

**PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DEL PROCESO DE  
FERMENTACIÓN DE LA PULPA DE CAFÉ**

**YENIFER KATERINE CAMACHO TORRES  
YENI NATALIA LIZARAZO CALA**

**UNIVERSIDAD LIBRE DE COLOMBIA  
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS  
INGENIERIA AMBIENTAL  
EI SOCORRO  
2021**

**PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DEL PROCESO DE  
FERMENTACIÓN DE LA PULPA DE CAFÉ**

Yenifer Katerine Camacho Torres  
Yeni Natalia Lizarazo Cala

Trabajo de grado para optar al título de Ingeniera Ambiental

Directora de tesis  
María del Pilar Guauque Torres  
Dra. Ciencia y tecnología de los materiales

UNIVERSIDAD LIBRE DE COLOMBIA  
Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias  
Ingeniería Ambiental  
El Socorro  
2021

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo de grado inicialmente a Dios quien es mi luz y guía en todo momento, a mis padres por su esfuerzo y sacrificio para brindarme la oportunidad de estudiar una carrera profesional, por creer en mi capacidad y apoyarme incondicionalmente tanto en la parte moral como económica; especialmente a mi madre quien es mi fuente de inspiración y motivación para poder superarme cada día más y luchar para brindarle un mejor futuro a mi familia, a mi hermano para que siga mi ejemplo y pueda alcanzar las metas que se proponga, a mi novio por su comprensión, apoyo, ejemplo de persistencia y motivación para crecer tanto personal como profesionalmente, a la doctora María del Pilar Guauque Torres por compartir su conocimiento, ser la guía de este proyecto y tener tanta paciencia en este proceso.

Yenifer Katerine Camacho Torres

Dedico este trabajo a Dios por ser la luz y guía y ayudarme a levantar en los momentos difíciles, a mis padres quienes fueron los impulsores de este nuevo logro, también a mis hermanas las cuales de una u otra manera fueron mi apoyo emocional en momentos de tristeza y desesperación, a mi pareja por brindarme amor y apoyo económico en algunas ocasiones, a la Doctora María del Pilar Guauque Torres por ser guía y transmitir sus conocimientos en pro de la realización y culminación de mis estudios.

Yeni Natalia Lizarazo Cala

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos primeramente a Dios por habernos permitido culminar este ciclo en nuestro proyecto de vida y darnos fortaleza, a la doctora María del Pilar Guauque Torres por su apoyo, entrega y ayuda incondicional permitiéndonos llevar a cabo el desarrollo y ejecución del proyecto para la culminación de nuestros estudios profesionales.

A nuestros padres quienes nos brindaron apoyo y ayuda incondicional para realizar nuestra carrera universitaria acompañándonos en todo nuestro proceso, brindándonos amor y fortaleza para soportar las dificultades generadas.

A nuestras amigas y compañeras de estudio; Geidy, Liliana, Jenny y Erika porque sin su ayuda y colaboración conjunta no hubiésemos podido culminar la investigación y proyecto de grado.

A los auxiliares y docentes encargados de los laboratorios de la Universidad por brindarnos apoyo y ser guías en las prácticas que se realizaron para terminar este proyecto.

# Contenido

RESUMEN.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA.....	10
3. JUSTIFICACIÓN.....	13
4. OBJETIVOS.....	14
4.1. Objetivo general.....	14
4.2. Objetivos específicos.....	14
5. MARCO TEÓRICO.....	15
5.1 Composición y producción de café.....	15
5.1.1. Composición química del café.....	15
5.1.2 Características del grano de café.....	15
5.2 Impactos ambientales y riesgos por los subproductos del café.....	16
5.2.1 Riesgo ambiental del manejo inadecuado de los subproductos del café	16
5.3 Impactos ambientales y riesgos por el cultivo del café.....	17
5.3.1. Deforestación.....	17
5.3.2. Pérdida de biodiversidad.....	18
5.3.3. Contaminación por uso de agroquímicos.....	18
5.3.4. Erosión y degradación del suelo.....	18
5.3.5. Impactos ambientales por proceso de beneficio del café.....	19
5.3.5.1. Reducción del recurso hídrico.....	20
5.3.5.2. Contaminación de fuentes hídricas.....	20
5.4. Aprovechamiento de residuos agroindustriales.....	20
6. ANTECEDENTES.....	23
7. NORMATIVIDAD.....	25
8. METODOLOGÍA.....	27
8.1. Tipo y alcance de la investigación.....	27
8.2. Técnicas de recopilación de datos.....	27
8.3. Población y muestra.....	27
8.4. Ubicación geográfica.....	28
8.5. Diseño experimental.....	28

8.5.1. Fase 1: .....	29
8.5.2. Fase 2: .....	29
8.6. Variables .....	30
8.7. Equipos, instrumentos y materiales .....	31
8.8.1. Preparación de soluciones para el método químico.....	34
8.9. Obtención de la pulpa de café .....	35
8.9.1. Fermentación y ensilaje de la pulpa .....	36
8.9.2. Procedimiento fase 1 .....	37
8.9.2.1. Método químico para la extracción e identificación de ácido láctico... 38	
8.9.2.1.2. Preparación del reactivo de identificación (FeCl <sub>3</sub> ).....	40
8.9.3. Procedimiento fase 2 .....	41
8.9.3.1. Método enzimático para identificación de ácido láctico.....	42
8.9.3.1.2. Método Pulpa de café con hidrólisis ácida o con tratamiento .....	43
8.9.3.1.4. Pulpa de café normal .....	44
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	45
9.1. Curva de calibración con el método químico (FeCl <sub>3</sub> ) usando ácido láctico comercial como estándar. ....	45
9.2. Resultados fase 1 .....	46
9.3. Cálculos de concentración de ácido láctico usando el método químico....	48
9.3.1. Absorbancia sin turbidez .....	48
9.3.2. Absorbancia neta (424 nm) .....	49
9.3.3. Molaridad de ácido láctico en la celda espectrofotométrica .....	49
9.3.4. Molaridad (M) de ácido láctico en la reacción (rxn) de precipitado (ppto) 50	
9.4. Resultados fase 2.....	57
9.5. Comparación de técnicas analíticas.....	63
10. CONCLUSIONES.....	65
11. OBSERVACIONES Y RECOMENDACIONES .....	66
12. GLOSARIO.....	67
13. REFERENCIAS .....	69

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición química de la pulpa de café.....	16
Tabla 2. Actividades desarrolladas por cada objetivo. ....	30
Tabla 3. Variables .....	31
Tabla 4. Proporciones para preparación de las muestras .....	37
Tabla 5. Datos de concentraciones y absorbancias .....	45
Tabla 6. Promedios de absorbancia durante las primeras 24 h de fermentación. 46	
Tabla 7. Promedios de absorbancia durante las primeras 60 h de fermentación.. 47	
Tabla 8. Promedios de absorbancia durante las primeras 96 h de fermentación. 47	
Tabla 9. Valores de blancos obtenidos para respectivos cálculos. ....	49
Tabla 10. Datos muestras a las 24 h de fermentación con su respectivo cálculo . 52	
Tabla 11. Promedios y desviación estándar de la concentración de ácido láctico 52	
Tabla 12. Promedios y desviación estándar de la concentración de ácido láctico 53	
Tabla 13. Promedios y desviación estándar de la concentración de ácido láctico 53	
Tabla 14. Comparación entre método HPLC y Químico (FeCl <sub>3</sub> ) .....	56
Tabla 15. Datos de concentraciones y absorbancia.....	58
Tabla 16. Datos ácido láctico por el método enzimático con cepa1 .....	60
Tabla 17. Datos método enzimático con cepa 9.....	61
Tabla 18. Comparación técnicas detección.....	64

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación geográfica.....	28
Figura 2. Esquema de procedimientos llevados a cabo en cada fase.....	34
Figura 3. Ensilaje pulpa de café .....	36
Figura 4. Preparación de las muestras para el proceso de incubación .....	37
Figura 5. Preparación y extracción de ácido láctico .....	38
Figura 6. Muestras de la pulpa de café con c/u de las estrategias.....	41
Figura 7. Preparación de la pulpa y neutralización de la muestra. ....	43
Figura 8. Pesaje de las pulpas para cada porcentaje.....	44
Figura 9. Estrategias de fermentación.....	44
Figura 10. Curva de calibración inicial (estándar) .....	45
Figura 11. Concentraciones de ácido láctico.....	54
Figura 12. Curva de calibración método enzimático.....	58
Figura 13. Producción de ácido láctico método enzimático.....	61

## RESUMEN

En el proceso de producción del café se generan residuos sólidos que se convierten en una fuente de contaminación de los recursos naturales de aquellas zonas cafeteras, causando impactos en los recursos: hídrico, suelo y aire al no realizar una disposición adecuada. Es por ello que se hace necesario buscar múltiples alternativas posibles para el manejo adecuado de la pulpa. Como objetivo general del presente trabajo se planteó determinar la producción de ácido láctico mediante fermentación de pulpa de café sometida a cambios en diferentes variables (% inóculo, % pulpa y tiempo de fermentación) y con diferentes estrategias de pre-tratamiento de pulpa (deshidratación parcial y/o hidrólisis ácida). La metodología comprendió varias fases empezando por la adecuación de la materia prima (limpieza-triturado), seguido de fermentación y determinación de condiciones óptimas de trabajo usando diferentes diseños experimentales y teniendo en cuenta los parámetros previamente enunciados. Como resultado final se buscó la obtención de ácido láctico mediante fermentación de la pulpa de café, cuantificación de la producción, así como la optimización de la producción de ácido láctico.

En la primera fase se evaluaron los tiempos de fermentación (24, 60 y 96 h), las concentraciones de 1- 2.5 y 4 % de inóculo y porcentajes de pulpa de café al 10, 15 y 20%; obteniendo así las condiciones óptimas para la fermentación a las 60 h con un inóculo de 2.5% y en una concentración de pulpa de café del 20% dando como resultado una concentración de ácido láctico de 16225.23  $\mu\text{g/mL}$ , siendo este el valor más alto obtenido.

En cuanto a los valores obtenidos para la fase 2 usando un método enzimático para la cuantificación del ácido láctico se evidenció que la pulpa natural con Cepa 1 arrojó una concentración de 839.52  $\mu\text{g/mL}$ , siendo la concentración más alta de ácido láctico.



## 1. INTRODUCCIÓN

La caficultura en Colombia es una de las principales fuentes de ingreso en el sector agrícola. El departamento de Santander le aportó, en el 2019, 5.57% de ingresos que equivalen a la producción de 499.79 cargas debido a la expansión cafetera y al manejo tecnificado dado a las parcelas. Cabe mencionar que además de la generación de empleos, también se presenta un impacto ambiental preocupante producto de la disposición inadecuada de los desechos, es por ello que se deben tomar medidas con el fin de mitigar y aprovechar estos residuos (Vanguardia, 2019).

Es por ello que este trabajo de grado tiene como finalidad identificar la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de pulpa de café, en presencia de *Lactobacillus sp.* microorganismos fundamentales para este proceso, los cuales tienen la función de consumir los azúcares simples y/o complejos y nutrientes presentes en la pulpa para transformarlos en ácido láctico y obtener, mediante procedimientos posteriores de purificación y polimerización, como producto final biopolímeros biodegradables (Naranjo, 2010). La implementación de diversos métodos de identificación de ácido láctico permitió optimizar e identificar cuál de estos métodos permite una identificación del ácido. Además, se utilizó la pulpa de café porque es un desecho orgánico que si no se le da un manejo adecuado puede generar afectaciones a los diferentes recursos naturales, de hecho, en las áreas comuneras es una de las principales causas de contaminación del suelo y agua por el vertimiento de dicho residuo.

Por otra parte, los plásticos de único uso como aquellos usados para empaques y embalajes generan contaminación y se buscó, como ingenieras ambientales, implementar estrategias alternativas con el fin de obtener la materia prima para la generación de plásticos biodegradables. Cabe mencionar que este último proceso será realizado en laboratorios especializados en dónde se puedan ajustar correctamente las condiciones de separación y polimerización.

Este trabajo buscó abordar dos problemas ambientales, como lo son la extremada contaminación presente en sitios de disposición final y océanos a causa del uso excesivo de plásticos de único uso y la contaminación ambiental derivada de un residuo que se considera como un desecho en la industria cafetera.

El trabajo se realizó con el fin de conocer qué beneficios podría tener la implementación de este proyecto para la comunidad caficultora, además de establecer la importancia de utilizar el desecho y disminuir la contaminación brindando una solución a dicha problemática y a su vez sentar las bases de posteriores procedimientos con los que se puedan generar productos biodegradables.

## 2. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

En Colombia el café representa el 2% del PIB Nacional; en el año 2010 se produjeron 2700 millones de kg de café correspondiente a 11 millones de sacos de café pergamino seco mientras que en Santander se produjo un 4.95% de café con 6.279 kg de producción de pulpa fresca (Rodríguez Valencia Nelson, Zambrano Franco Diego., 2010). En el procesamiento del café se obtiene la pulpa como subproducto que corresponde al 43% del peso en base húmeda y genera el 72% de contaminación. Esta problemática genera afectaciones más graves en los países en vías de desarrollo, al no contar con tecnologías limpias y sistemas de control y corrección. Todo este material vegetal, si no se maneja y dispone de forma adecuada, se convierte en fuente de contaminación de los recursos naturales de la zona cafetera. La pulpa en especial se puede convertir en un factor muy positivo o negativo dependiendo del uso y manejo que se le dé, debido a los valores de pH y acidez que puede presentar.

Según datos de Cenicafé (2010) se afirmó lo siguiente:

El promedio de la producción de pulpa es de 2.25 t/ha-año. Por cada millón de sacos de 60 kg de café almendra que Colombia exporta, se generan 162.900 toneladas de pulpa fresca, que si no se utilizan adecuadamente producirán una contaminación equivalente a la generada en un año, en excretas y orina, por una población de 868.736 habitantes.

La provincia comunera es la segunda en términos de área sembrada con café ocupando 12.867 hectáreas; cuenta con un total de 7820 unidades productoras y producción en hectáreas de 10.279 de las cuales se siembra un 10.1% en el municipio de Guadalupe (DANE, Censo Nacional Agropecuario, 2014), según la producción obtenida se genera 4.87 kg de desecho en el municipio de Guadalupe (Federación Nacional de Cafeteros [FNC], 2017). A partir de los valores de producción, se obtuvieron los valores de desechos generados en el beneficio del café, lo que permite tener una visión de la magnitud de los daños y problemas ocasionados al ambiente y sus ecosistemas y a su vez para la comunidad en general por la proliferación de vectores a causa de la acumulación de dichos residuos. Cabe mencionar que la caficultura es una actividad de gran importancia para la provincia debido a las condiciones agroecológicas presentes permitiendo por ende un rendimiento por hectárea de 17 cargas de café pergamino seco.

En todas las etapas de beneficio del café se generan afectaciones ya que este es un proceso complejo y va a depender de la manera en la cual se realice el beneficio.

Por ejemplo, existe contaminación en los suelos a causa de la mala disposición de la pulpa y el mucílago que se acumulan y genera contaminación en el aire por concentración de vapores orgánicos, azufre, metanotiol entre otros. El almacenamiento de estos desechos también genera malos olores y por ende proliferación de vectores los cuales pueden desencadenar enfermedades tales como dengue, esquistosomiasis, fiebre amarilla entre otras ocasionadas por picaduras de mosquitos, al igual que pueden generarse problemas fitosanitarios y contaminación cruzada por los microorganismos presentes. En cuanto a los daños en el recurso hídrico, a causa de la presencia de pulpa, mucílago y la consecuente fermentación de las proteínas y azúcares que los componen, se generan taninos, alcaloides y demás polifenoles los cuales presentan difícil degradación biológica. Es por ello que se deben implementar estrategias de beneficio correcto que disminuyan y contribuyan a una reducción de los desperdicios ocasionados durante el proceso de lavado cuyos lixiviados pueden ocasionar pérdidas de biodiversidad de fauna a causa de los sólidos suspendidos y cambios físico-químicos.

Para tener una visión más clara de las afectaciones anteriormente mencionadas se hizo hincapié en el trabajo de Romero et al., (2012) en el cual realizaron una serie de matrices para valorar el grado de impacto ambiental. Para diferentes ítems se asignaron valores que permitieran determinar la importancia y grado de alteración, lo cual les permite determinar el grado de destrucción, y así analizar los puntos críticos y cuantificar los daños ocasionados por el beneficio del café. Los resultados más importantes remarcaron el deterioro del manto acuífero a causa de los desechos sólidos y la contaminación del aire ya que en el momento de la descomposición emiten malos olores, los cuales provocan enfermedades respiratorias. Los procesos de despulpado y lavado afectan de manera negativa y tienen un impacto significativo sobre el ambiente y los seres vivos reconociendo los factores que se mencionan a continuación como aquellos de categoría crítica: contaminación del suelo, contaminación hídrica, desechos líquidos, consumo de agua y afectación a la salud.

La importancia de estudios tendientes al aprovechamiento de los residuos del beneficio del café radica en generar vías alternativas de ingreso, provenientes de recursos que, pese a su potencial económico, hoy son considerados como residuos o material de desecho y causantes de problemáticas ambientales. La producción del café tiene incidencia en la salud de las personas de las zonas que se encuentran impactadas por la actividad, dado que las emisiones que se generan en las aguas residuales constituyen focos de vectores que producen enfermedades como oncocercosis o ceguera de los ríos, chikungunya, entre otros (Alfaro & Rodríguez, 1994).

