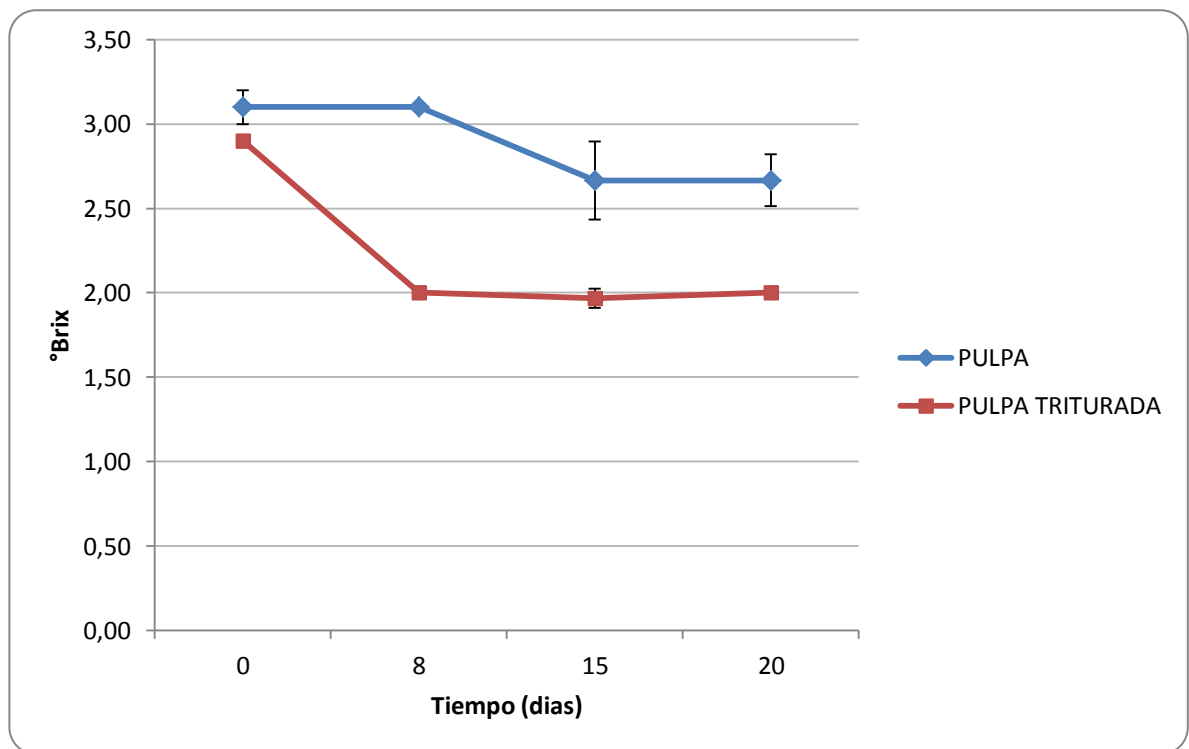


Figura 19: Perfil de la evolución de °Brix de la pulpa con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación

En el caso de los °Brix del mucilago al inicio del proceso de fermentación presenta una caída brusca lo cual está asociada al crecimiento exponencial y mayor consumo de sustrato por parte de las bacterias fermentativas. Después el proceso se ralentiza debido a que cada vez es menor la disponibilidad de azúcares. Se observa que al iniciar con una concentración de mayor °Brix, lo hace más efectivo para producir bioetanol debido a la cantidad de azúcares presentes al inicio del

proceso fermentativo, según (Castillo & Lopez, 2013) encontraron 2% de alcohol con 8 a 10 °Brix, lo cual se tuvo una concentración al inicio del proceso de 6,2 °Brix. A medida que se incrementa el tiempo de fermentación disminuye los °Brix siendo esta tendencia similar al reportado por (Funes *et al.*, 2011; Rodriguez Valencia & Zambrano Franco, 2011), (Figura 20). El resultado estadístico de los datos obtenidos muestra que el análisis de varianza el intervalo para los diferentes días no se traslapa lo cual representa que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias, con una incertidumbre del 5% mostro que las medias de los tratamientos son diferentes, es decir los días afecta significativamente el valor del contenido de azúcar ($p < 0.05$). Como era de esperarse, a medida que transcurre el proceso fermentativo existe un consumo importante de los azúcares presentes hasta bioetanol, lo cual se ve reflejado en el descenso de los grados Brix.

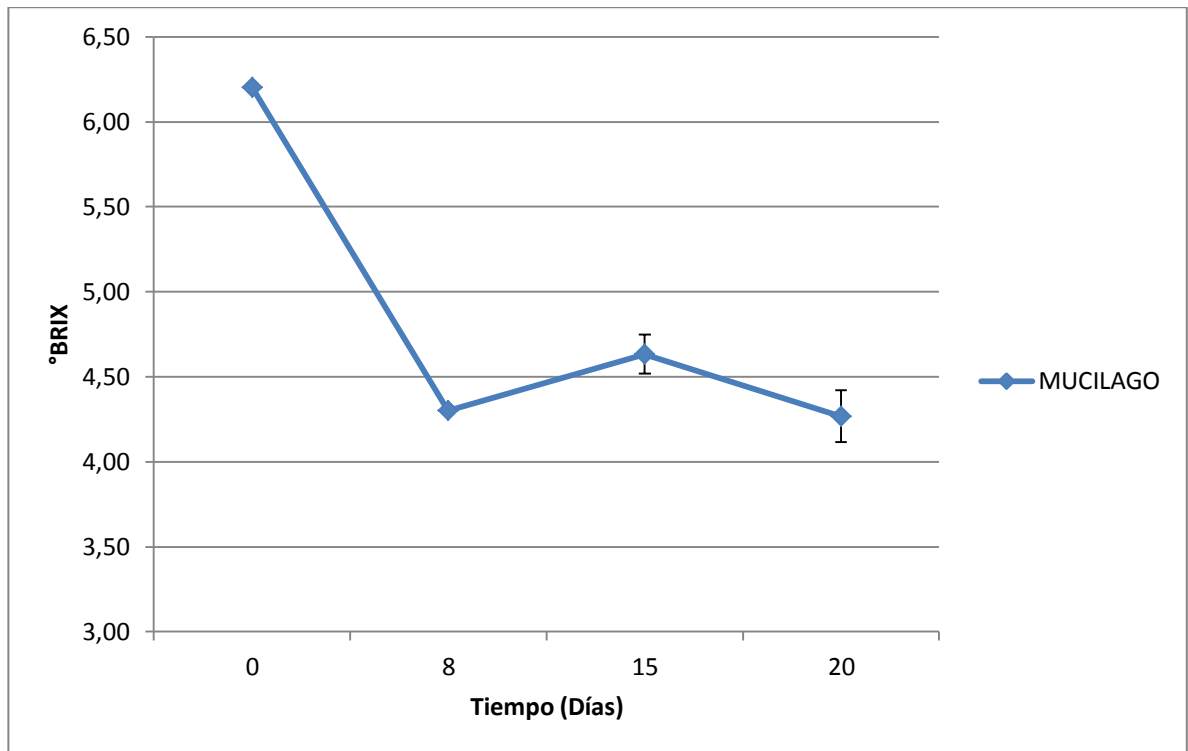


Figura 20: Perfil de la evolución de °Brix del mucilago con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación

8.2.3. Acidez

La acidez del material con pulpa y pulpa triturada se basó en el equivalente de ácido láctico, donde se observa que a medida que se incrementa el tiempo de

fermentación aumenta la acidez (Figura 21). Según (Acosta, 2012) menciona que un elevado contenido de acidez inicial genera una baja velocidad de fermentación por lo cual en esta investigación se observa que inicia con una baja acidez y a medida que pasa el tiempo aumenta gradualmente. Según (Marin *et al.*, 2003) al trascurrir la fermentación comienzan los procesos catabólicos por la degradación de la membrana celular y la presencia de los compuestos químicos y microorganismos que se derivan de este proceso, por tanto contribuyen al aumento de la acidez.

El análisis estadístico mostro que las medias del tratamientos difieren, es decir, los días afectan significativamente el valor de la acidez, lo que indica que cuando aumenta el tiempo de fermentación el ácido láctico cambia durante el proceso de fermentación, con una incertidumbre de ($p < 0.05$).

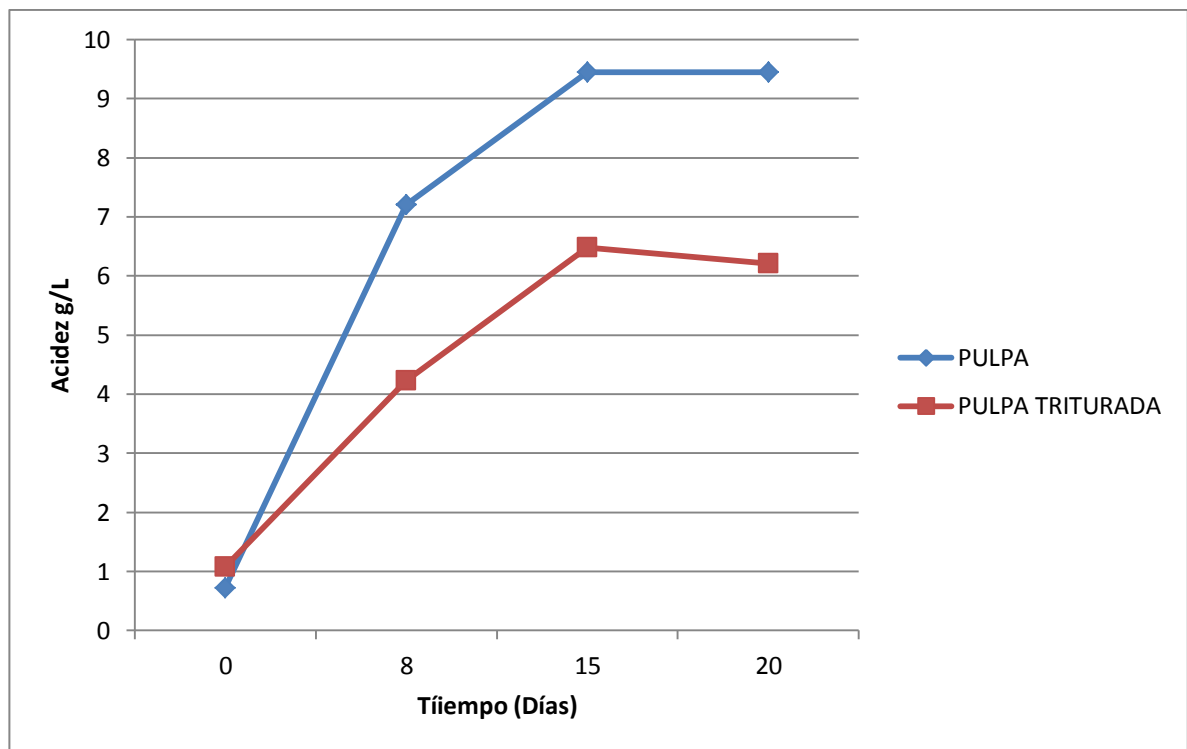


Figura 21: Perfil de la evolución de la acidez de la pulpa con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación

En el caso de la acidez del mucilago se tomó como referencia el equivalente del ácido láctico; se observa a medida que se aumenta el tiempo de fermentación aumenta la acidez hasta llegar al pico máximo que posteriormente desciende (Figura 22), de tal forma se presentan dos fases: la primera hay un aumento rápido en la acidificación; y la segunda fase donde exhibe una desaceleración atribuido al gasto del sustrato y a la disminución de las bacterias debido a las

condiciones acidas, siendo la tendencia similar al reportado por (Puerta Quintero, 2012). El análisis estadístico mostro que las medias del tratamientos difieren, es decir, los días afectan significativamente el valor de la acidez ($p < 0.05$).

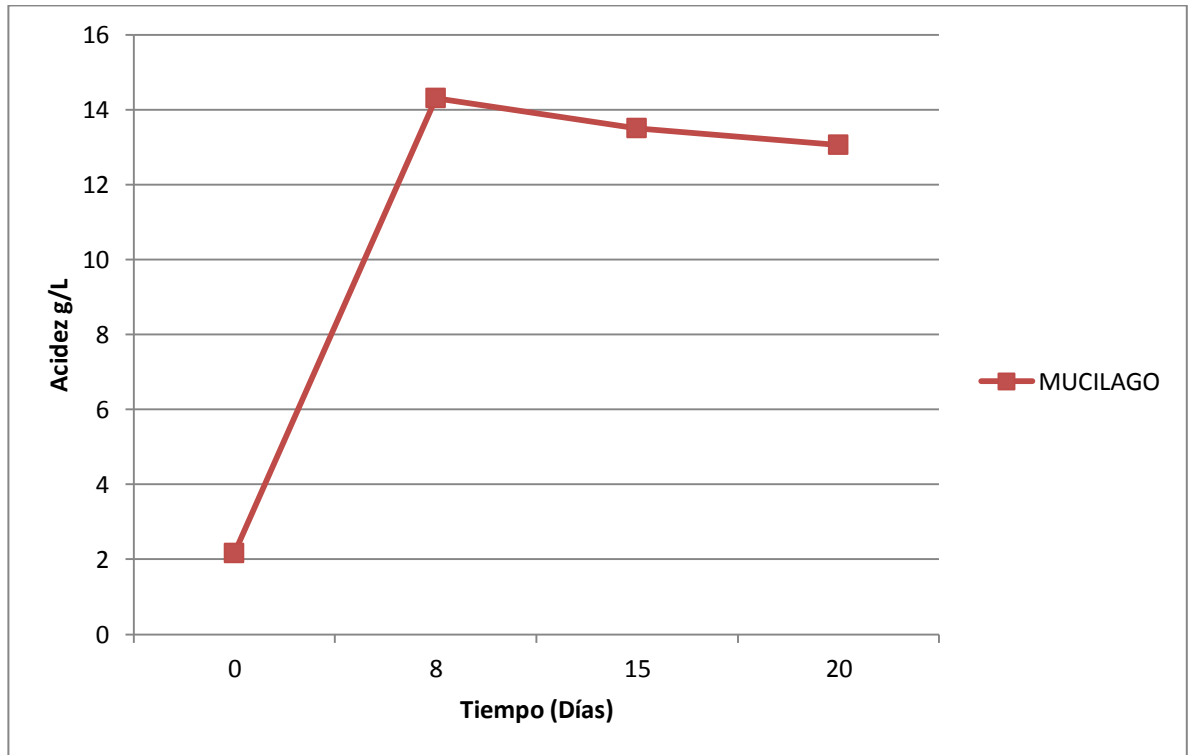


Figura 22: Graficas de la evolución de la acidez, para tratamiento de mucilago de café

8.2.4. Color

El color es un parámetro que suele medirse para definir las características físicas de una muestra lo cual permite obtener la curva espectral, en este estudio se observó el color para el tratamiento de la pulpa y pulpa triturada en el proceso fermentativo, representándose en el plano formado por coordenadas $L^*a^*b^*$ (Tabla 10).

