



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

1 de 2

Neiva, marzo del 2022

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Neiva

El (Los) suscrito(s):

Ingrid Johana Gutiérrez Bustos, con C.C. No. 1'083.906.747,

Karla Julieth Figueroa Araque, con C.C. No. 1'082.128.650,

_____, con C.C. No. _____,

_____, con C.C. No. _____,

Autor(es) de la tesis y/o trabajo de grado o _____

Titulado EVALUACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO POLILÁCTICO A PARTIR DEL MUCÍLAGO DE CAFÉ CON POTENCIAL PARA USO EN EL SECTOR ALIMENTARIO

presentado y aprobado en el año 2022 como requisito para optar al título de

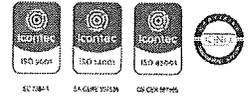
Ingeniero agrícola;

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

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

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

2 de 2

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

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma: Angel J. Gutierrez B

Firma: _____

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma: Karla Julieth F.A

Firma: _____



TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: EVALUACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO POLILÁCTICO A PARTIR DEL MUCÍLAGO DE CAFÉ CON POTENCIAL PARA USO EN EL SECTOR ALIMENTARIO

AUTOR O AUTORES:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Figueroa Araque	Karla Julieth
Gutiérrez Bustos	Ingrid Johana

DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Martínez Castro	Víctor Manuel
Sandoval Salazar	Iván Alberto

ASESOR (ES):

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
----------------------------	--------------------------

PARA OPTAR AL TÍTULO DE: INGENIERO AGRÍCOLA

FACULTAD: INGENIERÍA

PROGRAMA O POSGRADO: PROGRAMA DE INGENIERÍA AGRÍCOLA

CIUDAD: Pitalito **AÑO DE PRESENTACIÓN:** 2022 **DE PÁGINAS:** 20

TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una X):



DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO

CÓDIGO	AP-BIB-FO-07	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	2 de 4
---------------	---------------------	----------------	----------	-----------------	-------------	---------------	---------------

Diagramas ___ Fotografías ___ Grabaciones en discos ___ Ilustraciones en general Grabados ___
Láminas ___ Litografías ___ Mapas ___ Música impresa ___ Planos ___ Retratos ___ Sin ilustraciones ___ Tablas
o Cuadros

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

MATERIAL ANEXO:

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

PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:

Español

1. Biotecnología
2. Mucilago de café
3. Ácido láctico
4. Polimerización por Apertura Abierta de Anillo
5. Ácido Poliláctico

inglés

Biotechnology
Coffee mucilage
Lactic acid
Ring Opening Polymerization
Polylactic acid.



RESUMEN DEL CONTENIDO:

Colombia en el 2021 registró una producción de 12,6 millones de sacos de 60 kg de café verde, siendo Pitalito el primer productor a nivel nacional con una producción anual de 20.298,20 toneladas. A pesar de la importancia económica de este producto, se generan cerca de 55.000 toneladas de mucílago por cada millón de sacos. Qué, una vez liberado al medio ambiente, puede afectar a las aguas subterráneas y superficiales por su alta resistencia orgánica y pH ácido. Aunque el mucílago genera una problemática ambiental, contiene una gran cantidad de moléculas o compuestos de alto valor agregado, que a partir de procesos biotecnológicos pueden ser aprovechables para producir ácido poliláctico para el sector alimentario. Por ende, el objetivo del trabajo realizado fue evaluar la obtención de ácido poliláctico utilizando como sustrato mucílago de café, mediante la adición de bacterias ácido Lácticas de un cultivo comercial que contiene *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. Lactis* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, con el fin de producir ácido láctico. Esté a su vez, se polimerizo por el método de apertura abierta de anillo para obtener el ácido poliláctico, en el cual, se determinaron las propiedades fisicoquímicas por el método espectroscopia infrarroja. En síntesis, la mayor concentración de ácido láctico se obtuvo en el ensayo 4 de 0,3685 g/L, con unas condiciones de pH de 5,5, temperatura 37 °C y microorganismo de 1,17 g/L, con una concentración inicial de azúcares reductores de 5,28 g/L. En la caracterización del ácido poliláctico, se obtuvo como resultado la presencia de varios grupos funcionales que indica la presencia de ácido poliláctico.

ABSTRACT:

Colombia in 2021 had a production of 12,6 million bags of 60 kg of green coffee, with Pitalito being the first producer at the national level with an annual production of 20.298,20 tons. Despite the economic importance of this product, aborta 55.000 tons of mucilage are generated for every million bags. What, once released into the environment, can affect groundwater and surface water due to its high organic resistance and acidic pH. Although mucilage generates environmental problems, it contains a large number of molecules or compounds with high added value, which can be used to produce polylactic acid for the food sector through biotechnological processes. Finally, the objective of the work carried out was to evaluate the production of polylactic acid using coffee mucilage as a substrate, by improving lactic acid bacteria from a commercial culture containing *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, in order to produce lactic acid. This, in turn, was polymerized by the open ring opening method to obtain polylactic acid, in which the physicochemical properties were determined by the infrared spectroscopy method. In summary, the highest concentration of lactic acid was obtained in test 4 of 0,3685 g/L, with conditions of pH 5,5, temperature 37 °C and microorganism of 1,17 g/L, with a concentration initial reducing sugars of 5,28 g/L. In the characterization of polylactic acid, the presence of several functional groups that indicate the presence of polylactic acid was obtained as a result.



DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO

CÓDIGO	AP-BIB-FO-07	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	4 de 4
---------------	---------------------	----------------	----------	-----------------	-------------	---------------	---------------

APROBACION DE LA TESIS

Nombre Jurado 1: Claudia Milena Amorocho Cruz

Firma:

Nombre Jurado 2: Joel Girón Hernández

Firma:



EVALUACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO POLILÁCTICO A PARTIR DEL MUCÍLAGO DE CAFÉ CON POTENCIAL PARA USO EN EL SECTOR ALIMENTARIO

Trabajo de grado presentado al departamento de Ingeniería Agrícola
Como requisito para optar al título de: Ingeniero Agrícola

Autore (s)

Ingrid Johana Gutiérrez Bustos: 20142130476

Karla Julieth Figueroa Araque: 20141125398

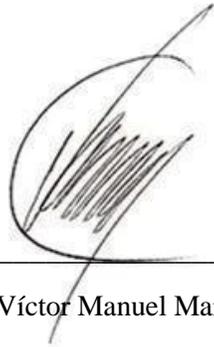
UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Facultad de Ingeniería

Programa de Ingeniería Agrícola

Sede Pitalito, Huila, Colombia. 2022

Firma



Director: Víctor Manuel Martínez Castro

Firma



Codirector: Iván Alberto Sandoval Salazar

Nota de aceptación

Firma

Jurado: Joel Girón Hernández

Firma

Jurado: Claudia Milena Amorocho Cruz

EVALUACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO POLILÁCTICO A PARTIR DEL MUCÍLAGO DE CAFÉ CON POTENCIAL PARA USO EN EL SECTOR ALIMENTARIO

