

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS**

**27 MAY 2014**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**INFLUENCIA DEL TIEMPO DE AIREACIÓN, CONCENTRACIÓN DE  
AZÚCARES REDUCTORES Y SULFATO DE AMONIO EN LA  
PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE MUCÍLAGO DE CAFÉ (*Coffea  
arabica*)**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

**AUTORES**

Bach. Auver Abel, ROJAS SOPLÍN

Bach. Euler, ROJAS SOPLÍN

**ASESOR**

Dr. Miguel Ángel, BARRENA GURBILLÓN

**CO-ASESOR**

Ing. Segundo Víctor, OLIVARES MUÑOZ

**CHACHAPOYAS, 2014**

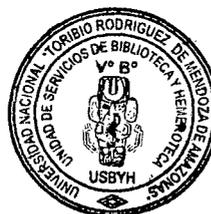
## DEDICATORIAS

A Dios, por hacernos sentir su presencia durante nuestro recorrido, por estar presente en todo momento de nuestras actividades y sobre todo por darnos la valentía, fortaleza y confianza en nosotros mismos para alcanzar nuestras metas.

A mis padres Edilberto Rojas Poquioma y Bertilda Soplín Baca por su apoyo y confianza y por brindarnos sus consejos y palabras de motivación en todo momento para superar los obstáculos y lograr un mejor futuro.

A mi esposa Maria Nuñez Mendoza y a mi querida hija Kathia Cristel Rojas Nuñez por el apoyo incondicional y por las fuerzas que ellas me generan para seguir adelante y hacer realidad este proyecto de investigación.

**Auver Abel Rojas Soplín**



A **Dios** por los triunfos y momentos difíciles en los cuales no me ha desamparado y me ha enseñado a mantenerme con fortaleza y firmeza, por permitirme llegar a este momento tan especial de mi vida.

A mis **Padres** Edilberto Rojas Poquioma y María Bertilda Soplín Baca, por su apoyo incondicional, que me motivaron a seguir adelante. Quienes han sabido luchar venciendo un sinnúmero de adversidades para sacar a sus hijos adelante. Gracias por depositar su confianza y por creer en mí.

A mis **Hermanos** quienes me han brindado comprensión y apoyo para el logro de mis metas. También por su solidaridad en los momentos más difíciles durante mi vida de estudiante, ellos me dieron la mano para seguir adelante y culminar lo que empecé.

**Euler Rojas Soplín**

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por darnos la vida y la oportunidad de seguir adelante con inteligencia, trabajo y optimismo.

A la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias y en particular a la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial, por brindarnos una educación de alto nivel y que nos ha permitido formarnos como profesionales útiles para la sociedad.

A los técnicos del Laboratorio de Microbiología, Laboratorio de Química, Laboratorio de Ingeniería, Laboratorio de Tecnología de la UNTRM, Laboratorio de Aguas y Suelos del INDES-CES, por el apoyo con equipos y ambientes.

A la Empresa Agropecuaria “CAMPO VERDE S.A.C”, por su apoyo con sus instalaciones para la obtención de la materia prima, que hicieron posible la realización de esta investigación.

A nuestros Asesores: Dr. Miguel Ángel, Barrena Gurbillón y al Ing. Segundo Víctor, Olivares Muñoz, por el apoyo y por sus oportunos consejos y conocimientos en la ejecución de la presente investigación.

Al docente M. Sc. Oscar A. Gamarra Torres por dar las facilidades del Laboratorio de Aguas y Suelos del INDES-CES y por el apoyo con sus conocimientos oportunos en la ejecución de la presente investigación.

A todos nuestros queridos amigos, que de una u otra manera hicieron posible alcanzar esta meta.

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL  
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**

**Ph. D. Dr. Hab. VICENTE MARINO CASTAÑEDA CHÁVEZ  
RECTOR**

**Ms.C. ROBERTO JOSÉ NERVICHACON  
VICERRECTOR ACADÉMICO (e)**

**Dr. EVER SALOMÉ LÁZARO BAZÁN  
VICERRECTOR ADMINISTRATIVO (e)**

**Dr. MIGUEL ANGEL BARRENA GURBILLÓN  
DECANO DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS**

## VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS

El Docente de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas que suscribe, hace constar que ha asesorado la realización de la tesis titulada **“INFLUENCIA DEL TIEMPO DE AIREACIÓN, CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES Y SULFATO DE AMONIO EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE MUCÍLAGO DE CAFÉ (*Coffea arabica*)”**, de los tesisistas egresados de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias, Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial de esta Casa Superior de Estudios:

-Br. Auver Abel Rojas Soplín

-Br. Euler Rojas Soplín

El suscrito da el visto bueno al informe de la mencionada tesis, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de las observaciones que formulen, para su posterior sustentación.

Chachapoyas, 13 de abril del 2014



---

Dr. Miguel Angel Barrera Gurbillón

Profesor Principal DE

## VISTO BUENO DEL CO-ASESOR DE TESIS

El Docente de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas que suscribe, hace constar que ha asesorado la realización de la tesis titulada **“INFLUENCIA DEL TIEMPO DE AIREACIÓN, CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES Y SULFATO DE AMONIO EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE MUCÍLAGO DE CAFÉ (*Coffea arabica*)”**, de los tesistas egresados de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias, Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial de esta Casa Superior de Estudios:

-Br. Auver Abel Rojas Soplín

-Br. Euler Rojas Soplín

El suscrito da el visto bueno al informe de la mencionada tesis, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de las observaciones que formulen, para su posterior sustentación.

Chachapoyas, 13 de abril del 2014

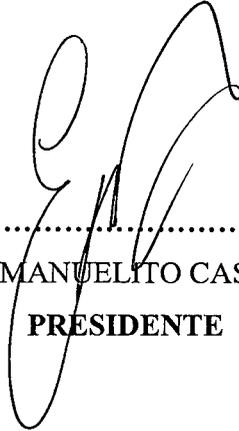


---

Ing. Segundo Víctor Olivares Muñoz

Profesor Auxiliar TC

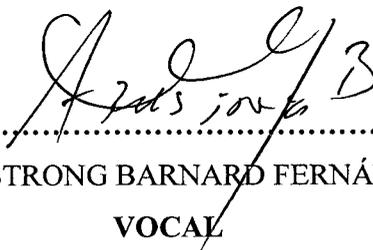
**JURADO EVALUADOR**



.....  
Ing. EFRAÍN MANUELITO CASTRO ALAYO  
**PRESIDENTE**



.....  
Ing. ERICK ALDO AUQUIÑIVÍN SILVA  
**SECRETARIO**



.....  
Mg. Sc. ARMSTRONG BARNARD FERNÁNDEZ JERI  
**VOCAL**



**UNIVERSIDAD NACIONAL**  
**TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**

FACULTAD DE INGENIERIA Y CIENCIAS AGRARIAS

**ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

En la ciudad de Chachapoyas, el día 04 de ABRIL del año 2014, siendo las 11:00 horas, se reunieron los integrantes del Jurado conformado por:

Presidente: Ing. Efraín Manuelito Castro Alayo

Secretario: Ing. Erick Aldo Auguiniú Silva

Vocal: Ing. Armstrong Barnard Fernandez Jeri

para evaluar la Sustentación del Informe de Tesis presentado por el(la) bachiller, don(ña) Auver Abel Rojas Soplin,

titulado "Influencia del tiempo de aireación, concentración de azúcares reductores y sulfato de amonio en la producción de etanol a partir de mucilago de Café (Coffea arabica)".

Después de la sustentación respectiva, el Jurado acuerda la APROBACIÓN (  ), DESAPROBACIÓN (  ) por mayoría (  ), por unanimidad (  ); en consecuencia, el (la) aspirante puede proseguir con el trámite subsiguiente, de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la UNAT-A.

Siendo las 15:30 horas del mismo día, el Jurado concluye el acto de sustentación del Informe de Tesis.

SECRETARIO

PRESIDENTE

VOCAL

Form6- T





UNIVERSIDAD NACIONAL  
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS

FACULTAD DE INGENIERIA Y CIENCIAS AGRARIAS

ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chachapoyas, el día 04 de ABRIL del año 2014, siendo las 11:00 horas, se reunieron los integrantes del Jurado conformado por:

Presidente: Ing. Efraín Manuelito Castro Alayo

Secretario: Ing. Erick Aldo Auguiniwin Silva

Vocal: Ing. Armstrong Barnard Fernandez Jeri

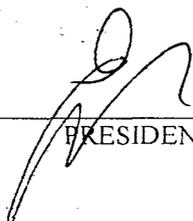
para evaluar la Sustentación del Informe de Tesis presentado por el(la) bachiller, don(ña) Euler Rojas Soplín

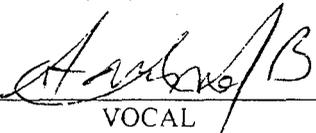
titulado "Influencia del tiempo de aireación, concentración de azúcares reductores y sul fato de amonio en la producción de etanol a partir de mucilago de cafe (Coffea arabic

Después de la sustentación respectiva, el Jurado acuerda la APROBACIÓN (X), DESAPROBACIÓN ( ) por mayoría ( ), por unanimidad (X); en consecuencia, el (la) aspirante puede proseguir con el trámite subsiguiente, de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la UNAT-A.

Siendo las 13:30 horas del mismo día, el Jurado concluye el acto de sustentación del Informe de Tesis.

  
SECRETARIO

  
PRESIDENTE

  
VOCAL

Form6- T

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO .....	iv
AUTORIDADES DE LA UNTRM-A.....	v
VºBº DEL ASESOR.....	vi
VºBº DEL CO-ASESOR.....	vii
JURADO EVALUADOR .....	viii
ÍNDICE GENERAL.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS .....	xi
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS .....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
2.1. Material Biológico.....	8
2.1.1. Agente fermentativo.....	8
2.1.2. Preparación del inóculo .....	8
2.1.3. Materia prima.....	8
2.1.4. Biorreactores.....	9
2.2. Seguimiento del proceso fermentativo.....	9
2.2.1. Evaluación de la materia prima en el laboratorio.....	9
2.2.2. Control del proceso fermentativo cada 24 horas .....	9
2.2.3. Fin de la fermentación.....	10
2.3. Optimización de la producción de etanol.....	11
2.3.1. Variables independientes.....	11
2.3.2. Variable dependiente.....	11
2.4. Análisis Estadístico .....	12
III. RESULTADOS .....	13
3.1. Análisis inicial de la materia prima.....	13
IV. DISCUSIÓN .....	21
V. CONCLUSIONES.....	25

	<b>Pág.</b>
VI. RECOMENDACIONES .....	26
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	27
ANEXOS.....	30
ANEXO1. Conteo de células de levadura en el inóculo con cámara de Neubauer...30	
ANEXO 2. Determinación de azúcares reductores con en el método de Lane y Eynon.....	32
ANEXO 3. Biorreactores con inyección de aire y sustrato en fermentación y su diseño.....	34
ANEXO 4.Descripción de cada una de las etapas del proceso para obtener etanol a partir de mucílago de café.....	35
ANEXO 5. Determinación del grado alcohólico del etanol obtenido.....	37
ANEXO 6. Gráficas de las variables independientes con cada uno de sus niveles...39	
ANEXO 7. Fotografías de todo el trabajo de investigación.....	43

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Producción de café pergamino de la Región Amazonas por Provincias en los últimos 6 años en toneladas.	1
Tabla 2. Residuos obtenidos en el proceso de beneficio e industrialización de 1 000 g de café cereza.	3
Tabla 3. Rendimiento de alcohol de subproductos del café.	3
Tabla 4. Posibilidad de producción de etanol por provincias-Región Amazonas, tomando como base datos de la Tabla 1(producción promedio anual de mucílago de café) el rendimiento del mejor tratamiento (113.5 mL).	4
Tabla 5. Valores de las variables independientes a evaluar con el diseño estadístico de Box-Benhken.	11
Tabla 6. Distribución de los valores de las variables independientes según el diseño estadístico de Box-Behnken.	12
Tabla 7. Análisis inicial de la materia prima (mucílago de café), en el laboratorio.	13
Tabla 8. Densidad, Azúcares reductores, °Brix y Conteo de levaduras del mucílago de café durante la fermentación.	14
Tabla 9. Rendimiento de etanol, de cada una de las 15 corridas experimentales, aplicando el diseño estadístico de Box-Behnken.	15
Tabla 10. Resultados de cada una de las 15 corridas experimentales, aplicando el diseño estadístico de Box-Behnken.	16
Tabla 11. Análisis de varianza para rendimiento de etanol.	17
Tabla 12. Coeficiente de regresión para rendimiento de etanol.	17
Tabla 13. Parámetros óptimos para rendimiento de etanol de 120,457 mL.	18
Tabla 14. Parámetros óptimos para producir etanol a partir de mucílago de café ( <i>Coffea arabica</i> ).	20
Tabla 15. Controles físicos y químicos del etanol rectificado	20
Tabla 16. Determinación del porcentaje de etanol en una muestra	38

