

Disminución de polifenoles totales y taninos en residuales sólidos procedentes del beneficio de café para la producción de lipasas

Jessica Ponce-Rodríguez^{1*}, Anlly Vilcacundo-Alcívar², Francisco Macías-Menéndez²,
Ernesto Alonso Rosero-Delgado², Yunet Gómez-Salcedo²

¹⁾ Maestría en Ingeniería Química, Instituto de Posgrado, Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Av. Urbina y Che Guevara, Portoviejo, Manabí, Ecuador.

²⁾ Carrera de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas, Universidad Técnica de Manabí (UTM), Portoviejo, Manabí, Ecuador.

(*) j.ponce.3@hotmail.com

Recibido: 03/12/2020

Revisado: 17/12/2020

Aceptado: 27/12/2020

Resumen

Se determinó del residual de café la humedad, proteína, nitrógeno y lignina. Se evaluaron los efectos de la temperatura y el tiempo de exposición del pre-tratamiento alcalino en la disminución de polifenoles totales y taninos, obteniendo un mejor resultado a una temperatura igual a 73 °C y un tiempo de 20 min. Posteriormente, se obtuvieron las condiciones óptimas de fermentación mediante la evaluación de los efectos del pH y la temperatura sobre la actividad de la lipasa. Como resultado, se obtuvo que los valores óptimos de pH y temperatura fueron 3,5 y 35 °C respectivamente, obteniendo una actividad de lipasa de $99,44 \pm 3,47 \text{ U} \cdot \text{gS}^{-1}$, demostrando el uso de los sólidos del beneficio del café como sustrato en la obtención de lipasa.

Palabras clave: *Aspergillus niger*; biomasa; lipasa; polifenoles; taninos

Abstract

Reduction of total polyphenols and tannins in solid residues from coffee processing for lipase production. Moisture, protein, nitrogen and lignin from the coffee residual were determined. The effects of the temperature and the exposure time of the alkaline pretreatment in the reduction of total polyphenols and tannins were evaluated. A better result at a temperature equal to 73 °C and a time of 20 min was found. Subsequently, the optimal pH and temperature conditions effects on lipase activity were evaluated. As a result, the optimal pH and temperature values were 3.5 and 35 °C respectively, obtaining a lipase activity of $99.44 \pm 3.47 \text{ U} \cdot \text{gS}^{-1}$, proving these the use of coffee processing solids as a substrate in obtaining lipase.

Keywords: *Aspergillus niger*; Biomass; Lipase; Polyphenols; Tannins

Introducción

Uno de los efectos negativos que acompaña el crecimiento de la agroindustria es el aumento de residuos orgánicos. Algunos de estos residuos son tratados inadecuadamente, lo que produce contaminación ambiental y molestias por presencia de olores, proliferación de roedores e insectos, entre otros efectos negativos¹. Una posible respuesta a esta problemática, además de las alternativas de tratamientos de residuales, es su aprovechamiento a través de procesos biotecnológicos, como la fermentación en estado sólido, para la obtención de productos de interés económico como enzimas u otros metabolitos^{2,3}.

La agroindustria del café genera un gran volumen de residuos, que en la actualidad constituyen una problemática a nivel ambiental, además, de ser un tema de investigación⁴. Los residuos sólidos de la etapa del beneficio del café representan alrededor del 50% de la masa total⁵. Estos residuos están

compuestos por la cáscara, la piel y la pulpa del café⁶, los cuales son productos ricos en materia orgánica, lo que podrían hacerlos adecuados para la elaboración de productos de interés científico y comercial, como la elaboración de bioetanol⁷ o la producción de enzimas⁸ como la lipasa, la cual tiene importantes aplicaciones en la industria alimentaria, como la producción de grasas con propiedades físicas y químicas deseables⁹. Para que estos residuos sean aptos para el proceso de fermentación en estado sólido, es necesario someterlos a pre-tratamientos para la disminución de su contenido de lignina¹⁰. Según Ortiz¹¹, para lograr la hidrólisis de este compuesto se han propuesto diversos pre-tratamientos, entre los cuales se encuentran los físicos como: mecánicos y térmicos; y los químicos empleando ácidos, bases o la combinación de ambos. El pre-tratamiento alcalino es un método eficaz para la remoción de lignina, que consiste en la separación de las uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos, una rotura de

la estructura de la lignina y en la solubilización, redistribución y condensación de la lignina¹².

