

**Universidad Nacional
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Escuela de Ciencias Biológicas
Licenciatura en Biotecnología**

Informe Escrito Final

**Obtención de multiproductos con valor agregado mediante procesos
biotecnológicos y químicos a partir de pulpa de café (*Coffea arabica* L.)
deshidratada**

**Proyecto de graduación presentado como requisito parcial para optar por el
grado de Licenciatura en Biotecnología**

**Ana Victoria Elizondo Masís
(304770772)**

**Campus Omar Dengo
Heredia, 2024**

Este trabajo de graduación fue APROBADO por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biotecnología.

JAVIER
ALVARADO
MESEN (FIRMA)

Firmado digitalmente
por JAVIER ALVARADO
MESEN (FIRMA)
Fecha: 2024.01.31
12:39:41 -06'00'

Dr. Javier Alvarado Mesén
Representante, Decano, quien preside

SILVIA MARGOT
MAU INCHAUSTEGUI
(FIRMA)

Digitally signed by SILVIA
MARGOT MAU
INCHAUSTEGUI (FIRMA)
Date: 2024.02.09 11:47:54
-06'00'

Dra. Silvia Mau Incháustegui
Representante de la Dirección de la (ECB)

JOSE ANIBAL
MORA
VILLALOBOS
(FIRMA)

Digitally signed by
JOSE ANIBAL MORA
VILLALOBOS (FIRMA)
Date: 2024.02.06
14:47:53 +01'00'

Dr. J. Aníbal Mora Villalobos
Tutor

JESSICA PAMELA
MONTERO
ZAMORA
(FIRMA)

Digitally signed by
JESSICA PAMELA
MONTERO ZAMORA
(FIRMA)
Date: 2024.02.06
09:41:14 -06'00'

M. Sc. Jéssica Montero Zamora
Asesora

JORENGETH
ABAD
RODRIGUEZ
RODRIGUEZ
(FIRMA)

Firmado digitalmente
por JORENGETH
ABAD RODRIGUEZ
RODRIGUEZ (FIRMA)
Fecha: 2024.01.31
15:12:28 -06'00'

MBA. MPM. Abad Rodríguez Rodríguez
Asesor

VICTOR ADRIAN ALVAREZ VALVERDE (FIRMA)
PERSONA FISICA, CPF-01-1328-0745.
Fecha declarada: 09/02/2024 09:37:21 AM
Contacto: victor.alvarez.valverde@una.ac.cr

M.Sc. Víctor Álvarez Valverde
Invitado especial

Agradecimiento

A mis padres, especialmente, por impulsarme y darme la oportunidad de concluir mis estudios, por todo el amor y el apoyo incondicional que me brindaron durante todos estos años. Gracias por estar para mí en todo momento.

A mi esposo, por ser mi soporte diario en todo este largo proceso, por apoyarme incondicionalmente, por acompañarme día a día y por darme siempre las palabras de aliento necesarias para seguir.

A mi hermana, por ser motivadora, por impulsarme y por siempre darme palabras de ánimo cuando las necesitaba.

A Aníbal Mora Villalobos, mi tutor, por la confianza otorgada para trabajar en sus proyectos desde que ingresé a CENIBiot, por todas las enseñanzas y recomendaciones.

A Jéssica Montero Zamora, mi asesora, por su paciencia, tiempo, dedicación, apoyo, consejos, guía y por compartir su conocimiento conmigo durante mis años en la Unidad de Bioprocesos del CENIBiot.

A Abad Rodríguez Rodríguez, mi asesor, por toda la ayuda, paciencia, enseñanzas y recomendaciones brindadas durante todo este tiempo.

A Silvia Fernández Fernández, por ser mi compañera de laboratorio, por sus consejos, enseñanzas y tiempo compartido en el laboratorio.

A Valeria Leandro Arce, por ser mi compañera de laboratorio, por sus consejos y por su ayuda en las últimas actividades del proyecto para concluirlo a tiempo.

A Jorge Araya Matthey, quien fue investigador del área de Química del CENIBiot, por su paciencia, ayuda, consejos y enseñanzas compartidas.

Al CENIBiot, en especial a la Unidad de Bioprocesos, quienes me recibieron por más de tres años siendo mi primera casa profesional, por facilitarme el uso de los equipos e insumos necesarios para el desarrollo del proyecto. Al fondo de becas CENAT-CONARE por financiar el proyecto y por darme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente en este laboratorio.

A CoopeTarrazú, especialmente a Jimmy Porras Barrantes, por proporcionar la pulpa de café utilizada en el proyecto y por brindarme la confianza de ser parte de su equipo en el departamento de Investigación, Desarrollo e Innovación de la cooperativa.

A Roberto Naranjo Zúñiga, coordinador del CeDAO de CoopeTarrazú, por sus consejos y enseñanzas durante todo este tiempo en la cooperativa.

Dedicatoria

A mis padres Ana y Alvar.

A mi esposo Steven.

A mi hermana Amanda.

Por todo el apoyo incondicional brindado durante estos años.

Índice

| | |
|--|------|
| Miembros del Tribunal..... | I |
| Agradecimiento..... | II |
| Dedicatoria..... | III |
| Índice..... | IV |
| Índice de cuadros..... | VI |
| Índice de figuras..... | VII |
| Resumen..... | VIII |
| Agradecimiento..... | II |
| Dedicatoria..... | III |
| Índice de cuadros | VI |
| Índice de figuras..... | VII |
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1. Antecedentes | 1 |
| 1.2. Justificación..... | 6 |
| 1.3. Planteamiento del problema a investigar | 9 |
| 1.4. Objetivos | 10 |
| 1.4.1. Objetivo general | 10 |
| 1.4.2. Objetivos específicos..... | 10 |
| 2. Marco Metodológico..... | 11 |
| 2.1. Objeto de estudio..... | 11 |
| 2.2. Área de estudio..... | 11 |
| 2.3. Diseño de la investigación..... | 11 |
| 2.3.1. Determinación de cinética de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Bacillus subtilis</i> a partir de extractos de pulpa de café deshidratada..... | 12 |
| 2.3.2. Cuantificación de polifenoles totales presentes en la pulpa de café deshidratada..... | 16 |
| 2.3.3. Caracterización de la lignina presente en la pulpa de café deshidratada..... | 18 |
| 2.4. Descripción del análisis..... | 22 |
| 3. Resultados | 23 |
| 3.1 Determinación de cinética de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Bacillus subtilis</i> a partir de extractos de pulpa de café deshidratada..... | 23 |
| 3.2 Cuantificación de polifenoles totales presentes en la pulpa de café deshidratada | 30 |

| | |
|---|----|
| 3.3 Caracterización de la lignina presente en la pulpa de café deshidratada | 33 |
| 4. Discusión..... | 35 |
| 5. Conclusiones | 46 |
| 6. Recomendaciones | 48 |
| 7. Fuentes de financiamiento | 49 |
| 8. Conflictos de interés | 49 |
| 9. Referencias..... | 50 |

Índice de cuadros

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Productos con valor agregado obtenidos a partir de pulpa de café deshidratada..... | 4 |
| Cuadro 2. Medios de cultivo para las fermentaciones con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Bacillus subtilis</i> en microplaca y matraz y su respectiva composición (g/L) | 15 |
| Cuadro 3. DO máx y tasa de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio PDH suplementado en microplaca de 96 pocillos..... | 24 |
| Cuadro 4. DO máx y tasa de crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> en medio PDH suplementado en microplaca de 96 pocillos..... | 25 |
| Cuadro 5. DO máx de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio PDH suplementado en matraz..... | 26 |
| Cuadro 6. Consumo de glucosa (g/L) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio PDH suplementado..... | 27 |
| Cuadro 7. DO máx de <i>Bacillus subtilis</i> en medio PDH suplementado en matraz..... | 28 |
| Cuadro 8. Consumo de sacarosa (g/L) de <i>Bacillus subtilis</i> en medio PDH suplementado..... | 29 |
| Cuadro 9. Concentración de polifenoles totales (mg EAG/g \pm SD) mediante la prueba colorimétrica Folin-Ciocalteu con los métodos de baño ultrasónico y maceración..... | 33 |
| Cuadro 10. Masa (g) de lignina recuperada del licor negro obtenido de la extracción en medio básico con NaOH 2 mol/L..... | 34 |
| Cuadro 11. Porcentaje de extractivos hidrosolubles y liposolubles presentes en la PDH con tres tratamientos..... | 34 |
| Cuadro 12. Porcentaje de ceniza, lignina y carbohidratos estructurales presentes en la PDH con tres tratamientos..... | 35 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Curva de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con medio PDH suplementado en microplaca de 96 pocillos | 24 |
| Figura 2. Curva de crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> con medio PDH suplementado en microplaca de 96 pocillos..... | 25 |
| Figura 3. Curva de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con medio PDH suplementado en matraz..... | 26 |
| Figura 4. Consumo de glucosa (g/L) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio PDH suplementado..... | 27 |
| Figura 5. Curva de crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> con medio PDH suplementado en matraz. | 28 |
| Figura 6. Consumo de sacarosa (g/L) de <i>Bacillus subtilis</i> en medio PDH suplementado..... | 29 |
| Figura 7. Concentración de polifenoles totales (mg EAG/ g \pm SD) mediante la prueba colorimétrica Folin-Ciocalteu para el método de baño ultrasónico con los solvente etanol, metanol y acetona..... | 31 |
| Figura 8. Concentración de polifenoles totales (mg EAG/ g \pm SD) mediante la prueba colorimétrica Folin-Ciocalteu para el método de maceración con los solventes etanol, metanol y acetona..... | 32 |

Resumen

La pulpa de café es un subproducto obtenido como desecho principal en el proceso del beneficiado húmedo del café. Existen compuestos bioactivos que pueden ser extraídos de la pulpa de café deshidratada (PDH) para dar un valor agregado a este desecho. Se realizó un pretratamiento a la PDH donde se obtuvo un extracto líquido y un sustrato sólido. El extracto líquido se utilizó como medio de cultivo y fue suplementado con diferentes nutrientes. PDH + glucosa y PDH + triptona presentaron mejores cinéticas de crecimiento en microplaca con *S. cerevisiae* y *B. subtilis*, respectivamente. A nivel de matraz la DO máx para ambos microorganismos se presentó en el medio PDH + Extracto de levadura. *S. cerevisiae* presentó un consumo de glucosa de 24.76 g/L en el medio de PDH + Glucosa y *B. subtilis* consumió 60.92 g/L de sacarosa en el medio puntilla de arroz. El extracto sólido se utilizó para extraer y cuantificar polifenoles totales y para realizar una extracción y caracterización del material lignocelulósico. La mayor concentración de polifenoles totales se obtuvo con el método de maceración para tres mezclas acuosas de solventes orgánicos: etanol, metanol y acetona. La mezcla acuosa de acetona presentó la mayor cuantificación de polifenoles totales, 6.062 mg EAG/g de PDH. En la caracterización del material lignocelulósico de la PDH se obtuvo un 17.3% de lignina, 28% de hemicelulosa, 41.1% de celulosa y 0.7% de cenizas. La PDH puede utilizarse como medio de cultivo para la obtención de biomasa microbiana y lograr obtener metabolitos secundarios, además como fuente para extraer compuestos bioactivos como los polifenoles totales utilizados como antioxidantes, además de material lignocelulósico, el cual puede ser utilizado como materia prima para realizar aislantes, pegamentos, empaques, entre otros.

1. Introducción

La pulpa de café es uno de los principales subproductos de los cultivos agroindustriales del país, es procesada y utilizada en su mayoría como abono orgánico. Actualmente gracias a la aplicación de procesos biotecnológicos y a la composición química de la pulpa de café, puede ser aprovechada en la obtención de multiproductos con valor agregado. Los azúcares fermentables, los compuestos fenólicos totales y el material lignocelulósico, son ejemplos de componentes que se pueden obtener a partir de la pulpa de café. Los componentes mencionados anteriormente son extraídos de la pulpa de café con el fin de realizar un manejo adecuado del residuo y otorgarle valor agregado, así como disminuir la contaminación ambiental causada por dicho subproducto del beneficiado del café.

1.1. Antecedentes

La expansión de los cultivos agrícolas ha acelerado paralelamente el volumen de las emisiones y los residuos generados por esta actividad, constituyendo un serio problema a nivel mundial (Caicedo, Ortiz y Valderrama, 2022). Los subproductos son bienes secundarios obtenidos en un proceso industrial, los cuales son comercializados por poseer un valor económico (Salomé-Martínez y Jaramillo-Gamboa, 2023). Desde los años 70's los profesionales en biotecnología han dirigido sus estudios al aprovechamiento de los residuos a través de procesos biotecnológicos. El desarrollo de dichos procesos tiene la finalidad de conservar, desintoxicar y reutilizar o reciclar los residuos agrícolas. Además, permiten obtener productos que posteriormente serán utilizados en otros procesos industriales (Casas-Martínez, Fuquen-Fúquene, Gómez-Rodríguez, 2022). La fermentación de azúcares llevada a cabo por microorganismos es uno de los procesos industriales mencionados, mediante los cuales se pueden generar productos biotecnológicos (Cadena y Córdoba, 2022). Dentro de los productos se encuentran vitaminas, enzimas, biocombustibles, biofertilizantes, aminoácidos, ácidos orgánicos, antibióticos, suplementos alimenticios, biopolímeros, entre otros (Rojas y Hernández, 2022).

Debido a la demanda de los subproductos agrícolas surge la alternativa de generar multiproductos valorizables a partir de un mismo subproducto. Las plantas multiproducto encargadas de la producción de bioproductos cuentan con instalaciones que permiten la optimización de procesos, decrecen los costos de las inversiones de productos nuevos, lo que facilita una inserción rápida en el mercado (Apezteguía-Rodríguez et al., 2020).

La biomasa lignocelulósica proveniente de cultivos como caña de azúcar, palma y banano es empleada como materia prima en procesos de conversión química, térmica y biológica para producir energía, bioetanol, biogás, carbón, bioproductos, entre otros (Clauser, 2019). Sin embargo, en estos procedimientos se obtienen subproductos que serán utilizados posteriormente en procesos multiproducto para obtener productos químicos verdes. Tal es el caso de la celulosa y la hemicelulosa, que son subproductos formados a partir del bagazo de caña de azúcar en la producción de bioetanol. El glicerol es otro ejemplo de subproducto obtenido en la producción de biodiesel. Este puede adquirir valor económico al emplearse en procesos fermentativos (Mora-Villalobos et al., 2020; Santos, 2020).

El proyecto Valorisation of Biorefinery By-Products (Valor-Plus) desarrollado en el período del 2013-2017 por la Asociación Española de Bioempresas (Asebio), es un ejemplo de aplicación de métodos biotecnológicos para convertir subproductos de la biorrefinería en bioproductos. En este proyecto se valorizó la hemicelulosa, la lignina y el glicerol, obteniendo a partir de estos compuestos prebióticos, bioplásticos y ácido láctico, respectivamente. Además, mejoró la eficiencia económica y productiva, disminuyendo el deterioro ambiental gracias al uso completo de la biomasa (Asebio, 2018).

Por su parte, en la mayoría de los países donde la agricultura es una de las actividades económicas principales se generan numerosas cantidades de residuos. Las toneladas de pulpa de café que se obtienen al procesar este cultivo por el beneficiado húmedo son un ejemplo de esta situación (Díaz, 2022). La pulpa de café tradicionalmente es utilizada para producir fertilizantes,

compost y en la alimentación del ganado por su alto valor nutricional (Flórez y Rosales, 2018). Sin embargo, estas aplicaciones solo usan cierta parte de los desechos disponibles a partir de la pulpa. Esto debido al contenido de cafeína, taninos y polifenoles, los cuales a concentraciones elevadas son tóxicos tanto para los animales como para el ambiente (Serna-Jiménez et al., 2018). Para contrarrestar estos efectos tóxicos se ha aplicado la desintoxicación de la pulpa. Este proceso garantiza la obtención de productos fermentados con un menor impacto ambiental, con aplicaciones potenciales y con valor añadido (Santos et al., 2020). En este sentido, Santos et al. (2020) en su investigación en Francia realizaron una fermentación alcohólica como pretratamiento para desintoxicar la pulpa de café antes de reutilizarla en la agricultura. Este proceso permitió obtener un 50 % menos de cafeína en los residuos de la pulpa, además, se registró un 64 % menos de pulpa considerada como desecho.

Se ha demostrado que la pulpa de café constituye un sustrato con potencial industrial gracias a la obtención de diferentes bioproductos valorizables. Tal es el caso de Nguyen et al., (2017) quienes desarrollaron un proceso multiproducto para obtener D-manosa y bioetanol a partir de residuos de café. Diversos investigadores a nivel mundial han empleado la pulpa de café en procesos biotecnológicos para obtener diferentes productos con valor agregado como azúcares fermentables, compuestos fenólicos totales y lignina. En el cuadro 1 se muestran algunos estudios en los que se obtuvieron los productos antes mencionados.