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

	Pág.
Fotografía 1. Cámara de Neubauer.	30
Fotografía 2. Inyección de aire a los biorreactores	34
Fotografía 3. Biorreactores con sustrato en fermentación	34
Fotografía 4. Sistema de despulpado, desmucilaginado, seleccionado y lavado	43
Fotografía 5. Obtención del mucílago.	43
Fotografía 6. Mucílago obtenido.	43
Fotografía 7. Pasteurizado del mucílago.	43
Fotografía 8. Densidad del sustrato.	43
Fotografía 9. Determinación de azúcares reductores	44
Fotografía 10. Conteo de células de levaduras	44
Fotografía 11. Destilación simple.	44
Fotografía 12. Destilados de los 15 experimentos.	44
Fotografía 13. Destilación fraccionada del experimento de mayor rendimiento.	44
Fotografía 14. Destilación fraccionada del experimento de mayor rendimiento.	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Diagrama de flujo del proceso para obtener etanol a partir de mucílago de café.	10
Figura 2. Diagrama de Pareto.	18
Figura 3. Modelo de superficie de respuesta.	19
Figura 4. Modelo contorno de superficie de respuesta.	19
Figura 5. Esquema de la cuadrícula de una cámara de Neubauer.	31
Figura 6. Figura 6. Diseño del sistema utilizado en el trabajo de fermentación	34
Figura 7. Modelo de superficie de respuesta a una aireación constante de 30 minutos.	39
Figura 8. Modelo de superficie de respuesta a una aireación constante de 60 minutos.	39
Figura 9. Modelo de superficie de respuesta a una concentración de sulfato de amonio de 0,5 g/L de sustrato, constante.	40
Figura 10. Modelo de superficie de respuesta a una concentración de sulfato de amonio de 1,0 g/L de sustrato, constante.	40
Figura 11. Modelo de superficie de respuesta a una concentración de sulfato de amonio de 1,5 g/L de sustrato, constante.	41
Figura 12. Modelo de superficie de respuesta a una concentración de azúcares reductores de 15,0 g/L de sustrato, constante.	41
Figura 13. Modelo de superficie de respuesta a una concentración de azúcares reductores de 20,0 g/L de sustrato, constante.	42
Figura 14. Modelo de superficie de respuesta a una concentración de azúcares reductores de 25,0 g/L de sustrato, constante.	42

## RESUMEN

Este trabajo de investigación tuvo como objetivo general determinar la influencia del tiempo de aireación, concentración de azúcares reductores y sulfato de amonio en la producción de etanol a partir de mucílago de café (*Coffea arabica*). Primero se obtuvo el mucílago, se pasteurizó y se realizó una evaluación preliminar, luego se estandarizó a pH 4,5 con HCl concentrado (32,14 g para 32,14 L de mucílago de café puro), se determinó la concentración de azúcares reductores, de acuerdo a este resultado se realizó las diluciones, adición de sulfato de amonio y el tiempo de aireación según el diseño estadístico de Box-Behnken. Al sustrato se adicionó 0,5% (v/v) de inóculo con una concentración de  $10^6$  células de *Saccharomyces cereviceae*/mL. El proceso de fermentación se realizó en biorreactores (baldes) de 4 L de capacidad (volumen de sustrato 3 L), a temperatura ambiente (18-20 °C), cada 24 horas se midió en el sustrato en fermentación la densidad, azúcares reductores, °Brix y conteo de células de levadura, cuando sus valores fueron casi constantes se detuvo la fermentación y se procedió a la destilación. El máximo rendimiento obtenido fue de 113,5 mL etanol de 20 °GL/L de mucílago de café, con los valores de las variables: 60 minutos de aireación a 0,333 vvm, 1,5 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /L de mucílago de café y 15,0 g de azúcares reductores/L de mucílago de café.

**Palabras clave:** mucílago de café, biorreactor, producción de etanol, fermentación.

## ABSTRACT

This research had as its overall objective to determine the influence of time of aeration, concentration of reducing sugars and ammonium sulfate in the production of ethanol from mucilage of coffee (*Coffea arabica*). First, the mucilage is obtained, pasteurized and preliminary evaluation was performed, then was standardized to pH 4,5 with concentrated HCl (32,14 g to 32,14 L of pure coffee mucilage ), the concentration of reducing sugar, according to this result the dilutions are performed, adding ammonium sulfate was determined aeration time and according to the statistical Box-Behnken design. Substrate was added to 0,5% (v/v) inoculum with a concentration of  $10^6$  cells of *Saccharomyces cereviceae*/mL. The fermentation process was performed in bioreactors (buckets) of 4 L capacity (volume of substrate 3 L), at room temperature (18-20 °C) every 24 hours, the density, reducing sugars were measured in the fermentation substrate, °Brix and yeast cell count, when the values were almost constant fermentation stopped and proceeded to distillation. The maximum yield was 113,5 mL ethanol of 20 °GL/L coffee mucilage, with the values of the variables: 60 minutes at 0,333 vvm aeration, 1,5 g of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /L coffee mucilage and 15,0 g of reducing/L sugars coffee mucilage.

Keywords: coffee mucilage, bioreactor, production of ethanol, fermentation.

## I. INTRODUCCIÓN

La producción de etanol como energía renovable a partir de subproductos orgánicos es una oportunidad de utilizar y dar valor agregado a desechos como el mucílago, la pulpa y aguas mieles del café. La producción y procesamiento de café a nivel mundial ha generado una gran cantidad de subproductos, que ocasionan problemas de contaminación ambiental, por lo que su procesamiento contribuirá a reducir su impacto ambiental negativo y generará ingresos a los productores de café. Hoy en día una de las preocupaciones más importantes en el mundo es el agotamiento de la energía proveniente de los derivados del petróleo, la obtención de energía renovable es una alternativa para contrarrestar este problema.

Los productores cafetaleros de las Provincias de Utcubamba, Luya, Rodríguez de Mendoza, Bagua, Bongará y Chachapoyas de la Región Amazonas, no le están dando importancia al aprovechamiento del mucílago y aguas mieles que son subproductos del beneficio del café; no conocen el proceso de fermentación ni las variables influyentes en el rendimiento de la producción de etanol.

Tabla 1. Producción de café pergamino de la Región Amazonas por Provincias en los últimos 6 años en toneladas.

Provincias	Años					
	2008	2009	2010	2011	2012	*2013
Utcubamba	13 546	13 662	13 828	14 845	16 045	13 863
Luya	5 127	10 008	13 117	13 180	12 088	8 787
Rod.Mendoza	2 817	4 081	4 046	3 991	6 386	6 499
Bagua	2 838	3 631	3 624	3 104	3 340	3 270
Bongará	427	376	351	357	398	384
Chachapoyas	39	55	45	61	60	47
Total	24 794	31 813	35 011	35 538	38 317	32 850

Fuente: Dirección Agraria Amazonas, 2013

\* Producción tomada hasta Setiembre del 2013

Países industrializados como Brasil producen bioetanol a partir de la caña de azúcar, esto conlleva que con el tiempo el azúcar se vuelva más caro (componente principal de la canasta familiar), por lo que se debe reemplazar esta materia prima, por otra que sea un desecho orgánico para obtener bioetanol.

**Mucílago o mesocarpio**, está localizado entre la pulpa y la cáscara del grano y representa alrededor del 5 % del peso del grano de café. El mucílago constituye una capa de 0,5 a 2 mm de espesor que está fuertemente adherido a la cáscara del grano de café. Según Calle (1977), obtuvo 149 g de mucílago a partir de 1,0 Kg de café cereza. Desde el punto de vista físico, el mucílago es un sistema coloidal líquido, biofílico, siendo por lo tanto un hidrogel. Químicamente, el mucílago contiene agua, pectinas, azúcares y ácidos orgánicos. La fracción del mesocarpio que queda adherida a la cascarilla en el despulpado, está constituida por tejidos hialinos que no contienen cafeína ni taninos, es rica en azúcares, pectinas y nitrógeno (0,15 % en base seca). Además, el mucílago por su alto contenido de diferentes tipos de azúcares, es un excelente medio para la elaboración de biofertilizantes enriquecidos con minerales y así llegar a ser utilizado en los cultivos del propio café y de musas. En la preparación de abono orgánico tipo bokashi, se recomienda usar el mucílago o aguas mieles directamente, sustituyendo al máximo el volumen de agua que se desee. El mucílago es un excelente sustrato para el crecimiento de hongos, bacterias y otros microorganismos benéficos deseables para la recuperación de la calidad de suelos deteriorados por las malas prácticas de la agricultura convencional (Gómez & Nicolás, 2006).

El mucílago del fruto de café es muy rico en sustancias pécticas, de las que se podría obtener pectinas, de igual forma por su contenido de azúcares se puede utilizar para la producción de miel y alcohol etílico; asimismo, por fermentación anaeróbica se puede producir gas metano. No se oculta que convertir un residuo en un producto comercial, requiere un arduo trabajo, pero un material de desperdicio puede convertirse en valioso gracias a un nuevo aparato o descubrimiento, a la adaptación de los procesos o debido al encarecimiento de los materiales a los cuales puede sustituir (Calle, 1977).

Tabla 2. Residuos obtenidos en el proceso de beneficio e industrialización de 1 000 g de café cereza.

Proceso	Residuo obtenido	(g)
Despulpado	Pulpa fresca	436
Desmucilaginado	Mucílago	149
Secado	Agua	171
Trilla	Pergamino	42
	Película plateada	
Torrefacción	Volátiles	22
Preparación bebida	Borra	104
Residuo acumulada		924

Fuente: Adaptado por Calle (1977).

Debido a la elevada cantidad de azúcares reductores contenidos en esta fracción del fruto y a la facilidad de ser utilizado por los microorganismos, se le confiere al mucílago de café una importancia industrial como sustrato en fermentaciones para la producción de metabolitos de interés económico (González, 1982).

Rodríguez (2007), empleando como materia prima los subproductos del café, obtuvo como resultado 58,37 mL de etanol/Kg de mucílago fresco. Además obtuvo 25,28 mL de etanol/Kg de pulpa fresca.

Tabla 3. Rendimiento de alcohol de subproductos del café

Etanol obtenido por cada millón de sacos de café verde			
Subproducto	Toneladas generadas	Litros de etanol/tonelada	Galones americanos de etanol
Pulpa fresca	162 900,00	25,28	1 088 008,00
Mucílago fresco	55 500,00	58,37	855 888,00
Galones de etanol/millón de sacos de café verde			1 943 896,00

Fuente: Adaptado por CENICAFE, 2007.

Tabla 4. Posibilidad de producción de etanol por provincias-Región Amazonas, tomando como base datos de la Tabla 1 (producción promedio anual de mucílago de café) y el rendimiento del mejor tratamiento (113.5 mL).

Provincias	Mucílago promedio (Tn)	L etanol de 20 °GL/ Tn mucílago	Galones americanos de etanol
Ucubamba	8731	113.50	231 794,06
Luya	6341	113.50	190 131,27
Rod.Mendoza	2831	113.50	84 885,92
Bagua	2016	113.50	60 448,64
Bongará	233	113.50	6 986,37
Chachapoyas	31	113.50	929,52
Total	20 183,00	-----	605 175,75

Fuente: Elaboración propia

De acuerdo a los resultados obtenidos en laboratorio que fue de 113,50 mL de etanol de 20 °GL/L mucílago diluido (189,17 L etanol de 20 °GL/Tn mucílago puro). Aprovechando el total de mucílago que se desecha 20 183 toneladas, se podría aportar 605 175,75 L de etanol. Para obtener etanol de alta pureza se sometería a una destilación fraccionada y se obtendría 139 190,42 L de etanol de 88 °GL.

Los sustratos más comúnmente usados para la fermentación son los azúcares, en especial la D-glucosa (fermentación alcohólica). Para muchas levaduras en un medio adecuado, la fermentación significa la conversión de hexosas, principalmente glucosa, fructosa, manosa y galactosa, en etanol y dióxido de carbono, en ausencia de aire (Hernández, 2007 y Madigan *et al*, 1999).

Para la producción de etanol han sido utilizadas diferentes fuentes de carbono como materia prima; a) materiales portadores de azúcares simples que contienen carbohidratos (jugo de caña de azúcar, melazas, sorgo dulce, etc.); b) materiales amiláceos los cuales contienen almidón como fuente de azúcares (yuca, maíz, papa, etc.) y c) materiales celulósicos, que contienen celulosa, hemicelulosa, como el bagazo de la caña de azúcar, la madera, residuos agrícolas, etc. El etanol se produce por fermentación de estas materias primas con levaduras u otros microorganismos.

Las materias primas del primer tipo fermentan directamente. El segundo tipo de materias primas constan de carbohidratos complejos, como el almidón, que primero se debe convertir en azúcares fermentables mediante la acción de enzimas y las materias primas que son sustancias celulósicas se convierten en azúcares fermentables por hidrólisis con ácidos inorgánicos, principalmente (Hernández, 2007).

Según González (1998), la fermentación puede definirse como un proceso en el cual se llevan a cabo cambios químicos en un substrato orgánico, ya sea un hidrato de carbono, proteína, grasa o algún tipo de materia orgánica. Estos cambios se llevan a cabo por catalizadores bioquímicos conocidos como enzimas, que son elaboradas por tipos específicos de microorganismos vivos.

La producción de células de levadura y la producción de alcohol por levaduras son dos procesos industriales muy diferentes: el primer proceso requiere oxígeno para la máxima producción de material celular y es un proceso aeróbico, en tanto que el proceso de fermentación alcohólica es anaeróbico y sólo se efectúa en ausencia de oxígeno. Las levaduras son hongos unicelulares que tienen forma esférica, ovoide, elipsoide o cilíndrica. Se multiplican por brotación y al separarse en cada brote queda una escara en la pared de la célula madre. También suelen presentar una reproducción sexuada donde dos células haploides se conjugan formando un cigoto que de inmediato en algunas especies o mucho tiempo después y sólo en condiciones especiales en otras, sufre una meiosis generando las ascosporas haploides (Brock & Madigan, 1993).

