

## EVALUACIÓN DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS DE RESIDUALES SÓLIDOS DEL BENEFICIO DE CAFÉ PARA LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIPASAS

Anlly Vilcacundo-Alcívar<sup>1\*</sup>, Francisco Macías-Menéndez<sup>1</sup>, Jessica Ponce-Rodríguez<sup>2</sup>, Yunet Gómez-Salcedo<sup>1</sup>, Ernesto Alonso Rosero-Delgado<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Escuela de Ingeniería Química. Facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas. Universidad Técnica de Manabí (UTM). Portoviejo, Manabí, Ecuador. E-mail: [anllymily97@gmail.com](mailto:anllymily97@gmail.com), [franciscomaciasmenendez@gmail.com](mailto:franciscomaciasmenendez@gmail.com), [yunitags@gmail.com](mailto:yunitags@gmail.com), [ernestrosdel@gmail.com](mailto:ernestrosdel@gmail.com)

<sup>2</sup>Estudiante de la Maestría en Ingeniería Química. Instituto de Posgrado. Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo. Av. Urbina y Che Guevara, Portoviejo, Manabí, Ecuador. E-mail: [j.ponce.3@hotmail.com](mailto:j.ponce.3@hotmail.com)

\*Autor para la correspondencia: [anllymily97@gmail.com](mailto:anllymily97@gmail.com)

Recibido: 08-06-2020 / Aceptado: 29-09-2020 / Publicación: 31-12-2020

Editor Académico: Ezequiel Zamora-Ledezma<sup>1</sup>

### RESUMEN

El café es uno de los principales productos agrícolas exportados en Ecuador, produciendo una gran cantidad de residuos como pulpa y cáscara (46 %) que se generan durante el proceso de post-cosecha de granos verdes de café. Estos residuos, de naturaleza lignocelulósica pueden ser aprovechados para la obtención de enzimas lipasas, según investigaciones de los últimos años. Sin embargo, para la producción de enzimas, se requieren etapas de pretratamiento del residuo. Este trabajo se centró en establecer las variables de operación del proceso de hidrólisis, previo la obtención de enzimas lipasas a partir de la fermentación de residuales sólidos del café en la etapa del beneficio, utilizando un hongo filamentoso *Aspergillus niger* como agente biológico de transformación. Dentro del trabajo se efectuó el pretratamiento alcalino del residual en dos corridas experimentales, para un total de 15 variantes: en la primera (9 variantes) se evaluó la concentración de NaOH y tiempo, en la segunda (6 variantes) temperatura y tiempo. Al residual hidrolizado se determinó rendimiento másico, lignina, nitrógeno y proteínas. Los resultados demostraron que el pretratamiento con NaOH al 6 %, 60 min y 121 °C remueve mayor porcentaje de lignina ( $69,26 \pm 2,92$  %) y 6 %, 60 min, 25 °C el mayor contenido de nitrógeno ( $1,52 \pm 0,03$  %). Mediante ANOVA y Prueba de Múltiples Rangos se determinó que no existen diferencias para 6 %, 60 min y por superficie de respuesta se estableció una temperatura de 35,67 °C, condiciones utilizadas para la fermentación, obteniendo una actividad enzimática de  $37,67 \pm 0,58$  U/g.

**Palabras clave:** *Coffea arabica* L, hidrólisis alcalina, lignina, fermentación estado sólido, *A. niger*.

## EVALUATION OF THE PROCESS OF HYDROLYSIS OF SOLID WASTE FROM THE COFFEE BENEFIT FOR THE PRODUCTION OF LIPASE ENZYMES

### ABSTRACT

Coffee is one of the main agricultural products exported in Ecuador, producing a large amount of waste such as pulp and peel (46 %) that are generated during the post-harvest process of green coffee beans. These residues, of a lignocellulosic nature, can be used to obtain lipase enzymes, according to research in recent years. However, for the production of enzymes, residue pretreatment steps are required. This work focused on establishing the operating variables of the hydrolysis process, before obtaining lipase enzymes from the fermentation of solid coffee residues in the beneficiation stage, using a filamentous fungus *Aspergillus niger* as a biological transformation agent. Within the work, the alkaline pretreatment of the residual was carried out in two experimental runs, for a total of 15 variants, in the first (9 variants) the NaOH concentration and time were evaluated, the second (6 variants) temperature and time. The hydrolyzed residual was determined by mass yield, lignin, nitrogen, and proteins. The results showed that pretreatment with NaOH at 6 %, 60 min, and 121 °C removes the highest percentage of lignin ( $69.26 \pm 2.92$  %) and 6 %, 60 min, 25 °C the highest nitrogen content ( $1.52 \pm 0.03$  %). Through ANOVA and Multiple Range Test, it was determined that there are no differences for 6 %, 60 min and by response surface, a temperature of 35.67 °C was established, conditions used for fermentation, obtaining an enzymatic activity of  $37.67 \pm 0.58$  U/g.

**Keywords:** *Arabic coffee*, alkaline hydrolysis, lignin, solid-state fermentation, *A. niger*.

## AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE HIDRÓLISE DE RESIDUAIS SÓLIDOS DO BENEFÍCIO DE CAFÉ PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMAS DE LIPASE

### RESUMO

O café é um dos principais produtos agrícolas exportados pelo Equador, produzindo grande quantidade de resíduos como polpa e casca (46 %), gerados na pós-colheita dos grãos de café verdes. Esses resíduos, de natureza lignocelulósica, podem ser usados para a obtenção de enzimas lipases, de acordo com pesquisas realizadas nos últimos anos. No entanto, para a produção de enzimas, etapas de pré-tratamento de resíduos são necessárias. Este trabalho teve como objetivo estabelecer as variáveis operacionais do processo de hidrólise, antes da obtenção das enzimas lipases da fermentação de resíduos sólidos de café na etapa de beneficiamento, utilizando um fungo filamentosso *Aspergillus niger* como agente de transformação biológica. Dentro do trabalho, o pré-tratamento alcalino do resíduo foi realizado em duas corridas experimentais, para um total de 15 variantes, na primeira (9 variantes) foram avaliados a concentração de NaOH e o tempo, a segunda (6 variantes) temperatura e tempo. O resíduo hidrolisado foi determinado pelo rendimento de massa, lignina, nitrogênio e proteínas. Os resultados mostraram que o pré-tratamento com NaOH a 6 %, 60 min e 121 °C remove a maior porcentagem de lignina ( $69,26 \pm 2,92$  %) e 6 %, 60 min, 25 °C o maior teor de nitrogênio ( $1,52 \pm 0,03$  %). Através de ANOVA e Multiple Range Test foi determinado que não há diferenças para 6 %, 60 min e por superfície de resposta foi estabelecida uma temperatura de 35,67 °C, condições utilizadas para a fermentação, obtendo uma atividade enzimática de  $37,67 \pm 0,58$  U/g.

**Palavras-chave:** *Coffea arabica L.*, hidrólise alcalina, lignina, fermentação em estado sólido, *A. niger*.

---

Citaci3n sugerida: Vilcacundo-Alcívar, A., Macías-Menéndez, F., Ponce-Rodríguez, J., Gómez-Salcedo, Y., Rosero-Delgado, E. (2020). Evaluaci3n del proceso de hidrólisis de residuales sólidos del beneficio de café para la producci3n de enzimas lipasas. Revista Bases de la Ciencia, 5(3), 55-72. DOI: 10.33936/rev\_bas\_de\_la\_ciencia.v%vi%i.2431 Recuperado de: <https://revistas.utm.edu.ec/index.php/Basedelaciencia/article/view/2431>

---

## 1. INTRODUCCIÓN

La agroindustria ha venido experimentando un gran desarrollo en varias de sus actividades. Una de las principales consecuencias de este desarrollo es el incremento en la generación y acumulación de los desechos sólidos (Beltrán et al., 2019), lo cual genera un problema tanto económico como ecológico. En la búsqueda de mitigar estos impactos en el ambiente se plantean estrategias que proponen aprovechar estos residuos en nuevos procesos, llegándose a obtener una serie de compuestos que resultan útiles por sus propiedades y ventajas en diversos campos (Saval, 2012).