Por otro lado, una característica de estos residuos es que contienen sustancias como polifenoles, taninos y cafeína en su composición¹³. Entre estas sustancias, los polifenoles y taninos son los más dañinos, atribuyéndoles propiedades recalcitrantes durante la biodegradación del residual¹⁴ y efectos inhibidores en las enzimas¹⁵. Estas características conllevan a que los pre-tratamientos químicos o biológicos también tengan como objetivo la transformación de la composición de estos residuales, en cuanto al contenido de taninos.

La presente investigación tiene como objetivo, determinar las transformaciones que ocurren en la composición del residual sólido del beneficio del café, durante el pre-tratamiento alcalino, y la propuesta de las condiciones de temperatura y pH más favorables para la actividad de la lipasa, implicada en la fermentación del residual.

Materiales y métodos

Procedencia y manejo del residuo de café

El residual consiste en pulpa y cáscara de café de la especie *Coffea arabica* L., procedente de la etapa de beneficio del fruto, recolectada en el sitio San Pablo (zona rural), cantón Jipijapa en la provincia de Manabí. Posterior a la colecta, el residual se almacenó en bolsas plásticas herméticas a 4 °C, hasta su empleo en la experimentación.

El residual se secó, en un secador con circulación de aire a una temperatura de 60 °C¹⁶, hasta obtener una humedad inferior a 13%¹⁷. El contenido de humedad se determinó mediante un analizador marca Boeco, modelo BMA I50. El material seco se trituró y tamizó para obtener partículas con un tamaño promedio de 11,5 mm¹⁸.

Caracterización del residual

El residual se caracterizó en cuanto al contenido de proteínas y nitrógeno por el método Kjeldahl, de acuerdo a el método oficial descrito por la AOAC¹⁹ y contenido de lignina mediante el método de Klason, descrito por Godoy²⁰ y por Schwanninger²¹.

Pre-tratamiento alcalino

El pre-tratamiento alcalino se desarrolló según la metodología descrita por Menezes²². Para cada tratamiento, se procedió a mezclar 100 g de muestra del residual sólido y 1 L de hidróxido de sodio, durante un tiempo, una concentración de hidróxido de sodio y temperatura de exposición, definido por el diseño experimental (tablas 1 y 2). En el pre-tratamiento de la tabla 1, se evaluaron dos factores: el tiempo y la temperatura de exposición al pre-tratamiento a una concentración de hidróxido de sodio al 6% y, en el pre-tratamiento de la tabla 2, se evaluaron los factores concentración de hidróxido y tiempo a una temperatura de 121 °C. El residual pre-tratado se recuperó mediante filtración y lavado con 1,5 L de agua destilada

a 70 °C, de acuerdo al método propuesto por Chen²³. Después del lavado, el residual pre-tratado se secó en una mufla (Thermo Scientific THERMOLYN 48010) a una temperatura de 60 °C por 6 horas, para eliminar el exceso de agua.

Tabla 1. Pre-tratamiento alcalino temperatura-tiempo

Variable	-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)

Tabla 2. Pre-tratamiento alcalino tiempo-concentración

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

-1 nivel bajo (25 %, 20 min), 0 nivel medio (4 %, 40 min), 1 nivel alto (6 %, 60 min)

Se realizaron pruebas de normalidad y homocedasticidad, en las que se constató que los datos cumplen con una distribución normal y que la varianza de los errores de la variable respuesta es constante. Posteriormente se efectuó un análisis de varianza (ANOVA), con la finalidad de determinar si existían diferencias en el efecto de los pre-tratamientos. Las diferencias entre las medias de los tratamientos se calcularon mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey ($P \leq 0,05$) utilizando el software estadístico software Statgraphics Centurion XV.

Determinación de polifenoles totales

La extracción de polifenoles se realizó del residual sólido, antes y después del pretratamiento, de acuerdo a las condiciones óptimas reportadas en investigaciones anteriores²⁴. Para la cuantificación de polifenoles totales, se midieron 60 µL de la muestra a la que se agregaron 4,74 mL de agua destilada y 300 µL del reactivo Folin & Ciocalteu's phenol reagent, la mezcla se homogenizó utilizando el Pulsing vortex mixer (Fisher Scientific 022L5375), se esperó el tiempo de reacción (máximo 8 min).