Cuadro 1. Productos con valor agregado obtenidos a partir de pulpa de café deshidratada

| Producto | Metodología empleada | Resultados obtenidos | Bibliografía |
|------------------------------|--|--|--|
| Azúcares fermentables | Se utilizó <i>Bacillus coagulans</i> para fermentaciones en biorreactores a escalas de laboratorio (2 L) y piloto (50 L) para producir ácido láctico a partir de hidrolizados de pulpa de café. Se cuantificó la concentración de azúcares reductores al inicio y al final de fermentaciones alcohólicas con extractos de pulpa de café y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . | - Recuperación del 70 a 80 % de los azúcares fermentables disponibles. - Azúcares fermentables recuperados: glucosa 20 g/L, xilosa 15 g/L, sacarosa 6-11 g/L y arabinosa 6-10 g/L - Concentración de azúcares reductores: 89.51 g/L al inicio y 72.46 g/L al final de la fermentación. - Consumo de azúcares reductores: 17.05 g/L. | Pleissner et al., 2016. Castillo et al., 2018. |
| Polifenoles totales | Se realizaron extracciones acuosas a seis muestras de pulpa seca de diferentes variedades y a una bebida comercial producida en Suiza llamada Cáscara. Se realizaron extracciones simples con mezclas de etanol: agua al 15:85 y 20:80 para extraer polifenoles totales. | Variedad de café Borbón del Congo con 9.17 mg equivalentes de ácido gálico (EAG) / g de materia seca. Se obtuvieron 26 ± 4 mg GAE / g de materia seca de polifenoles totales. | Heeger et al., 2017. Ramón-Gonçalves et al., 2019. |
| Lignina | Se realizó una caracterización fisicoquímica de residuos agroindustriales de cascarilla de arroz y de café y se analizaron los porcentajes de lignina. Se utilizaron residuos agrícolas provenientes de cinco tipos de plantas: piña, café, henequén, candelilla verde y tule, para determinar el rendimiento porcentual de lignina. Se utilizó un tratamiento ácido y uno alcalino para la deslignificación utilizando pulpa de café. | Se obtuvo un valor experimental de 15.93 % de lignina. El café obtuvo el mayor porcentaje de lignina con un 45.39 %, más alto que el reportado para las coronas de piña (30.91 %). Se obtuvo un porcentaje de lignina para el tratamiento ácido y alcalino de 42.5 y 40.7 %, respectivamente. | Arias y Meneses, 2016. Moreno et al., 2015. Castillo et al., 2018. |

Fuente: Elaboración propia

En Costa Rica la mayoría de los residuos agrícolas orgánicos producto de los cultivos de arroz, caña de azúcar, piña, palma africana, banano y café son empleados en abonos orgánicos para el suelo, a nivel energético y como sustrato en alimentos para animales (Hernández-Chaverri y Prado, 2018). Según Chacón (2014) la mayoría de los estudios realizados en el país que utilizan residuos de pulpa de café se enfocan en el uso de esta biomasa para el composteo y como generadora de energía debido a su potencial renovable. Para brindar otras alternativas al uso de estos desechos en la línea energética, en el 2013 se creó el proyecto “Uso de los residuos agrícolas orgánicos como fuente de energía: aprovechamiento de recursos y reducción de gases de efecto invernadero”, entre el Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica y la Fundación FITTACORI (Coto, 2013).

Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado métodos más eficientes que generen mayores fuentes económicas en el uso de este subproducto. Rojas (2015) utilizó residuos de café como sustrato para la producción de biogás en un biodigestor anaerobio semicontinuo. Obtuvo un porcentaje de lignina presente en la pulpa con un rendimiento de 35.8 %, valor que se puede considerar como eficiente en cuanto a la obtención de este compuesto, ya que es bastante alto comparado con los reportados en rastrojos de maíz (18.6%), boñiga (4.6%) y gallinaza (4.6%). Además, Jiménez (2016) desarrolló un análisis cromatográfico para cuantificar compuestos polifenólicos como el ácido cafeico, el ácido ferúlico y el ácido 5-cafeoilquínico. En sus resultados se reportaron porcentajes de recuperación en la pulpa seca de 99.0 %, 76.4 % y 77.7 %, respectivamente. A pesar de todos los esfuerzos e investigaciones realizadas hasta el momento, no existen registros amplios sobre la obtención de multiproductos a partir de la pulpa de café en el país, como sí se ha evidenciado para la caña de azúcar.

El uso de la pulpa de café para la obtención de productos múltiples es una alternativa viable. Debido a que garantiza la optimización de procesos, reduce el deterioro ambiental y se vuelve económicamente rentable en el mercado. Por esta razón, se considera de suma importancia ampliar las investigaciones en las que se utilice la pulpa de café como materia prima en procesos biotecnológicos y químicos para la obtención de productos múltiples.

1.2. Justificación

En Costa Rica la mayoría del café es procesado por la vía húmeda, en este proceso se remueve la pulpa de las cerezas de café para posteriormente limpiar y clasificar los granos (Gómez, 2019). Durante el proceso húmedo se da origen a diversos subproductos del café considerados como residuos dentro de los cuales se encuentra la pulpa de café (Janissen y Huynh, 2018). Se estima que sólo un 9 % del volumen total de la fruta es utilizado en la producción de la bebida, el volumen restante es clasificado como subproducto. La pulpa de café equivale al 40 % en peso seco de la fruta (Terán et al., 2023). Según el ICAFE (2015) por cada fanega¹ de café procesada en el país se producen 105 kg de pulpa de café. En la producción de 150 fanegas que equivalen aproximadamente a 36 m³, se producen alrededor de 15 782 kg de pulpa. Además, se estima que por cada kg de cerezas de café se obtienen aproximadamente 430 g de pulpa de café (Heeger et al., 2017).

Los residuos provenientes del despulpado y traslado del café utilizando agua producen alrededor del 72 % de la contaminación total generada por este desecho y el 28 % es producto de las mieles obtenidas en el lavado del café (Terán et al., 2023). Dichos residuos provocan un deterioro en la calidad del suelo y en las aguas residuales que posteriormente pueden llegar a los ríos. Lo anterior se debe a los compuestos bioactivos presentes en la pulpa de café que pueden causar problemas ecotoxicológicos (Rosas, 2019). Además, presentan una degradación biológica difícil e incrementan las emisiones de gases de efecto invernadero. Algunos de los compuestos bioactivos constituyentes de la pulpa de café pueden ser fitotóxicos, afectando la germinación de semillas y el crecimiento de las plantas (Janissen y Huynh, 2018).

Cuando los residuos del despulpado y las aguas mieles llegan a los cuerpos de agua los microorganismos presentes generan una demanda de oxígeno mayor para poder descomponer dichos residuos. Además, por el exceso de nutrientes se produce eutrofización, imposibilitando la

¹ Una fanega de café equivale a 20 cajuelas, aproximadamente 253 Kg de café fruta. Una cajuela representa entre 11 y 13 kg de café. (ICAFE, 2015)

vida de los organismos en estos ecosistemas por los bajos niveles de oxígeno (Serna-Jiménez, 2018). Las altas concentraciones de materia orgánica presentes en los cuerpos de agua receptores ocasionan un aumento en la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) y en la Demanda Química de Oxígeno (DQO) afectando el equilibrio en los ecosistemas acuáticos (Magoni et al., 2018). Según La Gaceta 55, Alcance 8, decreto N.º 33601-MINAE-S (2007) los límites máximos permisibles para las aguas residuales producto del beneficiado de café en Costa Rica son: para DBO 700 mg/L, para DQO 1400 mg/L y para Sólidos Suspendidos Totales (SST) 500 mg/L. Fernández y Springer (2008) realizaron mediciones de estos parámetros en los ríos Grande y Cacao, Alajuela, Costa Rica, donde tres beneficios vierten las aguas tratadas a dichos ríos. Para DBO obtuvieron 1570 mg/L, mientras que para DQO 3860 mg/L y para SST 5814 mg/L, todos estos parámetros se encuentran por encima de los valores permitidos por el Ministerio de Ambiente y Energía de Costa Rica (MINAE).

A pesar de los problemas ambientales que genera la pulpa de café si se vierte a cielo abierto, esta tiene el potencial de ser materia prima gracias a los componentes bioactivos y químicos que posee (Serna-Jiménez et al., 2018). La pulpa de café es rica en nutrientes como azúcares reductores, cafeína, proteínas y fibras, además, cuenta con elementos como nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, sodio, magnesio, hierro, entre otros. Los compuestos fenólicos totales constituyen otro grupo de interés presente en la pulpa. Dentro de este se encuentran polifenoles, ácidos clorogénicos y cafeicos y taninos (Fierro-Cabrales et al., 2018).

Por su parte, para manejar adecuadamente este residuo agrícola se ha puesto énfasis en la biotecnología. La Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE) define la biotecnología como “la aplicación de la ciencia y la tecnología a los organismos vivos, sus productos o modelos, para alterar materiales vivos o muertos para la producción de conocimiento, bienes y servicios” (OCDE, 2002). Esta ciencia a través de los años se ha desarrollado en diferentes áreas, desde la salud, los procesos industriales, el medio ambiente, la agricultura, entre otros. Aunado a esto, se considera que con la inserción de la biotecnología industrial y sus aplicaciones se ha logrado desarrollar nuevos productos, optimizar procesos ya

existentes y reducir el impacto ambiental, gracias al uso de materias primas renovables (Iglesias-Osores, 2020). Por su parte, la biotecnología ambiental ayuda a disminuir o contrarrestar los efectos de actividades industriales percibidos en el medio ambiente (Cardoso y Gouttefanjat, 2022). El tratamiento de residuos, por ejemplo, es una aplicación que pone en práctica los alcances tanto de la biotecnología industrial como de la ambiental. Con la conversión de desechos y residuos agrícolas, se disminuye la contaminación ambiental y se genera una serie de productos a partir de la biomasa completa (Vargas y Pérez, 2018). Tal es el caso del uso de la pulpa de café, uno de los subproductos sólidos de la industria cafetalera.

La mayoría de los compuestos antes mencionados que constituyen la pulpa de café pueden ser extraídos y utilizarse como materia prima en la obtención de multiproductos. Estos productos poseen un interés biotecnológico y posteriormente pueden ser utilizados en procedimientos industriales (Pillaca, 2023). Estos procesos están relacionados con las industrias farmacéutica y alimentaria principalmente (Serna-Jiménez et al., 2018). Los compuestos fenólicos tienen una función antioxidante natural, la cual impide el daño de tejidos generado por los radicales libres causando daño oxidativo en las células (Siqueira-Palmeri, et al., 2018) y provocando enfermedades cardiovasculares como por ejemplo la presión arterial, inflamatorias, neurodegenerativas y hepáticas (Martínez-Alemán et al., 2019). Los compuestos fenólicos, principalmente el ácido clorogénico se encuentra en mayor proporción en la pulpa de café (42.2 % de los compuestos fenólicos totales). El ácido clorogénico puede utilizarse como materia prima en la producción de colorantes, además se ha utilizado en la industria alimentaria y cosmética para la formulación de diferentes productos gracias a sus ingredientes bioactivos. El ácido clorogénico que se comercializa para dichas aplicaciones se encuentra en cantidades de 250 mg y 1 y 5 g con un precio de 35.47, 126.18 y 390.43 dólares estadounidenses, respectivamente (Sigma-Aldrich, 2020). Los polifenoles poseen también función antimicrobiana, la cual ha sido poco estudiada hasta el momento. Sin embargo, se ha demostrado que el ácido quínico, el ácido málico, los ácidos clorogénicos y la cafeína son los principales compuestos presentes en la pulpa de café que muestran un efecto antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (Chaves-Ulate y Esquivel-Rodríguez, 2019).

Por su parte, en la industria alimentaria se emplean los azúcares fermentables extraídos de la pulpa de café. Estos son empleados en la obtención de ácido butírico, ácido láctico y etanol. Estos dos últimos son utilizados en la producción de productos lácteos y de vinos y cervezas, respectivamente (Arteaga y Casiano, 2018). Además, en algunos casos la pulpa de café ha sido aprovechada en la producción de biocombustibles. Al ser un residuo agrícola lignocelulósico permite la obtención de bioetanol, biobutanol y biogás. La pulpa de café constituye una fuente de energía renovable por lo que disminuye la emisión de gases de efecto invernadero, siendo amigable con el medio ambiente (Burgos-Arcos y Sablón-Cossío, 2022). Adicionalmente a partir de este residuo se extrae la lignina, la cual es utilizada en la producción de papel, de dispersantes para cemento, polimezclas, adhesivos, como materia prima en la producción de compuestos químicos como vainillina, endulzante xilitol, entre otros (Mendoza, 2016). La lignina tipo Kraft es utilizada para obtener compuestos químicos de base aromática y biocombustibles. Este producto en el mercado se comercializa en presentaciones de 100 y 500 gramos con un precio de 62.49 y 216.64 dólares estadounidenses, respectivamente (Sigma-Aldrich, 2020).

Por lo tanto, el propósito de este trabajo consiste en la búsqueda de alternativas para el aprovechamiento completo de la pulpa de café. Las cuales van dirigidas a la obtención de multiproductos con valor agregado a partir de las toneladas de pulpa de café que se procesan a través del beneficiado húmedo en el país. El uso completo de este residuo permitiría la obtención de una gran variedad de productos biotecnológicos a partir del desarrollo tecnológico mediante el fraccionamiento y la conversión de esta biomasa a diversos productos.

1.3. Planteamiento del problema a investigar

Debido a la gran cantidad de pulpa de café producida por la vía del beneficiado húmedo, sus limitadas aplicaciones, los componentes presentes en la pulpa de café y el uso de procesos biotecnológicos en el aprovechamiento de desechos agrícolas, surge la siguiente pregunta:

¿Cómo desarrollar un proceso multiproducto para obtener productos con valor agregado a partir de la pulpa de café (*Coffea arabica* L.) deshidratada?

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Desarrollar a nivel de prueba de concepto un proceso multiproducto a partir de la pulpa de café (*Coffea arabica* L.) deshidratada mediante la aplicación de procesos biotecnológicos y químicos para la obtención de productos con valor agregado.

1.4.2. Objetivos específicos

1. Determinar la cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y de *Bacillus subtilis* en extractos de pulpa de café deshidratada.
2. Cuantificar la cantidad de polifenoles totales presentes en la pulpa de café deshidratada mediante el método colorimétrico Folin-Ciocalteu.
3. Determinar la cantidad de lignina purificada presente en la pulpa de café deshidratada mediante extracciones alcalinas.

2. Marco Metodológico

2.1. Objeto de estudio

Esta investigación se realizó con residuos de pulpa de café (*Coffea arabica* L.) deshidratada obtenidos a partir de granos procesados por la vía húmeda. Estos residuos los proporcionó la cooperativa CoopeTarrazú R. L., ubicada en el cantón de Tarrazú, San José, Costa Rica. Esta es una cooperativa de caficultores que se dedica a procesar y vender café producido de forma sostenible, por lo que generan numerosos sacos de residuos de pulpa de café. Según el ICAFE (2015) por cada fanega de café procesada se producen aproximadamente 105 kg de pulpa de café, para la cosecha del periodo 2022/2023 se generaron aproximadamente 200 mil toneladas de pulpa de café.

2.2. Área de estudio

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de la Unidad de Bioprocesos del Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot) el cual pertenece al Centro Nacional de Alta Tecnología (CeNAT-CONARE) San José, Costa Rica. El CENIBiot trabaja en el escalamiento de procesos biotecnológicos con el objetivo de potenciar el desarrollo de la biotecnología en la región.

2.3. Diseño de la investigación

En el marco de la definición de procesos multiproducto mencionada anteriormente. La presente metodología se inició a partir de la pulpa de café deshidratada (PDH), de manera que se

siguió un proceso integrado para obtener diversos productos con valor agregado a partir de esta misma biomasa.

Del material brindado por la cooperativa aproximadamente 12 kg se secaron en horno a 60 °C en bandejas de aluminio por 48 horas, posteriormente la PDH seca fue molida a 2 mm en un molino de cuchillas en el Laboratorio de Investigación y Tecnología de Polímeros (POLIUNA), Escuela de Química de la Universidad Nacional, con el material obtenido se realizaron los respectivos ensayos.

2.3.1. Determinación de cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y *Bacillus subtilis* a partir de extractos de pulpa de café deshidratada

Para la determinación de las cinéticas de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y *Bacillus subtilis* a partir de extractos de PDH se utilizó la metodología de Montero-Zamora et al. (2020) con algunas modificaciones.

Microorganismos

Las cepas de los microorganismos: *Saccharomyces cerevisiae* y *Bacillus subtilis*, a utilizar para las cinéticas de crecimiento en microplaca y en matraz fueron proporcionadas por CoopeTarrazú R.L. A partir de las cepas proporcionadas se multiplicaron los cultivos en placas de agar comercial para obtener las colonias de los microorganismos. Para la levadura *S. cerevisiae* se utilizó el medio Papa Dextrosa Agar (PDA) y para la bacteria *B. subtilis* se utilizó el medio Lysogeny-Broth (LB) agar, los cultivos se incubaron a 30°C por 24 horas. Los inóculos de los microorganismos se realizaron 24 horas después de realizada la multiplicación de estos, en tubos cónicos plásticos de 15 mL estériles con 3 mL del medio de cultivo Papa

Dextrosa Broth (PDB) y LB Broth y con una colonia de *S. cerevisiae* y *B. subtilis* y, respectivamente, con un tiempo de incubación de 24 horas, a 200 rpm, a 30 °C.

