

Capítulo 16

Evaluación de tres pretratamientos por hidrólisis aprovechando residuos de café para la producción de bioetanol

Andrés Hernán Rosero Erazo¹
Cristian Fernando Delgado Coral²
Juan Carlos Narváez Burgos³

Cítese como: Rosero-Erazo, A. H., Delgado-Coral, C. F. y Narváez-Burgos, J. C. (2023). Evaluación de tres pretratamientos por hidrólisis aprovechando residuos de café para la producción de bioetanol. En F. C. Gómez-Meneses, L. M. Gómez y J. P. García-López (comps.), *Formación de competencias científicas desde la investigación y la academia* (pp. 181-200). Editorial UNIMAR. <https://doi.org/10.31948/editorialunimar.207.c346>

Resumen

Se usó tres tratamientos de hidrólisis para obtener bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos como la pulpa y el mucílago de café, obtenidos durante el despulpe y el proceso de beneficio de café. El residuo lignocelulósico se obtuvo de la vereda Yunguilla en el municipio de Samaniego, Nariño. Inicialmente, se hizo una caracterización fisicoquímica que continuó con tres diseños experimentales: el primero, la hidrólisis térmica usando dos factores: el tiempo (4 y 8 minutos) y, la temperatura (90 y 150 °C); el segundo, denominado hidrólisis ácida, evaluó dos factores: el tiempo (10 y 15 minutos) y, el ácido (nítrico y sulfúrico).

El tercer diseño de experimentos, denominado 'hidrólisis enzimática', evaluó dos factores: el tipo de enzima (amilasa y celulasa) y, el tiempo de incubación (8 y 24 horas). Para los tres diseños experimentales, las variables de respuesta fueron los azúcares totales, encontrando que estos permiten evaluar diferentes factores en la hidrólisis térmica, ácida y enzimática. De acuerdo con los resultados, la hidrólisis enzimática con tiempos de incubación de 24 horas y usando la enzima amilasa, logra aumentar la concentración de azúcares en 1744 mg/l.

Palabras clave: bioetanol; hidrólisis; ácido; enzima; café.

¹ Universidad Mariana, Programa de Ingeniería ambiental. Correo: andreshroero@umariana.edu.co

² Universidad Mariana, Programa de Ingeniería ambiental. Correo: crdelgado@umariana.edu.co

³ Universidad Mariana, Programa de Ingeniería ambiental. Correo: jcnarvaez@umariana.edu.co



Evaluation of three hydrolysis pretreatments using coffee waste for bioethanol production

Abstract

Three hydrolysis treatments were used to obtain bioethanol from lignocellulose residues such as coffee pulp and mucilage, obtained during the pulping and coffee milling process. The lignocellulose residue was obtained from the Yunguilla village in the municipality of Samaniego, Nariño. Initially, a physicochemical characterization was made and continued with three experimental designs: the first, thermal hydrolysis using two factors: time (4 and 8 minutes) and temperature (90 and 150 °C); the second, called acid hydrolysis, evaluated two factors: time (10 and 15 minutes) and acid (nitric and sulfuric).

The third experimental design, called 'enzymatic hydrolysis', evaluated two factors: the type of enzyme (amylase and cellulase) and the incubation time (8 and 24 hours). For the three experimental designs, the response variables were total sugars, finding that these allow the evaluation of different factors in thermal, acid, and enzymatic hydrolysis. According to the results, enzymatic hydrolysis with incubation times of 24 hours and using the enzyme amylase, manages to increase the concentration of sugars by 1744 mg/l.

Keywords: bioethanol; hydrolysis; acid; enzyme; coffee.

Avaliação de três pré-tratamentos de hidrólise usando resíduos de café para a produção de bioetanol

Resumo

Três tratamentos de hidrólise foram usados para obter bioetanol de resíduos lignocelulósicos, como polpa e mucilagem de café, obtidos durante o processo de despulpamento e moagem do café. O resíduo lignocelulósico foi obtido no vilarejo de Yunguilla, no município de Samaniego, Nariño. Inicialmente, foi feita uma caracterização físico-química, que prosseguiu com três delineamentos experimentais: 1) hidrólise térmica, usando dois fatores: tempo (4 e 8 minutos) e temperatura (90 e 150 °C); 2) denominado 'hidrólise ácida', avaliou dois fatores: tempo (10 e 15 minutos) e ácido (nítrico e sulfúrico).

O terceiro projeto experimental, denominado 'hidrólise enzimática', avaliou dois fatores: o tipo de enzima (amilase e celulase) e o tempo de incubação (8 e 24 horas). Para os três projetos experimentais, as variáveis de resposta foram os açúcares totais, o que permite a avaliação de diferentes fatores na hidrólise térmica, ácida e enzimática. De acordo com os resultados, a hidrólise enzimática com tempos de incubação de 24 horas e usando a enzima amilase, consegue aumentar a concentração de açúcares em 1.744 mg/l.

Palavras-chave: bioetanol; hidrólise; ácido; enzima; café.



Introducción

En la actualidad, Colombia sigue anclada económicamente a los combustibles fósiles ya que, según MásColombia (2022), la primera actividad económica son las exportaciones de combustibles fósiles y productos de las industrias extractivas, con un 54 % de participación. Cabe resaltar, como afirma Reyes (1999) que, los combustibles fósiles como el carbón, petróleo y gas natural generan grandes impactos y problemas ambientales; por esta razón, se busca un cambio para la reducción de los problemas ambientales ocasionados por la quema de combustibles fósiles que desencadenan contaminación atmosférica y cambio climático. Se apuesta, entonces, por una transición entre los combustibles fósiles por biocombustibles, haciendo uso de biomasa.

Las Naciones Unidas (UN, s.f.), en su reporte del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC, por sus siglas en inglés) sobre tendencias e impulsores de las emisiones indican que, la producción de combustibles fósiles debe disminuir aproximadamente un 6 % anual entre 2020 y 2030, lo que repercutiría en una disminución de los gases de efecto invernadero (GEI). Por lo anterior, se hace uso de biomasa lignocelulósica; es decir, residuos de café pulpa y mucílago, teniendo en cuenta la producción anual de café colombiano que cerró con 14.8 millones de sacos de 60 Kg, representando un 9 % más que en 2018 (Federación Nacional de Cafeteros, 2020). De otro lado, Fernández-Cortés et al. (2020) y Cerquera et al. (2022), en sus estudios sobre los impactos ambientales que causan los residuos de café, profundizan en cómo esta biomasa genera contaminación en las fuentes hídricas, además del deterioro o erosión de la fertilidad y humedad de los suelos durante toda la cadena productiva.

