

**EVALUACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE BIOPOLÍMEROS A PARTIR DE
MUCILAGO DE CAFÉ ESCALA LABORATORIO**

LUIS FELIPE GUERRERO BENAVIDES

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
DEPARTAMENTO DE RECURSOS NATURALES Y SISTEMAS AGROFORESTALES
PROGRAMA DE INGENIERÍA AMBIENTAL
SAN JUAN DE PASTO**

2019

**Evaluación de la obtención de biopolímeros a partir de mucilago de café escala
laboratorio**

LUIS FELIPE GUERRERO BENAVIDES

Trabajo de grado para optar el título de Ingeniero Ambiental

Director: Msc.

DIANA CAROLINA MORALES PABÓN

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
DEPARTAMENTO DE RECURSOS NATURALES Y SISTEMAS AGROFORESTALES
PROGRAMA DE INGENIERÍA AMBIENTAL
SAN JUAN DE PASTO
2019**

NOTA DE RESPONSABILIDAD

Las ideas y conclusiones aportadas en este Trabajo de Grado son Responsabilidad de los autores.

Artículo 1 del Acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966, emanado por el Honorable Concejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación

Diana Carolina Morales Pabón

Directora

Yolanda Ana Maria Lagos Mallama

Jurado

Miguel Antonio Casanova Acosta

Jurado

San Juan de Pastos, 2019

AGRADECIMIENTOS

A DIOS: Que con su infinita sabiduría permitió superar todos los momentos de debilidad, por ser el guía y compañero durante este proceso, y brindarme un camino lleno de aprendizajes , experiencias y felicidad.

A mis padres por ser el pilar fundamental de mi vida que, con su apoyo incondicional, entrega, sacrificio, por cada uno de sus consejos y su amor, por convertirse en mi inspiración y ser el motivo para seguir adelante y nunca desfallecer, este logro es ustedes puesto que ustedes son los artífices de ello.

A mis familiares que nos brindaron su apoyo e hicieron ameno este camino, porque no solo es alcanzar un objetivo sino disfrutar de todo su proceso.

A mis amigos y compañeros en especial a los Eriros por sus palabras de aliento y su apoyo que permitieron que esta etapa se una de las mejores experiencias de mi vida.

A la Magister Diana Carolina Morales directora de este trabajo, gracias por la apoyo, dedicación, sabiduría, amistad y motivación constante durante el iniciar y culminación satisfactoria de este trabajo.

DEDICATORIA

A Dios por su infinito amor y sabiduría

A mi madre **Yanuba Rosario Benavides** por ser el pilar importante de mi vida y por demostrarme siempre su cariño, su apoyo incondicional en mis alegrías, tristezas, triunfos y derrotas

A mi padre **Julio Guerrero** por su comprensión, tolerancia, esfuerzo y tenacidad puesto durante el transcurso de mi carrera

Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
4. CONCLUSIONES.....	13
5. RECOMENDACIONES.....	14
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14

RESUMEN

La presente investigación tiene como propósito brindar una alternativa de aprovechamiento a los subproductos provenientes del beneficio de café por vía húmeda, en especial del mucílago el cual se caracteriza por su alta carga contaminante. Se evaluó la generación de biopolímero aplicando un proceso de fermentación láctica y polimerización, para la parte experimental se usó *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* activados en medio MRS para la preparación de inóculo a diferentes concentraciones (5, 10, 15 (g/L)), usados en nueve ensayos preliminares al proceso de fermentación bajo diferentes condiciones de tiempo, temperatura y pH inicial de 5,6, siendo 2 días, 36°C respectivamente y una concentración máxima de inóculo las condiciones iniciales para la fermentación a mayor escala obteniendo una concentración de 17,34% de contenido orgánico recuperado y concentrado por medio de destilación sencilla y caracterizado por el método de titulación. El contenido orgánico se sometió a un proceso de polimerización mediante reducción de presión y alta temperatura con un tiempo total de 13 horas, el producto final se purificó a través de una dilución y precipitación obteniendo 0,2 gramos de un sólido amorfo, de coloración amarillenta y de textura rugosa al tacto.

Palabras clave: Ácido Láctico, Fermentación Láctica, Policondensación.

ABSTRACT

The present investigation has as purpose to offer an alternative of advantage to the byproducts coming from the benefit of coffee by humid way, especially of the mucilage which is characterized by its high polluting load. The generation of biopolymer was evaluated applying a process of lactic fermentation and polymerization, for the experimental part was used *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* activated in MRS medium for the preparation of inoculum at different concentrations (5, 10, 15 (g / L)), used in 9 preliminary trials to the fermentation process

under different conditions of time, temperature and initial pH of 5 , 6, being 2 days, 36 ° C respectively and a maximum inoculum concentration the initial conditions for fermentation on a larger scale obtaining a concentration of 17.34% organic content recovered and concentrated by means of simple distillation and characterized by the method of degree. The organic content was subjected to a polymerization process by reducing pressure and high temperature with a total time of 13 hours, the final product was purified through a dilution and precipitation obtaining 0.2 grams of an amorphous solid, yellowish coloration and rough texture to the touch.

Key Words: Lactic Acid,Lactic Fermentation, Policondesation

1. INTRODUCCIÓN

Anualmente en Colombia se presenta una creciente producción de café que para el periodo Julio 2017 a Junio 2018 fue de 14,3 millón de sacos con un incremento de 2% con respecto al periodo anterior (FEDECAFÉ, Federacion Nacional de Cafeteros, 2018). Lo anterior, ha permitido que el país obtenga un reconocimiento internacional en cuanto a producción y calidad de café, respaldado por las condiciones ambientales del país, el sistema de gestión y el apoyo frente a la calidad que ha sido diseñada por cada uno de los productores, convirtiendo al café colombiano en uno de los mejores (Morales, 2016)

La Federación Nacional de Cafeteros (2010) establece que dentro de las principales regiones productoras de café se encuentra el departamento de Nariño por encontrarse en los alrededores del volcán Galeras (Zona de Occidente de Nariño) y al suroriente del Rio Patía “Zona Norte”, permitiendo que el café de la región se caracterice por su alta acidez y cuerpo medio, un aroma pronunciado, y por su sabor limpio y dulce, acompañado de la suavidad intrínseca del Café Colombiano.