Se añadieron 900 µL, de una solución de carbonato de sodio anhidro granular al 20%, y la solución resultante se almacenó a 20 °C durante dos horas. El blanco se preparó de igual forma, pero empleando agua destilada en lugar de muestra, correspondiendo a un volumen de 4,8 mL, para luego leer su concentración a 730 nm en un Espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Fisher Scientific – Evolution 60S). Los resultados se expresaron en equivalentes de ácido gálico (mg GAE.g⁻¹).

Cuantificación de taninos totales

La cuantificación se realizó por diferencia de polifenoles totales y polifenoles no tánicos. Se mezclaron 100 mL del extracto del residual sólido del beneficio de café, con 50 mL de solución de gelatina al 0,25%/100 mL de solución ácida de

cloruro de sodio y 20 g de caolín en polvo. La mezcla se agitó durante 15 min. Este método fue aplicado de acuerdo a lo mencionado por Bajaj²⁵. Seguidamente el sobrenadante se centrifugó (Eppendorf Centrifuge 5804 R) a 5000 rpm durante 5 minutos y 25 °C.

Posteriormente a la centrifugación se observó un precipitado que corresponde a los compuestos tánicos de la muestra y en el sobrenadante los polifenoles no tánicos; por lo tanto, a la muestra sobrenadante se le aplica el método descrito anteriormente para cuantificación de polifenoles totales, lo cual corresponderá al valor de polifenoles no tánicos presentes en el residual.

Preparación de la solución de esporas para la fermentación

La solución de las esporas se obtuvo siguiendo la metodología descrita por Gutiérrez²⁶, con algunas modificaciones. Se tomó el microorganismo (*Aspergillus niger*) y se inoculó en varios matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían como medio, 30 mL del agar papa dextrosa (PDA). Posteriormente se procedió con la incubación (Incubadora MEMMERT SN30) a 30°C durante siete días, hasta que se observó la superficie del agar completamente cubierta de esporas. Posteriormente, a cada matraz se le añadieron aproximadamente 20 mL de una solución de elementos trazas, previamente esterilizada, compuesta por FeSO₄·7H₂O 0,005 g/L, CuSO₄·5H₂O 0,001 g/L, MnSO₄·7H₂O 0,0015 g/L, ZnSO₄·7H₂O 0,003 g/L y 1 g/L de aceite de oliva.

Luego, los matraces se colocaron en una zaranda a 120 rpm por 30 minutos. El contenido de cada matraz se filtró a través de papel de Ø=125 mm y filtros de jeringa (Thermo Scientific™ PTFE Target2™) de 0,45 µm. El filtrado se recogió en un recipiente estéril y almacenó a 4 °C. El conteo del número de esporas por mL se llevó a cabo en la cámara de Neubauer.

Fermentación en estado sólido

Las condiciones de pre-tratamiento, a las que se somete el residual previo a la fermentación, se determinaron previamente²⁷. Se empleó una solución de NaOH a una concentración de 6%, 60 min de exposición al pre-tratamiento y una temperatura de proceso de 35,67 °C. Para la preparación de la fermentación en estado sólido se siguió la metodología descrita por Vilcacundo-Alcívar²⁷. La preparación del inoculo del *A. niger* para la fermentación en estado sólido se realizó inoculando el hongo en matraces Erlenmeyer de 50 mL, que contenían 5 gramos del residual hidrolizado, 1,5% (p/p sólido seco) de aceite de oliva como inductor para la producción de enzimas lipasas, una solución de 10⁷ esporas/g sólido seco y sulfato de amonio suficiente para tener una relación C/N 12:1, necesario para el crecimiento del *A. niger*, el medio tenía un rango de humedad relativa entre 78 – 85%.