En este orden de ideas, se buscó utilizar los residuos lignocelulósicos a nivel local en la vereda de Yunguilla en el municipio de Samaniego, evaluando la producción de bioetanol a partir de tres pretratamientos, por hidrólisis térmica, ácida y enzimática de los residuos de café (pulpa y mucílago) en condiciones de laboratorio, logrando responder la pregunta de investigación sobre ¿Qué pretratamiento de hidrólisis permite un mejor acondicionamiento de los residuos de café pulpa y mucílago, para la producción de bioetanol de segunda generación?

Además, la presente investigación será un marco teórico y metodológico para futuras investigaciones en la Universidad Mariana o en la región, sobre los biocombustibles, enfocándose en evaluar diferentes pretratamientos que acondicionen la biomasa para llegar a la calidad establecida en la normatividad colombiana y, así mismo, mejorar significativamente la cantidad, dándole un carácter novedoso al estudio, ya que se está haciendo uso de residuos lignocelulósicos; igualmente, aporta con nuevas estrategias ambientales para la disminución de los impactos ambientales ocasionados por la inadecuada disposición final del residuo, contribuyendo con los caficultores en la solución de esta problemática.

Para acondicionar los residuos de café, se planteó tres diseños de experimentos de efectos fijos completamente aleatorizados, evaluando tres pretratamientos



denominados hidrólisis térmica, ácida y enzimática, encontrando como variables de respuesta, los azúcares totales y grados brix, que son utilizados en el proceso de fermentación alcohólica; sin embargo, los residuos lignocelulósicos como los residuos de café después del proceso de despulpado en la finca, inician procesos fermentativos que dificultan su manejo. El diseño de experimentos sobre el pretratamiento de los residuos para la obtención de bioetanol contribuye al control de la contaminación. Por otra parte; la importancia de la evaluación de los pretratamientos de hidrólisis térmica, ácida y enzimática logra aumentar la concentración de glucosa presente en el residuo, encontrando el mejor diseño de experimentos con la hidrólisis enzimática con tiempos de incubación de 24 horas con la enzima amilasa (EA-24h), logrando una concentración de azúcares totales de 1744.92 mg/l y en los grados brix de 6.55 °Brix.

Desarrollo

Formulación del problema

A lo largo de la historia y en busca de satisfacer sus necesidades, la humanidad ha utilizado diferentes combustibles fósiles como el carbón, petróleo y gas natural, como fuente de energía para ser usada en procesos de combustión que han ayudado a lograr una cocción de los alimentos y brindar protección en temperaturas bajas; estos combustibles han generado grandes impactos y problemas ambientales (Reyes, 1999); muchas autoridades legisladoras asumen que la sustitución de los combustibles fósiles por aquellos obtenidos a partir de biomasa, tendría unos efectos importantes y positivos sobre el cambio climático mediante la generación de unos niveles menores de GEI, causantes del calentamiento global.

Colombia es un país que depende de los combustibles fósiles, pues son la principal fuente de ingresos por sus exportaciones, como lo indica el Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE, 2021): en junio de 2021 las ventas externas del país aumentaron en un 33,1 % con relación a junio de 2020, debido principalmente al crecimiento de 56,3 % en las ventas externas del grupo de combustibles; por esta razón, se pretende reducir los problemas ambientales que deja la quema de combustibles fósiles, que generan contaminación atmosférica y cambio climático (Reyes, 1999).

Debido a la contaminación causada por los combustibles fósiles, se requiere implementar nuevas estrategias que disminuyan esta problemática ambiental, por lo cual se piensa en los residuos agrícolas o residuos lignocelulósicos que son generados en grandes cantidades, dado que son fuente de energía económica y renovable con menos emisiones de GEI (Hurtado, 2016), más aún cuando la producción anual de café en Colombia cerró en 2019 con 14.8 millones de sacos de 60 Kg, superando al año 2018 (Federación Nacional de Cafeteros, 2020), reconociendo que las grandes cantidades de residuo mucílago y pulpa de café no tienen una adecuada disposición y almacenamiento final durante el proceso de beneficio.



Fernández-Cortés et al. (2020), en su estudio sobre los impactos ambientales que causan los residuos de café indican que estos, al no tener una debida disposición final, generan contaminación en las fuentes hídricas; por consiguiente, se convierten en un grave problema ambiental que lleva al deterioro o erosión de la fertilidad y humedad de los suelos. Por su parte, Cerquera (2022) exterioriza que los residuos de café, durante todo el proceso de siembra, cultivo, cosecha, beneficio, tueste y producción final, llegan a afectar los recursos hídricos, suelos y, también, la atmósfera en las regiones donde se lleva a cabo estas prácticas agrícolas; por lo tanto, en Colombia se está incursionando con nuevas políticas y estrategias para la elaboración de nuevas energías limpias; es decir, más sostenibles; en este caso, iniciar una transición dejando atrás los combustibles fósiles y usar biocombustibles amigables con el medio ambiente (Cortés et al., 2011), dado que estos pueden ser producidos a base de biomasa; por ende, los residuos de café pulpa y mucílago serán transformados en biocombustible, pues solo necesitan diferentes tratamientos y procedimientos para convertirse en bioetanol.

Metodología

Primer objetivo: Analizar los parámetros fisicoquímicos de la composición del subproducto a aprovechar (pulpa y mucílago).

Para analizar los parámetros fisicoquímicos del residuo de café pulpa y mucílago, se hizo una revisión bibliográfica referente a la producción de café y medición de diferentes parámetros fisicoquímicos; luego, visitas a campo a las fincas caficultoras en la vereda Yunguilla en el municipio de Samaniego, recolectando información referente a la producción de café; posteriormente, se empezó la recolección de los residuos de café, llegando a recolectar en la primera visita 30 kg de residuo; se procedió a transportar el residuo en cadena de frío a 4 °C para no iniciar procesos de fermentación y, para finalizar, se desarrolló los análisis fisicoquímicos como: cenizas, humedad, grados brix, azúcares totales y lípidos en los laboratorios de Alvernia.

Segundo objetivo: Estandarizar el proceso de pretratamiento por hidrólisis térmica, ácida y enzimática de la pulpa y mucílago del café en la producción de bioetanol.

La estandarización de los procesos de pretratamiento por hidrólisis fueron hechos siguiendo diferentes actividades, empezando con una revisión bibliográfica de diferentes métodos utilizados en la hidrólisis, para generar guías de laboratorio y estandarizar los pretratamientos; de igual manera, una revisión bibliográfica para la fermentación y destilación; a continuación, se redujo el tamaño de la pulpa para iniciar los pretratamientos; luego se buscó las enzimas de amilasa y celulasa junto con los ácidos nítrico y sulfúrico, realizando los tres tipos de hidrólisis térmica, ácida y enzimática; consecutivamente, se inició con el diseño de experimentos (Tabla 1).