En Colombia, tradicionalmente se realiza el beneficio de café por vía húmeda, lo que propicia la alta calidad del café colombiano, sin embargo ANACAFÉ (2011) afirma que se causa una degradación de fuentes hídricas como del suelo a partir del uso de 150 litros de agua por cada quintal de café producido; adicionalmente se producen subproductos que en su mayoría son efluentes acuosos que de acuerdo a ANACAFÉ (2009)poseen una alta carga contaminante por las características físicas, químicas y microbiológicas que alteran las

propiedades naturales de los ecosistemas, donde se hacen los vertimientos provenientes del beneficio del café.

Por lo anterior el tratamiento de subproductos del beneficio de café se deben encontrar ligados a la Política Nacional de Producción más Limpia implementada desde 1997, que busca la conservación de materias primas y energía, al igual que eliminación de materias tóxicas y la minimización de residuos de carácter contaminante. Además, que dentro de la política se contemplan una serie de estrategias que vinculan una articulación institucional y de cada sector productivo con el fin de impulsar su aplicación e incentivar la mejora de los procesos productivos y de todas las operaciones complementarias (Min.Ambiente, 1997).

Dentro de los subproductos provenientes del beneficio del café encuentra el mucílago contribuye con un 14,85% del peso del fruto seco. En la producción de café cereza se producen alrededor de 91L de mucílago que posee una carga orgánica en el agua del primer lavado, <100.000 mg O₂ /L en términos de Demanda Química de Oxígeno (CENICAFÉ, 2016). Del total de la contaminación generada por el beneficio húmedo, el mucílago contribuye con el 28% equivalente a una población de 310.000 habitantes (CENICAFÉ, 2010).

De acuerdo a lo mencionado por Arias *et al.*, (2008) el mucílago es un subproducto utilizable potencialmente en la fermentación láctica como sustrato, dada su composición química, para la producción de ácido láctico materia prima para la fabricación de biopolímeros. El mucilago al ser un subproducto biodegradable y no tener un valor comercial lo convierte en una fuente atractiva para tratamientos biotecnológicos de bajos costos.

La obtención de biopolímeros a partir del mucílago de café surge como una alternativa frente a los inconvenientes que presentan los polímeros sintetizados a base del petróleo gracias a que es un polímero biodegradable de buenas propiedades físicas y mecánicas que se refleja en la resistencia que presenta al ser sometidos bajo una fuerza, esto se debe a las grandes cadenas poliméricas que forman una atracción entre ellas Lasprilla *et al.* (2012)

Dentro de la búsqueda de fuentes de biopolímeros que eviten los problemas que tiene la industria tradicional del plástico y como alternativa para aprovechar los subproductos de diversas agroindustrias, se han desarrollado investigaciones que utilizan materias primas biodegradables, entre estas se encuentran: almidones de papa (Iñiguez y Castillo, 2011), ñame, fruto del cují (Medina *et al.*, 2014), residuos de piña (Araya *et al.*, 2010), aguas residuales de industria láctea (Camacho, 2015).

Por lo anteriormente expuesto, la presente investigación se centra en la evaluación de la obtención de biopolímero a escala laboratorio dentro del laboratorio de calidad de agua de la Universidad de Nariño a partir de mucílago de café, como una alternativa de aprovechamiento de este subproducto que permita la reducción de la contaminación generada.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La parte experimental se desarrolló dentro del laboratorio de calidad de agua perteneciente al departamento de Recursos Naturales y Sistemas Agroforestales, Universidad de Nariño sede Torobajo. Como materia prima principal se empleó las aguas mieles provenientes del primer lavado del beneficio de café de la finca Guayacana ubicada dentro del corregimiento de San Rafael, Municipio de San Lorenzo. La finca cuenta con una extensión de 5ha siendo 2ha las correspondientes al cultivo de café y con una producción de 2.000kg de café pergamino seco.

Materiales equipos y reactivos

Previo al análisis se verificó la calibración de equipos y materiales empleados, determinando las posibles variaciones de medición e incertidumbres que éstos pueden aportar a los resultados.

A continuación, se enlistan los equipos, insumos, instrumentos de referencia empleados en los procesos de obtención del APL

Tabla 1. Materiales

EQUIPOS	INSTRUMENTOS	INSUMOS
Incubadora Scientific DNP-9025 ^a	Cajas Petri de Vidrio	Cultivo láctico de yogurt

Microscopio Scientific Anti-Mold	Porta objetos de Vidrio	Medio de cultivo agar y caldo MRS. Agar MRS (de MAN, ROGOSA y SHARPE)
pHmetro American marine Inc Pinpoint	Elermeyer 500mL Vidrio	Lugol 5 %
Bomba de Vacío DOA-P704-AA Gast	Balón de destilación 250 y 100mL Vidrio	Alcohol 7%
Plancha de agitación y calentamiento Faithful	Beaker 1000mL Vidrio	Cristal violeta 95 %
	Probeta 10mL Vidrio	Levadura
		Pectina 100%
		Bicarbonato de sodio 100%
		Indicador de Fenolftleina 1%
		Hidróxido de sodio 0,1 N
		Ácido bórico 99%
		Cloruro de estaño dihidratado 95%
		Éter di etílico 99%
		Cloroformo 99%

En este apartado se presenta un orden de trabajo diseñado en tres aspectos principales con el fin de evaluar la obtención de biopolímero a partir de mucílago de café a escala laboratorio. En primer lugar, se estableció las condiciones para la fermentación láctica, a continuación, se calculó la concentración de ácido láctico, finalmente se definió los parámetros de polimerización de biopolímero.