Para la fermentación sólida se evaluó diseño experimental factorial n^k, con 2 factores y 3 niveles, diseñado por medio del software Statgraphics Centurion XV. Los factores que se analizaron fueron pH y temperatura en la fermentación en estado

sólido. Como variable de respuesta, se midió la actividad de lipasa. El pH fue regulado mediante la adición de ácido clorhídrico 1 N. El diseño experimental se describe en la tabla 3.

Tabla 3. Fermentación en estado sólido

Variable	-1	0	1
pH	3,5	5,5	7,5
Temperatura (°C)	25	35	45

-1 nivel bajo (3,5; 25 °C), 0 nivel medio (5,5; 35°C min), 1 nivel alto (7,5; 45 °C)

Determinación de lipasas

Para la determinación de lipasas se siguió la metodología descrita por Nema²⁸. En general, la actividad enzimática se puede expresar en términos de unidades por mililitro o unidades por gramo de sustrato seco y puede ser calculada mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad de lipasa } \left(\frac{U}{gS} \right) = \frac{A * C}{E} \quad (\text{Ec. 1})$$

donde A = mL de NaOH consumido por minuto; C = concentración de NaOH [mM]; E = concentración de la muestra en g/mL; U/gS = µmol de ácidos grasos liberados por minuto por gramo de sustrato sólido seco del que se ha extraído la enzima.

Resultados y discusión

Caracterización del residual

El contenido de humedad del residual fue de 74,4502 ± 2,35%. El contenido de nitrógeno y proteínas 1,32 ± 0,00 % y 8,28 ± 0,02 %, respectivamente, siendo estos resultados similares a los reportados en estudios anteriores^{29,30}. El porcentaje de lignina en el residual fue de 13,13 ± 0,06 %, un valor cercano a los reportados por Giroto³¹ y Gurrám³². Las diferencias que se encuentran en la literatura en cuanto a la composición del residual, se deben a diferentes factores entre ellos el tiempo de cosecha, condiciones de cultivo, la variedad del café utilizado o a las diferentes propiedades del residual debido a las diferencias de suelo y clima.

Pre-tratamiento alcalino

En la tabla 4 se muestran los resultados, donde se evaluó el efecto de la temperatura, la concentración de NaOH y el tiempo de exposición del residual al pre-tratamiento alcalino en la disminución de la concentración de polifenoles y taninos. Los resultados del ANOVA (tablas 5 y 6) presentaron una diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$) y, mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey, se demostró que existen diferencias significativas en la concentración de polifenoles y taninos entre las medias de la variantes temperatura (25, 73 y 121 °C), concentración de NaOH (2, 4 y 6%) y tiempo de exposición (20, 40 y 60 min), utilizando un nivel de confianza del 95%. Se demostró la existencia de diferencias significativas entre las variantes de tiempo y concentración de hidróxido

de sodio; sin embargo, en el caso de la temperatura no hubo una diferencia significativa entre 25 y 73 °C.

Tabla 4. Efecto del tiempo de exposición, concentración de Na(OH) y la temperatura en la concentración de los polifenoles totales y taninos del residual sólido del café

Variantes	T (°C)	t (min)	NaOH (%)	Taninos* (mgGAE.g ⁻¹)	Polifenoles totales* (mgGAE.g ⁻¹)
Inicial	-	-	-	10,32 ± 1,47	12,66 ± 1,76
1	25	20	6	3,81 ± 0,65	4,72 ± 0,68
2	25	40	6	3,96 ± 0,34	4,82 ± 0,33
3	25	60	6	4,26 ± 0,21	5,07 ± 0,23
4	73	20	6	3,15 ± 0,22	4,08 ± 0,48
5	73	40	6	4,11 ± 0,18	5,15 ± 0,21
6	73	60	6	5,66 ± 0,21	6,84 ± 0,26
7	121	20	6	5,18 ± 0,33	6,24 ± 0,25
8	121	40	6	6,10 ± 0,21	8,33 ± 0,01
9	121	60	6	8,83 ± 0,66	12,06 ± 0,56
10	121	20	4	6,49 ± 0,02	7,97 ± 0,02
11	121	40	4	6,56 ± 0,28	8,80 ± 0,01
12	121	60	4	7,30 ± 0,59	9,51 ± 1,04
13	121	20	2	6,97 ± 0,16	9,16 ± 0,01
14	121	40	2	7,66 ± 1,57	9,31 ± 1,52
15	121	60	2	7,89 ± 0,86	10,88 ± 0,97

*Los valores corresponden al promedio de tres determinaciones ± la desviación estándar

Tabla 5. Análisis de varianza para los taninos en el pre-tratamiento alcalino.