Las levaduras pueden oxidar en aerobiosis los monosacáridos, como la glucosa y la fructosa, hasta dióxido de carbono y agua formando ATP, NADH y radicales carbonados intermedios en la biosíntesis celular. Algunas son aerobias estrictas pero otras en condiciones de anaerobiosis pueden fermentar los azúcares produciendo etanol, aunque esta vía metabólica produce mucho menos ATP. Las levaduras usadas industrialmente consumen como máximo un 10% de sustrato por vía oxidativa, pues prefieren la fermentación. Entre ellas se encuentran especies de *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Brettanomyces* y *Candida*, las que consumen rápidamente la glucosa. Los disacáridos, como la sacarosa son hidrolizados en el exterior de la

membrana. La glicólisis es el conjunto de reacciones que permiten pasar de glucosa a piruvato con la formación de 2 ATP y 2 NADH. En anaerobiosis el piruvato es descarboxilado hasta acetaldehído y luego reducido a etanol con gasto del NADH generado en la primera etapa (Brock & Madigan, 1993).

La fermentación de jugo de uva se ve ampliamente favorecido por agitación previa a la fermentación junto a las pieles de las uvas, ya que de esta manera las levaduras y bacterias son inoculadas al jugo, a pesar que la fermentación con levaduras es más rápida con un leve contacto de oxígeno, una exposición continua favorece el crecimiento de un amplio rango de bacterias y levaduras, las que pueden transformar el producto en un vinagre naciente (Jackson, 2008).

Según Guillaume (2004), la fermentación en vinos se facilita con: 1) aireación al comienzo de la fermentación alcohólica para asegurar la multiplicación de las células y mejorar su resistencia al etanol. 2) controlar la temperatura y mantenerlo dentro de los límites viables para las levaduras (20-30 °C) estos límites varían según las cepas de levadura, si las temperaturas son demasiado bajas, la fermentación se ralentiza hasta pararse, si es demasiado elevada las levaduras mueren. 3) no eliminar las sustancias sólidas acumuladas en el fondo de los depósitos, para mantener un nivel aceptable de lípidos y compuestos nitrogenados (el contenido de nitrógeno asimilable debe ser superior a 150 mg/L y su absorción aumenta la velocidad de fermentación, su carencia también ralentiza la fermentación y algunas veces la bloquea). La levadura produce etanol y CO<sub>2</sub> a partir de glucosa, el etanol inhibe la absorción de la glucosa. La levadura reacciona produciendo factores de supervivencia, (ácidos grasos insaturados, ergosterol), que reducen la permeabilidad de la membrana al etanol. La degradación de la glucosa constituye una cascada de reacciones (la glicólisis) que conduce a la producción de piruvato, este se transforma en etanal y luego en etanol.

Cueva & Huayama (2007), obtuvieron una concentración máxima de etanol de 92,17 g/L de medio (14 % vol. etanol) con los valores de las variables de: 165 g de panela/L de medio, 200 mg de sulfato de amonio/L de medio y 6 días de fermentación a 33 °C.

Carrión & Huamán (2008), determinaron los parámetros óptimos para la obtención de etanol a partir de la fermentación del almidón de papa (*Solanum tuberosum*) Yungay, usando *Saccharomyces cerevisiae* MIT L-51 que son: 20% p/v de azúcares reductores, 180 mg de sulfato de amonio/L de sustrato y un tiempo de 72 horas de fermentación, dando un rendimiento de 94,67 g de etanol/L de sustrato.

Barrena *et al.* (2010), obtuvieron un máximo rendimiento de aguardiente de 0,350 mL aguardiente/mL guarapo con los siguientes valores de las variables: 2 horas de aireación a 0,333 vvm, 0,5 gramos de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  por litro de jugo de caña de azúcar y 3,0 gramos de azúcares reductores por litro de jugo de caña de azúcar (contenido promedio del jugo de caña de azúcar recién extraído).

Tabaco & Tejada (2012), obtuvieron un máximo rendimiento de 0,367 mL de aguardiente de 20 °GL/mL guarapo con los siguientes valores de las variables: 1 hora de aireación a 0,45 vvm, 1,0 gramo de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  por litro de jugo de caña de azúcar y 9,0 gramos de azúcares reductores por litro de jugo de caña de azúcar.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Material biológico

#### 2.1.1. Agente fermentativo

Para la fermentación del mucílago de café y obtener etanol se empleó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* comercial.

#### 2.1.2. Preparación del inóculo

Primero se pesó 1 g de levadura granulada luego se agregó a un matraz Erlenmeyer estéril de 150 mL conteniendo 99 mL de agua destilada estéril luego se homogenizó y se sembró 1 mL de muestra por difusión (incorporación) por duplicado en placas con agar Mac Conkey, seguido se incubó a 28 °C por 48 horas. A las dos placas sembradas se le hizo un lavado suave con agua destilada estéril y se depositó en un matraz Erlenmeyer estéril de 150 mL al que se le adicionó 100 mL de agua destilada estéril. Con cámara de Neubauer y microscopio se determinó la concentración del inóculo. Para cada sistema a ensayar se utilizó 15 mL de inóculo con  $10^6$  células de levadura/mL para 3 L de sustrato (equivalente a 0,5 % (v/v) con respecto al volumen del sustrato).

#### 2.1.3. Materia prima

El mucílago de café se obtuvo de la Finca Timbuyacu, sector Nueva Esperanza, Provincia de Rodríguez de Mendoza, Amazonas. Se utilizó una malla racshell para exprimir manualmente el mucílago presente en la pulpa del café. En esta finca cuentan con un equipo multifuncional para el beneficio del café, el cual hace despulpado, seleccionado de grano, demucilaginado y lavado, el inconveniente es que para cualquiera de las actividades antes mencionadas utiliza agua pero en mínima cantidad. Este equipo se empleó para extraer la mayor cantidad de mucílago, más rápido y completar el volumen requerido. Una vez obtenido el mucílago de café se pasteurizó a una temperatura de 75 °C x 10 minutos, luego se enfrió a temperatura ambiente.

#### **2.1.4. Biorreactores**

Se emplearon 15 biorreactores de 4 L de capacidad, con las mismas características y proporciones geométricas. Estos fueron baldes de plástico a cuya tapa se le hizo dos agujeros (en el medio y al costado) uno para inyectar aire y otro con un tubo para la salida de aire y el CO<sub>2</sub> producido durante la fermentación, además facilitaba la extracción de la muestra para su análisis. Los agujeros para la inyección de aire luego se taponaban con algodón para impedir el ingreso del aire del medio ambiente hacia el mosto.

Para la inyección de aire se utilizó bombas de acuario con las que se hizo ingresar 0,333 vvm (1L de aire /min para 3 L de sustrato). El aire bombeado pasó por medio de una manguera plástica, se purificó en un recipiente con salmuera saturada, luego por medio de otra manguera plástica se pasó al biorreactor, al final del conducto de aireación que estaba colocado en el centro del biorreactor se colocó una piedra pómez para que el aire ingrese en forma de burbujas pequeñas. (Anexo 3).

### **2.2. Seguimiento del proceso fermentativo**

#### **2.2.1. Evaluación de la materia prima en el laboratorio**

El mucílago se trasladó al Laboratorio de Ingeniería de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza donde se midió: densidad, °Brix, pH y luego el pH se ajustó a 4,5 con ácido clorhídrico concentrado. Luego, se determinó su contenido de azúcares reductores (AR) para hacer las diluciones necesarias y tener sustratos con un contenido de AR específico.

#### **2.2.2. Control del proceso fermentativo cada 24 horas**

En una muestra de sustrato en fermentación se midió: densidad, °Brix, contenido de azúcares reductores y el número de células de levaduras con una cámara de Neubauer y microscopio en el Laboratorio de Aguas y Suelos del INDES-CES.

### 2.2.3. Fin de la fermentación

Se detuvo la fermentación (a las 96 horas) cuando la densidad y los °Brix fueron casi constantes.

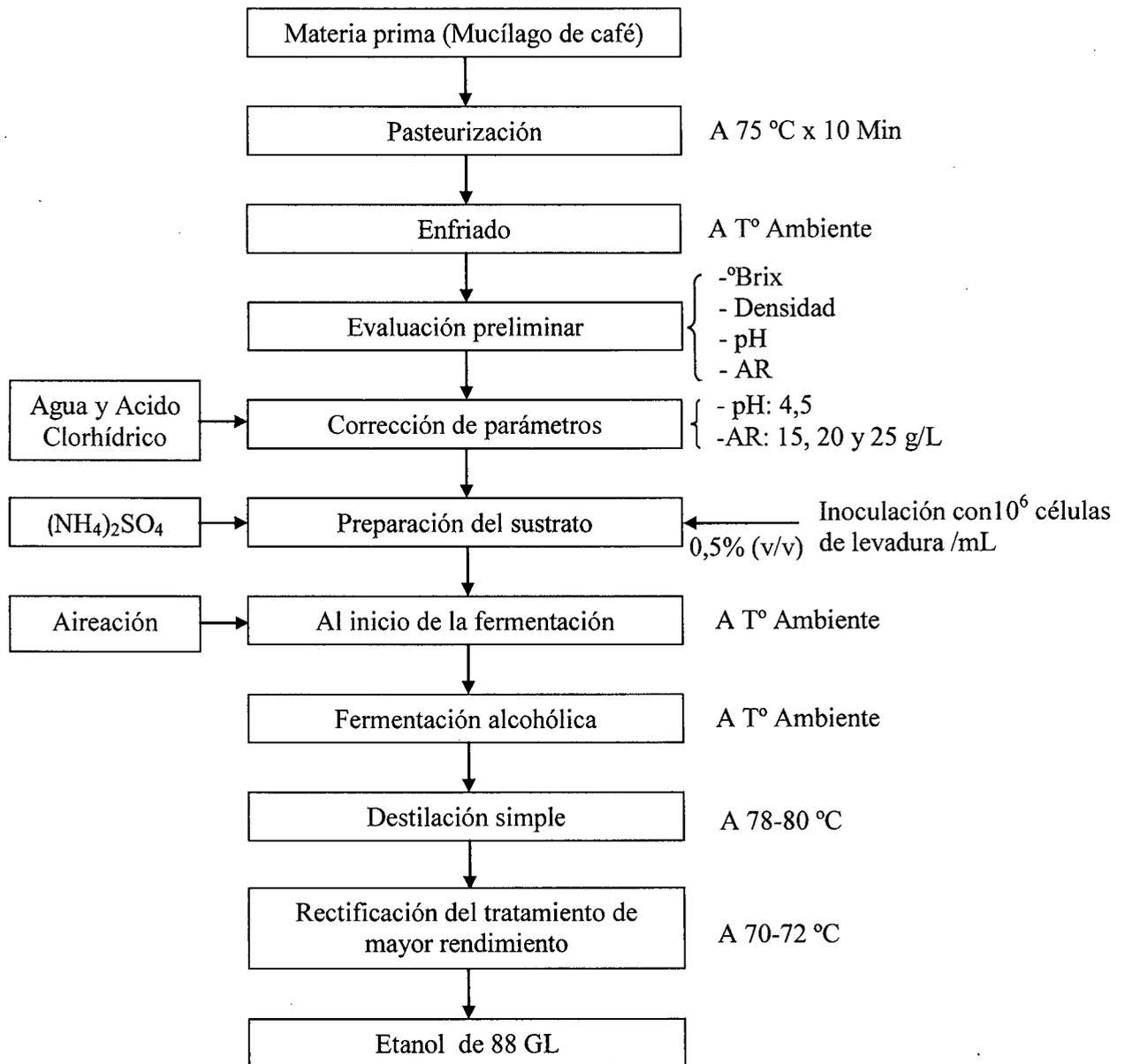


Figura 1. Diagrama de flujo del proceso para obtener etanol a partir de mucílago de café.

Las etapas del proceso para obtener etanol a partir de mucílago de café, que se muestran en la Figura 1, se describen en el Anexo 4.

### 2.3. Optimización de la producción de etanol

Para el presente trabajo de investigación se consideró las variables independientes: tiempo de aireación (minutos), concentración de azúcares reductores (g/L) y sulfato de amonio (g/L). La variable dependiente o respuesta fue el rendimiento de etanol expresado como mL de etanol/L de sustrato fermentado (mucílago de café). Se utilizó el diseño estadístico de Box-Benhken (Montgomery, 2003), para tres variables independientes, para obtener el mejor valor de cada una de las variables influyentes en el rendimiento de etanol obtenido a partir del mucílago de café, para lo cual se requiere que cada variable tenga tres valores equidistantes alto (+), medio (0) y bajo (-) los que se muestran en la Tabla 5.

#### 2.3.1. Variables independientes

- Aireación: Al inicio de la fermentación a 0,333 vvm (1 L de aire/3 L de sustrato (mucílago de café)): 30, 60 y 90 minutos.
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : En g/L de sustrato (mucílago de café): 0,5, 1,0 y 1,5.
- Azúcares reductores: En g/L de sustrato (mucílago de café): 15, 20 y 25.

#### 2.3.2. Variable dependiente

- Rendimiento de etanol: En mL de etanol/L de sustrato (mucílago de café).

Tabla 5. Valores de las variables independientes a evaluar con el diseño estadístico de Box-Benhken.

Valor	Aireación (X1) (minutos)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (X2) (g/L sustrato)	Azúcares reductores (X3) (g/L sustrato)
Alto (+)	90	1,5	25
Medio (0)	60	1,0	20
Bajo (-)	30	0,5	15

Los valores de las tres variables independientes se distribuyeron de acuerdo al diseño de Box-Benhken, que se muestran en la Tabla 6, donde cada fila corresponde a un experimento y cada columna corresponde a una variable.

Tabla 6. Distribución de los valores de las variables independientes según el diseño estadístico de Box-Behnken.