Los residuos agroindustriales son considerados como uno de los mejores sustratos para los procesos de fermentación en estado sólido (FES) para la producción de enzimas u otros metabolitos de interés, ya que son abundantes, baratos y contienen fuentes ricas en carbono, nitrógeno y minerales (Ashok et al., 2017). Se conoce que varios de los residuos generados para cultivar microorganismos en el proceso de FES pueden aprovecharse para la producción de enzimas, tal como se ha descrito para café, arroz, soja, salvado de trigo y los efluentes de molinos de la industria de aceites vegetales (Fleuri et al., 2014).

Un residuo que merece especial atención en Ecuador es el generado durante el procesamiento del café (Nieto y Chegwin, 2010). El café predomina dentro de los principales productos de exportación no petrolera para Ecuador, de acuerdo con cifras del Banco Central del Ecuador (BCE, 2019). Existen tres métodos de procesamiento para la obtención de granos verdes a partir de los frutos maduros del café: i) seco, ii) semi-seco y iii) húmedo. Durante estos procesos se generan desechos como pulpa y cáscara de café (Vilela et al., 2010). Estos residuos han sido estudiados como materias primas en la producción de hongos, ácidos orgánicos, saborizantes, y alimentación animal, además otra alternativa es su empleo como sustrato en la producción de enzimas (Sadh et al., 2018).

Para emplear los residuos lignocelulósicos en la FES es necesario realizar pretratamientos que aseguren una remoción de lignina, facilitando a los microorganismos el aprovechamiento de los polisacáridos presentes (Cuervo et al., 2009). El pretratamiento es de los pasos más costosos y menos sofisticados en la conversión de biomasa en azúcares fermentables (Badiei et al., 2014). Para lograr la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica se han propuesto pretratamientos los cuales se pueden clasificar principalmente en pretratamientos físicos (mecánicos y térmicos), químicos (empleando ácidos o bases) y mixtos combinando ambos tipos (Cortés, 2014).

Los pretratamientos reportados implican los siguientes pasos: (1) perturbación y eliminación de la matriz, lignina y carcasa de hemicelulosa que encierra las fibras de celulosa; (2) rompimiento de los enlaces de hidrógeno en las regiones cristalinas de la celulosa; y (3) aumento de la porosidad y la superficie de área de la celulosa (Li et al., 2010).

El tratamiento mecánico consiste en la reducción del tamaño de partícula de la biomasa lignocelulósica, esta reducción conduce a un aumento de la superficie disponible y una reducción del grado de polimerización (Che Kamarludin et al., 2014). En el caso del pretratamiento térmico la biomasa lignocelulósica se calienta. Si la temperatura aumenta por encima de 150-180 °C, en primera instancia, la hemicelulosa y poco después la lignina, comenzará a solubilizarse (Sarip et al., 2016). El pretratamiento ácido tiene como principal reacción la hidrólisis de la hemicelulosa y lograr con esto mejor acceso a la celulosa (Shafiei et al., 2015).

Los pretratamientos alcalinos aumentan la digestibilidad de la celulosa y son más efectivos en la solubilización de la lignina y además tienen un efecto limitado sobre la solubilidad de la celulosa y hemicelulosa, en comparación con pretratamientos ácidos (Karimi y Taherzadeh, 2016). Los hidróxidos de sodio (NaOH), potasio (KOH) y calcio (CaOH), así como amoníaco (NH<sub>4</sub>OH) son adecuados para su uso en procesos de pretratamiento alcalino (Bolado-Rodríguez et al., 2016). El hidróxido de sodio (NaOH) ocasiona una expansión de la biomasa lo cual provoca un aumento en el flujo interno y del área de superficie de la pulpa; así mismo reduce el grado de polimerización de la celulosa, causando la destrucción de la estructura de la lignina (Taherzadeh y Karimi, 2008).

Los hongos del género *Rhizopus*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Geotrichum*, *Penicillium* y *Aspergillus* son organismos productores de lipasa (Geoffry y Achur, 2018). Entre ellos, el hongo *Aspergillus niger*, se considera prometedor para la síntesis de lipasas con aplicaciones industriales, debido a su capacidad de crecer rápidamente sobre un soporte sólido y sintetizar grandes cantidades de enzimas extracelulares (Cairns et al., 2018). En sustratos agroindustriales como la cáscara de arroz, tortas de semillas de algodón y *jatropha* se ha estudiado su capacidad para la producción de lipasas. (Nema et al., 2019; Putri et al., 2020).

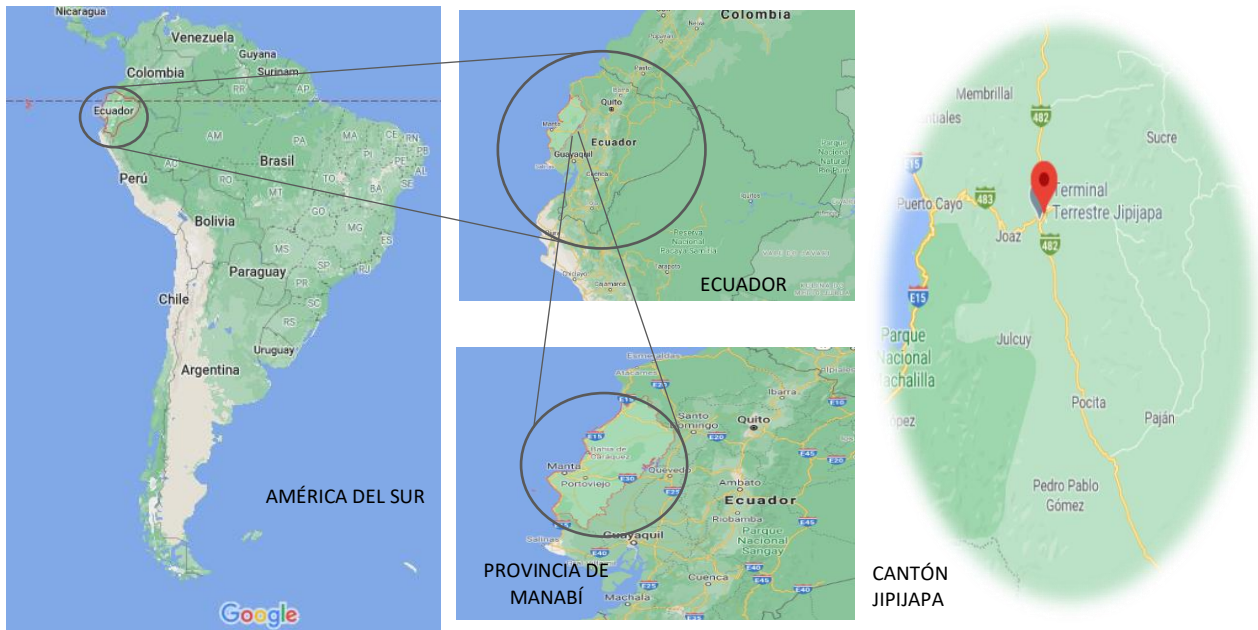
En el presente estudio se exploran las condiciones del pretratamiento químico con hidróxido de sodio en el residual sólido del beneficio de café, revelando su potencial uso en el proceso de producción de enzimas, empleando el hongo *Aspergillus niger* como organismo fermentador.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Residuo de café

El residual sólido del beneficio de café (*Coffea arabica L.*) compuesto por pulpa y cáscara, se obtuvo en el poblado San Pablo, Parroquia Pedro Pablo Gómez, Cantón Jipijapa en la Provincia Manabí, cosecha del año 2019.

# EVALUACIÓN DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS DE RESIDUALES SÓLIDOS DEL BENEFICIO DE CAFÉ PARA LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIPASAS



**Figura 1.** Ubicación del sitio San Pablo. Mapa obtenido de los datos de Google Maps 2020. Las coordenadas geográficas son latitud 1°34'00.2"S longitud 80°35'57.1"W y lat/long (dec): -1.566710, -80.599184

El material (residual) se almacenó en bolsas plásticas herméticas a 4 °C en un congelador durante una semana. El residual se sometió a un proceso de secado en un sistema de bandejas (UCK) a 60 °C durante 6 horas (Serna-Jiménez et al., 2018), hasta alcanzar una humedad del 7 % (Bermúdez et al., 2014). El material seco se trituró en una licuadora industrial (SKYMSSEN TA-04) para obtener un tamaño promedio de partícula de 11,5 mm (Shi et al., 2008).