RESUMEN

Colombia en el 2021 registró una producción de 12,6 millones de sacos de 60 kg de café verde, siendo Pitalito el primer productor a nivel nacional con una producción anual de 20.298,20 toneladas. A pesar de la importancia económica de este producto, se generan cerca de 55.000 toneladas de mucílago por cada millón de sacos. Qué, una vez liberado al medio ambiente, puede afectar a las aguas subterráneas y superficiales por su alta resistencia orgánica y pH ácido. Aunque el mucílago genera una problemática ambiental, contiene una gran cantidad de moléculas o compuestos de alto valor agregado, que a partir de procesos biotecnológicos pueden ser aprovechables para producir ácido poliláctico para el sector alimentario. Por ende, el objetivo del trabajo realizado fue evaluar la obtención de ácido poliláctico utilizando como sustrato mucílago de café, mediante la adición de bacterias ácido Lácticas de un cultivo comercial que contiene *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. Lactis* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, con el fin de producir ácido láctico. Esté a su vez, se polimerizo por el método de apertura abierta de anillo para obtener el ácido poliláctico, en el cual, se determinaron las propiedades fisicoquímicas por el método espectroscopia infrarroja. En síntesis, la mayor concentración de ácido láctico se obtuvo en el ensayo 4 de 0,3685 g/L, con unas condiciones de pH de 5,5, temperatura 37 °C y microorganismo de 1,17 g/L, con una concentración inicial de azúcares reductores de 5,28 g/L. En la caracterización del ácido poliláctico, se obtuvo como resultado la presencia de varios grupos funcionales que indica la presencia de ácido poliláctico.

Palabras clave: Biotecnología, Mucílago de café, Ácido láctico, Polimerización por Apertura Abierta de Anillo, Ácido Poliláctico.

ABSTRACT

Colombia in 2021 had a production of 12,6 million bags of 60 kg of green coffee, with Pitalito being the first producer at the national level with an annual production of 20.298,20 tons. Despite the economic importance of this product, about 55.000 tons of mucilage are generated for every million bags. What, once released into the environment, can affect groundwater and surface water due to its high organic resistance and acidic pH. Although mucilage generates environmental problems, it contains a large number of molecules or compounds with high added value, which can be used to produce polylactic acid for the food sector through biotechnological processes. Finally, the objective of the work carried out was to evaluate the production of polylactic acid using coffee mucilage as a substrate, by improving lactic acid bacteria from a commercial culture containing *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, in order to produce lactic acid. This, in turn, was polymerized by the open ring opening method to obtain polylactic acid, in which the physicochemical properties were determined by the infrared spectroscopy method. In summary, the highest concentration of lactic



UNIVERSIDAD

SURCOLOMBIANA

acid was obtained in test 4 of 0,3685 g/L, with conditions of pH 5,5, temperature 37 °C and microorganism of 1,17 g/L, with a concentration initial reducing sugars of 5,28 g/L. In the characterization of polylactic acid, the presence of several functional groups that indicate the presence of polylactic acid was obtained as a result.

Keywords: Biotechnology, Coffee mucilage, Lactic acid, Ring Opening Polymerization Polylactic acid.

1. INTRODUCCIÓN

Colombia, es considerado el mayor productor mundial de café arábigo de suave lavado. En el año 2021 se registró una producción de 12,6 millones de sacos de 60 kg de café verde (Prensa Federación Nacional de Cafeteros, 2022). Dentro del PIB agropecuario se destaca la producción de café en la que el Huila es el primer productor nacional con cerca de 147.000 hectáreas sembradas y una producción cercana de 163.000 toneladas. El principal municipio productor a nivel nacional es Pitalito con una producción anual de 20.298,20 toneladas (Pinilla *et al.*, 2021). Por lo tanto, es un producto priorizado en la apuesta agroindustrial de la agenda interna de productividad y competitividad del Huila (Cerquera *et al.*, 2020). Pese a la importancia económica de éste producto, en las diferentes etapas del proceso productivo del café se generan alrededor de 784.000 t/año de biomasa residual, que incluyen el mucílago, la pulpa, cascarilla, dado que solo se aprovecha el 5% del peso del fruto para la preparación de la infusión (Serna *et al.*, 2018). El mucílago representa alrededor de 14,85% del peso del fruto fresco y por cada millón de sacos, se generan cerca de 55.000 toneladas (Guerra y Rueda, 2021).

El mucílago, un subproducto del proceso de beneficio húmedo, es un residuo utilizable potencialmente en la fermentación láctica como sustrato dada su composición química. Está constituido por una capa gruesa de tejido esponjoso de 0,4 a 2 mm de espesor, que contiene: 84,2% de agua, 8,9% de proteína, 4,1% de azúcares reductores, 0,91% de ácido péptico y 0,7% de ceniza (Arias *et al.*, 2008). Este subproducto se ha considerado de poco o nulo valor económico, y por consiguiente es designado como biomasa residual (Urquijo, 2016). Que una vez liberado al medio ambiente, puede afectar a las aguas subterráneas y superficiales, por su alta resistencia orgánica y pH ácido (Morales *et al.*, 2020). En efecto, producen alteraciones negativas al medio ambiente y un aumento considerable de sólidos suspendidos conformados particularmente por pectinas, y demandas biológicas o químicas de oxígeno muy altas del orden de 15.000 a 30.000 ppm en las aguas mieles, lo que corresponde a poderes contaminantes entre 60 y 240 veces superiores a las aguas residuales domésticas (Guilombo, 2017).

En esta investigación, se explora el mucílago de café como sustrato viable para la obtención ácido láctico a partir de procesos fermentativos, el cual es un compuesto biotecnológico precursor para obtener Acido poliláctico (PLA); por lo tanto, se estaría generando valor agregado a este tipo de residuo. Debido a su biodegradabilidad, propiedades de barrera y biocompatibilidad, este biopolímero ha encontrado numerosas aplicaciones tales como producción de hilo para sutura, implante, producción de envases y empaques para alimentos (Serna *et al.*, 2003; Henao *et al.*, 2018). En la actualidad, la industria del plástico es la tercera aplicación más desarrollada del petróleo después de la energía y el transporte; cerca de 200 millones de toneladas de desechos de plásticos son generados anualmente, provenientes de vehículos, computadoras, envases y productos de higiene; sin embargo, la baja biodegradabilidad de este tipo de desechos los convierte en un contaminante a largo plazo, afectando a los ecosistemas del suelo y agua. Como alternativa a esta problemática surgen los biopolímeros los cuales se obtienen a partir de recursos renovables y son biodegradables, siendo el PLA uno de estos (Giaroli y Maggioni, 2015).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Ubicación

El componente experimental se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de biotecnología del Tecnoparque Nodo Pitalito del servicio nacional de aprendizaje (SENA), ubicado en la vereda La Paz, a 7 kilómetros del área urbana de Pitalito Huila.