Procesamiento de la pulpa de café deshidratada

Se realizó un pretratamiento con agua caliente presurizada (Liquid Hot Water, LHW) a la PDH molida, la biomasa se colocó en un recipiente con agua caliente (90-100°C) durante 20 minutos en reposo para la extracción de compuestos solubles en agua (López et al., 2018). Posterior al tiempo de extracción, en la fase líquida de la extracción se encuentran los azúcares fermentables y otros compuestos solubles en agua. Posteriormente se realizó una filtración por prensado para separar ambas fases de la extracción, la fase líquida de la sólida, además de eliminar los demás compuestos que no son de interés. El líquido obtenido se filtró por papel filtro Whatman 1, seguidamente se centrifugó por 5 minutos a 2500 revoluciones por minuto (rpm). El sobrenadante se filtró utilizando materiales esterilizados por una membrana de 0.45 µm y posteriormente por 0.2 µm para garantizar que en el extracto no existiera presencia de microorganismos o de células en estado vegetativo. Finalmente, el extracto de PDH se guardó a 4 °C, este extracto se denominó “extracto líquido” y fue utilizado para los ensayos en microplaca y matraz. El extracto sólido producto de la extracción mencionada anteriormente se utilizó para la extracción y cuantificación de polifenoles totales y para la caracterización de lignina.

Cinética de crecimiento en microplaca con *Saccharomyces cerevisiae* y *Bacillus subtilis*

Las fermentaciones se realizaron en una microplaca de 96 pozos, en cada pozo de la microplaca se depositó un total de 250 µL que incluye el volumen del inóculo previamente obtenido y el volumen restante del medio de cultivo. El volumen del inóculo utilizado en cada fermentación fue calculado de manera que se llegara a una densidad óptica inicial de 0.05 en cada uno de los pozos leyendo a una longitud de onda de 600 nm. Además, se determinó la cinética de crecimiento de los microorganismos con las siguientes condiciones: 24 horas, 30 °C y

200 rpm. Posteriormente se realizó la lectura de densidad óptica (DO) en un lector de microplacas Biotek, Winooski, VT, USA a una longitud de onda de 600 nm (DO 600).

En las fermentaciones en microplaca los medios Extracto de levadura Peptona Dextrosa (YPD, por sus siglas en inglés) Broth y LB Broth fueron los medios utilizados como control positivo (C+), el extracto de PDH se utilizó como control negativo (C-). El medio estudiado en los tratamientos fue el extracto de PDH suplementado con diferentes componentes, uno por cada tratamiento. Para la cinética de *S. cerevisiae* el extracto de PDH se suplementó con glucosa, extracto de levadura y peptona bacteriológica, para la cinética de *B. subtilis* el extracto de PDH se suplementó con triptona, cloruro de sodio y extracto de levadura. En total se utilizaron tres tratamientos en cada cinética. En el cuadro 3 se presentan los tratamientos utilizados para las fermentaciones en microplaca y matraz con los microorganismos seleccionados. Posteriormente se seleccionaron los mejores tratamientos y las fermentaciones se escalaron a matraces de 250 mL.

Cuadro 2. Tratamientos para las fermentaciones con *Saccharomyces cerevisiae* y *Bacillus subtilis* en microplaca y matraz y su respectiva composición (g/L)

| Medio de cultivo | Composición (g/L) |
|------------------|---|
| YPD Broth | Glucosa 20, extracto de levadura 10, peptona bacteriológica 20 |
| LB Broth | Triptona 10, cloruro de sodio 10, extracto de levadura 5 |
| PDH | Pulpa de café deshidratada *Composición no determinada |
| PDH + Glu | Pulpa de café deshidratada suplementada con glucosa 20 |
| PDH + EL | Pulpa de café deshidratada suplementada con extracto de levadura 10 |
| PDH + Pep | Pulpa de café deshidratada suplementada con peptona bacteriológica 20 |
| PDH + Trip | Pulpa de café deshidratada suplementada con triptona 10 |
| PDH + NaCl | Pulpa de café deshidratada suplementada con cloruro de sodio 10 |
| PDH + EL | Pulpa de café deshidratada suplementada con extracto de levadura 5 |
| MPA | Puntilla de arroz 15, glucosa 12 |

PDH: pulpa de café deshidratada, Glu: glucosa, EL: extracto de levadura, Pep: peptona bacteriológica, Trip: triptona, NaCl: cloruro de sodio, MPA: medio puntilla de arroz
Fuente: Elaboración propia

Cinética de crecimiento en matraces con *Saccharomyces cerevisiae* y *Bacillus subtilis*

Se realizaron dos fermentaciones en matraces de 250 mL, una para cada microorganismo y cada tratamiento seleccionado se realizó por triplicado en un volumen de 50 mL. Para cada fermentación se realizaron dos inóculos desfasados, el primero a las 8 am y el segundo a las 2 pm, esto con el fin de obtener dos cinéticas desfasadas para cada microorganismo y obtener mayor cantidad de puntos de muestreo.

En la cinética de crecimiento en matraz con *S. cerevisiae* se utilizó PDH suplementada con glucosa y extracto de levadura. En cuanto a la cinética de crecimiento en matraz con *B. subtilis* se utilizó PDH suplementada con triptona, cloruro de sodio y extracto de levadura.

Además, en cada fermentación se utilizó el medio de PDH sin suplementar como C- y como medio de referencia puntilla de arroz (MPA). Ambas fermentaciones se incubaron a 30 °C, a 200 rpm y por 24 horas. Cada 3 horas se tomó una muestra de 2 mL de cada matraz, 1.5 mL se filtraron por 0.45 µm y el filtrado se depositó en viales para determinar posteriormente el consumo de azúcares fermentables, 0.5 mL se utilizaron para determinar la densidad óptica leída a 600 nm. La lectura de DO 600 se realizó en el lector de microplacas, cuando la lectura de DO obtenida fue mayor a 1 se realizaron diluciones de 1:3 y de 1:6 para que el valor fuera reconocido por el lector y no fuera un dato erróneo. El consumo de azúcares (g/L) se realizó en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés), para la fermentación con *S. cerevisiae* se determinó el consumo de glucosa y para la de *B. subtilis* se determinó el consumo de sacarosa.

2.3.2. Cuantificación de polifenoles totales presentes en la pulpa de café deshidratada

Para determinar la cuantificación de polifenoles totales presentes en la pulpa de café deshidratada se utilizó la metodología propuesta por Esquivel-Alvarado et al., (2019) con algunas modificaciones.

Muestra de pulpa de café deshidratada

En la extracción de azúcares fermentables de la PDH, realizada previamente para la determinación de las cinéticas de crecimiento, se obtuvieron dos fases. La fase líquida utilizada anteriormente y la sólida utilizada para la extracción y cuantificación de polifenoles totales. Esta biomasa sólida se colocó en la estufa a 50 °C y una vez seca se utilizó para las extracciones y cuantificación de polifenoles totales.

Extracción de polifenoles totales con solventes orgánicos

Se utilizaron tres solventes orgánicos para la extracción de polifenoles totales presentes en la PDH: etanol, metanol y acetona, todos al 50 % con agua destilada en 100 mL. Para cada uno de los solventes se realizaron tres tratamientos con diferentes pesos de biomasa seca de PDH. Se pesaron aproximadamente 500 mg \pm SD (tratamiento 1) de la biomasa seca de la PDH, para el segundo tratamiento se pesaron 100 mg \pm SD y 50 mg \pm SD para el tercer tratamiento. Esta biomasa fue colocada en tubos cónicos plásticos de 15 mL. Cada tratamiento se realizó por triplicado para cada solvente, para un total de 9 tubos por método de extracción utilizado: extracción asistida con ultrasonido y maceración.

Para la extracción en baño ultrasónico se colocaron 3 mL de cada solvente a cada tratamiento todos los tubos en un baño ultrasónico por 15 minutos, posteriormente se centrifugaron a 2500 rpm por 10 minutos, luego se tomó el sobrenadante con ayuda de una pipeta pasteur y se depositó en un balón aforado de 10 mL. Este proceso se realizó por triplicado para cada uno de los tubos. Posteriormente se filtraron 2 mL de cada tubo por 0.45 μ m y se analizaron todas las muestras mediante la prueba colorimétrica Folin–Ciocalteu. Para el proceso de maceración se colocó la biomasa seca de la pulpa de café en tubos cónicos plásticos de 15 mL y se añadieron 10 mL del solvente de acuerdo con cada tratamiento. Cada tratamiento se realizó por triplicado, para un total de 9 tubos. Se dejaron reposar durante 24 horas a temperatura ambiente y sin agitación. Luego de las 24 horas se centrifugaron los tubos a 1897 fuerza g por 10 minutos y se filtraron 2 mL de cada tubo por 0.45 μ m y se analizaron todas las muestras mediante la prueba colorimétrica Folin–Ciocalteu.

Prueba colorimétrica Folin-Ciocalteu

La prueba se realizó en una microplaca de 96 pozos para cada una de las muestras de los matraces y el control por triplicado. En cada pozo se depositaron 30 μL de cada muestra, 200 μL de agua de ósmosis, 15 μL del reactivo Folin-Ciocalteu 2M y 20 μL de Na_2CO_3 al 20 %. Posteriormente se realizó la lectura de absorbancia en un lector de microplacas Biotek, Winooski, VT, USA, a 750 nm, incubado por 40 min a 40 °C. Los resultados fueron expresados en mg EAG / mL de muestra.

Diseño factorial central compuesto para la extracción de compuestos fenólicos

Para definir las condiciones optimizadas de extracción de los polifenoles totales se utilizaron 100 g de pulpa de café deshidratada molida y se realizó un diseño factorial central compuesto de dos factores que fueron evaluados en tres niveles cada uno (CCD 2³): tiempo (20, 25 y 30 minutos) y concentración de solvente/agua (50:50, 60:40 y 70:30) en 100 mL, se utilizaron los solventes etanol y metanol y el método de extracción baño ultrasónico. Para realizar el CCD 2³ se utilizó el programa Desing-Expert 12.

2.3.3. Caracterización de la lignina presente en la pulpa de café deshidratada

El material utilizado en esta parte se obtuvo en la extracción sencilla con agua caliente y pulpa de café deshidratada molida realizada en la sección 2.3.1 Determinación de cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y *Bacillus subtilis* a partir de extractos de pulpa de café deshidratada, en la sección de Procesamiento de la pulpa de café deshidratada. El material utilizado corresponde a la fase sólida de la extracción.

Caracterización del material lignocelulósico

Se caracterizó el material en términos de sus contenidos extractivos hidrosolubles y liposolubles, celulosa, hemicelulosa, lignina insoluble y cenizas. La metodología para cuantificar los parámetros citados anteriormente se basó en los reportes técnicos del Laboratorio Nacional de Energías Renovables de los EEUU (NREL, por sus siglas en inglés) NREL/TP-510-42622 (2005) para la determinación de cenizas en biomasa y NREL/TP-510-42618 (2008) para la determinación de carbohidratos estructurales en biomasa. La metodología empleada se basó en los reportes mencionados anteriormente y en modificaciones realizadas en CENIBiot. Se modificó el método para determinar la concentración de azúcares, para determinar la concentración de glucosa se utilizó el método enzimático de glucosa oxidasa (Kit Glicemia Enzimática AA (GOD)) de la marca Wiener lab y para los azúcares reductores la técnica de DNS (Miller, 1959). Además, la determinación de la lignina insoluble en ácido se basó en los estándares de la Asociación Técnica de la Industria de la Pulpa y el Papel de los EEUU (TAPPI por sus siglas en inglés) TAPPI Test Method T 222 om-88 (1998).

Extracción alcalina de lignina presente en la pulpa de café deshidratada

Para realizar pruebas a pequeña escala de la extracción de la lignina presente en la PDH deshidratada se realizó la extracción alcalina con dos tratamientos. El primer tratamiento con una disolución de NaOH 2 mol/L (\approx 80 g/L), en el segundo tratamiento se utilizó la misma disolución de NaOH con 1.5 % (v/v) de peróxido de hidrógeno adicional, ambos tratamientos en una relación de sólido: líquido de 1:10, para cada tratamiento se utilizaron 300 g de la biomasa de PDH. Ambos procesos de extracción se llevaron a cabo en la autoclave por 40 min a 121 °C. Posterior a la extracción se separó la biomasa remanente del licor negro obtenido mediante filtración por medio de telas. La fase sólida de la extracción se colocó en bandejas para secarlo en horno a 60 °C por 24 horas y posteriormente se almacenó para utilizarlo en la determinación de extractivos hidrosolubles, liposolubles, ceniza y carbohidratos estructurales (celulosa, hemicelulosa y lignina). La fase líquida (licor negro) se utilizó para determinar la masa de la lignina recuperada.

Separación de la lignina del licor negro obtenido en la extracción alcalina

Para separar la lignina del licor negro obtenido luego de la extracción alcalina se utilizó solo el primer tratamiento (NaOH 2 mol/L). Se calentó el licor hasta una temperatura alrededor de 60 °C en una plantilla y se neutralizó con ácido sulfúrico (H₂SO₄) diluido al 20 % v/v hasta que alcanzó un pH de 2, este pH se midió con tiras para medir pH. Para neutralizar 1,5 L del extracto alcalino se utilizaron 565 mL de H₂SO₄. La solución de pH ajustado se centrifugó en la centrífuga refrigerada a 3500 rpm por 10 min, para separar el precipitado de lignina del líquido. La lignina recuperada se re-suspendió en agua acidificada con H₂SO₄ a pH de 2 para remover sales, azúcares e impurezas.

Determinación de la masa de lignina recuperada

Se tomaron 30 mL del extracto obtenido anteriormente con la lignina recuperada y se colocaron en un beaker de 100 mL a una temperatura de 60 °C (por triplicado). En cada beaker se ajustó el pH lentamente a 2 con H₂SO₄ al 20% v/v y con agitación constante para favorecer la coagulación de la lignina. Para ajustar el extracto a pH 2 se utilizaron 15 mL de H₂SO₄ al 20 % v/v. Posterior al ajuste de pH, las fases obtenidas se separaron por filtración al vacío y se realizaron lavados a la lignina sólida con agua caliente. Los sólidos recuperados se colocaron en la estufa a 80 °C por 24 h para secarlos. Luego de este tiempo las muestras se enfriaron en el desecador y se pesaron en balanza analítica y se calcinaron en crisoles previamente pesados a 550 °C por 4 h. Las muestras calcinadas se enfriaron en el desecador y se pesaron en balanza analítica para determinar su contenido de cenizas. La diferencia entre la masa de cenizas y la masa de muestra seca correspondía a la masa de lignina obtenida.

Determinación de extractivos hidrosolubles y liposolubles

En esta determinación se utilizaron 3 tratamientos: 1) PDH/H₂O, 2) PDH/NaOH 2 mol/L y 3) PDH/NaOH 2 mol/L+1.5% v/v H₂O₂, se utilizó la fase sólida previamente obtenida en la extracción alcalina. Para la determinación de los extractivos hidrosolubles se pesaron 3 g de muestra por triplicado para cada tratamiento en beakers de 250 mL y se añadieron 150 mL de H₂O MiliQ y se colocaron a hervir por una hora a 700 rpm. Posteriormente se filtró al vacío todo el material. El líquido se colocó en una botella pre-pesada para liofilizar y posteriormente pesar para determinar el contenido de extractivos hidrosolubles y el sólido se colocó en la estufa a 80°C por 24 horas y luego se utilizó para la determinación de los extractivos liposolubles.

Para determinar el contenido de extractivos liposolubles se pesaron aproximadamente 2 g de muestra sólida obtenida en la determinación de extractivos hidrosolubles, por triplicado para cada tratamiento. Se añadieron 120 mL de etanol al 96% y se colocaron en beakers de 250 mL a hervir por una hora a 700 rpm. Posteriormente se filtró todo el material, el líquido se colocó en la estufa a 70°C por 48 horas para evaporar todo el etanol y posteriormente pesar. Las muestras sólidas se colocaron en la estufa a 70°C y serán utilizadas posteriormente para caracterizar carbohidratos estructurales y lignina.

Determinación de ceniza, lignina, hemicelulosa y celulosa

Para determinar el contenido de ceniza, lignina, hemicelulosa y celulosa se utilizó el sólido obtenido en la filtración de los extractivos liposolubles de los tres tratamientos utilizados. Se pesaron aproximadamente 300 mg de muestra sólida en matraces de 125 mL, por triplicado para cada tratamiento. Se añadieron 3 mL de H₂SO₄ al 72% a cada erlenmeyer y se colocaron en baño maría a 30°C por 1 hora. Posteriormente se agregaron 84 mL de agua de ósmosis a cada erlenmeyer y se colocaron en la autoclave por 1 hora a 121°C y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. El material de cada matraz se filtró al vacío en crisoles de vidrio tipo Gooch de 30 y 50 mL previamente calcinados a 500 °C por 3 horas y pesados. La fase líquida obtenida de

cada matraz se neutralizó con hidróxido de calcio (cal) y con ácido clorhídrico (HCl) 2 mol/L hasta llegar a pH 5.5-6. Posteriormente el líquido obtenido se filtró utilizando papel filtro Whatman 1 y un embudo Büchner. El filtrado obtenido se colocó en balones aforados de 250 mL, cada uno para cada tratamiento, con las muestras obtenidas se cuantificó la cantidad de glucosa y azúcares reductores. Estos parámetros se utilizaron posteriormente para obtener los datos de hemicelulosa y celulosa. La fase sólida obtenida de cada matraz se colocó en la estufa a 100 °C por 24 horas para pesarla y posteriormente calcinar los crisoles a 500 °C por 3 horas para posteriormente volver a pesar y obtener los datos de lignina y cenizas.