Tabla 1

Diseño de experimentos

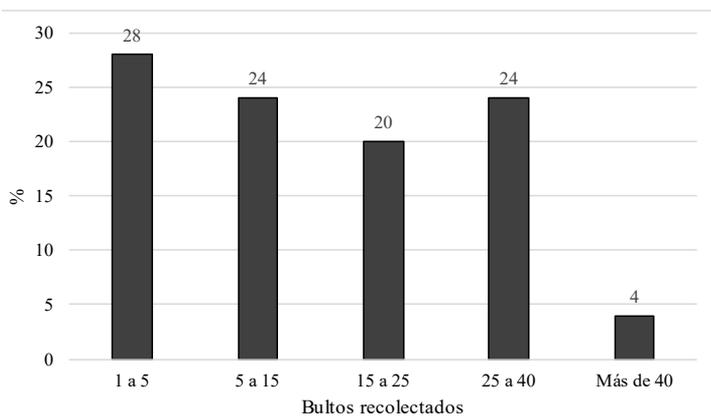
Diseño de experimentos	Tratamiento	Tiempo	N. Tratamiento	V.R	
Hidrólisis Térmica	T90	4min	T90 – 4min	24	
		8min	T90 – 8min		
	T150	4min	T150 – 4min		
		8min	T150 – 8min		
Hidrólisis Ácida	A.S	10min	A.S – 10min		24
		15min	A.S – 15min		
	A.N	10min	A.N - 10min		
		15min	A.N - 15min		
Hidrólisis Enzimática	E.C	8h	E.C - 8h	24	
		24h	E.C - 24h		
	E.A	8h	E.A - 8h		
		24h	E.A - 24h		
Café Control	C.C	Grados Brix	Azúcares total		12

Análisis de los parámetros fisicoquímicos de la composición del subproducto para aprovechar pulpa y mucílago

En el municipio de Samaniego, exactamente en la vereda de Yunguilla, según los datos encontrados en la Alcaldía del municipio, se ubicó a 178 familias que practican la caficultura; por ende, se hace uso de la ecuación para hallar la muestra, encontrando 25 familias caficultoras; sin embargo, la confiabilidad se redujo al 85 %, debido a que las áreas donde están las familias son extensas y, por cuestión de tiempo, se utilizó este nivel de confiabilidad. Según las respuestas de las familias caficultoras, se presenta a continuación el café recolectado en la vereda.

Figura 1

Café recolectado por las familias caficultoras en la vereda Yunguilla





En cuanto a la cantidad de bultos recolectados, el 28 % de las familias, al tener áreas pequeñas, logra recolectar entre uno y cinco bultos de café, continuando con el 24 % que recolecta entre cinco y 15 bultos; el 20 % entre 15 y 25 bultos; el 24 % entre 25 y 40 bultos y, tan solo el 4 %, más de 40 bultos, en un periodo de seis meses. Cabe mencionar que cada bulto tiene 62 Kg; es decir, las 25 familias caficultoras encuestadas logran recolectar alrededor de 406 bultos: 25 110 Kg de café cada seis meses; 50 220 Kg/año.

Sin embargo, esta cantidad puede variar debido a que en esta región de Nariño se realiza la recolección una vez al año, en la denominada 'gran cosecha', en los meses de mayo y junio. Por otro lado, están los denominados 'pepeos', que inician desde los meses de febrero y, la cantidad de café recolectado puede aumentar o disminuir. En el informe de la Federación Nacional de Cafeteros (2020) presentado en el 89 Congreso Nacional de Cafeteros, la producción nacional alcanzó 13.4 millones de sacos; por lo tanto, la cantidad de residuos generados puede ser aprovechada en compostaje, biocombustible, entre otros; pero, las malas prácticas ambientales y el porcentaje de café que no es utilizado pueden llegar a afectar el medio ambiente, como ya se ha mencionado.

De acuerdo con el beneficio que se le hace al café, como el tradicional o lavado, se utiliza cantidades de agua que pueden ser recirculadas o no, de acuerdo con las buenas prácticas ambientales de los caficultores. Ramírez et al. (2015) indican que los lixiviados son un problema, debido a la alta carga contaminante DQO: 110.000 ppm. kg-1, que se puede encontrar durante el proceso de beneficio.

Tabla 2

Resultados de los parámetros fisicoquímicos de la pulpa y mucílago de café

Descriptivos	Humedad (%)	Cenizas (%)	Lípidos (%)	Grados Brix (°Brix)	Azúcares Totales (mg/l)
Media	16.757	1.127	0.316	2.961	382.127
Error estándar	0.01	0.001	0.001	0.04	0.03
Mediana	16.749	1.127	0.316	2.982	382.135
Moda	16.710 ^a	1.120 ^a	0.316	2.809 ^a	382.030 ^a
Desv. Estandar	0.030	0.002	0.003	0.10	0.06
Varianza	0.001	0.001	0.001	0.010	0.004

En la Tabla 2 se presenta los parámetros medidos en los laboratorios de Alvernia de la Universidad Mariana. Se midió parámetros de humedad con un $16,76 \pm 0,03$ %, un error estándar de la media de 0.01, indicando el error de la media poblacional a partir de una muestra de datos con seis repeticiones; por otro lado, la varianza encontrada es de 0.001, que indica la dispersión de los datos respecto a la media encontrada, generando menor riesgo en el procedimiento de humedad.

Para el caso de la humedad, el valor promedio es de $16,76 \pm 0,03$ %. Vargas y Mazón (2004) utilizando una temperatura de 103°C y muestras de 5,00 g; el tiempo establecido fue de 2 h. Se estudiaron 3 lotes de pulpa de café cada uno con un



contenido de humedad diferente (bajo, intermedio y alto reportaron valores entre 17,4 y 17,8 % en base seca, muy cercanos a los hallados en la presente investigación en base seca, lo que indica que la cantidad de agua de los residuos de café es aproximadamente la tercera parte de la masa total. En cuanto al porcentaje de cenizas, la media encontrada es de 1.127 ± 0.001 % con un error estándar de 0.001. Valores muy cercanos a cero implican que los datos no presentan ruido; es decir, el procedimiento de las seis repeticiones en la determinación de cenizas es muy similar, además de generar confianza en el procedimiento y resultado.

Para finalizar la medición de parámetros, se tiene los azúcares totales, encontrando $382\ 127 \pm 0.06$ mg/l con un error estándar de la media de 0.03; entre estos están la glucosa, fructuosa, sacarosa, lactosa, entre otros, que son utilizados por bacterias para fermentarlos en alcoholes o ácido acético; no obstante, estos resultados pueden variar según el tiempo y la refrigeración del residuo.