2.2. Colecta y adecuación de la materia prima (mucílago de café)

El mucílago fue recolectado en la finca el cedro, vereda Chorrillos, ubicada en el municipio de Guadalupe-Huila, a una altura de 1330 msnm, temperatura promedio de 23 °C. Para el desarrollo del trabajo se seleccionaron los granos en estado óptimo de madurez, alrededor de 20 kg de café cereza variedad Caturra. Seguidamente, se llevó a la despulpadora; los granos despulpados se fermentaron durante 12 horas mediante el proceso de fermentación natural (FNC, 2016). Luego, se hizo el lavado manual sumergiendo los granos en 12 litros de agua en un tanque plástico. El mucílago desprendido fue almacenado en tres recipientes plásticos con capacidad de 3 litros previamente esterilizados. Posteriormente, el mucílago fue filtrado en lienzos para separar el material de mayor tamaño y después, centrifugado durante 15 minutos a 4000 rpm, en tubos de falcon de 45 ml. Luego, se esterilizó la muestra usando la autoclave SKU: AV-150 (PHOENIX, Brasil) automatizada durante 30 minutos, a una temperatura de 120 °C y 15 psi de presión (Arias *et al.*, 2009).

2.3. Acondicionamiento del mucílago mediante hidrólisis enzimática

El acondicionamiento enzimático se realizó utilizando tres concentraciones de la enzima *Pectinasa de Aspergillus Aculeatus* de la marca Sigma-E 6287 de 57,5, 115 y 230 mg, tomando como control el mucílago sin enzima, esto con el fin determinar el mejor rendimiento de azúcares reductores. Por lo tanto, la concentración de la enzima que permitió obtener mayor contenido de azúcares reductores se utilizó para iniciar cada uno de los ensayos, que fueron ubicados en la incubadora de agitación vertical SKU: TE-4200 (TECNAL, Brasil), durante 3 horas a una temperatura de 50 °C y 120 rpm (Peñuela *et al.*, 2011).

2.4. Activación del inóculo comercial

Con el fin de permitir el crecimiento de los microorganismos, se preparó el caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe) (Merck, Colombia), utilizando 1000 ml de agua destilada, en la cual se mezclan 10 g de glucosa, 5 g extracto de levadura, 5 g acetato de sodio, 2 g fosfato dipotásico, 0,1 g sulfato de magnesio, dicho medio se esterilizó en una autoclave automática (Arias *et al.*, 2008). El medio ya preparado se distribuyó en 20 Erlenmeyer de 50 ml, donde la cantidad de microorganismo se especifica en la **tabla 1**. El cultivo láctico comercial liofilizado contiene: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii lactis* y *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*. Cada sobre contiene 1,2 g, conservados a una temperatura de 4 °C, provenientes de la empresa de insumos y

tecnológicos de la industria alimentaria VIVOLAC. Los inóculos fueron incubados a 37 °C durante 24 horas.

2.5. Fermentación láctica

En la fermentación láctica se utilizaron 12 litros de mucílago de café, que se distribuyeron en 20 Erlenmeyer de 1000 ml, los cuales contenían 600 ml de muestra cada uno. A estos, se le adicionaron 50 ml inóculo previamente activado. Se empleó el diseño experimental central compuesto de superficie respuesta, como procedimiento estadístico para optimizar la producción de ácido láctico, se utilizaron tres factores: pH, temperatura y microorganismo. Para el factor 1 (pH) presenta dos rangos 5,0 y 6,0. El factor 2 (temperatura) presenta dos rangos 34 y 40 °C. Para el factor 3 (microorganismo) presenta dos rangos 0,5, y 1,0 g/L. Este tipo de diseño proporciona seis puntos centrales (pH 5,5, temperatura 37 °C y microorganismo 0,75 g/L) y dos puntos axiales correspondientes a cada factor (pH 4,7 y 6,3, temperatura 32 y 42 °C, microorganismo 0,33 y 1,17 g/L) (Acosta *et al.*, 2021).

TABLA 1. Diseño experimental central compuesto de superficie respuesta, para llevar a cabo la fermentación láctica.

Ensayos	pH	Temperatura (°C)	Microrganismos (g/L)
1	5,5	37	0,75
2	6,0	40	1,00
3	5,0	40	0,50
4	5,5	37	1,17
5	5,5	37	0,75
6	5,5	37	0,75
7	6,0	40	0,50
8	5,5	37	0,33
9	6,0	34	0,50
10	5,5	32	0,75
11	4,7	37	0,75
12	6,0	34	1,0
13	5,0	40	1,0
14	6,3	37	0,75
15	5,5	37	0,75
16	5,0	34	1,0
17	5,0	34	0,50
18	5,5	37	0,75
19	5,5	42	0,75
20	5,5	37	0,75

2.6. Obtención y purificación del ácido láctico del caldo fermentativo

Finalizada la fermentación de los 20 ensayos, se procedió a centrifugar (MPW M-UNIVERSAL, Polonia) el caldo fermentativo en tubos de falco de 45 ml, a una velocidad de 4000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se filtró en una bomba al vacío, en un filtro de 5 - 8 µm (Boeco,

Germania) esto con el fin de purificar el caldo. Luego, se rota-evaporó a 95 rpm a una temperatura de 80 °C. En el embudo decantador se incorporó 150 ml de éter dietílico y 150 ml de muestra, durante 12 horas, con el objetivo de hacer una separación de fases. Se tomó la parte más clara que se formó en la fase superior y se llevó al rotaevaporador a 40 °C y 95 rpm, para evaporar el éter dietílico, concentrar y purificar el ácido láctico (Cuervo y Echeverry, 2017).

2.7. Determinación de azúcares reductores por el método colorimetría DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico)

Se preparó 50 ml de reactivo ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) a partir de 0,5g de ácido 3,5 dinitrosalicílico, 15 g de sal Rocheleé Tartrato de Na- K y 0,8 g de NaOH. Se disolvió el NaOH en 20 ml de agua destilada y se añadió en agitación el tartrato de Na-K lentamente, se completó con agua destilada hasta 40 ml y se agregó lentamente el ácido 3,5 dinitrosalicílico, esta mezcla se afora a 50 ml con agua destilada. Se filtra y se almacena en un frasco ámbar cubierto con papel aluminio a 4 °C (Bello *et al.*, 2006).

Para la obtención de la curva de calibración de azúcares reductores, se utilizó como estándar la glucosa en un rango de concentración de 0 a 2,0 g/L. Se añadió 0,5 ml de la dilución de glucosa y 0,5 ml del reactivo DNS. Estos, se agitaron manualmente y se dejaron 7 minutos en agua caliente a 80 °C y fueron colocados en un baño de agua con hielo por 7 minutos. Seguidamente, se agregó a cada tubo 5 ml de agua destilada, se agitó y se procedió a leer la absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro (Bello *et al.*, 2006).