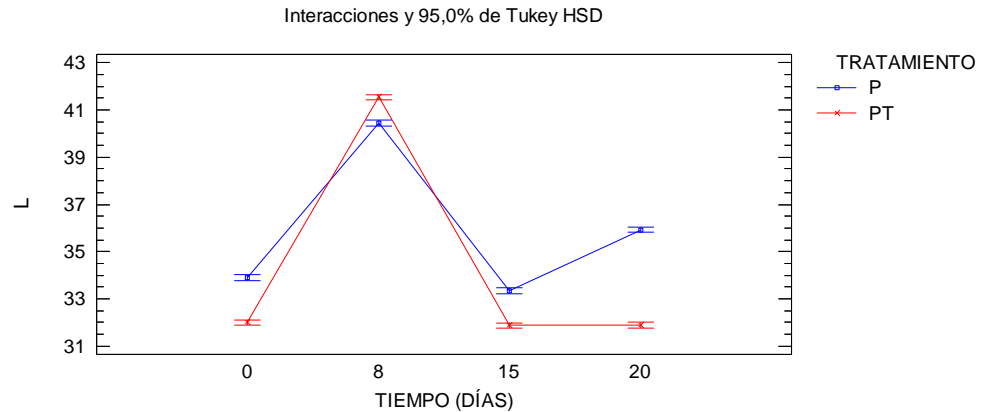


Figura 23: Perfil de la evolución de la coordenada L del mucilago con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación

El color del tratamiento para pulpa y pulpa triturada con el espacio CIELAB permitió una mejor observación de la evaluación del oscurecimiento del material. Teniendo en cuenta la coloración se tomó como base representativa las coordenadas L y a^* indicando un retroceso con respecto al tiempo atribuido a la homogenización del tratamiento. En este caso no se puede establecer relación entre ambos aspectos, pues las concentraciones no siguieron una tendencia clara durante proceso fermentativo. El análisis estadístico presentó diferencias significativas entre los días de fermentación y entre tratamientos con un nivel del 95% de confianza; por lo tanto se encuentra en el rango de la luminosidad poco oscura (Chiralt Boix *et al.*, 2007), debido a la oxidación del material lo cual aumenta la acidez haciendo que varíe la mecanización (Figura 23).

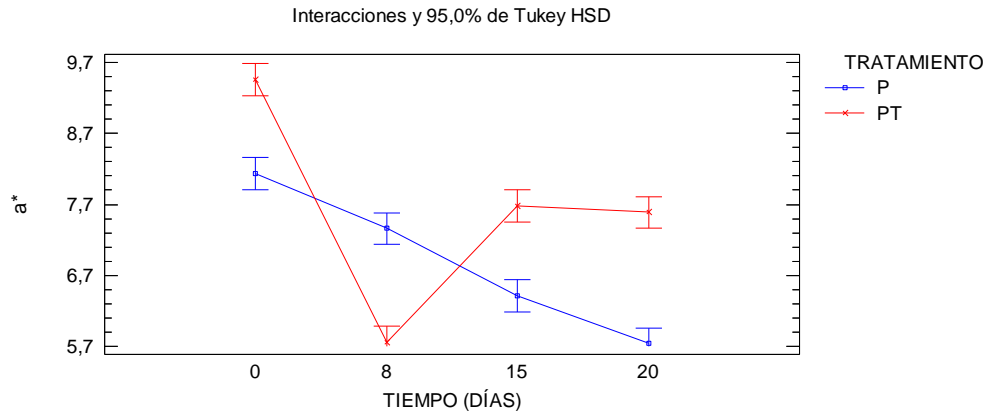


Figura 24: Perfil de la evolución de la coordenada a* del pulpa con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación

Para la coordenada a*, fue tomada, debido a la composición química de la pulpa donde revela valores de concentración de taninos presentes según lo reportado por (Noriega *et al.*, 2009). Lo cual se ve reflejado en la curva de cromática de la coordenada a* (Figura 24). En el análisis estadístico hay diferencias significativas con un nivel de confianza de 95%, con 3 grupos homogéneos, tomando una tonalidad rojiza estando en un rango de $6,91 \pm 0,05$ y $7,62 \pm 0,05$ según lo reportado por (Chiralt Boix *et al.*, 2007).

Lo cual indica que el proceso de trituración influye en el cambio de las coordenadas L y a*.

Tabla 10: Valores de medias de los parámetros experimentales y cálculo de coordenadas CIE Lab, con respecto al tratamiento con pulpa de café en el ensayo preliminar

		Parámetros experimentales			Parámetros calculados	
PULPA	TIEMPO	L*	a*	b*	H*	C*
	0	33,91±0,03a	8,14±0,03a	11,07±0,01a	53,68±0,12a	13,74±0,01a
	8	40,45±0,01b	7,36±0,02b	15,21±0,02b	64,17±0,03b	16,89±0,03b
	15	33,33±0,16c	6,41±0,41c	9,08±0,50a	54,79±0,31c	11,11±0,64c
	20	35,93±0,09d	5,73±0,03d	11,38±0,06c	63,25±0,05d	12,74±0,07d
		Parámetros experimentales			Parámetros calculados	
PULPA TRITURAD	TIEMPO	L*	a*	b*	H*	C*
	0	31,99±0,10a	9,46±0,04a	8,04±0,12a	40,36±0,51a	12,42±0,06a
	8	41,54±0,03b	5,76±0,02b	16,17±0,03b	70,40±0,03b	17,16±0,03b
	15	31,87±0,09 ^a	7,68±0,02c	8,25±0,08c	47,06±0,32c	11,27±0,05c
	20	31,88±0,06 ^a	7,59±0,17c	8,99±0,21d	49,84±0,19d	11,76±0,27d

Para el tratamiento del mucilago en el proceso fermentativo se muestran los valores medios, desviación estándar y las diferencias significativas en la evaluación del color empleados por coordenadas del espacio CIELAB (Tabla 11).

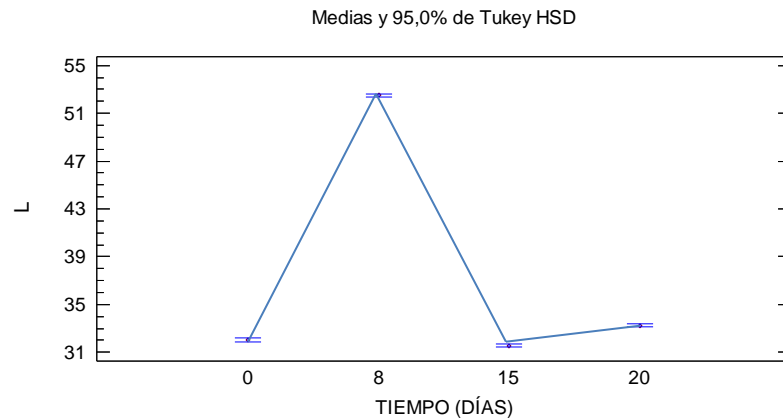


Figura 25: Perfil de la evolución de la coordenada L del mucilago con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación

Teniendo en cuenta la coloración se tomó como base representativa las coordenadas L y b* indicando un retroceso con respecto al tiempo atribuido a la homogenización del tratamiento. En este caso no se puede establecer relación entre ambos aspectos, pues las concentraciones no siguieron una tendencia clara durante proceso fermentativo. El análisis estadístico presento diferencias significativas entre los días de fermentación con un nivel de significancia del 5%, manteniéndose en un rango de $31,54 \pm 10,40$ y $53,02 \pm 10,54$ encontrándose 5 grupos homogéneos; por lo tanto se halla en el rango de la luminosidad poco oscura (Chiralt Boix *et al.*, 2007), debido a la oxidación del material lo cual aumenta la acidez haciendo que varié el oscurecimiento (Figura 25).

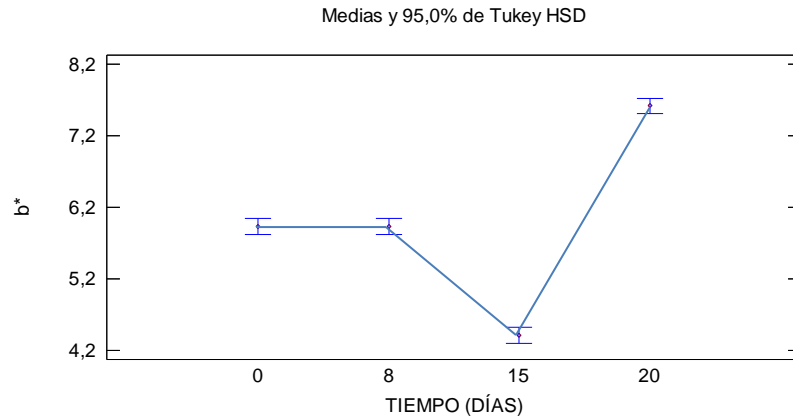


Figura 26: Perfil de la evolución de la coordenada b^* del mucilago con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación

Para la coordenada b^* , fue tomada, debido a la composición química del mucilago donde revela valores de concentración de proteínas, lípidos, carbohidratos entre otros, presentes según lo reportado por (Puerta Quintero & Rios Arias, 2011). Lo cual se ve reflejado en la curva de cromática de la coordenada b^* (Figura 26). En el análisis estadístico diferencias significativas con un nivel de confianza de 95%, con 4 grupos homogéneos, tomando una tonalidad amarillenta estando en un rango de $4,4 \pm 1,13$ y $7,73 \pm 1,13$ según lo reportado por (Chiralt Boix *et al.*, 2007).

Tabla 11: Valores medios de los parámetros experimentales y cálculo de coordenadas CIElab, con respecto al tratamiento con mucilago de café para el ensayo preliminar

MUCILAGO	Parámetros experimentales				Parámetros calculados	
	TIEMPO	L^*	a^*	b^*	H^*	C^*
	0	$32,04 \pm 0,07a$	$3,67 \pm 0,01a$	$5,93 \pm 0,05a$	$58,25 \pm 0,17a$	$6,97 \pm 0,05a$
	8	$52,50 \pm 0,05b$	$-0,72 \pm 0,01b$	$5,93 \pm 0,01a$	$96,89 \pm 0,10b$	$5,97 \pm 0,01b$
	15	$31,55 \pm 0,01c$	$2,86 \pm 0,04a$	$4,41 \pm 0,01b$	$57,07 \pm 0,42c$	$5,26 \pm 0,01c$
	20	$33,25 \pm 0,20d$	$3,74 \pm 0,11c$	$7,61 \pm 0,16c$	$63,86 \pm 0,24d$	$8,48 \pm 0,19d$

ENSAYO DE VERIFICACIÓN A MAYOR ESCALA CON PULPA Y MUCILAGO DE CAFÉ

Luego de obtener resultados del ensayo preliminar de la pulpa y del mucilago se procede a realizar los ensayos a mayor escala siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.2. Tras la puesta en marcha de los ensayos se realizó el seguimiento de los parámetros descritos a continuación. Para cada parámetro se realizó un análisis con el fin de explicar los cambios que suceden durante el proceso fermentativo.

Se puede concluir de manera general que los ensayos realizados a escala de laboratorio permitieron observar cambios importantes en el pH, °Brix, color durante el proceso fermentativo. Estos cambios son debido a la transformación de la materia orgánica presente en la fermentación, lo cual inicia con el desdoblamiento de los azúcares comúnmente se conoce como hidrólisis, consistente en la ruptura de los puentes glucosídicos, en esta cada molécula de glucosa gana una molécula de agua (Gracia, s.f.). Siendo así el alcohol etílico o etanol un producto químico que es obtenido a partir de la fermentación de azúcares, los cuales se encuentran en productos vegetales, como cereales, pulpa, mieles, caña de azúcar, sorgo o biomasa. Estos azúcares están combinados en forma de sacarosa, almidón, hemicelulosa y celulosa (Guerra *et al.*, 2008).

En la digestión anaerobia intervienen numerosas reacciones bioquímicas que hacen que este proceso sea muy complejo, dentro de esta tienen lugar cuatro etapas: inician con la Hidrólisis posteriormente la etapa fermentativa o acidogénica luego la etapa acetogénica por último la etapa metanogénica (Waste, 2013).