Durante el desarrollo de las actividades cafeteras se realiza el proceso de beneficio húmedo de café en el cual se generan dos subproductos: el mucílago y la pulpa de café. El beneficio húmedo del café puede realizarse de manera convencional o usando el proceso de beneficio ecológico del café con manejo de subproductos (BELCOSUB). En el beneficio convencional se gastan entre 40-50 litros de agua por kilogramo de café pergamino seco en donde la mitad se utiliza en la clasificación del fruto, siendo esta etapa la primordial para la investigación ya que se requiere la pulpa para los experimentos; la otra parte es usada en el despulpado y transporte de la pulpa a las fosas, así como para el transporte de café despulpado a los tanques de fermentación (Cenicafé, 2015). Para minimizar el consumo de agua, desde hace unos años se ha venido implementando el proceso BELCOSUB, ya que gasta entre 4.0 y 5.0 L por cada kg, además posee lavadores mecánicos o tanques de fermentación lo cual evita el 74 % de la contaminación del agua. De esta forma, se ha disminuido el consumo de agua y por ende la generación de desechos líquidos como el mucílago que llegan al suelo o fuentes hídricas causando contaminación, al tiempo que contribuye con la reducción en el consumo de este recurso, debido a que suele ser escaso en la provincia, pero es indispensable para el proceso y para la comunidad en general (Valencia et al., 2015). Sin embargo, la presencia de la pulpa sigue siendo un tema de relevancia ambiental y económica que debe ser atendido.

Por otra parte, la contaminación ambiental causada en su mayoría por plásticos, hoy en día es un problema grave debido al consumo excesivo de material de único uso, que afecta los ecosistemas marinos debido a que los residuos pueden terminar en los océanos causando daños a las especies que allí habitan o están en contacto con este entorno. Se calcula que entre el 15 % y el 40 % del plástico producido en el mundo acaba cada año en los mares. El PNUMA pensaba en 2013 que al menos 6.4 millones de toneladas de basura acababa cada año en el mar. Actualmente esta cantidad es superior a los 8 millones de toneladas de plástico que pueden terminar en el mar cada año. Cabe mencionar que la procedencia de estos plásticos es de países desarrollados y en vías de desarrollo, con poblaciones que tienen crecimiento rápido (Estévez, 2017). Es por ello, que la comunidad científica internacional busca cada día plantear alternativas al uso de material polimérico.

Las dos problemáticas planteadas previamente, contaminación ambiental por residuos provenientes del beneficio del café y contaminación ambiental por uso masivo de polímeros, son el foco que motiva la presente investigación.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El proyecto tiene como objetivo investigar uno de los métodos para la obtención de ácido láctico a partir de materia prima de desecho como lo es la pulpa de café, siendo una fuente de azúcares y nutrientes que pueden ser aprovechados por microorganismos que en su proceso metabólico permitan la producción de ácido láctico.

Hoy en día el ácido láctico juega un papel importante debido a que es un ácido orgánico usado en las industrias farmacéuticas, cosméticas y alimentarias, además del alto potencial generado al usar este producto como materia prima en la producción de polímeros biodegradables (Waldir et al., 2007).

Plantear estrategias de aprovechamiento de subproductos del café, es de gran importancia para las fincas productoras, debido a que se le da uso a un residuo que no tiene una disposición final adecuada y genera grandes daños ambientales, tanto al suelo como a las fuentes hídricas. El aporte que genera esta investigación es una posible pequeña solución a los problemas ambientales donde no se realiza ningún tipo de tratamiento a la pulpa del café. Además, con la obtención de ácido láctico empleado para la producción de biopolímeros podría reducirse, a largo plazo, el uso de los plásticos derivados de hidrocarburos que son un problema ambiental debido a su biodegradabilidad lenta que generan gran impacto ambiental a los diferentes ecosistemas.

Los residuos agroindustriales tienen un gran potencial de estudio para su aprovechamiento debido al creciente impacto ambiental y económico que genera la incorrecta disposición de los mismos en el ámbito empresarial a nivel mundial (Yepes et al., 2008). Dentro de las principales aplicaciones estudiadas a los residuos agroindustriales se encuentran la utilización como sustratos fermentables a nivel biotecnológico, en procesos de biodegradación de contaminantes, como fuente de energía en la creación de biocombustibles y como adsorbentes de residuos químicos en aguas, principalmente. Uno de los primordiales retos biotecnológicos consiste en la búsqueda de materias primas de bajo costo y fácil adquisición que puedan ser utilizadas como sustratos fermentables que provean carbono o nitrógeno a los procesos mediados por microorganismos (Barragán et al., 2008).

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

Determinar la producción de ácido láctico mediante la fermentación de pulpa de café sometida a cambios en el porcentaje de pulpa e inóculo adicionados, así como el tiempo de fermentación, la deshidratación parcial y/o la hidrólisis ácida previa de la pulpa.

### **4.2. Objetivos específicos**

- Determinar cuál es el método (químico o enzimático) adecuado para la identificación de ácido láctico en la pulpa de café.
- Cuantificar la producción de ácido láctico en un proceso de fermentación de pulpa de café durante las primeras 96 h, variando el porcentaje de pulpa y de inóculo, e identificar la relación óptima.
- Identificar la estrategia de mayor producción de ácido láctico a partir de pulpa sometida a deshidratación parcial y/o hidrólisis ácida previa a la fermentación.

## **5. MARCO TEÓRICO**

### **5.1 Composición y producción de café**

#### **5.1.1. Composición química del café**

Además de las condiciones organolépticas que posee el café, los granos de café tienen antioxidantes como los polifenoles, ácidos fenólicos, cafeicos, entre otros; y la presencia y cantidad de estos biocomponentes dependen exclusivamente de la especie, lugar de origen, grado de tuestión, fermentación y molienda. En Colombia, la industria cafetera representa una parte importante en la economía y es un eje de desarrollo rural, pero en sus diferentes etapas o procesos se generan residuos que al no darle un adecuado uso constituye un problema ambiental (Serna et., al 2018).

#### **5.1.2 Características del grano de café**

Los racimos unidos a las ramas por los tallos cortos forman la cereza del café. Está formada por una parte exterior (exocarpio), donde el color evidencia su evolución. El exocarpio cubre la pulpa (mesocarpio) de la naturaleza mucilaginosa, que encierra las semillas pegadas por su parte plana y cubiertas por dos capas: una llamada capa densa de pectina y la otra de coloración amarilla conocida como pergamino. Finalmente, el grano está recubierto por una fina membrana de color plateado llamada tegumento (Prieto, 2002, p. 3).

El café químicamente está compuesto por agua y materia seca, la almendra está constituida por minerales y por sustancias orgánicas como carbohidratos, lípidos, proteínas, alcaloides como cafeína y trigonelina además de ácidos carboxílicos y fenólicos y compuestos volátiles los cuales le aportan el aroma a la almendra (Puerta, 2011). A continuación en la tabla 1, se muestra la composición química de la pulpa de café.

**Tabla 1.** Composición química de la pulpa de café.

<b>Determinación</b>	<b>Valor</b>
• pH	4.40
• Humedad (%)	74.83
<b>Compuesto</b>	<b>% Base seca</b>
• Taninos	1.80 – 8.56
• Sustancias pécticas totales	6.50
• Azúcares reductores	12.40
• Azúcares no reductoras	2.00
• Cafeína	1.30
• Ácido clorogénico	2.60
• Ácido caféico total	1.60
• Contenido celular	63.20
• Fibra detergente neutral	36.80
• Fibra detergente acida	34.50
• Hemicelulosa	2.30
• Celulosa	17.70
• Lignina	17.50
• Proteína lignificada	3.00
• Proteína cruda	10.10
• Cenizas insolubles	0.40

**Fuente:** Elías, 1978

## **5.2 Impactos ambientales y riesgos por los subproductos del café**

Los impactos ambientales y riesgos que pueden ser generados por los desechos de la pulpa de café son múltiples a continuación se mencionan y describen algunos de estos, cabe mencionar que se dan en el momento que no se aprovechan bien dichos residuos.

### **5.2.1 Riesgo ambiental del manejo inadecuado de los subproductos del café**

Al ser vertida, la pulpa generada durante el beneficio del café a las fuentes hídricas, produce grandes cantidades de materia orgánica que al ser metabolizadas por las bacterias para poder degradarlas consumen el oxígeno disuelto presente en las fuentes hídricas causando por ende pérdida de la biodiversidad presente en estas (Samayoa et., al 2014).

- Modificaciones drásticas en la acidez natural del agua a pH 2.5, producida por los ácidos orgánicos (acético, butírico, propiónico, etc.) generados



durante la degradación de la materia orgánica específicamente en su etapa anaeróbica.

- Agotamiento o pérdida del oxígeno disuelto (OD) en el agua, ocasionado por la necesidad de abastecimiento de los microorganismos encargados de la degradación de la materia orgánica.
- Incremento de la turbidez del agua (coloración oscura), como consecuencia de los polifenoles presentes y de la gran cantidad de sólidos suspendidos (ANACAFÉ, s.f.).

Según información obtenida por las empresas de fertilizantes, el café en Colombia consume aproximadamente 350.000 t de fertilizantes de síntesis química cada año. Esto permite indicar que para la producción de café en promedio se aplican 400 kg en fertilizantes por ha/año. Los cuales se encuentran en el mismo rango estimado de aplicación de fertilizantes en promedio usados en la agricultura colombiana la cual está estimada en 499 kg ha/año (Sánchez Navarro et., al 2013).

La pulpa de café al ser vertida al medio ambiente puede causar contaminación. Ante esta realidad se han realizado muchos estudios como realizar un proceso natural de abono orgánico, la transformación en compost, elaboración de té de cáscara de café entre otros con el fin de aprovecharla y disminuir su efecto tóxico en el ambiente (Ramírez, 1998).

### **5.3 Impactos ambientales y riesgos por el cultivo del café**

#### **5.3.1. Deforestación**

Es una de las principales causas evidenciadas durante el establecimiento del cultivo de café ya que se deben perder grandes cantidades de bosque y o especies arbóreas presentes en el entorno, puesto que es un cultivo que requiere especificaciones de siembra, cabe mencionar que dichos bosques juegan un papel ecológico importante debido a que protegen la dinámica atmosférica, calidad del agua y especies silvestres que allí habitan. Los bosques intercambian el CO<sub>2</sub> entre la biosfera y la atmósfera almacenando una cantidad importante de carbono tanto de la vegetación como de los suelos, es así que actúan como sumideros capturando el CO<sub>2</sub> y convirtiéndolo en carbohidratos, mediante la fotosíntesis (Pineda et al., 2005).

### **5.3.2. Pérdida de biodiversidad**

La deforestación y el establecimiento de monocultivos como lo es el café generan mayores pérdidas de hábitat y por ende una reducción de biodiversidad de fauna y flora a causa de la intensificación del sistema de producción de café que impacta de manera directa debido a que se va degradando la cobertura vegetal y las especies. Estudios realizados en México y Colombia por el Smithsonian Migratory Viré Centre, indican que en los cultivos con exposición solar se presenta un 90 por ciento menos de especies de pájaros con relación a las plantaciones de café bajo sombra (Toledo, 1996).

Los datos obtenidos por Mekonen et al., (2014) encontraron durante un experimento:

“La cantidad de plaguicidas presentes en los frutos del café, arrojaron que los porcentajes de recuperación de los plaguicidas en la pulpa de café verde están en un rango de 70% a 120%, con una desviación estándar menor a 20%, lo cual permite indicar que la pulpa posee concentración de algunos de los componentes presentes en los plaguicidas uno de los principales es el DDT el cual puede llegar a generar afectaciones y alteraciones para las especies que estén en contacto o ingieran dicho compuesto, cabe mencionar que además del suelo, las fuentes hídricas también se verán afectadas puesto que por infiltración este compuesto va a parar a los acuíferos y fuentes hídricas (pg. 1297)”.

### **5.3.3. Contaminación por uso de agroquímicos**

El uso de agroquímicos genera grandes afectaciones ya que contamina diversidad de recursos del ambiente como lo es el suelo, aire y fuentes hídricas y a su vez trae consigo afectaciones a la salud de las personas que hacen uso de estos compuestos. La adición de estos va a depender del tipo de exposición solar a la que estén sometidos los cultivos, ya que el café bajo sombra requiere de un uso progresivo de pesticidas, fertilizantes y químicos (Ramírez González, 2016).

### **5.3.4. Erosión y degradación del suelo**

La degradación de los suelos se refiere a la disminución o alteración negativa de una o varias de las ofertas de bienes, servicios y/o funciones ecosistémicos y ambientales de los suelos, ocasionada por factores y procesos naturales o

antrópicos que, en casos críticos, pueden originar la pérdida o la destrucción total del componente ambiental (IDEAM, 2004).

La pulpa de café tiene diversidad de compuestos entre los cuales se encuentran altas cargas de fenoles y polifenoles que son sustancias las cuales son consideradas como tóxicas para gran parte de especies de artrópodos y microorganismos; además de poseer un pH ácido. Altas cantidades de pulpa de café en el suelo pueden generar afectaciones a poblaciones de microflora edáfica, en el que los hongos acidófilos son los principales microorganismos encargados de la metabolización de la materia orgánica (Cervantes et al., 2015).

En Colombia, el 97% de la erosión es causada por la lluvia y esto es asociado con áreas cultivadas con café principalmente, en tiempos de fuertes lluvias sobre todo en terrenos con pendientes sometidas a la deforestación y a la producción de monocultivo durante mucho tiempo, causan un significativo deterioro de la calidad del suelo a su vez contribuye a la erosión por falta de cobertura vegetal. En la zona cafetera se estima que las pérdidas de suelo por erosión en el cultivo de café son del orden de 6 a 30 t/ha/año (Quiroz e Hincapié, 2007). Es por ello que el establecimiento de monocultivos de café en áreas montañosas genera entornos particularmente frágiles lo cual desencadena un deterioro en la calidad del suelo y por ende una erosión creciente.

“El concepto de sostenibilidad implica una producción a largo plazo sin causar mayores daños al medio ambiente o agotar los recursos naturales (Benzing, 2001). Se dice que la agricultura es sostenible cuando es ecológicamente segura, económicamente viable, socialmente justa y culturalmente apropiada, donde el medio ambiente y los recursos naturales son la base de la actividad económica. La agricultura sostenible preserva la biodiversidad, conserva el suelo, el agua y la energía, valora el conocimiento local, minimiza los insumos externos que el productor necesita para cultivar haciéndolo más autosuficiente” (Labrador & Altieri, 2001).

### **5.3.5. Impactos ambientales por proceso de beneficio del café**

Es importante mencionar que en el proceso del café no solo se generan impactos ambientales negativos, (que afectan las fuentes hídricas, los suelos, la biodiversidad y los ecosistemas); estos impactos pueden generar graves alteraciones en el desarrollo de la sociedad. Es por ello que es significativa la conservación y protección de los recursos naturales ya que por medio de ellos el ser humano satisface sus necesidades, implementando un desarrollo sostenible y entendiendo lo indispensable que es la conservación del medio ambiente (Fernández et al., 2020).

### **5.3.5.1. Reducción del recurso hídrico**

Durante el proceso de beneficio del café tradicional es indispensable el uso de agua, el cual suele usarse de manera excesiva empleándose entre 21 y 25 litros de agua por kilogramo de café; el cual se ve agotado por el abuso en el proceso de lavado (Osorio, 2019).

### **5.3.5.2. Contaminación de fuentes hídricas**

Según reportes del Ideam (2012), el sector cafetero aporta en Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) 41.25 toneladas al año, por Demanda Química de Oxígeno (DQO) 53.92 toneladas por año y en Sólidos Suspendidos Totales (SST) 32.900 toneladas por año, lo cual indica el grado de contaminación que tienen los cuerpos de agua.

La DBO y DQO son algunos de los parámetros más importantes en la caracterización de las aguas residuales. La DQO es la demanda química de oxígeno del agua. Es la cantidad de oxígeno necesario para oxidar la materia orgánica por medios químicos y convertirla en  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . La DBO solo detecta el material orgánico degradado biológicamente (Induanálisis, 2019). Los dos parámetros permiten indicar la contaminación en las fuentes hídricas y es por ello que son medidas de importancia para tener en cuenta en el control de la contaminación en fuentes hídricas.

## **5.4. Aprovechamiento de residuos agroindustriales**

La agroindustria, se puede definir como la acción económica que combina la producción agrícola con la industrial para generar productos alimenticios o materias primas que son reservadas a la producción de bienes con valor agregado (González, 2013). En la actualidad, la agroindustria es reconocida no solo por su producción e impacto económico mundial, sino también por las técnicas que se realizan para reducir el impacto ambiental que crean sus residuos; por tanto, su continuidad y oportunidades en el mercado no dependen solamente de regulaciones sujetas a sanciones sino también de su relación con el medio ambiente. De acuerdo con el informe del DANE sobre exportaciones en el año 2017, la agroindustria ocupa el primer renglón de exportaciones en Colombia por un valor de 35.25 millones de dólares y por ello los residuos de este renglón de la economía y en especial los concernientes al café, son mayoritarios y se constituyen en una problemática ambiental a ser resuelta (Departamento Nacional De Planeación [DANE], 2017).

Como se enunció previamente el beneficio del café aporta dos subproductos básicos que son la pulpa y el mucílago. Si bien las nuevas tecnologías de beneficio han disminuido la cantidad de mucílago generado al disminuir el requerimiento de agua necesaria para el beneficio, la problemática asociada a la pulpa de café sigue siendo un tema para abordar. La pulpa de café (*Coffea arábica L.*) es un residuo vegetal lignocelulósico que se adquiere después del proceso de beneficio húmedo y es arrojada a los suelos y acuíferos, por lo que constituye el principal agente contaminante de diferentes ecosistemas (Cervantes, 2014).

El aprovechamiento de los residuos sólidos es de vital importancia debido a que los residuos generados por la industria cafetera generan una gran contaminación al medio ambiente por ello se ha considerado en invertir en tecnologías mediante las cuales se modifiquen las características de dichos productos y se logre un incremento en el uso de los residuos en procesos industriales, para la producción de nuevos productos que sean de gran importancia para los cafeteros y de esta manera minimizar los contaminantes aportados por estos residuos (Agudelo, 2012). Es por ello, que se plantea la posibilidad de aprovechar la pulpa de café como una fuente de biomasa para la producción microbiana de compuestos con valor agregado como ácidos orgánicos y alcoholes. El presente proyecto se centra en la optimización de condiciones de producción de ácido láctico.