2.8. Cuantificación de Ácido láctico

Pará determinar la curva patrón, se tomó como referencia un ácido láctico comercial con una pureza del 86,2%. Pará preparar la solución madre se tomó 580 µL del ácido y se aforó a 500 ml de agua destilada. Según lo expuesto por los autores Cañas, *et al.*, (2018), se leyó la absorbancia a 435 nm en el espectrofotómetro. Inicialmente se preparó la solución HCL 0,1 N con una concentración del 37%, en el cual se tomó 840 µL y se aforó a 100 ml con agua destilada. Posteriormente a partir de esa solución se preparó la solución de cloruro férrico, donde se pesó 1 g de FeCl₃, 2 ml de HCl 0,1 N y se aforó a 100 mL con agua destilada. Finalmente, para la preparación de cada disolución se tomaron 5 ml de la solución madre y 2,5 ml de la solución de cloruro férrico y se aforó a 25 ml.

2.9. Determinación de la biomasa del cultivo liofilizado comercial

La determinación del peso seco del crecimiento de los microorganismos, se extrajo el precipitado de cada una de las 20 muestras, se procedió a lavar agregando agua destilada y se centrifugaron centrifugar (MPW M-UNIVERSAL, Polonia); se realizó este procedimiento dos veces. Se utilizó un papel filtro de 0,45 µm (Merck, Colombia), el cual se pesó vacío, se filtró el sobrenadante utilizando una bomba al vacío, y se llevó al horno a temperatura de 60 °C durante 24 horas, terminado este tiempo se procedió a colocarlo en un desecador a temperatura ambiente. Pasadas las 24 horas se pesó el filtro, y por diferencia de pesos se determinó la cantidad de biomasa que creció durante la fermentación láctica (Arias *et al.*, 2009).

2.10. Polimerización del ácido láctico

Para obtener la muestra de PLA, se tomó como referencia las mejores condiciones del diseño experimental central compuesto de superficie de repuesta del ensayo 4 con un pH de 5.5 y temperatura de 37 °C y microorganismo de 1,17 g/L. Este, se replicó a un volumen de 2,4 litros de mucílago a partir de 4 kg de café cereza y 2,88 g/L de microorganismo, en el cual se obtuvo 4,5 ml de ácido láctico.

2.10.1. Esterificación (obtención de la lactida)

La obtención de la lactida se realizó en un vaso de precipitados de 100 ml al cual se le agregó 5 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y 4,5 ml de ácido láctico, llevado a una plancha magnética a 120 °C durante 2 horas. Seguidamente, se añadió 5 ml de H_2SO_4 durante 8 horas. Terminado ese tiempo, se adiciona nuevamente 5 ml de ácido sulfúrico durante 12 horas, verificando que la muestra se tornará un color marrón, para determinar qué es lactida (Cuervo y Echeverry, 2017).

2.10.2. Polimerización por apertura abierta de anillo (ROP)

Tomando como referencia la metodología de los autores Cuervo y Echeverry (2017), se pesó 11,56 ml de lactida obtenida en la esterificación, con base al peso de la lactida se utilizó 6,92 g de cloruro de estaño (II), y 11,5 ml metanol, mezclados en un vaso de precipitados de 250 ml, en el cual se llevó a una plancha de calentamiento para ajustar la temperatura a 50 °C durante 24 horas, verificando que el precipitado presente partículas blancas.

2.11. Secado del polímero

Se evaporó el metanol de la muestra obtenida anteriormente a una temperatura de 70 °C, en una plancha de calentamiento. Posteriormente, se le adicionaron 100 ml de acetona, y se filtró por medio de una bomba al vacío. Finalmente, se colocó en el desecador (Cuervo y Echeverry, 2017).

2.12. Evaluación fisicoquímica del ácido poliláctico (PLA)

En la evaluación fisicoquímica del PLA se tomaron 0,5 g del precipitado blanco obtenido de la polimerización del ácido láctico y se caracterizó por el método de Espectroscopia infrarroja (FTIR) (Shimadzu, Chile) y se comparó con los espectros de APL presentes en la gráfica de la metodología propuesta por los autores Cuervo & Echeverry (2017), donde utilizaron el ácido láctico comercial para obtener APL, en la que se obtuvo a través de FTIR.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis de la concentración de azúcares reductores según el pretratamiento enzimático

En la **tabla 2**, se observa que el mucílago sometido a tratamiento con la enzima *Pectinasa de Aspergillus Aculeatus*, presentó mayor concentración de azúcares reductores en comparación del mucílago sin enzima. Se obtuvo, que el mucílago que contiene una concentración de 230 mg de la enzima arroja mayor respuesta en el contenido de azúcares reductores de 5,28 g/L. Los resultados fueron similares a lo reportado por los autores Peñuela *et al.*, (2011), quienes encontraron que este tipo de enzima permite la degradación de la pectina del café cerca del 98% permitiendo aprovechar moléculas de menor peso molecular, favoreciendo la disminución de los tiempos de fermentación y aumentando cerca de 40% la concentración de azúcares reductores.

TABLA 2. Azúcares reductores presentes en el mucílago sin y con acondicionamiento enzimático (g/L)

Tratamientos	Concentración enzima <i>Pectinasa de Aspergillus Aculeatus</i> (mg)	Respuesta azúcares reductores inicial (g/L)	Respuesta azúcares reductores final (g/L)
Mucílago de café	0	3,14	3,10
Mucílago + Enzima	57,5	3,14	3,34
	115	3,14	3,35
	230	3,14	5,28

La **tabla 3** muestra la repuesta a la producción ácido láctico, utilizando el programa Minitab 16, R^2 81,06% y R^2 ajustado a 64,02%, con una desviación estándar del 0,0440107. El tiempo de fermentación máximo fue de 75 horas, según lo expuesto por los autores Escobar *et al.* (2010), el uso de más de 75 horas afecta el crecimiento de los microorganismos.

TABLA 3. Resultados de los experimentos establecidos diseño experimental central compuesto de superficie de repuesta para la obtención de ácido láctico en mucílago de café.

ENSAYOS	FACTOR 1 pH	FACTOR 2 Temperatura °C	FACTOR 3 Microorganismos (g/L)	RESPUESTA Ácido Láctico (g/L)
1	5,5	37	0,75	0,2179
2	6,0	40	1,0	0,3585
3	5,0	40	0,5	0,2134
4	5,5	37	1,17	0,3685
5	5,5	37	0,75	0,2176
6	5,5	37	0,75	0,2193
7	6,0	40	0,5	0,2068
8	5,5	37	0,33	0,2151