8.2.5. pH

El material de pulpa (P) y pulpa triturada con levadura (PL) para el parámetro de pH se observa que poseen comportamiento similar; al adicionar levadura mostraron mejores rendimientos en el tiempo de fermentación y producción de bioetanol. Para poder realizar una comparación entre los dos tratamientos, se toma como base 5 días de prueba (Figura 27). De esta manera cabe resaltar que en el análisis estadístico los datos obtenidos muestran en el pH diferencias significativas entre los dos tratamientos con una incertidumbre de ($p < 0.05$); los resultados muestran a medida que se incrementa el tiempo de fermentación disminuye el pH, en el rango de tiempo (0-2) días hay transformación de compuestos químicos en producción de alcohol, ácidos lácticos y CO_2 , que posteriormente se estabilizan inhibiendo el crecimiento de microorganismos en el rango de tiempo (2-5) días y

finalmente genera acetogénesis del alcohol siendo este comportamiento similar al reportado por (Rodríguez Valencia, 2013; Puerta Quintero, 2013).

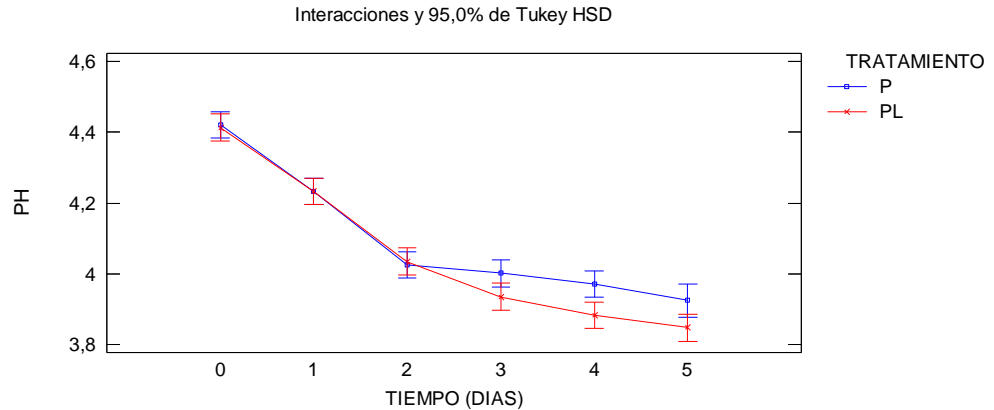


Figura 27: Perfil de la evolución de pH de la pulpa con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación

Por otra parte para el mucilago (M) y mucilago con levadura (ML) se observa que el comportamiento del pH es similar (Figura 28). De esta manera cabe resaltar que en el análisis estadístico los datos obtenidos muestran en el pH diferencias significativas entre los dos tratamientos con un nivel de confianza del 95%; según (Rodríguez Valencia & Zambrano Franco, 2011) el pH ideal para este tipo de experimentos oscila entre 3,5 y 5,5 por lo cual estamos acorde con los autores; los resultados muestran a medida que se incrementa el tiempo de fermentación disminuye el pH por la transformación de compuestos químicos en producción de alcohol, ácidos lácticos y a la salida de CO₂, que posteriormente se estabilizan y finalmente generan acetogénesis del alcohol siendo este comportamiento similar al reportado por (Rodríguez Valencia, 2013; Puerta Quintero, 2013).

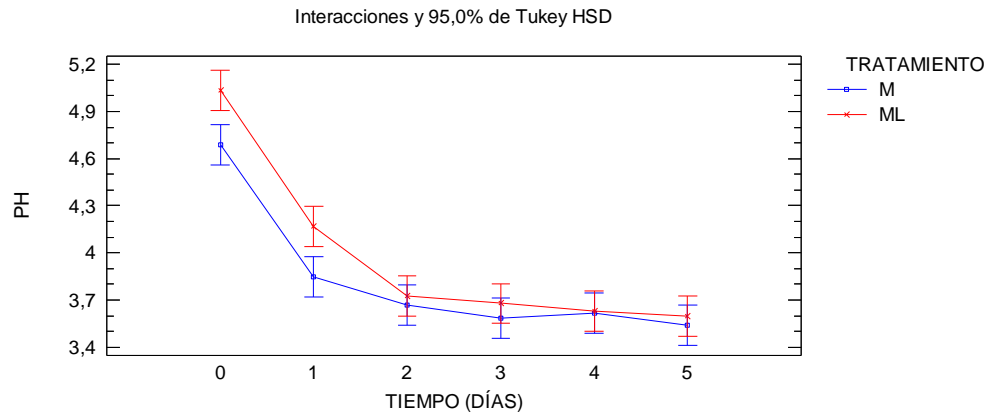


Figura 28: Perfil de la evolución de pH del mucilago con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación

8.2.6. Solidos disueltos

Para los ensayos a mayor escala con pulpa y pulpa con levadura se observa que el comportamiento de los grados °Brix es similar (Figura 29), se encontró diferencias estadísticamente significativas entre los dos tratamientos con un nivel de significancia del 5%.

En el tratamiento (PL), al inicio del proceso fermentativo no presento variación debido a la adaptación de las levaduras que fueron adicionadas, por lo que después del día 1 se generó un descenso brusco de los °Brix que finalizó el día 3, posteriormente se estabilizó hasta valores de 6,67 °Brix. Para el caso del tratamiento (P), se presenta una curva suave, observándose que desde el primer día de fermentación los °Brix disminuyen hasta el día 3 por transformación de los azúcares en alcohol, ácidos y dióxido de carbono es decir, la tasa de degradación de los azúcares disminuye cuando se va agotando y acidificando el sustrato que se explica por el crecimiento y metabolismo de las bacterias y levaduras fermentadoras en donde el proceso fermentativo se finaliza en el momento en que los °Brix se mantienen constantes, lo cual se asemeja a comportamiento reportado por (Puerta Quintero, 2012; Rodríguez Valencia, 2013; Puerta Quintero, 2013; Arguedas Gamboa, 2013).

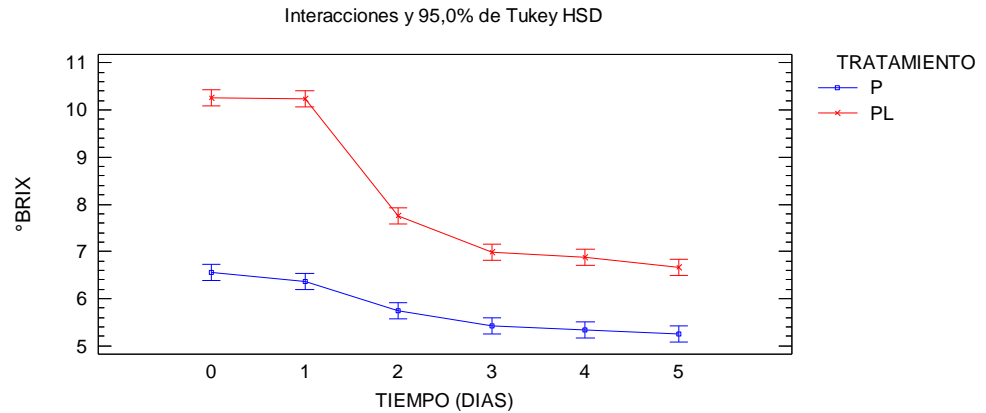


Figura 29: Perfil de la evolución de °Brix de la pulpa con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación

En el caso de los °Brix con el mucilago y mucilago con levadura se observa que poseen comportamientos similares (Figura 30), encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los dos tratamientos con un nivel de significancia del 5%, además mostro que las medias de los tratamientos son diferentes, en donde los días afecta significativamente el valor del contenido de azúcar, es decir que a medida que se incrementa el tiempo de fermentación en el mucilago de café disminuye los °Brix, lo cual se debe a la producción y disipación de CO_2 lo que disminuye el contenido de solidos disueltos en el medio incidiendo directamente en el valor de los grados Brix lo cual se asemeja el comportamiento a lo reportado por (Rojas & Rojas, 2014). Según lo publicado por (Castillo & Lopez, 2013) encontraron 2% de alcohol con 8 a 10 °Brix.

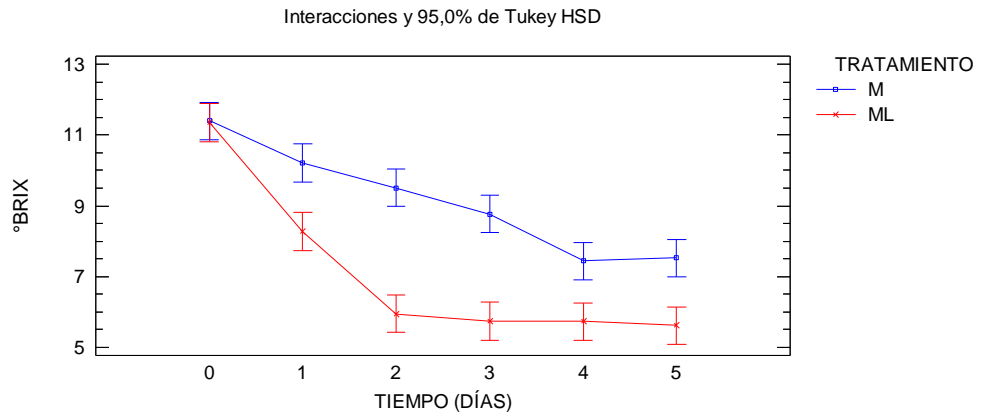


Figura 30: Perfil de la evolución de °Brix del mucilago con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación

8.2.7. Acidez

El comportamiento de la acidez con (P) y (PL) se asemeja a una forma sigmoidea siendo similar al reportado por (Puerta Quintero, 2013), la diferencia del tratamiento de pulpa con levadura se presenta en los primeros días (0-1 día) donde se observa una fase de adaptación debido a la adición de la levadura, lo que lleva que aumente la acidez el día 1. Al iniciar con una baja acidez genera una alta velocidad de fermentación lo que aumenta gradualmente al transcurrir los días (Figura 31), siendo estos valores similares al reportado por (Acosta, 2012). El análisis estadístico muestra diferencias significativas entre los tratamientos y las medias del tratamientos difieren, es decir, los días afectan significativamente el valor de la acidez ($p < 0.05$). Lo que indica que cuando aumenta el tiempo de fermentación el ácido láctico cambia durante el proceso de fermentación.

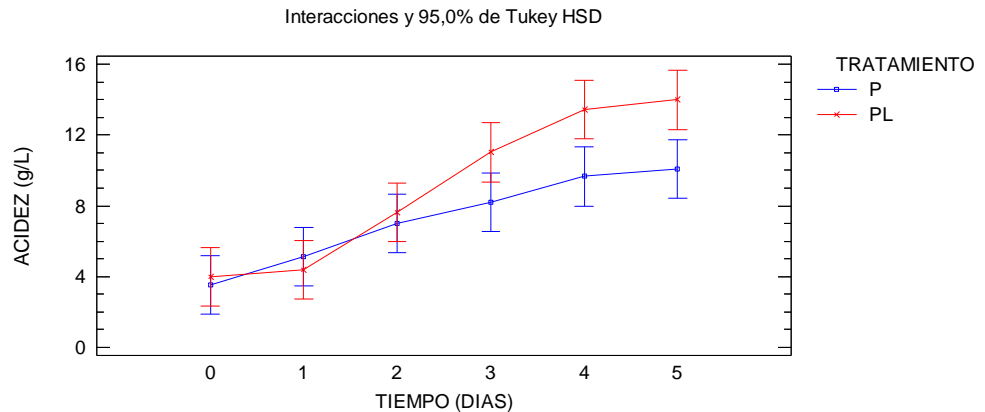


Figura 31: Perfil de la evolución de acidez de la pulpa con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación

En el caso de la acidez con el mucilago (M y ML), se tuvo un comportamiento similar pero para los primeros días (0-1 días) se generó una diferencia con el ensayo empleando mucilago con levadura, ya que tal y como muestra la gráfica se observa una fase inicial de adaptación debido a la adición de la levadura, lo que lleva que aumente la acidez el día 1 (Figura 32). La curva fue de crecimiento exponencial en el tiempo de fermentación y su valor presentó diferencias significativas durante este proceso, lo cual se asemeja a lo reportado por (Puerta Quintero & Rios Arias, 2011). El análisis estadístico con un valor de significancia del 5%, mostró que hay diferencias entre los dos tratamientos y que las medias del tratamiento difieren, es decir, los días afectan significativamente el valor de la acidez haciendo que incremente; lo que indica que cuando transcurre el tiempo de fermentación aumenta el ácido láctico y ácido acético (Jackels & Jackels, 2005).

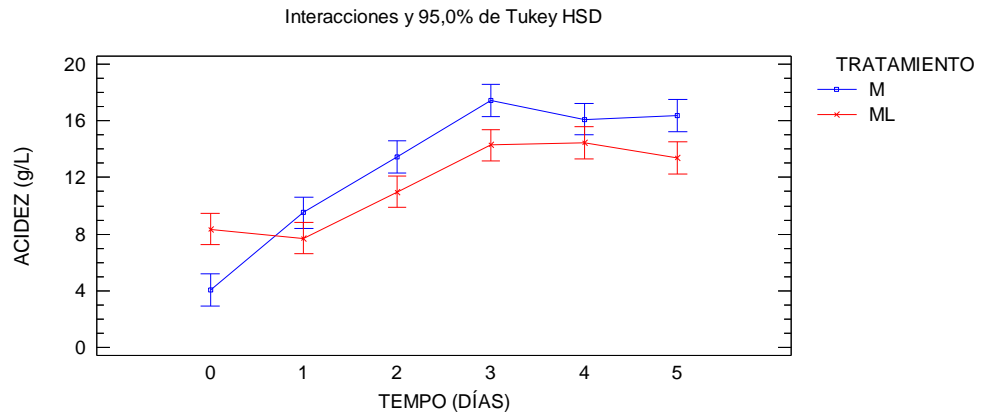


Figura 32: Perfil de la evolución de acidez del mucilago con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación

8.2.8. Color

El color de la pulpa y pulpa triturada con levadura se muestran los resultados obtenidos durante el proceso fermentativo en el sistema CIELab (Tabla 12).