2.4. Descripción del análisis

Se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) y un análisis posterior de Tukey HSD con un nivel de significancia de 0.05, utilizando el programa estadístico Minitab, para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos utilizados en cuanto a los parámetros de densidad óptica máxima, tasa de crecimiento y consumo de glucosa y sacarosa. La concentración de polifenoles totales obtenida se comparó en cuanto a la técnica empleada y a la mezcla acuosa del solvente utilizado. Finalmente, al material PDH se le realizó una caracterización lignocelulósica en términos de lignina, celulosa, hemicelulosa y cenizas.

3. Resultados

3.1 Determinación de cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y *Bacillus subtilis* a partir de extractos de pulpa de café deshidratada

Cinéticas de crecimiento en microplaca de 96 pocillos

Con las cinéticas de crecimiento realizadas a ambos microorganismos en medio PDH suplementado, se obtuvieron los parámetros de densidad óptica máxima (DO máx) y la tasa de crecimiento para cada cinética. En la figura 1 se observa la cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* en el medio PDH suplementado con Pep, Glu y EL. El tratamiento que mostró mayor DO máx corresponde al medio PDH + Glu.

En el cuadro 3 se muestran los parámetros de DO máx y la tasa de crecimiento de *S. cerevisiae* en el medio PDH suplementado. El tratamiento PDH suplementado con Glu fue el que obtuvo el mayor crecimiento del microorganismo, con una DO máx de 0.770 ± 0.480 , este tratamiento presenta diferencias significativas con el tratamiento de PDH + Pep. En cuanto a la tasa de crecimiento, el tratamiento PDH+ Glu presentó la tasa de crecimiento más rápida de la levadura (0.095 ± 0.053), sin embargo, no existen diferencias significativas entre los tratamientos. El tratamiento PDH + Pep fue el que presentó la menor DO máx y la menor tasa de crecimiento, 0.425 ± 0.112 y 0.066 ± 0.026 , respectivamente.

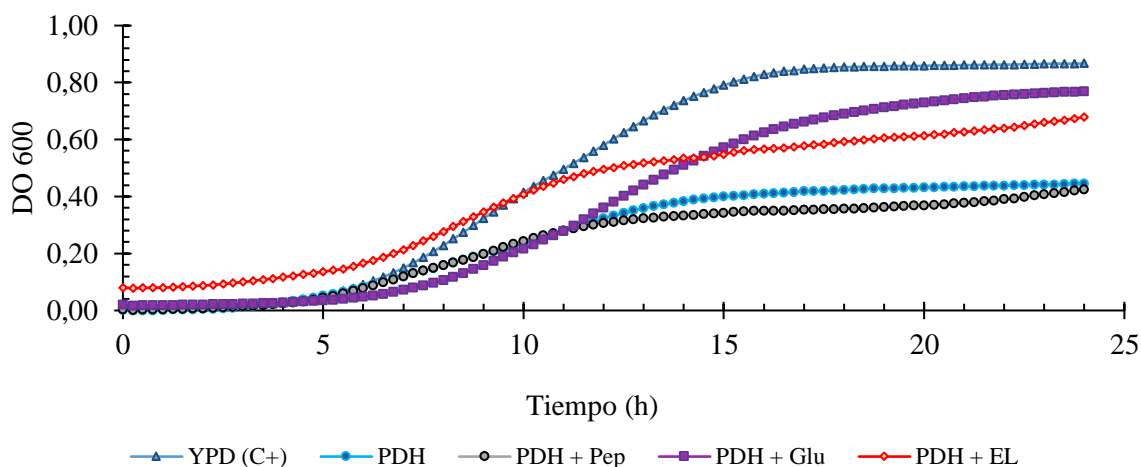


Figura 1. Curva de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* con medio PDH suplementado en microplaca de 96 pocillos

Cuadro 3. DO máx y tasa de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio PDH suplementado en microplaca de 96 pocillos

| Tratamiento | DO máx* | Tasa de Crecimiento (h ⁻¹)* |
|-------------|------------------------------|---|
| PDH + Glu | 0.770 ± 0.480 ^a | 0.095 ± 0.053 ^a |
| PDH + EL | 0.679 ± 0.197 ^{a,b} | 0.092 ± 0.030 ^a |
| PDH + Pep | 0.425 ± 0.112 ^b | 0.066 ± 0.026 ^a |
| PDH | 0.445 ± 0.061 ^{a,b} | 0.067 ± 0.024 ^a |

*Las letras diferentes en los valores de las columnas significan diferencias significativas.

En la figura 2 se muestra la cinética de crecimiento de *B. subtilis* en el medio PDH suplementado con Trip, NaCl y EL. El tratamiento de PDH + Trip fue el que presentó una mayor DO máx. En el cuadro 4 se muestran los parámetros de DO máx y la tasa de crecimiento de *B. subtilis* en el medio PDH suplementado. En cuanto a la DO máx se presentan diferencias significativas entre los tratamientos. Se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos de PDH suplementado con Trip, con NaCl y con EL comparados con el medio de PDH sin suplementar. Entre tratamientos se presentaron diferencias significativas entre el medio

PDH + Trip y el medio PDH + EL. El tratamiento que presentó mayor crecimiento de la bacteria fue el de PDH + Trip con una DO máx de 0.514 ± 0.212 . En cuanto a la tasa de crecimiento, el tratamiento de PDH + Trip es significativamente diferente a los demás tratamientos, fue el tratamiento en el cual la bacteria obtuvo una tasa de crecimiento más rápida (0.094 ± 0.020).

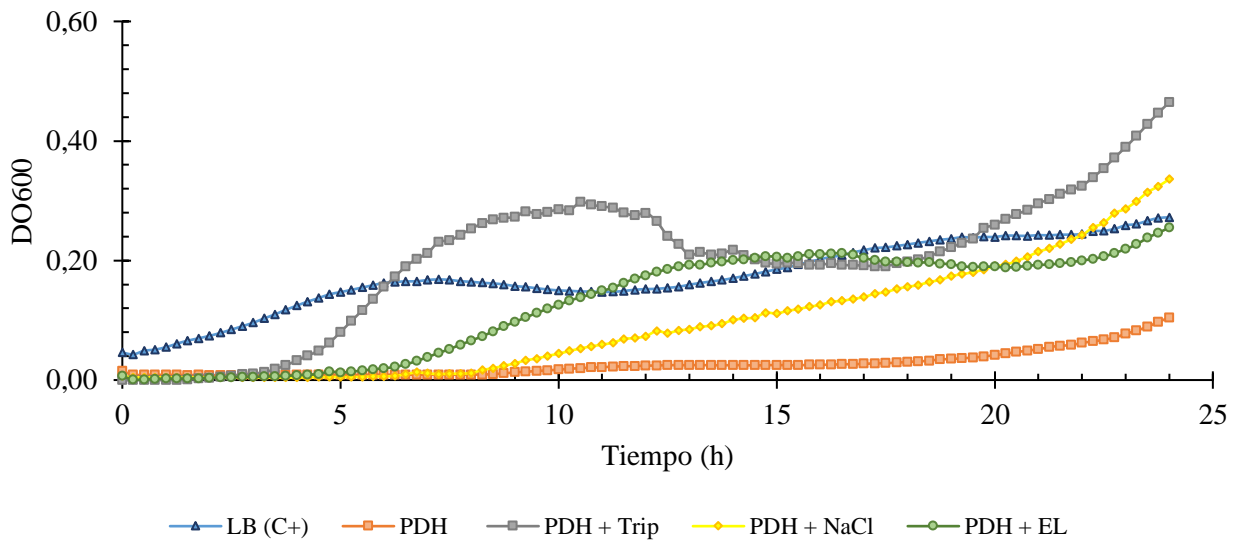


Figura 2. Curva de crecimiento de *Bacillus subtilis* con medio PDH suplementado en microplaca de 96 pocillos

Cuadro 4. DO máx y tasa de crecimiento de *Bacillus subtilis* en medio PDH suplementado en microplaca de 96 pocillos

| Tratamiento | DO máx* | Tasa de Crecimiento (h^{-1})* |
|-------------|-------------------------|-----------------------------------|
| PDH + Trip | 0.514 ± 0.212^a | 0.094 ± 0.020^a |
| PDH + NaCl | $0.336 \pm 0.219^{a,b}$ | 0.053 ± 0.028^b |
| PDH + EL | 0.304 ± 0.111^b | 0.057 ± 0.036^b |
| PDH | 0.109 ± 0.097^c | 0.028 ± 0.034^b |

*Las letras diferentes en los valores de las columnas significan diferencias significativas.

Cinéticas de crecimiento en matraz

Después de los resultados obtenidos en la cinética de crecimiento de *S. cerevisiae* en microplaca se realizó la cinética de crecimiento a nivel de matraz eliminando el tratamiento de PDH + Pep, además, se incluyó el medio MPA como medio de referencia. En la figura 3 se observa que el tratamiento de PDH + EL fue el que presentó mayor DO máx. En el cuadro 5 se muestra la DO máx de *S. cerevisiae* en medio suplementado a nivel de matraz. En ninguno de los tratamientos analizados se encontraron diferencias significativas, sin embargo, el tratamiento que presentó mayor DO máx fue el de PHD + EL ($1249 \pm 1,660$). El tratamiento MPA presentó el menor crecimiento de *S. cerevisiae* (0.199 ± 0.112).

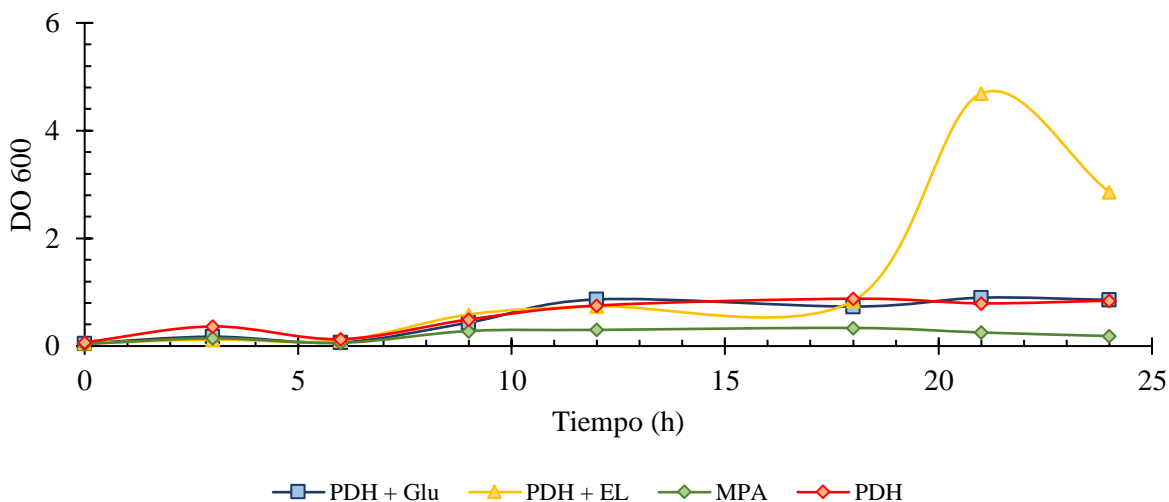


Figura 3. Curva de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* con medio PDH suplementado en matraz

Cuadro 5. DO máx de *Saccharomyces cerevisiae* en medio PDH suplementado en matraz

| Tratamiento | DO máx* |
|-------------|---------------------|
| PDH + Glu | 0.511 ± 0.373^a |
| PDH + EL | 1.249 ± 1.660^a |
| PDH | 0.540 ± 0.325^a |
| MPA | 0.199 ± 0.112^a |

*Las letras diferentes en los valores de la columna significan diferencias significativas.

La figura 4 muestra el consumo de glucosa (g/L) de *S. cerevisiae* en medio PDH suplementado con Glu y con EL a nivel de matraz. El mayor consumo de glucosa se presentó en el tratamiento de PDH + Glu, seguido del tratamiento con EL (24.76 ± 10.14 y 5.14 ± 1.244 g/L, respectivamente). El tratamiento PDH + Glu presentó diferencias significativas con el tratamiento PDH + EL y con PDH (cuadro 6).

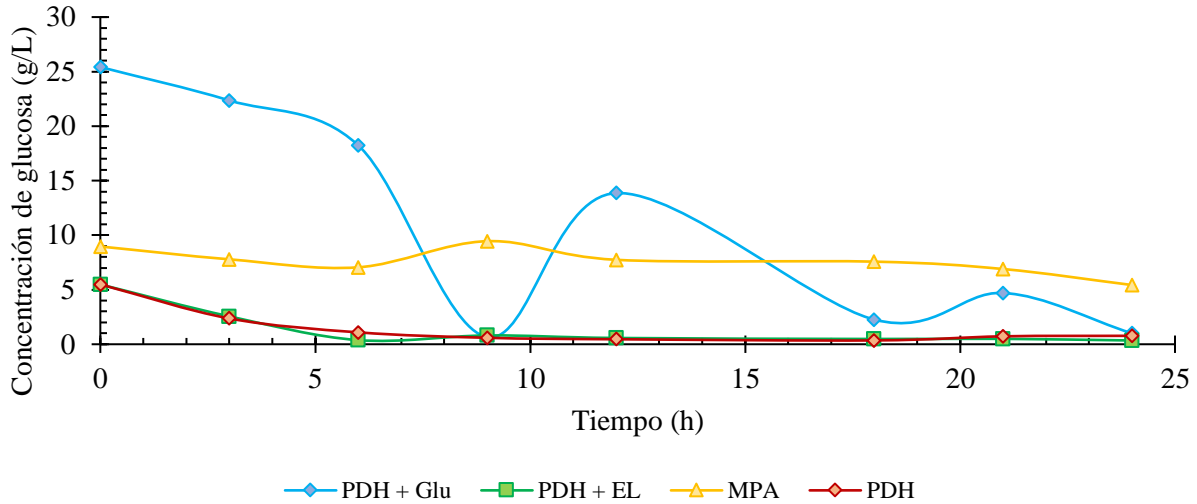


Figura 4. Consumo de glucosa (g/L) de *Saccharomyces cerevisiae* en medio PDH suplementado

Cuadro 6. Consumo de glucosa (g/L) de *Saccharomyces cerevisiae* en medio PDH suplementado

| Tratamiento | Consumo de glucosa (g/L)* |
|-------------|---------------------------|
| PDH + Glu | 24.76 ± 10.14^a |
| PDH + EL | 5.14 ± 1.81^b |
| PDH | 5.13 ± 1.74^b |
| MPA | $4.02 \pm 1.24^{a,b}$ |

*Las letras diferentes en los valores de la columna significan diferencias significativas.

Para la cinética de crecimiento de *B. subtilis* a nivel de matraz, se utilizaron los mismos tratamientos que en la cinética anterior, de igual forma se incluyó el medio MPA como medio de referencia. En la figura 5 se observa la cinética de crecimiento en matraz, donde el tratamiento de PDH + EL fue el que presentó mayor DO máx. En el cuadro 7 se muestra la DO máx de *B. subtilis* en medio suplementado a nivel de matraz. Se presentaron diferencias significativas entre el tratamiento de PDH + EL con el tratamiento PDH + NaCl y con el tratamiento de MPA. El tratamiento que presentó mayor DO fue el de PHD + EL (1.48 ± 1.455). El tratamiento PDH + NaCl presentó el menor crecimiento de *B. subtilis* (0.300 ± 0.313).

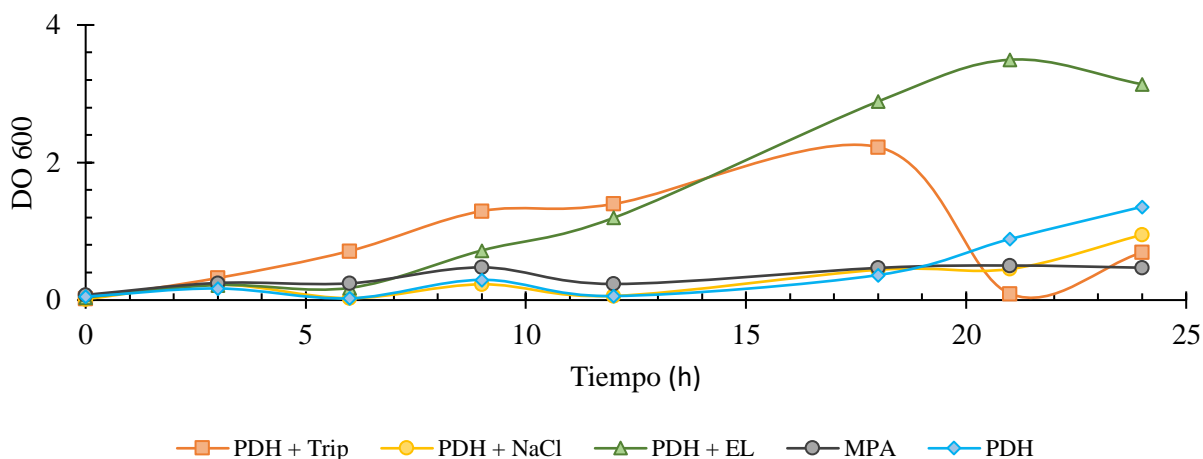


Figura 5. Curva de crecimiento de *Bacillus subtilis* con medio PDH suplementado en matraz

Cuadro 7. DO máx de *Bacillus subtilis* en medio PDH suplementado en matraz

| Tratamiento | OD máx* |
|-------------|-------------------------|
| PDH + Trip | $0.845 \pm 0.753^{a,b}$ |
| PDH + NaCl | 0.300 ± 0.313^b |
| PDH + EL | 1.484 ± 1.455^a |
| PDH | $0.401 \pm 0.478^{a,b}$ |
| MPA | 0.340 ± 0.1159^b |

*Las letras diferentes en los valores de la columna significan diferencias significativas.