Para la determinación de azúcares totales utilizando el método fenol-sulfúrico se ubica un valor de $382\ 127 \pm 0.06$ mg/l. Los factores que afectan a que se halle en mayor o menor concentración son: la variedad de café y, que la cereza esté en el punto óptimo de maduración, es decir, roja; para el caso de estudio, el café seleccionado fue la variedad caturra. Puerta y Riosa (2014) encontraron factores que afectan la concentración de azúcares totales, como es el caso de la fermentación, por lo cual, al no tener refrigeración, inician actividades microbianas que hacen uso de la glucosa presente en el residuo.

Procesos de pretratamiento por hidrólisis térmica, ácida y enzimática de la pulpa y mucílago del café en la producción de bioetanol

Para el desarrollo del segundo objetivo específico de la presente investigación se estandarizó los pretratamientos por hidrólisis térmica, ácida y enzimática, aprovechando los residuos de café pulpa y mucílago, donde las variables de respuesta son los azúcares totales; posteriormente se utilizó programas estadísticos para su análisis como SPSS, SIGMAPLOT y RSTUDIO.

Figura 2

Reducción de los residuos de café antes de ser molidos



En la reducción del tamaño de los residuos pulpa y mucílago de café se usó dos molinos eléctricos: uno de ellos es una licuadora y el otro, un molino industrial, buscando reducir al máximo el tamaño del residuo, ya que en los procedimientos de hidrólisis es más sencilla su manipulación; además, el pretratamiento por hidrólisis térmica, ácida y enzimática tiene mayor eficacia.

Estandarización de hidrólisis térmica en temperaturas de 90 °C y 150 °C

Para la presente investigación, se siguió diferentes metodologías no estandarizadas, a las cuales se les hizo algunas modificaciones. Torres-Cabezas (2019) empleando un equipo de explosión de vapor y a partir del análisis de alfa celulosa, análisis termogravimétrico (TGA) trabajó con 25 gramos de materia prima y 800 ml de agua, obteniendo una relación o carga de sólidos constante de 32g/g para todos los ensayos. Correa et al. (2012) usaron una carga de sólidos de seis gramos de agua por cada gramo de materia prima. En el caso de estudio se utilizó una relación 1:3; esto es, un gramo de residuo por cada tres ml de agua destilada.

En el diseño de experimentos se tiene dos factores: la temperatura y el tiempo; en este caso, existen diferentes temperaturas donde inicia el proceso de hidrólisis. Correa et al. (2012) usaron temperaturas desde los 110 a 240 °C. Por otro lado, se sigue la metodología propuesta, pero se hace algunas modificaciones, utilizando dos temperaturas denominadas T1 = 90 °C y T2 = 150 °C.

Figura 3

Reactor adaptado tipo BATCH



Con el diseño de experimentos se identifica las variables del diseño experimental; para la clasificación en el caso particular de tratamientos se utilizó la ecuación donde es el número de niveles del factor y es el factor, obteniendo cuatro tratamientos con tres repeticiones para cada uno; el diseño experimental empleado es un diseño para comparar dos o más tratamientos completamente al azar de efectos fijos.



Tabla 3

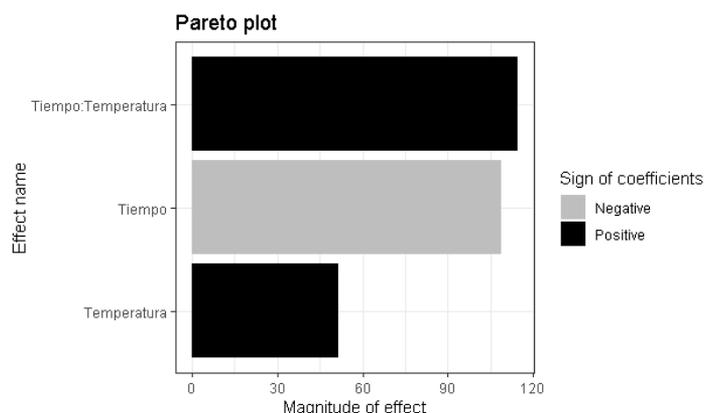
Estadística descriptiva de azúcares totales en la hidrólisis térmica

Estadísticos	T90 - t4	T90 - t8	T150 - t4	T150 - t8	CC
Media	1710.26	1263.48	1584.03	1595.59	380.78
Error estándar de la media	1.9	0.7	1.1	1.3	2.1
Mediana	1708.70	1263.70	1582.70	1596.70	382.05
Moda	1703.70 ^a	1260.70 ^a	1581.70	1599.70	381.70
Desv. Estandar	5.6	2.2	3.3	3.9	5.1
Varianza	31.3	4.7	11.0	15.1	25.7

La Tabla 3 permite observar los resultados obtenidos en la estadística descriptiva, para lo cual se usó el programa estadístico SPSS; los parámetros medidos fueron: media, error estándar de la media, mediana, moda, desviación y varianzas, para lograr una mejor contextualización de todos los datos.

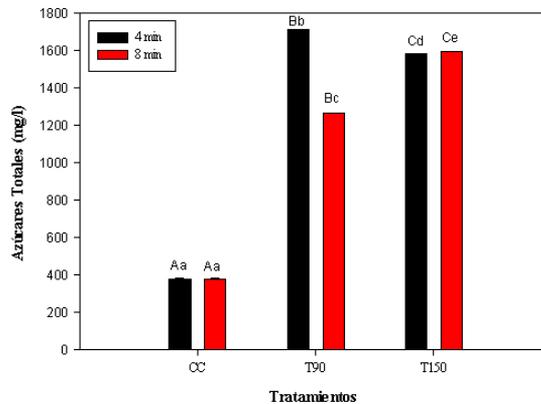
Figura 4

Comportamiento de azúcares totales en la hidrólisis térmica



En la Figura 4 se presenta el comportamiento de azúcares totales en la hidrólisis térmica, cuyo factor de mayor importancia según la magnitud que tiene el efecto durante el pretratamiento es la relación entre tiempo y temperatura; es decir, los dos factores tienen influencia durante el proceso; el signo de coeficiente para este caso es positivo, indicando que es de mayor relevancia realizar el pretratamiento con tiempos de ocho minutos y temperaturas de 150 °C para la liberación de azúcares totales.

En segundo lugar, de acuerdo con la magnitud del efecto, el factor de mayor importancia es el tiempo, donde el signo de coeficiente es negativo; esto implica mayor eficacia al utilizar tiempos menores de ocho minutos; sin embargo, la magnitud de los dos primeros factores, tiempo y temperatura con el factor tiempo y la proporcionalidad de magnitudes es muy similar; por lo tanto, la relación entre factores y el factor solitario implican considerarlos para futuros experimentos.

Figura 5*Variación de azúcares totales en la hidrólisis térmica*

Nota: las distintas letras mayúsculas y minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos y tiempos, respectivamente (Tukey, $p < 0.05$).