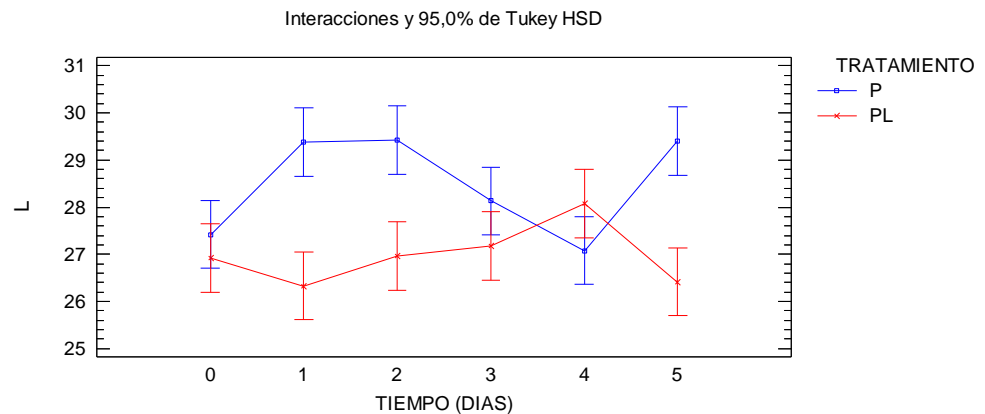


Figura 33: Perfil de la evolución de la coordenada L, para los tratamientos de pulpa con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación

La evolución de la luminosidad para los dos tratamientos es diferente (Figura 33), se observa una simetría inversa; esta diferencia se da debido a que el tratamiento dos (PL) se realizó una trituración de la biomasa al inicio del proceso y la adición de levaduras, esto genero un oscurecimiento de la biomasa. Para el caso del

tratamiento (P), se asemeja al comportamiento del ensayo preliminar siendo un poco clara, pero encontrando diferencias debido a la toma de muestras en intervalos de tiempos más cortos. En el análisis estadístico presenta diferencias significativas entre los días de fermentación y entre tratamientos; además se encuentran 3 grupos homogéneos, con un nivel del 95% de confianza, tomando una luminosidad poco clara estando en un rango de 26,98 y 28,22 según lo reportado por (Chiralt Boix *et al.*, 2007).

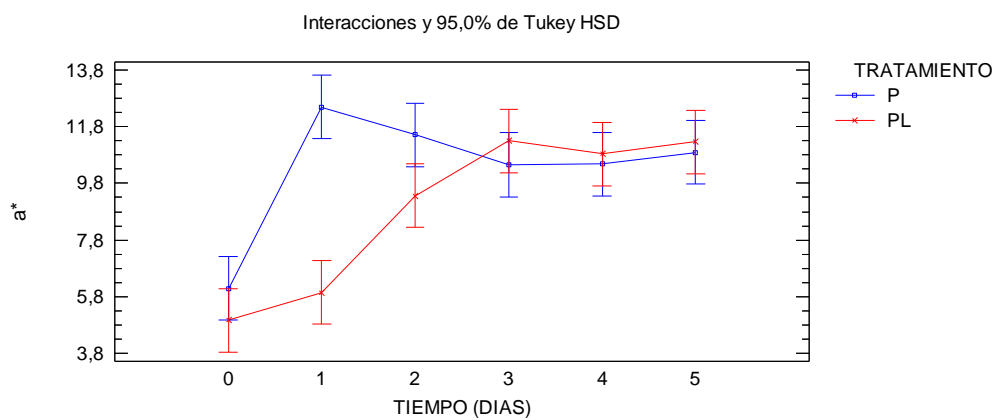


Figura 34: Perfil de la evolución de la coordenada a^* , para los tratamientos de pulpa con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación

La coordenada a^* del sistema CIELab, tomando una tonalidad entre rojo y verde; se analizó debido a la composición química de la pulpa donde revela valores de concentración de taninos presentes según lo reportado por (Noriega *et al.*, 2009), lo cual se ve reflejado en la curva de cromática de la coordenada a^* (Figura 34) donde se puede observar que para el tratamiento con (P) en el intervalo de tiempo 0 y 1 día, hay un brusco incremento pasando de 6,08 a 12,50 que luego hay un descenso suave para los siguientes días; en cambio en el tratamiento (PL), se presenta un incremento moderado en el intervalo de tiempo de 0 a 3 días, y se estabiliza hasta el día 5. Teniendo en todo su proceso una tonalidad rojiza. En el análisis estadístico hay diferencias significativas con un nivel de confianza de 95%, con 3 grupos homogéneos, tomando una tonalidad rojiza estando en un rango de 8,56 y 10,71 según lo reportado por (Chiralt Boix *et al.*, 2007).

Lo cual indica que al triturar y agregar las cepas de levaduras influye en el cambio de las coordenadas L y a^* .

Tabla 12: Valores de medias de los parámetros experimentales y cálculo de coordenadas CIELab, con respecto al tratamiento con pulpa de café

	Parámetros experimentales				Parámetros calculados	
	TIEMPO	L*	a*	b*	H*	C*
PULPA TRITURADA	0	27,42±0,14a	6,08±1,00a	2,32±0,54a	20,68±1,30a	6,50±1,13a
	1	29,38±0,13b	12,50±0,84b	5,47±0,79b	23,52±1,64ac	13,66±1,09b
	2	29,42±1,57cb	11,51±2,02bc	5,50±2,55b	24,30±6,05ab	12,82±2,95cb
	3	28,13±1,60a	10,46±2,06c	4,61±2,18bc	22,64±5,36ae	11,48±2,78dc
	4	27,08±1,70ae	10,49±1,87c	4,69±1,94bc	23,16±4,79e	11,53±2,51ec
	5	29,39±0,94db	10,90±1,20c	5,82±1,62b	27,57±4,08b	12,38±1,82fbc
	Parámetros experimentales				Parámetros calculados	
PULPA TRITURADA CON LEVADURA	TIEMPO	L*	a*	b*	H*	C*
	0	26,92±0,42a	4,96±0,13a	3,72±0,43a	36,78±2,73a	6,20±0,34a
	1	26,33±0,14b	5,93±0,61a	1,24±0,10b	12,00±2,11b	6,07±0,58a
	2	26,97±0,38a	9,36±1,79b	2,44±0,73c	14,39±1,44c	9,68±1,92b
	3	27,17±0,43a	11,30±1,17c	3,29±0,72a	16,10±2,03c	11,77±41,30c
	4	28,08±0,59c	10,85±1,54d	3,88±0,96a	19,40±1,98e	11,52±1,77c
5	26,41±0,59b	11,27±1,42cd	3,36±0,77a	16,40±1,83c	11,76±1,58c	

Para el tratamiento del mucilago y mucilago con levadura en el proceso fermentativo se muestran los valores medios, desviación estándar y las diferencias significativas en la evaluación del color empleados por coordenadas del espacio CIELAB (Tabla 13).

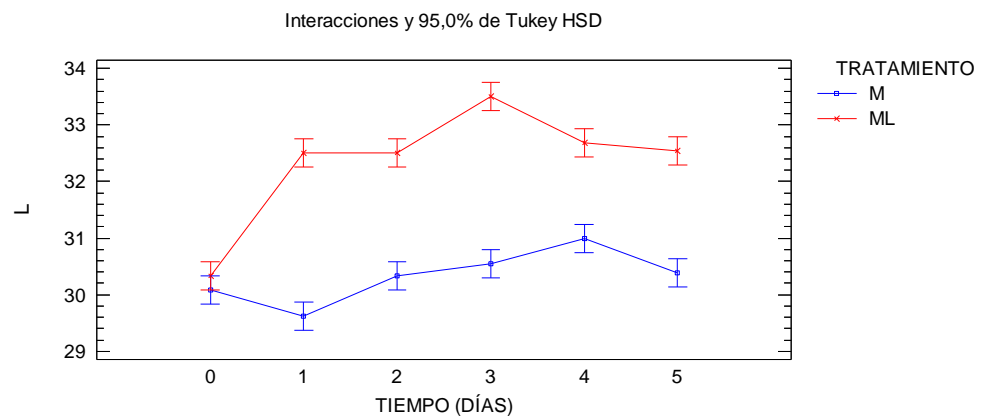


Figura 35: Perfil de la evolución de la coordenada L, para los tratamientos de mucilago con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación

Teniendo en cuenta la coloración como en el ensayo preliminar se tomó como base representativa las coordenadas L y b* indicando una similitud con respecto al

tiempo. En este caso no se puede establecer relación entre ambos aspectos, pues las concentraciones no siguieron una tendencia clara durante proceso fermentativo. El análisis estadístico presento diferencias significativas entre los días de fermentación con un nivel de significancia del 5%, manteniéndose en un rango de $30,23 \pm 0,04$ y $32,43 \pm 0,04$ encontrándose 4 grupos homogéneos; por lo tanto se halla en el rango de la luminosidad poco oscura (Chiralt Boix *et al.*, 2007), debido a la oxidación del material lo cual aumenta la acidez haciendo que varíe el oscurecimiento (Figura 35).

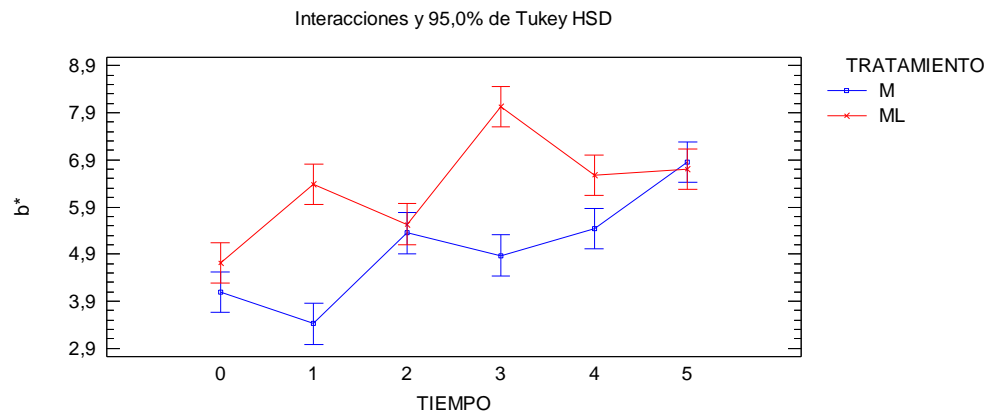


Figura 36: Perfil de la evolución de la coordenada b*, para los tratamientos de mucilago con respecto al tiempo, en el proceso de fermentación

Para la coordenada b*, fue tomada, debido a la composición química del mucilago donde revela valores de concentración de proteínas, lípidos, carbohidratos entre otros, presentes según lo reportado por (Puerta Quintero & Rios Arias, 2011). Lo cual se ve reflejado en la curva de cromática de la coordenada b* (Figura 36). En el análisis estadístico hay diferencias significativas con un nivel de confianza de 95%, con 5 grupos homogéneos, tomando una tonalidad amarillenta estando en un rango de $4,85 \pm 0,07$ y $6,46 \pm 0,07$ según lo reportado por (Chiralt Boix *et al.*, 2007).

Tabla 13: Valores de medias de los parámetros experimentales y cálculo de coordenadas CIElab, con respecto al tratamiento con mucilago de café

		Parámetros experimentales				Parámetros calculados	
		TIEMPO	L*	a*	b*	H*	C*
MUCILAGO	0	30,09±0,15a	2,68±0,17 ^a	4,09±0,17a	56,74±0,84a	4,89±0,23a	
	1	29,61±0,25b	2,10±0,19b	3,42±0,41b	58,35±1,31f	4,02±0,44b	
	2	30,32±0,41a	2,65±0,27 ^a	5,35±1,07c	63,30±2,14b	5,97±1,08c	
	3	30,55±0,29ca	2,44±0,14c	4,87±0,33dc	63,39±0,36b	5,45±0,36dc	
	4	30,99±0,30d	2,64±0,23ab	5,44±0,59ec	64,04±1,39b	6,05±0,58ec	
	5	30,38±0,26a	2,90±0,14d	6,86±0,52f	67,01±1,10c	7,45±0,52f	
		Parámetros experimentales				Parámetros calculados	
		TIEMPO	L*	a*	b*	H*	C*
MUCILAGO CON LEVADURA	0	30,32±0,16a	2,09±0,13 ^a	4,71±0,12a	66,03±1,54a	5,16±0,11a	
	1	32,51±0,22b	2,18±0,08 ^a	6,38±0,34b	71,14±0,48b	6,74±0,35b	
	2	32,51±0,28b	1,68±0,13b	5,53±0,53c	73,13±0,46c	5,78±0,54c	
	3	33,51±0,33c	2,38±0,15c	8,02±0,38d	73,51±0,39c	8,37±0,41d	
	4	32,69±0,37b	1,79±0,16b	6,57±0,21b	74,78±1,36d	6,81±0,21a	
	5	32,55±0,53b	1,89±0,26b	6,70±0,96b	74,23±1,03dc	6,96±0,98a	

8.2.9. DQO total y DQO soluble

Para el parámetro de DQO Total en el ensayo a mayor escala presento un incremento en este valor en el tratamiento de pulpa con levadura y mucilago con levadura debido a que se encuentra mayor contenido de microorganismo en el medio. Para los dos tratamientos tanto en el mucilago como en el mucilago con levadura poseen DQO mayores a las presentadas en la pulpa y pulpa con levadura, debido a la cantidad de oxígeno que requiere para oxidar la materia orgánica, siendo este valor diferente al reportado por (Ramirez *et al.*, 2015)

De esta manera se puede decir que el 74,6% de contaminación en el proceso de beneficio por 60kg de café almendra de exportación, es producido por la pulpa ya que se genera mayor volumen que el mucilago, pero por un kilogramo de café cereza genera mayor grado de contaminación el mucilago, debido al mayor contenido de materia orgánica presente que en la pulpa (Tabla 14).