Estipulación de las condiciones para la fermentación láctica

Las condiciones iniciales para la fermentación láctica, inicialmente se usó microorganismos liofilizados de un cultivo láctico compuesto por *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. Los microorganismos se activaron en un medio de cultivo

líquido o caldo MRS e incubados a una temperatura de 36°C por un periodo de 48 horas, posteriormente se sembró los microorganismos en medio de cultivo agar MRS.

Seguidamente se realizó la identificación de los microorganismos aplicando pruebas bioquímicas iniciando con tinción de Gram que permitió identificar a través de la coloración el carácter Gram positivos (coloración violeta) o Gram negativos (coloración rosa), además permitió diferenciar la morfología que presentan los bacilos y cocos. (Aparicio, 2016)

La prueba de oxidasa se está basada en la identificación de una enzima llamada citocromo C oxidasa mediante titulación reactivo de Kovacs donde se presenta un cambio de color (morado) si la prueba es positiva, en su defecto es negativa y la prueba catalasa consiste en agregar una muestra de microorganismos sobre una gota de peróxido donde se presta un burbujeo indica la presencia de catalasa, en su defecto no hay presencia de catalasa (Microbitos, 2011).

Preliminar al conteo se realizó una dilución decimal hasta 10^{-10} en cajas petri donde se adicionó agar MRS y según López y Torres (2006) se incubo por un periodo de 48 lo que permitió verificar efectos de inhibición en el crecimiento de los microorganismos. Para contabilizar adecuadamente las colonias, se escogen las placas que muestren entre 30 y 300 colonias, los resultados se expresan en unidades formadoras de colonias por gramo (UFC g^{-1}), donde:

$$UFC g^{-1} = No. de colonias por placa(entre 30 y 300) * inverso de la dilución * 10$$

Con la identificación y conteo de los microorganismos se procedió a la preparación del inóculo variando las concentraciones del mismo para la realización de los diferentes ensayos de fermentación.

Fermentación

Siguiendo lo establecido en los trabajos realizados por Arias *et al.* (2008) y Iñiguez *et al.* (2011) a nivel de laboratorio se realizaron nueve ensayos para determinar las condiciones para el proceso ideales de fermentación del mucílago de café. Los ensayos se sometieron a

temperaturas de 15, 25 y 36°C, tiempo de fermentación de 2, 6 y 15 días y la concentración de inóculo microbiológico

Los ensayos consistieron en 500mL de una mezcla de mucílago, inóculo microbiológico, adicionalmente en los ensayos de menor tiempo se añadió levadura y pectina para acelerar la obtención de ácido láctico. La temperatura y pH se ajustaron siguiendo lo recomendado por Hoffvendahl y Hahn-Hägerdal, (2000), para ello el valor de pH inicial de cada ensayo se ajustó en un valor de 5,6 mediante la adición de 23 gramos de bicarbonato de sodio.

Con los ensayos se determinó las condiciones iniciales para una fermentación a mayor escala. Este proceso consistió en una fermentación tipo Batch dentro de un biorreactor con un volumen de mezcla de 3 litros, pH inicial a 5,6, se reguló la temperatura hasta 36°C, con una agitación de 15 minutos por cada hora a 100 rpm (Iñiguez *et al.*, 2011)

Cálculo de la concentración de ácido láctico

La recuperación del ácido láctico consistió en una destilación sencilla propuesta por Iñiguez *et al.* (2011) utilizando 150mL del líquido fermentado, mediante el calentamiento hasta alcanzar una temperatura de 98°C para garantizar la generación de vapores en este caso ácido láctico al ser el componente más volátil se presenta un continuo paso de moléculas desde la superficie líquida (solución fermentada) hacia el espacio libre, simultáneamente las moléculas de vapor regresan al líquido hasta que se presente un líquido-vapor donde se iguala la tasa de evaporación a la de condensación. Los vapores se dirigen al condensador donde son enfriados y convertidos en estado líquido. Los vapores y el líquido destilado presentan las mismas características lo que garantiza que una adecuada recuperación y concentración de ácido láctico.

Cuantificación del ácido láctico

La concentración de ácido láctico se determinó mediante titulación haciendo uso del indicador fenolftaleína al 1% e hidróxido de sodio al 10%, este método consistió en titular 9mL de ácido láctico con hidróxido de sodio como solución alcalina y estas soluciones deben de establecer un color rosa pálido en el ácido, lo que indica el punto final de la titulación, posteriormente se aplicó las siguientes fórmulas para calcular la concentración, teniendo en cuenta la Norma Mexicana (NOM-155-SCFI, 2012).

$$\text{Concentración Ácido láctico} = \frac{\text{Volumen de NaOH gastado} \times \text{Concentración NaOH}}{\text{Volumen Muestra}}$$

$$\% \text{ Acido Láctico Producido} = \frac{\text{Concentración AL} \times 90,08}{10}$$

Definición de las condiciones de polimerización del ácido láctico en la obtención de biopolímero

Teniendo en cuenta lo mencionado por Bueno (2012) la policondensación es un proceso donde se produce una reacción de condensación de bajo peso molecular, dando lugar a la formación de enlaces covalentes mediante la eliminación de agua, dióxido de carbono o metanol. Este proceso se divide en dos etapas: oligomerización y policondensación.