En la Figura 5 se observa las medias marginales del parámetro azúcares totales, evidenciando que existen diferencias significativas entre el café control (CC), el tratamiento de temperatura 90 °C (T90) y, el tratamiento de temperatura 150 °C (T150) en cuanto al tiempo de cuatro minutos. Para el tiempo de ocho minutos también se logra demostrar diferencias significativas entre tratamientos con un (< 0.05).

Posteriormente, se aprecia diferencias significativas en el factor tiempo (letras minúsculas), en los tratamientos (T90) y (T150). La Figura 5 se relaciona con la Figura 6 de Pareto, dado que los factores que tienen mayor eficiencia son la relación entre factores y el tiempo, respectivamente; es decir; la hidrólisis térmica tiene eficiencia al trabajar con temperaturas de 150 °C y tiempos de ocho minutos. De acuerdo con el test de Tukey (como se cita en Chacón e Isla, s.f.), el tratamiento de T90 con un tiempo de cuatro minutos logra obtener la concentración más alta de azúcares totales y, en la gráfica de Pareto, el factor tiempo indica que el tiempo de cuatro minutos es más efectivo; por lo tanto, es posible afirmar que en el proceso de hidrólisis térmica, el mejor tratamiento a seguir es usar tiempos de cuatro minutos y temperaturas de 90 °C y menores a 150 °C para aumentar la concentración de azúcares totales y grados Brix.

En la Figura 5 se aprecia las gráficas de Pareto, donde los factores de mayor efecto con respecto a su magnitud son la relación entre la temperatura y el tiempo. López et al. (2019) utilizaron tiempos de cinco y 15 minutos y no encontraron diferencias significativas; sin embargo, en la presente investigación sí se aprecia diferencias significativas entre tiempos, encontrando un mejor pretratamiento al usar el de cuatro minutos. En este caso, usar tiempos menores implica menor consumo de energía.

De igual manera, el efecto de la temperatura es de vital importancia. López et al. (2019) hallaron mayor efectividad al usar temperaturas entre 175 y 185 °C; también



que, al usar temperaturas de 150 °C no pudieron aumentar la concentración de azúcares; lo mismo sucede en la presente investigación donde, al trabajar con temperaturas de 150 °C la concentración de azúcares totales disminuye a 1584.03 mg/l; el posible factor que altera el pretratamiento es la temperatura, porque no logra ionizar el agua del medio y así liberar azúcares presentes en los residuos de lignina, celulosa y hemicelulosa presentes en los residuos de café (Carvalho et al., 2009).

Lôbo Baêta et al. (2016) encontraron que, la cantidad de azúcares durante el proceso de hidrólisis disminuye, debido a las altas temperaturas, donde los azúcares presentes se degradan en furfural, que son compuestos tóxicos. En cuanto al mejor pretratamiento encontrado en esta investigación fue el T90 con cuatro minutos, donde se logró encontrar la mayor concentración de azúcares 1710.25 mg/l. Por su parte Michel-Cuello et al. (2015) reportaron que el mejor pretratamiento usado en su estudio fue utilizar temperaturas de 100 °C, muy similar al encontrado en este estudio.

Estandarización de hidrólisis ácida con ácido sulfúrico y nítrico

Para lograr la estandarización de la hidrólisis ácida se siguió la metodología propuesta por Banerji et al. (2013), quienes usaron ácido sulfúrico con temperaturas controladas de 100 y 121 °C, haciendo algunas modificaciones en cuanto a la temperatura y tiempos. A continuación, se describe la metodología utilizada en la presente investigación: inicialmente, se hizo una molienda del residuo para mejorar el proceso de hidrólisis; seguidamente, un proceso de lignificación que buscaba eliminar la lignina polimérica presente en la estructura de los residuos de café; posteriormente, se sumergió la muestra en dos ml de (NaOH) 0,1 normalidad durante 15 minutos, se añadió 0,816 gramos de sulfato de calcio (CaSO_4) y se dejó reposar durante tres horas; para finalizar, se tamizó la muestra y se lavó los residuos con agua destilada.

Continuando con el proceso de hidrólisis ácida, se empleó ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 5 % en relación 2:1 p/v; por cada 30 gramos de residuos se adicionó 50 ml de H_2SO_4 a 125 °C con un tiempo de diez y 15 minutos; en un frasco de tapa azul se introdujo la muestra con el ácido y se llevó al reactor tipo Batch con las temperaturas y tiempos descritos en el diseño experimental; para finalizar, se neutralizó el pH de la muestra utilizando NaOH 6 Molar; se usó ácido nítrico (HNO_3) al 5 % relación 2:1 p/v; por cada 30 gramos de residuos se adicionó 50 ml a 100 °C con un tiempo de diez y 15 minutos.

Tabla 4

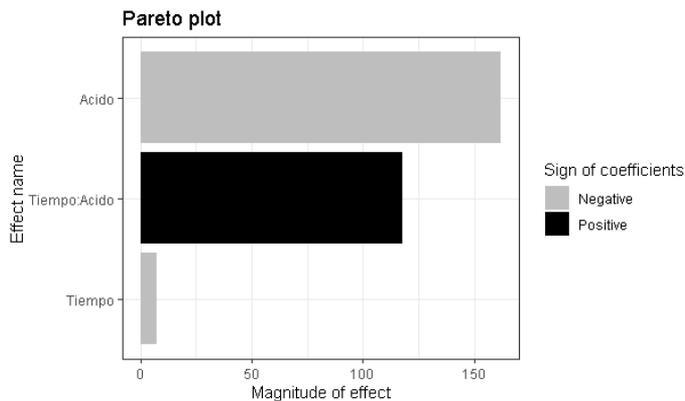
Estadística descriptiva de azúcares totales en la hidrólisis ácida

Estadísticos	AN - t10	AN - t15	AS - t10	AS -t15	CC
Media	2236.14	1985.81	1676.26	1897.59	1417.14
Error estándar	1.2	0.9	0.8	0.7	0.8
Mediana	2237.70	1985.70	1675.70	1897.70	1417.70
Moda	2237.70	1984.7000 ^a	1675.70	1899.70	1417.70
Desv. Estandar	3.7	2.8	2.3	2.0	2.3
Varianza	13.5	7.9	5.3	4.1	5.3

En la Tabla 4 se aprecia los resultados de la estadística descriptiva del parámetro azúcares totales: AN – t10 (Ácido nítrico con un tiempo de diez minutos), AN – t15 (ácido nítrico con un tiempo de 15 minutos), AS – t10 (ácido sulfúrico con un tiempo de diez minutos), AS - t15 (ácido sulfúrico con un tiempo de 15 minutos) y el CC (café control).