Tabla 14: Valores de medias del parámetro experimental DQO Total, con respecto al tratamiento de pulpa y mucilago de café

	DQO Total (mg/L)		DQO Soluble (mg/L)
	TIEMPO	Promedio	Promedio
Pulpa	1	93270,00±3222,28	52683,67±1816,24
	10	189667,00±11503,6	
Mucilago	TIEMPO	Promedio	Promedio
	1	175506,67± 6931,01	96677,33±3428,45

	10	282240,00± 9918,31	
		<i>DQO Total (mg/L)</i>	<i>DQO Soluble (mg/L)</i>
<i>Pulpa con levadura</i>	<i>TIEMPO</i>	<i>Promedio</i>	<i>Promedio</i>
	1	332666,67±19139,84	292333,33±18610,03
	10	381166,67±18610,03	
<i>Mucilago con levadura</i>	<i>TIEMPO</i>	<i>Promedio</i>	<i>Promedio</i>
	1	481533,67±12370,43	441539,00±12379,66
	10	443433,33±32557,08	

El análisis estadístico de los datos obtenidos muestra que se presentan diferencias significativas entre los tratamientos pero por el contrario no se presenta diferencias significativas entre el tiempo al inicio y al final de fermentación con una incertidumbre del 5%. Como era de esperarse aproximadamente entre el (50-60)% es soluble biodegradable, lo cual el resto requiere de un proceso de hidrolisis inicial.

8.2.10. Sólidos totales y sólidos volátiles

Los sólidos totales para mucilago se observa una simetría en inversa entre los valores del material de mucilago y mucilago con levadura (Figura 37), siendo este valor diferentes al reportado por (Gonzalez & Palma, 1989) donde especifican que en aguas de despulpado se encuentran aproximadamente 12,334gr/L y en aguas de lavado posee aproximadamente 9,393gr/L; lo cual se encuentra en un promedio 839,823 gr/L y 867,159 gr/L para mucilago y mucilago con levadura procesado por desmucilagador mecánico. El análisis estadístico de los datos obtenidos muestra que el análisis de varianza no hay diferencias estadísticamente significativas entre los días ni entre los tratamientos, con una incertidumbre del 5%.

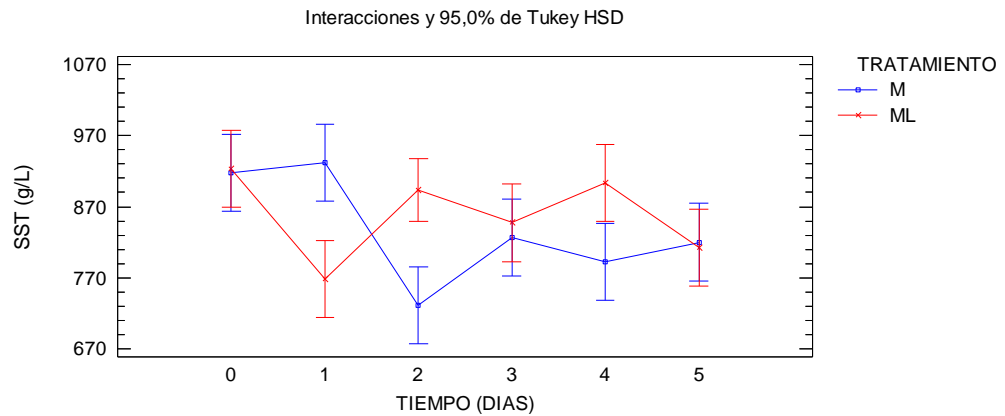


Figura 37 Perfil de la evolución de sólidos solubles totales durante el proceso de fermentación para los tratamientos de mucilago con respecto al tiempo

En la (Tabla 15) se encuentran los valores promedios del parámetro sólidos solubles totales y sólidos solubles volátiles para el tratamiento de mucilago y mucilago con levadura.

Tabla 15: Valores de medias del parámetro experimental sólidos solubles totales y sólidos solubles volátiles, con respecto al tratamiento de pulpa y mucilago de café

		Sólidos solubles Totales (g/L)	Sólidos solubles volátiles (g/L)
<i>Mucilago</i>	<i>TIEMPO</i>	<i>Promedio</i>	<i>Promedio</i>
	0	917,43±17,35	977,70±18,64
	1	931,77±23,54	984,18±23,77
	2	730,86±15,37	778,34±22,34
	3	826,34±14,63	876,59±23,99
	4	792,73±55,34	867,93±9,70
	5	820,07±6,30	864,80±5,79
<i>Mucilago con levadura</i>	<i>TIEMPO</i>	<i>Promedio</i>	<i>Promedio</i>
	0	923,04±22,24	980,93±27,65
	1	768,50±3,74	806,44±3,67
	2	885,86±62,25	926,05±66,13
	3	847,20±3,42	884,40±2,81
	4	903,43±29,15	941,31±29,75
	5	811,91±3,57	847,48±3,31

Para el caso de los sólidos suspendidos volátiles se encontró una simetría inversa entre el tratamiento de mucilago y mucilago con levadura. Según lo reportado por (Alvarez *et al.*, 2011) encontró que en aguas residuales de pre-beneficio un valor

de 1790gr/L lo cual en esta investigación está por debajo siendo 896,946gr/L para mucilago y 909,328 gr/L para mucilago con levadura.

El cambio en la concentración de sólidos volátiles con el tiempo, puede estar asociado a la hidrólisis de la materia orgánica biodegradable que está disponible para ser transformada a bioetanol. La materia volátil tiene una relación directa con la materia orgánica biodegradable. En este sentido, disminuye con el tiempo, en términos generales el proceso fermentativo, lo cual se reduce en aproximadamente entre un 10-15% los sólidos volátiles. El análisis estadístico de los datos obtenidos muestra que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los días de fermentación y entre tratamientos, con un nivel de confianza del 95%, para los cuales se obtuvieron 3 grupos homogéneos (Figura 38).

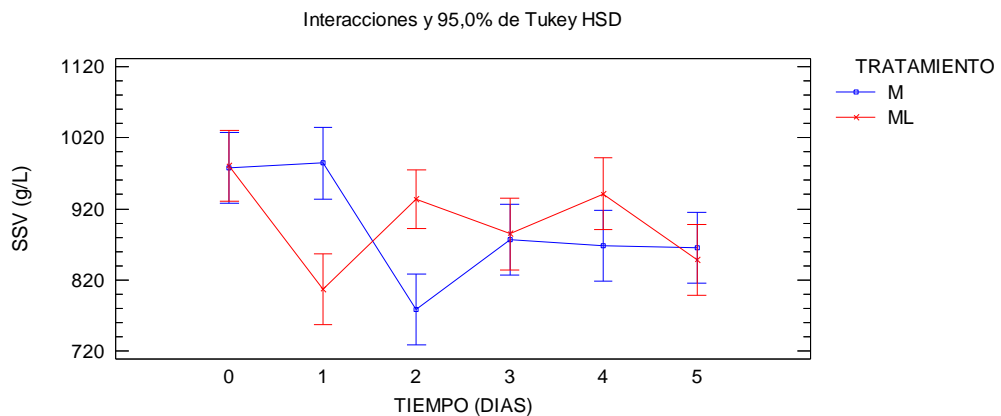


Figura 38: Perfil de la evolución de sólidos solubles volátiles durante el proceso de fermentación para los tratamientos de mucilago con respecto al tiempo

8.2.11. Análisis microbiológicos

La realización de esta prueba, permitió determinar las características microbiológicas de las muestras de la pulpa y mucilago de café.

8.2.12. Recuento de BAL

Las BAL aisladas presentaron forma circular, color blanco opaco, con bordes regulares, de tantos aproximadamente 110 mm de diámetro. La tinción Gram de

los aislados correspondió a bacilos, sin presentar ningún tipo de agrupación y gram positivos. La prueba de catalasa fue negativa.

Se presenta la curva de crecimiento de las bacterias ácido lácticas en la pulpa de café, se puede detallar que entre los días 0 y 4 se encuentra la fase exponencial y posteriormente se encuentra la fase de muerte para los días 4 hasta los 10 días tanto para las 16 como para las 40 horas de recuento de colonias, formando curvas similares (Figura 39); se obtuvo un crecimiento máximo de 7,93 logUFC/ml presentándose a los 3 días para las 16 horas y 7,82 logUFC/ml para las 40 horas. El análisis estadístico de los datos obtenidos muestra que hay diferencias significativas entre el tiempo de fermentación y las horas de recuento lo cual representa el crecimiento de las bacterias lácticas nativas en la pulpa con un nivel de confianza del 95%.

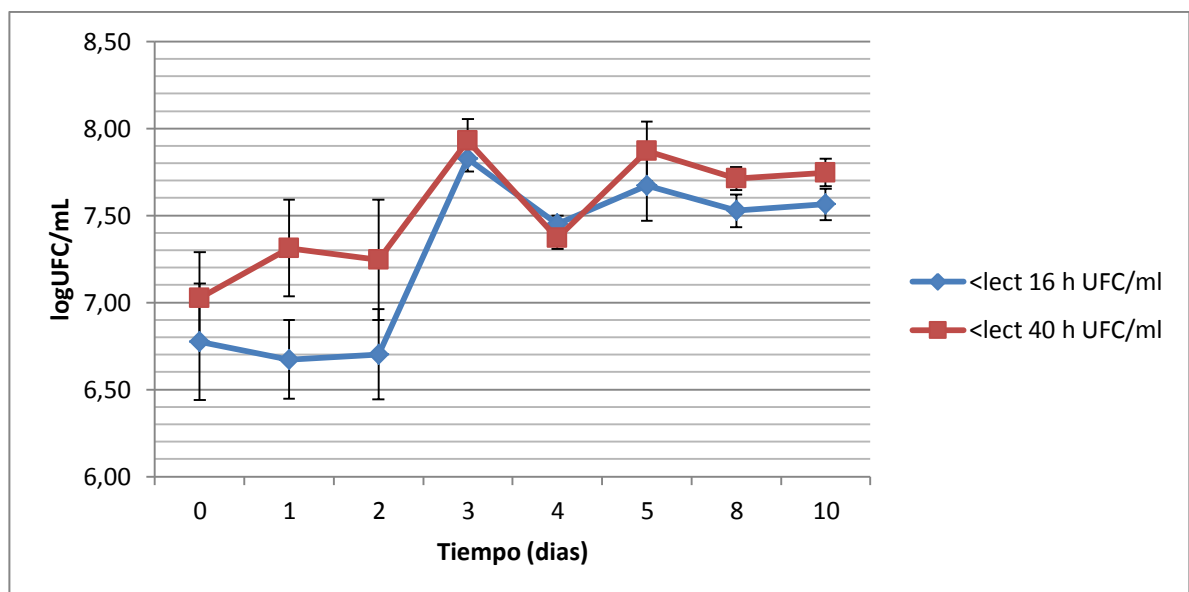


Figura 39: Recuento de bacterias ácido lácticas durante el proceso de fermentación con la biomasa de pulpa de café

Para el caso de las bacterias lácticas con el material de mucilago se presentó en la curva de crecimiento (Figura 40), se puede detallar que entre los días 0 y 4 se encuentra la fase exponencial y posteriormente se encuentra la fase de muerte para los días 4 hasta los 10 días; presentándose para las 16 y las 40 horas y siendo el comportamiento similar. Siendo estas curvas similares en frutos maduros con zaranda reportado por (Puerta Quintero, 2012). El análisis estadístico de los datos obtenidos muestran diferencias significativas entre el tiempo de fermentación y las horas de recuento, lo cual representa el crecimiento de las bacterias lácticas nativas en el mucilago con una incertidumbre del 5%. Las

principales bacterias lácticas del mucilago podrían ser *Lactobacillus acidophilus*, *L. fermentum*, *L. plantarum* y *Streptococcus faecalis*, entre otras; las cuales producen ácido láctico, alcohol, ácido acético, ácido fórmico y dióxido de carbono según (Puerta Quintero, 2012).

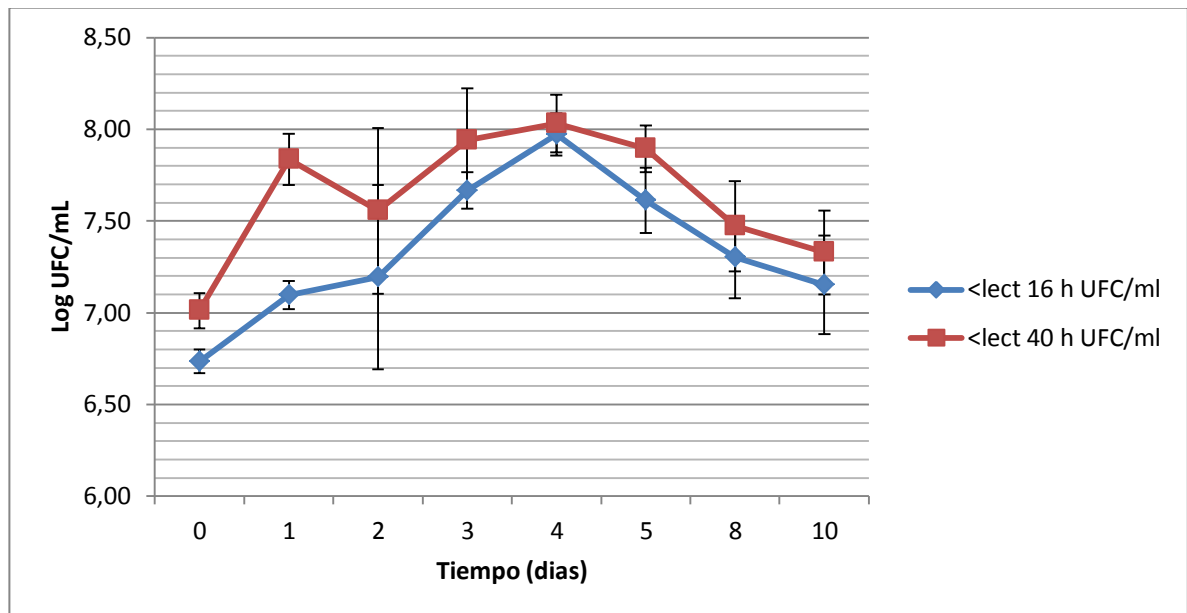


Figura 40: Recuento de bacterias ácido lácticas durante en el proceso de fermentación de la biomasa del mucilago

8.2.13. Recuento de levadura

Las levaduras aisladas presentaron forma circular, color blanco lechoso con bordes regulares, de tantos aproximadamente 6 mm de diámetro. La tinción gram de los aislados correspondió a forma elíptica y gram positivos.