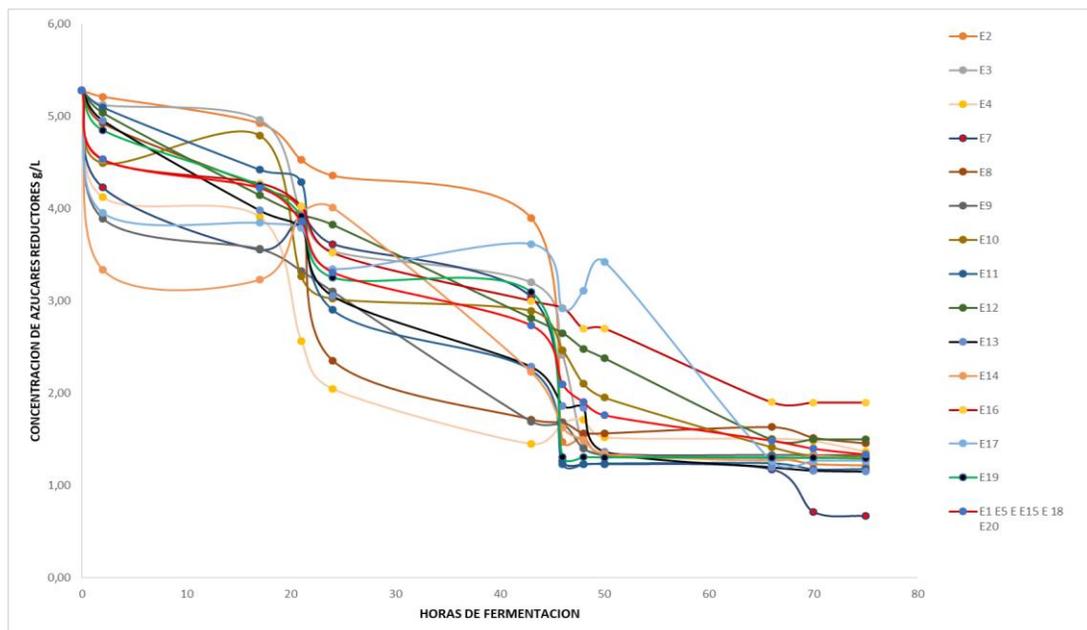
UNIVERSIDAD

SURCOLOMBIANA

9	6,0	34	0,5	0,1280
10	5,5	32	0,75	0,1062
11	4,6	37	0,75	0,2148
12	6,0	34	1,0	0,1586
13	5,0	40	1,0	0,2127
14	6,3	37	0,75	0,3159
15	5,5	37	0,75	0,2019
16	5,0	34	1,0	0,1155
17	5,0	34	0,5	0,1351
18	5,5	37	0,75	0,2134
19	5,5	42	0,75	0,2892
20	5,5	37	0,75	0,2752

3.2. Análisis de azúcares reductores de los ensayos

La **gráfica 1**, muestra la disminución en la concentración de azúcares reductores en g/L, sobre las 75 horas de fermentación en todos los ensayos propuestos. A las 46 horas los ensayos 4 y 19 con condiciones de pH de 5,5, temperatura 37 y 42 °C y microorganismo 1,17 y 0,75 g/L respectivamente, obtuvieron un mayor consumo de azúcares reductores con respecto a los demás de 1,67 y 1,30 g/L respectivamente. según Burgos (2020), indica que lo anterior es debido a que las bacterias están consumiendo el sustrato como fuente de energía para producir ácido láctico. Esta producción se incrementa simultáneamente al consumo de azúcares, dándose hasta el agotamiento del azúcar en el medio, incluso luego del crecimiento celular se continúa produciendo este metabolito (Jurado *et al.*, 2013).



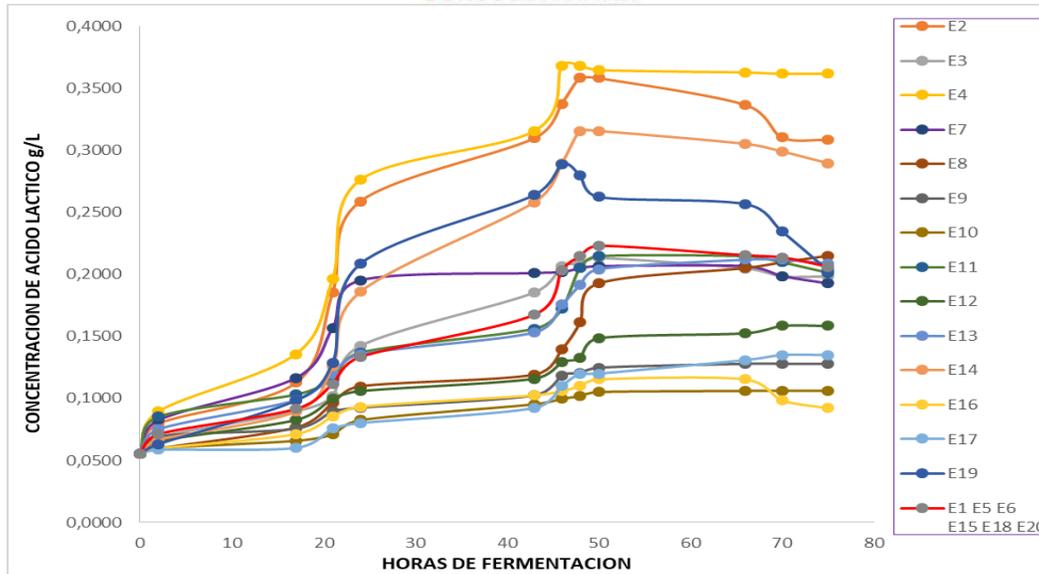
GRÁFICA 1. Consumo de azúcares reductores en los diferentes ensayos del diseño experimental en 75 horas de fermentación.

Los ensayos 9 y 17 con condiciones de pH de 6 y 5, temperatura 34 y microorganismo 0,5 g/L presentaron un consumo lento, ya que poseen condiciones de temperatura de 34° C y microorganismo de 0,5 g, probablemente estos dos factores influyeron en el crecimiento de las bacterias. Por ende, tuvieron bajos rendimientos de ácido láctico. El ensayo 8 pH de 5,5, temperatura 37 y microorganismo 0,33 g/L fue el más demorado en consumir los azúcares reductores, seguramente se debió a que contenía la menor concentración de microorganismo del diseño.

3.3. Análisis de obtención de ácido láctico de los ensayos

En la **gráfica 2**, se muestra el comportamiento de productividad de ácido láctico (g/L), en los diferentes ensayos durante 75 horas. En ella, se observa según los datos experimentalmente obtenidos que el ensayo 4 con condiciones de pH de 5,5, temperatura 37 °C y microorganismo 1,17 g/L, logró una mayor producción de ácido láctico de 0,3685 g/L, con respecto a los demás ensayos en un tiempo de 46 horas, Este, corresponde a un punto central del diseño en los factores de pH 5,5, temperatura de 37°C y a un punto axial en el factor microorganismo de 1,17 g/L, posiblemente esto puede indicar qué se debe aumentar la concentración de microorganismo para optimizar la producción de ácido láctico. El ensayo 10 con condiciones de pH de 5,5, temperatura 32 °C y microorganismo 0,75 g/L obtuvo la menor producción de ácido láctico del diseño propuesto, probablemente se deba porque corresponde al punto axial mínimo del factor temperatura en este caso 32° C, las condiciones no son aceptables para el crecimiento de las bacterias.