En cuanto al ácido láctico este es un ácido orgánico que se adquiere mediante un proceso biotecnológico de homofermentación probiótica, considerado de gran importancia en la industria farmacéutica, alimentaria, en la producción de polímeros biodegradables y en la acuicultura (Quintana, 2016). También es utilizado en la industria de plásticos como precursor del ácido poliláctico. En décadas recientes, muchas de las investigaciones buscan optimizar la producción de ácido con el fin de lograr una mayor productividad y utilidad a bajo costo. Los parámetros a tener en cuenta dentro de los bioprocesos son: tipo de microorganismos, sistemas de producción, nutrientes y bioreactores (García et al., 2010).

El proceso de aprovechamiento de materias primas implica algunos pasos como la hidrólisis del sustrato para llegar hasta azúcares fermentables, fermentación de azúcares para producir ácido láctico, separación de biomasa y partículas sólidas del medio de fermentación y por último la purificación del ácido láctico a partir del medio fermentativo (Rodríguez Stouvenel; Serna-Cock et Al., 2005). Los microorganismos capaces de realizar la conversión de azúcares a ácido láctico son los llamados *Lactobacillus*, valiosos por su capacidad de fermentar varias fuentes de carbono simples, además para producir ácido láctico, muchas de estas bacterias pueden subsistir en condiciones de acidez (León de la O, y otros, 2013). La mayoría de los *Lactobacillus* tienen alta tolerancia a pH por debajo de 5 y el crecimiento óptimo está en un rango entre 20-40° C (Castañeda & Gallo, 2017).

Para el crecimiento de las bacterias ácido lácticas (BAL), se requiere una mezcla de aminoácidos y péptidos, los cuales son utilizados por los microorganismos, a su vez se genera una rápida fermentación, se usan sustratos baratos, permitiendo una baja adición de nutrientes nitrogenados, para que crezcan en condiciones de pH reducidos y presenten poca producción de biomasa (Vázquez, J, 2008).

La fermentación es un proceso muy utilizado en la industria en lo que corresponde a la producción de pan, vino y cerveza en presencia de procesos bioquímicos realizados por levaduras, bacterias y enzimas, que degradan principalmente los azúcares de los sustratos (Puerta et al, 2011). Puntualmente, la fermentación es un método que las células usan para extraer energía de los carbohidratos cuando el oxígeno u otros aceptores de electrones no están disponibles en el entorno. El proceso puede seguir a glucólisis como el siguiente pasó en la descomposición de la glucosa y otros azúcares para producir moléculas de trifosfato de adenosina (ATP) que crean una fuente de energía para la célula.

La optimización de las condiciones de fermentación puede no ser suficiente para la producción de ácido láctico en cantidades apreciables. Por ello, existen diversas estrategias que permiten mejorar la producción como por ejemplo la hidrólisis ácida o deshidratación de la pulpa, previo al proceso fermentativo. La deshidratación permite controlar el crecimiento de microorganismos que puedan competir por el consumo de nutrientes en la pulpa y con ello mejorar el proceso fermentativo con *Lactobacillus*. La hidrólisis ácida es el proceso más eficiente para la liberación selectiva de azúcares hemicelulósicos dejando como residuo final fracciones de celulosa y ligninas casi inalteradas (McMillan, 1994). Esta es una de las técnicas más utilizadas para la liberación de hemicelulosa; en este proceso es fundamental el uso de ácidos diluidos (1-4%), bajo temperaturas moderadas de (120 a 160 °C) generando poca descomposición de los azúcares; el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> es el ácido más usado para este proceso. De acuerdo con Pleissner y col (2017) se usó un tratamiento térmico de 121 °C durante 30 minutos en presencia de 0.18 mol de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para hidrolizar la pulpa de café.

## 6. ANTECEDENTES

Teniendo en cuenta que el proceso de fermentación desarrollado en la presente investigación inicia con la extracción de microorganismos naturales de la pulpa, fue necesario investigar si la flora microbiana naturalmente presente en los residuos del beneficio del café, incluía especies del género *Lactobacillus sp.* Los investigadores Puerta et al., (2012), realizaron un proceso de fermentación a una temperatura promedio de 20.5°C hasta por 74 h, y encontraron que, en el mucílago de café maduro y clasificado, el 33% de la población bacteriana inicial fueron *Lactobacillus*, que crecieron desde las primeras h del proceso hasta predominar a las 8 h de fermentación. El mucílago se fermentó en forma natural dadas las condiciones ambientales de las zonas cafeteras, además influyó la composición microbiana y química, así como las temperaturas que variaron entre el día y la noche de 12 a 34°C. La velocidad de degradación dependía del sistema de fermentación y la temperatura externa influyó en el desarrollo y metabolismo de los microorganismos.

En otro estudio, utilizaron la pulpa de café 16.6% (p/v) como fuente de carbono para la fermentación y la producción de ácido láctico usando *Bacillus Coagulans*. La pulpa de café fue sometida a un tratamiento térmico a 121°C en presencia de 0.18 mol de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> durante un tiempo de 30 minutos. Las fermentaciones se realizaron en el laboratorio a escala piloto teniendo en cuenta que el rendimiento de ácido láctico por gramo de azúcar consumido fue de 0.78 g y la fuente de carbono del 94.65%. A partir de la hidrólisis se redujeron los costos de fuente de nitrógeno, utilizando técnicas convencionales que optimizaron la producción de ácido láctico (Pleissner et al., 2017).

Por otra parte, se evaluó la producción de ácido láctico empleando mora residual y suero de quesería en diferentes mezclas, se inició con la caracterización de cada uno de los sustratos a través de ensayos fisicoquímicos como pH, humedad, contenido de azúcares, proteína. Se escogió como fuente de carbono y energía la peptona y sales (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>), para la producción de ácido láctico, empleando *Lactobacillus sp.* La medición del ácido láctico se realizó usando cloruro férrico, con medición espectrofotométrica a 440 nm. La mejor concentración para las mezclas de mora y suero durante el proceso fermentativo transcurridas las 20 h fue de 461.068 ± 0.118 µg Ácido Láctico/L respectivamente con un pH de 2.94 en la mora y de 6.7 en el suero (Montes, 2015).

En la investigación realizada por Castañeda et al., (2017), se evaluó la influencia del medio de crecimiento comparando el medio de cultivo Agar MRS (de Man, Rogosa y Sharpe) con un medio de cultivo constituido por peptona y extracto de levadura sobre la bacteria *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *Bulgaricus* para la obtención del ácido láctico usando como fuente de carbono afrecho de café que fue sometido a hidrólisis ácida para la obtención de azúcares reductores. La finalidad de la investigación fue la obtención de ácido láctico para cada uno de los medios de crecimiento y determinación del mejor método de producción. El procedimiento se realizó a una temperatura de 45°C durante 24 h y se agregó cáscara de mandarina en medio de crecimiento MRS a una temperatura de 37°C. La mayor productividad se logró en el medio fermentativo con el Agar MRS y afrecho de café, el cual fue de 11.16 g/L de ácido láctico en menos de 12 h. Teniendo en cuenta que la cáscara de mandarina y el afrecho de café están compuestos por hemicelulosa y celulosa (45% y 50% aproximadamente) pueden evaluarse como sustratos adecuados para la obtención de azúcares simples (Castañeda y col, 2017).



## 7. **NORMATIVIDAD**

Decreto Ley 2811 de 1974. Por el cual se dicta el Código Nacional de Recursos Naturales Renovables y de Protección al Medio Ambiente. Artículo 8: Donde se consideran factores que deterioran el ambiente a) La contaminación del aire, de las aguas, del suelo y de los demás recursos naturales renovables. Se entiende por contaminación la alteración del ambiente con sustancias o formas de energía puestas en él, por actividad humana o de la naturaleza, en cantidades, concentraciones o niveles capaces de interferir el bienestar y la salud de las personas, atentar contra la flora y la fauna, degradar la calidad del ambiente de los recursos de la nación o de los particulares. Se entiende por contaminante cualquier elemento, combinación de elementos, o forma de energía que actual o potencialmente pueda producir alteración ambiental de las precedentemente descritas. La contaminación puede ser física, química o biológica.

Norma ISO 14001: Se promueve la protección ambiental y la prevención de la contaminación, avanzando hacia el desarrollo sostenible y el equilibrio entre el crecimiento económico, social e industrial y la conservación del medio ambiente.

Decreto 1505 de 2003: Aprovechamiento de Residuos Sólidos. A través de un manejo integral de los residuos sólidos, los materiales que se recuperan son reincorporados al ciclo productivo y económico de manera eficiente, por medio de cualquier modalidad que lleve beneficios sanitarios, ambientales, sociales y económicos.

Decreto 1076 de 2015: Por el cual se expide el Decreto Único Reglamentario del Sector Ambiente y Desarrollo Sostenible. En la sección 18 denominada conservación de los recursos naturales en predios rurales, indican que los propietarios de predios están obligados a la conservación, protección y aprovechamiento de las aguas y no incorporar en dichas aguas cuerpos o sustancias sólidas, líquidas o gaseosas, tales como basuras, desechos o cualquier sustancia tóxica, no provocar alteración del flujo natural de las aguas. Capítulo 3: Establece las disposiciones con los diferentes usos del recurso hídrico, el Ordenamiento del Recurso Hídrico y los vertimientos al suelo y a los alcantarillados, igualmente la sección 2 establece la destinación genérica de las aguas superficiales y subterráneas, siendo uno de los usos el agrícola, donde se utiliza el agua para

irrigación de cultivos y otras actividades conexas o complementarias. Título 7: Prevención y control contaminación ambiental por el manejo de plaguicidas donde establecen las medidas ambientales para el manejo de los plaguicidas, y para la prevención y el manejo seguro de los desechos o residuos peligrosos provenientes de los mismos, con el fin de proteger la salud humana y el ambiente (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, 2015).

## **8. METODOLOGÍA**

### **8.1. Tipo y alcance de la investigación**

La investigación fue experimental debido a que se deben realizar diversos procesos y análisis en el laboratorio, para llevar a cabo la obtención del ácido láctico, además las variables fueron manipuladas en condiciones controladas y con grupos control o blancos de muestras.

El tipo de investigación fue correlacional ya que en las variables dependientes que son concentración de ácido láctico y pH; influyen las variables independientes como lo son tiempo, porcentaje de pulpa, porcentaje de inóculo, temperatura, concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### **8.2. Técnicas de recopilación de datos**

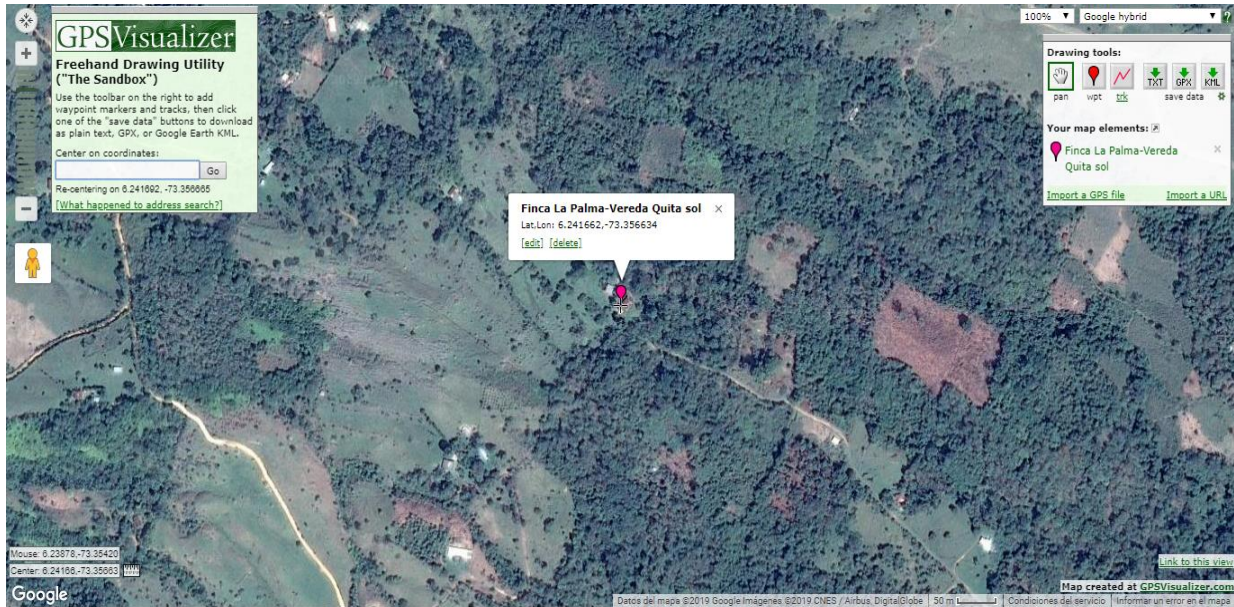
Los datos se obtuvieron por medio de ensayos y monitoreos durante el proceso de fermentación; los cuales se llevaron a cabo en los laboratorios de básicas, microbiología y aguas de la Universidad Libre Seccional Socorro.

### **8.3. Población y muestra**

La muestra de pulpa de café fue obtenida de la finca La Palma, vereda Quitasol del municipio Guadalupe, Santander la cual cuenta con 6 hectáreas cultivadas de café; se tomaron 11 kg de la pulpa para realizar el ensilaje, para el primer ensayo se tomaron 6 kg y se elaboraron 155 muestras mientras que para el segundo ensayo la población tomada fue de 2 kg los cuales se distribuyeron 225 g para la preparación de los tres tratamientos (Deshidratación parcial, Hidrólisis ácida y pulpa de café sin tratamiento), para posterior envasado y análisis de las muestras y realizar la respectiva toma de datos.

## 8.4. Ubicación geográfica

Figura 1. Ubicación geográfica



Fuente: Gps Visualizer

En la figura 1 se muestra la ubicación geográfica donde se realizó la recolección de la materia prima a utilizar. El sitio es llamado vereda Quitasol finca la Palma del municipio de Guadalupe, mientras que los procedimientos de fermentación y análisis de ácido láctico se realizaron en los laboratorios de la Universidad Libre seccional Socorro.

## 8.5. Diseño experimental

Se realizaron dos diseños experimentales para cada fase del proyecto (se relatan en detalle más adelante) Se analizaron las muestras por cuadruplicado.

El diseño se realizó con el software de análisis Statgraphics, donde se evaluaron las interacciones de las variables y así poder obtener las mejores condiciones para la producción de ácido láctico.

### **8.5.1. Fase 1**

Mediante un diseño de experimentos de 3x3 se evaluaron tres factores y tres niveles así: Porcentaje de pulpa (10 %, 15 % y 20 %), porcentaje de inóculo (1 %, 2.5 % y 4 %) y tiempo de fermentación (24 h, 60 h, 96 h); la variable de respuesta fue la concentración de ácido láctico para cada uno de los métodos (método químico). Este diseño se realizó con el software de análisis Statgraphics.

Para ello se realizaron una serie de experimentos para la producción de ácido láctico; este proceso se llevó a cabo con diferentes porcentajes de pulpa, porcentajes de inóculo y tiempo de fermentación ya que estos tienen gran influencia en la producción de ácido láctico, luego se extrajeron muestras de cada uno de los tratamientos obteniendo un total de 155 unidades, sin incluir los blancos, a estas se les realizó un proceso de separación para su posterior lectura en el espectrofotómetro, como se enuncia más adelante (método químico).

### **8.5.2. Fase 2**

Diseño experimental de 2x2 que consistió en 2 factores y dos niveles, siendo el primer factor el tipo de inóculo (cepa 2018 y 2019), y el segundo factor pretratamiento de pulpa (deshidratación parcial e hidrólisis ácida). La variable de respuesta fue concentración de ácido láctico para el método enzimático. Este diseño se realizó con el software de análisis Statgraphics.

Dado que la variable de análisis más importante en el presente proyecto es la concentración de ácido láctico.

El abordaje de cada uno de los objetivos del presente trabajo de grado se desarrolló con diferentes actividades tal y como se observa en la tabla 2.

**Tabla 2.** Actividades desarrolladas por cada objetivo.

<b>OBJETIVOS</b>	<b>ACTIVIDADES (RESUMEN)</b>
OBJETIVO 1: Determinar el mejor método de identificación de ácido láctico en la pulpa de café.	Mediante parámetros de operación como lo son la precipitación con sulfato de zinc ( $ZnSO_4$ ) y método enzimático (LOx) se establecieron curvas de calibración para determinar cuál es el método en el cual se obtiene los mínimos y máximos porcentajes de ácido láctico en cada protocolo.
OBJETIVO 2: Cuantificar la producción de ácido láctico en un proceso de fermentación de pulpa de café durante las primeras 96 h, variando el porcentaje de pulpa y de inóculo; e identificar la relación óptima.	Se realizó el envasado de cada una de las muestras con diferentes porcentajes de pulpa de café (10 %, 15 %, 20 %) e inóculo (1 %, 2.5 %, 4 %) y en diferentes tiempos de fermentación (24 h, 60 h, 96 h), para así llegar a determinar cuál de las muestras es la que genera mayor producción de ácido láctico.
OBJETIVO 3: Identificar la mejor estrategia para la producción de ácido láctico a partir de pulpa sometida a deshidratación parcial y/o hidrólisis ácida previa a la fermentación.	De cada tratamiento (deshidratación parcial e hidrólisis ácida) se tomaron muestras por quintuplicado para determinar la concentración de ácido láctico usando el método enzimático.

**Fuente:** Autoras (2021)

## **8.6. Variables**

Las variables fueron escogidas de manera tal que permitieran una optimización y manejo adecuado en cada uno de los métodos implementados, teniendo a su vez en cuenta la incidencia de estas en cada proceso (tabla 3).

**Tabla 3.** Variables

<b>Tipo</b>	<b>Variable</b>	<b>Unidad</b>
<b>Dependiente</b>	pH (Potencial de hidrógeno)	-
	Concentración de ácido láctico	%
<b>Independiente</b>	Tiempo (24, 60 y 96h)	Horas
	Porcentaje de pulpa en el medio de cultivo (10, 15, 20)	%
	Porcentaje de inóculo <i>Lactobacillus</i> en el medio de cultivo (1,2.5, 4)	%
	Deshidratación parcial (Temperatura y tiempo de secado)	°C ; h
	Hidrólisis ácida (Concentración de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	M
<b>Interviniente</b>	Clima	°C
	Tiempo de maduración de la pulpa de café.	-

**Fuente:** Autoras (2021)

### **8.7. Equipos, instrumentos y materiales**

**Balanza Portátil:** Esta balanza está compuesta por un solo receptor de carga de plato en el cual se deposita el material para medir, brinda precisión de dos unidades y confiabilidad. Algunas de sus características son:

- Modelo: CS 2000
- Referencia: OHAUS
- Unidades de medida: gramo.