En la (Figura 41) se presenta la curva de crecimiento de las levaduras en la pulpa de café, se puede detallar que entre los días 0 y 3 se encuentra la fase latencia, luego entre los días 3 al 4 se encuentra la fase exponencial y posteriormente se encuentra la fase de muerte para los días 4 hasta los 10 días; presentándose para las 16 y las 40 horas de recuento de colonias; se obtuvo un crecimiento máximo de 7,61 logUFC/ml presentándose a los 3 días para las 16 horas y 8,18 logUFC/ml para las 40 horas, siendo curvas similares. Comparando los °Brix con el máximo crecimiento de levaduras durante los primero 2-3 días coincide con el máximo descenso de grados brix. Lo cual es coherente ya que es la etapa de máximo crecimiento exponencial donde están consumiendo todos los azúcares disponibles. El análisis estadístico de los datos obtenidos muestra diferencias

significativas entre el tiempo de fermentación y las horas de recuento lo cual representa el crecimiento de las levaduras en la pulpa con una incertidumbre del 5%. Según lo reportado por (Blandon *et al.*, 1999) se encontraron microorganismos unicelulares (levaduras) como son *Torulopsis* y *Rhodotorula*.

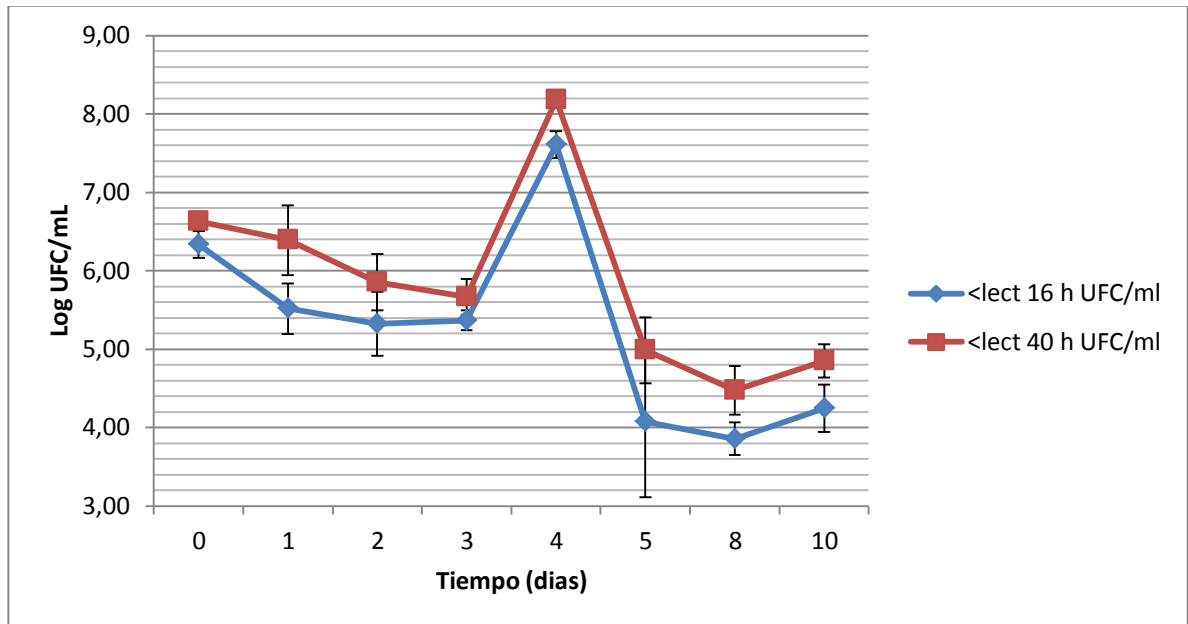


Figura 41: Recuento de levaduras durante el proceso de fermentación con la biomasa de pulpa de café

Para el caso de las levaduras son el material de mucilago se presentó en la curva de crecimiento (Figura 42), se puede detallar que entre los días 0 y 3 se encuentra la fase latencia, luego entre los 3 a los 5 días se encuentra la fase exponencial y posteriormente se encuentra la fase de muerte para los días 5 hasta los 10 días; presentándose para las 16 y las 40 horas. Siendo estas curvas diferente a lo reportado por (Puerta Quintero, 2012). El análisis estadístico de los datos obtenidos muestra diferencias significativas entre el tiempo de fermentación y las horas de recuento lo cual representa el crecimiento de las levaduras en la mucilago con un nivel de confianza del 95%. Las principales levaduras fermentadoras presentes en el mucilago según (Puerta Quintero, 2012) son: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lipolytica*, *C. parasilopsis* y *C. pintolopesii*, que produce etanol y CO₂ y las no fermentadoras como *Cryptococcus terreus*, *Rhodotorularubra* y *R. glutinis*.

La cepa *S. cerevisiae* var. *Bayanus* según el fabricante es idónea en la elaboración de vinos tinto de uva, en la presente investigación se aprecia que con la pulpa de café se obtuvo mayor crecimiento de esta cepa que con el mucilago,

es de resaltar que la pulpa de café tiene taninos al igual que la uva, siendo este medio óptimo para el crecimiento de esta levadura.

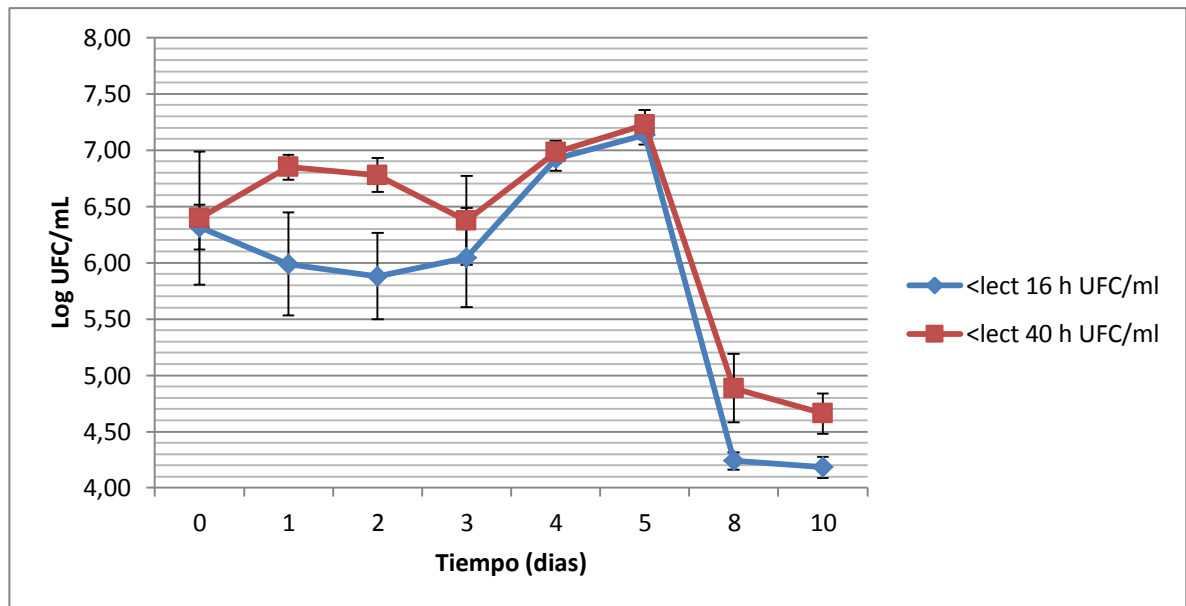


Figura 42: Recuento de levaduras durante el proceso de fermentación de la biomasa de mucilago

8.3. Destilación

ENSAYO PRELIMINAR CON PULPA Y MUCILAGO DE CAFÉ

Una vez finalizada la etapa de fermentación en cada ensayo con pulpa, pulpa triturada y mucilago de café, las muestras obtenidas fueron procesadas mediante el método de destilación simple usando como base un volumen de 250ml (Tabla 16). En el ensayo preliminar los resultados no fueron significativos debido a que este proceso no estaba ajustado aun y la idea era establecer un protocolo para el resto de ensayos. En este sentido la destilación realizada en estos ensayos no fueron favorables, es decir no se obtuvo un volumen de bioetanol representativo debido al tiempo prolongado de la fermentación en este ensayo, es probable que el etanol formado se haya convertido en ácidos y compuestos gaseosos según lo reportado por (Puerta Quintero, 2012).

Tabla 16: Valores de volúmenes en el proceso de destilación con la biomasa de pulpa y pulpa triturada de café

Tratamiento	Volumen utilizado (ml)	Volumen destilado (ml)	Eficiencia destilación (%)
Pulpa de café	250	190	52,4
Pulpa triturada de café	250	180	48,2

Mucilago de café	250	160	42,8
------------------	-----	-----	------

ENSAYO DE VERIFICACIÓN A MAYOR ESCALA CON PULPA Y MUCILAGO DE CAFÉ

La destilación para este proceso se llevó a cabo mediante el método de destilación simple, las muestras con pulpa de café y pulpa con levadura, revelaron valores de etanol importantes (Tabla 17). Siendo la cantidad de bioetanol obtenido superior al reportado por (Rodríguez Valencia, 2013) y que fue de 1,84 ml de bioetanol hidratado a partir de 500 gr de la mezcla pulpa-agua.

Tabla 17: Valores de volúmenes en el proceso de destilación con la biomasa de pulpa de café

Tratamiento	Volumen utilizado (ml)	Volumen destilado (ml)	Eficiencia destilación (%)
Pulpa de café	250	190	63,8
Pulpa triturada con levadura	250	88	63,9

En el caso de la biomasa de mucilago de café y mucilago con levadura, al terminar el proceso fermentativo se realizó el proceso de destilación simple usando como base un volumen de 250ml y teniendo como resultado una mezcla de agua más etanol (Tabla 18). Siendo este valor más eficiente al reportado por (Rodríguez Valencia & Zambrano Franco, 2011) obteniendo 6,39 ml de bioetanol hidratado a partir de 950 ml de la mezcla mucilago-agua.

Tabla 18: Valores de volúmenes en el proceso de destilación con la biomasa de mucilago de café

Tratamiento	Volumen utilizado (ml)	Volumen destilado (ml)	Eficiencia destilación (%)
Mucilago de café	250	172,5	68,4
Mucilago con levadura	250	71,5	65,7

8.4. Bioetanol obtenido

ENSAYO PRELIMINAR CON PULPA Y MUCILAGO DE CAFÉ

En este ensayo con la biomasa de pulpa y pulpa triturada de café después de 20 días de fermentación, el valor experimental promedio está basado con respecto a la densidad (Tabla 19). En la cual, los resultados para las pruebas no fueron

favorables, es decir que no se obtuvo etanol debido al tiempo prolongado de la fermentación ya que el etanol presente fue acetificado según lo reportado por (Puerta Quintero, 2012).

Tabla 19: Bioetanol obtenido de la biomasa de pulpa y pulpa triturada de café

Parámetros	Pulpa de café	Pulpa triturada de café
Densidad (gr/cm ³)	0,9936	0,9945
Peso del etanol %	3,46	2,97

En caso del mucilago de café después de 20 días de fermentación (Tabla 20), se obtuvo como resultado un valor mínimo en la producción de bioetanol ya que según (Puerta Quintero, 2012) afirma que los °Brix al estabilizarse, la producción de alcohol se detiene y empieza un proceso de acetificación.

Tabla 20: Bioetanol obtenido de la biomasa de mucilago de café

Parámetro	Mucilago de café
Densidad (gr/cm ³)	0,9897
Peso del etanol %	5,94

ENSAYO DE VERIFICACIÓN A MAYOR ESCALA CON PULPA Y MUCILAGO DE CAFÉ

En este ensayo con la biomasa de pulpa y pulpa triturada con levadura de café después de finalizar el proceso de fermentación, se obtiene como resultado un mejor rendimiento en la producción de bioetanol con la adición de la levadura (Tabla 21), ya que hay una mayor eficiencia en la conversión de azúcares (Puerta Quintero, 2012). Al analizar los datos del peso del etanol (%) para la pulpa de café se obtuvo un 3,85% lo cual es muy destacable el aumento de casi el 50% con pulpa y levadura que llegó a 6.6%; ya que la pulpa de café demora 45 días en la descomposición en condiciones de anaeróbicas (Balseca de la Cadena & Cabrera Bastida, 2011).

Tabla 21: Bioetanol obtenido de la biomasa de pulpa de café

Parámetro	Pulpa de café	Pulpa con levadura
Densidad (gr/cm ³)	0,9929	0,9886
Peso del etanol %	3,85	6,60

En el caso del mucilago y mucilago con levadura después de terminar el proceso de fermentación, se obtiene resultados sorprendentes en la obtención de bioetanol (Tabla 22). Ya que con la adición de inóculo de levadura *Saccharomyces*

cerevisiae var *Bayanus* ayudaron en la conversión de los azúcares en bioetanol y dióxido de carbono mediante el fenómeno denominado glucólisis (Funes *et al.*, 2011); además reporta que con la adición de 6% de levadura produjo 0,175% de etanol. Al comparar el peso del etanol (%) del mucilago y mucilago con levadura, parece que la adición de levadura no es tan representativa como el caso de la pulpa; porque el mucilago no presentó diferencia en los °Brix y por el contrario, en la pulpa se encontró diferencias significativas al inicio del proceso.