La oligomerización es un proceso de deshidratación donde se usó 100mL de ácido láctico el cual fue sometido a un sistema de destilación al vacío, a un calentamiento con una temperatura desde 25 a 150°C la cual se aumentó paulatinamente. Durante las dos primeras horas se mantuvo el proceso bajo presión atmosférica normal, posteriormente se redujo la presión en 5 y 10 pulgadas mercurio por un periodo de una hora cada uno, la presión final se redujo a 15 pulgadas de mercurio por cuatro horas, para un total de ocho horas (Bueno, 2012).

Según lo propuesto por Pinzón *et al.* (2006), durante el proceso de oligomerización se hizo seguimiento a la conversión de ácido láctico en oligómero calculando el valor ácido, mediante el procedimiento ASTM D 4662 - 03 se tituló con NaOH 0,1N diferentes muestras tomadas del oligomero producido en un intervalo de dos horas.

Siguiendo el método establecido por (Moon, Lee, Taniguchi, Miyamoto, & Kimura, 2002), se añadió 0,4% peso de Cloruro de estaño (II) dihidratado y ácido bórico con una relación molar 1:1 al oligómero obtenido. Este proceso se sometió a calentamiento con un aumento de la temperatura de 15°C por minuto hasta alcanzar los 180°C y a una presión reducida hasta 15 pulgadas de mercurio con una bomba de vacío con un periodo de cinco horas adicionales

Finalmente, se realizó la purificación con el fin de eliminar cualquier impureza del biopolímero este paso se llevó a cabo haciendo una dilución en cloroformo y una precipitación con éter di etílico, finalizando con una filtración al vacío y de esta forma obtener un polímero en estado sólido.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento de las condiciones para la fermentación láctica

La obtención de ácido láctico a nivel industrial se puede realizar por vía química o biotecnológica. Biotecnológicamente se basa en la fermentación de diferentes sustratos ricos en carbohidratos mediante el uso de bacterias u hongos lo que permite obtener ácido láctico D (-) o L (+) activos ópticamente, a diferencia de la química en la cual se produce una mezcla de ácido láctico D y L inactivo ópticamente. Por ello la producción de AL en su mayoría se realiza por vía biotecnológica (Serna y Rodríguez de Stouvenel, 2005)

Identificación de microorganismos

La caracterización bioquímica (Tabla 2) permitió identificar el género de los microorganismos clasificándolos como Lactobacilos y Streptococcus, correspondiente a los microorganismos más eficientes en la obtención de ácido láctico (Waldir *et al.*, 2007), entre las características microscópicas se identificó una forma alargada (bastones), entrelazados clasificándolos como bacilos y los cocos de forma redondeada, conformando cadenas largas (Güerchia, 2015). Macroscópicamente se observó un color blanco cremoso, forma redonda, puntiformes, bordes enteros, superficie convexa (Parra, 2010). Con esta caracterización se determinó que los microorganismos son del género *Lactobacilos* y *Streptococcus*.

Tabla 2. Caracterización bioquímica de los microorganismos

Prueba	Resultado
Tinción de Gram	Positiva
Oxidasa	Negativa
Catalasa	Negativa

Los microorganismos mayormente utilizados en el proceso de obtención de ácido láctico y que han tenido mayor estudio son del genero *Lactobacillus* y *Streptococcus* (Garcia *et al.*, (2010), dada las características de estos al ser termófilos, de fermentación rápida, con bajos requerimientos de nutrientes nitrogenados, baja producción de biomasa, resistencia a medios ácidos lo que otorga ventajas sobre otras bacterias (Hoffvendahl y Hahn-Hägerdal, 2000)

Posteriormente a la identificación de los microorganismos, se contabilizó el número de unidades formadoras de colonias como se puede apreciar en la Tabla 3, los valores encontrados garantizan un crecimiento continuo de los microorganismos. Según Estupiñan *et al.*, (2007) este crecimiento microbiológico permite la producción de ácido láctico gracias a la optimización de la fermentación.

Tabla 3. Cuantificación del microorganismo

Nº Dilución	Conteo	Promedio	UFC
1	-		
1 X 10 ⁻¹	-		
1 X 10 ⁻²	-		
1 X 10 ⁻³	-		
1 X 10 ⁻⁴	-		
1 X 10 ⁻⁵	$\frac{84}{102}$	91	91 X 10 ⁻⁶
1 X 10 ⁻⁶	$\frac{98}{110}$	103	103 X 10 ⁻⁷
1 X 10 ⁻⁷	$\frac{116}{108}$	112	112 X 10 ⁻⁸
1 X 10 ⁻⁸	$\frac{89}{91}$	90	90 X 10 ⁻⁹
1 X 10 ⁻⁹	$\frac{82}{76}$	79	79 X 10 ⁻¹⁰

Sobre población (-), UFC: Unidades Formadoras de Colonias.

Producción y cuantificación de ácido láctico

La realización de ensayos de fermentación correspondientes al diseño preliminar del proceso permitió analizar el comportamiento de la producción ácido láctico mediante la variación de las condiciones de fermentación. En la Tabla 4 se especifican cada una de las condiciones en los diferentes ensayos realizados: pH inicial y final, temperatura inicial, y final, tiempo de fermentación, concentración de inóculo y producción de ácido láctico.