**Multiparámetro:** Este equipo es de gran ayuda para la toma de pH y temperatura en aguas, se conectan a sondas que reconocen automáticamente el parámetro presente en la muestra o prueba; posee configuraciones de método para reducir errores. A continuación, algunas características del instrumento.

- Modelo: HQ40d

- Referencia: MULTIPAR.METRO

**Centrífuga:** Este equipo es usado para separación de sustancias en sólidos y líquidos mediante la aceleración producida y teniendo en cuenta la velocidad angular de giro, agiliza la sedimentación y a su vez permite que la separación de los componentes teniendo en cuenta su viscosidad. A continuación, algunas características del equipo.

- Modelo: PLC-012
- Referencia: Centrífuga Harmonic Series
- Control de velocidad: 0 a 12.000 rpm

**Licuada:** Es un instrumento que tiene como finalidad la trituración de material para disminuir su tamaño, consta de un motor eléctrico que hace girar unas cuchillas.

**Incubadora:** Es usada para la incubación de cultivos vivos a 37°C con gran precisión; posee una técnica de regulación que permite eliminar las oscilaciones de temperatura crítica. A continuación, se presentan algunas características.

- Modelo: memmert
- Referencia: Schutzart DIN EN 60529- IP 20

**Tubos de ensayo para centrifuga:** Es un instrumento de laboratorio usado para contener los líquidos y sólidos de una muestra su fondo es cónico y con pantalla para escritura es fabricado con polipropileno resiste 6000 rpm y a temperaturas de 121°C.

- Volumen: 15 ml

**Kit de micropipetas:** Este instrumento fue usado para facilitar y generar mayor exactitud a la hora de realizar la extracción de sustancias, reactivos o soluciones de los diversos métodos, para ello se usaron 4 debido a los diferentes volúmenes.

- **Modelo:** GIANT TRANSFERPIPETTE
- **Volúmenes:** 0.5 - 10  $\mu$ l  
2 - 20  $\mu$ l  
20 - 200  $\mu$ l  
100 - 1000  $\mu$ l



**Nevera (fija):** Este equipo es usado para la conservación de las muestras además de su eficiencia y bajo consumo de energía, cuenta con una tecnología vital fresh que disminuye la propagación de bacterias al interior. Algunas características del equipo.

- **Modelo:** Nevera Himalaya Haceb.
- **Referencia:** N HIMALAYA 404 SE DA TI

**Horno de convección:** Este equipo cumple la función de secado debido a la distribución homogénea de temperatura, la rápida dinámica y el ventilador de alto rendimiento. A continuación, se presentarán algunas características.

- **Modelo:** BINDER
- **Referencia:** 9090-0015

#### **Reactivo kit enzimático Lactato Oxidasa:**

**Marca:** Wiener lab

#### **Reactivos provistos del kit:**

**A. Reactivo A:** TOOS 3.5 mM; ascorbato oxidasa (pepino)  $\geq 30$  U/ mL; buffer fosfato 100 mM pH 7.8, azida sódica  $< 0.1\%$ .

**B. Reactivo B:** 4-aminoantipirina 5 mM; lactato oxidasa (microorganismos)  $\geq 10$  U/mL; peroxidasa (rábano picante)  $\geq 24$  U/mL; buffer fosfato 100 mM pH 7.8, azida sódica  $< 0.1\%$ .

El reactivo A (2 $\mu$ L) se debe incubar a 37 °C durante 120 segundos y leer absorbancia a 540 o 550 nm (el blanco de muestra). Luego agregar 35 $\mu$ L del reactivo B e incubar a 37 °C durante 300 segundos y leer absorbancia a 540 o 550 nm (la concentración de lactato).

**Espectrofotómetro:** Este equipo está diseñado para ofrecer resultados de gran exactitud, sirve para análisis de muestras, documenta los resultados permite la medición de diferentes rangos de longitud de onda algunas de las características se encontrarán a continuación.

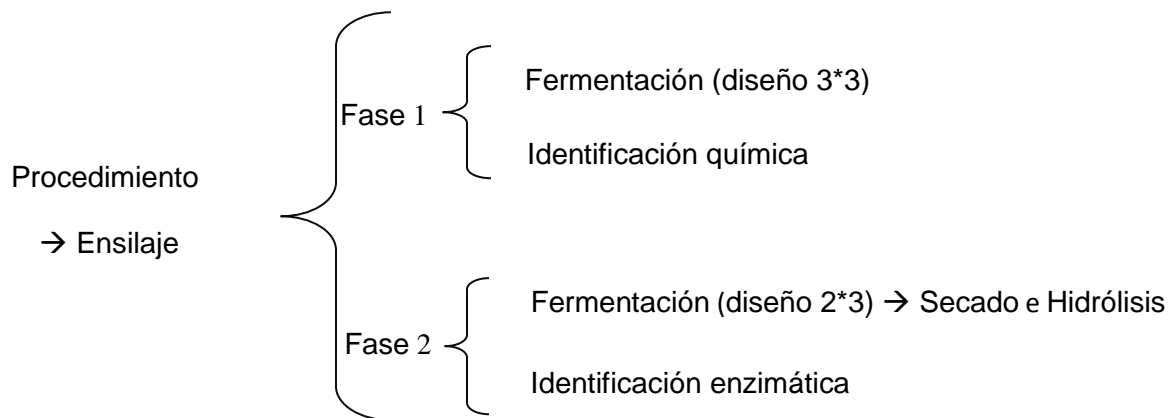
- **Modelo:** DR 3900 HACH
- **Referencia:** 1505416

➤ **Longitud de onda:** 320 - 1100 nm

## 8.8. Procedimiento

El procedimiento inició con una etapa de ensilaje de donde se extrajeron las cepas de lactobacillus naturales que fueron usadas posteriormente como inóculo de los procesos de fermentación. Para la fermentación acidoláctica se dividió en dos, donde inicialmente en la fase uno (1) se realizó la fermentación usando un diseño experimental de 3\*3 con un método de identificación química. En la fase dos (2) se hizo una fermentación acidoláctica con un diseño 2\*3 previo tratamiento de la pulpa (secado e hidrólisis ácida) evidenciando resultados mediante el método de identificación enzimática, como se muestra en la figura 2.

**Figura 2.** Esquema de procedimientos llevados a cabo en cada fase



### 8.8.1. Preparaciones de soluciones

Cabe aclarar que antes de realizar las diferentes fases del proyecto se prepararon los diferentes reactivos que eran necesarios para cada procedimiento particular. A continuación, se presenta la preparación de cada una de las soluciones teniendo en cuenta que fueron a 1 L con agua destilada.

#### 8.8.1.1. Preparación del cloruro de bario (BaCl<sub>2</sub>)

Para esta solución se pesaron 9.8 gr de BaCl<sub>2</sub>, se disolvió con agua destilada y envasó para conservar.

#### **8.8.1.2. Preparación del hidróxido de sodio (NaOH)**

Para esta solución se pesaron 2.64 gr de NaOH, se adicionó agua destilada y con la ayuda de un agitador se disolvió, posteriormente se dejó enfriar y se envasó.

#### **8.8.1.3. Preparación del sulfato de zinc (ZnSO<sub>4</sub>)**

Para esta solución se pesaron 22.5 gr, se disolvió con agua destilada y envasó.

#### **8.8.1.4. Preparación de la muestra de tricloruro férrico**

Inicialmente se pesaron 0.11 g de tricloruro férrico FeCl<sub>3</sub>, luego se le adicionó 0.27 mL de HCl a una concentración de 0.1 N luego se aforó a 2.2 mL con agua destilada, posteriormente se toman 1.83 mL de la solución, se afora a 22 ml.

### **8.8.2. Preparación de medios de cultivo usando pulpa de café.**

#### **8.8.2.1. Pulpa de café con hidrólisis ácida**

Se prepararon 500 mL de pulpa al 15 % con hidrólisis ácida para ello se adicionó 0.18 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a la pulpa y se calentaron durante 30 min a 121 °C, esto para liberar los azúcares, luego se neutralizó adicionando NaOH al 25 % (p/p).

#### **8.8.2.2. Pulpa de café con deshidratación parcial**

Se prepararon 500 mL de pulpa al 15 % de café que previamente fue secada en el horno a una temperatura de 60 °C durante 24 h.

#### **8.8.2.3. Pulpa de café sin tratamiento**

Se prepararon 500 mL de pulpa de café licuándola y llevándola a 15 % con agua destilada y agua peptonada.

### **8.9. Obtención de la pulpa de café**

La muestra de café (11 kg) fue obtenida mediante el proceso BELCOSUB en la finca la Palma de la vereda Quitasol del municipio Guadalupe, Santander, seguidamente transportada en un lapso de 18 h al laboratorio de Microbiología de la Universidad Libre Seccional Socorro donde se prepararon los reactores artesanales de fermentación, se esterilizó la pulpa y todos los materiales. Vale la pena resaltar que, previo a este trabajo, se había hecho un ensilaje controlado por 8 días con pulpa

extraída en las mismas condiciones para identificar una cepa de *Lactobacillus* nativa y que fue aislada y caracterizada en el laboratorio específicamente para este trabajo, los cuales fueron incubados en medios de cultivo como agar sangre, MacConkey y MRS, a 37 °C durante 24 h (Hernández y López, 2020).

### 8.9.1. Ensilaje de la pulpa

- Ensilaje de la pulpa sin tratamiento: 500 g de pulpa de café (proceso BECOLSUB) fueron ensilados en bolsas de (HDPE) polietileno de alta densidad (Calibre 8) y selladas con precintos.
- Medición pH Ensilaje: Se pesaron 10 g de pulpa + 100 mL agua destilada, se maceró y extrajo 10 mL para medición.
- Se realizaron 3 ensilajes los cuales se dejaron 8 días para un mejor resultado.

En la figura 3 se muestra el paso a paso y los procedimientos llevados a cabo para el ensilaje de la pulpa de café.

**Figura 3.** Ensilaje pulpa de café



Izquierda: Pulpa de café. Centro: Trituración de la pulpa. Derecha: Pulpa de café ensilada

**Fuente:** Autoras

### 8.9.2. Procedimiento fase 1

Se prepararon los inóculos que contenían la cepa nativa de *Lactobacillus* (1%, 2.5%, 4%), y se prepararon también los medios de cultivo modificados con pulpa como sigue: se pesaron 687 g de la pulpa para ser envasados en los diferentes porcentajes (10 %, 15 % y 20 %), para un total de 135 g, 288 g y 264 g a los cuales se les adicionaron 1350 mL, 1920 mL y 1320 mL de agua peptonada para el control del pH del medio, respectivamente (ver tabla 2), se incubaron las 155 muestras (figura 4) a 37 °C por una semana y se sacaron a las 24 h, 60 h y 96 h de fermentación realizando las respectivas mediciones de pH y temperatura de cada una de las muestras. A continuación, en la tabla 4 se evidencian las proporciones que se usaron para las muestras.

**Tabla 4.** Proporciones para preparación de las muestras

<b>Pulpa (%)</b>	<b>Inóculo (%)</b>	<b>Tiempo (h)</b>
10	1	24
15	2.5	60
20	4	96

**Fuente:** Autoras (2021)

Réplicas de cada punto =4  
Total muestras = 155

**Figura 4.** Preparación de las muestras para el proceso de incubación



**Fuente:** Autoras

### 8.9.2.1. Método químico para la extracción e identificación de ácido láctico.

A cada muestra se le adicionaron 0.16 mL de extracto de pulpa, 2.84 mL de agua destilada; 1.20 mL de cloruro de bario ( $\text{BaCl}_2$ ); 1.20 mL de hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ); 0.6 mL de sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4$ ) este reactivo se adicionó para precipitar la muestra como lactato de bario ( $\text{BaSO}_4$ ). La mezcla se agitó y centrifugó a 4500 rpm durante 10 min, se extrajo del sobrenadante 3 mL y se le adicionaron 3 mL de tricloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ), el cual se preparó minutos antes del proceso, siendo este el reactivo de identificación para su lectura en el espectrofotómetro (Silva y Queiroz, 2002).

A cada una de las 155 muestras se les aplicó el procedimiento de separación e identificación de ácido láctico siguiendo el método químico de identificación de ácido láctico que se detalla en el apartado 8.9.2.1.1.

En la figura 5 se muestra el paso a paso para la extracción del ácido láctico.

**Figura 5.** Preparación y extracción de ácido láctico



**Fuente:** Autoras

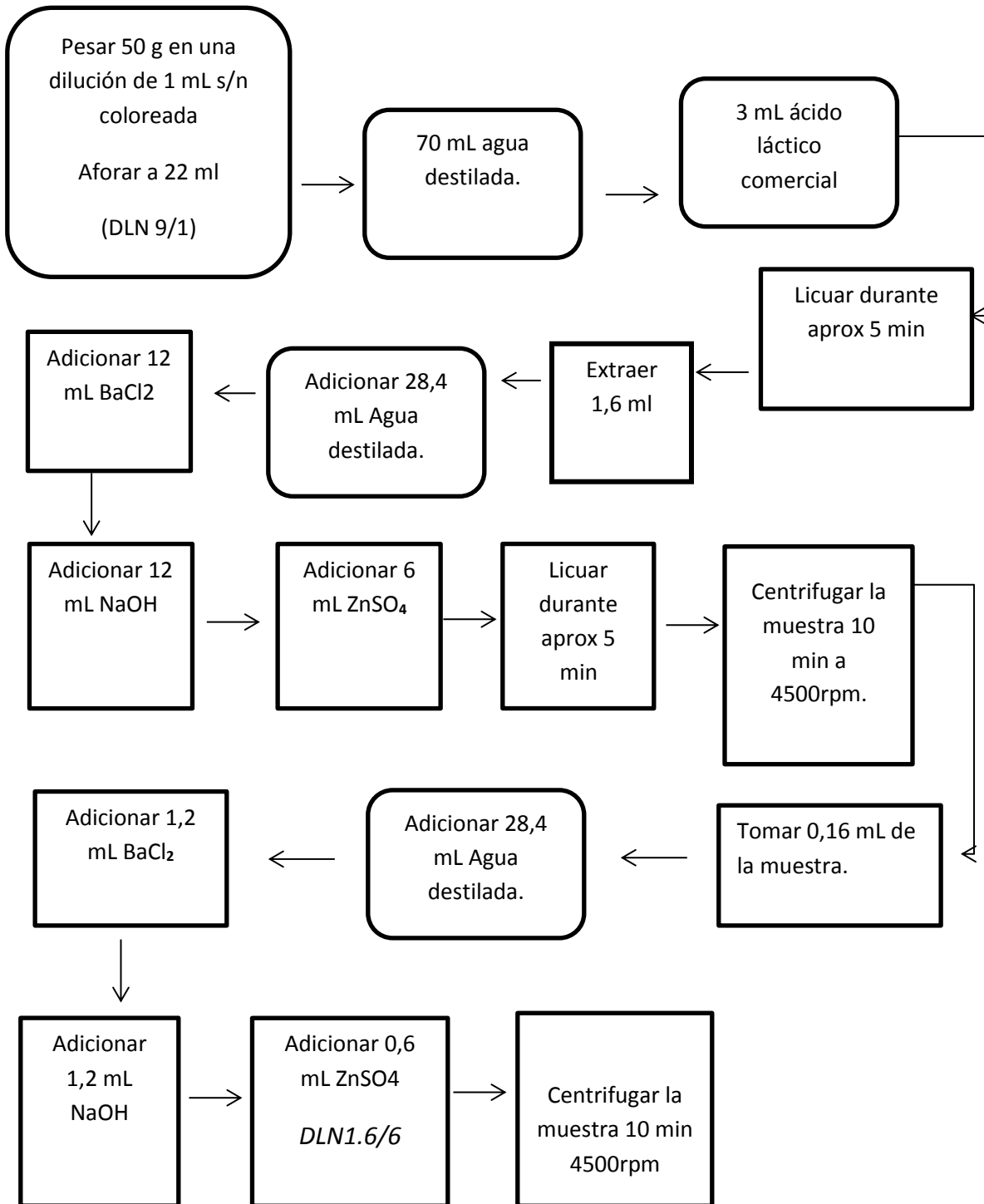
Izquierda: Extracción de pulpa. Centro: Extracción de la muestra para lectura

Derecha: Neutralización de la muestra

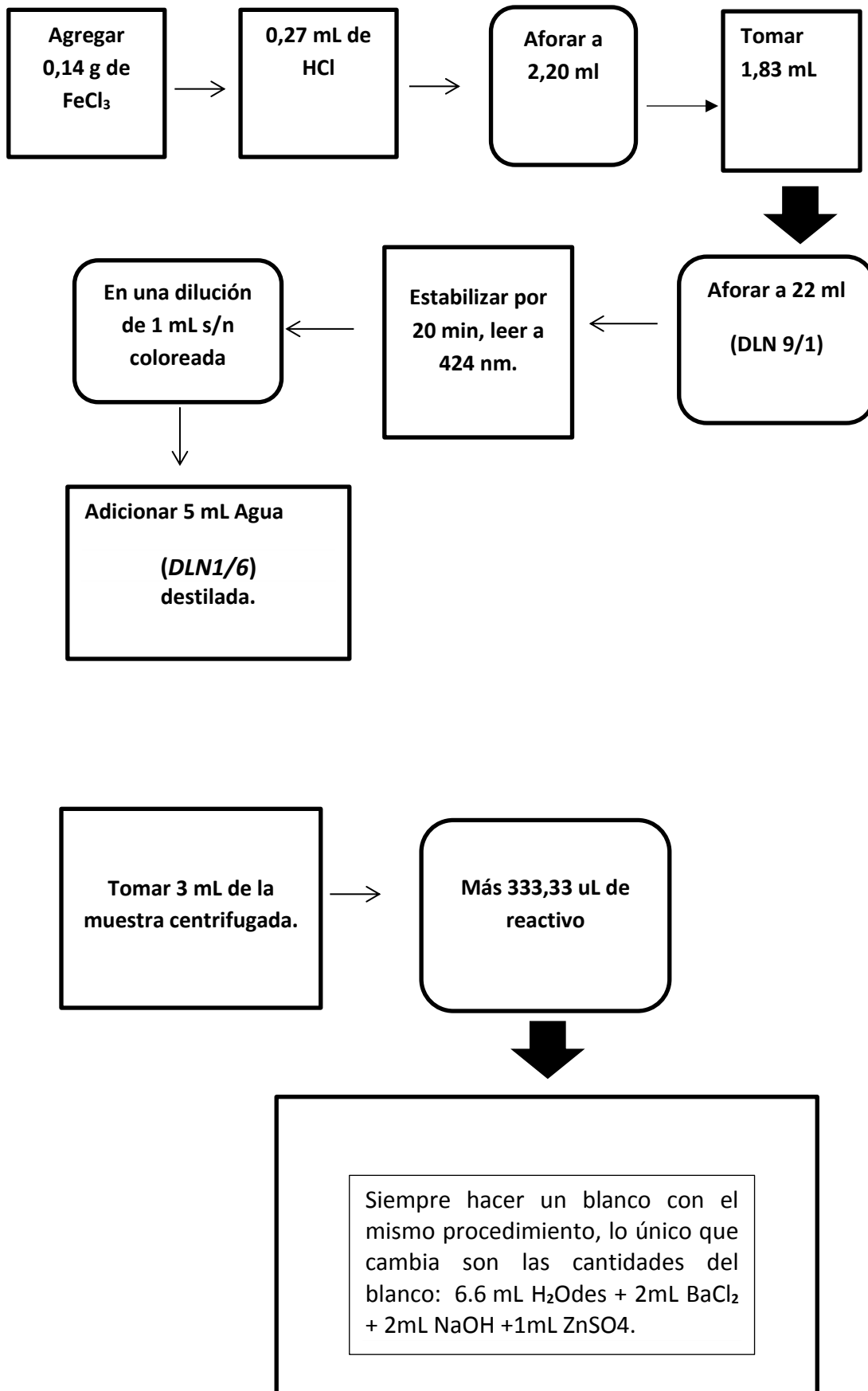
Para la lectura en el espectrofotómetro se realizó una dilución de 1 en 6 es decir por cada 1.00 mL de la reacción se adicionaron 6.00 mL de agua destilada.