En la figura 6 se muestra el consumo de sacarosa (g/L) de *B. subtilis* en medio PDH suplementado con Trip, NaCl y EL, además del medio PDH y del medio de referencia MPA. En el medio MPA fue en el que *B. subtilis* presentó un mayor consumo de sacarosa. En el cuadro 8 se muestran los datos donde el tratamiento MPA fue el que presentó mayor consumo de sacarosa (g/L) 60.92 ± 18.06 , presentado diferencias significativas con los demás tratamientos. Los demás tratamientos no mostraron diferencias significativas entre ellos.

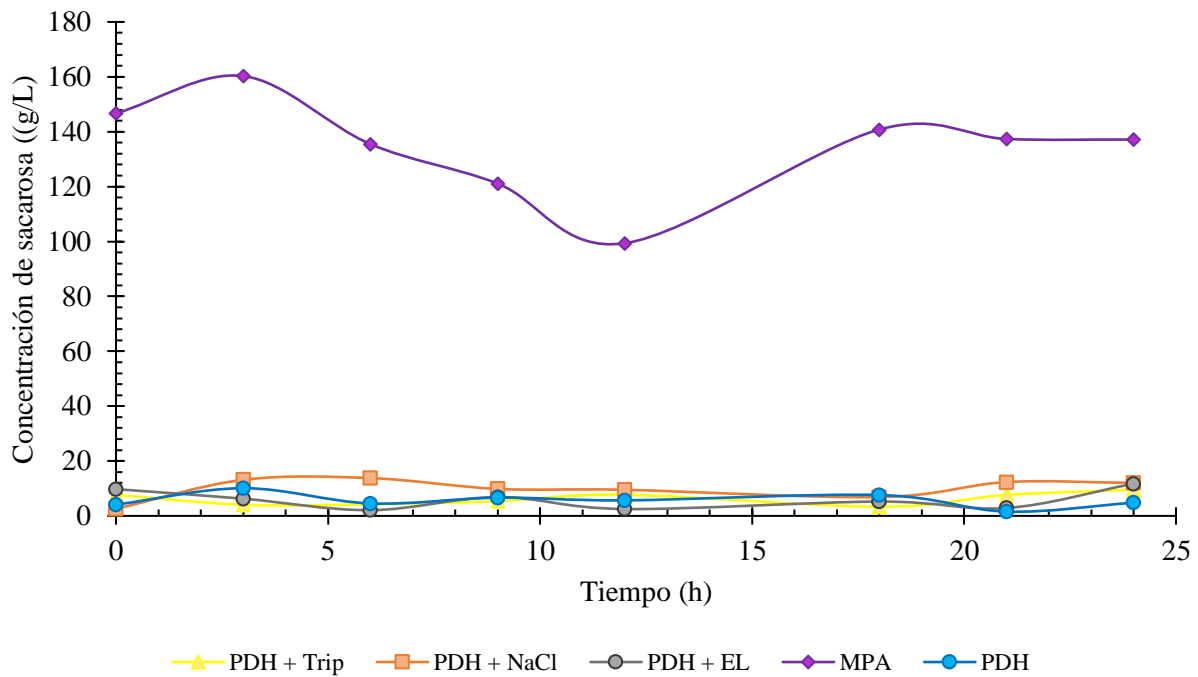


Figura 6. Consumo de sacarosa (g/L) de *Bacillus subtilis* en medio PDH suplementado

Cuadro 8. Consumo de sacarosa (g/L) de *Bacillus subtilis* en medio PDH suplementado

| Tratamiento | Consumo de sacarosa (g/L)* |
|-------------|----------------------------|
| PDH + Trip | 6.20 ± 2.24^b |
| PDH + NaCl | 11.17 ± 3.75^b |
| PDH + EL | 9.24 ± 3.50^b |
| PDH | $8,51 \pm 2.55^b$ |
| MPA | 60.92 ± 18.06^a |

*Las letras diferentes en los valores de la columna significan diferencias significativas.

3.2 Cuantificación de polifenoles totales presentes en la pulpa de café deshidratada

En la figura 7 se muestra la concentración de polifenoles totales (mg EAG/g de PDH) presentes en la PDH, producto de la extracción a través del método de baño ultrasónico con las mezclas de solventes orgánicos etanol, metanol y acetona al 50%. En los gráficos 7a, 7b y 7c la mayor cantidad de polifenoles extraída con la técnica de baño ultrasónico fue con la mezcla acetona 50%. En la figura 8 se muestra la concentración de polifenoles totales (mg EAG/g de PDH) presentes en la PDH, utilizando el método de extracción maceración con las mismas mezclas del método anterior. De igual forma, la mayor cantidad de polifenoles totales extraídos fue con la mezcla del solvente acetona (gráficos 8a, 8b y 8c).

En el cuadro 9 se muestra el promedio de la concentración de polifenoles totales (mg EAG/g de PDH) presentes en la PDH, extraídos con baño ultrasónico y maceración con las mezclas de solventes mencionados anteriormente de acuerdo con cada tratamiento. Con la técnica de baño ultrasónico, en los tratamientos con 500 y 100 mg de PDH la menor cantidad de polifenoles extraídos fue con el solvente metanol, 0.426 y 1.246 mg EAG/g de PDH, respectivamente. En el tratamiento con 50 mg el etanol fue el solvente con el que se extrajo la menor cantidad de polifenoles totales (1.087 mg EAG/g de PDH). En los tres tratamientos la mayor cantidad de polifenoles totales extraídos se logró con la mezcla de acetona, siendo el tratamiento con 100 mg en el que se obtuvo la mayor concentración (5.402 mg EAG/g PDH)

En cuanto al método de baño ultrasónico se cuantificó la mayor concentración de polifenoles totales en el tratamiento con 100 mg de muestra y con la mezcla de acetona (5,402 mg EAG/g PDH). Con el método de maceración sucedió de igual forma, la mayor concentración de polifenoles totales se cuantificó en el tratamiento de 100 mg de muestra con el mismo solvente (6,062 mg EAG/g PDH). Además, la mayor cantidad de polifenoles extraídos se presentaron con la técnica de maceración para los tres solventes.

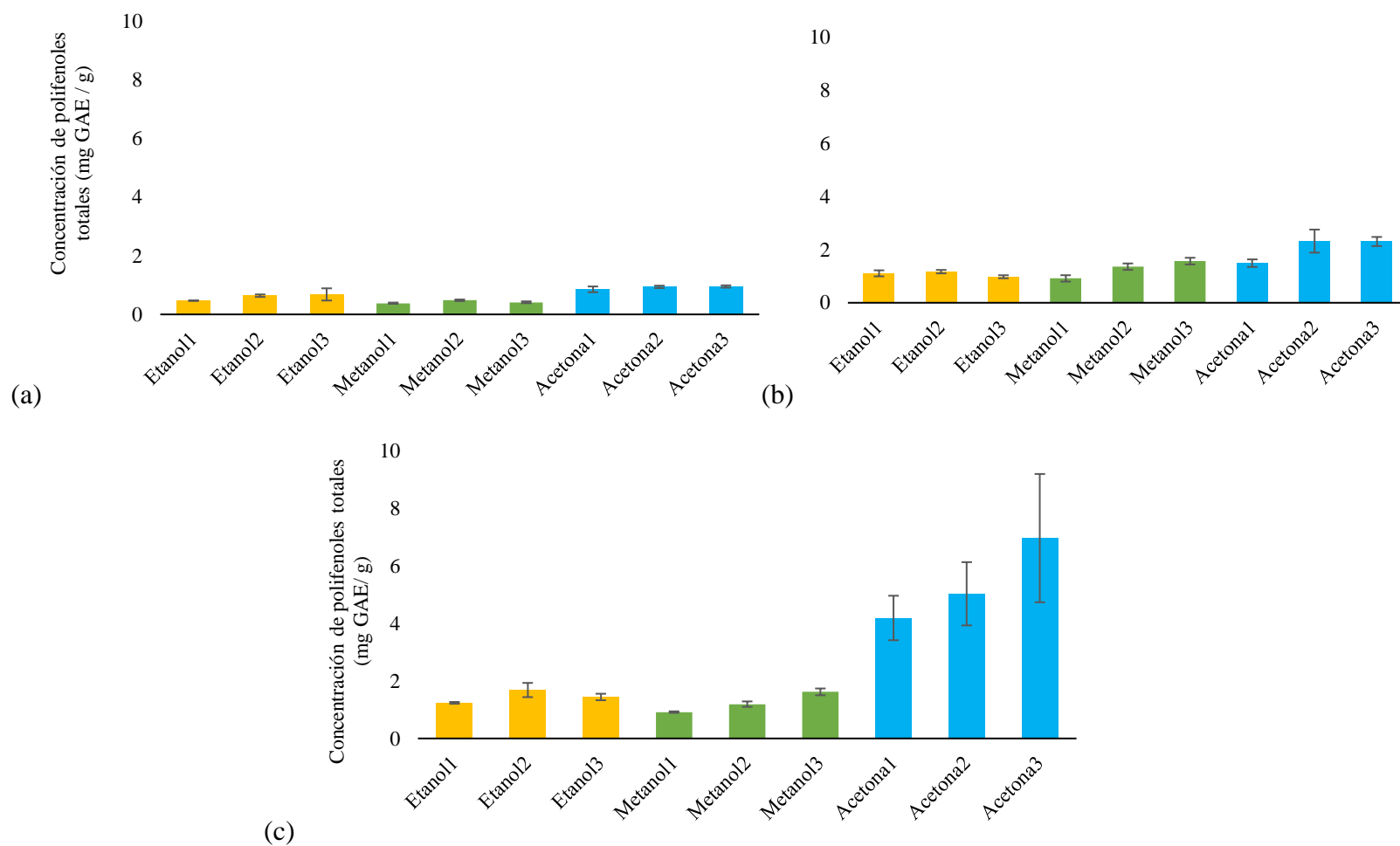


Figura 7. Concentración de polifenoles totales (mg EAG/ g \pm SD) mediante la prueba colorimétrica Folin-Ciocalteu para el método de baño ultrasónico con los solventes etanol, metanol y acetona.

(a) Primer tratamiento (500 mg \pm SD), (b) Segundo tratamiento (50 mg \pm SD)
y (c) Tercer tratamiento (100 mg \pm SD)

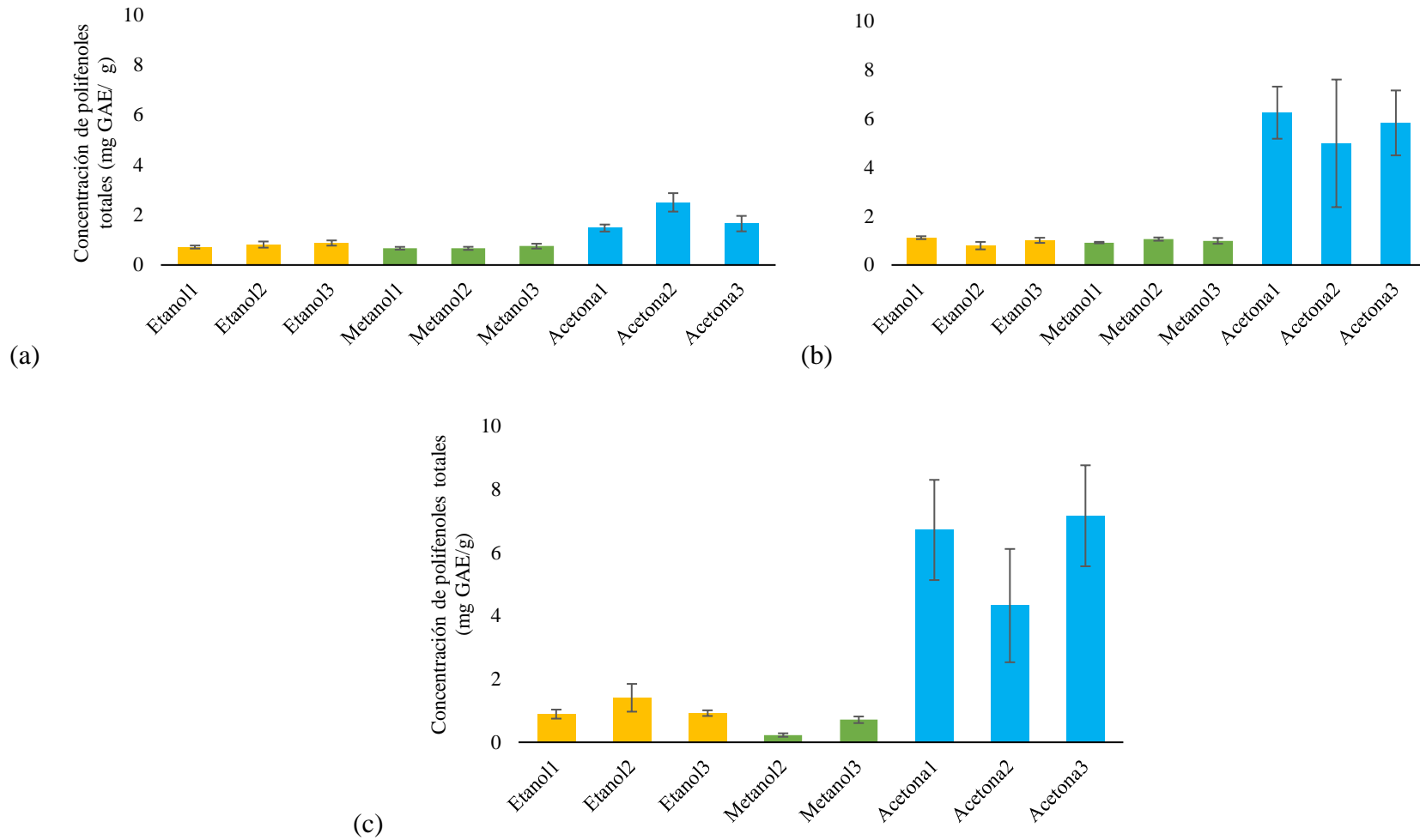


Figura 8. Concentración de polifenoles totales (mg EAG/ g \pm SD) mediante la prueba colorimétrica Folin-Ciocalteu para el método de maceración con los solventes etanol, metanol y acetona.

(a) Primer tratamiento (500 mg \pm SD), (b) Segundo tratamiento (50 mg \pm SD)
y (c) Tercer tratamiento (100 mg \pm SD)

Cuadro 9. Concentración de polifenoles totales (mg EAG/g \pm SD) mediante la prueba colorimétrica Folin-Ciocalteu con los métodos de baño ultrasónico y maceración

| Concentración de polifenoles totales (mg EAG/g PDH) | | | | | | |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Solvente orgánico | Baño ultrasónico | | | Maceración | | |
| | Tratamientos | | | | | |
| | 500 mg | 50 mg | 100 mg | 500 mg | 50 mg | 100 mg |
| Etanol | 0.596 \pm 0.112 | 1.087 \pm 0.098 | 1.457 \pm 0.223 | 0.804 \pm 0.081 | 0.976 \pm 0.166 | 1.073 \pm 0.290 |
| Metanol | 0.426 \pm 0.051 | 1.282 \pm 0.333 | 1.246 \pm 0.355 | 0.696 \pm 0.050 | 0.991 \pm 0.072 | 0.272 \pm 0.420 |
| Acetona | 0.915 \pm 0.053 | 2.041 \pm 0.476 | 5.402 \pm 1.426 | 1.879 \pm 0.548 | 5.691 \pm 0.640 | 6.062 \pm 1.525 |

Posteriormente se realizó un diseño factorial para optimizar la extracción de polifenoles totales de las muestras de PDH seca en baño ultrasónico. Al concluir el análisis de este diseño no se encontraron diferencias significativas entre los solventes utilizados etanol y metanol y los factores y niveles seleccionados para cada solvente. Por lo que se determinó con el diseño que la cantidad de polifenoles totales extraídos con el método de baño ultrasónico no es significativa.