## 2.2. Caracterización Microbiológica

La caracterización del residual (seco y triturado) en cuanto al contenido de humedad, lignina, nitrógeno y proteína se realizó en el Laboratorio de Investigación Científica de la Universidad Técnica de Manabí. El contenido de humedad se determinó mediante una termobalanza BOECO Germany, modelo BMA. Para la determinación de lignina se aplicó el método de Klason, de acuerdo a lo descrito por Schwanninger y Hinterstoisser (2002); Álvarez Godoy et al. (2007). Se agregó 15 ml de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) de 72 % de concentración a 1 g de muestra seca. La mezcla se dejó reaccionar durante dos horas en un baño de agua a 20 °C con agitación constante. Posteriormente se disminuyó la concentración del ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) al 3 % y se llevó al autoclave durante 60 min a 120 °C. El material insoluble se recuperó, tras un tiempo de asentamiento y filtración con un crisol tipo Gooch de porosidad fina, y se lavó con agua caliente. El crisol se llevó a una estufa a 105 ± 3 °C hasta alcanzar un peso seco constante (TAPPI, 2006). El contenido de lignina se calculó mediante la ecuación (1):

$$L = \frac{A}{B} * 100 \quad (1)$$

Donde L: representa el contenido de lignina (%). A: es el peso seco de lignina y B: es el peso de la muestra inicial. Para calcular el porcentaje de lignina removida (RL) se procedió con la ecuación (2).

$$RL = 100 - L \quad (2)$$

El contenido de nitrógeno y proteínas se realizó mediante el método de Kjeldahl, descrito en el folleto de la compañía BUCHI (2010), el cual está basado en las reglamentaciones AOAC 945.39. Para el contenido de proteínas (P), expresado en porcentaje, se emplea la ecuación (3), donde se multiplica el porcentaje de nitrógeno (N) por el factor 6,25 (Fia et al., 2010).

$$P = N * 6,25 \quad (3)$$

### 2.3. Pretratamiento alcalino

Se realizaron dos ensayos de hidrólisis básica, donde se empleó NaOH como sustancia alcalina. En el primer ensayo se evaluó la concentración álcali, establecida en base a lo reportado por Menezes et al. (2014) y el tiempo de exposición en la autoclave (BIOBASE Autoclave BKQ-B75 II), a una temperatura de 121°C (Menezes et al., 2014; Rodríguez, 2013). Se diseñó un experimento factorial 3<sup>2</sup> y cada variante se realizó por triplicado. En la **Tabla 1** se exponen los niveles bajo, medio y alto (-1, 0 y 1, respectivamente) de cada factor. En el segundo ensayo se consideró evaluar el efecto de la temperatura y el tiempo de exposición sobre el proceso, en un experimento factorial como el descrito anteriormente. Los niveles de cada factor se muestran en la **Tabla 2**.

**Tabla 1.** Primer ensayo

| FACTOR         | -1 | 0  | 1  |
|----------------|----|----|----|
| [NaOH] (% p/p) | 2  | 4  | 6  |
| Tiempo (min)   | 20 | 40 | 60 |

-1 nivel bajo (2 %, 20 min), 0 nivel medio (4 %, 40 min), 1 nivel alto (6 %, 60 min)

**Tabla 2.** Segundo ensayo

| FACTOR           | -1 | 0  | 1   |
|------------------|----|----|-----|
| Temperatura (°C) | 25 | 73 | 121 |
| Tiempo (min)     | 20 | 40 | 60  |

-1 nivel bajo (25 °C, 20 min), 0 nivel medio (73 °C, 40 min), 1 nivel alto (121 °C, 60 min)

En cada variante se empleó 100 g del residual sólido de café y 1 L de solución alcalina. El residual pretratado se recuperó mediante filtración y lavado con 1,5 L de agua destilada a 70 °C de acuerdo al método propuesto por Chen et al. (2007). Después del lavado, se secó en una mufla (Thermo Scientific THERMOLYN 48010) a una temperatura de 60 °C por 6 horas, para eliminar el exceso de agua.

Para la evaluación de los pretratamientos se realizó la caracterización del residual pretratado en cuanto al contenido de lignina, para calcular la remoción de lignina (RL), y de nitrógeno (N) y proteína (P) remanente. También se calculó el rendimiento másico del pretratamiento alcalino ( $Y_{HB}$ ) por medio de la ecuación (4):

$$Y_{HB} = \frac{M_f}{M_i} * 100 \quad (4)$$

Donde  $M_f$  es la masa final del residual después del pretratamiento (g) y  $M_i$  la masa inicial del residual de café secado y triturado (Menezes et al., 2014).

Una vez definidas las condiciones de pretratamientos (tiempo, temperatura y concentración de álcali) que se utilizaría previo a la fermentación, se realizó el análisis elemental al residual pretratado para determinar su contenido de carbono y nitrógeno. Esta determinación analítica se efectuó en el laboratorio del Departamento de Petróleos, Energía y Contaminación de la Universidad Central del Ecuador, empleando un analizador elemental SERIES II CHNS/O ANALYZER 2400, marca PERKIN ELMER, bajo la técnica de separación por cromatografía frontal con detector TCD (Thermal Conductivity Detector), modo de operación CHNS (Pregl-Dumas), gas transportador helio, exactitud  $\leq 0,3\%$  y precisión  $\leq 0,2\%$ . Se procedió a pesar 5 mg de muestra, se colocó en el analizador elemental y se seleccionó el modo CHN/S con un tiempo de análisis de 8 min por cada una de las 3 réplicas. Por último, se obtuvieron los resultados mostrados por el equipo (porcentaje en peso de cada componente)

#### **2.4. Fermentación en estado sólido**

El *A. niger* se inoculó y replicó en placas de Petri que contenían 30 mL del agar papa dextrosa (PDA) solidificado, mismos que fueron incubados (MEMMERT SN30) a 30 °C durante un período de 5 días (Colla et al., 2015). La solución de esporas se obtuvo mediante la siembra del microorganismo en matraces Erlenmeyer de 250 mL, que contenían como medio PDA y se incubaron a 30 °C por 7 días. La forma de muestreo se realizó añadiendo en cada Erlenmeyer 20 mL de una solución de elementos traza compuesta por 0,005g/L de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,001g/L de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 0,0015 g/L de  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,003 g/L de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  y 1 g/L de aceite de oliva. Posteriormente los Erlenmeyer se colocaron en una zaranda a 120 rpm durante 30 min con el fin de arrastrar las esporas del agar. El contenido de cada Erlenmeyer se pasó por filtros de papel de 125 mm y filtros de jeringa (Thermo

Scientific™ PTFE Target2™) de 0,45 µm. El conteo del número de esporas se realizó a través de la cámara de Neubauer (Gutiérrez et al., 2008).

Se preparó un inóculo de *Aspergillus niger* para la fermentación en estado sólido, empleando matraces Erlenmeyer de 250 mL, que contenían 5 g del residual hidrolizado, 1,5 % (p/p sólido seco) de aceite de oliva como inductor para la producción de enzimas lipasas (Falony et al., 2006), una solución de 10<sup>7</sup> esporas/g sólido seco (Lagunas et al., 2006) y sulfato de amonio para establecer una relación C:N de 12:1, necesaria para el crecimiento del *A. niger* (Reyes-Ocampo et al., 2013). La humedad relativa del medio estuvo entre 78 – 85 % para contribuir en el metabolismo del microorganismo (Pandey, 2003).

Según Cujilema-Quitio et al. (2018), la actividad de enzimas lipasas se obtiene más fácilmente al emplear pH ligeramente ácidos, ya que en medios muy ácidos el desarrollo de los microorganismos no es favorable, trayendo también una disminución de su actividad enzimática, por lo tanto, en este estudio se estableció un pH de 5,5 (Bernabé et al., 2006) durante un tiempo de fermentación de 3 días a temperatura de 30 °C en matraces Erlenmeyer de 250 mL (Cujilema-Quitio et al., 2018).

Determinación de lipasas. El ensayo se realizó de acuerdo a lo propuesto por Fu et al. (1995). La emulsión fue homogenizada durante 3 minutos a 18000 rpm (Watanabe et al., 1977). Una unidad de actividad de lipasa (U) es definida como la cantidad de enzima que produce 1 µmol de ácidos grasos por minuto en las condiciones del ensayo y se calcula a través de la ecuación 5 (Nema et al., 2019).

$$\text{Actividad de lipasa} \left( \frac{U}{gds} \right) = \frac{A * C}{E} \quad (5)$$

Donde A = ml de hidróxido de sodio (NaOH) consumido por minuto; C = concentración de NaOH [mM]; E = concentración de la muestra en g/ml; U/gds = µmol de ácidos grasos liberados por minuto por gramo de sustrato sólido seco del que se ha extraído la enzima.