### 8.9.2.1.1. Procedimiento para extracción de ácido láctico método químico

A continuación, el diagrama de flujo seguido para la extracción de ácido láctico donde se siguió la metodología planteada por Silva, D. J. & Queiroz, A. C. (2002).



### 8.9.2.1.2. Preparación del reactivo de identificación ( $\text{FeCl}_3$ )





### 8.9.3. Procedimiento fase 2

Para la fase 2 se tomaron como condiciones de partida aquellas previamente optimizadas en la fase 1 y se plantearon estrategias de tratamiento para la pulpa de café que pudieran mejorar la producción de ácido láctico.

Se prepararon las muestras con las condiciones de 2.5 % de inóculo, 15 % de pulpa y 60 h de incubación; las cuales fueron las mejores de la fase 1, luego se realizaron 30 muestras de la siguiente forma:

- 10 recipientes con la estrategia de pulpa con hidrólisis ácida o pulpa con tratamiento (PT)
- 10 recipientes con la estrategia de pulpa normal o pulpa sin tratamiento (PN)
- 10 recipientes con la estrategia de pulpa con deshidratación parcial o pulpa seca (PS)

De cada estrategia se incubaron 5 muestras a 35°C, teniendo en cuenta que se contaba con una cepa (A) obtenida en 2018 y luego una cepa (B) obtenida en 2019 en las mismas condiciones.

Anterior a este procedimiento un equipo de trabajo realizó la preparación del inóculo con caldo MRS y sembraron las cepas anteriormente nombradas.

En resumen, fueron 30 muestras las cuales se realizaron por quintuplicado para la cepa (A) 2018 y cepa (B) 2019 con cada una de las estrategias evaluadas: pulpa con tratamiento, pulpa sin tratamiento y pulpa seca respectivamente evidenciadas en la figura 6.

**Figura 6.** Muestras de la pulpa de café con c/u de las estrategias

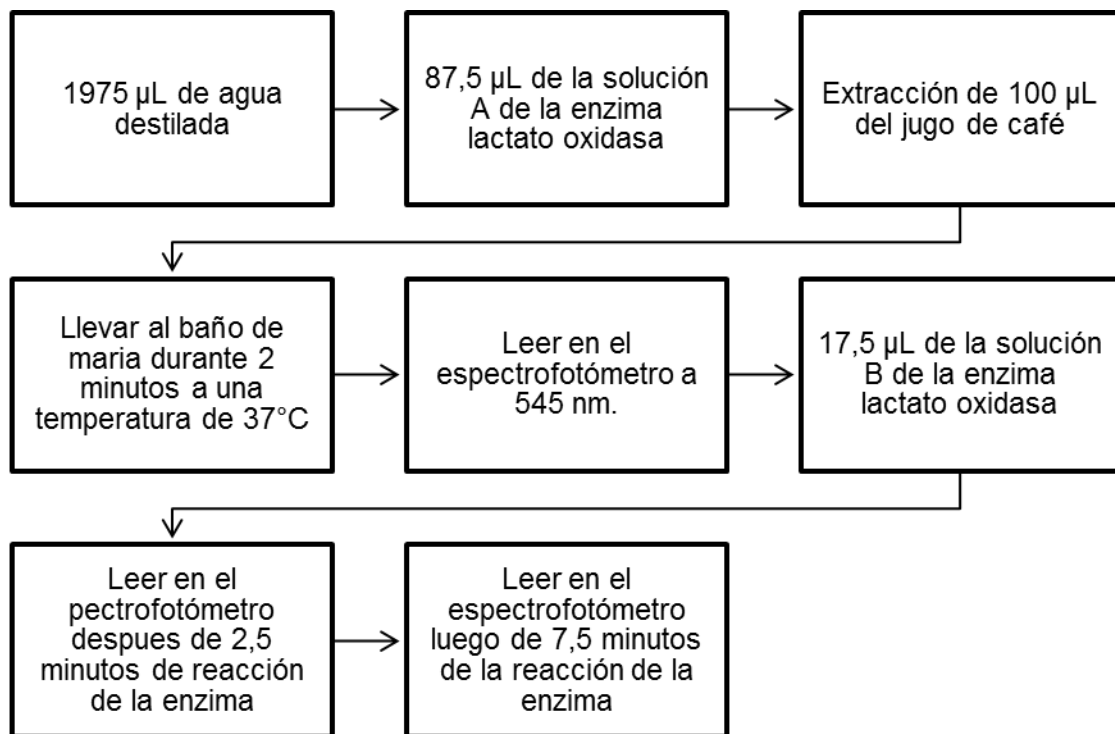


**Fuente:** Autoras

### 8.9.3.1. Método enzimático para identificación de ácido láctico

El método de identificación consistió en la oxidación del lactato producida por la enzima lactato oxidasa (LOx); el peróxido que se formó en esta reacción fue utilizado por la peroxidasa para generar un cromógeno, la intensidad cromática del complejo formado es directamente proporcional a la concentración de lactato en la muestra. Brevemente, se adicionaron 1975  $\mu\text{L}$  de agua, luego 87.5  $\mu\text{L}$  de la solución que contiene el buffer y el cromóforo y 100  $\mu\text{L}$  de la solución sobrenadante de fermentación. Esta mezcla de reacción se dejó a 37 °C durante 2 minutos, se hizo lectura del blanco a 545 nm y posteriormente se adicionó la enzima lactato oxidasa (17.5  $\mu\text{L}$ ). El reactivo se dejó actuando durante 2.5 minutos a 37 °C y se hizo la lectura final de la muestra a 545 nm (Wiener laboratorios S.A. I.C, 2000).

#### 8.9.3.1.1. Procedimiento de identificación por método enzimático



### 8.9.3.1.2. Método Pulpa de café con hidrólisis ácida o con tratamiento

Inicialmente se recolectó la pulpa, seguidamente se prepararon 500 mL de pulpa a un porcentaje del 15 %, se le adicionó una solución 0.18 M de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) luego fueron sometidos a calentamiento hasta ebullición, durante 30 minutos; esto para que el ácido reaccione y rompa las estructuras de la celulosa y así permitir la liberación de los azúcares que posteriormente los microorganismos podrán consumir en la fase de fermentación para maximizar la producción de ácido láctico. Por último, se le adicionó hidróxido de sodio (NaOH) en una concentración de 0.1 N 25 % (p/p) para neutralizar la muestra, como se muestra en la figura 7.

**Figura 7.** Preparación de la pulpa y neutralización de la muestra.



Izquierda: Pulpa triturada. Centro: Adición de ácido sulfúrico. Derecha: Calentamiento de la muestra.

**Fuente:** Autoras

### 8.9.3.1.3. Pulpa de café con deshidratación parcial

Se pesaron inicialmente con 156.72 g, luego se dejó la muestra en el horno a 60°C durante 24 h, se sacó la muestra y se pesó obteniendo un valor de 29.53 g, por último, se determinó la humedad. Con el material seco obtenido se realizó un medio de cultivo añadiendo agua peptonada hasta aforar a 500 mL, como se muestra en la figura 8.

**Figura 8.** Pesaje de las pulpas para cada porcentaje.



**Fuente:** Autoras

A continuación, la fórmula utilizada para hallar el porcentaje de humedad.

$$\text{Porcentaje de humedad} = \left( \frac{W_{\text{inicial}} - W_{\text{final}}}{W_{\text{inicial}}} \right) * 100$$

#### **8.9.3.1.4. Pulpa de café normal**

Se prepararon 500 mL de pulpa previamente licuada, donde se le adicionó agua peptonada hasta llegar al 15 %.

En la figura 9 se pueden ver las muestras con su respectivo envasado y rotulado.

**Figura 9.** Medios de cultivo a partir de pulpa de café (estrategias de fermentación)



**Fuente:** Autoras

## 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 9.1. Curva de calibración con el método químico ( $\text{FeCl}_3$ ) usando ácido láctico comercial como estándar.

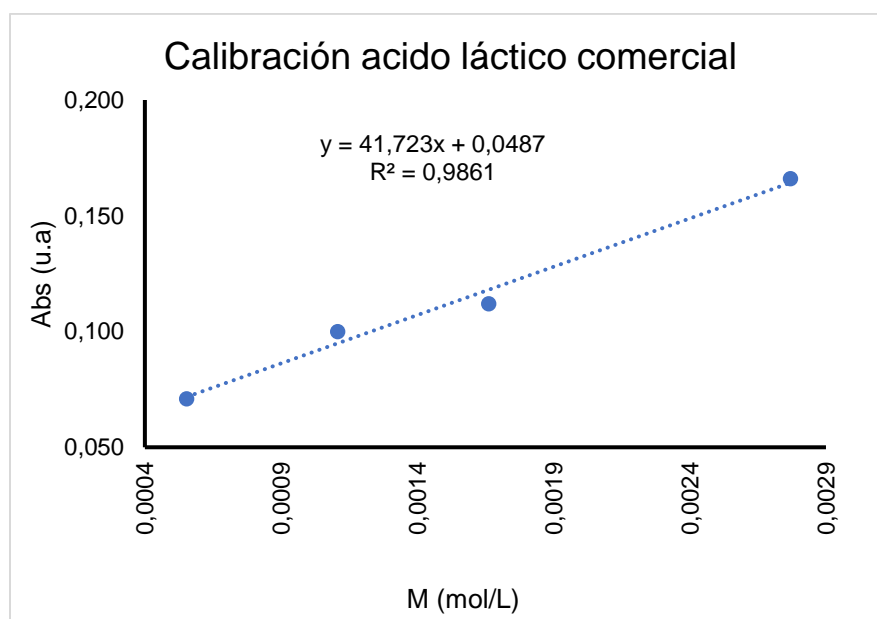
Esta fue realizada con el fin de determinar el máximo de absorbancia que se logra obtener en 440 nm, para establecer el rango de linealidad en el que el método químico tiene respuesta y con todos los datos obtenidos determinar el óptimo para la producción de ácido láctico. En la tabla 5 se muestran los datos de concentraciones y absorbancias obtenidos en la curva de calibración y posteriormente en la figura 10 se evidencia la respectiva gráfica.

**Tabla 5.** Datos de concentraciones y absorbancias

Conc (M)	Abs	Abs corregida
0,0002	0,235	0,1
0,0004	0,265	0,13
0,0006	0,29	0,155
0,0008	0,355	0,22

**Fuente:** Autoras (2021)

**Figura 10.** Curva de calibración inicial (estándar)



**Fuente:** Autoras (2021)

En la figura 10 se muestra la curva de calibrado del ácido láctico, teniendo en cuenta diversas concentraciones en el cual se logra obtener una correlación del 98% indicando que a mayor concentración de ácido láctico mayor absorbancia presentando una correlación positiva fuerte.

## 9.2. Resultados fase 1

A continuación, se presentan los datos obtenidos durante el primer experimento de fermentación de la pulpa de café identificando ácido láctico mediante el método químico; los datos presentados corresponden al promedio de cada nivel de las muestras.

- Datos de las muestras fermentadas durante 24 h, con cada uno de los porcentajes de pulpa e inóculo los cuales se muestran en la tabla 6.

**Tabla 6.** Promedios de absorbancia obtenidos durante las primeras 24 h de fermentación.

Muestras	Medición pH	Abs base	Prom de abs		Abs sin turbidez	Resultados
Tiempo (h) Inóculo(%) Pulpa (%)	Prom	424 nm (u.a)	650 nm (u.a)	700 nm (u.a)	424 nm (u.a)	Abs neta (u.a)
24-1-10	4,658	0,679	0,228	0,200	0,465	0,138
24-2,5-10	4,560	0,652	0,195	0,170	0,469	0,141
24-4-10	4,127	0,649	0,207	0,182	0,454	0,126
24-1-15	4,110	0,630	0,206	0,180	0,437	0,109
24-2,5-15	4,274	0,695	0,230	0,203	0,479	0,15
24-4-15	4,375	0,641	0,180	0,153	0,370	0,147
24-1-20	4,011	0,556	0,169	0,145	0,467	0,139
24-2,5-20	4,462	0,685	0,224	0,201	0,472	0,144
24-4-20	4,244	0,642	0,191	0,167	0,463	0,135

**Fuente:** Autoras (2021).

- En la tabla 7, se muestran los datos de las muestras fermentadas durante 60 h, con cada uno de los porcentajes de pulpa e inóculo.

**Tabla 7.** Promedios de absorbancia durante las primeras 60 h de fermentación.

Muestras	Medición pH	Abs base	Prom de abs			Abs sin turbidez	Resultados
Tiempo (h) Inóculo(%) Pulpa (%)	Prom	424 nm (u.a)	650 nm (u.a)	700 nm (u.a)	424 nm (u.a)	Abs neta (u.a)	
60-1-10	5,688	0,720	0,239	0,225	0,488	0,282	
60-2,5-10	5,762	0,685	0,238	0,210	0,461	0,256	
60-4-10	5,780	0,730	0,250	0,220	0,495	0,290	
60-1-15	4,735	0,599	0,192	0,167	0,316	0,268	
60-2,5-15	4,940	0,730	0,240	0,210	0,503	0,297	
60-4-15	4,986	0,668	0,223	0,196	0,356	0,253	
60-1-20	4,003	0,685	0,207	0,194	0,381	0,279	
60-2,5-20	4,113	0,769	0,231	0,202	0,553	0,348	
60-4-20	4,410	0,790	0,280	0,250	0,419	0,316	

Fuente: Autoras (2021)

- Datos de las muestras fermentadas durante 96 h, con cada uno de los porcentajes de pulpa e inóculo evidenciados en la tabla 8.

**Tabla 8.** Promedios de absorbancia durante las primeras 96 h de fermentación.

Muestras	Medición pH	Abs base	Prom de abs			Abs sin turbidez	Resultados
Tiempo (h) Inóculo(%) Pulpa (%)	Prom	424 nm (u.a)	650 nm (u.a)	700 nm (u.a)	424 nm (u.a)	Abs neta (u.a)	
96-1-10	6,063	0,657	0,214	0,188	0,336	0,131	
96-2,5-10	6,038	0,734	0,250	0,218	0,376	0,171	
96-4-10	5,989	0,726	0,253	0,225	0,366	0,160	
96-1-15	5,707	0,720	0,250	0,219	0,366	0,160	
96-2,5-15	5,416	0,730	0,243	0,212	0,382	0,174	
96-4-15	5,518	0,716	0,242	0,214	0,367	0,162	
96-1-20	4,006	0,691	0,194	0,171	0,382	0,177	
96-2,5-20	4,030	0,748	0,223	0,195	0,406	0,201	
96-4-20	4,117	0,759	0,230	0,197	0,409	0,204	

Fuente: Autoras (2021)

### 9.3. Cálculos de concentración de ácido láctico usando el método químico.

A continuación, se explicitará el respectivo cálculo de la cantidad de ácido láctico obtenido en el primer experimento a partir de los datos previamente presentados.

- PM ácido láctico = 90.08 g/ml
- Densidad del ácido láctico = 1.206 g/ml
- Ecuación de recta =  $Y=0.0487/41.4723$

La anterior ecuación de la recta fue la obtenida por la curva de calibrado con el reactivo de identificación tricloruro férrico y ácido láctico comercial mostrado en la figura 9.

Se obtuvo la absorbancia de todas las muestras a 424, 650 y 700 nm en una dilución 1/6. Se sacó el promedio de las absorbancias a 650 y 700 nm para cuantificar posibles interferencias debidas a la turbidez del medio. La absorbancia a 424 nm es el punto donde se espera observar el cromógeno derivado de la adición de tricloruro férrico que permite la identificación del lactato.

Para obtener el valor del ácido láctico generado en el proceso se realizaron las siguientes operaciones.