Tabla 22: Bioetanol obtenido con la biomasa de mucilago de café

Parámetro	Mucilago de café	Mucilago con levadura
Densidad (gr/cm ³)	0,9889	0,9881
Peso del etanol %	6,40	6,90

8.5. Biogás teórico

ENSAYO DE VERIFICACIÓN A MAYOR ESCALA CON PULPA Y MUCILAGO DE CAFÉ

El cálculo del biogás teórico se determinó teniendo en cuenta la DQO total y soluble de la pulpa, mucilago y las vinazas. El hecho de que estos residuos presenten elevadas DQO los hace susceptibles de ser tratados anaeróbicamente para producir biogás que puede ser aprovechado energéticamente.

Partiendo de que teóricamente es posible obtener 350ml de biogás por gramo de DQO eliminada anaeróbicamente se observó que:

En el caso de la pulpa fresca la cantidad de biogás obtenida es de 13,90m³/d. En el caso del mucilago fue de 25,51m³/d. Una vez finalizado el proceso de fermentación se obtienen unos residuos llamados vinazas los cuales deben ser tratados posteriormente. El volumen aproximado de las vinazas tras la fermentación fue de 91,8 ml. Estas vinazas presentan una DQO elevada y en torno a 750.000mg/LO₂ para la pulpa y 980.000mg/LO₂ para mucilago. Si estas son tratadas anaeróbicamente en un digestor podría producirse hasta 197,88m³/d m³ biogás/día para la pulpa y 258,57m³/d m³ biogás/día para el mucilago.

En la producción a biogás se obtuvo una degradación de la materia orgánica en un 56% para la pulpa y un 55% para mucilago.

Se observa que al finalizar la fermentación la cantidad de biogás a producir teóricamente es mayor en un 42,7% para pulpa y 57,3% para el mucilago, además de encontrar que las vinazas del mucilago generan 14,6% más biogás que las

vinazas obtenidas en la pulpa (Tabla 23); lo cual (Rodríguez Valencia & Zambrano Franco, 2010) reportan que por cada kilogramo de pulpa fresca genera 25 L de biogás y por cada kilogramo de DQO genera 287 L de metano. Siendo el biogás una mezcla gaseosa constituida por metano que oscila entre el 50% y 80% y gas carbónico con pequeñas trazas de vapor de agua, hidrogeno, sulfuro de hidrogeno, amoniaco, monóxido de carbono, nitrógeno, oxígeno y trazas de compuesto orgánicos.

Tabla 23: Resultado del cálculo de biogás teórico

Tratamientos	Pulpa	Pulpa triturada con levadura	Mucilago	Mucilago con levadura
Q biogás inicial (m3/d)	13,90	77,12	25,51	116,49
Q biogás vinazas (m3/d)	197,88	160,42	258,57	101,32

8.6. Caracterización de las vinazas y tratamientos

ENSAYO PRELIMINAR CON PULPA Y MUCILAGO DE CAFÉ

Se presentan los resultados relacionados con la caracterización de las vinazas (pH, °Brix, volumen de vinazas) (Tabla 24), para pulpa y pulpa triturada siendo similares entre los tratamientos, pero encontrando diferencias en el parámetro de pH según lo reportado por (Rodríguez Valencia, 2013) con un valor de 4,57.

Tabla 24: caracterización de las vinazas con pulpa y pulpa triturada de café

Parámetros medidos	Pulpa de café	Pulpa de café Triturada
pH	2,7±0,01	2,10±0,01
°Brix	1,03±0,06	0,77±0,06
Volumen de vinazas (ml)	90,5	93,2

Para el caso del mucilago (Tabla 25), se presentan los resultados relacionados con la caracterización de las vinazas (pH, °Brix, volumen de vinazas), siendo diferente a lo reportado por (Rodríguez Valencia & Zambrano Franco, 2011) con un valor en el pH de 3,80.

Tabla 25: caracterización de las vinazas del mucilago de café

Parámetros medidos	Mucilago de café
pH	2,83±0,06
°Brix	0,60±0,01
Volumen de vinazas	55 ml

ENSAYO DE VERIFICACIÓN A MAYOR ESCALA CON PULPA Y MUCILAGO DE CAFÉ

Las vinazas para el material de pulpa y pulpa con levadura en su contenido de DQO es de 750.000mg/L y 608.000mg/L. Según lo reportado por (Rodríguez Valencia, 2013) el contenido de DQO promedio es de 42.826 ppm; para lo cual en esta investigación se observa un valor mucho más alto lo cual genera una gran contaminación si estas vinazas no son tratadas o gestionadas (Figura 43).



Figura 43: Volumen de vinazas para el tratamiento con pulpa de café

Para el caso del mucilago y el mucilago con levadura se tiene un valor de DQO total de 980.000mg/L y 384.000mg/L respectivamente, lo cual es diferente a lo reportado por (Rodríguez Valencia & Zambrano Franco, 2011) teniendo como resultado un valor de DQO de 168.650 ppm para mucilago sin levadura y 119.689 para mucilago con levadura (Figura 44).



Figura 443: Volumen de vinazas para el tratamiento del mucilago de café

9. DIAGRAMA GENERAL DE LA BIORREFINERÍA A PARTIR DE RESIDUOS DEL CAFE

Como parte de este proyecto se propone un esquema de una planta aplicando el concepto de biorrefinería teniendo en cuenta la unión de diversos procesos que permiten la transformación eficiente de los residuos tratados y el máximo aprovechamiento de los mismos. Obteniendo productos tales como biogás, bioetanol y biofertilizantes.

En el proceso de beneficio por vía húmeda Inicialmente existe una etapa de despulpado donde el café cereza es pasado por una despulpadora la cual por medio mecánico, el fruto maduro es sometido a la eliminación de la pulpa (epicarpio). En esta etapa se obtienen como residuo la pulpa fresca. Luego la siguiente etapa es el desmucilaginado que es un proceso por el cual se desprende la mucosidad que se encuentra entre el grano y la cereza de café. Obteniendo como residuo el mucílago.

Tanto la pulpa como el mucilago se le agrega de forma homogénea levadura y

son llevadas al tanque de fermentación; en este proceso se produce CO₂ que es utilizado en la producción de energía y materia tratada; por medio de destilación se obtiene etanol y vinazas para detener el proceso de fermentación se debe tener en cuenta los °Brix al momento en que se estabilizan.

El etanol es usado como biocombustibles y las vinazas por digestión son tratadas anaeróbicamente, generando biogás que es usado en la producción de energía o como biocombustibles y los residuos por medio de ultrafiltración, dan lugar a fertilizantes como el fosforo (P), por medio de osmosis inversa se obtiene fertilizantes con una composición de nitrógeno, potasio y agua. Donde son aprovechados como bio-fertilizantes.

Existe otra alternativa donde los residuos que llegan al tanque de recepción son llevados directamente por medio de una co-digestión a una digestión anaerobia donde se produce biogás que es usado en la producción de energía o como biocombustibles y los residuos por medio de ultrafiltración y osmosis inversa se obtiene fertilizantes en su composición fosforo (P), nitrógeno y potasio (N/K) y agua. Donde son aprovechados como bio-fertilizantes.

Al formar un ciclo cerrado de esta manera se realiza un aprovechamiento de los residuos, disminuyendo la contaminación en las fuentes hídricas, produciendo varios componentes que son aprovechados de manera eficiente y generando una alternativa económico-ambiental en la biorrefinería propuesta.

10. CONCLUSIONES

Se demostró que es posible obtener etanol a partir de residuos de café y la cantidad de este dependerá del estado de maduración del grano así como también el tratamiento que se le dé a la muestra durante todo el proceso de fermentación.

Al caracterizar física, química y microbiológica los residuos a tratar se pudo establecer el tiempo de fermentación a partir de los °Brix, el estado de maduración del fruto a partir del color, la acidificación de la biomasa y la cantidad de levaduras y BAL iniciales del proceso de fermentación.

En este estudio se puede concluir que los residuos agroindustriales del proceso de beneficio (pulpa y mucilago), son una fuente importante en la obtención de bioetanol ya que los análisis fisicoquímicos y microbiológicos realizados durante todo el proceso de fermentación, sirvieron como base para determinar algunas relaciones entre variables, por ejemplo al estabilizarse los °Brix se debe detener el proceso de fermentación, la curva de crecimiento de las levaduras y BAL presente.

El tiempo de recolección de las muestras influye en la producción de bioetanol, ya que cuando está maduro el grano es donde hay mayor contenido de azúcar, lo cual ayuda en la fermentación.

En caso de producir bioetanol, el mejor método de obtención es utilizando la incorporación de inóculos *Saccharomyces cerevisiae* var *Bayanus*.

Igualmente el aprovechamiento de estos recursos renovables impactaría positivamente en los aspectos económicos y ambientales en la región cafetera presentando una alternativa para disminuir la contaminación ambiental.

El rendimiento en la obtención de bioetanol a partir de la pulpa es baja comparada con la producida en pulpa triturada. Para el caso del mucilago al poseer mayores porcentajes de azúcares reductores produjeron mayor contenido de bioetanol.

El rendimiento del alcohol obtenido en el proyecto fue de 3,46%, 2,97% y 5,94% para pulpa, pulpa triturada y mucilago respectivamente en el ensayo preliminar; para el caso del ensayo a mayor escala fue de 3,85% y 6,60% para pulpa y pulpa triturada con levadura, con respecto al tratamiento del mucilago y mucilago con levaduras fue de 6,40% y 6,90% respectivamente, lo cual indica que los grados Brix en el ensayo a mayor escala eran más apropiados para la obtención de etanol siendo de 6,5 y 10,97° Brix para pulpa y pulpa con levadura, frente al tratamiento con el mucilago y mucilago con levadura se obtuvo 11,94 y 11,36°Brix y en el

ensayo preliminar siendo 1,97°Brix, 2,90°Brix y 2,6°Brix para pulpa, pulpa triturada y mucilago.

El comportamiento del pH durante el proceso de fermentación muestra una tendencia descendente, indicando un aumento de la acidez de la masa, que coincide con la producción de ácidos a partir de los azúcares y del rompimiento de las pectinas. Este proceso comienza con valores cercanos a 5,00. Desde el inicio de la fermentación se observan valores diferentes.

El incremento de ácido láctico como metabolismo principal de fermentación de las bacterias lácticas se puede correlacionar directamente con el pH puesto que podría explicar el mecanismo de fermentación de los residuos generados en la etapa de beneficio.

La población de levaduras y de algunas bacterias aerobias y aerobias facultativas aumenta en las primeras horas de la fermentación del café, pero a medida que el proceso avanza el pH inicial cercano a 5,2 desciende a valores entre 3,5 y 4,0 de esta forma, se inhibe el crecimiento de coliformes y de otras bacterias del mucilago, aunque se favorece el desarrollo de levaduras y de las bacterias lácticas que son acidofilas.

El pH puede tomarse como un indicador relacionado con el tiempo de fermentación, el cual puede usarse para encontrar el tiempo de finalización del proceso correlacionando con el parámetro de °Brix.

El proceso resulta económicamente viable dado que la materia prima no tiene hasta ahora un valor comercial (producto de desecho), por lo que resultaría atractivo a la industria comparado con el etanol de residuos del beneficio de café.

11. RECOMENDACIONES

Es importante tener en cuenta la época de recolección de la materia prima, siendo mejor cuando el grano esta en optimo estado de maduración.

En la etapa de fermentación sería mejor incorporar inóculo de levadura *Saccharomyces Cerevisae* para que el desarrollo de la fermentación sea más rápido y mejor.

Monitorear con intervalos más cortos el proceso de la fermentación, con el fin de determinar el punto óptimo de finalización en la fermentación

Para lograr una producción a nivel industrial se debería construir una planta piloto en una zona donde la producción de café sea significativa para obtener biomasa de pulpa y mucilago de café.

El pretratamiento de los residuos juega un papel importante en el rendimiento del proceso. Por este motivo es necesario homogenizar y disgregar lo máximo posible el tamaño de partícula de los residuos tratados.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, C., 2012. Evaluacion de la fermentacion alcoholica para la produccion de Hidromiel. *Universidad Nacional De Colombia, tesis, directora: Quicazan Cecilia Marta*, pp. 1-144.
- Agudelo A., R. A., 2002. Obtencion de etanol a partir de la borra de café.. *Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ingenieria y arquitectura, trabajo de grado: Ingeniero quimico*, p. 120.
- AIE, A. I. d. I. E., 2006. Perspectivas Energeticas en el Mundo. *World Energy Outlook*.
- Alvarez, J., Hugh, S., Cuba, N. & Loza Murguia, M., 2011. Evaluacion de un sistema de tratamiento de aguas residuales del prebeneficio de café (Coffea arabica) implementado en la comunidad Carmen Pampa provincia Nor Yungas del Departamento de La Paz. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 2(1), pp. 34-42.
- Apha, A. W., 2005. «Standard Methods for the Examination of Wastewater». *American Public Health Association*, Volumen 21 st ed, pp. part, 8000, 94-100.
- Arcila O., F., 1979. Produccion de biogás a base de pulpa de café.. *En reunion Internacional sobre la utilizacion integral de los subproductos de café*, p. 17.
- Arguedas Gamboa, P., 2013. Definición del Proceso de Elaboración de una Bebida Fermentada a Partir de Pulpa del Café (broza). *Tecnología en Marcha*, pp. 38-49.
- Balseca de la Cadena, D. A. & Cabrera Bastida, J. C., 2011. Produccion de biogas a partir de aguas mieles y pulpa de café. *Tesis, Zamoramo carrera de desarrollo socioeconomico y ambiente* .
- Blandon Castañeda, G., Davila Arias, M. T. & Rodriguez Valencia , N., 1999. Caracterizacion Microbiologica y fisico-quimica de la pulpa de café sola y con mucilago en proceso de lombricompostaje. *Cenicafé*, 50(1), pp. 5-23.
- Brando , C. H. J., 2008. *Pós-colheita do café*. 1 ed. s.l.:s.n.
- Cafeteros, F. N. d., 2010. *El arbol y el entorno*. [En línea]
Available at:
http://www.cafedecolombia.com/particulares/es/sobre_el_cafe/el_cafe/el_arbol_y_el_entorno
[Último acceso: 05 01 2016].
- Calle, H., 1977. subproductos del café. *Cenicafé, Boletín Técnico No. 6.*, p. 84.
- Carvajal, J. J., Aristizabal Torres, I. D., Oliveros Tascon, C. E. & Mejia Montoya, J. W., 2011. Colorimetria del fruto de café (Coffea arabica L.) durante su desarrollo y maduración. *Revista Facultad Nacional de Agronomia, Universidad Nacional de Colombia*, 64(2), pp. 6229-6240.