Número de experimento	Variables		
	X1	X2	X3
1	-	-	0
2	-	+	0
3	+	-	0
4	+	+	0
5	-	0	-
6	-	0	+
7	+	0	-
8	+	0	+
9	0	-	-
10	0	-	+
11	0	+	-
12	0	+	+
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

Fuente: Montgomery, 2003.

#### 2.4. Análisis estadístico

Los resultados experimentales se procesaron con el software estadístico Statgraphics Centurión XV. El nivel óptimo de cada variable independiente se determinó usando las técnicas de optimización de respuesta superficial (Mc Daniel, 1976), el cual fue aplicado a las tres variables independientes.

### III. RESULTADOS

#### 3.1. Análisis inicial de la materia prima

Tabla 7. Análisis inicial de la materia prima (mucílago de café), en el laboratorio.

Parámetros	M1	M2
°Brix	9,90	4,35
Densidad (g/mL)	1,12	1,043
Azúcares reductores (g/L)	28,0	12,73
pH	4,96	4,84

Fuente: Elaboración propia

Donde:

M1: mucílago obtenido el mismo día de cosecha durante el despulpado.

M2: mucílago obtenido después del despulpado (después de 14 horas de fermentación), durante el lavado del café.

Durante la fermentación se realizó un seguimiento midiendo la densidad, °Brix, azúcares reductores y conteo de levaduras.

En la Tabla 7 se aprecia que la densidad del mosto en fermentación va disminuyendo conforme avanza la fermentación, debido a la producción de CO<sub>2</sub>, que se disipa al medio ambiente. Los azúcares reductores se incrementan debido a que continúa la hidrólisis de la sacarosa presente en el sustrato, por estar en medio ácido (pH 4,5). Los °Brix disminuyen, lo cual se debe a la producción y disipación de CO<sub>2</sub>, lo que disminuye el contenido de sólidos disueltos en el medio, incidiendo directamente en el valor de los °Brix.

Tabla 8. Densidad, azúcares reductores, °Brix y conteo de levaduras durante la fermentación del mucílago de café

N° de expe- rimento	Densidad g/mL					Azúcares reductores g/L					°Brix					N° de células levadura /mL de sustrato				
	0h	24h	48h	72h	96h	0h	24h	48h	72h	96h	0h	24h	48h	72h	96h	0h	24h	48h	72h	96h
1	1,067	1,045	1,035	1,028	1,025	20,0	32,9	37,3	40,0	35,0	6,8	5,4	4,2	3,3	3,2	10 <sup>6</sup>	1,1x10 <sup>9</sup>	4,6 x10 <sup>9</sup>	7,2x10 <sup>9</sup>	7,0x10 <sup>9</sup>
2	1,072	1,048	1,029	1,022	1,020	20,0	32,9	35,0	37,3	21,1	6,9	6,5	4,8	4,0	3,9	10 <sup>6</sup>	6,6x10 <sup>9</sup>	6,9 x10 <sup>9</sup>	8,1x10 <sup>9</sup>	8,0x10 <sup>9</sup>
3	1,063	1,044	1,033	1,025	1,021	20,0	29,5	37,3	40,0	22,9	6,8	6,3	5,1	4,2	4,0	10 <sup>6</sup>	7,5x10 <sup>9</sup>	7,8 x10 <sup>9</sup>	8,4x10 <sup>9</sup>	8,2x10 <sup>9</sup>
4	1,080	1,065	1,045	1,032	1,028	20,0	28,4	40,0	43,1	19,5	6,7	6,3	4,9	4,0	3,8	10 <sup>6</sup>	8,0x10 <sup>9</sup>	8,4 x10 <sup>9</sup>	9,6x10 <sup>9</sup>	8,4x10 <sup>9</sup>
5	1,054	1,035	1,023	1,018	1,015	15,0	23,3	25,5	26,7	18,4	5,5	5,0	3,8	3,0	3,0	10 <sup>6</sup>	6,5x10 <sup>9</sup>	7,2 x10 <sup>9</sup>	7,7x10 <sup>9</sup>	6,8x10 <sup>9</sup>
6	1,085	1,058	1,036	1,025	1,022	25,0	30,3	48,2	50,9	25,5	8,8	8,2	6,4	5,5	5,3	10 <sup>6</sup>	7,0x10 <sup>9</sup>	7,8 x10 <sup>9</sup>	8,4x10 <sup>9</sup>	7,9x10 <sup>9</sup>
7	1,061	1,044	1,032	1,024	1,021	15,0	26,7	35,0	37,3	13,4	5,2	4,5	3,3	2,5	2,4	10 <sup>6</sup>	8, x10 <sup>9</sup>	9,8 x10 <sup>9</sup>	1,2x10 <sup>10</sup>	8,8x10 <sup>9</sup>
8	1,083	1,067	1,048	1,036	1,033	25,0	33,3	37,3	43,1	16,3	8,5	7,8	5,7	4,6	4,5	10 <sup>6</sup>	9,2x10 <sup>9</sup>	9,9 x10 <sup>9</sup>	1,1x10 <sup>10</sup>	8,6x10 <sup>9</sup>
9	1,054	1,040	1,025	1,019	1,017	15,0	21,5	29,5	31,1	10,3	5,2	4,7	3,3	2,5	2,3	10 <sup>6</sup>	8,4x10 <sup>9</sup>	8,6 x10 <sup>9</sup>	9,0x10 <sup>9</sup>	7,9x10 <sup>9</sup>
10	1,085	1,061	1,040	1,032	1,028	25,0	35,0	46,7	56,0	17,5	8,5	8,1	6,6	4,7	4,7	10 <sup>6</sup>	9,7x10 <sup>9</sup>	1,1 x10 <sup>10</sup>	1,3x10 <sup>10</sup>	9,3x10 <sup>9</sup>
11	1,063	1,045	1,030	1,024	1,021	15,0	22,4	26,7	37,3	6,40	5,4	5,0	3,8	2,8	2,6	10 <sup>6</sup>	9,5x10 <sup>9</sup>	9,9 x10 <sup>9</sup>	1,2x10 <sup>10</sup>	9,5x10 <sup>9</sup>
12	1,092	1,055	1,036	1,027	1,026	25,0	32,9	43,1	56,0	8,90	8,5	7,8	5,9	5,0	4,8	10 <sup>6</sup>	9,9x10 <sup>9</sup>	1,2 x10 <sup>10</sup>	1,3x10 <sup>10</sup>	8,7x10 <sup>9</sup>
13	1,073	1,052	1,036	1,027	1,025	20,0	27,5	37,3	40,0	9,60	7,0	6,5	5,1	4,2	4,0	10 <sup>6</sup>	1,0x10 <sup>10</sup>	1,2 x10 <sup>10</sup>	1,3x10 <sup>10</sup>	9,4x10 <sup>9</sup>
14	1,062	1,045	1,030	1,022	1,020	20,0	29,5	32,9	37,3	13,5	6,8	6,4	5,2	4,3	4,3	10 <sup>6</sup>	1,0x10 <sup>10</sup>	1,1 x10 <sup>10</sup>	1,2x10 <sup>10</sup>	9,8x10 <sup>9</sup>
15	1,071	1,050	1,035	1,025	1,023	20,0	28,0	32,9	43,1	10,3	6,7	6,2	5,0	4,3	4,1	10 <sup>6</sup>	9,8x10 <sup>9</sup>	1,1 x10 <sup>10</sup>	1,3x10 <sup>10</sup>	9,5x10 <sup>9</sup>

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 9 se muestra el rendimiento de etanol de 20° Gay Lussac, de cada una de las 15 corridas experimentales, aplicando el diseño estadístico de Box–Behnken. El mucílago de café fermentado en cada corrida experimental fue destilado con un equipo de destilación simple; se midió el volumen de etanol obtenido y su grado alcohólico.

Tabla 9. Rendimiento de etanol, de cada una de las 15 corridas experimentales, aplicando el diseño estadístico de Box-Behnken.

Numero de experimento	Sustrato (mL)	Etanol de 20 °GL (mL)	Rendimiento (mL etanol/ L sustrato)
1	3000,0	275,64	91,88
2	3000,0	216,88	72,29
3	3000,0	164,16	54,72
4	3000,0	256,09	85,36
5	3000,0	194,53	64,84
6	3000,0	213,52	71,17
7	3000,0	210,16	70,05
8	3000,0	156,83	52,28
9	3000,0	152,02	50,67
10	3000,0	210,71	70,24
<b>11</b>	<b>3000,0</b>	<b>340,50</b>	<b>113,5</b>
12	3000,0	177,07	59,02
13	3000,0	190,67	63,56
14	3000,0	192,40	64,13
15	3000,0	191,80	63,93

Fuente: Elaboración propia

Tabla 10. Resultados de cada una de las 15 corridas experimentales, aplicando el diseño estadístico de Box-Behnken.

°N de experimento	Aireación (minutos)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L sustrato)	Azúcares reductores (g/L sustrato)	Rendimiento (mL etanol/L sustrato)	Orden de producción
1	30,00	0,5	20,0	91,88	2
2	30,00	1,5	20,0	72,29	4
3	90,00	0,5	20,0	54,72	13
4	90,00	1,5	20,0	85,36	3
5	30,00	1,0	15,0	64,84	8
6	30,00	1,0	25,0	71,17	5
7	90,00	1,0	15,0	70,05	7
8	90,00	1,0	25,0	52,28	14
9	60,00	0,5	15,0	50,67	15
10	60,00	0,5	25,0	70,24	9
<b>11</b>	<b>60,00</b>	<b>1,5</b>	<b>15,0</b>	<b>113,5</b>	<b>1</b>
12	60,00	1,5	25,0	59,02	12
13	60,00	1,0	20,0	63,56	11
14	60,00	1,0	20,0	64,13	9
15	60,00	1,0	20,0	63,93	10

Fuente: Elaboración propia

Según lo expuesto en la Tabla 10 se observa que el experimento N° 11 fue el de mayor rendimiento de etanol.

Tabla 11. Análisis de varianza para rendimiento de etanol

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Azúcares reductores	268,54	1	268,54	4,66	0,0834
B:Sulfato de amonio	490,784	1	490,784	8,51	0,0331
C:Aireación	178,322	1	178,322	3,09	0,1389
AA	3,66773	1	3,66773	0,06	0,8109
AB	1370,85	1	1370,85	23,78	0,0046
AC	145,202	1	145,202	2,52	0,1733
BB	405,592	1	405,592	7,04	0,0453
BC	630,763	1	630,763	10,94	0,0213
CC	10,7756	1	10,7756	0,19	0,6835
Error total	288,208	7	57,6415		
Total (corr.)	3794,3	14			

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 11 se aprecia que el sulfato de amonio, la interacción entre azúcares reductores y sulfato de amonio y la interacción de sulfato de amonio y aireación son estadísticamente significativos, el valor-P menor de 0,05 (95% de confianza) indica que son variables influyentes en el rendimiento de etanol.

Tabla 12. Coeficiente de regresión para rendimiento de etanol

Coeficiente	Estimado
Constante	-32,4342
A:Azúcares reductores	10,2509
B:Sulfato de amonio	29,6883
C:Aireación	-0,418986
AA: A <sup>2</sup>	-0,0398667
AB: AxB	-7,405
AC: AxC	-0,0401667
BB: B <sup>2</sup>	41,9233
BC: BxC	0,837167
CC: C <sup>2</sup>	0,00189815

Fuente: Elaboración propia

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Rendimiento de etanol} = -32,4342 + 10,2509 * A + 29,6883 * B - 0,418986 * C - 0,0398667 * A^2 - 7,405 * A * B - 0,0401667 * A * C + 41,9233 * B^2 + 0,837167 * B * C + 0,00189815 * C^2$$

En la Figura 2 se muestra la influencia de las tres variables independientes, siendo la más influyente la concentración de sulfato de amonio y la menos influyente es la aireación, pero la interacción de la concentración de sulfato de amonio y la aireación mejora el rendimiento de etanol.

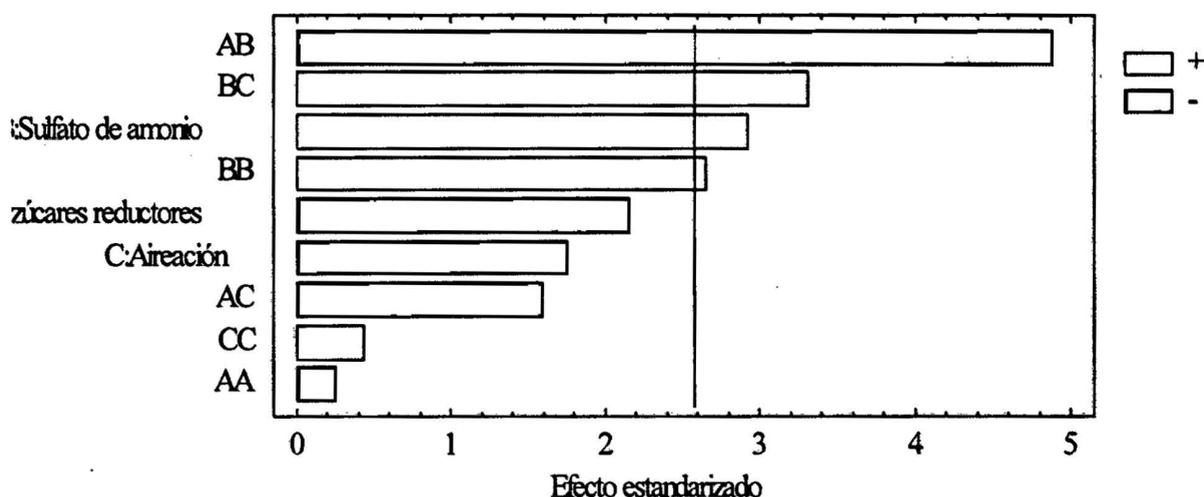


Figura 2. Diagrama de Pareto estandarizado para rendimiento de etanol. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 13. Parámetros óptimos para rendimiento de etanol con los cuales se obtiene 120,457 mL.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Azúcares reductores	15,0	25,0	15,0
Sulfato de amonio	0,50	1,50	1,4949
Aireación	30,0	90,0	90,0

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 3 se muestra la concentración de azúcares reductores (g/L sustrato) versus la concentración de sulfato de amonio (g/L sustrato) a una aireación constante de 90 minutos para obtener el máximo rendimiento de etanol (mL).