## 2.5. Análisis Estadístico

El procesamiento estadístico de los datos se realizó mediante el programa *STATGRAPHICS CENTURION XVI.I.* a través de un análisis de varianza (ANOVA), con la finalidad de determinar si existían diferencias en el efecto de los pretratamientos. Posteriormente, se realizó la Prueba de Rangos Múltiples para determinar cuáles medias son estadísticamente significativas de otras. Se utilizó un nivel de confianza del 95%. Por otra parte, con el Diagrama de Pareto Estandarizado se analizó el efecto positivo o negativo que tienen las variantes en el proceso de hidrólisis. Por último, se realizó una optimización de múltiples respuestas con el fin de maximizar el contenido del nitrógeno en el residual hidrolizado. Mediante estos análisis se estableció la variante a utilizar en el proceso de fermentación.



### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Caracterización del residual sólido de café

La humedad del residual resultó de  $72,83 \pm 2,35$  % siendo un valor cercano al reportado por Gurram et al. (2016); y por Figueroa y Vargas (2016). El porcentaje de lignina fue de  $13,13 \pm 0,06$  %, cercano a los que reportan Chala et al. (2018), de la Cruz-Martorellz et al. (2019), y Murthy y Madhava (2012) (15,5 %; 17,5 y 16,5 %, respectivamente). Las variaciones en la concentración de lignina, y de otros compuestos, en este residual se deben a varios factores como condiciones de cultivo, estado de madurez, procesamiento (Puerta y Ríos, 2011; Reales et al., 2016), la variedad de planta de café, el origen del residual, la naturaleza heterogénea (pulpa y cáscara) y del método de extracción o aislamiento de lignina empleado (Chávez y Domine, 2013; Lu y Ralph, 2010). El contenido de lignina que presentó el residual se considera alto e impide el fácil acceso a las fibras celulósicas, por lo tanto, esta debe ser hidrolizada o pre-tratada con hidróxido que permite romper la estructura de la lignina (Torres Jaramillo et al., 2017). El contenido de nitrógeno y proteínas resultante fue de  $1,32 \pm 0,00$  % y  $8,28 \pm 0,02$  %, respectivamente, valores similares a los obtenidos por Encalada et al. (2017).

#### 3.2. Pretratamiento alcalino

##### 3.2.1. Primer ensayo

En el primer ensayo se evaluó el efecto del tiempo de exposición y la concentración del álcali (**Tabla 3**).

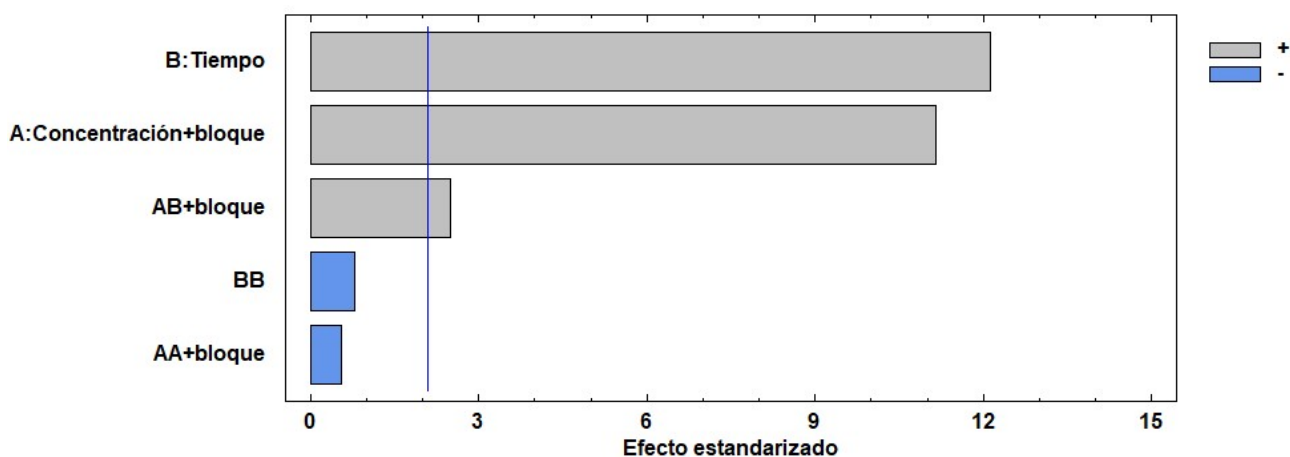
**Tabla 3.** Efecto de la concentración de NaOH y el tiempo de hidrólisis en el contenido de lignina y nitrógeno del residual sólido del café (T = 121 °C)

| Variantes | [NaOH] | Tiempo | $Y_{HB}$<br>(%)  | R L<br>(%)       | N<br>(%)        | P<br>(%)        |
|-----------|--------|--------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|
| 1         | 1      | 1      | $33,62 \pm 2,47$ | $69,26 \pm 2,92$ | $0,77 \pm 0,00$ | $4,84 \pm 0,00$ |
| 2         | 1      | 0      | $34,69 \pm 1,45$ | $43,87 \pm 1,28$ | $0,71 \pm 0,00$ | $4,42 \pm 0,00$ |
| 3         | 1      | -1     | $32,58 \pm 5,79$ | $31,00 \pm 4,19$ | $0,85 \pm 0,00$ | $5,29 \pm 0,01$ |
| 4         | 0      | 1      | $34,52 \pm 1,31$ | $54,16 \pm 5,61$ | $0,60 \pm 0,03$ | $3,74 \pm 0,21$ |
| 5         | 0      | 0      | $29,09 \pm 0,28$ | $36,09 \pm 7,31$ | $0,57 \pm 0,00$ | $3,53 \pm 0,00$ |
| 6         | 0      | -1     | $33,60 \pm 2,31$ | $10,57 \pm 4,85$ | $0,85 \pm 0,00$ | $5,30 \pm 0,00$ |
| 7         | -1     | 1      | $35,24 \pm 0,93$ | $24,28 \pm 3,76$ | $0,92 \pm 0,00$ | $5,74 \pm 0,00$ |
| 8         | -1     | 0      | $39,93 \pm 0,76$ | $22,00 \pm 1,97$ | $0,61 \pm 0,02$ | $3,83 \pm 0,15$ |
| 9         | -1     | -1     | $33,95 \pm 5,58$ | $3,28 \pm 1,19$  | $0,74 \pm 0,03$ | $4,62 \pm 0,20$ |

Rendimiento máximo de pretratamiento alcalino ( $Y_{HB}$ ), Remoción de lignina (R L), Nitrógeno (N) y Proteína (P) remante. Los valores corresponden al promedio de tres determinaciones  $\pm$  la desviación estándar.

Mediante las pruebas-F en un análisis de varianza (ANOVA) realizado a los valores de las variables respuesta de un total de 27 muestras del ensayo 1, se constató que la concentración y el tiempo en el que se aplica el pretratamiento afectan de manera estadísticamente significativa el contenido de lignina del residual, puesto que los valores-P son menores que 0,05. A través del análisis de la Prueba de Múltiples Rangos se determinó que las medias son significativamente diferentes de otras. El método empleado para discriminar las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. En el ANOVA para el contenido de nitrógeno, debido a que la concentración y el tiempo poseen valor-P < 0,05 se estableció que son significativamente diferentes. En el análisis de la Prueba de Múltiples Rangos, se determinó que no existen diferencias de medias cuando la concentración de hidróxido de sodio (NaOH) fue de 2 % y 6 % y en tiempo de 20 min y 60 min. Por lo tanto, se estableció que la mejor condición de pretratamiento resulto ser la combinación de 6 % de NaOH y 60 min. Para estas condiciones la remoción de lignina y contenido de nitrógeno son  $69,26 \pm 2,92$  % y  $0,77 \pm 0,00$  %, respectivamente (**variante 1, Tabla 3**). Estudios realizados por Niño López et al. (2013) y Reales et al. (2016) corroboran el efecto de la concentración de hidróxido de sodio empleada en pretratamientos alcalinos, obteniendo una remoción de lignina de 74 % al emplear NaOH al 5 % y de 33,95 % al usar el hidróxido al 3,91%.