Los resultados obtenidos se compararon con el trabajo realizado por los autores Arias *et al.* (2008), donde la producción de ácido láctico fue por hidrólisis enzimática a partir del mucílago de café con la cepa liofilizada NRRL-B548 de *Lactobacillus bulgaricus*, obteniéndose un mayor rendimiento de ácido láctico a las 30 horas de fermentación, posiblemente se debió a que utilizaron una cepa liofilizada específica, el sustrato se enriqueció con una mayor cantidad de inóculo y la concentración inicial de azúcares reductores fue alrededor de 10 veces mayor, en comparación con la presente investigación en la que se utilizó un cultivo comercial para yogur. Por ende, puede ser una alternativa de producción a escala industrial a más bajo costo y se pueden aprovechar las características propias del mucílago sin alteraciones previas de su composición química.



GRÁFICA 2. Ácido láctico (g/L) en los diferentes ensayos del diseño experimental en 75 horas de fermentación.

3.4. Análisis del peso seco del crecimiento del microorganismo según la producción ácido láctico

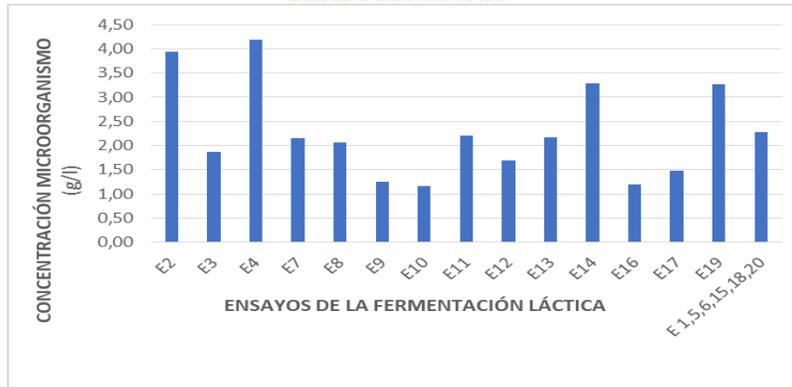
Según los autores Ortiz *et al.*, 2008, como se citó en Ossa *et al.*, 2010, se debe tener en cuenta que los rangos óptimos para la fermentación láctica se encuentran en un pH de 4,5 a 6,4 y de temperatura entre 30 y 40 °C.

En la **gráfica 3**, se observa el comportamiento del crecimiento de las bacterias ácido lácticas asociadas al cultivo comercial, medido a través del peso seco. Donde se demuestra, un crecimiento constante del microorganismo, analizado por el aumento de peso seco con respecto al tiempo. Se contempla, que todos los ensayos propuestos tuvieron un comportamiento similar; sin embargo, E4 y E2 con condiciones de pH de 5,5 y 6, temperatura 37 y 40 °C y microorganismo 1,17 y 1 g/L, tuvieron mayores valores de peso seco (4,19 g/LL y 3,94 g/LL respectivamente) a las 75 horas de crecimiento, también presentaron mayor producción de ácido láctico, indicando que la cantidad de microorganismo influye en el rendimiento de ácido láctico. Por el contrario, el ensayo que tuvo un menor crecimiento corresponde al E10 con condiciones de pH de 5,5, temperatura 32 °C y microorganismo 0,75 g/L que alcanzó una concentración mínima de 1,16 g/L.



UNIVERSIDAD

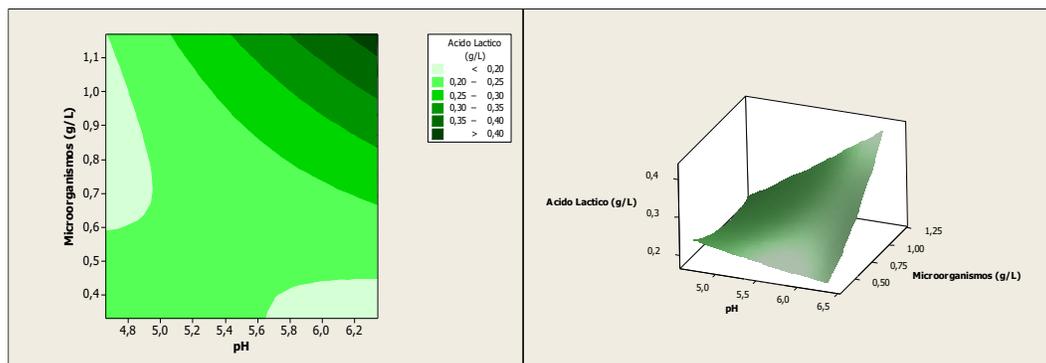
SURCOLOMBIANA



GRÁFICA 3. Concentración de microorganismo g/L, en los diferentes ensayos

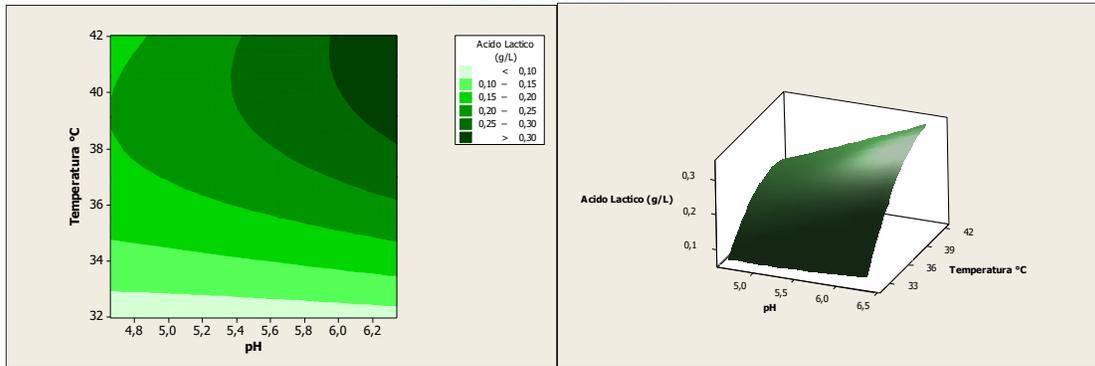
3.5. Análisis La metodología superficie de respuesta para la obtención de ácido láctico

En la **Gráfica 4**, se observa que el pH entre 5,5 a 6,4 presenta las mejores condiciones de rendimiento de ácido láctico durante el tiempo mostrando tonalidades más oscuras en los rangos de 0,30 g/L a 0,40 g/L, a medida que se incrementa la concentración del microorganismo aumentó proporcionalmente la cantidad ácido láctico.



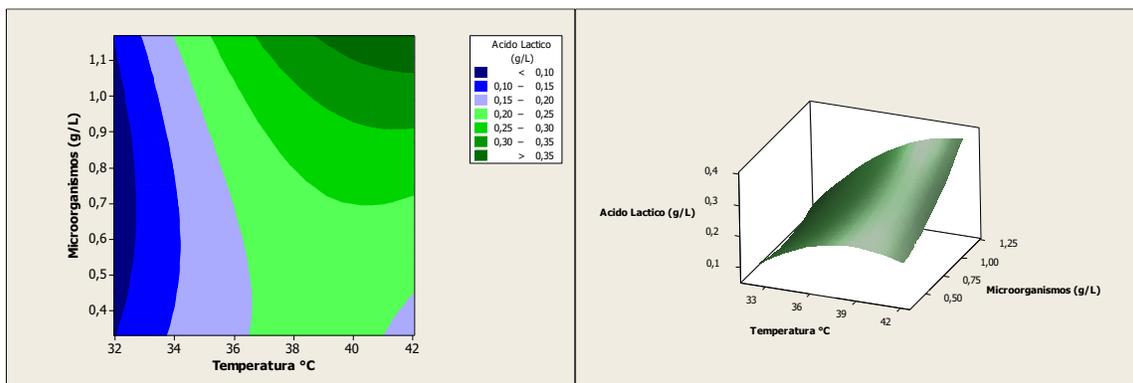
GRÁFICA 4. Superficie de respuesta para la obtención de ácido láctico en función de la concentración de microorganismos y pH.