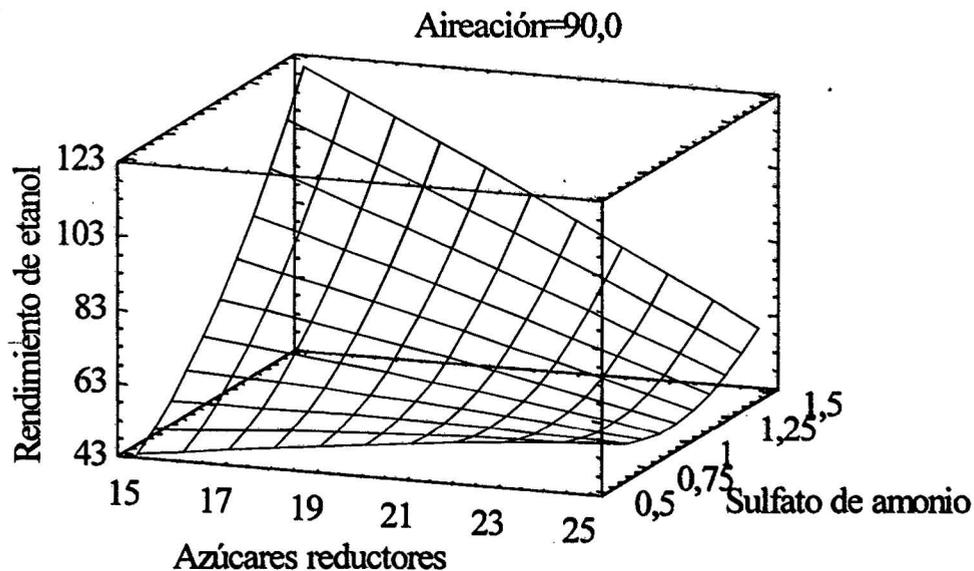


Figura 3. Representación gráfica para rendimiento de etanol optimizado bajo un modelo de superficie de respuesta. Elaboración propia

En la Figura 4 se muestra el punto de máximo rendimiento de etanol lo cual se obtiene con el valor bajo de azúcares reductores y con el valor alto de sulfato de amonio a una aireación constante por 90 minutos. Esto tiene relación con lo presentado en la Tabla 13.

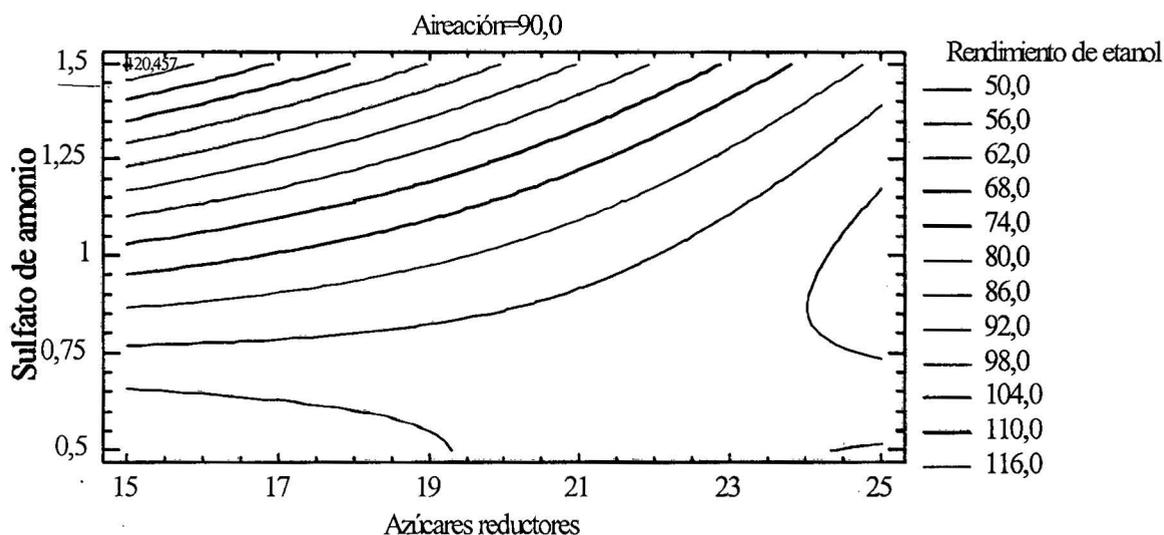


Figura 4. Representación gráfica para el rendimiento de etanol bajo un modelo de contorno de superficie de respuesta. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 14. Parámetros óptimos para producir etanol a partir de mucílago de café (*Coffea arabica*).

Parámetros del proceso de fermentación	
Volumen del mosto inicial (L)	3,0
pH	4,5
Sulfato de amonio (g/L)	1,5
Azúcares reductores (g/L)	15,0
Inocular 0,5% v/v (cél. Lev./mL)	10 <sup>6</sup>
Aireación a 0,333 vvm (minutos)	90
Temperatura ambiente (°C)	18-20
Tiempo (horas)	96,0
Volumen de etanol a obtener (mL)	361,37
Rendimiento de etanol (%)	12,05

Fuente: Elaboración propia

Tabla 15. Características del etanol rectificado.

Características	Resultados	INDECOPI
pH	5,8	Neutro
Temperatura (°C)	20	20
Densidad (g/L)	0,8251	0,8082
Grado alcohólico	88	94

Fuente: Elaboración propia

#### IV. DISCUSIÓN

En la presente investigación, el máximo rendimiento fue de 113,5 mL etanol de 20 °GL/L de mucílago de café y se ha obtenido con los valores de las variables del experimento 11: 60 minutos de aireación a 0,333 vvm, 1,5 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  por litro de mucílago de café y 15,0 g de azúcares reductores por litro de mucílago de café. Barrena *et al.* (2010), obtuvieron un máximo rendimiento de aguardiente de 350 mL de 20 °GL/L de guarapo con los siguientes valores de las variables: 2 horas de aireación a 0,333 vvm, 0,5 gramos de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  por litro de jugo de caña de azúcar y 3,0 gramos de azúcares reductores por litro de jugo de caña de azúcar (contenido promedio del jugo de caña de azúcar recién extraído). Tabaco & Tejada (2012), obtuvieron un máximo rendimiento de 367 mL de aguardiente de 20 °GL/L de guarapo con los siguientes valores de las variables: 1 hora de aireación a 0,45 vvm, 1,0 gramo de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  por litro de jugo de caña de azúcar y 9,0 gramos de azúcares reductores por litro de jugo de caña de azúcar. Carrión & Huamán (2008), determinaron los parámetros óptimos para la obtención de etanol a partir de la fermentación del almidón de papa (*Solanum tuberosum*) Yungay, usando *Saccharomyces cerevisiae* MIT L-51: 20% p/v de azúcares reductores, 0,18 g de sulfato de amonio/L de sustrato y un tiempo de 72 horas de fermentación a 33 °C, dando un rendimiento de 94,67 g de etanol/L de sustrato. Con el cual se demuestra que materias primas diferentes tienen comportamientos diferentes durante la fermentación con cantidades variables de sulfato de amonio y azúcares reductores, además que también influye la temperatura del proceso de fermentación.

En el presente trabajo de investigación se obtuvo un rendimiento de 113,5 mL de etanol/L mucílago de café (106,07 mL etanol/Kg de mucílago de café). Rodríguez (2007), empleando como materia prima los subproductos del café, obtuvo como resultado 58,37 mL de etanol/Kg de mucílago fresco. Cuando se obtiene el mucílago fresco tiene una densidad alta, con alta viscosidad que hace un medio no apropiado para el crecimiento de las levaduras. Mientras que otros recomiendan que se utilice mucílago puro para obtener mejores resultados. Con esta investigación es lo contrario, porque el tiempo que transcurre entre la recolección de la cereza y el despulpado va a permitir que la presencia de azúcares reductores se incremente y si se le guarda para el siguiente día es aún mayor, es por eso que para obtener mayor

rendimiento se debe trabajar con 15 g de azúcares reductores por litro de mucílago (hacer dilución con agua destilada estéril) que puede ser el máximo permitido, el trabajar con mayor concentración de azúcares reductores conlleva a que gran parte se transforme en biomasa y se produzca etanol en mínima cantidad.

Calle (1977), en CENICAFE estudiaron las condiciones para la obtención de alcohol a partir de la pulpa y mucílago de café y por fermentación alcohólica se pueden obtener en promedio 1,2 L de alcohol etílico de 85°/100 Kg de café cereza. En nuestra investigación se trabajó solamente con mucílago fresco (con dilución) y se obtuvo 0,22 L de etanol de 88°/100 Kg de café cereza. Estos resultados obtenidos son relativamente bajos respecto a los obtenidos en CENICAFE, ya que trabajaron con pulpa y mucílago, que juntos representan una mayor fracción y contienen mayor cantidad de azúcares totales.

Cabrera *et al.* (1987), reportan que se puede obtener entre 2 a 2,5 g de etanol en 48 horas, cuando la fermentación se realiza a 28°C, a partir de 200 gramos de cerezas frescas. Igualmente reportan mejorías en los rendimientos del proceso en un 20%, en 48 horas, cuando realizaron un pretratamiento con una bacteria pectinolítica como *Erwinia herbicola* en asociación con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En la presente investigación se obtuvo 3,38 g de etanol de 20 °GL en 96 horas, cuando la fermentación se realizó a temperatura ambiente (18-20 °C), a partir de 59,52 g de mucílago de café fresco diluido. Esto nos da a entender que a una temperatura mayor a la del ambiente las levaduras trabajan mejor pero si la asociamos a un suplemento de sulfato de amonio y aire al inicio la producción de etanol se incrementa.

En la presente investigación se obtuvo 2,25 mL de etanol (0,8251 g/mL) de 150 mL de sustrato fermentado (rendimiento 1,50 %). Gómez & Nicolás (2006), obtuvieron 2,30 mL de etanol (0,826 g/mL) de 150 mL de muestra fermentada (mucílago de Coopedota con mayor rendimiento de 1,53 %), sin pasteurizar (proceso de fermentación con las propias levaduras del mucílago, a T° ambiente). En un tiempo de fermentación de 96 horas a temperatura ambiente (18-20 °C) se obtiene un menor rendimiento de etanol pero con mayor grado alcohólico el cual se concentra durante el tiempo de fermentación.

El procesamiento de los datos experimentales con el software Statgraphics permite predecir que se puede obtener 120,457 mL de etanol de 20 °GL/L de mucílago de café con los siguientes valores de las variables: 90 minutos de aireación a 0,333 vvm, 1,4949 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  por L de mucílago de café y 15,0 g de azúcares reductores /L de mucílago de café. El rendimiento predicho es ligeramente mayor al obtenido en el experimento 11, con la diferencia que el resultado del software indica que se debe airear más tiempo para incrementar el rendimiento de etanol en 6,13 %.

Según los parámetros óptimos para rendimiento de etanol (Tabla 13), se deduce de manera general que la mayor concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  es la que permite mayor rendimiento de etanol y la concentración de azúcares reductores es influyente en el rendimiento de etanol pero de manera negativa. Mientras que el tiempo de aireación es menos influyente para el rendimiento de etanol tal como se muestra en el análisis de varianza (Tabla 11) y en la Figura 2 del diagrama de Pareto estandarizado. Sin embargo la interacción de la concentración de sulfato de amonio con la aireación, manteniendo constante la concentración de azúcares reductores, mejora el rendimiento de etanol (experimentos 9 y 11, 3 y 4). La mayor concentración de sulfato de amonio en los experimentos 11 y 4, contribuye a la mayor producción de biomasa que favorecerá la conversión de los azúcares reductores en etanol.

En la Tabla 11 del análisis de varianza, particiona la variabilidad de rendimiento de etanol en piezas separadas para cada uno de los efectos, entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando el cuadrado medio contra el estimado del error experimental, existe 4 efectos que tienen un p-valor menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

Conforme avanza la fermentación la densidad disminuye, el contenido de azúcares reductores aumenta porque se está hidrolizando la sacarosa presente en el mucílago y luego en el cuarto día desciende; los °Brix disminuyen porque durante la bioconversión de los azúcares reductores en etanol realizado por las levaduras también se produce  $\text{CO}_2$  gaseoso que sale del sustrato en fermentación, perdiéndose masa, estos datos están reportados en la Tabla 8.



Según Puerta (2012), en la fermentación de sustrato sólido, el café despulpado contiene entre 5 y 9 millones de microorganismos por cada mililitro de mucílago, conformados por 35% de levaduras, 26% de *Lactobacillus*, 20% de *Enterobacteriaceae* y 19% de *Streptococcus* y otros aerobios. Mientras que en una fermentación sumergida con 50% de agua, el recuento inicial oscila entre 1,5 y 4,9 millones de colonias compuestas de 40% de levaduras, 25% de *Lactobacillus*, 20% de *Enterobacteriaceae* y 15% de *Streptococcus* y otros aerobios. En la investigación realizada se inoculó con 1 millón de células de levaduras ( $10^6$ ), que representa casi la mitad de lo que existe en el mucílago sin pasteurizar, lo que contribuirá para reducir el tiempo de fermentación e incrementar el rendimiento de etanol.