#### 9.3.1. Absorbancia sin turbidez

$$\text{Abs sin turbidez}_{(424 \text{ nm})} = \text{Absorbancia}_{(424 \text{ nm})} - \bar{X} \text{ absorbancias}_{(650,700 \text{ nm})}$$

$$\text{Absorbancia sin turbidez}_{(424 \text{ nm})} = 0,679 - \bar{X} (0,228 - 0,200)$$

$$\text{Absorbancia sin turbidez}_{(424 \text{ nm})} = 0,679 - 0,214$$

$$\text{Absorbancia sin turbidez}_{(424 \text{ nm})} = 0,465$$



### 9.3.2. Absorbancia neta (424 nm)

Absorbancia neta= abs sin turbidez <sub>(424 nm)</sub> - abs sin turbidez del blanco<sub>(424 nm)</sub>

Absorbancia neta= 0,465- 0,327

Absorbancia neta=0,138

Nota: Para obtener el valor de absorbancia neta se deben tomar los datos de absorbancia sin turbidez de cada uno de los blancos en los diferentes tiempos de fermentación (24 h, 60 h y 96 h)

**Tabla 9.** Valores de blancos obtenidos para respectivos cálculos.

Blancos	Valor
24 (h)	0,327
60 (h)	0,205
96 (h)	0,366

**Fuente:** Autoras (2021).

En la tabla 9 se evidencian los valores de blancos obtenidos en cada uno de los cálculos realizados cambiando el porcentaje de inóculo y porcentaje de pulpa.

### 9.3.3. Molaridad de ácido láctico en la celda espectrofotométrica

Los valores presentes en la formula son los obtenidos de la ecuación de la recta obtenida.

$$\text{Molaridad ácido láctico en la celda} = \frac{\text{Absorbancia neta}_{(424)} - 0,0487}{41,472}$$

$$\text{Molaridad ácido láctico en la celda} = \frac{0,138 - 0,0487}{41,472}$$

$$\text{Molaridad ácido láctico en la celda} = 0,002$$

### 9.3.4. Molaridad (M) de ácido láctico en la reacción (rxn) de precipitado (ppto)

La dilución consistió en tomar 1 mL de la reacción y disolverlo en 5 mL de agua destilada, esto se debe realizar para la lectura en el espectrofotómetro ya que si no se realiza este procedimiento la coloración de la reacción sobrepasa el rango de respuesta lineal del método químico de detección.

$$\text{Dilución} = \frac{\text{Mililitros de sobrenadante}}{\text{Volumen de la solución}}$$

$$\text{Dilución} = \frac{1,6}{6}$$

$$\text{Dilución} = 0,16667$$

$$\text{Molaridad de ácido láctico en Rxn ppto} = \frac{\text{M muestra ácido láctico}}{0,16667}$$

$$\text{Molaridad de ácido láctico en Rxn ppto} = \frac{0,002}{0,16667}$$

$$\text{Molaridad de ácido láctico en Rxn ppto} = 0,013$$

### 9.3.5. Molaridad de ácido láctico en el ensayo colorimétrico

Este factor de dilución tiene en cuenta la reacción colorimétrica. Consistió en tomar 4.5 mL del sobrenadante obtenido después de la separación como lactato de bario y adicionar 1.5 mL de tricloruro férrico para que desarrollara color.

$$\text{Dilución} = \frac{\text{Mililitros de sobrenadante}}{\text{Volumen de la solución}}$$

$$\text{Dilución} = \frac{4,5}{5}$$

$$\text{Dilución} = 0,9$$

$$\text{Molaridad de ácido láctico ensayo} = \frac{\text{M de ácido láctico rxn ppto}}{0,9}$$

$$\text{Molaridad de ácido láctico ensayo} = \frac{0,013}{0,9}$$

$$\text{Molaridad de ácido láctico ensayo} = 0,014$$

### 9.3.6. Molaridad de ácido láctico en medio de fermentación

$$\text{Dilución} = \frac{\text{Mililitros de sobrenadante}}{\text{Volumen de la solución}}$$

$$\text{Dilución} = \frac{1,6}{6}$$

$$\text{Dilución} = 0,2667$$

Esta dilución tiene en cuenta el proceso de separación del lactato presente en la fermentación (1.6mL de sobrenadante) usando la precipitación como lactato de bario (6mL).

$$\text{Molaridad de ácido láctico en el medio} = \frac{\text{M ácido láctico ensayo}}{0,2667}$$

$$\text{Molaridad de ácido láctico en el medio} = \frac{0,0144}{0,2667}$$

$$\text{Molaridad de ácido láctico en el medio} = 0,054$$

### 9.3.7. Concentración de Ácido láctico en $\mu\text{g/mL}$

A continuación, se muestra el respectivo procedimiento y conversiones usadas para la obtención de ácido láctico en  $\mu\text{g/mL}$ .

$$\text{Ácido láctico producido} = \frac{\text{M ácido láctico en medio} * \text{PM ácido láctico} * 1000000}{1000}$$

$$\text{Ácido láctico producido} = \frac{0,054 * 90,08 * 1000000}{1000}$$

$$\text{Ácido láctico producido} = 4,8, \text{ E}+03$$

Tabla 10. Datos muestras a las 24 h de fermentación con su respectivo cálculo

Muestras	Promedios	Prom de cada dilución			Promedios
		Dln 1/6	Dln 4,5/5	Dln 1,6/6	
	M ácido láctico en celda	M ácido láctico Rxn ppto	M ácido láctico ensayo	M ácido láctico en medio	ug/mL ÁcLAct
24-1-10	0,002	0,013	0,014	0,054	4,8,E+03
24-2,5-10	0,002	0,013	0,015	0,056	5,0,E+03
24-4-10	0,002	0,011	0,012	0,047	4,2,E+03
24-1-15	0,001	0,009	0,010	0,036	3,3,E+03
24-2,5-15	0,002	0,015	0,016	0,061	5,5,E+03
24-4-15	0,002	0,014	0,016	0,059	5,3,E+03
24-1-20	0,002	0,013	0,014	0,054	4,9,E+03
24-2,5-20	0,002	0,014	0,015	0,057	5,2,E+03
24-4-20	0,002	0,013	0,014	0,052	4,3,E+03

Fuente: Autoras (2021)

Todos los datos de absorbancia obtenidos por el método químico fueron procesados de igual forma, se promediaron aquellos tratamientos en igualdad de condiciones y el comportamiento general del proceso de fermentación se resume en la tabla 10.

Se hizo un promedio de la concentración de ácido láctico ( $\mu\text{g/mL}$ ) de todas las réplicas para cada tratamiento, así como la desviación estándar (tablas 11,12, 13).

Tabla 11. Promedios y desviación estándar de la concentración de ácido láctico

%Inóculo	1					
	Tiempo fermentación (h)	24	DESVEST	60	DESVEST	96
10%	4897,978	<b>3164,6</b>	12668,494	<b>3903,731</b>	4446,371	<b>360,535</b>
15%	3319,620	<b>1865,8</b>	11917,326	<b>2815,345</b>	6066,360	<b>506,185</b>
20%	4937,346	<b>2837,2</b>	12505,590	<b>3686,161</b>	6955,997	<b>794,499</b>

Fuente: Autoras (2021)

**Tabla 12.** Promedios y desviación estándar de la concentración de ácido láctico

%Inóculo		2,5				
Tiempo fermenta (h)	24	DESVEST	60	DESVEST	96	DESVEST
10%	5082,602	<b>1704,836</b>	11229,509	<b>3006,743</b>	6376,331	<b>1015,665</b>
15%	5568,600	<b>3164,924</b>	15322,470	<b>3522,192</b>	6779,518	<b>1180,328</b>
20%	5222,428	<b>4598,403</b>	16225,230	<b>1910,314</b>	8247,463	<b>2207,915</b>

Fuente: Autoras (2021)

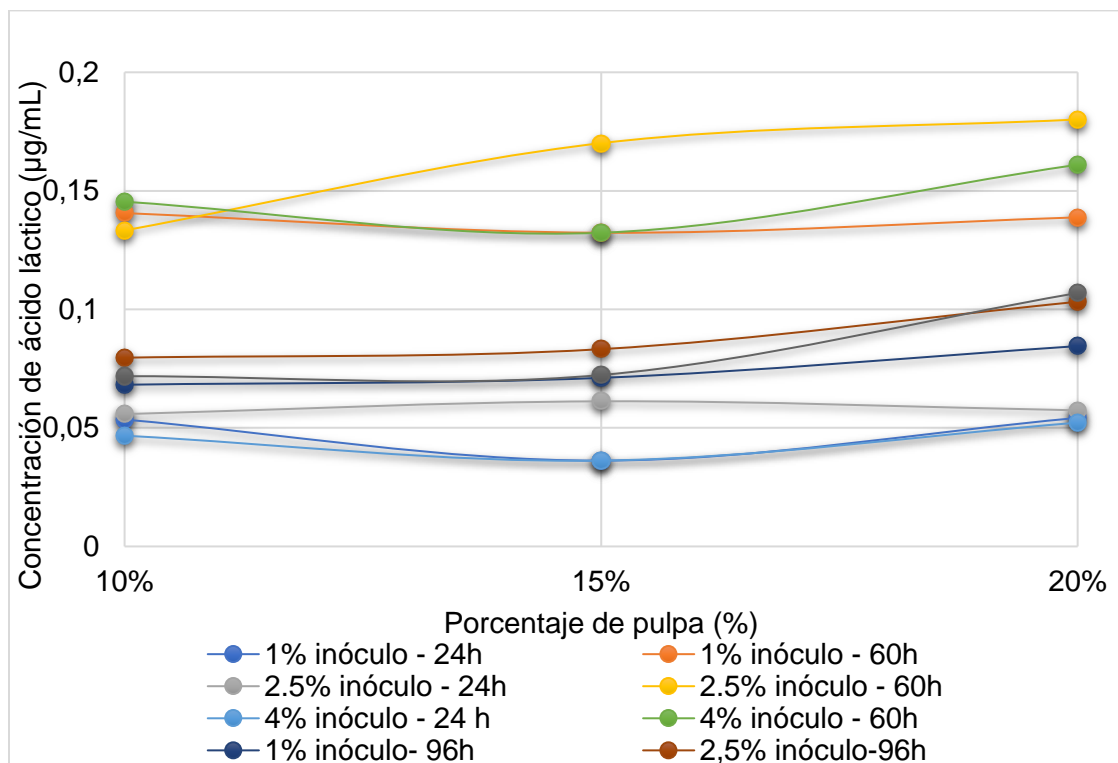
**Tabla 13.** Promedios y desviación estándar de la concentración de ácido láctico

%Inóculo		4				
Tiempo fermenta (h)	24	DESVEST	60	DESVEST	96	DESVEST
10%	4258,579	<b>4537,6192</b>	13093,855	<b>2436,0557</b>	5944,183	<b>748,574</b>
15%	5364,97	<b>6729,8028</b>	11102,807	<b>3522,192</b>	6131,975	<b>950,240</b>
20%	4754,0792	<b>3200,66925</b>	14501,163	<b>3109,787</b>	8419,417	<b>749,560</b>

Fuente: Autoras (2021)

La figura 11 corresponde a los datos obtenidos para las diferentes muestras con los diferentes porcentajes de pulpa e inóculo y tiempo de fermentación de acuerdo a la desviación estándar.

**Figura 11.** Concentraciones de ácido láctico



En la figura 11 se muestran los resultados obtenidos del tiempo de fermentación de la pulpa de café a 24 h, 60 h y 96 h. Se utilizaron concentraciones de 1 % 2.5 % y 4 % de inóculo y porcentajes de pulpa de café al 10 %, 15 % y 20 %. A las 24 h se observa que el porcentaje de inóculo 1 % con 15 % de pulpa obtuvo una concentración de ácido láctico de 3319.6 µg/mL, siendo la más baja y a las 60 h de fermentación se determinó que el 2.5 % de inóculo, 20 % de pulpa de café logró la mayor concentración de ácido láctico con 16225.2 µg/mL.

No hay diferencia significativa entre resultado de 60 h- 2.5 %- 20 % y 60 h- 2.5 % - 15 % por lo tanto se elige el 15 % que tiene menos sólidos para sacar la muestra.

Según el análisis de resultados obtenidos en la fase 1 de la presente investigación donde se encontró una buena producción de ácido láctico (15322.47 µg/mL) con 15 % de pulpa, 2 % de inóculo y 60 h de fermentación son comparables con los obtenidos por Pleisner y col (2016) que obtuvieron un valor óptimo cuando se tenía el 16.6 % de pulpa; la relación óptima encontrada en los experimentos aquí comparados puede estar relacionada con una mayor disponibilidad de azúcares para alimentación de microorganismos si se compara con los datos obtenidos a 10 % de pulpa mientras que los datos obtenidos a 20 % de pulpa pudo darse por un aumento en la cantidad de compuestos fenólicos típicamente encontrados en la

pulpa que pueden servir como inhibidores para el crecimiento de los microorganismos.

De igual forma se manejaron tiempos de fermentación de 24 h, 60 h y 96 h con lecturas de concentración de ácido láctico en cada punto, según Puerta, Marín, Osorio, (2011), los tiempos de fermentación tienen gran incidencia ya que los mayores valores obtenidos para la producción de ácido se observaron en su trabajo a partir de las 52 h lo cual concuerda con el presente trabajo en donde la mayor producción de ácido láctico se dio a las 60 h de fermentación.

Se realizaron algunas pruebas de control rutinario de la metodología de determinación de ácido láctico usando el método de separación de ácido láctico planteado por Silva, D. J. & Queiroz, A. C. (2002) con determinación colorimétrica siguiendo las recomendaciones de Borshchevskaya (2016). El control rutinario implicó la adición de ácido acético a una muestra de pulpa de café fresca buscando comprobar la selectividad del proceso de separación e identificación de ácido láctico. En dicha prueba se esperaba una respuesta nula debido a que no se tenía presencia de ácido láctico. Sin embargo, en estas pruebas de rutina se encontraron resultados positivos “falsos positivos” para el objetivo perseguido en el presente proyecto. Dadas las características de la fermentación de pulpa de café es posible la obtención de ácido láctico, ácido acético y otros ácidos orgánicos en diferentes proporciones y por ello se hace necesario verificar esta hipótesis preliminar según la cual el método de identificación químico NO es selectivo para identificación de ácido láctico.

Para corroborarlo, se solicitó a la seccional Pereira una determinación de ácido láctico usando la técnica analítica de cromatografía líquida de alta presión “HPLC” por sus siglas en inglés. Esta técnica analítica tiene como principio la interacción específica de un compuesto químico (en el presente caso, ácido láctico) que está diluido en una mezcla con diversos componentes y un solvente (lo que en conjunto se denomina fase móvil) cuando pasan a través de una columna que contiene un sólido (fase estacionaria). El proceso es altamente eficiente cuando la presión del sistema aumenta. Los resultados se analizan frente a un patrón comercial analizado previamente en donde se identifica el tiempo que demora la fase móvil en salir a través de la fase estacionaria (comúnmente denominado tiempo de retención). Es una técnica mundialmente reconocida por su selectividad, especificidad y reproducibilidad en la identificación de compuestos químicos presentes en una mezcla diluida. La muestra 24 h – 2.5 % inóculo y 10 % de pulpa reportó 18.8 µg/mL ácido láctico y 292.9 µg/mL de ácido acético, mientras que los datos de la muestra 24 h – 2.5 % inóculo y 15 % de pulpa se observan en la tabla 14 con un duplicado del ensayo para asegurar el reporte. Vale la pena aclarar que el resultado

presentado en la tabla 14 para tricloruro férrico es el promedio de 4 determinaciones.

**Tabla 14.** Comparación entre método HPLC y Químico (FeCl<sub>3</sub>)

Muestra	Ácidos orgánicos - FeCl <sub>3</sub> (µg/mL)	Ácido láctico – HPLC (µg/mL)	Ácido acético – HPLC (µg/mL)
24 h fermentación – 2.5 % inóculo - 15 % pulpa	5568,60	59,60	214.7
		60,60	217.2
Desviación estándar			
	3164,92	0,71	1.76

**Fuente:** Autoras (2021)

El análisis detallado de la tabla 14 permite inferir que la determinación química usando tricloruro férrico (reactivo analítico) no es selectiva para la identificación de ácido láctico y pareciera una metodología general para identificación de ácidos orgánicos. Al comparar el resultado obtenido usando HPLC se observa una gran diferencia entre los dos métodos de identificación y se concluye que es difícil establecer diferencias significativas entre ensayos cuando el método de identificación no permite obtener resultados precisos y exactos.

La poca selectividad del FeCl<sub>3</sub> no permitió encontrar diferencias significativas en el diseño experimental para ser analizado por Statgraphics ya que el programa interpretaba que todos los resultados eran iguales. Por tal motivo se decidió no seguir usando este software de análisis y sólo se realizó un análisis de estadística de tendencia central.

El gran inconveniente del método hasta aquí ensayado es la selectividad de la determinación con tricloruro férrico porque no se tiene la certeza del tipo o tipos de ácidos presentes que arrojan resultado positivo con la prueba y por lo tanto no hay exactitud en las concentraciones detectadas en la muestra. Vale la pena aclarar que la selectividad de la determinación con tricloruro férrico no depende de la calidad del reactivo sino de la reacción de identificación misma, debido a que el tricloruro férrico reacciona con diferentes ácidos orgánicos cómo se expresó previamente, lo que obstaculiza la determinación de un ácido orgánico en particular.



Por todo lo anteriormente expuesto, se decidió solicitar el reactivo de identificación específico lactato peroxidasa cuyos resultados se presentan en la siguiente sección.

#### **9.4. Resultados fase 2**

En la fase 2 del presente proyecto se partió de las condiciones optimizadas en la fase 1 para mejorar la producción de ácido láctico.