Tabla 4. Variables medidas en el proceso de fermentación

Numero de Ensayo	pH (unidades de pH)		Temperatura (°C)		Tiempo de fermentación (días)	Concentración inóculo (g/L)	Ácido láctico (%)
	Inicial	Final	Inicial	Final			
1	5,6	4,3	15	14	2	5	0,19
2	5,6	5,1	25	16	2	10	0,1
3	5,6	6,23	36	14,6	2	15	0,35
4	5,6	4,1	15	15	6	5	0,13
5	5,6	2,6	25	14,5	6	10	0,11
6	5,6	4,7	36	14,7	6	15	0,09
7	5,6	3,9	15	15,7	15	5	0,11
8	5,6	4,8	25	16,3	15	10	0,06
9	5,6	4,6	36	16	15	15	0,3

Las condiciones iniciales de pH y temperatura se ajustaron siguiendo lo recomendado por (Hoffvendahl y Hahn-Hägerdal, 2000; Serna y Rodríguez de Stouvenel, 2005), quienes afirman que los microorganismos usados en la presente investigación presentan un mejor crecimiento en intervalos de pH entre 5,5 y 6,5; al igual que a una temperatura entre 20 y 45°C.

En los diferentes ensayos realizados para la determinación de las condiciones iniciales del proceso de fermentación se cuantifico la concentración de ácido láctico producido. Los datos obtenidos se registran en la Tabla 4; las mayores concentraciones obtenidas corresponden a los ensayos 3 y 9, estas concentraciones se ven respaldadas por Arias *et al.*,

(2008) quien obtuvo mayores concentraciones en los ensayos con mayor cantidad de inóculo microbiológico.

Un factor importante para la optimización de la fermentación láctica para los ensayos de menor tiempo es la adición de extracto de levadura seca activada la cual proporciona los nutrientes necesarios para los demás microorganismos y de acuerdo Bianchi *et al.* (2001), la levadura también es una fuente de ácido láctico, además se adicionó pectina comercial que permite la aceleración de la fermentación puesto que despolimeriza e hidroliza la pectina presente en el mucílago (Quintero *et al.*, 2010).

En los ensayos preliminares se obtuvo una producción 0,35% de ácido láctico, mientras que en la producción a mayor escala se produjo 2,88% de acuerdo a Proaños y Piñeros, (2014) afirman que un factor que limita de la obtención de ácido láctico es la agitación que se mantiene durante el proceso de fermentación láctica, dado que la agitación permite una aireación la cual acompañada de la disminución de nutrientes que necesitan los microorganismos ocasiona un estrés oxidativo provocando la obtención de subproductos como ácido actico y etanol.

Para la recuperación de ácido láctico se tuvo en cuenta la presencia de subproductos del proceso de fermentación (Hoffvendahl y Hahn-Hägerdal, 2000), por ello se mantuvo la temperatura del proceso de destilación a 98°C de esta forma se garantiza que los vapores generados durante este proceso en gran medida se de ácido láctico puesto que esta temperatura corresponde a su punto de ebullición.

La concentración de ácido láctico se determinó mediante titulación, esto permitió verificar el rendimiento del proceso de fermentación tanto de los ensayos preliminares (Tabla 4), como en la de mayor escala. A partir del primer seguimiento de la concentración se encontró un aumento continuo de la misma con valores que oscilan desde 0,45% a 2,88% mL/L que corresponde a un 17,34% de ácido láctico total obtenido en la etapa de fermentación valor aceptable comparado con Quintero *et al.* (2012) quien obtuvo 17,6% los resultados del seguimiento de la concentración a mayor escala se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Porcentaje de Ácido Láctico producido.

Tiempo de Fermentación (horas)	Volumen de NaOH (mL)	Normalidad NaOH	Volumen Muestra	Ácido Láctico (% mL/L)
8	0,5	0,1 Normal	1 mL	0,45
16	1,1			0,99
24	1,6			1,44
32	2,2			1,98
40	2,7			2,43
48	3,2			2,88

La Figura 1 muestra el comportamiento del pH de la solución compuesta de mucílago e inóculo microbiológico con respecto al tiempo de fermentación. Este comportamiento se traduce en la acidificación de la solución influyendo en la producción de ácido láctico de manera positiva que atendiendo a lo expuesto por Quintero *et al.*,(2012) este aumento en la acidez se convierte en un indicador de la producción de ácido.

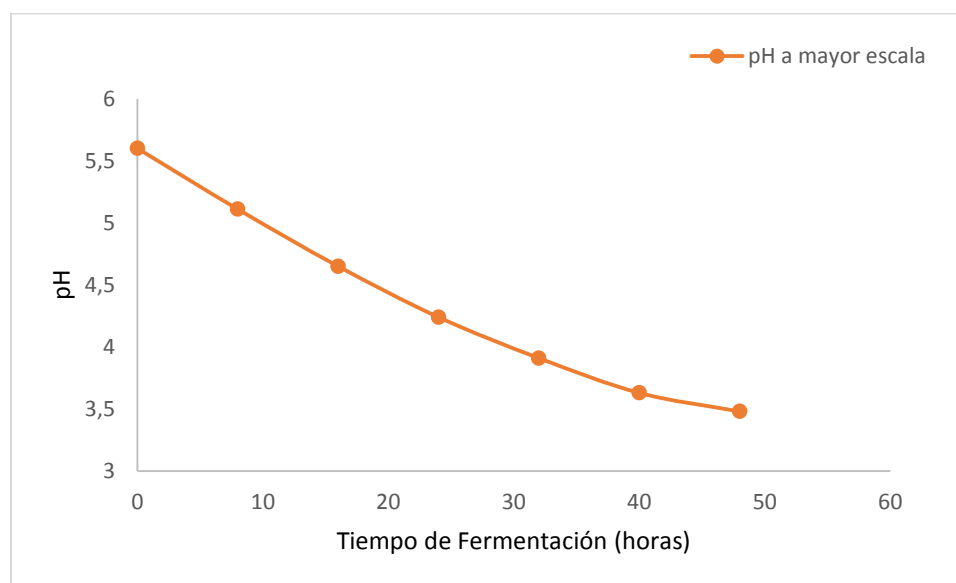


Figura 1. Variación de pH Fermentación.