Gómez & Nicolás (2006), el mucílago diluido afecta proporcionalmente la densidad, grados Brix y porcentaje del etanol. Con la investigación hecha es lo contrario por que se obtuvo el mayor rendimiento con la mayor dilución hecha (se bajo de 28 a 15 g de azúcares reductores/L de mucílago). Pero es necesario también que se realice una mezcla en proporciones iguales entre el mucílago presente en la pulpa (obtenido el mismo día de cosecha y despulpado del café que tiene alrededor de 28 g de azúcares reductores/L de mucílago) y el mucílago adherido a la pepa (obtenido el día siguiente, después del proceso de fermentación del café durante el lavado, que tiene alrededor de 12 g de azúcares reductores/L de mucílago), pasteurizados previamente.

## V. CONCLUSIONES

1. El máximo rendimiento fue de 113,5 mL de etanol de 20 °GL/L de sustrato (mucílago de café), con los siguientes valores de las variables: 60,0 minutos de aireación a 0,333 vvm, 1,5 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  por litro de sustrato y 15,0 g de azúcares reductores por litro de sustrato.
2. A mayor concentración de sulfato de amonio y menor concentración de azúcares reductores se obtiene mayor rendimiento de etanol.
3. Un tiempo de aireación de 60,0 minutos (0,333 vvm), permitió obtener un mayor rendimiento de etanol.
4. El tiempo de aireación es la variable menos influyente, pero en interacción con la concentración de sulfato de amonio, ambos son altamente influyentes en el rendimiento de etanol puesto que lo incrementan.
5. El sulfato de amonio es una variable de influencia positiva en el rendimiento de etanol.
6. La interacción de la concentración azúcares reductores y el tiempo de aireación son altamente influyentes en la reducción del rendimiento de etanol.
7. El mucílago obtenido el mismo día de cosecha y despulpado tiene mayor concentración de azúcares reductores y más °Brix, respecto al mucílago obtenido el día siguiente.

## VI. RECOMENDACIONES

- Recolectar el mucílago presente en la pulpa durante el proceso de despulpado, porque contiene mayores valores de azúcares reductores y °Brix.
- Pasteurizar el mucílago, para inocular con levaduras selectas y activadas.
- Para tener un mayor rendimiento de etanol se debe trabajar con lo siguiente:
  - Bajar el pH del mucilago a 4,5 con HCl concentrado.
  - Realizar una dilución con agua hasta una concentración de 15 g de azúcares reductores por litro de mucílago.
  - Suplementar al sustrato con 1,5 gramos de sulfato de amonio por cada litro.
  - Adicionar al sustrato acidificado 0,5% (v/v) de inóculo de *Saccharomyces cereviceae* que contiene  $10^6$  células de levadura/mL.
  - Recolectar el mucílago restante que está adherido a la pepa del café, al día siguiente, después del proceso de fermentación del café durante el lavado, que contiene valores bajos de azúcares reductores y °Brix, para emplearlo como diluyente en vez de agua.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Barrena Gurbillón, M.A., O.A Gamarra T. y J.L Maicelo Q. 2010. Estandarización de la producción de aguardiente en la Región Amazonas. Investigaciones Amazonenses. Revista Oficial de Investigación Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas. Volumen 5 – N° 1 enero – julio 2011.
- Brock, T.D. & Madigan M.T. 1993. Microbiología. 6ta. Edic. Edit. Prentice Hall Hispanoamericana S. A. México.
- Calle, H. 1977. Subproductos del café. (Boletín Técnico N° 6), 84 p, Chinchiná, CENICAFE, Colombia. Recuperado el 19 de Febrero de 2013, de <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/acodal/xxx.pdf>.
- Carrión, A.N. & Huamán, C. K. 2008. Determinación de los parámetros para obtener etanol por fermentación del almidón de papa (*Solanum tuberosum*) variedad Yungay, de la localidad de Levanto, Región Amazonas. Tesis para obtener el Título de Ingeniero Agroindustrial. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza- Amazonas. Perú.
- Cueva P. H. & Huayama S. P. M. 2007. Elaboración de bebida alcohólica a partir de jugo de naranja criolla (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) suplementado con panela y sulfato de amonio, fermentado con *Saccharomyces cerevisiae* MIT L-51. Tesis para obtener el Título de Ingeniero Agroindustrial. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza- Amazonas. Perú.
- Gómez, D. L & Nicolás, M. J. A. 2006. Producción de alcohol etílico a partir de mucílago de café, Trabajo de graduación Lic. Ing. Agrónomo. Guácimo, Costa Rica. Recuperado el 03 de enero de 2014, de <http://usi.earth.ac.cr/glas/sp/dpg/31-06.pdf>.
- González, E. 1982. Temas selectos sobre el aprovechamiento de los residuos del beneficiado húmedo del café. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. (Informe Técnico para optar el título de Ingeniero Bioquímico). 132 p. México, D. F.

- González, W.J. 1998. Estudio de prefactibilidad para instalar en Costa Rica una planta de producción de ETBE. Proyecto de graduación Lic. Ing. Química. San José, Costa Rica. 272 p.
- Guillaume G. 2004. Bases científicas y tecnológicas de la enología. 1ra Ed. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza-España.
- Hernández, M.T. 2007. Tendencias actuales en la producción de bioetanol. Boletín Electrónico No. 08. Facultad de Ingeniería - Universidad Rafael Landívar. Cuba.
- Hernando A. Valencia Z. 2004. Manual de prácticas de microbiología básica. 1ra Ed. Editorial Unibiblos. Bogotá-Colombia.
- Información estadística de los principales productos de la Región Amazonas, Dirección Agraria Amazonas. 2013.
- Jackson R. 2008. Wine Science: Principles and Applications. 3ra ed. San Diego, USA: Academic Press, p. 1-14, 332-417. Recuperado el 03 de enero de 2014, de <http://memorias.utpl.edu.ec/sites/default/files/documentacion/intingali2008/papers/utpl-congreso-ingenieria-alimentos-2008-fluctuacion-densidad-vino-tinto.pdf>.
- Madigan, M.T.; J.M.Martinko & J. Parker. 1999. Biología de los Microorganismos. 8<sup>va</sup> Edic. Edit. Prentice Hall, Inc. Madrid – España.
- Mc Daniel, L. E. 1976. Application of response surface optimization techniques to polyene macrolide fermentation studies in shake flask. Dev. Ind. Microbiology.
- Montgomery. 2003. Diseño y análisis de experimentos. 2da. Edic. New York: Chichester. p, 459-471.
- Puerta Quintero, G. I. 2012. Factores, procesos y controles en la fermentación del café. CENICAFE, Manizales, Caldas-Colombia. Recuperado el 02 de enero del 2014 de <http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/327/1/avt0422.pdf>.

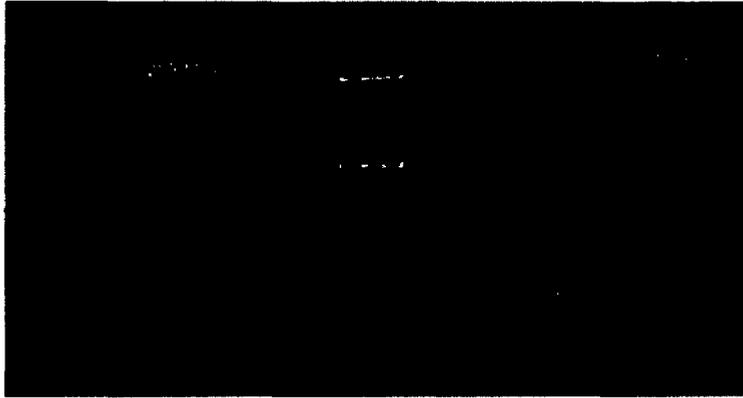
Rodríguez, N. 2007. Producción de alcohol carburante a partir de los sub-productos de café. Informe Anual de Actividades, Octubre de 2006 a Septiembre de 2007, CENICAFE, Chinchiná-Caldas. 37-50 P. Colombia. Recuperado el 03 de Abril de 2013, de <http://www.cenicafe.org/es/publications/avt0393.pdf>.

Tabaco, T. N. & Tejada, CH. E. 2012. Influencia del tiempo de aireación, concentración de azúcares reductores y sulfato de amonio sobre el rendimiento de aguardiente de 20 °Gay Lussac. Tesis para obtener el Título de Ingeniero Agroindustrial. Facultad de Ingeniería y Ciencias agrarias. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza - Amazonas. Perú.

## ANEXOS

### ANEXO 1

#### Conteo de células de levadura en el inóculo con cámara de Neubauer



Fotografía 1. Cámara de Neubauer.

Para el conteo de células de levadura se procedió según el Manual de Prácticas de Microbiología Básica de Hernando Valencia, (2004).

#### **Procedimiento:**

1. Se tomó la cámara y se fijó sobre ella la laminilla.
2. Con una pipeta Pasteur se tomó la muestra de la dilución del cultivo a examinar.
3. Se depositó suavemente el líquido al borde de la laminilla (o en la ranura dispuesta) y cargue por capilaridad el volumen exacto requerido.
4. Se enfocó a menor aumento. Se ajustó la intensidad luminosa para observar tanto las células como las líneas de la cámara. Luego se pasó al objetivo de 40x.
5. Se contó los cuadrados de las esquinas (subdividido en 16 cuadrados secundarios) y el central, cuyo volumen es de  $0,1 \text{ mm}^3$ .

Se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Número de células}}{\text{mL o cm}^3} = \frac{(A_1 + A_3 + C_1 + C_3 + B_2) / 5}{\text{Factor de dilución} \times 10^{-4} \text{ cm}^3}$$

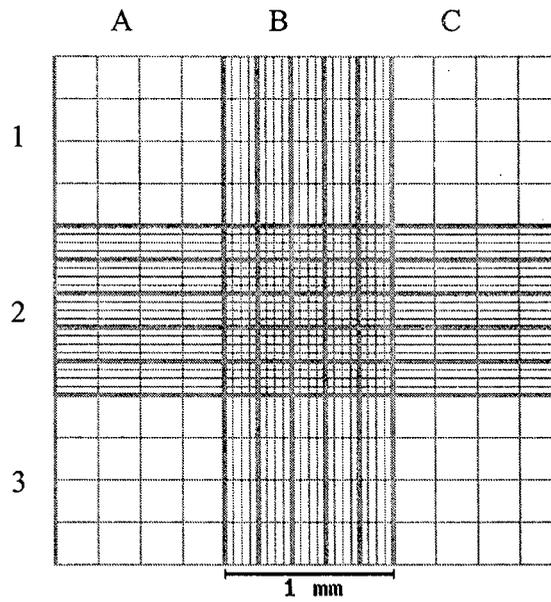


Figura5. Esquema de la cuadrícula de una cámara de Neubauer.

$$\frac{\text{Número de células}}{\text{mL}} = \frac{(16+10+8+12+16)/5}{10^{-2} \times 10^{-4}} = 1,24 \times 10^7 \text{ células levadura en el inóculo}$$

## ANEXO 2

### Determinación de azúcares reductores con en el método de Lane y Eynon

#### Composición de las soluciones necesarias

Fehling A:  $\text{CuSO}_4 = 34,65$  g para 1 L

Fehling B: tartrato de sodio y potasio = 34,65 g y hidróxido de sodio = 50,00 g; para 1 L.

#### Contenido de azúcares reductores

Los carbohidratos cuyas moléculas contienen un grupo aldehído libre, se denominan reductores. Se utilizó la metodología de Lane y Eynon (Amaga y Altamirano, 1999) para determinar la cantidad de azúcares reductores. El método de basa en que los azúcares que tienen carácter reductor, reducen las sales de cobre a óxido cuproso ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) en solución alcalina.



#### Valoración del reactivo de Fehling

Se llenó la bureta de 50 mL con una solución de glucosa al 0,5% (p/v), después se depositó en un matraz Erlenmeyer 5 ml de Fehling A ( $\text{CuSO}_4 = 34,65$  g para 1 L) y 5 mL de Fehling B ( tartrato de sodio y potasio = 34,65 g y hidróxido de sodio = 50,00 g; para 1 L), luego se agregó a este matraz 4 gotas de azul de metileno al 1 % (p/v) (indicador) y se calentó con un mechero de alcohol hasta ebullición. En seguida se valoró el reactivo de Fehling, manteniendo la ebullición, con la solución de glucosa al 0,5%. Se finalizó la valoración cuando el sulfato cúprico se redujo totalmente, lo cual se comprobó por el cambio de color azul a un precipitado rojo ladrillo, anotándose el volumen de gasto (11,2 mL) de la solución de glucosa al 0,5%.

### Equivalencia en glucosa del reactivo de Fehling

Se determinó la equivalencia del reactivo de Fehling con el consumo de solución de glucosa (11,2 mL) en la valoración:

Solución de glucosa al 0,5 % equivale a decir 0,5 g de glucosa contenidos en 100 mL de esta solución.

$$11,2 \text{ ml de solución de glucosa consumidos} = 0,056 \text{ g de glucosa}$$

Entonces: 10 mL de Fehling A y B = 0,056 g de glucosa.