En la **Gráfica 5** muestra que el pH influye ligeramente en la producción láctica, las temperaturas por debajo de los 34 °C presentan bajas concentraciones de AL, siendo las óptimas entre 37 y 42 °C.



GRÁFICA 5. Gráficas de contorno y de superficie de respuesta para la obtención de ácido láctico en función de la temperatura y pH.

En la **Gráfica 6** se observa que si el pH está bajo pero la temperatura se encuentra entre los rangos de 37 y 42 °C aumenta moderadamente el ácido láctico, pero en cambio si el pH está alto pero la temperatura baja los rendimientos disminuyen notoriamente.



GRÁFICA 6. Contorno de superficie de respuesta para la obtención de ácido láctico en función de la temperatura y concentración de microorganismos.

3.6. Resultados para obtener PLA

Mediante el proceso fermentativo se obtuvieron 4,5 ml de ácido láctico purificado, en la esterificación 11,56 ml de lactida y en la polimerización por ROP 0,5 g de PLA.

3.7. Evaluación fisicoquímica del ácido poliláctico (PLA)

Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 5**, presentando en sus espectrogramas un pico característico con una longitud de onda de $3497,58 \text{ cm}^{-1}$ perteneciente a un estiramiento del grupo hidroxilo (OH). Las bandas entre $2985,81 \text{ cm}^{-1}$ y $2902,87 \text{ cm}^{-1}$, corresponde a la vibración en los enlaces C-H presentes en los grupos alquilo metilo; la longitud de onda $1764,71 \text{ cm}^{-1}$ que se presenta en el espectro de la muestra es debida a la vibración longitudinal del grupo carbonilo (C=O) presente en el grupo éster del PLA, con una intensidad del 82% aproximadamente considerada muy fuerte; la banda que se observa a los $1408,39 \text{ cm}^{-1}$ se debe a las vibraciones de flexión entre enlaces alquilo-metileno (C-H) (Murillo *et al.*, 2021) . La longitud $1166,94$ pertenece

al enlace éter-aromático (CO) su presencia aumenta la intensidad del compuesto (Medina *et al.*, 2018). Las demás bandas longitudinales encontradas en el espectro pertenecen a la zona de la huella digital (Murillo *et al.*, 2021).

El proceso de evaluación de la obtención de PLA resulta aceptable para continuar siendo investigado, debido a que se está produciendo un material biodegradable de origen natural a partir de residuos renovables (Labeaga, 2018), como en este caso el mucílago de café. Actualmente, considerado un sustrato poco explorado en la obtención de este biopolímero, pero al cual se le atribuye un carácter potencial en esta investigación.

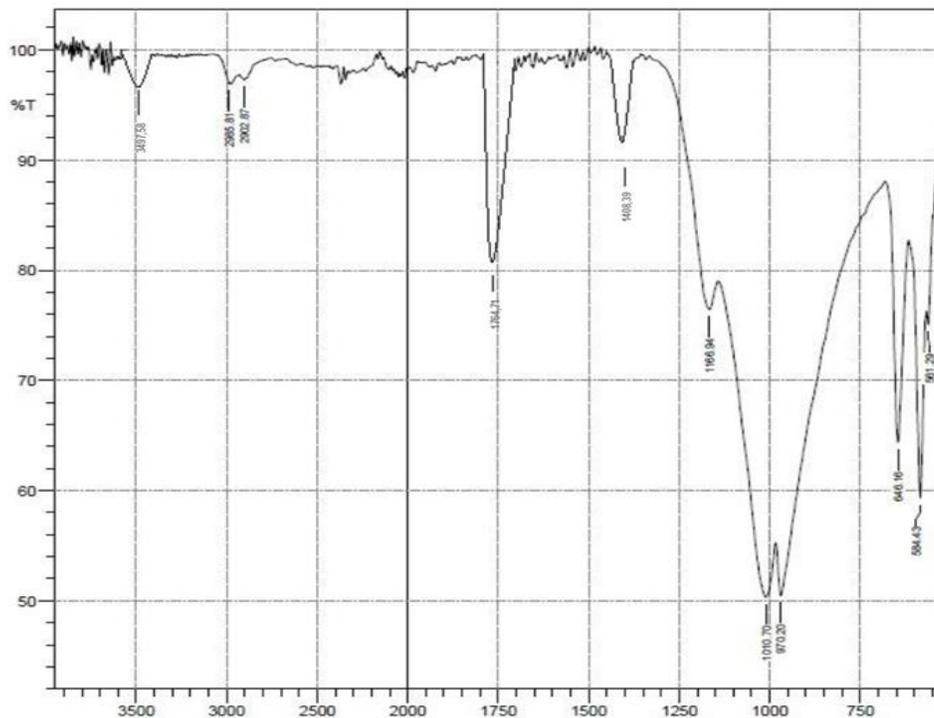


FIGURA 5. Espectro infrarrojo del ácido poliláctico

4. CONCLUSIONES

- El acondicionamiento que se realizó al mucílago de café mediante la adición de la enzima *Pectinasa de Aspergillus Aculeatus*, favoreció el incremento de la concentración de azúcares reductores permitiendo disponibilizar sustrato para el desarrollo de los diferentes acondicionamientos del diseño compuesto central con un valor inicial de 5,28 g/L.
- De acuerdo al análisis del diseño experimental central compuesto de superficie respuesta, las mejores condiciones para la fermentación láctica del cultivo comercial liofilizado que contiene: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii lactis* y *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, se encuentran a un pH de 5,5, temperatura de 37 °C y a una cantidad de microorganismo 1,17 g/L.
- Al implementar la metodología ROP por vía química fue viable para la obtención de ácido poliláctico, pero se debe tener en cuenta los residuos presentes en el mucilago, ya que al momento de polimerizar el ácido láctico se puede presentar otros compuestos que alteran la calidad de la muestra.
- Según los datos presentados en la gráfica (FTIR), permitió observar en los espectrogramas, grupos funcionales que determina la presencia de APL.