3.3 Caracterización de la lignina presente en la pulpa de café deshidratada

En el cuadro 10 se presenta la masa en gramos de lignina recuperada del licor negro a partir de la extracción en medio básico con el tratamiento de NaOH 2 mol/L. Posteriormente, de realizar el pretratamiento ácido al licor negro obtenido se removió un 78 % de lignina mediante este proceso, siendo el 22 % restante cenizas.

Cuadro 10. Masa (g) de lignina recuperada del licor negro obtenido de la extracción en medio básico con NaOH 2 mol/L

| Muestra seca (g) | Cenizas (g) | Lignina (g) |
|-----------------------|-------------|-------------|
| 0,534 | 0.118 | 0.416 |
| Porcentaje (%) | 22.011 | 77.989 |

En el cuadro 11 se muestran los porcentajes de extractivos hidrosolubles y liposolubles para cada uno de los tres tratamientos utilizados. El tratamiento de PDH/H₂O presentó mayor porcentaje de extractivos hidrosolubles y liposolubles, 29.018 y 6.636 %, respectivamente. El segundo tratamiento en mostrar resultados mayores fue el de PDH/NaOH 2 mol/L+1.5% v/v H₂O₂ con 6.770 % para extractivos hidrosolubles y 5.875 % para extractivos liposolubles.

Cuadro 11. Porcentaje de extractivos hidrosolubles y liposolubles presentes en la PDH con tres tratamientos

| Tratamiento | Extractivos hidrosolubles | Extractivos liposolubles |
|---|---------------------------|--------------------------|
| PDH/H₂O | 29.018 | 6.636 |
| PDH/NaOH 2 mol/L | 1.452 | 2.050 |
| PDH/NaOH 2 mol/L+1,5% v/v H₂O₂ | 6.770 | 5.875 |

En el cuadro 12 se muestra el porcentaje de cenizas, lignina, hemicelulosa y celulosa presentes en la PDH en los tres tratamientos utilizados. El tratamiento de PDH con peróxido de hidrógeno fue el que presentó mayor porcentaje de lignina (17.337 %) y menor cantidad de cenizas (0.719 %) lo que indica que la lignina obtenida en este tratamiento se encuentra libre de impurezas. Además, fue el tratamiento que presentó mayor porcentaje de hemicelulosa (29.725 %) y celulosa (41.137 %).

Cuadro 12. Porcentaje de ceniza, lignina y carbohidratos estructurales presentes en la PDH con tres tratamientos

| Tratamiento | Ceniza (%) | Lignina (%) | Hemicelulosa (%) | Celulosa (%) |
|---|------------|-------------|------------------|--------------|
| PDH/H ₂ O | 1.336 | 16.832 | 16.321 | 11.0575 |
| PDH/NaOH 2 mol/L | 0.981 | 15.268 | 21.171 | 27.322 |
| PDH/NaOH 2 mol/L+1,5% v/v H ₂ O ₂ | 0.719 | 17.337 | 29.725 | 41.137 |

4. Discusión

El extracto de pulpa de café puede utilizarse como medio de cultivo para el crecimiento de microorganismos en sustitución de los medios de cultivo estándares, para ello se deben analizar los requerimientos nutricionales del microorganismo de interés, con el fin de suplementar el extracto con los componentes adecuados para su crecimiento (Hernández, 2021). La pulpa de café deshidratada contiene una alta cantidad de azúcares, dentro de los cuales se encuentran la glucosa, fructosa y sacarosa. Estos azúcares son importantes para el crecimiento de bacterias y levaduras, ya que pueden ser utilizados como fuente de energía (Camargo y Cobos, 2023).

En relación con el comportamiento observado en la curva de crecimiento de *S. cerevisiae* en microplaca, la levadura fermenta y absorbe azúcares de residuos orgánicos ricos en fuentes de carbono. Dentro de estos azúcares se encuentra la glucosa, la sacarosa, maltosa y galactosa. La levadura utiliza diversos compuestos para reproducirse, mientras que a su vez descompone azúcares, además, este microorganismo descompone la glucosa para obtener otros subproductos como etanol, energía, biomasa celular, CO₂, entre otros (Samaniego y Taipe, 2022). Estudios afirman que la levadura *S. cerevisiae* es un microorganismo fermentador energético de azúcares en condiciones anaerobias, sin embargo, existen otras levaduras que fermentan la glucosa en condiciones aeróbicas más rápido. Esta levadura toma la energía a partir de la glucosa por lo que

tiene una alta capacidad fermentativa, lo que indica que su requerimiento nutricional principal es la glucosa, además de otros azúcares presentes en la pulpa de café (García y Contreras, 2019).

Guia (2019) realizó una fermentación de *S. cerevisiae* en un medio de cultivo formulado a base de melaza de caña de azúcar como fuente de carbono y energía donde obtuvo una tasa de crecimiento de 0.33 h^{-1} . Se han reportado para *S. cerevisiae* velocidades específicas de crecimiento entre 0.078 h^{-1} y 0.447 h^{-1} en medios con melaza (Guia, 2019). En la presente investigación la tasa de crecimiento obtenida para *S. cerevisiae* en el medio de PDH suplementado con glucosa se encuentra dentro del rango antes descrito. Este parámetro puede variar dependiendo de la capacidad que tiene la levadura para consumir los sustratos presentes en el medio, por las condiciones limitantes de oxígeno, por altas concentraciones de azúcares en el medio lo que podría inhibir el crecimiento microbiano o que el cultivo pueda estar limitado de algún sustrato que necesite para su crecimiento típico (Guia, 2019). Romero et al. (2018) realizaron un ensayo para reproducir *S. cerevisiae* en medios con residuos agroindustriales: pulpa de mango y cáscara de piña. En el medio de pulpa de mango *S. Cerevisiae* presentó una DO600 de 0.27 ± 0.006 , mientras que en el medio de cáscara de piña 0.11 ± 0.08 . En la presente investigación la DO de *S. cerevisiae* en el medio de PDH con los respectivos suplementos fue mayor que en el estudio de Romero et al. (2018), lo que podría sugerir que la PDH suplementada y sin suplementar aporta una mayor fuente de nutrientes a la levadura para su crecimiento en comparación con la pulpa de mango y con la cáscara de piña.

Por su parte, en la curva de crecimiento de *B. subtilis* en microplaca el comportamiento observado evidencia que esta bacteria tiene la capacidad de degradar diversos sustratos en compuestos más simples, los cuales se incorporan en el metabolismo central del carbono y son fácilmente asimilados por la bacteria para llevar a cabo su crecimiento (Quintana, 2022). La pulpa de café es rica en fibra, azúcares, proteínas, antioxidantes, entre otros, que son aprovechados por los microorganismos en su crecimiento. Sin embargo, se necesitan de diferentes suplementos para añadir a este extracto para cumplir con los requerimientos del microorganismo en estudio. Las fuentes de nitrógeno orgánico como la peptona, triptona y el

extracto de levadura utilizados en este estudio aportan una gran cantidad de aminoácidos libres, péptidos cortos y minerales que son utilizados por el microorganismo para crecer y para sintetizar proteínas (Montero-Zamora et al., 2020).

Montero-Zamora et al., (2020) realizaron fermentaciones con *Lactobacillus rhamnosus* en suero de leche suplementado con fuentes de nitrógeno. Como fuente de nitrógeno utilizaron peptona y extracto de levadura, con el suero de leche suplementado con peptona *L. rhamnosus* obtuvo una DO600 de 1.52 ± 0.04 y una tasa de crecimiento de $0.32 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$, mientras que con el suplemento extracto de levadura los datos obtenidos corresponden a una DO600 de 1.62 ± 0.08 y una tasa de crecimiento de $0.32 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$. En este caso no se presentaron diferencias significativas en los parámetros obtenidos para el crecimiento de la bacteria con los suplementos utilizados. En la presente investigación ambos parámetros medidos para *B. subtilis* en los medios de PDH suplementado con triptona y extracto de levadura se encuentran por debajo de los obtenidos para *L. rhamnosus*. Sin embargo, se encuentran por encima de los parámetros obtenidos para el medio PDH control, por lo que la adición de fuentes de nitrógeno es fundamental para el crecimiento de la bacteria en estudio. Dentro de los factores que inhiben o demoran el crecimiento bacteriano se encuentran la presencia de fenoles, el exceso de sustrato o uso de un sustrato con bajo potencial nutritivo. Además, se ha demostrado que las sales de amonio y nitratos son buenas fuentes de N para cepas de *B. subtilis* (Cruz-Martín et al., 2021). Cruz-Martín et al. (2021) obtuvieron una tasa de crecimiento de 0.113 h^{-1} para *B. pumilus* en caldo de soya con melaza. Las tasas de crecimiento de *B. subtilis* obtenidas en esta investigación se encuentran por debajo de la antes mencionada, lo que podría sugerir que además de la fuente de N en el medio de PDH se debe suplementar también con alguna fuente de carbono, como glucosa, melaza, azúcar moreno, entre otras, que le proporcione mayor fuente de energía y se pueda obtener una densidad bacteriana mayor.

En las curvas de crecimiento en microplaca con medio PDH suplementado obtenidas en este estudio se observa una fase de latencia o fase lag de 5 a 6 horas aproximadamente. En esta fase el microorganismo se está adaptando al medio para posteriormente multiplicarse en la fase

exponencial. Cuando se encuentra en esta fase lag la concentración de biomasa se mantiene constante o en algunos casos puede disminuir. Además, es una fase muy activa metabólicamente y se da un reconocimiento de los nutrientes por parte del microorganismo (Caycedo, Corrales y Trujillo, 2021). Sin embargo, puede que en esta fase se pierda tiempo que puede ser aprovechado en la fase exponencial. Una forma de disminuir este tiempo en la fase lag es inocular el matraz o el biorreactor con un preinóculo que se encuentre en la fase exponencial de crecimiento, así una vez inoculado se inicia inmediatamente el crecimiento del cultivo en la fase exponencial (Guia, 2019). Higueta y Restrepo (2019), realizaron una cinética de crecimiento con *B. subtilis* cepa B33 y comprobaron que al utilizar un preinóculo de 12 horas para inocular volúmenes mayores no se muestra una fase lag significativa, sino que se obtiene la fase exponencial que empieza desde las 0 horas y se extiende por aproximadamente 12 horas.

En la cinética de crecimiento realizada en matraz para *S. cerevisiae* y para *B. subtilis* se observa que el extracto de levadura le provee a ambos microorganismos nutrientes adicionales para poder crecer adecuadamente. La PDH contiene en su composición azúcares que son degradados por los microorganismos para posteriormente utilizarlos como sustrato (Mora-Villalobos et al., 2020). Al agregar al medio de PDH glucosa como suplemento se incrementa la cantidad de azúcares reductores disponibles en el medio para consumo. Sin embargo, los microorganismos además del requerimiento principal de fuente de energía brindada por los azúcares presentes en la PDH o por azúcar añadida requiere de otras fuentes nutricionales, como por ejemplo aminoácidos y péptidos, brindados por el extracto de levadura (Montero-Zamora et al., 2020). Rodríguez-Barrantes (2018) establece que las levaduras crecen en un medio de cultivo que le proporcione los nutrientes necesarios tanto para su metabolismo primario como secundario. Por lo tanto, un medio de cultivo adecuado debe estar balanceado correctamente, incluyendo una combinación de fuentes de carbono y nitrógeno, además de microelementos, macroelementos y factores de crecimiento.

En cuanto al consumo de glucosa en la fermentación de *S. cerevisiae*, los medios PDH y PDH suplementado con extracto de levadura aportan muy poca glucosa para que sea consumida por la levadura, sin embargo, se alimenta de otras fuentes de nutrientes. Estos microorganismos que crecen en el medio de PDH se alimentan de nutrientes que aporta la pulpa de café como lo son carbohidratos, proteínas, azúcares fermentables, además de utilizar como fuente de nitrógeno el extracto de levadura que se añadió al medio (Mora-Villalobos et al., 2020). Dentro de los nutrientes básicos que *S. cerevisiae* requiere para su desarrollo se encuentran como fuente de carbono: la glucosa, la galactosa o sacarosa, y compuestos de nitrógeno orgánicos e inorgánicos que ayudan en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos de la levadura (Suárez-Machín, Garrido-Carralero y Guevara-Rodríguez, 2016).

En el medio suplementado con glucosa la levadura empieza consumiendo la glucosa añadida, posteriormente la levadura comienza a liberar y consumir los 5 g/L de glucosa restantes presentes en la PDH, debido a lo anterior se observa un pico en la curva de consumo de glucosa a las 12 horas de fermentación aproximadamente, seguidamente el consumo de glucosa va disminuyendo en la gráfica hasta alcanzar el consumo total de esta. Los microorganismos llevan a cabo el catabolismo de compuestos orgánicos a través de diversas rutas metabólicas. En el caso de la glucosa ocurre mediante tres vías: la glucólisis, el ciclo de Krebs y cadena de transporte de electrones (Vásquez, 2021). La liberación de azúcares de la pulpa, en este caso de la glucosa, se da gracias a la acción de enzimas presentes en la levadura, las cuales ponen disponible la glucosa presente para que sea consumida por el microorganismo. Las glucanasas son enzimas que se encuentran presentes en bacterias, hongos, levaduras, microalgas, entre otros, y se encargan de degradar a los β -glucanos (Sosa-Pech, 2019). De acuerdo con el mecanismo que utilicen para hidrolizar los sustratos se dividen en 2 grupos: las endo- β -glucanasas y las exo- β -glucanasas. Las primeras hidrolizan aleatoriamente los enlaces β de la cadena polisacárida para liberar pequeños oligosacáridos, las segundas realizan una hidrólisis del sustrato rompiendo los residuos de glucosa desde el extremo no reductor. La degradación de los β -glucanos se lleva a cabo por la acción de ambos grupos de enzimas (Fernández, 2021).

En cuanto al consumo de sacarosa en la fermentación de *B. subtilis*, el medio PDH partió con una concentración de 4.13 g/L, el medio suplementado con cloruro de sodio con 2.61 g/L, el suplementado con triptona con 7.66 g/L, el medio suplementado con extracto de levadura con 9.75 g/L y finalmente el medio que inició con una concentración mayor de sacarosa fue el de puntilla de arroz con 146.68 g/L. Es esperable que en todos los medios de cultivo excepto en el medio de puntilla de arroz, se encuentre una concentración baja de sacarosa, ya que la PDH tiene pocos azúcares y no se agregaron azúcares adicionales a los medios de cultivo. Las enzimas glucosiltransferasas bacterianas tienen la función de hidrolizar la sacarosa en sus unidades más simples, siendo glucosa y fructuosa. Los residuos de glucosa resultantes se polimerizan para dar lugar a los glucanos, los cuales serán hidrolizados posteriormente por las glucanasas (Lara, 2018).

La alta concentración inicial de sacarosa en el medio de puntilla de arroz (~ 147 g/L) se debe a que a este medio si se le agregó sacarosa, la cual está más disponible en el medio. Sin embargo, esta alta concentración también se debe a que *B. subtilis* por acción de las enzimas α -amilasa y amiloglucosidasa hidrolizan las moléculas de almidón, liberando azúcares de este (Miranda y Molina, 2015). Las α -amilasas llevan a cabo el proceso de licuefacción, donde ocurre una hidrólisis parcial del almidón a dextrinas. Posteriormente, se da el proceso de sacarificación donde las amiloglucosidasas hidrolizan las dextrinas obtenidas previamente, en los extremos no reductores, en las uniones α -1,4 y α -1,6 dando paso a dextrinas, maltosa, sacarosa, hasta la obtención de glucosa (Miranda y Molina, 2015). En la curva de consumo de sacarosa del medio de puntilla de arroz *B. subtilis* no consumió en su totalidad la sacarosa disponible, probablemente porque esta no se hidrolizó en su totalidad en sus dos unidades o azúcares simples, glucosa y fructosa para poder ser aprovechada por los microorganismos (Vásquez, 2021).

Gracias a las propiedades nutricionales que tiene la pulpa de café como la capacidad antioxidante, se ha utilizado como materia prima en la elaboración de diversos productos. Estos productos utilizan compuestos bioactivos como los polifenoles que se encuentran en la pulpa de café, los cuales tienen beneficios para la salud como antioxidantes (Serna-Jiménez et al., 2018). Existen diversas técnicas empleadas para extraer polifenoles de alguna biomasa sólida, dentro de estas se mencionan extracción con solventes orgánicos, en agua, asistida por calor, con fluidos supercríticos, por tecnología de microondas, entre otras (Surco-Laos et al., 2020). Cuando se utilizan solventes orgánicos o acuosos, como en este caso, la muestra se pone en contacto con el solvente seleccionado y se utiliza alguna técnica adicional para favorecer la extracción como la maceración, ultrasonido, percolación, entre otras (Musalan, 2019).

Para la extracción de polifenoles totales en esta investigación se utilizaron los solventes orgánicos diluidos en agua al 50-50% v/v. Se ha evidenciado un mayor rendimiento de extracción cuando se utilizan mezclas de solventes con diferentes polaridades que el solvente puro. Por ejemplo, el etanol es poco polar lo que favorece la extracción de compuestos fenólicos menos polares como por ejemplo flavonoles y polifenoles, por su parte el agua facilita la extracción de compuestos más polares, como antocianinas, saponinas y taninos. Es por esta razón que se ha evidenciado que se extraen mayor cantidad de compuestos cuando las muestras contienen cierta proporción de agua (Al-Dhabi, Ponmurugan y Jeganathan, 2017).