El resultado de la acidificación de la solución de mucílago e inóculo durante el proceso de fermentación láctica se ve altamente influenciada por el crecimiento de los microorganismos y por un proceso de hidrólisis enzimático como consecuencia de la adición de pectina la cual favorece la acumulación de glucosa que posteriormente será transformada en ácido láctico (Araya, 2010).

Congruente a la acidificación y lo expuesto anteriormente se presentan los resultados de producción de ácido láctico a mayor escala en la Figura 2.

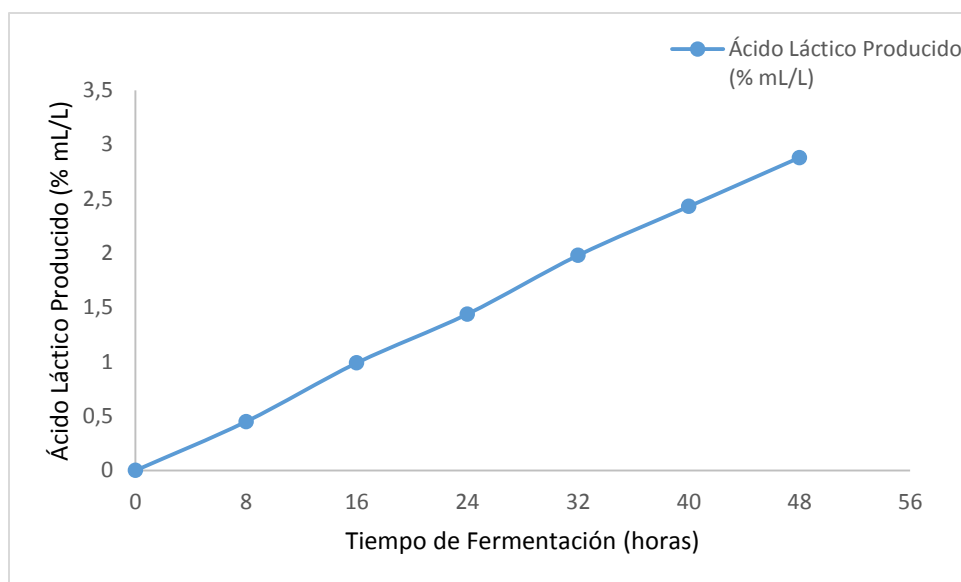


Figura 2 Obtención de Ácido Láctico a Mayor Escala

Para corroborar los resultados mostrados anteriormente (Figura 1 y 2) estadísticamente se constató la relación mediante apelación del método de regresión lineal simple tomando como variables independientes (pH y tiempo de fermentación) y variable dependiente o respuesta (concentración de ácido láctico).

De acuerdo a la Tabla 6 el valor y según (Lahura, 2003) del coeficiente de correlación establece una relación fuerte de la variable dependiente con cada una de las variables independientes es decir que tanto pH y tiempo de fermentación tienen una alta influencia en el aumento de la concentración de ácido láctico con una relación inversa y directa respectivamente con cada variable. Igualmente, con el valor p ANOVA se asegura la existencia una relación significativa entre las variables.

Tabla 6. Análisis de Variables de Seguimiento de la Fermentación

	pH	Tiempo de Fermentación	Coefficiente de Correlación
Concentración de Ácido Láctico	-0,923	0,92	Valor-P ANOVA
	< 0,05	< 0,05	Nivel de Confianza
	95%	95%	

Polimerización del ácido láctico

Oligomerización

Se realizó el seguimiento a la conversión de ácido láctico en oligómero de bajo peso molecular calculando el valor ácido como se observa en la Figura 3 (Pinzón *et al.*, 2006). Adicionalmente en esta etapa se da una reacción de esterificación (Gupta y Kumar, 1987) donde se da la reacción entre un grupo alcohol y un ácido de carácter irreversible puesto que retira agua constantemente, con lo cual la reacción inversa no procede.

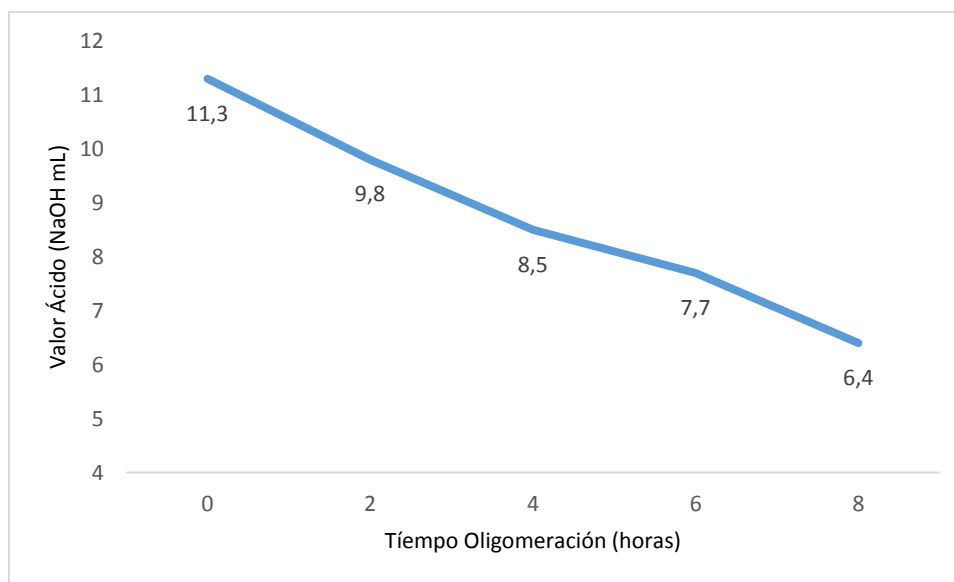


Figura 3. Seguimiento etapa de oligomerización.