Figura 6

Comportamiento de azúcares totales en la hidrólisis ácida

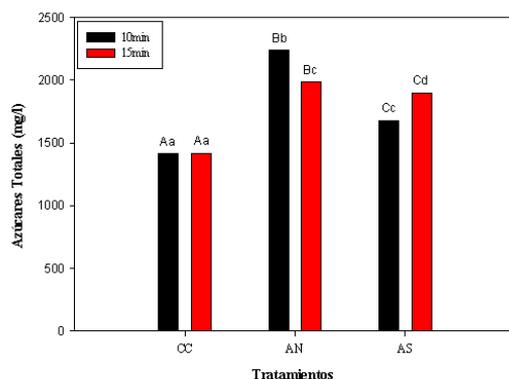


Se presenta el comportamiento de los azúcares totales en la hidrólisis ácida, donde el factor de mayor importancia según la magnitud que tiene el efecto durante el pretratamiento es el factor ácido, siguiendo la relación entre tiempo y ácido y tiempo, respectivamente. En el factor ácido el signo de coeficiente es negativo, por lo tanto, el ácido que tiene mayor efectividad es el ácido nítrico. En segundo lugar, de acuerdo con la magnitud del efecto se aprecia la relación ácido y tiempo; sin embargo, el efecto disminuye con respecto al factor ácido; es decir, tiene menor efecto en la hidrólisis.



Figura 7

Variación de azúcares totales en la hidrólisis ácida



Nota: las distintas letras mayúsculas y minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos y tiempos, respectivamente (Tukey, $p < 0.05$).

En la Figura 7 se observa las medias marginales estimadas de azúcares totales. Para el factor tratamiento, las letras mayúsculas indican que existen diferencias significativas, tanto para el CC sin ningún pretratamiento, como para el ácido nítrico (AN) y el ácido sulfúrico (AS), en el tiempo de diez minutos. En cuanto al tiempo de 15 minutos, también se identifica diferencias significativas entre tratamientos con un (< 0.05).

Seguidamente, se observa que existen diferencias significativas entre tiempos; en este caso, el tratamiento de AN presenta diferencias significativas entre los tiempos de diez y 15 minutos, como el tratamiento de AS. La Figura 7 se relaciona con la Figura 8 de Pareto, debido a que el efecto de la magnitud indica que tiene mayor eficacia el factor ácido usando el ácido nítrico con tiempos de diez minutos, por lo que se puede evidenciar en el test de Tukey que la mayor concentración de azúcares totales se encuentra al usar el tratamiento de ácido nítrico con tiempo de diez minutos.

En la Figura 7 en la representación de Pareto para azúcares totales, el factor ácido tiene una magnitud de efecto negativo indicando que, para este pretratamiento, el AN tiene mayor efecto en las variables de respuesta; sin embargo, no es posible afirmar que existan diferencias significativas con respecto al AS. Lôbo Baêta et al. (2016) indican que, al usar mayor cantidad de ácido, los azúcares como monosacáridos aumentan, debido a que las cadenas de los polisacáridos se rompen y así liberan monosacáridos. Kumar y Chauhan (2010) usaron dos ácidos: clorhídrico y cítrico, concluyendo que, los azúcares liberados tienen mayor calidad al usar ácido cítrico; por ende, los ácidos fuertes afectan los azúcares totales y recomiendan usar ácidos diluidos menos fuertes.

Por otro lado, el factor tiempo tiene influencia en el tratamiento, siempre y cuando se tenga la relación ácido y tiempo. En el caso de los azúcares totales (Figura 7), el coeficiente de signo es positivo; es decir, los azúcares totales tienen un mayor

beneficio al usar tiempos de 15 minutos con el ácido sulfúrico (AS); sin embargo, existen factores que pueden afectar este pretratamiento, como los tiempos prolongados, temperaturas elevadas y un medio ácido, logrando que los azúcares empiecen a degradarse (Ojumu y Ogunkunle, 2005).

Estandarización de hidrólisis enzimática con enzimas amilasa de *Aspergillus oryzae* A8220-50ml y celulasa de *Trichoderma Reesei* C2730- 50ML

En la estandarización de la hidrólisis enzimática se utilizó dos metodologías; en la primera, Cieza y Díaz (2018) utilizaron tres concentraciones de enzimas de 0,05 %, 0,1 % y 0,2 %; los tiempos empleados fueron de dos, cuatro y seis horas y, la temperatura, de 80 °C para su incubación; en la segunda, Apaza y Ramírez (2021) en el período enero-mayo, el MINAGRI reportó una producción de 1011 mil toneladas de arroz, lo que equivale a una producción de 269 mil toneladas de cascarilla de arroz (correspondiente al 20% del grano entero utilizaron cinco gramos de residuo, realizando un pretratamiento *buffer* durante 15 minutos; usaron relaciones de enzima/sustrato (E/S): 30 % p/p, 40 % p/p y 50 % p/p; la temperatura para la incubación fue de 50 °C con una agitación de 200 r.p.m y tiempos de 24 a 72 horas. Para la estandarización de la hidrólisis enzimática usaron diez gramos de residuo inicial, siguiendo el método denominado deslignificación; después de realizado este pretratamiento, al residuo se le ajustó el pH a 4.7 y finalizaron con un baño hidrotérmico de 75 °C en cinco minutos.

Figura 8

Proceso de hidrólisis enzimática



Para la identificación y clasificación de tratamientos en este caso particular, se utilizó la ecuación donde es el número de niveles del factor y es el factor, obteniendo cuatro tratamientos con tres repeticiones para cada uno; el diseño experimental empleado es un diseño para comparar dos o más tratamientos de efectos fijos completamente al azar y, así mismo, se presenta a continuación la tabla de orden estándar.



Tabla 5

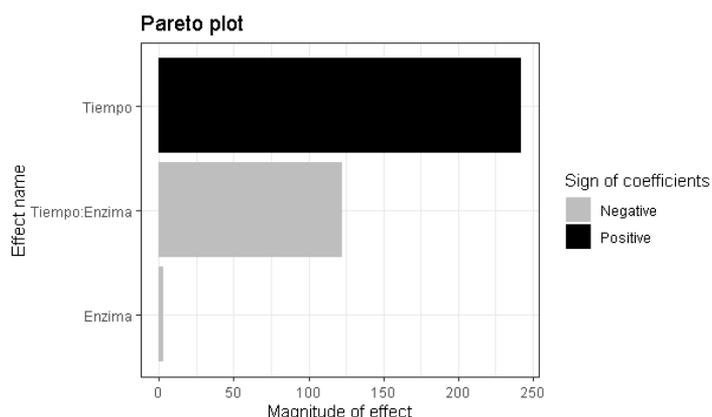
Resultados de la estadística descriptiva en la hidrólisis enzimática

Estadísticos	EA - 8h	EA - 24h	EC - 8h	EC - 24h	CC
Media	1016.37	1744.92	1255.03	1494.26	1317.14
Error estándar de la media	1.0	1.1	1.2	1.0	0.8
Mediana	1016.70	1744.70	1254.70	1494.70	1317.70
Moda	1015.70 ^a	1744.70	1251.70 ^a	1494.70	1317.70
Desv. Estandar	2.9	3.2	3.5	3.0	2.3
Varianza	8.5	9.9	12.5	8.8	5.3

En la Tabla 5 se puede ver los resultados obtenidos con el programa estadístico SPSS, donde las variables utilizadas son la media, error estándar, mediana, moda, desviación y varianza. Cabe resaltar que estos resultados serán utilizados para lograr una mejor contextualización.