Vale la pena aclarar que en los ensayos de determinación de ácido láctico por el método químico ( $\text{FeCl}_3$ ) se encontraron falsos positivos por presencia de ácido acético. Se realizaron ensayos con el reactivo de trabajo y adición de ácido acético y se obtuvieron muestras coloreadas con lo cual se podría malinterpretar como prueba positiva para ácido láctico. Esta prueba fue corroborada con los análisis por HPLC previamente descritos. Teniendo en cuenta que en las condiciones de trabajo empleadas es posible una fermentación heteroláctica en donde se genere ácido láctico y ácido acético como producto final del proceso, fue necesario buscar nuevos métodos de identificación del analito de interés más específico. Es por ello, que se recurrió a la búsqueda de un kit enzimático en donde la especificidad de la enzima permite asegurar que la coloración de la prueba se debe únicamente a la presencia del ácido láctico.

Las estrategias usadas para mejorar la producción de ácido láctico estuvieron enfocadas en hacer un pre tratamiento de la pulpa para mejorar la disponibilidad de azúcares reductores que pudieran ser convertidos en el analito de interés. Puntualmente el acondicionamiento de la pulpa seca reportó el siguiente porcentaje de humedad.

$$\text{Porcentaje de humedad} = \frac{156,72-29,53}{156,72} \times 100 = 81,16 \%$$

Porcentaje de humedad= **81,16 %**

Así mismo, se planteó la hidrólisis ácida ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.18M) de la pulpa de café con la intención de hidrolizar parcialmente la celulosa presente en el material vegetal y disponer de mayor concentración de azúcares posiblemente fermentables para la producción de ácido láctico. Luego del proceso de hidrólisis ácida se ajustó el pH para mantener la neutralidad de la pulpa y todos los medios fueron preparados con agua peptonada para que funcione como buffer en el medio de fermentación.

Siguiendo el método escrito en la sección 8.8.4.1 se obtuvieron los resultados de concentración de ácido láctico fruto del proceso fermentativo. A continuación, se explicará el respectivo cálculo.

En un primer momento se hizo la recta de calibración usando ácido láctico comercial (figura 12) para obtener la ecuación de la recta que permite identificar la concentración del ácido a partir del dato de absorbancia usando el kit enzimático.

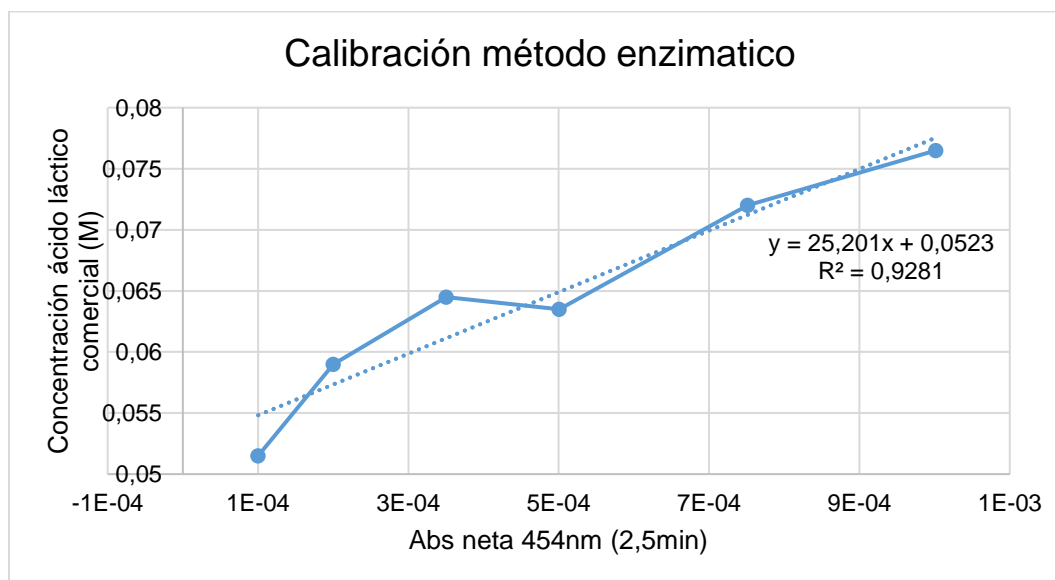
En la tabla 15 se observa cada uno de los datos obtenidos en el tiempo de reacción de la enzima a 2.5 min y 454nm

**Tabla 15.** Datos de concentraciones y absorbancia

Concentración ácido láctico comercial (M)	Abs neta 454nm (2.5min)
1E-04	0,0515
2E-04	0,059
4E-04	0,0645
5E-04	0,0635
8E-04	0,072
1E-03	0,0765

**Fuente:** Autoras (2021)

**Figura 12.** Curva de calibración método enzimático



**Fuente:** Autoras

A continuación, se muestra la ecuación de la recta obtenida a partir de los datos arrojados en el laboratorio.

Ecuación de la recta ( $Y = 25,201x + 0,0523$ )

En un segundo momento a partir de la ecuación de la recta se identificaron las concentraciones de ácido láctico presentes en el sobrenadante de fermentación de la pulpa de café. Teniendo en cuenta que cada tratamiento se hizo por triplicado, se evaluaron los promedios de absorbancia tanto del blanco como de la muestra y posteriormente se aplicó la ecuación de la recta. Para facilidad de lectura se hacen los cálculos detalladamente para la primera fila que será presentada en la tabla 16.

$$\text{Absorbancia neta } 545 \text{ nm} = \text{Abs } 545 \text{ nm}_{\text{muestra}} - \text{Abs } 545 \text{ nm}_{\text{Blanco}}$$

$$\text{Absorbancia neta } 545 \text{ nm} = 0,06 - 0,114 = 0,05 \text{ nm}$$

$$\text{Promedios de blancos} = \bar{X} \text{ muestras } 545 \text{ nm}_{\text{blanco}}$$

$$\text{Promedios de blancos} = \bar{X} (0,06; 0,062; 0,071) = 0,064 \text{ nm}$$

$$\text{Promedios de muestras} = \bar{X} \text{ muestras } 545 \text{ nm}_{\text{muestra}}$$

$$\text{Promedios de muestras} = \bar{X} (0,114; 0,131; 0,135) = 0,13$$

$$\text{Promedio de absorbancia neta } 545 \text{ nm} = \bar{X} \text{ Abs } 545 \text{ nm}_{\text{muestra}} - \bar{X} \text{ Abs } 545 \text{ nm}_{\text{Blanco}}$$

$$\text{Promedios de absorbancia neta } 545 \text{ nm} = 0,13 - 0,064 = 0,06$$

### **Concentración de Ácido láctico en Molaridad (M)**

$$\text{Concentración ácido láctico} = \frac{\text{Abs } 545 \text{ nm} - 0,0523}{25,201}$$

$$\text{Concentración ácido láctico} = \frac{0,06 - 0,0523}{25,201}$$

$$\text{Concentración ácido láctico} = 3,0 \times 10^{-4}$$

### **Conversión de Ácido láctico a $\mu\text{g/mL}$**

$$\text{Conversión } \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = \frac{\text{X Concentración de Ac Lac (M)} * \text{Pm Ac Lac} * 1000000}{1000}$$

$$\text{Conversión } \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = \frac{1.6\text{E-}04 \text{ mol/L} * 90.08 \text{ g/mol} * 1000000}{1000}$$

$$\text{Conversión } \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = 4,9 \times 10^3 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

En las tablas 16 y 17 se encontrarán los datos obtenidos en el laboratorio con los medios de cultivo preparados a partir de pulpa sometida a pre tratamiento ácido o seco usando el método enzimático de determinación de ácido láctico con sus repeticiones.

**Tabla 16.** Datos ácido láctico por el método enzimático con cepa1

Muestras	pH (60h)	2,0 min Blancos	2,5 min Muestras	Absorbancia 545 nm	Concentración ácido láctico (M)
C1-PT-1	4,53	0,060	0,114	0,05	7,E-05
		0,062	0,131	0,07	7,E-04
		0,071	0,135	0,06	5,E-04
C1-PT-2	4,59	0,074	0,137	0,06	4,E-04
		0,060	0,106	0,05	0,E+00
		0,074	0,140	0,07	5,E-04
C1-PT-3	4,59	0,066	0,120	0,05	7,E-05
		0,065	0,121	0,06	1,E-04
		0,067	0,126	0,06	3,E-04
C1-PT-4	4,61	0,068	0,105	0,04	0,E+00
		0,064	0,103	0,04	0,E+00
		0,067	0,108	0,04	0,E+00
C1-PT-5	4,58	0,070	0,111	0,04	0,E+00
		0,068	0,110	0,04	0,E+00
		0,077	0,113	0,04	0,E+00

**Fuente:** Autoras (2021)

C1= Cepa uno  
 C9= Cepa nueve  
 PT= Pulpa con tratamiento  
 PS= Pulpa seca

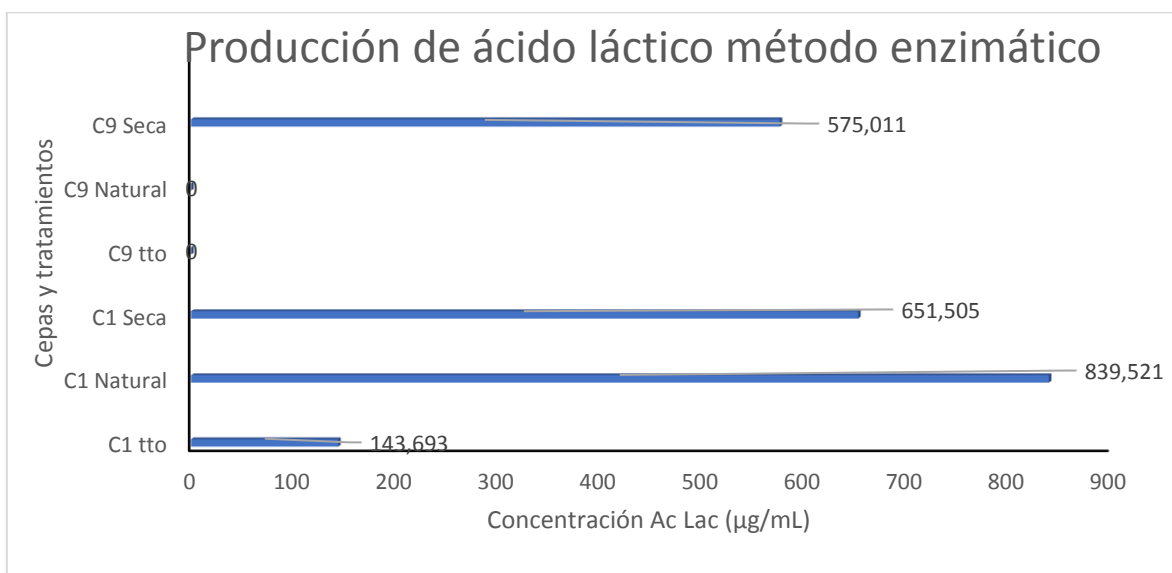
**Tabla 17.** Datos método enzimático con cepa 9

Muestras	pH (60h)	2,0 min	2,5 min	Absorbancia 545 nm	Concentración ácido láctico (M)
C9-PS-1	3,85	0,092	0,16	0,07	6,E-04
		0,092	0,148	0,06	1,E-04
		0,106	0,138	0,03	0,E+00
C9-PS-2	3,86	0,096	0,177	0,08	1,E-03
		0,099	0,173	0,07	9,E-04
		0,092	0,144	0,05	0,E+00
C9-PS-3	3,9	0,098	0,153	0,06	1,E-04
		0,092	0,138	0,05	0,E+00
		0,089	0,124	0,04	0,E+00
C9-PS-4	3,79	0,085	0,164	0,08	1,E-03
		0,092	0,176	0,08	1,E-03
		0,094	0,185	0,09	2,E-03
C9-PS-5	3,75	0,103	0,179	0,08	9,E-04
		0,092	0,177	0,09	1,E-03
		0,089	0,179	0,09	1,E-03

**Fuente:** Autoras (2021)

En la figura 13 se muestran los datos obtenidos de concentración de ácido láctico teniendo en cuenta las estrategias de secado e hidrólisis ácida de la pulpa y cuantificando el resultado final por medio del método enzimático.

**Figura 13.** Producción de ácido láctico método enzimático



**Fuente:** Autoras (2021)

En la figura 13 se evidencian los datos para cada una de las cepas y tratamientos lo cual permite indicar que, con la **C9**, para el caso de los tratamientos natural y con tratamiento ácido, no se logró obtener valores de ácido láctico en el rango de determinación de la enzima. Esto pudo deberse a un inadecuado uso de las micropipetas, problemas durante la incubación de la cepa o en el proceso de fermentación y conservación de las muestras con la pulpa. En cuanto al tratamiento seco se obtuvo un valor significativo pero este se pudo dar debido al color y turbidez de la muestra. De igual forma se evidenció que la pulpa natural con **C1** arrojó la mejor concentración de ácido láctico obtenida en este ensayo, lo cual significa que se realizó correctamente el procedimiento y además las lecturas fueron realizadas en un período de tiempo corto, por tanto, la **C1** reportó valores de 839.52 µg/mL de ácido láctico para la pulpa natural, para la pulpa seca de 651.51 µg/mL y 575.01 µg/mL para la pulpa con tratamiento ácido.

Según los resultados de Cañas et al., (2013) en su trabajo de grado encontraron que la mayor concentración de ácido láctico (13.67 g/L) fue a las 96 h de incubación en condiciones de 40 °C, inóculo del 2%. Vale la pena resaltar que las enzimas no modifican el balance energético de la determinación de ácido láctico y su función limita a hacer selectivo el proceso de determinación.

En el trabajo de Proaños y col (2014) mediante sacarificación o transformación de azúcar y fermentación simultánea a partir de la cascarilla no tratada y tratada con NaOH, obtuvieron que la máxima concentración obtenida fue de 1.81 g/L y 1.44 g/L respectivamente, además observaron que hubo una limitación del sustrato, pues la hidrólisis de la cascarilla ocurrió principalmente durante las 12 primeras horas del proceso, en este trabajo pudo haber sucedido lo mismo y cuando se llegó al tiempo de las 60 h ya no había disposición. Debido a lo nombrado anteriormente las bacterias consumieron la glucosa disponible en etapas tempranas de la fermentación y pronto se encontraron ante la ausencia de este sustrato para continuar el proceso fermentativo.

Teniendo en cuenta lo planteado por Borshchevskaya y col (2016) en la fase 1 de la presente tesis se usó el tricloruro férrico como método de determinación de ácido láctico eficiente en el rango de 0.3 a 10 g/L con un coeficiente de correlación de 0.999 sin requerir preparación de la muestra. Sin embargo, se evidenció que el ácido acético es una potente interferencia que puede modificar los resultados finales obtenidos. Siguiendo el análisis bibliográfico hecho por Guauque y col (2020) se eligió un método enzimático que permitiera mejorar la especificidad de la detección minimizando las interferencias derivadas de la posible presencia de múltiples subproductos del proceso fermentativo. Es por esta razón que los resultados de la fase 2 son menores que los presentados en la fase 1 del experimento.

La comparación entre los métodos de determinación de ácido láctico (químico y enzimático) permitió evidenciar que se obtiene mejor respuesta con el método enzimático.

## **9.5. Comparación de técnicas analíticas**

En la determinación química usando tricloruro férrico se evidenciaron problemas de selectividad por cuanto el reactivo permitió coloración en muestras que contenían ácido acético y agua (tabla 18). Teniendo en cuenta que el ácido acético es un producto que normalmente puede encontrarse en el proceso fermentativo pero que no es lo deseable para la obtención de ácido láctico, es cuestionable usar esta metodología de trabajo.

Guauque y col (2020) expresan que la técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC por sus siglas en inglés) tiene la capacidad de diferenciar la contribución de diferentes tipos de ácidos orgánicos como cítrico, tartárico, málico y acético. Sin embargo, la técnica de HPLC requiere infraestructura de alto valor y una gran cantidad de accesorios y reactivos que permitan su uso.

Teniendo en cuenta lo anterior y manifestando que en las dos técnicas analíticas se obtienen resultados, se destaca la replicabilidad del HPLC y sus ventajas dentro de las cuales están la especificidad, velocidad, precisión y pequeños tamaños de muestra requeridos en el análisis.

Por otra parte, se encuentran los métodos enzimáticos que permiten tener una buena selectividad con bajo presupuesto. El kit de determinación de lactato contiene la enzima lactato oxidasa que es selectiva para determinar el ácido orgánico: ácido láctico. Además, contiene un sistema de oxidación con cromóforos que permiten obtener una respuesta en el espectro visible a 545 nm. De esta forma se tiene un sistema de detección altamente selectivo a un menor costo comparado con el de HPLC. Son métodos que deben ser valorados en cada condición de trabajo para asegurar su replicabilidad y que sirven para cuantificación, pero no para separación y purificación.

Se puede concluir que en las instalaciones de la Universidad lo más viable en términos económicos es usar la enzima ya que requiere un equipamiento de menor costo por lo que se prefiere como herramienta de identificación y cuantificación, aunque puede reportar un error asociado cuando la matriz de partida es muy compleja es por ello que a continuación en la tabla 18 se evidencia la comparación de los resultados con cada una de las técnicas.

**Tabla 18.** Comparación técnicas detección

Comparación técnicas detección	FeCl <sub>3</sub> (µg/mL)	Enzima C2018 sin tto (µg/mL)	HPLC (µg/mL)
<b>60 h - 2,5 % inóculo - 15 % pulpa</b>	15322,47	839	1490,10
<b>Porcentaje de error estimado (%)</b>	928%	65%	

**Fuente:** Autoras (2021)

En la tabla 18 se observa la comparación de técnicas de detección, donde se muestran diferencias significativas en los tres métodos comparados. Se parte de que la medición correcta es la realizada por HPLC y a partir de allí se comparan las dos técnicas disponibles en la universidad. Teniendo en cuenta la baja especificidad del método de identificación con FeCl<sub>3</sub> es esperable que se tenga el mayor valor reportado por cuanto puede reaccionar con diferentes ácidos orgánicos como el ácido cítrico, acético y málico (Mannix, 2015). En cuanto al método enzimático es posible que la complejidad de la matriz de fermentación tenga sustratos inhibidores de su actividad o de la actividad de las demás enzimas que componen el reactivo test. La revisión de la composición del test proveída por el fabricante reporta la presencia de las enzimas lactato oxidasa, ascorbato oxidasa y peroxidasas de rábano picante (Wiener laboratorios S.A. I.C, 2000). Se ha reportado que lactato oxidasa puede ser inhibida por la presencia de oxalatos (Ghisla & Massey, 1975) mientras que la ascorbato oxidasa puede ser inhibida por compuestos fenólicos (Gaspard et al., 1997). Dados los múltiples componentes presentes en el medio de cultivo planteado a partir de la pulpa de café, resulta posible entender una inhibición parcial de algunas de las enzimas que permiten la detección. Sin embargo, se observa que el nivel de error proveído por la determinación con enzimas es un orden de magnitud inferior al obtenido con FeCl<sub>3</sub>.