- Castillo, B. & Lopez, A. L., 2013. Tesis, Validación del mucilago de café para la producción de etanol y abono orgánico, directora Blandon Sandra.. *Universidad Nacional de Ingeniería*, pp. 1-4.
- Chinappi Ciccolella, I. & Jerez Carrizo, A., 2008. Biodigestión anaeróbica de la pulpa de café. Propuesta de saneamiento ambiental y ahorro energético. *Evaluación de un acuífero - Academia*, pp. 1-9.
- Chiralt Boix, A. y otros, 2007. Propiedades físicas de los alimentos. *Universitat Politècnica de Valencia*, pp. 1-203.
- Clarke, R. J. & Macrae, R., 1987. Coffee. *Elsevier Applied Science Publishers*, Volumen 2, p. 321.
- Esguerra, M. d. P. & McAllister, D., 2014. Capítulo 1. El mercado internacional del café verde, su evolución reciente y sus perspectivas 2013-2020.
- Federacafé, 1997. Fabrica de café liofilizado: Composición química de la borra de café. septiembre.
- Funes Caballero, M. R. y otros, 2011. Producción de bioetanol a partir del mucilago de café (*Coffea arabica*. L.). CURC. UNAH. Comayagua. Honduras. *Revista Ciencia y Tecnología No.10*, pp. 1-15.
- García Laureiro, J. I., 2014. *Ciencias.com* [Entrevista] (29 09 2014).
- Gómez Millán, G., 2015. Desarrollo de biorrefinerías en el mundo. *ResearchGate (Ciencia y desarrollo)*, pp. 1-13.
- Gonzalez F., R. & Palma R., M. I., 1989. Algunos cambios químicos que sufren las aguas residuales del beneficio del café por almacenamiento. *Tesis: químico farmacéutico, Universidad Nacional de Colombia*, p. 134.
- Gracia, C., s.f. Bioetanol.
- Guerra Millán, F. J., Mallén Wiechers, C., Struck Garza, A. & Varela Vega, T., 2008. Producción de Bioetanol. *Universidad Iberoamericana*, pp. 1-36.
- Guevara, C. A., Arenas A., H., Mejía, A. & Peláez, C. A., 2012. Obtención de etanol y biogas a partir de banano de rechazo. *información tecnológica*, 23(2), pp. 19-30.
- IGAC, 2015. Cartografía temática plan de ordenamiento territorial Municipal (P.O.T) del municipio de Garzón Huila.. *División planeación del desarrollo rural y urbano base cartográfica*.
- Illy, A. & Viani, R., 1995. Espresso coffee: the chemistry of quality. *Academic press limited*, p. 253.
- Jackels, S. & Jackels, C., 2005. Characterization of the coffee mucilage fermentation process using chemical indicators. *A field study in Nicaragua Journal of food science*, 70(5), pp. c321-c325.

Kostenberg, D., Marchaim, U., Watad, A. A. & Epstein, E., 1995. Biosynthesis of plant hormones during aerobic digestion of instant coffee waste. *Plant growth regulation* , pp. 17:127-132.

Machado, A., 2001. El café en Colombia a principios del siglo XX. *Universidad Nacional de Colombia*, pp. 77-97.

Marin, S., Arcila Pulgarin, J., Montolla Restrepo, E. & Oliveros Tascón, C., 2003. Cambios físicos y químicos durante la maduración del fruto del café (*Coffea arabica* L. var. Colombia). *Cenicafé*, 54(3), pp. 208-225.

Martín Gil, J., 2009. El futuro de los Biocombustibles: Biorrefinerías integradas. *Universidad de Valladolid*, 30 septiembre.

Montilla, J., 2006. Caracterización de algunas propiedades físicas y factores de conversión del café. *Universidad de Caldas*, p. 107.

Noriega Salazar, A., Silva Acuña, R. & García de Salcedo, M., 2009. Composición química de la pulpa de café a diferentes tiempos de ensilaje para su uso potencial en la alimentación animal. *Zootecnia Trop.*, 27(2), pp. 135-141.

Oliveira, L. D., Franca, A. S., Camargos, R. D. & Barros, J. M., 2003. Avaliação preliminar da viabilidade de produção de biodiesel a partir de grãos defeituosos de café. *Revista Brasileira de Armazenamento*.

Pascual, A., Regueiro, L. & Silvestre, G., 2015. Evaluación de las plantas de biogás agroindustrial hacia nuevos modelos basados en el concepto de biorrefinería. *Retema, Especial Bioenergía, Departamento de Medio Ambiente, Bioenergía e Higiene Industrial*, pp. 1-7.

Peña, P. A., Ramírez Saldarriaga, A. N. & Rúa G., M. Y., 2016. Elaboración de bebida carbonatada a base de pulpa y cisco de café arábica (*coffee arabica* L.). *Agronomía Colombiana*, Volumen 34, pp. 1175-1177.

Porres, C., Calzada, J. F. & Rolz, C., 1987. Combustión de la pulpa de café. *In: Simposio Internacional sobre la Utilización Integral de los Subproductos del café*, 3., 16-18 Febrero. pp. 16-19. 17 Refs. Esp..

Posso, F., 2004. Estudio del desarrollo de las energías alternativas en Venezuela. *ANALES de la Universidad Metropolitana*, pp. 147-164.

Puerta Quintero, G. I., 1996. La calidad del café. *Cenicafé*, p. 9.

Puerta Quintero, G. I., 2012. Factores, procesos y controles en la fermentación del café. *Avance técnico Cenicafé*, pp. 1-12.

Puerta Quintero, G. I., 2013. Cinética química de la fermentación del mucílago de café a temperatura ambiente. *Cenicafé*, 62(1), pp. 42-59.

Puerta Quintero, G. I. & Ríos Arias, S., 2011. Composición química del mucílago del café, según el tiempo de fermentación y refrigeración. *Cenicafé*, 62(2), pp. 23-40.

Quezada, W., Gallardo, I. & Torres, M., 2016. El color en la calidad de los endulcorantes de la agroindustria panelera. *AFINIDAD LXXIII*.

Ramírez Gómez, C. A., Oliveros Tascón, C. E. & Sanz Uribe, J. R., 2015. Manejo de lixiviados y aguas de lavado en el proceso de beneficio húmedo del café. *Cenicafé*, 66(1), pp. 46-60.

Roa, G. y otros, 1999. Beneficio ecológico del café. *Cenicafé*, p. 300.

Roa, M., 2003. Potencialidad del café y sus residuos rurales como cultivo energético en Colombia. *Cenicafé. Disciplina Ingeniería Agrícola*, p. 2.

Rodríguez Valencia, N., 2009. Estudio de un biosistema integrado para el postratamiento de las aguas residuales del café utilizando macrófitas acuáticas. *Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente. Esp.(Tesis: Doctoral) (Tesis dirigida por Miguel Rodilla Alamá)*, p. 508.

Rodríguez Valencia, N., 1999. Contenido de azúcares reductores en la pulpa y el mucílago de café. *Informe anual de actividades 1998-1999, Cenicafé, Disciplina de Química Industrial*, p. 90.

Rodríguez Valencia, N., 2007a. Balance energético en la producción de etanol a partir de la pulpa y el mucílago de café y poder calorífico de los subproductos del proceso del cultivo de café. *Cenicafé, Disciplina de Calidad y Manejo Ambiental*, p. 7.

Rodríguez Valencia, N., 2007b. Producción de bioetanol a partir de la pulpa y el mucílago del café. *Informe anual de actividades 2006-2007, Disciplina de calidad y manejo ambiental, Cenicafé*, p. 78.

Rodríguez Valencia, N., 2013. Producción de Alcohol a Partir de la Pulpa de Café. *Cenicafé*, 64(2), pp. 78-93.

Rodríguez Valencia, N. & Zambrano Franco, D. A., 2010. Los subproductos del café: fuente de energía renovable. *Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, Avances técnicos Cenicafé*, marzo.p. 2.

Rodríguez Valencia, N. & Zambrano Franco, D. A., 2011. Producción de alcohol a partir del mucílago de café. *Cenicafé*, 62(1), pp. 56-69.

Rodríguez, G., 2015. Geografía de Colombia. p. 256.

Rojas, A. & Rojas, E., 2014. Influencia del tiempo de aireacion, concentracion de azucares reductores y sulfato de amonio en la produccion de etanol a partir de mucilago de cafe (coffea arabica). *tesis Universidad Nacional Toribio Rodriguez de Mendoza de Amazonas*.

Salazar, Riaño H., N. M., Arcila P., J. & Ponced C., A., 1994. Estudio morfológico, anatómico y ultraestructural del fruto de cafe Coffea arabica L.. *Cenicafé*, pp. 93-105.

Sanchez Ramirez, J. E., 2015. *Tratamiento de aguas residuales industria del café*. Grazón - Huila, s.n.

Sánchez, M. S., 2003. Energías renovables: conceptos y aplicaciones WWF. *Fundación Natura*, p. 153.

Urueña Gómez, M., 2013. El mercado mundial y nacional del café en el siglo XXI. *Manual del cafetero Colombiano investigación y tecnología para la sostenibilidad de la caficultura, FNC-Cenicafé*, pp. 18-26.

Waste, A., 2013. Digestion Anaerobia.

Wilboux, R., 1963. Agricultural engineering. *FAO*.

Zambrano F., D. A., 1994. Estudios de planta piloto para el tratamiento anaerobico de las aguas residuales del proceso de beneficio humedo del café. *Centro Nacional de Investigaciones de café, Cenicafé*.

Zambrano F., D. A. & Isaza H., J. D., 1994. Lavado del café en los tanques de fermentación. *Revista Cenicafé (Colombia) 45(3)*, pp. 106-118.

Zambrano Franco , D. A. & Isaza Hinestroza, J. D., 1998. Demanda quimica de oxigeno y nitrogeno total, de los subproductos del proceso tradicional de beneficio humedo del café. *Cenicafé*, 49(4), pp. 279-289.

ANEXOS

ANEXO A

$$acidez(gr/l) = \frac{V_{NaOH} * N_{NaOH} * 90}{V_{muestra}}$$

Dónde:

V_{NaOH} =Volumen de NaOH consumido en la titulación (ml)

N_{NaOH} =Normalidad de la solución NaOH

$V_{muestra}$ = Volumen de la muestra (ml)

90= equivalente del ácido láctico

ANEXO B

Medios de cultivo

Medios de cultivo líquido

Los medios líquidos fueron distribuidos en tubos de ensayo, debidamente esterilizados a temperatura de 121°C, en un tiempo de 30 minutos en autoclave atemperados a temperatura ambiente y luego almacenados a temperatura a 4°C.

Agua de peptona (Merck KGaA, 64271 Darmstadt Germany)

Se disuelve 25,5 g en un litro de agua desmineralizada

pH, 7±0,2 a 25°C

Composición para un litro de agua destilada

peptona de caseína	10.0 g
Cloruro sódico	5.0 g
Dihidrogenofosfato potásico	1.5 g
Hidrogenofosfato disodico dodecahidrato	9.0 g

Caldo MRS (OXOID)

Se disuelve 52 g en un litro de agua destilada

pH, 6.2±0,2 a 25°C

Composición para un litro de agua destilada

Peptona	10.0 g
Polvo `Lab-Lemco`	8.0 g
Extracto de levadura	4.0 g
Glucosa	20.0 g
Monooleato de sorbitán	1 ml
Hidrógeno-fosfato dipotásico	2.0 g
Acetato de sodio 3H 2 O	5.0 g
Citrato triamónico	2.0 g
Sulfato de magnesio 7H 2 O	0,2 g
Manganeso 4H sulfato de 2 O	0.05 g

Medios de cultivo solido

Agar MRS (OXOID)

Se disuelve 62 g en un litro de agua destilada se esterilizo a temperatura de 121°C, en un tiempo de 15 minutos en autoclave atemperados a temperatura ambiente y luego vertido a placas estériles.

pH, 6.2±0,2 a 25°C

Composición para un litro de agua destilada

Peptona	10.0
Polvo `Lab-Lemco`	8.0
Extracto de levadura	4.0
Glucosa	20.0
Monooleato de sorbitán	1 ml
Hidrógeno-fosfato dipotásico	2.0
Acetato de sodio 3H 2 O	5.0
Citrato triamónico	2.0
Sulfato de magnesio 7H 2 O	0,2
Manganeso 4H sulfato de 2 O	0.05
agar	10.0

Agar YGC (Merck KGaA, 64271 Darmstadt Germany)

Se disuelve 40.0 g en un litro de agua desmineralizada

pH, $6,6 \pm 0,2$ a 25°C

Composición para un litro de agua destilada

Extracto de levadura	5,0
D(+)-Glucosa	20.0 g
Cloranfenicol	0,1 g
Agar-agar	14,9 g