Si bien es cierto en este estudio la mayor cantidad de polifenoles extraídos se obtuvo con la técnica de maceración, la técnica asistida por ultrasonido es la más utilizada. Esto se debe a que es una técnica de bajo costo, ya que reduce el tiempo de proceso y, además, el consumo de energía (Gutiérrez, 2020). Al generarse ondas durante la aplicación del ultrasonido, se generan efectos térmicos y de agitación, estos producen burbujas, las cuales impactan sobre las membranas de las células de la pulpa de café y facilitan el ingreso del solvente dentro de las células, favoreciendo la transferencia de masa (Gutiérrez, 2020).

Musalan, (2019), utilizó las mismas técnicas implementadas en este estudio para extraer y cuantificar polifenoles totales de la pulpa de café, con una solución de etanol-agua al 50%. Mediante el proceso de baño ultrasónico obtuvo 5.583 mg EAG/g de pulpa de café de polifenoles totales, en 10 g de muestra con 200 mL de la mezcla del solvente durante 30 minutos. La relación sólido: líquido utilizada por Musalan es similar a la empleada en este ensayo, el primero utilizó una relación de 100:2 (mg/mL), en el segundo se utilizó una relación de 100:3 (mg/mL), la concentración del solvente es la misma en ambos ensayos, pero se presenta una diferencia en la concentración de polifenoles obtenida, la cual podría deberse a la duración de la extracción, 30 y 15 minutos, respectivamente. Al-Dhabi, Ponmurugan y Jeganathan (2017), demostraron que conforme se incrementa el tiempo de extracción aumenta el rendimiento de la extracción, debido a que la biomasa y el solvente están en mayor contacto por más tiempo, favoreciendo la tasa de transferencia de masa dando una mayor eficiencia de extracción y mayor concentración de polifenoles totales.

Con la técnica de maceración Musalan, (2019), obtuvo una concentración de polifenoles totales de 2.914 mg EAG/g de pulpa de café, bajo las mismas condiciones que la técnica anterior (solvente y relación sólido: líquido), pero a 24 horas. Mediante la técnica de maceración a las 24 horas, en este estudio se obtuvieron 6.062 ± 1.525 mg EAG/g de PDH de polifenoles totales con la mezcla etanol-agua al 50%, utilizando una relación sólido: líquido de 100:10 (mg/mL). En este caso, la diferencia de concentraciones podría deberse a que se utilizó mayor cantidad de solvente en este estudio. Por lo que, al presentarse mayor volumen de solvente en contacto con la biomasa, se extrae mayor cantidad de polifenoles totales (Al-Dhabi, Ponmurugan y Jeganathan, 2017).

Geremu, Tola y Sualeh (2016), realizaron una extracción de polifenoles totales con la técnica de maceración a cuatro muestras de pulpa de café de diferentes variedades. Para ello utilizaron los mismos solventes que en este estudio, pero a una concentración de 80% solvente-agua. El mayor contenido de polifenoles se presentó con la mezcla de 80% de metanol (1809.9 mg EAG/g), con el tratamiento de acetona 80% obtuvieron una concentración de

1709.0 mg EAG/g, mientras que con el tratamiento 80% etanol extrajeron la menor cantidad de polifenoles (489,5 mg EAG/g). Por su parte, Fierro-Cabrales et al. (2018), cuantificaron mediante la técnica del reactivo Folin-Ciocalteu una concentración de polifenoles totales de 4.09 mg EAG/g en pulpa de café seca, mientras que en base húmeda 0.91 mg EAG/g de pulpa de café.

Si bien es cierto, las concentraciones de polifenoles totales obtenidas en este estudio con la técnica de maceración son mucho menores en comparación con las obtenidas por Geremu, Tola y Sualeh (2016) empleando la misma técnica. Estas diferencias en la concentración de polifenoles totales pueden deberse a la composición del solvente utilizado, Geremu, Tola y Sualeh (2016) utilizaron una relación solvente agua 8:1 (80% solvente-agua), mientras que en el presente estudio la concentración utilizada fue de 50% solvente-agua. Otro aspecto por considerar es la polaridad de los compuestos de interés, las mezclas acuosas de etanol, metanol y acetona se utilizan para extraer compuestos con mayor polaridad, los compuestos con menor polaridad generalmente se extraen con acetato de etilo o cloroformo. Por lo que se recomienda realizar dos extracciones con solventes de polaridades diferentes para favorecer la extracción de ambos tipos de compuestos presentes en la biomasa (Wilson, 2020). Sin embargo, comparando con los resultados obtenidos por Musalan, (2019), se obtuvo una mayor concentración de polifenoles totales que con la técnica de baño ultrasónico. Por lo que se comparte lo expuesto por Geremú, Tola y Sualeh, (2016) de obtener una mayor concentración de polifenoles totales con la técnica de maceración.

Por su parte, el tipo de lignina obtenido en este estudio corresponde a lignina extraída con el método con soda cáustica, en el cual se utiliza una disolución acuosa de NaOH. La deslignificación ocurre cuando por acción del NaOH se rompen los enlaces α y β -aril éter (C-O) presentes en grupos hidroxilos fenólicos y no fenólicos. Lo anterior favorece que la lignina se disuelva en el medio alcalino, la lignina obtenida por este método presenta bajo peso molecular al estar más soluble y es libre de azufre, lo que hace que su aprovechamiento posterior sea mayor (Moreno y Lamprea, 2022).

El licor negro obtenido en el proceso de extracción de lignina es considerado como un producto de desecho altamente estable, debido a su nivel de alcalinidad tan elevado, presenta un pH de 12 a 13. Además, posee una carga alta de compuestos orgánicos e inorgánicos y una demanda química de oxígeno (DQO) alta, lo que hace que sea poco biodegradable si llegara a estar en contacto con fuentes de agua. Este licor presenta sustancias químicas disueltas, entre ellas lignina. Algunos autores han realizado pretratamientos ácidos con el fin de precipitar y remover la lignina presente en este licor y así otorgarle un segundo uso (Pinzón y Rodríguez, 2022).

En el presente estudio se obtuvo un 78 % de lignina recuperada del licor negro con H_2SO_4 a pH de 2. La cantidad de lignina que sea removida del licor negro proveniente de utilizar algún residuo de la agroindustria depende del pH y de la precipitación de los compuestos que conforman los polisacáridos. Cuando los productos del licor negro son precipitados a un pH entre 5.5 y 7.0 se favorece la recuperación de la lignina más pura, aunque esta puede ser en menor proporción. Mientras que a pH bajos se obtiene una mayor cantidad de lignina, pero con un mayor contenido de impurezas, como materiales disueltos de la degradación de polisacáridos y cenizas (Domínguez-González et al., 2018).

Mussatto et al. (2007), determinaron diferentes porcentajes de lignina recuperada del licor negro obtenido en el tratamiento de residuos de granos de una cervecería. A un pH de 2.15 el porcentaje de lignina obtenido fue de 81.43 %, a un pH de 3.23 se obtuvo 78.86 % de lignina, mientras que a un pH de 6 se obtuvo 15.67%, un pH más elevado de 10.61 se obtuvo un 0.16 % de lignina, lo que quiere decir que a pH altos la precipitación de lignina es mínima. Por su parte, Castillo et al., (2018) obtuvieron un porcentaje de lignina con un pretratamiento ácido de 42.5 %.

Se ha evidenciado que uno de los pretratamientos de bajo costo y que ha alcanzado niveles altos de remoción de lignina de biomazas lignocelulósicas es el que se agrega cierta proporción de H_2O_2 . Este compuesto rompe las paredes de lignina que conforman el material

lignocelulósico de la biomasa en estudio, además con este pretratamiento la celulosa es más accesible para su cuantificación (Suárez-Forero et al., 2019). Murthy y Madhava, (2012), en sus ensayos obtuvieron valores relacionados con la biomasa lignocelulósica de lignina 17.5 %, hemicelulosa 2.3%, celulosa 63 % y ceniza de 8.9%. Los valores de lignina y celulosa obtenidos en este estudio con el tratamiento con H_2O_2 se acercan a los antes mencionados. Por su parte, Menezes et al., (2014), obtuvieron en sus resultados con un pretratamiento alcalino con NaOH aplicado a pulpa de café un contenido de celulosa de 69.18%, de hemicelulosa 44.15% y de lignina 25.19%. Hendroko et al. (2018), obtuvieron en sus resultados sobre caracterización de la pulpa de café un contenido de celulosa de 25,84%, de hemicelulosa 4.37% y de lignina un 12.46 %. Rodríguez, Laencima y García, (2018), obtuvieron a partir de pulpa de café un contenido de celulosa de 35.6% y de hemicelulosa 9.2%.

5. Conclusiones

- Las cinéticas de crecimiento en microplaca de *S. cerevisiae* y *B. subtilis* presentaron la mayor DO y tasa de crecimiento en los medios de PDH suplementado con glucosa y triptona, respectivamente. En cuanto a las cinéticas de crecimiento de *S. cerevisiae* y de *B. subtilis* en matraces se obtuvo la mayor DO en el medio de PDH suplementado con extracto de levadura para ambos microorganismos.
- *S. cerevisiae* obtuvo el mayor consumo de glucosa en el medio de PDH con glucosa, a pesar de que la mayor DO la obtuvo en el medio de PDH con extracto de levadura, lo anterior se debe a que el medio con extracto de levadura no contenía azúcares añadidos como si el medio con glucosa. *B. subtilis* presentó el mayor consumo de sacarosa en el medio MPA, a pesar de que corresponde al medio de referencia, se debe a la hidrólisis del almidón presente en la puntilla de arroz. El medio de PDH con NaCl fue el tratamiento suplementado que presentó mayor consumo de sacarosa.
- Se evidencia que la PDH puede ser utilizada como un medio de cultivo promisorio gracias a todos los nutrientes que aporta a los microorganismos como azúcares, fibra, proteínas, etc. Sin embargo, debe ser suplementada de acuerdo con los requerimientos nutricionales que presente el microorganismo a utilizar. Además, se comprobó que la puntilla de arroz posee pocos nutrientes que pueden ser aprovechados por los microorganismos para crecer, por lo que se debe optimizar el medio con los suplementos adecuados.
- La mayor cantidad de polifenoles totales cuantificados se presentaron en el tratamiento de 100 mg de PDH con el solvente orgánico acetona en ambas técnicas de extracción. Empleando la técnica de maceración se cuantificaron $6,062 \pm 1.525$ mg EAG/g PDH, mientras que con la técnica de baño ultrasónico se cuantificaron $5,402 \pm 1.426$ mg EAG/g PDH.

- En la extracción de lignina en medio básico con NaOH 2 mol/L se removi6 un 78% de lignina presente en el licor negro producto de la extracci6n, obteniendo un 22% de cenizas. En relaci6n con la caracterizaci6n del material lignocelul6sico se presentaron resultados relevantes con el tratamiento de extracci6n con per6xido de hidr6geno: lignina 17,3%, hemicelulosa 28%, celulosa 41,1% y cenizas 0,7%. Este tratamiento ha demostrado ser de bajo costo y adem6s extraer porcentajes elevados de materiales lignocelul6sicos de desechos agroindustriales.
- La pulpa de caf6 es uno de los principales residuos generados en la agroindustria del caf6. El presente estudio propone una alternativa para revalorizar este residuo, otorgarle un valor agregado y as6 contribuir con una econom6a circular. Con la obtenci6n de az6cares fermentables metabolizados por microorganismos para la producci6n de bioetanol, por ejemplo, y la obtenci6n y purificaci6n de compuestos bioactivos como los polifenoles y de compuestos lignocelul6sicos utilizados como materia prima, se disminuye la contaminaci6n generada por la pulpa de caf6 como desecho y se da una alternativa a una biorrefiner6a basada en el aprovechamiento de los desechos de la industria cafetalera.

6. Recomendaciones

- Realizar más investigaciones donde se utilice la pulpa de café deshidratada como sustrato para obtener biomasa microbiana y productos que puedan ser utilizados en una producción multiproducto y así disminuir la contaminación ambiental generada por la pulpa de café, además de disminuir la huella de carbono.
- Realizar una fermentación a mayor escala de biorreactor donde se utilice como sustrato la pulpa de café deshidratada, donde se logre obtener además de biomasa microbiana metabolitos secundarios multiproductos de interés a partir de *S. cerevisiae* y *B. subtilis* como alcoholes, ácidos orgánicos, etc.
- La concentración de polifenoles totales obtenidos en este estudio varía en comparación con las concentraciones obtenidas por otros autores, sin embargo, se considera de suma relevancia en un próximo estudio medir la capacidad antioxidante de los polifenoles extraídos, debido a que se ha reportado que la pulpa de café contiene menos polifenoles que otras biomasas, pero pueden contener una capacidad antioxidante similar.
- La elección del método de extracción de polifenoles depende de la fuente de donde se van a extraer estos, el objetivo para el que se desean extraer y los equipos disponibles en el laboratorio debido a que técnicas hay muchas, se debe escoger la que propicie una mayor concentración en la extracción.
- Considerar extraer polifenoles totales utilizando pulpa de café fresca, para una posterior comparación con los datos obtenidos de pulpa de café deshidratada.
- Seleccionar correctamente el método a utilizar para extraer material lignocelulósico de desechos agroindustriales, ya que el método de extracción depende del uso final que se le pretende dar al material extraído, ya sea lignina, celulosa o hemicelulosa.

7. Fuentes de financiamiento

Esta investigación contó con el financiamiento del fondo de becas del Centro Nacional de Alta Tecnología y el Consejo Nacional de Rectores (CENAT-CONARE) 2021.

8. Conflictos de interés

Las personas participantes de esta investigación declaran que no existe conflicto de intereses en el desarrollo de esta investigación.

9. Referencias

- Al-Dhabi, N., Ponmurugan, K., y Maran Jeganathan, P. (2017). Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.05.005>
- Apezteguía-Rodríguez, I., Díaz-Montel, B., García-Martínez, Y., Trimiño-Lorenzo, L., Soler-Sánchez, D., Font-Echevarría, B., Muñoz-Hernández, L., Hernández-Pérez, L., García-Martínez, I. y Torres-Idavoy, R. (2020). Gestión de riesgos relativo al cambio de campaña productiva durante la etapa de desarrollo tecnológico en una instalación multiproducto. *Vaccimonitor*, 29(3), 118-128.
- Arias, R. y Meneses, J. (2016). *Caracterización físico-química de residuos agroindustriales (cascarilla de arroz y cascarilla de café), como materia prima potencial para la obtención de bioetanol*. [Tesis de grado]. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua.
- Arteaga, T. y Casiano, L. (2018). *Influencia de la temperatura y pH en la fermentación de azúcares hidrolizados para la obtención de etanol a partir de la cáscara de café (Coffea arabica L.)*. [Tesis de grado]. Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo.
- Asebio. (2018). Asociación Española de Bioempresa. <https://www.asebio.com/sobre-asebio/colaboraciones/proyectos/valor-plus>
- Burgos-Arcos, C. y Sablón-Cossío, N. (2022). Evaluación de las alternativas del empleo de la biomasa lignocelulósica del café en Chimborazo. *Ingeniería Industrial*, 43(1), 21-36.