La **Figura 2** muestra el Diagrama de Pareto Estandarizado para la remoción de lignina, que presenta los valores absolutos de los efectos estandarizados desde el más grande al más pequeño, con un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$ . Se demostró el efecto positivo (color gris) que tiene el tiempo (B), concentración (A) y la interacción de estos dos factores (AB) sobre la remoción de lignina en el residual, siendo estadísticamente significativos al cruzar la línea de referencia.

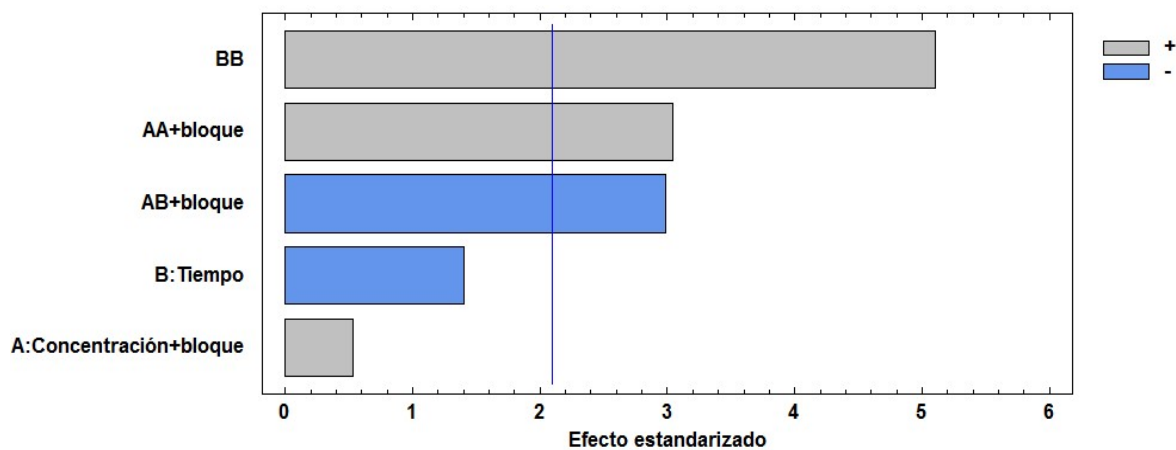


**Figura 2.** Diagrama de Pareto estandarizada para remoción de lignina

También, se pudo observar que la interacción tiempo-tiempo (BB) y concentración-concentración (AA) poseen un efecto negativo (color azul) que no son estadísticamente significativos. Por lo tanto, se

estableció que a medida que la concentración de NaOH y tiempo de hidrólisis incrementan, se obtiene una mayor remoción de lignina, lo cual facilita el acceso a los azúcares monoméricos.

En la **Figura 3** se muestra el efecto estandarizado del pretratamiento sobre el contenido de nitrógeno. Se observa que la interacción tiempo-tiempo (BB) y la concentración (AA) tienen un efecto estadísticamente positivo (color gris) con un  $\alpha = 0,05$  para mantener el contenido de nitrógeno en el residual. La interacción concentración-tiempo (AB) y tiempo (B) tienen un efecto negativo (color azul) siendo únicamente AB significativa. La concentración (A) posee un efecto estandarizado positivo (color gris) pero no es estadísticamente significativa en el nivel de 0,05. Este análisis permite determinar la magnitud e importancia de los efectos, pero no establece cuáles efectos aumentan o disminuyen la variable respuesta. Sin embargo, mantener el contenido de nitrógeno en el residual es primordial para el proceso de fermentación y su posterior producción de enzimas lipasas, debido a que el nitrógeno favorece el desarrollo y el metabolismo microbiano (Sánchez, 1999; Téllez-Mora et al., 2012).



**Figura 3.** Diagrama de Pareto estandarizada para contenido de nitrógeno

### 3.2.2. Segundo ensayo

En la **Tabla 4** se describen los resultados del segundo ensayo, donde se evaluó el efecto del tiempo de exposición y la temperatura, con una concentración inicial constante de álcali (6 %), en el pretratamiento teniendo como variable respuesta la remoción de lignina y la concentración de nitrógeno.

En el ensayo 2 se realizó un ANOVA con los resultados de las 27 muestras, se determinó que los valores de remoción de lignina con las variantes de temperatura y tiempo presentaron un efecto estadísticamente significativo, debido a que los valores- $P < 0,05$  y mediante la Prueba de Múltiples Rangos se constató que no existen diferencias con respecto a la media de la variante temperatura 25, 73 y 121 °C, pero si muestran diferencias de media en cada uno de los tiempos establecidos 20 min, 40 min y 60 min, utilizando un nivel del 95 % de confianza. En el caso del contenido de nitrógeno en el residual, mediante ANOVA se identificó que los valores son estadísticamente significativos (valor- $P < 0,05$ ) y por medio

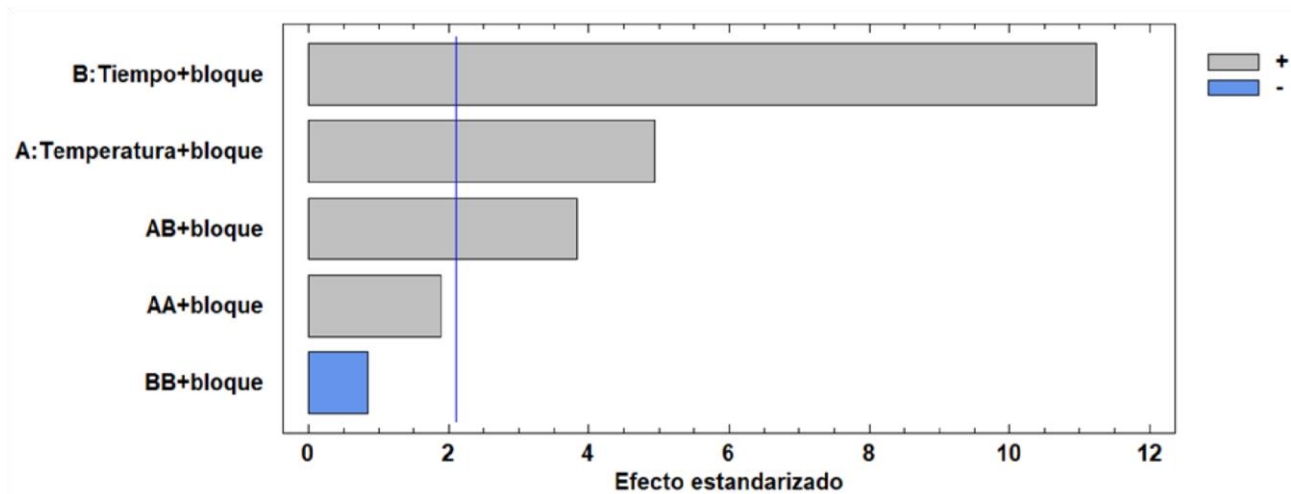
de un análisis de Prueba de Múltiples Rangos se observó diferencias entre las medias para 121 °C y con respecto al tiempo, cuando se efectuó el pretratamiento durante 40 y 60 minutos.

**Tabla 4.** Efecto de la temperatura y el tiempo de hidrólisis en el contenido de lignina y nitrógeno del residual sólido del café (NaOH=6 %)

| Variantes | Tiempo | Temperatura | Y <sub>HB</sub><br>(%) | R L<br>(%)   | N<br>(%)    | P<br>(%)    |
|-----------|--------|-------------|------------------------|--------------|-------------|-------------|
| 10        | 1      | 0           | 46,61 ± 2,33           | 46,11 ± 0,68 | 1,31 ± 0,04 | 8,16 ± 0,22 |
| 11        | 0      | 0           | 44,22 ± 3,10           | 42,76 ± 3,45 | 1,30 ± 0,03 | 8,12 ± 0,21 |
| 12        | -1     | 0           | 50,96 ± 7,62           | 28,32 ± 2,24 | 1,27 ± 0,00 | 7,94 ± 0,00 |
| 13        | 1      | -1          | 44,21 ± 4,67           | 44,28 ± 2,69 | 1,52 ± 0,03 | 9,50 ± 0,22 |
| 14        | 0      | -1          | 44,21 ± 4,52           | 40,91 ± 3,39 | 1,20 ± 0,00 | 7,49 ± 0,00 |
| 15        | -1     | -1          | 45,93 ± 1,37           | 26,54 ± 3,29 | 1,34 ± 0,21 | 8,39 ± 1,23 |