### Determinación de azúcares reductores

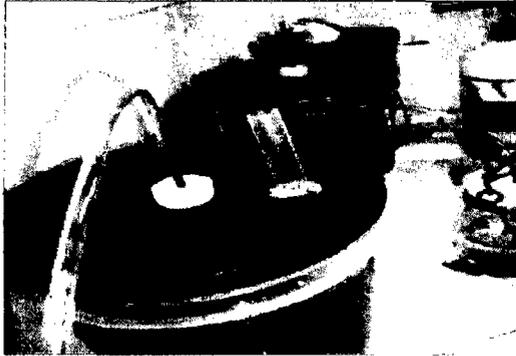
Se llenó la bureta de 50 mL con mucílago de café filtrado. En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se depositó 5mL de Fehling A y 5 mL de Fehling B, en seguida se agitó para homogenizar la mezcla, luego se agregó a este matraz 4 gotas de azul de metileno al 1% (p/v) (indicador) el cual dio un color azul intenso. Se calentó el matraz con un mechero de alcohol hasta ebullición. A continuación, se dejó caer de la bureta el mucílago de café filtrado en goteo rápido manteniendo la ebullición. Se finalizó la titulación cuando el reactivo de Fehling cambió de color azul a un precipitado rojo ladrillo, anotándose el volumen del mucílago de café filtrado gastado (2,1mL) en la titulación.

Determinación de g glucosa/L de mucílago de café:

$$\frac{0,056 \text{ g glucosa}}{10 \text{ mL Fehling}} \times \frac{10 \text{ mL Fehling}}{2,10 \text{ mL}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 28 \text{ g glucosa/L mucílago de café}$$

### ANEXO 3

#### Biorreactores con inyección de aire y sustrato en fermentación y su diseño

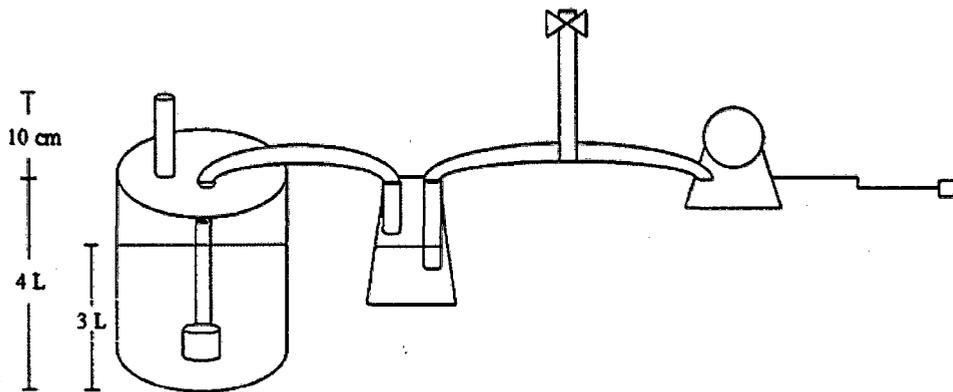


Fotografía 2. Inyección de aire a los Biorreactores



Fotografía 3. Biorreactores con sustrato en fermentación

Figura 6. Diseño del sistema utilizado en el trabajo de fermentación



## ANEXO 4

**Descripción de cada una de las etapas del proceso para obtener etanol a partir de mucílago de café.**

### **Materia prima**

Se utilizó una malla racshell para exprimir manualmente el mucílago presente en la pulpa del café. También se empleó un equipo multifuncional con el que cuentan en la finca para extraer la mayor cantidad de mucílago, más rápido y completar el volumen requerido.

### **Pasterización**

Se realizó en el laboratorio de tecnología en una olla (50 L de capacidad) a una temperatura de 75 °C x 10 minutos, permitió eliminar los microorganismos presentes en el mucílago y obtener un medio estéril para la inoculación del medio de cultivo (levaduras activadas).

### **Enfriado**

Se enfrió a temperatura ambiente en la misma olla donde se realizó el pasteurizado.

### **Evaluación preliminar**

Consistió en evaluar algunas propiedades fisicoquímicas de interés en el trabajo de investigación como:

- °Brix: se midió con un refractómetro
- Densidad: se midió en una fiola el volumen y en una balanza digital el peso.
- pH: se midió con un equipo de medición de pH (pH metro).
- Azúcares reductores (AR): se midió con el método de Lane y Eynon.

### **Corrección de parámetros**

Consistió en corregir el pH y la concentración de azúcares reductores

- pH: se corrigió con ácido clorhídrico concentrado 12N, se agregó 32,14 g de HCl a 32,14 L de mucílago de café puro para bajar un de 4,96 a 4,50 de pH.
- AR: se corrigió con agua destilada estéril utilizando la fórmula  $C1V1 = C2V2$

C: concentración

V: volumen

### **Preparación del sustrato**

En esta etapa se adicionó el sulfato de amonio según el diseño estadístico y se inoculó 0.5 % (v/v) de levadura activada con  $10^6$  células de levaduras/ mL de inóculo.

### **Al inicio de la fermentación**

Al inicio de la fermentación se adicionó aireación a temperatura ambiente, según el diseño estadístico de Box-Benhken.

### **Fermentación alcohólica**

Proceso en el que las levaduras van a consumir la glucosa presente en el sustrato y producto de su metabolismo se va a obtener el etanol. Este proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente en el Laboratorio de Ingeniería.

### **Destilación simple**

Se ensambló el equipo de destilación simple con la finalidad de separar el etanol de cada sustrato fermentado. La cual se controlaba que la temperatura fluctúe entre 78 a 80 °C.

### **Destilación fraccionada (rectificación)**

Se ensambló el equipo de destilación fraccionada, empleando un balón de 250 mL, un refrigerante en espiral y el condensado se recibió en un vaso de precipitado de 80 mL. Esta operación se realizó con la finalidad de obtener etanol de alta pureza, del tratamiento de mayor rendimiento. La cual se controlaba que la temperatura fluctúe entre 70 a 72 °C.

## ANEXO 5

### Determinación del grado alcohólico del etanol obtenido

Se determinó el peso específico del destilado usando el método del picnómetro. Se utilizó un picnómetro de 25mL de capacidad, se pesó el picnómetro en una balanza digital, luego se pesó el picnómetro con 2 mL de agua destilada; en seguida este mismo picnómetro se pesó con 2 ml de la muestra a analizar. Al peso obtenido del picnómetro con agua y con la muestra a analizar se le resto el peso del picnómetro vacío obteniéndose así de esta manera el peso del agua, así como también el peso de la muestra problema. Para luego determinar la gravedad específica (Ge) de este último:

$$Ge = (P_1 - P) / (P_2 - P)$$

Dónde:

P<sub>1</sub>= Peso del picnómetro con la muestra a 20°C

P<sub>2</sub>= Peso del picnómetro con agua a 20°C

P = Peso del picnómetro vacío

Determinación de la densidad (D) de la muestra problema

$$D = Ge \times d$$

Dónde:

d = densidad del agua a 20°C = 0,9982g/mL

$$Ge = (62,661 - 61,002) / (63,009 - 61,002) = 0,8266$$

$$D = 0,8266 \times 0,9982 \text{ g/mL} = 0,8251 \text{ g/mL: densidad de etanol}$$

Tabla 16: Determinación del porcentaje de etanol en una muestra.

% de etanol	% de agua	Densidad g/ mL
0	100	1,000
10	90	0,9836
20	80	0,9704
30	70	0,9555
40	60	0,9368
50	50	0,9155
60	40	0,8927
70	30	0,8692
80	20	0,8449
91	09	0,8181
95	05	0,8056
100	00	0,7907

## ANEXO 6

Gráficas de las variables independientes con cada uno de sus niveles

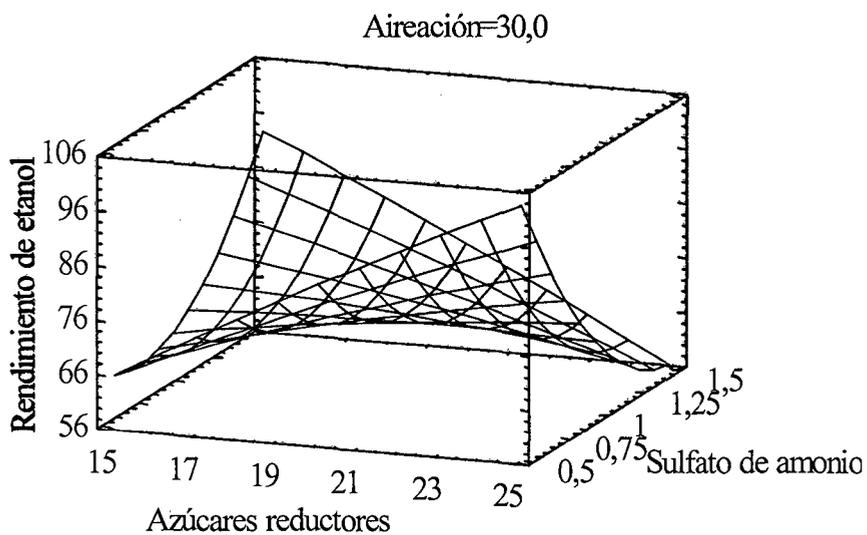


Figura 6. Concentración de azúcares reductores versus la concentración de sulfato de amonio a una aireación constante de 30 minutos.

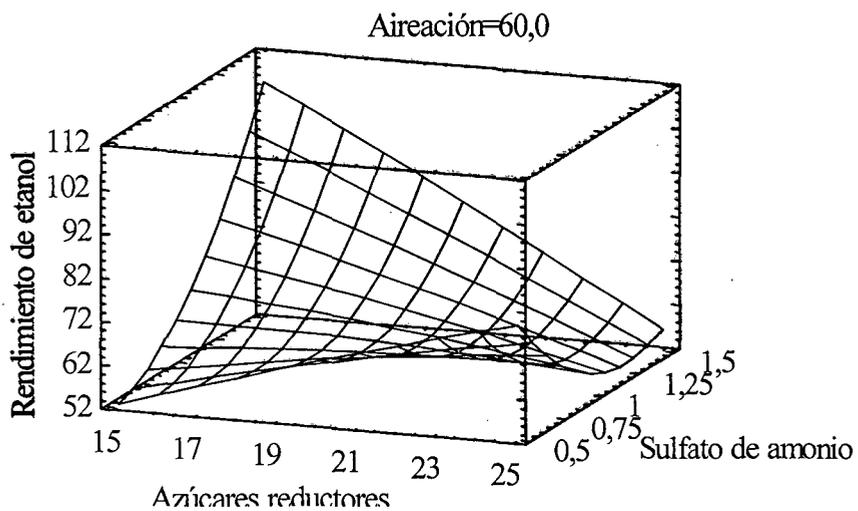


Figura 7. Concentración de azúcares reductores versus la concentración de sulfato de amonio a una aireación constante de 60 minutos.

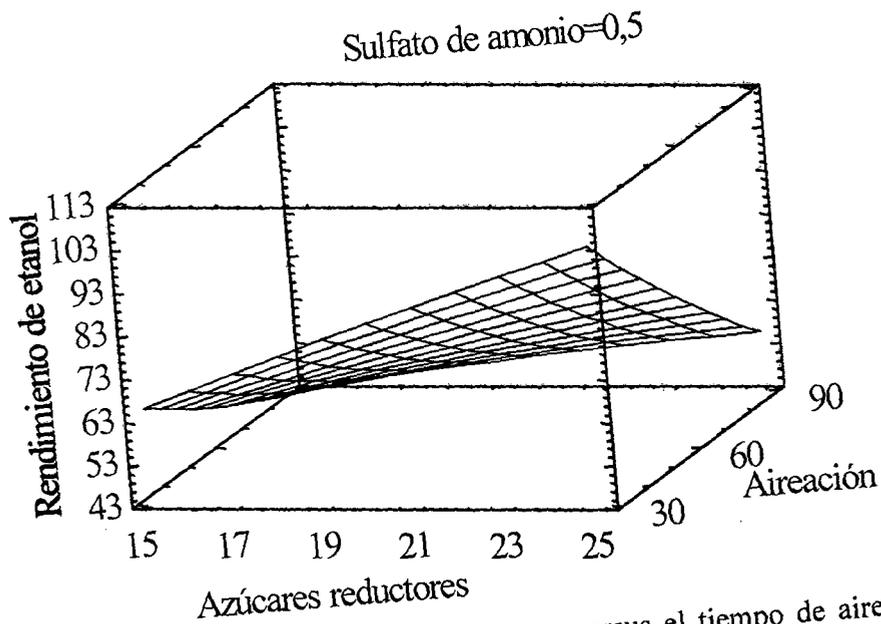


Figura 8. Concentración de azúcares reductores versus el tiempo de aireación con una concentración de sulfato de amonio de 0,5 g/L de sustrato, constante.

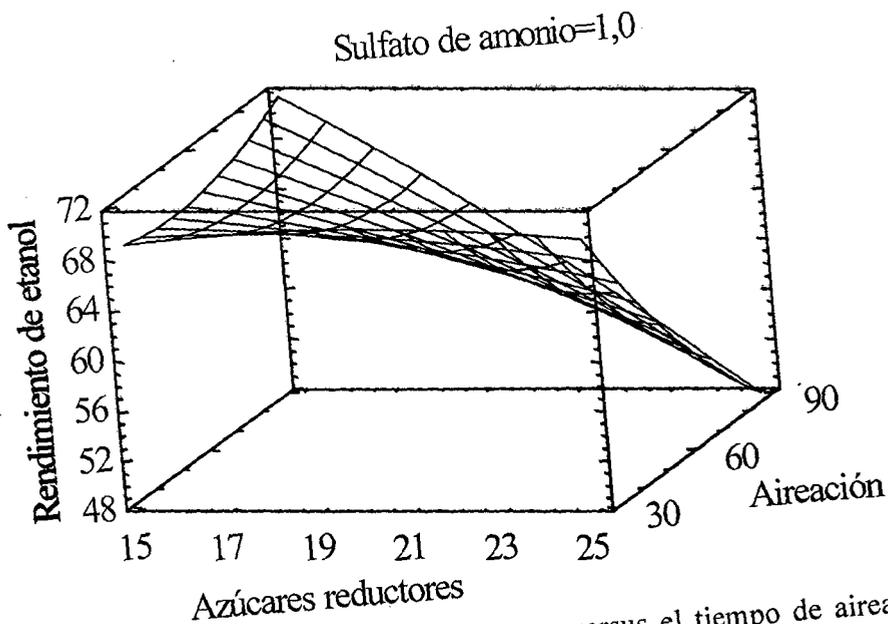


Figura 9. Concentración de azúcares reductores versus el tiempo de aireación con una concentración de sulfato de amonio de 1,0 g/L de sustrato, constante.