## 10. CONCLUSIONES

En los análisis realizados en las 96 h del proceso de fermentación de pulpa de café en presencia de *Lactobacillus sp.* en las respectivas pruebas de laboratorio se obtuvo que la mayor concentración de ácido láctico fue a las 60 h de fermentación con un valor de 15322.47 µg/mL y con un 2.5 % de inóculo y 20 % de concentración de pulpa de café, siendo esta la relación óptima entre las variables independientes. Sin embargo, el anterior valor no es replicable debido a que el método de identificación no es selectivo. Es por ello que se realizó una segunda fase en la cual se logró identificar que la mayor producción de ácido láctico en la misma condición, pero usando enzimas como método de detección es de 839.21 µg/mL para la pulpa natural.

Se logró determinar que el mejor método de identificación es el enzimático ya que al comparar el porcentaje de error en la determinación usando FeCl<sub>3</sub> o enzimas, éste último se encuentra un orden de magnitud más cercano al real (obtenido por HPLC).

Se evidenció que la producción de ácido láctico durante el proceso fermentativo de pulpa de café obtenido durante las primeras 24 h, 60 h y 96 h con los porcentajes de pulpa e inóculo fueron de 0.05 M, 0.15 M y 0.08 M respectivamente, estos valores fueron obtenidos mediante promedio de los datos con las respectivas variables dependientes.

Mediante las diversas estrategias usadas: pulpa sin tratamiento, con tratamiento ácido y seca, se logró identificar cuál de estas arrojaba un mejor resultado, de acuerdo a lo anterior se pudo determinar que el mejor valor obtenido fue para la pulpa que no estuvo sometida a ningún tratamiento siendo 839.52 µg/mL, en comparación con la pulpa con tratamiento ácido donde se obtuvo 143.69 µg/mL.

## 11. OBSERVACIONES Y RECOMENDACIONES

- Durante la ejecución del proyecto se evidenció que no siempre se contaba con la misma calidad del producto es decir en algunas ocasiones la pulpa presentaba un grado de fermentación debido a que el fruto estaba muy maduro.
- En el primer experimento de extracción de ácido láctico se utilizaron grandes porcentajes de pulpa y no se graduó de manera adecuada para el procedimiento de triturado el cual se realizó en una licuadora obtenido como resultado no favorable para el experimento.
- En cuanto al método enzimático se presentaron una serie de dificultades producto de los tiempos de reacción de la enzima ya que si este tiempo no era exacto generaba variaciones en los datos y por tanto se debía repetir el proceso lo cual ocasionaba demoras en el proceso.
- Se recomienda usar micro pipetas para tener una medición adecuada de las diversas cantidades requeridas para cada uno de los experimentos, cabe mencionar que a su vez se debe tener cuidado a la hora de extraer dichas sustancias y evitar la contaminación de las mismas.
- Según datos de bibliografías anteriores y de acuerdo a los datos obtenidos se recomienda la inmovilización de los microorganismos para rendimientos mayores en la producción de ácido láctico.
- Para mayor eficiencia en la producción se requiere conservar la cepa a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  en cámara de congelación profunda y además conservar las bacterias lácticas con glicerol.

## 12. GLOSARIO

**Ácido láctico:** Es un ácido orgánico que se genera mediante un proceso biotecnológico de homofermentación probiótica, considerado de gran importancia en la industria farmacéutica, alimentaria, en la producción de polímeros biodegradables y en la acuicultura. (Quintana, 2016). También es utilizado en la industria de plásticos como precursor del ácido poliláctico.

En décadas recientes muchas de las investigaciones buscan optimizar la producción de ácido con el fin de lograr una mayor productividad y utilidad a bajo costo usando materias primas. (García A. Carlos, Arrázola Guillermo y Durango Alba, 2010). Estas materias necesitan algunos pasos como la hidrólisis del sustrato para llegar hasta azúcares fermentables, fermentación de azúcares a ácido láctico y separación de biomasa y partículas sólidas del medio de fermentación y por último la purificación del ácido láctico. (Rodríguez Stouvenel; Serna-Cock et A., 2005)

**BECOLSUB:** Este proceso consiste en realizar el despulpado en seco, clasificado en Zaranda, desmucilaginado mecánico con Deslim y transporte de subproductos con Helicoidal, es de tipo ecológico ya que el consumo de agua se reduce desde 45 l/kg de café procesado a menos de 1 litro de agua por kilogramo de café, se realiza control de hasta el 95% de la contaminación al realizarse el desprendimiento mecánico del mucílago. (Jotagallo, 2017)

**Fermentación:** Son procesos bioquímicos realizados por levaduras, bacterias y enzimas, que degradan principalmente los azúcares de los sustratos. (*Puerta Gloria et al., 2011*). La fermentación anaeróbica es un método que las células usan para extraer energía de los carbohidratos cuando el oxígeno u otros aceptores de electrones no están disponibles en el entorno. El proceso puede seguir a la glucólisis como el siguiente paso en la descomposición de la glucosa y otros azúcares para producir moléculas de trifosfato de adenosina (ATP) que crean una fuente de energía para la célula.

**Hidrólisis ácida:** Es el proceso más eficaz para la liberación selectiva de azúcares hemicelulósicos dejando como residuo final fracciones de celulosa y ligninas casi inalteradas (JD, McMillan, 1994). Es una de las técnicas más utilizadas para la liberación de hemicelulosa; en este proceso es fundamental el uso de ácidos diluidos (1-4%), bajo temperaturas moderadas de (120 a 160 °C) ha demostrado ser adecuado para la hidrólisis de hemicelulosas, generando poca descomposición de los azúcares; el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> es el ácido más usado para este proceso.

**Lactobacillus:** Según Castañeda & Gallo (2017) los *Lactobacillus* son muy estimados por su capacidad de fermentar varias fuentes de carbono simples, además para producir ácido láctico, la mayoría de los *Lactobacillus* tienen alta

tolerancia a pH por debajo de 5 y el crecimiento óptimo está en un rango entre 20-40° C. Para la producción de las bacterias ácido lácticas (BAL), se llevan a cabo con microorganismos utilizados para una fermentación rápida y con sustratos baratos, permitiendo la adicción mínima de nutrientes nitrogenados, para que crezcan en condiciones de pH reducidos y presenten poca producción de biomasa. (Castañeda & Gallo, 2017)

**Pulpa de café:** Es un material de desecho que proviene de la industria del café. (Sierra, y otros, 2016). La pulpa de café (*Coffea arabica L.*) es un residuo vegetal lignocelulósico obtenido después del proceso de beneficiado en húmedo y es liberada en los suelos y acuíferos del macizo montañoso Guamuhaya, por lo que constituye el principal agente contaminante de este ecosistema. (*Rafael Cervantes*. Universidad Agraria de La Habana ,2014).

**Residuos agroindustriales:** La agroindustria, se define como la acción económica que involucra la producción agrícola con la industrial para desarrollar productos alimenticios o materias primas que son reservadas a la producción (González, 2013). Actualmente, la agroindustria es reconocida no solo por su producción e impacto económico mundial, sino también por las técnicas que se realizan para disminuir el impacto ambiental que crean sus residuos; por tanto, su continuación y oportunidades en el mercado no dependen solamente de regulaciones sujetas a sanciones sino también de su relación con el medio ambiente.

### 13. REFERENCIAS

- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2013). Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*, 31(6), 877–902.
- Alcaldía municipal de Socorro, Santander. (2016-2019). Plan de desarrollo municipal " Una Nueva Historia". Socorro: Alcaldía municipal de Socorro, Santander.
- Alfaro, M. y Rodríguez, J. (1994). Impacto ambiental del procesamiento del café en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 18(2), 217-225.
- André, P., C. E. Delisle y J. P. Revéret (2004), *Environmental Assessment for Sustainable Development: Processes, Actors and Practice*, Montreal, Presses Internationales Polytechniques, pg. 52, 54, 157.
- Asociación Nacional del Café -ANACAFÉ-. (s.f.). Subproductos del café. Recuperado de: [http://anacafe.org/glifos/index.php?title=BeneficioHumedo\\_Subproductos](http://anacafe.org/glifos/index.php?title=BeneficioHumedo_Subproductos)
- Agudelo, J. M. (2012). Aprovechamiento de los residuos sólidos provenientes del beneficio del café, en el municipio de Betania Antioquia: usos y aplicaciones. Caldas.
- Benzing. (2001). *Agricultura Orgánica Fundamentos para la región andina*. Villingen– Schwenningen: Necker–Verlag.
- Borshchevskaya L.N., Gordeeva, T.L., Kalinina, A.N y Sineokii S.P. (2016) Spectrophotometric Determination of Lactic Acid. *Journal of Analytical Chemistry*, Vol. 71, No. 8, pp. 755–758.
- Cañas Reyes, J. A., Gómez Lozano, O. A., & Hernández Nieto, A. I. (2018). Pruebas de producción de ácido láctico a nivel de laboratorio a partir de la cáscara de plátano (*Musa paradisiaca*) por fermentación utilizando el microorganismo *Lactobacillus delbrueckii*. Universitaria: UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
- Castañeda, E. y Gallo, M. (2017). Influencia del medio de crecimiento del *Lactobacillus Delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* en la obtención de ácido láctico a partir del afrecho de café y cáscara de mandarina [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Trujillo]. <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/8964>

- Cenicafé. (2010). Los subproductos del café: fuente de energía renovable. Avances técnicos 393 Cenicafé, 1-8.
- Cervantes Beyra, R., Castro Lizazo, I., Mesa Pérez, M., Ocampo Ramírez, A., Fernández Valdés, D. y Fernández Valdés, D. (2015). Efecto de la pulpa de *Coffea arabica* L. sobre la microflora de tres unidades de suelos. *Protección Veg*, 30(2), 115-122.
- DANE. (2014). Censo Nacional Agropecuario. Obtenido de Censo Nacional Agropecuario:  
[https://www.camaradirecta.com/temas/documentos%20pdf/informes%20actualidad%20provincias/cafe\\_provincias.pdf](https://www.camaradirecta.com/temas/documentos%20pdf/informes%20actualidad%20provincias/cafe_provincias.pdf)
- Daniel Pleissner, A.-K. N.-Q. (2016). Fermentative lactic acid production from coffee pulp hydrolysate using *Bacillus coagulans* at laboratory and pilot scales. *EL SEVIER*, 7.
- Silva, D. J. QUEIROZ, A. C. (2002). Análise de Alimentos Métodos Químicos e Biológicos. UFV.
- Domínguez, J; Vasquez, M. "Effect of the Operational Conditions on The L-Lactic acid production by *Rhizopus oryza* " e. *Ciencia y Tecnología de alimentos*. Vol 2, N° 3. 1999. pag. 113-118.
- Elías, L. (1978). Composición química de la pulpa de café y otros subproductos. Guatemala: Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá INCAP.
- Fernández Cortes Yessica, S. R. (2020). Impactos ambientales de la producción del café, y el aprovechamiento sustentable de los residuos generados. Scielo, 18.
- Ghisla, S., & Massey, V. (1975). Mechanism of inactivation of the flavoenzyme lactate oxidase by oxalate. *Journal of Biological Chemistry*, 250(2), 577–584.  
[https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)41936-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)41936-4)
- Guaque Torres, M., & Liliana Gómez, S. (2019). Ácido láctico: una revisión sobre los métodos de determinación y purificación. *Biociencias*, 14(2), 149-175.  
<https://doi.org/10.18041/2390-0512/biociencias.2.6027>.
- Hernández Ballesteros, G., Lopez Ríos, L. (2020). IDENTIFICACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CRECIMIENTO DE CEPAS TIPO *Lactobacillus* EN UN PROCESO FERMENTATIVO DE PULPA DE CAFÉ [Tesis de Grado, Universidad Libre Socorro].

- Induanálisis. (2019). Laboratorio monitoreo consultoría equipos. Obtenido de Laboratorio monitoreo consultoría equipos: [https://www.induanalisis.com/publicacion/detalle/dbo\\_y\\_dqo\\_31](https://www.induanalisis.com/publicacion/detalle/dbo_y_dqo_31).
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación ICONTEC. (2015). NTC-ISO 14001: Sistema de gestión ambiental. Requisitos con orientación para su uso. ICONTEC.
- Labrador, m., & Altieri. (2001). Agroecología y desarrollo: aproximación a los fundamentos agroecológicos para la gestión sustentable de agroecosistemas mediterráneos. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- Mannix, Marianne A., "The Effect of Organic Acids on the Formation and Behavior of Synthesized Iron Hydroxides: Implications for Acid Mine Drainage Treatment" (2015). Graduate Theses, Dissertations, and Problem Reports. 6157. <https://researchrepository.wvu.edu/etd/6157>
- Mario Arias Zabala, L. H. (2008). Producción de ácido láctico por fermentación de mucílago de café con lactobacillus bulgaricus nrri-b548. bdigital portal de revistas uno.
- Mekonen Seblework A. A. (2014). Pesticide residue evaluation in major staple food items of ethiopia using the quechers method: a case study from the jimma zone. Estados Unidos (USA): Environmental Toxicology and Chemistry.
- Millan JD, (1994) Pretreatment of lignocellulosic biomass. ACS Symp Ser 566:292-324
- Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible (26 de Mayo de 2015). Parques Nacionales. Obtenido de Parques Nacionales: <https://www.parquesnacionales.gov.co/portal/wp-content/uploads/2013/08/Decreto-Unico-Reglamentario-Sector-Ambiental-1076-Mayo-2015.pdf>.
- Naranjo, J. (2010). Producción de polihidroxitirato a partir de residuos agroindustriales.
- N. Msuya, R. J. (2018). Separation and Purification of Lactic Acid from Sisal Wastes. American Journal of Chemistry, 7.
- Osorio Criollo, M. I. (2019). Plan de Manejo Ambiental del proceso de beneficio del café para la finca El Paraíso, vereda la playa del municipio de Tarqui-Huila. Huila: Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD. [Proyecto para optar el Grado de Ingeniería Ambiental].

[https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/25375/%20%09mios  
oriocr.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/25375/%20%09mios%20oriocr.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

- Pineda López, M., Ortiz Ceballos, G. y Sánchez Velásquez, L. (2005). Los cafetales y su papel en la captura de carbono: un servicio ambiental aún no valorado en Veracruz. *Madera y Bosques*, 11(2), 3-14.
- Proaños Jeimmy, Piñeros Castro Yineth (2014). Evaluación de la producción de ácido láctico a partir de cascarilla de arroz por *Lactobacillus delbrueckii*. *MUTIS*, 7.
- Puerta Quintero, G. I. (2011). Composición química de una taza de café. Colombia: Cenicafé. Recuperado de <https://www.cenicafe.org/es/publications/avt04142.pdf>.
- Quiroz Marín, T. y Hincapié Gómez, E. (2007). Pérdidas de suelo por erosión en sistemas de producción de café con cultivos intercalados. *Cenicafé*, 58(3), 227-235.
- Ramírez González, C. (2016). La producción de café de alta calidad y los impactos generados en el ámbito social, ambiental y económico en Colombia [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Abierta y a Distancia]. <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/17517>
- Rodriguez Valencia Nelson, Zambrano Franco Diego. (2010). Cenicafé. Obtenido de Cenicafé:<http://www.jotagallos.com/agricola/assets/cenicafe-avance-tecnico-393-subproductos-del-cafe.pdf>.
- Rodriguez de Stouvenel. Producción Biotecnológica de Ácido Láctico: Estado del Arte, *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, Serna- Cock et A. 2005; 5:1 54-65.
- Romero-Hernández, F., Reyes-Picado, O., Dicovskirioboó, L., & Pichardo-Hernández, C. (2012). "Caracterización de tres beneficios húmedos colectivos y uno industrializado de café con énfasis en una propuesta de mejora de un modelo de beneficio húmedo colectivo en la Unión de Cooperativa Agropecuaria del Norte UCANOR, Jinotega." <http://ribuni.uni.edu.ni/1281/1/39805.pdf>
- Sánchez Navarro, D., Lis-Gutiérrez, J. P., Campo Robledo, J., & Herrera Saavedra, J. P. (2013). *Estudios Económicos Sectoriales*.
- Samayoa Toledo, A., Borrayo Herrera, B., Pérez Solares, A., Morataya Sazo, M. Montenegro Álvarez, L. (2014). Extracción de mucilago, azúcares y taninos de la pulpa de café y producción de ácido acético comercial a partir de las



mieles del café [Tesis de pregrado, Universidad de San Carlos de Guatemala].

Serna Jiménez , T. V. (2018). Aprovechamiento de la pulpa de café como alternativa de valorización de subproductos. *Ion Revista*, 6. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/rion/v31n1/0120-100X-rion-31-01-37.pdf>

Spectrophotometric Determination of Lactic Acid L. N. Borshchevskaya\*, T. L. Gordeeva, A. N. Kalinina, and S. P. Sineokii *journal of analytical chemistry* vol. 71 no. 8 2016.

Valencia, N., Sanz, J., Oliveros, C. y Ramírez, C. (2015). Beneficio del café en Colombia: Prácticas y estrategias para el ahorro, uso eficiente del agua y el control de la contaminación hídrica en el proceso de beneficio húmedo del café. FNC y Cenicafé.

Wang, Y., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2014). Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1–9.

Wiener laboratorios S.A. I.C. (2000). Para la determinación de lactato en plasma y líquido cefalorraquídeo. *Lactate*. Rosario, Santa Fe, Argentina: Wiener laboratorios S.A. I.C.