5. REFERENCIAS

- Acosta, A., Pérez, O., Albornas, Y., y Cortés, M. (2021). Potencialidades de la metodología de superficie respuesta en la optimización experimental en la industria química y alimentaria. *Revista centro azúcar*, 48(4), p. 123-138. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_serial&pid=2223-3-4861&lng=es&nrm=iso
- Arias-Zabala, M., Henao-Navarrete, L. y Castrillón-Gutiérrez, Y. (2009). Producción de ácido láctico por fermentación de mucílago de café con *Lactobacillus Bulgaricus* NRRL-B548. *Revista Redalyc* 76(158), p. 147-153. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49612069015>
- Bello-Gil, D., Carrera-Bocour, E. y Díaz-Maqueira, Y. (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método de ácido 3,5 dinitrosalicílico. *Revista Redalyc*, 40(2), p. 45-50. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120664006>
- Burgos-Montañez, L. (2020). Cuantificación de azúcares reductores del sustrato en residuos de piña con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico. *Revista de Investigación Fundación Universidad de América*, 13(1). <https://doi.org/10.29097/23461098.308>
- Cañas-Reyes, J., Gómez-Lozano, O., y Hernández-Nieto, A. (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*. Universidad de El Salvador.
- Cerquera-Losada, O., Pérez-Gómez, V. y Sierra-Chavarro, J. (2020). Análisis de la competitividad de la exportación del café del Huila. *Rev. Facultad de ciencias económicas y administrativas de la Universidad de Nariño*, 21(2), p. 19-44. <https://doi.org/10.22267/rtend.202102.139>
- Cuervo-Garcés, L. y Echeverry-Vargas, J. (2017). Síntesis ácida poliláctico proveniente del suero de quesería a nivel de laboratorio. *Rev. Iberoamericana*, 18(4), p.193-214.
- Escobar, L., Rojas, C., Giraldo-G, G. y Padilla-Sanabria., L. (2010). Evaluación del crecimiento de *Lactobacillus casei* y producción de ácido láctico usando como sustrato el suero de leche de vacuno. *Revista Investigación Universidad Quindío* (20), p.42 - 49. Armenia - Colombia.
- Federación Nacional de Cafeteros de Colombia-FNC. (2016). Post-cosecha. https://www.cafedecolombia.com/particulares/es/sobre_el_cafe/el_cafe/post-cosecha/
- Giaroli, G., y Maggioni, A. (2015). Producción de poliácido láctico por ROP. Universidad Nacional de Cuyo San Rafael, Mendoza.



UNIVERSIDAD

SURCOLOMBIANA

- Guerra-González, M. y Rueda-Silva, D. (2021). Producción de una biopelícula a partir de las pectinas extraídas del mucílago de café. Tesis de pregrado. Fundación Universidad Fundación de América, Bogotá D.C.
- Guilombo-Silva, J. (2017). Establecimiento de dos sistemas filtro como tratamiento de aguas residuales del café en el municipio de planadas Tolima (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD, Ibagué- Tolima.
- Henao, J., Ramos, J., Valencia, C, Adams, I., Rico, C., Escandón, J. y Echeverri-Cárdenas, D. (2018). Elaboración de un nuevo tipo de guías quirúrgicas para implantes dentales mediante impresión 3D. *Informador Técnico*, 82(1), p. 78-89. doi: <http://doi.org/10.23850/22565035.1005>
- Jurado-Gómez, H., Ramírez, C. y Aguirre, D. (2013). Cinética de fermentación de *Lactobacillus plantarum* en un medio de cultivo enriquecido como potencial probiótico. *Veterinaria y Zootecnia*, 7(2), p. 37-53.
- Labeaga-Viteri, A. (2018). Polímeros biodegradables. Importancia y potenciales aplicaciones. Trabajo de grado para optar por el título de Máster universitario en ciencia y tecnología química. Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED). Facultad de ciencias.
- Medina, J., Cedeño, P., Heras, R., Hernando, J-C. y Zapata, C. (2018). Comportamiento mecánico de mezclas de ácido poliláctico (PLA) con poliestireno (PS). *Revista INGENIERÍA UC*, 25(2). Carabobo, Venezuela.
- Morales-Rojas, E., Oliva-Cruz, S., Rascón-Barrios, J., Milla-Pino, M., Villegas-Rivas, D. y Chávez-Quintana, S. (2020). Sistemas de tratamiento de aguas mieles del café en la Provincia de Rodríguez de Mendoza, Perú. *Rev. Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*. 7(1), p. 84-90. <https://doi.org/10.23850/24220582.2918>
- Murillo-Vargas, F., Jiménez-Villalta, G., Esquivel-Alfaro, M. y Vega-Baudrit, J. (2021). Ácido L-poliláctico (PLA) y nanotubos de carbono de pared múltiple (NTC PM) con potenciales aplicaciones industriales. *Revista Colombia Química*, 50(1), Bogotá D.C. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v50n1.89838>
- Ortiz, A., Ruteo, J., Fajardo, E., Sarmiento, S., Aguirre, A., Arbeláez, G., Gómez, D. y Quevedo-Hidalgo, H. (2008). Evaluación de la capacidad probiótica "in vitro" de una cepa nativa de *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Scielo*, 13(2), p. 138-148. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-74832008000200005
- Ossa, J., Vanegas, M., y Badillo, A. (2010). Evaluación de la melaza de caña como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*. *Revista U.D.C.A Act. & Div. Científica*, 13(1), p. 97-104. <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v13n1/v13n1a11.pdf>



UNIVERSIDAD

SURCOLOMBIANA

- Peñuela-Martínez, A., Pabón-Usaquén, J. y Olivero-Tascón, C. (2011). Enzima: Alternativa para remover rápida eficazmente el mucílago de café. Revista Cenicafé. <https://www.cenicafe.org/es/publications/avt0406.pdf>
- Pinilla-H, J., Gutiérrez, L., Jaramillo, L y Pérez, J. (2021). Propuesta para el aprovechamiento de los subproductos del café, por medio de la evaluación y selección de las alternativas existentes, ajustadas a las condiciones actuales de los 25 pequeños caficultores líderes en 5 veredas del municipio de Irnos. Tesis de posgrado. <https://repository.ean.edu.co/bitstream/handle/10882/10798/PinillaJaime2021.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Prensa Federación Nacional de Cafeteros de Colombia-FNC. (2022). La producción de café de Colombia cierra el 2021 en 12,6 millones de sacos. Bogotá D.C. <https://federaciondecafeteros.org/wp/listado-noticias/produccion-de-cafe-de-colombia-cierra-2021-en-126-millones-de-sacos/>
- Serna, J., Torres, L., Martínez, C. y Hernández, M. (2018). Aprovechamiento de la pulpa de café como alternativa de valorización de subproductos. Revista Ion. 31(1), p. 37-42. <http://dx.doi.org/10.18273/revion.v31n1-2018006>
- Serna-C, L., Rodríguez, A. y Albán-A., F. (2003). Ácido Poliláctico (PLA): Propiedades y Aplicaciones. Revista Ingeniería y competitividad. 5(1), p. 2-16. <https://doi.org/10.25100/iyc.v5i1.2301>
- Urquijo, E. (2016). Identificación de impactos ambientales relacionados con el proceso de beneficio húmedo del café en la vereda de tres esquinas – Huila. Colombia (Tesis de especialización). Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá D.C.