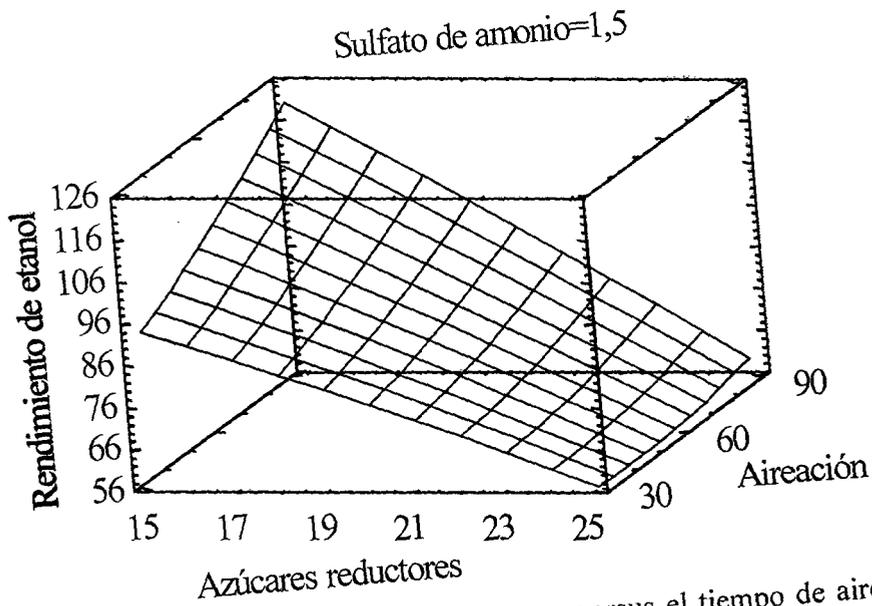


Figura 10. Concentración de azúcares reductores versus el tiempo de aireación con una concentración de sulfato de amonio de 1,5 g/L de sustrato, constante.

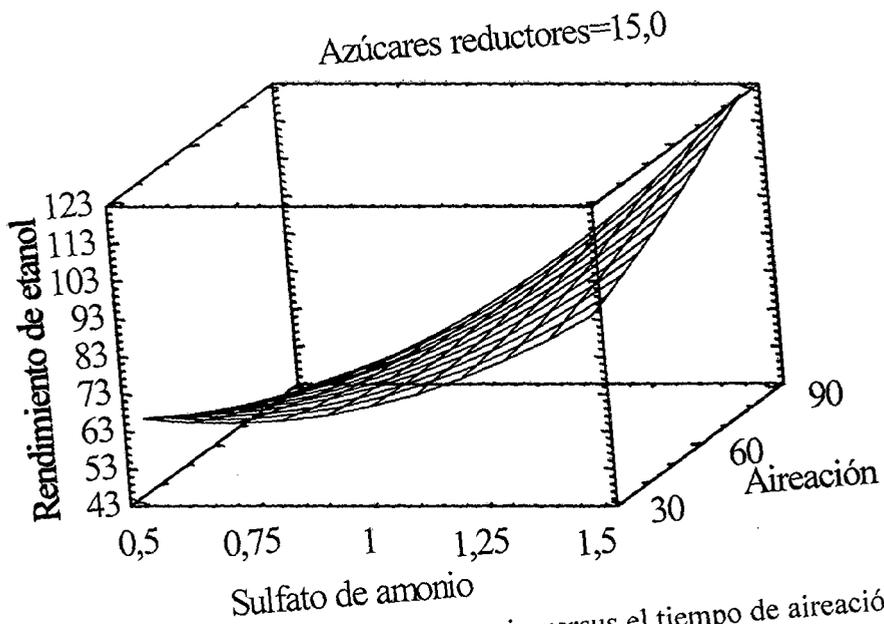


Figura 11. Concentración de sulfato de amonio versus el tiempo de aireación con una concentración de azúcares reductores de 15,0 g/L de sustrato, constante.

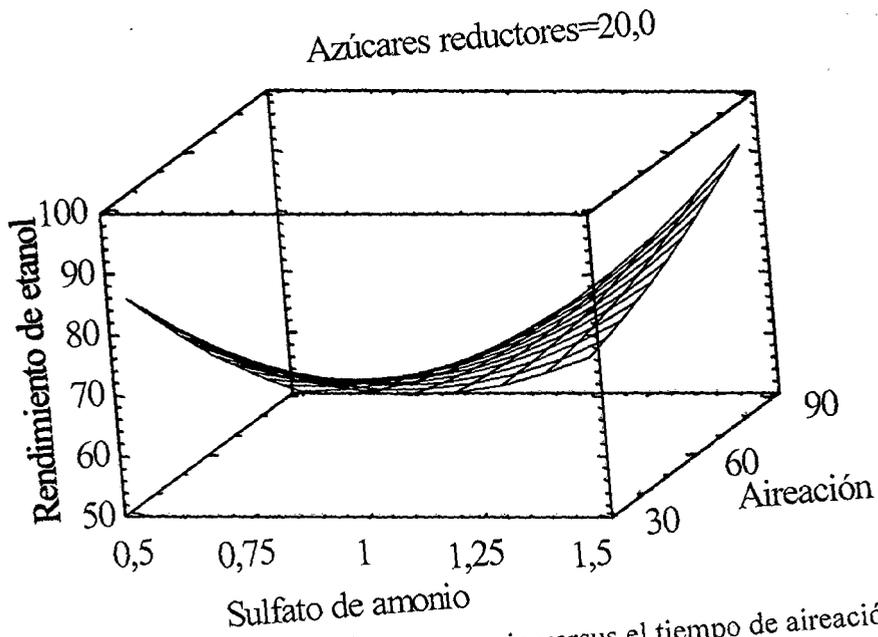


Figura 12. Concentración de sulfato de amonio versus el tiempo de aireación con una concentración de azúcares reductores de 20,0 g/L de sustrato, constante.

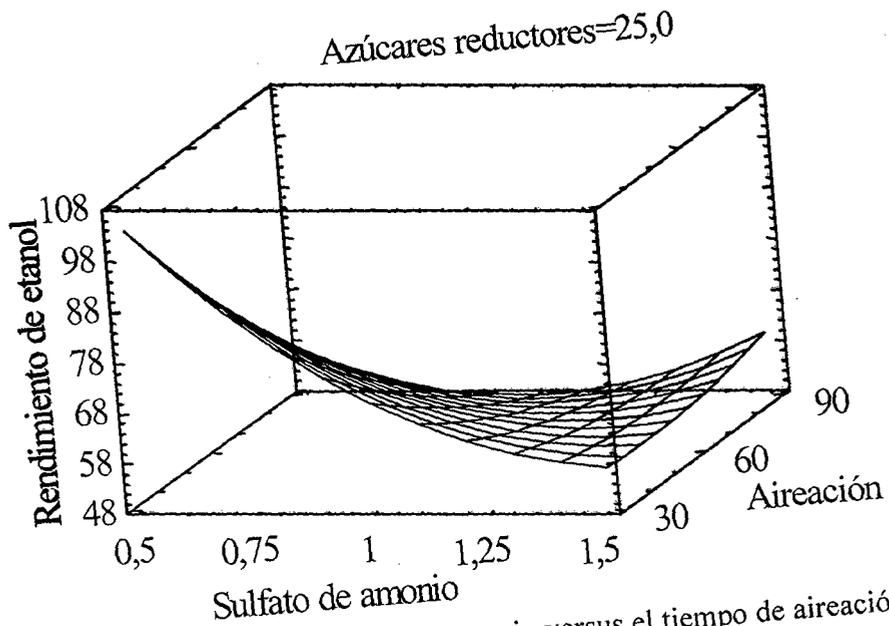


Figura 13. Concentración de sulfato de amonio versus el tiempo de aireación con una concentración de azúcares reductores de 25,0 g/L de sustrato, constante.

ANEXO 7



Parte lateral izquierda

Parte lateral derecha

Fotografía 4. Sistema de despulpado, desmucilaginado, seleccionado y lavado.



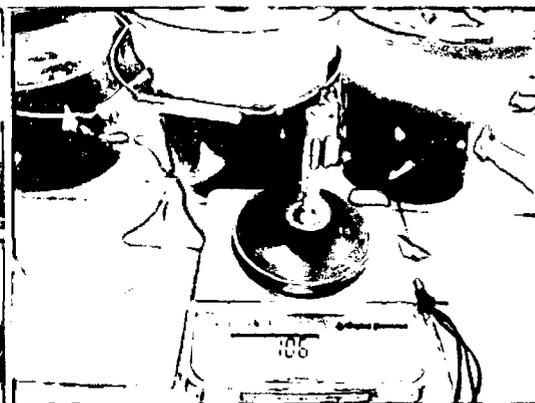
Fotografía 5. Obtención del mucilago



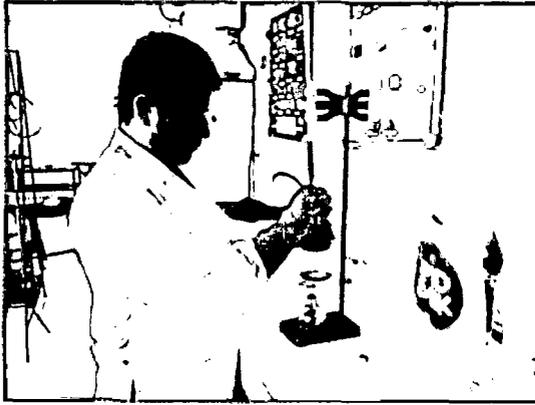
Fotografía 6. Mucilago obtenido



Fotografía 7. Pasteurizado del mucilago



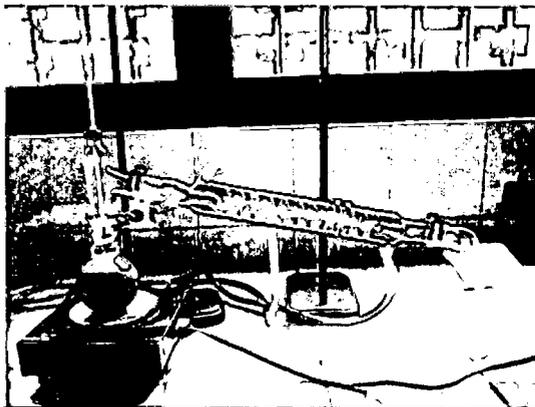
Fotografía 8. Densidad del sustrato



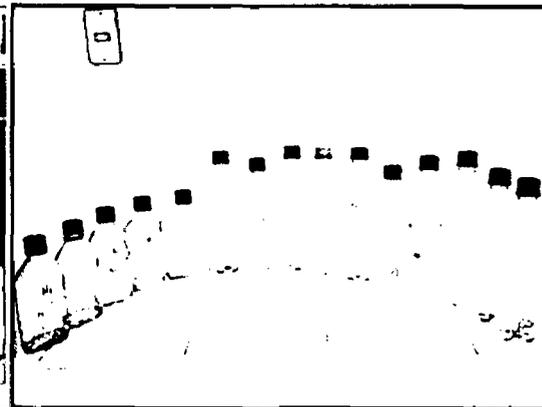
Fotografía 9. Determinación de azúcares reductores



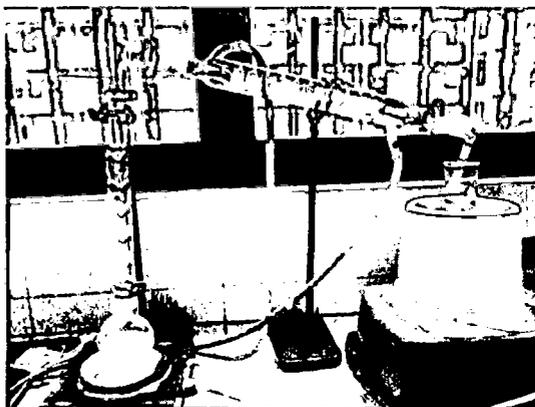
Fotografía 10. Conteo de células de levaduras



Fotografía 11. Destilación simple



Fotografía 12. Destilados de los 15 experimentos



Fotografía 13. Destilación fraccionada del experimento de mayor rendimiento

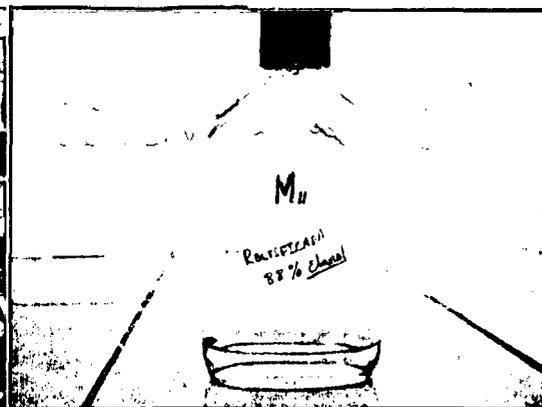


Figura 14. Destilado del experimento de mayor rendimiento