El valor ácido obtenido a las ocho horas de reacción fue de 6,4 lo que supone una baja obtención de oligómero. Esta baja obtención de oligómero durante esta etapa puede ser un factor que afecta la calidad y cantidad de biopolímero que se desea obtener así como en sus propiedades físicas, químicas y mecánicas según lo reportado por Tejada (2015).

Policondensación

En la obtención de biopolímero como APL se hace necesario el uso de catalizadores para la optimización de la velocidad de reacción (Romero y Gutiérrez, 2004), adicionalmente los catalizadores al entrar en reacción con el oligómero de bajo peso molecular a biopolímeros de mayor peso molecular (Moon *et al.*, 2002) además de que la activación de los catalizadores con ácidos protónicos previene la decoloración del producto obtenido por ello se da la formación de un líquido viscoso que de acuerdo a lo estipulado por Medina *et al.* (2014) la formación de este líquido se considera como una evidencia cualitativa de la formación de biopolímeros

La cantidad de biopolímero obtenido fue de aproximadamente de 0,2g de un volumen de 50mL, un sólido de características amorfas según Pretula (2016), de coloración amarillenta según Zuluaga (2013) quien obtuvo un producto de color amarillo debido a procesos de degradación térmica; y de textura rugosa al tacto.

4. CONCLUSIONES

Dadas las características contaminantes del mucílago y su potencial de biodegradabilidad, lo convierte en una fuente de materia prima para su aprovechamiento.

El uso de microorganismos con alto potencial de fermentación láctica y el uso del mucílago como sustrato, permite la producción de ácido láctico.

La fermentación realizada bajo condiciones óptimas de temperatura, tiempo de fermentación, concentración inóculo microbiológico y pH, presenta rendimientos y concentraciones finales de ácido láctico comparables a otros procesos reportados en la literatura.

Los rendimientos y productividades obtenidos en producción de ácido láctico, podrían ser mejorados optimizando parámetros de agitación y temperatura del proceso.

El proceso de polimerización del ácido láctico se realizó por el método de policondensación al vacío con catalizador de cloruro de estaño (II) dihidratado activado con ácido bórico; método con el cual no se logra una alta producción de polímero; por el contrario, queda abierta la posibilidad de experimentar y optimizar las condiciones de operación de esta etapa.

Altas concentraciones de ácido láctico en el medio acuoso tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular o microbiológico.

5. RECOMENDACIONES

Evaluar la producción de ácido láctico haciendo uso de diferentes subproductos del beneficio del café como la pulpa o cáscara al ser fuentes en azúcares.

Evaluar diferentes catalizadores orgánicos e inorgánicos, metálicos y no metálicos, así como su activación con otros ácidos protónicos, para la obtención de biopolímero.

Optimizar el proceso de oligomerización se recomienda el uso de equipos más eficientes.

Se recomienda emplear estrategias de remoción del AL del medio acuoso a medida que se va formando, lo cual reduciría su efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular, aumentando a su vez la conversión de sustrato en producto.

Caracterizar químicamente las especies obtenidas en los diferentes procesos

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANACAFÉ. (2009). *Manejo de Subproductos*. Recuperado de https://www.anacafe.org/glifos/index.php?title=Caficultura_ManejoSubproductos#El_Agua_Miel

ANACAFÉ. (2011). *Beneficio Humedo*. Recuperado de https://www.anacafe.org/glifos/index.php/BeneficioHumedo_Subproductos

Aparicio, G. M. (2016). Aislamiento de bacterias lácticas de alimentos lácteos: producción de bacteriocina. 17.

Araya Cloutier, C., Rojas Garbanzo, C., & Velázquez Carillo, C. (2010). *Síntesis de Ácido Láctico, A Través De La Hidrólisis Enzimática Simultánea A La Fermentación De Un Medio Base*

De Un Desecho de Piña (Ananas comosus), Para Uso Como Materia Prima En La Elaboración de Ácido Poliláctico. Revista Iberoamericana de Polímeros, 11(7), 407

- Arias Zabala, M., Henao Navarrete, L., & Castrillón Gutiérrez. (24 de Octubre de 2008). *Producción de Ácido Láctico por Fermentación de Mucílago de Café con Lactobacillus Bulgaricus NRRL-N548. Dyna, 76(158): 147-153*
- Bianchi, M. M., Brambilla, L., Protani, F., Liu, C.-L., Lievense, J., & Porro, D. (2001). *Efficient Homolactic Fermentation by Kluyveromyces lactis Strains Defective in Pyruvate Utilization and Transformed with the Heterologous LDH Gene. Appl. Environ. Microbiol., 67(12), 5621-5625.*
- Bueno, D. Y. (2012). *Síntesis de copolímeros basados en ácido láctico, ácidos dicarboxílicos insaturados y monómeros acrílicos.* Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/6365/>
- Camacho, C. O. (2015). *Caracterización y evaluación de bacterias para producción de bioplástico de origen microbiano utilizando como sustrato agua residual de la industria láctea.* Recuperado de <http://dspace.esoach.edu.ec/handle/123456789/4962>
- Carlos A. Garcia, Guillermo S. Arrázola, Alba M. Durango. (2010). *Producción De Ácido Láctico Por Vía Biotecnológica. Temas agrarios, 15(2), 9-26.*
- CENICAFÉ. (2010). *Los Subproductos del Café: Fuente de Energía Renovable.* Recuperado de <http://www.jotagallos.com/agricola/assets/cenicafe-avance-tecnico-393-subproductos-del-cafe.pdf>
- CENICAFÉ. (31 de 3 de 2016). *Cultivemos café- Manejo de Subproductos.* Recuperado de http://www.cenicafe.org/es/index.php/cultivemos_cafe/manejo_de_subproductos
- Estupiñán, H., Parada, D., Laverde, D., Peña, D. Y., & Vázquez, C. (Septiembre de 2007). *Obtención de Ácido Poliláctico Mediante Policondensación con Catalizador de Cinc Metálico. Scientia et Technica, 1(36).*
- FEDECAFÉ. (2010). *Nariño Denominación de origen.* Recuperado de http://narino.cafedecolombia.com/narino/el_departamento/ubicacion_de_narino_en_colombia/
- FEDECAFÉ. (2018). *Federación Nacional de Cafeteros.* Recuperado de Sala de prensa: https://www.federaciondecafeteros.org/clientes/es/sala_de_prensa/detalle/produccion_de_cafe_de_colombia_aumenta_36_en_junio/
- Güerchia, P. B. (24 de Septiembre de 2015). *Caracterización de bacterias Streptococcus thermophilus aisladas de leche cruda bovina, ovina y caprina.* Obtenido de <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/123456789/8221/1/uy24-17716.pdf>
- Gupta, S. K., & Kumar, A. (1987). *Reaction Engineering of Step Growth. Springer Science & Business Media.*
- Hoffvendahl, K., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). *Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. Enzyme and microbial technology, 26(2-4), 87-107.*