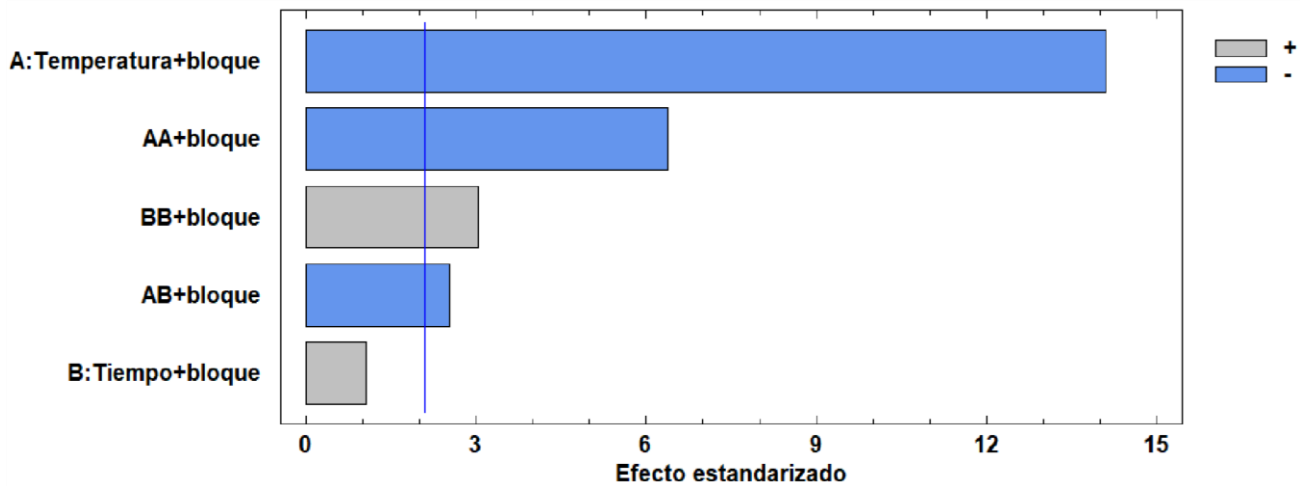
Rendimiento máximo de pretratamiento alcalino (Y<sub>HB</sub>), Remoción de lignina (R L), Nitrógeno (N) y Proteína (P) remante. Los valores corresponden al promedio de tres determinaciones ± la desviación estándar. Las codificaciones de -1, 0 y 1 representan al tiempo de 20 min, 40 min, 60 min y la temperatura de 25 °C, 73 °C y 121 °C. Nota: Los resultados correspondientes a las variantes a T=121°C se exponen en la tabla 3 (Variantes 1, 2 y 3) debido a que estas se encuentran en las mismas condiciones realizadas anteriormente de 121 °C, 6 % y en los tres tiempos.

La **Figura 4** presenta el Diagrama de Pareto de efectos estandarizado, se constató que el efecto positivo más grande (color gris) es el tiempo (B), seguido de la temperatura (A) y la interacción tiempo-temperatura (AB), debido a que cruzan la línea de referencia por lo que se evidencia que son estadísticamente significativas en la remoción de lignina para un nivel de significancia de 0,05, también se refleja, aunque en menor magnitud, el efecto positivo (color gris) que tiene al interactuar temperatura-temperatura (AA) y el efecto negativo (color azul) que tiene la interacción tiempo-tiempo (BB), sin embargo estos no son significativos. Este diagrama ayuda a determinar los efectos positivos o negativos que tienen estas variantes, pero no se puede establecer si aumentan o disminuyen los valores de remoción de lignina



**Figura 4.** Diagrama de Pareto estandarizada para remoción de lignina

En la **Figura 5** se presentan los factores temperatura (A), interacción temperatura-temperatura (AA) con efecto negativo (barras azules) que cruzan la línea de referencia y son estadísticamente significativos en el nivel de 0,05. La interacción tiempo-tiempo (BB) tiene un claro efecto positivo (color gris) y la interacción temperatura-tiempo (AB) muestran un efecto negativo (color azul) y son significativos, también se observa, aunque en menor magnitud el variante tiempo (B) que tiene un efecto positivo (color gris) pero no es significativo al no cruzar la línea de referencia del efecto estandarizado.



**Figura 5.** Diagrama de Pareto estandarizada para contenido de nitrógeno.

En esta investigación la mayor remoción de lignina ( $69,26 \pm 2,92$  %) se obtuvo cuando se trató el residual con NaOH al 6% durante 1h. Sin embargo, en otros residuos lignocelulósicos se puede remover porcentajes de lignina similares empleando álcalis a menor concentración, como es el caso de Xu y Cheng (2011) que al estudiar el pretratamiento de pastos utilizando NaOH a diferentes concentraciones, con tiempos entre 15 min y 1 h, obtuvieron una remoción máxima de (85,8 %) usando NaOH al 2 % durante 1 h. Por otra parte, Silverstein et al. (2007) investigaron el tratamiento químico de tallos de algodón, e informaron que, entre los métodos empleados, el tratamiento con NaOH fue el más efectivo con una remoción de lignina de 65,63 % para las condiciones de NaOH al 2 % durante 90 minutos a 121°C. En cuanto a contenido de nitrógeno, Braham y Bressani (1978) en su investigación sobre la composición y utilización de pulpa de café, estudiaron el efecto de la hidrólisis alcalina durante 24 horas con soluciones de hidróxido de sodio de 2,5 %, 5,5 % y 7,5 %, en las cuales reportaron concentraciones de nitrógeno de 1,78 %, 1,76 % y 1,79 % en peso seco respectivamente, valores similares a los obtenidos en el presente estudio.

En ambos ensayos se calculó el rendimiento en masa del pretratamiento alcalino ( $Y_{HB}$ ), el cual en conjunto con todas las variables respuestas permitiría seleccionar las condiciones de pretratamiento. Sin embargo, se debe considerar en la producción de enzimas lipasas la influencia del nitrógeno en el medio de fermentación, debido a su función en el desarrollo del microorganismo (Sánchez, 1999). Por otra

parte, se conoce que bajos rendimientos en masa, pueden generar altas tasas de remoción de lignina y en consecuencia proporcionar una masa suficiente para hidrólisis (Menezes et al., 2014) como se presentó en los resultados de la **Tabla 3**, mientras que en el segundo ensayo (**Tabla 4**) se observó rendimientos máxicos mayores, con una menor remoción de lignina y mayor contenido de nitrógeno.

Las condiciones de concentración y tiempo empleadas en el pretratamiento del residual para su posterior fermentación se establecieron mediante ANOVA y la Prueba de Múltiples Rangos siendo de 6 % y 60 min, respectivamente. En el segundo ensayo las variantes 10 y 13 fueron las más adecuadas para el valor de nitrógeno presente en el residual con concentraciones de  $1,31 \pm 0,04$  % y  $1,52 \pm 0,03$  %, se constató que los tratamientos más agresivos para una mayor remoción de lignina demostraron tener un efecto negativo sobre el contenido de nitrógeno. Mediante este criterio se descartaron tratamientos con remoción de lignina elevada, pero baja concentración de nitrógeno, es decir, los resultados del primer ensayo. A partir de las condiciones experimentales del ensayo 2 se realizó la optimización de respuesta para el contenido de nitrógeno. Se obtuvo como resultado una temperatura de proceso de  $35,67$  °C, 60 min de exposición al pretratamiento y solución de NaOH a una concentración de 6 %.