- Caicedo, G., Ortiz, J. y Valderrama, C. (2022). Análisis de la producción de almidón de *Canna edulis* ker como alternativa en zonas marginales de cultivos de café. *Revista de Investigaciones Agroempresariales*, 9. <https://doi.org/10.23850/25004468.5399>
- Cadena, D. y Córdoba, W. (2022). *Propuesta para la obtención de biohidrógeno por fermentación oscura a partir de un residuo agroindustrial*. [Tesis de grado]. Fundación Universidad de América, Bogotá.
- Camargo, L. y Cobos, C. (2023) *Simulación y modelamiento de la producción secuencial de biogás e hidrógeno a partir de la pulpa de café, por medio de la digestión anaerobia utilizando herramientas computacionales*. [Trabajo de grado]. Fundación Universidad de América, Bogotá
- Cardoso, I. y Gouttefanjat, F. (2022). Sustentabilidad, tecnología ambiental y regeneración ecosistémica: retos y perspectivas para la vida. *Revista Universidad y Sociedad*, 14(2), 142-157.
- Casas-Martínez, Y., Fuquen-Fúquene, L. y Gómez-Rodríguez, A. (2022). Avances en biotecnología ambiental: Biorremediación de plásticos. *I+3*, 4(2). <https://doi.org/10.24267/23462329.939>
- Castillo, A., Muñoz, A., Pantoja, R. y Portilla, M. (2018). Diferentes tipos de pre-tratamientos de la pulpa de café para generar su aprovechamiento. *Agro Sur*, 46(1), 41-50. <https://doi.org/10.4206/agrosur.2018.v46n1-05>
- Castillo-Benavides, J., Richmond-Navarro, G., Rojas-Pérez, F., y Zamora-Picado, E. (2018). Revisión de los sistemas de gasificación de biomasa para la generación de energía en Costa Rica de 1982 a 2014. *Revista Tecnología En Marcha*, 31(4), 3-14. <https://doi.org/10.18845/tm.v31i4.3955>

- Caycedo, L., Corrales, L. y Trujillo, D. (2021). Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. *Nova*, 19(36), 49-94. <https://doi.org/10.22490/24629448.5293>
- Chacón, R. (2014). Tecnologías sostenibles para la generación de electricidad en sector beneficiador. *Café de Costa Rica. Revista Informativa, ICAFE*, 8, 1-4.
- Chaves-Ulate, E. y Esquivel-Rodríguez, P. (2019). Ácidos clorogénicos presentes en el café: capacidad antimicrobiana y antioxidante. *Agron. Mesoam.* 30(1), 299-311. <https://doi.org/10.15517/am.v30i1.32974>
- Clauser, N. (2019). *Estudio técnico-económico de la biorrefinería de los residuos de industrialización primaria de la madera y agroindustriales*. [Tesis doctoral]. Universidad Nacional de Misiones, Misiones.
- Coto, O. (2013). *Informe de Consultoría Producto 2: Prácticas Actuales de Tratamiento y Disposición de los Residuos Agrícolas Orgánicos en Costa Rica*. San José, Costa Rica. <http://www.mag.go.cr/proyectos/proy-residuos-agricolas-org/productos/Informe%20RAO%20CR%20Producto%202.pdf>
- Cruz-Martín, M., Rocha-Rodríguez, E., Acosta-Suárez, M., Rodríguez, E., Pichardo, T., Roque, B. y Alvarado-Capó, Y. (2021). Efecto de diferentes medios de cultivo en el crecimiento y la actividad enzimática antifúngica de *Bacillus pumilus* CCIBP-C5. *Biotecnología Vegetal*, 21(2), 94-102.
- Díaz, C. (2022). *Fabricación de papel como aprovechamiento de residuos provenientes del café (pulpa y celulosa) en el municipio de Villarrica -Tolima*. [Tesis de grado]. Fundación Universidad de América, Bogotá.
- Domínguez-González, A., Hernández-Soto, R., Salgado-Román, J., Ardila-Arias, A. y Hernández-Maldonado, J. (2018). Obtención de compuestos aromáticos por oxidación de lignina con lacasa inmovilizada en alginato. *Agrociencia*, 52(2), 191-202.

- Esquivel-Alvarado, D., Muñoz-Arrieta, R., Alfaro-Viquez, E., Madrigal-Carballo, S., Krueger, C. G., y Reed, J. D. (2019). Composition of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Three Tropical *Vaccinium* Species from Costa Rica. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(10), 2872-2879. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01451>
- Fernández, L. (2021). *Caracterización de las actividades carbohidrasas producidas por especies marinas con aplicación potencial en la mejora del valor nutritivo de macroalgas*. [Tesis de grado]. Universidad de Almería, Almería.
- Fernández, L. y Springer, M. (2008). El efecto del beneficiado del café sobre los insectos acuáticos en tres ríos del Valle Central (Alajuela) de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 56(4), 237-256.
- Fierro-Cabrales, N., Contreras-Oliva, A., González-Ríos, O., Rosas-Mendoza, E. y Morales-Ramos, V. (2018). Caracterización química y nutrimental de la pulpa de café (*Coffea arabica* L.). *Agroproductividad*, 11(4), 9-13.
- Flórez, D. y Rosales, E. (2018). Uso del ensilaje de pulpa de café en alimentación animal. *Mundo FESC*, 8(15), 73–82
- García, C. y Contreras, J. (2019). *Evaluación de los parámetros cinéticos de Saccharomyces cerevisiae en medio de cultivo a base de melaza con y sin aireación*. [Tesis de grado]. Instituto Tecnológico Superior de Misantla, Veracruz.
- Geremu, M., Tola, Y., y Sualeh, A. (2016). Extraction and determination of total polyphenols and antioxidant capacity of red coffee (*Coffea arabica* L.) pulp of wet processing plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 3(25), 1-6. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0077-1>
- Gómez, J. (2019). *Modelación del procesamiento agroindustrial del café desde la fruta hasta el café oro*. [Tesis de grado]. Universidad de Costa Rica, San José.

- Guia, G. (2019). *Producción de levadura de panificación (Saccharomyces cerevisiae) en un medio de cultivo formulado a base de melaza de caña de azúcar*. [Trabajo final de grado]. Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- Gutiérrez, S. (2020). *Evaluación del proceso de extracción con soluciones de etanol, de un subproducto del procesamiento industrial de café, para obtener un extracto de antocianinas y ácido clorogénico*. [Trabajo final de grado]. Universidad de Costa Rica, San José.
- Heeger, A., Kosińska, A., Cantergiani, E. y Andlauer, W. (2017). Bioactives of coffee cherry pulp and its utilisation for production of Cascara beverage. *Food Chemistry*, 221, 969-975. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.067>
- Hendroko, R., Krido, S., Gamawati, P., Wahyudi, A., Widodo, W., Mel, M., Adhi, Y., Bayu, P. y Liwang, T. (2018). Characterisation of Arabica Coffee Pulp - Hay from Kintamani - Bali as Prospective Biogas Feedstocks. MATEC Web of Conferences, 164. <https://doi.org/10.1051/mateconf/201816401039>
- Hernández-Chaverri, R. y Prado, L. (2018). Impacto y oportunidades de biorrefinería de los desechos agrícolas del cultivo de piña (*Ananas comosus*) en Costa Rica. *Cuadernos de Investigación UNED*, 10(2), 455-468. <https://doi.org/10.22458/urj.v10i2.2059>
- Hernández, P. (2021) *Revisión de procesos biológicos para el aprovechamiento de pulpa de café residual*. [Trabajo de grado]. Fundación Universidad de América, Bogotá.
- Higueta, A. y Restrepo, A. (2019). *Desarrollo de un bioinsumo agrícola con base en un consorcio de Bacillus subtilis- Pseudomonas sp.*. [Tesis de grado]. Universidad EAFIT, Medellín.
- ICAFFE, Instituto del Café de Costa Rica. (2015). <http://www.icafe.cr/>

- Iglesias-Osores, S. (2020). Incipiente industria biotecnológica en el Perú, una amenaza que se asoma. *Manglar*, 17(1). <https://doi.org/10.17268/manglar.2020.001>
- Janissen, B. y Huynh, T. (2018). Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: A review. *Resources, Conservation and Recycling*, 128, 110-117. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.10.001>
- Jiménez, J. (2016). *Valorización de la pulpa de café (Coffea arabica) mediante la extracción de ácidos hidroxicinámicos y clorogénicos*. [Tesis de grado]. Universidad de Costa Rica, San José.
- La Gaceta 55, Alcance 8. (2007). *Decreto N° 33601-MINAE-S Reglamento de Vertido y Reuso de Aguas Residuales*.
- Lara, M. (2018). *Co-inmovilización y estabilización de enzimas y cofactores: glicosilación regioselectiva de compuestos bioactivos catalizada por glicosiltransferasas*. [Tesis de grado]. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- López, L., Pereda, I., Escobar, R., Pedraza, J. y Romero, O. (2018). Efecto de la aplicación de métodos de pre-tratamientos en el proceso de digestión anaerobia de la biomasa lignocelulósica. *Tecnología Química*, 38(2), 324-334.
- Magoni, C., Bruni, I., Guzzetti, L., Dell'Agli, M., Sangiovanni, E., Piazza, S., Regonesi, M., Maldini, M., Spezzano, R., Caruso, D. y Labra, M. (2018). Valorizing coffee pulp by-products as anti-inflammatory ingredient of food supplements acting on IL-8 release. *Food Research International*, 112, 129-135. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.026>
- Martínez-Alemán, S., Hernández-Castillo, F., Aguilar-González, C. y Rodríguez-Herrera, R. (2019). Extractos de pulpa de café: Una revisión sobre antioxidantes polifenólicos y su

- actividad antimicrobiana. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 27(77), 73-79.
- Mendoza, A. (2016). *Fragmentación de la lignina del café (Coffea arabica) para la obtención de compuestos fenólicos*. [Tesis de grado]. Instituto Tecnológico de Ciudad Madero, Tamaulipas.
- Menezes E., do Carmo J., Alves J., Menezes A., Guimarães I., Queiroz F. y Pimenta C. (2014). Optimization of alkaline pretreatment of coffee pulp for production of bioethanol. *Biotechnol Prog.* 30(2):451-62. <https://doi.org/10.1002/btpr.1856>
- Miranda, B y Molina, M. (2015). Evaluación de factores que pueden influir en el proceso de sacarificación-fermentación simultáneas para la producción de etanol a partir de materiales amiláceos. *Ingeniería*, 25(1), 47-61. <https://doi.org/10.15517/ri.v25i1.14665>
- Montero-Zamora, J., Cortés-Muñoz, M., Esquivel, P., Mora-Villalobos, J. y Velázquez, C. (2020). Growth conditions and survival kinetics during storage of *Lactobacillus rhamnosus* GG for the design of a sustainable probiotic whey-based beverage containing Costa Rican guava fruit pulp. *Journal of Food Science*, 85(10), 3478-3486. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15430>
- Mora-Villalobos, J., Montero-Zamora, J., Barboza, N., Rojas-Garbano, C., Usaga, J., Redondo-Solano, M., Schroedter, L., Olszewska-Widdrat, A y López-Gómez, J. (2020). Multi-Product Lactic Acid Bacteria Fermentations: A Review. *Fermentation*, 6(1), 23. <https://doi.org/10.3390/fermentation6010023>
- Moreno, H., Zamudio, M., De Alva, H. y Morales, A. (2015). “Separación de lignina aplicando procesos de biorefinería en la deslignificación de material lignocelulósico” Memoria del 7º Congreso Internacional de la Academia Mexicana Multidisciplinaria “Ciencia, Tecnología e Innovación en Movimiento” Universidad Autónoma de Tamaulipas.

- Moreno, K. y Lamprea, A. (2022). *Extracción de lignina en pulpa de café para la remoción de manganeso en aguas residuales como contexto para el desarrollo de competencias investigativas a partir de la identificación de carbohidratos* [Trabajo de grado]. Universidad Pedagógica Nacional, Bogotá.
- Murthy, P. y Madhava, M. (2012). Sustainable management of coffee industry by-products and value addition - A review. *Resources, Conservation and Recycling*, 66, 45-58. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2012.06.005>
- Musalan, M. (2019). *Evaluación de la actividad coagulante de los polifenoles extraídos de residuos de café (Coffea arabica)*. [Trabajo final de grado]. Fundación Universidad de América, Bogotá.
- Mussatto S, Fernandez M y Roberto I. (2007). Lignin recovery from brewer's spent grain black liquor. *Carbohydrate polymers Journal*, 70(2), 218- 223.
- Nguyen, Q., Cho, E., Trinh, L., Jeong, J. y Bae, H. (2017). Development of an integrated process to produce D-mannose and bioethanol from coffee residue waste. *Bioresource Technology*, 244, 1039–1048. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.169>
- OCDE (2002). *Frascati manual: Proposed standard practice for surveys on research and development*. OCDE, Paris.
- Pillaca, O. (2023). *Optimización de la producción de Proteína Celular con Candida sorboxilosa mediante el aprovechamiento de mucilago de café (Coffea arabica) para uso potencial como complemento alimenticio de animales* [Trabajo final de posgrado]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- Pinzón, D. y Rodríguez, C. (2022). *Diseño conceptual de la extracción de celulosa presente en la borra de café por medio de una digestión Kraft* [Proyecto de grado, Universidad de América,]. Repositorio Fundación Universidad de América

<https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/9047/1/6162945-2022-2-IQ.pdf>

Pleissner, D., Neu, A., Mehlmann, K., Schneider, R., Puerta-Quintero, G. y Venus, J. (2016). Fermentative lactic acid production from coffee pulp hydrolysate using *Bacillus coagulans* at laboratory and pilot scales. *Bioresource Technology*, 218, 167-173. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.078>

Quintana, L. (2022). *Evaluación de la producción de ácido indolacético en Bacillus subtilis utilizando modelos metabólicos a escala genómica y algoritmos de optimización multiobjetivo*. [Tesis de grado]. Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México.

Ramón-Gonçalves, M., Gómez-Mejía, E., Rosales-Conrado, N., León-González, M. y Madrid, Y. (2019). Extraction, identification and quantification of polyphenols from spent coffee grounds by chromatographic methods and chemometric analyses. *Waste Management*, 96, 15-24. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.07.009>

Rodríguez-Barrantes, M. (2018). Efecto del magnesio en el crecimiento y producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. *Pueblo Continente*, 29(1), 55-72.

Rodríguez, R., Laencina J. y García J. (2020). Evaluation of coffee pulp as substrate for polygalacturonase production in solid state fermentation. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 32,(2), 117-124, <https://doi.org/10.1051/mateconf/201816401039>

Rojas, E. y Hernández, G. (2022). *Aprovechamiento tecnológico de la pulpa de café en la obtención de un producto vaso biodegradable*. [Tesis de grado]. Universidad de la Salle, Bogotá

- Rojas, J. (2015). *Evaluación de la producción de biogás por medio de la biodigestión anaerobia semicontinua utilizando residuos del beneficiado del café como sustrato*. [Tesis de grado]. Universidad de Costa Rica, San José.
- Romero, C., Aguirre, L., Plata, N. y Yepes, J. (2018). Evaluación de medios de cultivo naturales para el mantenimiento de *Colletotrichum* sp., y *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientia Et Technica*, 23(3), 398-405.
- Rosas, O. (2019). *Producción de biogás a partir de los residuos de pulpa de café*. <http://web.mediasolutions.mx/Notas/?id=201902280317266827>
- Salomé-Martínez, S. y Jaramillo-Gamboa R. (2023). Análisis de aceptabilidad y percepción del consumidor de aplicaciones alimentarias de subproductos de café. *Informador Técnico*, 87(1), 40–52. <https://doi.org/10.23850/22565035.5192>
- Samaniego, C. y Taipe, A. (2022). *Efecto del tiempo, temperatura y cantidad de levadura en la obtención de etanol por fermentación de residuos sólidos orgánicos hidrolizados*. [Tesis de grado]. Universidad Nacional del Centro de Perú, Huancayo.
- Santos, F. (2020). *Sugarcane Biorefinery, Technology and Perspectives*, 1st ed.; Academic Press: London, UK.
- Santos, J., Mertz, C., Morel, G., Lacour, S., Belleville, M., Durand, N. y Dorniera, M. (2020) Alcoholic fermentation as a potential tool for coffee pulp detoxification and reuse: Analysis of phenolic composition and caffeine content by HPLC-DAD-MS/MS. *Food Chemistry*, 319. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126600>
- Serna-Jiménez, J., Torres-Valenzuela, L, Martínez-Cortínez, K., y Hernández-Sandoval, M. (2018). Aprovechamiento de la pulpa de café como alternativa de valorización de subproductos. *Revista Ion*, 31(1), 37-42. <https://doi.org/10.18273/revion.v31n1-2018006>

Sigma-Aldrich. (2020).
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/471003?lang=en®ion=CR>

Siqueira-Palmeri, M.G., L.T. Cruz, F. Soares-Bertges, H. Moreira-Húngaro, L.R. Batista, S.S. Da-Silva, M.J. Vieira-Fonseca, M. Pereira-Rodarte, F M. Pinto-Vilela, and M. Da-Penha. (2018). Enhancement of antioxidant properties from green coffee as promising ingredient for food and cosmetic industries. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 16, 43-48.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.07.011>

Sosa-Pech, M., Ruiz-Sánchez, E., Tun-Suárez, J., Pinzón-López, L., y Reyes-Ramírez, A. (2019). Germinación, crecimiento y producción de glucanasas en *Capsicum chinense* Jacq. inoculadas con *Bacillus* spp.. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 6(16), 137-143.

Suárez-Forero, S., Candela-Soto, A., Henao-Martínez, J. y Bayona-Ayala, O. (2019). Evaluación del desempeño del pretratamiento con peróxido de hidrógeno sobre bagazo de caña de azúcar para remoción de lignina. *ITECKNE*, 16(1), 21-28. doi:
<https://doi.org/10.15332/.v16i1.2158>

Suárez-Machín, C., Garrido-Carralero, N. y Guevara-Rodríguez, C. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 50(1), 20-28.

Surco-Laos, F., Ayquipa, H., Quispe, W., García, J. y Valle, M. (2020). Determinación de polifenoles totales y actividad antioxidante de extracto de semillas de uvas residuos de la producción de Pisco. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 86(2), 123-131.
<https://doi:10.37761/rsqp.v86i2.282>

Terán, S., Torres, B., Torrescano, G., Esqueda, M., Sánchez, A. y Vargas, R. (2023). Residuos del procesamiento del fruto de café como fuente natural de antioxidantes para la industria

cárnica. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 26, 1-12.
<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2023.540>

Vargas, Y. y Pérez, L. (2018). Aprovechamiento de residuos agroindustriales para el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 14(1), 59-72. <https://doi.org/10.18359/rfcb.3108>

Vásquez, J. (2021). *Evaluación de métodos para la producción de etanol a partir de pulpa de café*. [Tesis de grado]. Universidad del Valle de Guatemala, Ciudad de Guatemala.

Wilson, M. (2020). Evaluación de la extracción etanólica asistida por ultrasonido de los polifenoles de un subproducto del procesamiento de la mora. [Tesis de grado]. Universidad de Costa Rica, San José.