Figura 9

Comportamiento de azúcares totales en la hidrólisis enzimática

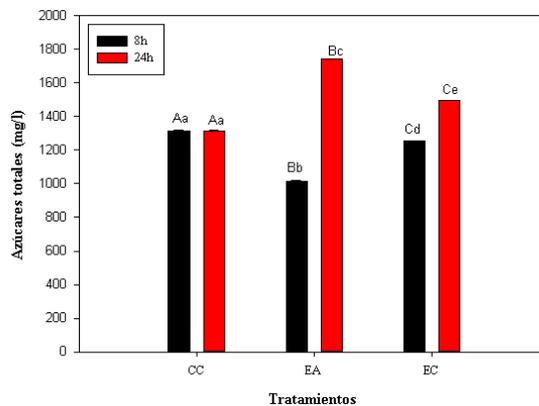


La Figura 9 muestra el comportamiento de los azúcares totales en la hidrólisis enzimática, donde el factor tiempo posee una mayor relevancia de acuerdo con la magnitud del efecto respecto a la relación tiempo y enzima; no obstante, el signo del coeficiente es positivo; por ende, la hidrólisis enzimática tiene mayor efectividad cuando se trabaja con tiempos de incubación de 24 horas. En cuanto al factor enzima, está en el último lugar, indicando que se puede utilizar cualquiera de las dos enzimas para la hidrólisis; es decir, no tiene relevancia en el experimento.

En segundo lugar, según la magnitud del efecto, se evidencia la relación tiempo y enzima, pero, la magnitud del efecto disminuye con respecto al factor tiempo; esto es, tiene menor efecto en las variables de respuesta, en este caso, de azúcares totales; además, su signo de coeficiente es negativo; por ello, tiene mayor efectividad usar tiempos de incubación menores y enzima amilasa.

Figura 10

Variación de azúcares totales en la hidrólisis enzimática



Nota: las distintas letras mayúsculas y minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos y tiempos, respectivamente (Tukey, $p < 0.05$).

En la Figura 10, en el parámetro de azúcares totales, si bien existen diferencias significativas con un tiempo de incubación de 24 horas en los tratamientos de enzima amilasa (EA) y enzima celulasa (EC), también hay diferencias significativas entre tiempos (letras minúsculas) en los tratamientos EA y EC con (<0.05); las letras minúsculas indican si existen diferencias significativas entre tiempos, tanto para la EA como para la EC. En el pretratamiento por hidrólisis enzimática en la Figura 10, el análisis realizado por Pareto indica que el mayor factor que afecta el pretratamiento es el tiempo indicando que, tiempos de 24 horas de incubación tienen mayor efectividad, aunque Cagua y Tayo (2021) encontraron mayores resultados al aumentar el tiempo de incubación e indican que el uso de diferentes enzimas no tiene mucha relevancia en la liberación de azúcares en el pretratamiento.

Considerando lo visto en la Figura 10, hay diferencias significativas tanto al usar tiempos de incubación de 24 horas, como con un valor $p < 0.05$ en la enzima amilasa y celulasa; de esta manera, la media encontrada en la enzima amilasa es de 1744.92 mg/l y el valor usando enzima celulasa con un tiempo de 24 horas es de 1494.25 mg/l, evidenciando que los valores son muy cercanos. Al utilizar la hidrólisis enzimática para la liberación de azúcares, hay tres factores que afectan el pretratamiento: tiempo de incubación, temperatura y cantidad de enzima utilizada.

Este comportamiento corresponde al esperado ya que, en un tiempo de 0 a 36 horas, las levaduras aumentarán su capacidad de tratamiento; por ende, también lo harán significativamente, los parámetros medidos. Espitia-Rocha et al. (2009) confirman que, las levaduras inician el crecimiento en fase exponencial desde la hora 0 hasta la hora 36. Vázquez (2015) llevó a cabo un diseño experimental con diferentes tiempos de incubación, evidenciando una mayor eficiencia y un aumento de la concentración en tiempos de incubación de 20 horas con una temperatura de 50 °C. En el diseño de experimentos de la presente investigación se observa un



aumento de la concentración de azúcares con la celulasa amilasa y un tiempo de incubación de 24 horas, obteniendo 1744.92 mg/l en azúcares totales.

Conclusiones

De los 406 bultos, es decir, 50 220 Kg/año que producen las fincas cafeteras de la vereda Yunguilla en el municipio de Samaniego, es posible utilizar el 28 % de este residuo, que pertenece a la pulpa de café; por lo tanto, a 14 061 Kg/año de residuo generado es posible darles un segundo uso para la obtención de bioetanol o abono orgánico, logrando reducir la contaminación ambiental por su mala disposición.

Los diseños de experimentos permiten evaluar diferentes factores, tanto en la hidrólisis térmica, como en la ácida y enzimática; de acuerdo con los resultados obtenidos, la hidrólisis enzimática con tiempos de incubación de 24 horas y usando la enzima amilasa, logra aumentar la concentración de azúcares totales y grados brix, de suerte que al fermentar y destilar la muestra, se logra la mayor concentración de bioetanol; sin embargo, la hidrólisis térmica permite un mayor rendimiento en la purificación del etanol al presentar un menor consumo de destilado a razón de -12,1 mL/ % etanol.

Con la muestra recolectada en la finca cafetera de la vereda Yunguilla, es decir, 88.97 kg de pulpa de café, se puede obtener 4.02 litros de bioetanol con un porcentaje de etanol del 84,52 %, utilizando el pretratamiento denominado hidrólisis enzimática. Por otra parte, la hidrólisis térmica permite obtener 4.39 litros de bioetanol con un porcentaje de etanol de 70,46 %.