### 3.3. Fermentación en estado sólido

El residual hidrolizado a través de las condiciones establecidas anteriormente (6 %, 60 min,  $35,67$  °C) fue empleado en el proceso de fermentación sólida. El residual pretratado bajo estas condiciones fue caracterizado en cuanto a contenidos de carbono y nitrógeno. Los valores fueron de 35,80 % y 1,22 %, respectivamente, resultando una relación C/N de 29:1, la cual luego se llevó a una relación C/N 12:1 mediante la adición de sulfato de amonio, necesaria para el crecimiento del microorganismo. La fermentación en estado sólido se realizó durante 3 días y la actividad enzimática (lipasa) fue de  $37,67 \pm 0,58$  U/g. Este valor es superior, comparado con otros estudios como el realizado por Serrat et al. (2019) quienes presentan una actividad máxima de 2,01 U/g en pulpa de café. Colla et al. (2015) utilizaron salvado de trigo y cáscara de arroz obteniendo valores de 12,20 U/g, resultados similares a los presentados por Costa et al. (2017). Sin embargo, estas actividades son menores de acuerdo a los publicados por Cujilema-Quitio et al. (2018) quienes obtuvieron una actividad máxima de 210,45 U/g empleando como sustrato bagazo de caña y miel de caña, esto puede deberse a que el medio de fermentación empleado fue específico para lipasas. Considerando que ninguno de estos estudios realizó algún pretratamiento químico para disociar el complejo formado por la hemicelulosa, celulosa y lignina en el sustrato, se observó que la actividad enzimática alcanzada en las condiciones establecidas en este trabajo permitió obtener un valor mayor de actividad en comparación a los reportados en la literatura.

#### 4. CONCLUSIONES

El hidróxido de sodio es efectivo en la remoción de lignina, llegándose a obtener valores de remoción hasta del  $69,26 \pm 2,92$  %; sin embargo, altas concentraciones y tiempos prolongados del pretratamiento alcalino, pueden disminuir el contenido de nitrógeno presente en el residual, perjudicando un posterior proceso biológico. Las mejores condiciones determinadas en este trabajo, para adecuar el residual sólido del beneficio de café al proceso de FES, fueron: 6 % de NaOH durante 60 minutos y una temperatura aproximada de  $35,6$  °C. La actividad enzimática de las lipasas fue de  $37,67 \pm 0,58$  U/g, valor que confirma el posible uso de este residual pretratado como sustrato para un proceso de fermentación sólida con *Aspergillus niger*.

#### 5. REFERENCIAS

- Álvarez Godoy, E., de Carvalho Rodrigues, J. C., Martins Alves, A. M., & Álvarez Lazo, D. (2007). Estudio del contenido y la calidad de la lignina mediante Pirólisis analítica en madera de *Pinus caribaea*. *Maderas. Ciencia y tecnología*, 9(2), 179-188. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-221X2007000200008>
- Ashok, A., Doriya, K., Rao, D., & Kumar, D. (2017). Design of solid state bioreactor for industrial applications: An overview to conventional bioreactors. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 9, 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.10.014>
- Badie, M., Asim, N., Jahim, J., & Sopian, K. (2014). Comparison of Chemical Pretreatment Methods for Cellulosic Biomass. *APCBEE Procedia*, 9, 170-174. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2014.01.030>
- BCE. (2019). Banco Central del Ecuador, Información Estadística Mensual No. 2013 - Noviembre 2019. Obtenido de Estadísticas del sector externo: <https://contenido.bce.fin.ec/home1/estadisticas/bolmensual/TEMensual.jsp>
- Beltrán, F., Orona, D., Cornejo, I., González, J., Esparza, J., & Quintana, E. (2019). Agro-Industrial Waste Revalorization: The Growing Biorefinery. *Biomass for Bioenergy - Recent Trends and Future Challenges*, 1-20. <https://doi:10.5772/intechopen.83569>
- Bermúdez, R., García, N., Serrano, M., Rodríguez, M., & Mustelier, I. (2014). Conversión de residuales agroindustriales en productos de valor agregado por fermentación en estado sólido. *Tecnología química*, 34(3), 263-274.
- Bolado-Rodríguez, S., Toquero, C., Martín-Juárez, J., Travaini, R., & García-Encina, P. A. (2016). Effect of thermal, acid, alkaline and alkaline-peroxide pretreatments on the biochemical methane potential and kinetics of the anaerobic digestion of wheat straw and sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 201, 182-190. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.047>
- Braham, J., & Bressani, R. (1978). Pulpa de café. composición, Tecnología y Utilización. Bogotá: Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, Guatemala CIID IDRC - 108s, 152: 22, 135
- BUCHI. (2010). Nitrogen and Protein Determination in Soy Products according to the Kjeldahl Method, Application Note 035/2010 Version 1. [https://static1.buchi.com/sites/default/files/FB56\\_AN\\_035\\_2010\\_Nitrogen\\_in\\_Soja\\_Products\\_0.pdf](https://static1.buchi.com/sites/default/files/FB56_AN_035_2010_Nitrogen_in_Soja_Products_0.pdf)
- Cairns, C., Nai, C., & Meyer, V. (2018). How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. *Fungal Biol Biotechnol*, 5(13), 2-14. <https://doi.org/10.1186/s40694-018-0054-5>
- Chala, B., Oechsner, H., Fritz, T., Latif, S., & Müller, J. (2018). Increasing the loading rate of continuous stirred tank reactor for coffee husk and pulp: Effect of trace elements supplement. *Engineering in Life Sciences*, 18(8), 551-561. <https://doi.org/10.1002/elsc.201700168>
- Chávez, M., & Domine, M. (2013). Lignina, estructura y aplicaciones: Métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 4(4), 15-46. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4710101>
- Che Kamarludin, S., Jainal, M., Azizan, A., Safaai, N., & Mohamad Daud, A. (2014). Mechanical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production. *Applied Mechanics and Materials*, 625, 838-841. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.625.838>

- Chen, Y., Sharma, R., Keshwani, D., & Chen, C. (2007). Potential of Agricultural Residues and Hay for Bioethanol Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 142(3), 276-290. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-0026-3>
- Colla, L., Ficanha, A., Rizzardi, J., Bertolin, T., Reinehr, C., & Costa, J. (2015). Production and Characterization of Lipases by Two New Isolates of *Aspergillus* through Solid-State and Submerged Fermentation. *BioMed Research International*, 725959. <https://doi.org/10.1155/2015/725959>
- Cortés, W. (2014). Tratamientos Aplicables a Materiales Lignocelulósicos para la Obtención de Etanol y Productos Químicos. *Revista de Tecnología*, 13(1), 39-44. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6041572>
- Costa, T., Hermann, K., Garcia-Roman, M., Valle, R., & Tavares, L. (2017). Lipase production by *Aspergillus Niger* grown in different agro-industrial wastes by solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 34(2), 419-427. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20170342s20150477>
- Cuervo, L., Folch, J., & Quiroz, R. (2009). Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares Para la Producción de Etanol. *BioTecnología*, 13(3), 20-21.
- Cujilema-Quitio, M. C., León-Revelo, G., Rizo Porro, M., Taramona Ruiz, L., & Ramos-Sánchez, L. B. (2018). Producción de lipasas por fermentación sólida con *Aspergillus Niger*: Influencia del pH. *Revista Centro Azúcar*, 45(4), 1-9. <https://biblat.unam.mx/hevila/Centroazucar/2018/no4/1.pdf>
- De la Cruz-Martorell, K., Gómez-Salcedo, Y., Santander, Y., Catagua Mera, D. J., Dustet Mendoza, J. C., & Pereda-Reyes, I. (2019). Effect of alkaline pre-treatment on the anaerobic biodegradability of coffee husk. *Revista Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia*, (92), 36-41. <https://doi.org/10.17533/udea.redin.20190516>
- Encalada, M., Fernández, P., Jumbo, N., & Quichimbo, A. (2017). Ensilaje de pulpa de café con la aplicación de aditivos en el cantón Loja. *Bosques Latitud Cero*, 7(2), 71-82. <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/322/293>
- Falony, G., Coca, J., Dustet, J., & Martínez, J. (2006). Production of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 235-240.
- Fia, R., de Matos, A., Fia, F., de Matos, M., Lambert, T., & Nascimento, F. (2010). Desempenho de forrageiras em sistemas alagados de tratamento de águas residuárias do processamento do café. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 14(8), 842-847. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662010000800008>
- Figueroa, J., & Vargas, L. (2016). Evaluación de DES, FSC y SPME/GC-MS para la extracción y determinación de compuestos responsables del aroma de café tostado de Vilcabamba - Ecuador. *Química Nova*, 39(6), 712-719. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20160077>
- Fleuri, L., Oliveira, M., Lara, A., Capoville, B., Pereira, M., Delgado, C., & Novelli, P. (2014). Production of fungal lipases using wheat bran and soybean bran and incorporation of sugarcane bagasse as a co-substrate in solid-state fermentation. *Food Science Biotechnology*, 23(4): 1199-1205. <https://doi.org/10.1007/s10068-014-0164-7>
- Fu, X., Zhu, X., Ga, K., & Duan, J. (1995). Oil and fat hydrolysis with lipase from *Aspergillus* sp. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72(5), 527-531. <https://doi.org/10.1007/BF02638852>
- Geoffry, K., & Achur, R. (2018). Screening and production of lipase from fungal organisms. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, 241-253. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.03.009>
- Gurram, R., Al-Shannag, M., Knapp, S., Das, T., Singaas, E., & Alkasrawi, M. (2016). Technical possibilities of bioethanol production from coffee pulp: a renewable feedstock. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 18(1), 269-278. <https://doi.org/10.1007/s10098-015-1015-9>
- Gutiérrez, Y., Dustet, J., & Martínez, J. (2008). Estudio de la etapa de fermentación para producir una lipasa de *A. niger* con potencialidades para la aplicación en la industria alimenticia. (Tesis de Maestría). Instituto Superior Politécnico "José Antonio Echeverría", Ciudad La Habana.
- Karimi, K., & Taherzadeh, M. (2016). A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: Composition, imaging, and crystallinity. *Bioresource Technology*, 200, 1008-1018. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.022>
- Lagunas, B., García, B., Castaño, E., Regalado, C., & Ávila, E. (2006). Production of hemicellulolytic enzymes through solid substrate fermentation and their application in the production of balanced feed for broilers. *Veterinaria México*, 37(1), 1-12. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=5341>
- Li, C., Knierim, B., Manisseri, C., Arora, R., Scheller, H., Auer, M., Vogel, K., Simmons, B., & Singh, S. (2010). Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. *Bioresource Technology*, 101(13): 4900-4906. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.066>