- Iñiguez, A., & Castillo, A. (Junio de 2011). *Obtención de ácido láctico a partir del almidón de papa (Solnum Tuberosum L), como materia pira para la fabricacion de material descartable biodegradable.*
- Lahura, E. (2003). *El coeficiente de correlación y correlaciones espúreas.* Recuperado de <http://www.pucp.edu.pe/economia/pdf/DDD218.pdf>
- Lasprilla, A., Martinez, G., Lunelli, B., Jardini, A., & Filho, R. (2012). *Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices. Biotechnology advances, 30(1), 321-328.*
- Lopez, L., & Torres, C. (2006). *Estudio cuantitativo de bacterias.* Obtenido de Universidad Nacional del Nordeste.
- Medina, J., Garcia, F., Paricaguán, B., Rojas, J., Castro, X., & Lugo, F. (Agosto de 2014). *Obtención de ácido láctico por fermentación del mosto del fruto de cuji (prosopis juloflora) y su posterior poli-condensación con zinc metalico a poli (ácido láctico) (pla).* *Revista INGENIERÍA UC, 21(2).*
- Microbitos, G. (2011). *microbitos blog.* Obtenido de Pruebas bioquímicas primarias: Tinción de GRAM, prueba de catalasa, prueba de oxidasa, prueba de O/F y motilidad: <http://microbitosblog.com/2011/09/27/pruebas-bioquimicas-primarias/>
- Min.Ambiente. (1997). *Politica Producción Más Limpia.* Recuperado de http://www.upme.gov.co/guia_ambiental/carbon/gestion/politica/politica/politica.htm
- Moon, S., Lee, C., Taniguchi, I., Miyamoto, M., & Kimura, Y. (Mayo de 2002). *El Seiver.* Obtenido de Melt/solid polycondensation of l-lactic acid: an alternative route to poly(l-lactic acid) with high molecular weigh. *Polymer, 42(11), 5059-5062.*
- Morales, D. C. (2016). *Selección de estrategias sostenibles para reducir la contaminación de los efluentes líquidos generados en el beneficio de café, Municipio de La Unión Nariño.*
- Parra, R. A. (16 de 06 de 2010). *Review. Bacterias Acido Lactivas: Papel funcional en los alimentos. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, 8(1), 93-105.*
- Pinzón, J. E., Martínez, J. H., Espinosa, A., Pérez, A., & Narváez, P. C. (2006). Polimerización de Ácido (DL) Láctico mediante Policondensación por Fusión Directa. Estudio Cinético de la Etapa de Oligomerización. *Revista colombiana de química, 35(2).*
- Pretula, J. (2016). *Policondensación de diglicerol con H3PO4. Geles reversibles degradables que dan macromoléculas multirreactivas y altamente ramificadas.*
- Proaños, J., & Piñeros Castro, Y. (2014). Evaluación de la producción de ácido láctico a partir de cascarilla de arroz por Lactobacillus delbrueckii.
- Quintero, G. I. (Diciembre de 2010). *Fundamentos del proceso de fermentación en el beneficio del café.* Obtenido de Avances tecnicos. Cenicafe. Recuperado de <https://www.cenicafe.org/es/publications/avt0402.pdf>
- Quintero, J., Acosta, A., Mejía, C., Ríos, R., & Torres, A. (2012). Producción de ácido láctico a través de fermentación de cassava-flourhydrolysate. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia, (65), 139-151*

- Romero, A., & Gutiérrez, J. (2004). *Procesos catalíticos, Catalizadores*. Recuperado de http://www.rac.es/ficheros/discursos/dr_20080825_148.pdf
- Serna Cook, L., & Rodríguez de Stouvenel, A. (2005). *Producción biotecnológica de ácido láctico: estado del arte*. *CYTA-Journal of Food*, 5(1), 54-65.
- Tejada, R. E. (Octubre de 2015). *Obtención de Ácido Láctico por Fermentación de Almidón de Ñame Espino mediante el Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus y el Streptococcus Thermophilus para su uso en la Producción de Ácido Poliláctico*.
- Waldir, E., Mojmir, R., Melzoch, K., Quillama, E., & Egoavil, E. (2007). Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. *Revista Peruana de Biología*, 14(2), 271-276
- Zuluaga, F. (2013). *Algunas aplicaciones del ácido poli-l-láctico*. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 37(142), 125-142.