Referencias

- Apaza, Y. M. y Ramírez, G. K. (2021). *Optimización de la hidrólisis enzimática en cascarilla de arroz (oryza sativa) para la obtención de bioetanol* [Tesis de Pregrado, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa]. https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UNSA_bfcb5b3c33e8602ca63b14aa4fa8f816
- Banerji, A., Balakrishnan, M., & Kishore, V. (2013). Low severity dilute-acid hydrolysis of sweet sorghum bagasse. *Applied Energy*, 104, 197-206. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.11.012>
- Cagua, A. M. y Tayo, E. A. (2021). *Hidrolisis enzimática de biomasa lignocelósica de cáscaras de banana maduro (musa paradisiaca) mediante A-Amilasa y Glucoamilasa para obtención de bioetanol* [Tesis de Pregrado, Universidad de Guayaquil]. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/58111>
- Carvalho, F., Silva-Fernandes, T., Duarte, L. C., & Gírio, F. M. (2009). Wheat straw autohydrolysis: Process optimization and products characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 153(1), 84-93. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8448-0>.



- Cerquera, M. P. (2022). *Evaluación de las diferentes estrategias de aprovechamiento de la pulpa de café en la finca la Lindosa, Palermo, Huila, Colombia* [Tesis de Pregrado, Fundación Universidad de América] Repositorio Institucional Lumieres. <https://hdl.handle.net/20.500.11839/8898>
- Chacón, C. e Isla, J. L. (s.f.). ANOVA, Análisis de varianza. Prueba de Tukey. https://www.colegiojuanxxiii.info/wp-content/uploads/2020/05/1_ANOVA-INVESTIGACION-Y-TECNOLOGIA-QUINTO.pdf
- Cieza, R. F. y Díaz, G. J. (2018). *Obtención de azúcares reductores a partir de cáscara de papa (Solanum tuberosum) por hidrólisis química y enzimática* [Tesis de Pregrado, Universidad Señor de Sipán]. Repositorio Institucional - USS. <http://repositorio.uss.edu.pe//handle/20.500.12802/5777>
- Correa, J., Ruiz, Á. y Garrote, G. (2012). Estudio del tratamiento hidrotérmico de fruta de banano. *Afinidad*, 69(559).
- Cortés, E. A., Ciro, H. J. y Moreno, E. L. (2011). Biocombustibles: búsqueda de alternativas. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 6(2), 118-123.
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). (2021). Boletín Técnico. Exportaciones (EXPO). Junio 2021. https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/boletines/exportaciones/bol_exp_jun21.pdf
- Espitia-Rocha, C., Gutiérrez-Rojas, I. y Espitia-Rivera, H. (2009). Producción de etanol a partir de cebada no malteada hidrolizada con a y B amilasas comerciales. *Universitas Scientiarum*, 14(2-3), 164-172. <https://doi.org/10.11144/javeriana.SC14-2-3.pdea>
- Federación Nacional de Cafeteros. (2020). Producción de café de Colombia cerró el 2019 en 14,8 millones de sacos. <https://federaciondecafeteros.org/wp/listado-noticias/produccion-de-cafe-de-colombia-cerro-el-2019-en-148-millones-de-sacos/>
- Fernández-Cortés, Y., Sotto-Rodríguez, K. D. y Vargas-Marín, L. A. (2020). Impactos ambientales de la producción del café, y el aprovechamiento sustentable de los residuos generados. *Producción + Limpia*, 15(1), 93-110. <https://doi.org/10.22507/pml.v15n1a7>
- Hurtado, P. (2016). Aprovechamiento de residuos de biomasa secundaria como combustible. *Ingenium*, 1(1), 26-30. <http://dx.doi.org/10.18259/ing.2016004>
- Kumar, A. & Chauhan, G. S. (2010). Extraction and characterization of pectin from apple pomace and its evaluation as lipase (steapsin) inhibitor. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 454-459. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.05.001>
- Lôbo Baêta, B. E., Sousa, D. R., Herrera, O. F., Alves, L. V., & De Aquino, S. F. (2016). Optimization of sugarcane bagasse autohydrolysis for methane production from hemicellulose hydrolyzates in a biorefinery concept. *Bioresource Technology*, 200, 137-146. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.003>



- López, P. C., Castañeda, M. T. y Meléndez, J. (2019). Efecto de los pretratamientos por prehidrólisis térmica y electrooxidación sobre la solubilización y biodegradabilidad anaeróbica de lodos residuales para la producción de metano. *Revista Tendencias en Docencia e Investigación en Química*, 5(5), 177-184
- MásColombia. (2022). ¿Qué tan dependiente es Colombia de los combustibles fósiles? <https://mascolombia.com/que-tan-dependiente-es-colombia-de-los-combustibles-fosiles/>
- Michel-Cuello, C., Gallegos, G., Maldonado, E. y Aguilar, N. (2015). Efecto de la temperatura y el PH del medio en la hidrólisis de fructanos de maguey para la obtención de jarabes fructosados. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 14(3), 615-622.
- Naciones Unidas (NU). (s.f.). Informe del IPCC: Impactos, adaptación y vulnerabilidad. <https://www.un.org/es/climatechange/ipcc-wgii-report>
- Ojumu, T. V. & Ogunkunle, O. A. (2005). Production of glucose from lignocellulosic under extremely low acid and high temperature in batch process, auto-hydrolysis approach. *Journal of Applied Sciences*, 5, 15-17. <https://doi.org/10.3923/jas.2005.15.17>
- Puerta-Quintero, G. I. y Riosa, S. (2014). Composición química del mucílago de café según el tiempo de fermentación y refrigeración. *Cenicafé*, 62(2), 23-40
- Ramírez, C. A., Oliveros, C. E. y Sanz, J. R. (2015). Manejo de lixiviados y aguas de lavado en el proceso de beneficio húmedo del café. *Cenicafé*, 66(1), 46-60.
- Reyes, P. J. (1999). Combustibles, fósiles y contaminación. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina*, 8, 87-92. <https://doi.org/10.18359/rcin.1412>
- Rodríguez Valiente, I. (2016). Pretratamiento de hidrólisis hidrotérmica para la degradación de los carbohidratos complejos de residuos de frutas para la obtención de bioetanol. <https://digibuo.uniovi.es/dspace/handle/10651/39252>
- Torres-Cabezas, M. A. (2019). *Obtención de celulosa a partir de la cáscara de cacao ecuatoriano (Theobroma cacao L.) mediante hidrólisis térmica para la elaboración de pulpa de papel* [Tesis de Pregrado, Universidad Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/19765>
- Vargas, G. A. y Mazón, B. (2004). Determinación de humedad en la pulpa de café. *REVITECA, Revista de Tecnología y Ciencia Alimentaria*, 10, 14-19.
- Vázquez, O. (2015). *Etanol lignocelulósico, a partir de cascarilla de café, por medio de hidrólisis química-enzimática y fermentación* [Tesis de Maestría, Universidad Veracruzana]. <https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/41986/VazquezMoralesOscar.pdf>