EVALUACIÓN DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS DE RESIDUALES SÓLIDOS DEL BENEFICIO DE CAFÉ  
PARA LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIPASAS

- Lu, F., & Ralph, J. (2010). Lignin. Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biochemicals and Biofuels. First ed. Amsterdam: Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53234-3.00006-7>
- Menezes, E., do Carmo, J., Alves, J., Menezes, A., Guimarães, I., Queiroz, F., & Pimenta, C. (2014). Optimization of Alkaline Pretreatment of Coffee Pulp for Production of Bioethanol. *Biotechnological progress*, 30(2), 451-462. <https://doi.org/10.1002/btpr.1856>
- Murthy, P., & 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>
- Nema, A., Patnala, S., Mandari, V., Kota, S., & Devarai, S. (2019). Production and optimization of lipase using *Aspergillus niger* MTCC 872 by solid-state fermentation. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0125-7>
- Nieto, I., & Chegwin, C. (2010). Influencia del sustrato utilizado para el crecimiento de hongos comestibles sobre sus características nutraceuticas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1): 169-178. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/15631/16392>
- Niño López, L., Acosta Cárdenas, A., & Gelves Zambrano, R. (2013). Evaluación de pretratamientos químicos para la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, (69), 317-326. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43029812024>
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 81-84. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00121-3](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00121-3)
- Puerta, G., & Ríos, S. (2011). Composición química del mucílago de café, según el tiempo de fermentación y refrigeración. *Cenicafé*, 62(2), 23-40. <https://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/478>
- Putri, D., Khoutama, A., Perdani, M., Utami, T., & Hermansyah, H. (2020). Optimization of *Aspergillus niger* lipase production by solid state fermentation of agro-industrial waste. *Energy Reports*, 6, 331-335. <https://doi.org/10.1016/j.egy.2019.08.064>
- Reales, J., Castaño, H., & Zapata, J. (2016). Evaluación de tres métodos de pretratamiento térmico sobre la deslignificación de tallos de yuca. *Información Tecnológica*, 27(3), 11-22. <https://doi:10.4067/S0718-07642016000300003>
- Reyes-Ocampo, I., González-Brambila, M., & López-Isunza, F. (2013). Un análisis del metabolismo de *Aspergillus niger* creciendo sobre un sustrato sólido. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12(1), 41-56. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1665-27382013000100005](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382013000100005)
- Rodríguez, N. (2013). Producción de alcohol a partir de la pulpa de café. *Cenicafé*, 64(2), 78-93. <https://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/541/1/arc064%2802%2978-93.pdf>
- Sadh, P., Duhan, S., & Duhan, J. (2018). Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z>
- Sánchez, V. (1999). Producción de proteasas fúngicas por fermentación en estado sólido para su aplicación en la industria de alimentos. [Tesis de Doctorado, Universidad de Buenos Aires]. [https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis\\_n3218\\_Sanchez.pdf](https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n3218_Sanchez.pdf)
- Sarip, H., Hossain, M., Azemi, M., & Allaf, K. (2016). A Review of the Thermal Pretreatment of Lignocellulosic Biomass towards Glucose Production: Autohydrolysis with DIC Technology. *BioResources*, 11(4), 10625-10653.
- Saval, S. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. *Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería*, 16(2), 14-46. [https://smbb.mx/wp-content/uploads/2017/10/Revista\\_2012\\_V16\\_n2.pdf](https://smbb.mx/wp-content/uploads/2017/10/Revista_2012_V16_n2.pdf)
- Schwanninger, M., & Hinterstoisser, B. (2002). Klason Lignin: Modifications to Improve the Precision of the Standardized Determination. *Holzforschung*, 56(2), 161-166. <https://doi.org/10.1515/HF.2002.027>
- Serna-Jiménez, J. A., Torres-Valenzuela, L. S., Martínez-Cortínez, K., & Hernández-Sandoval, M. C. (2018). Aprovechamiento de la pulpa de café como alternativa de valorización de subproductos. *Revista Ion*, 31(1), 37-42. <http://dx.doi.org/10.18273/revion.v31n1-2018006>
- Serrat, M., Arroyo, A., Ladrón, A., & Pérez, I. (2019). Influencia de las condiciones de cultivo en la producción de lipasas por hongos filamentosos en fermentación sólida y sumergida. *Cayos de Villa Clara. Cuba. VII Simposio Internacional de Química. II Convención Científica Internacional*.
- Shafiei, M., Kumar, R., & Karimi, K. (2015). Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. *Biofuel and Biorefinery Technologies*, vol 1. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-14033-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-14033-9_3)
- Shi, J., Pan, Z., McHugh, T., Wood, D., Zhu, Y., Avena, R., & Hirschberg, E. (2008). Effect of Berry Size and Sodium Hydroxide Pretreatment on the Drying Characteristics of Blueberries under Infrared Radiation Heating. *Journal of Food Science*, 73(6), E259-E265. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00816.x>

- Silverstein, R. A., Chen, Y., Sharma-Shivappa, R. R., Boyette, M. D., & Osborne, J. (2007). A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Bioresource Technology*, 98(16), 3000–3011. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.022>
- Taherzadeh, M., & Karimi, K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(9), 1621–1651. <https://doi.org/10.3390/ijms9091621>
- TAPPI. (2006). Acid-insoluble lignin in wood and pulp (Reaffirmation of T 222 om-02). *The Technical Association of the Paper and Pulp Industry (TAPPI)*(2), 1-14. <https://www.tappi.org/content/SARG/T222.pdf>
- Téllez-Mora, P., Peraza-Luna, F. A., Feria-Velasco, A., & Andrade-González, I. (2012). Optimización del proceso de fermentación para la producción de tequila, utilizando la metodología de superficie de respuesta (msr). *Revista mexicana de ingeniería química*, 11(1), 163-176. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmiq/v11n1/v11n1a14.pdf>
- Torres Jaramillo, D., Morales Vélez, S. P., & Quintero Díaz, J. C. (2017). Evaluación de pretratamientos químicos sobre materiales lignocelulósicos. *Revista chilena de ingeniería*, 25(4), 733-743. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-33052017000400733>
- Vilela, D., Pereira, G., Silva, C., Batista, L., & Schwan, R. (2010). Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). *Food Microbiology*, 27(8), 1128-1135. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.024>
- Watanabe, N., Ota, Y., Minoda, Y., & Yamada, K. (1977). Isolation and Identification of Alkaline Lipase Producing Microorganisms, Cultural Conditions and Some Properties of Crude Enzymes. *Agricultural and Biological Chemistry*, 41(8), 1353–1358. <https://doi:10.1080/00021369.1977.10862697>
- Xu, J., & Cheng, J. (2011). Pretreatment of switchgrass for sugar production with the combination of sodium hydroxide and lime. *Bioresource Technology*, 102(4), 3861–3868. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.038>