FACTOR	GL	F VALOR	P VALOR
A	2	27,17	3,48x10 ⁻¹¹
B	2	12,66	1,03x10 ⁻⁰⁴
C	2	5,30	0,01
A:B	4	6,55	6,52x10 ⁻⁰⁴
A:C	0	-	-
B:C	4	6,92	4,54x10 ⁻⁰⁴
A:B:C	0	-	-

A: Temperatura, B: Tiempo, C: Concentración

Tabla 6. Análisis de varianza para los polifenoles en el pre-tratamiento alcalino

FACTOR	GL	F VALOR	P VALOR
A	2	113,415	1,03x10 ⁻¹⁴
B	2	20,806	2,15x10 ⁻⁰⁶
C	2	7,436	2,38x10 ⁻⁰³
A:B	4	15,172	6,86x10 ⁻⁰⁷
A:C	0	-	-
B:C	4	12,153	5,45x10 ⁻⁰⁶
A:B:C	0	-	-

A: Temperatura, B: Tiempo, C: Concentración

Según el análisis estadístico, en cuanto a la disminución en la concentración de polifenoles y taninos, el tratamiento más efectivo fue la variante 4 (temperatura de 73 °C y un tiempo de exposición de 20 min), con una disminución de polifenoles totales de 12,66 ± 1,76 a 4,08 ± 0,478 mg GAE·g⁻¹ y de taninos de 10,32 ± 1,47 a 3,15 ± 0,217 mg GAE·g⁻¹. Con estos resultados se puede sugerir que el pre-tratamiento alcalino influye sobre la composición del residual, provocando la reducción del contenido de polifenoles totales y taninos. Esta reducción podría afectar en forma positiva a procesos de biodegradación, debido que los polifenoles y taninos son compuestos resistentes a la descomposición microbiana¹⁴. Sin embargo, este tratamiento también demostró tener un porcentaje de remoción de lignina igual a 28,32%²⁷, el cual es significativamente más bajo que el de otros estudios similares³³, esto se debió principalmente porque la condición de pre-tratamiento en la que se obtuvo una mayor disminución de polifenoles y taninos no fue tan agresiva.

Fermentación en estado sólido

Los resultados del efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad enzimática se muestran en la tabla 7. Mediante el análisis de varianza ANOVA (tabla 8), realizado a los valores de las variables respuesta de un total de 27 muestras de los diferentes tratamientos, se constató que el pH y la temperatura afectan de manera estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$) a la actividad enzimática. Mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey (tablas 9 y 10) se determinó que no existen diferencias de medias cuando la temperatura es de 25 o 45 °C, teniendo una actividad enzimática mayor a la temperatura de 35 °C. En el caso del pH, se determinó que existen diferencias entre las medias, siendo el pH de 3,5 el que logró mayor actividad enzimática. El valor de pH obtenido se encuentra dentro del rango esperado ya que un pH extremadamente ácido (menor a 1,5) puede producir una inhibición en el crecimiento fúngico. Por el contrario, un pH muy alcalino podría disminuir

Tabla 7. Efecto de la temperatura y el pH en la actividad enzimática (lipasa).

Variantes	TEMPERATURA (°C)	PH	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (U/GS)
1	45	7,5	44,44 ± 5,09
2	45	5,5	56,67 ± 6,67
3	45	3,5	72,22 ± 5,09
4	35	7,5	50,56 ± 3,47
5	35	5,5	61,44 ± 4,67
6	35	3,5	99,44 ± 3,47
7	25	7,5	59,89 ± 1,17
8	25	5,5	60,22 ± 0,38
9	25	3,5	64,00 ± 0,67

Los valores corresponden al promedio de tres determinaciones ± la desviación estándar

Tabla 8. Análisis de varianza para la fermentación en estado sólido

FACTOR	GL	F VALOR	P VALOR
TEMPERATURA	2	24,11	$8,10 \times 10^{-06}$
PH	2	107,86	$9,53 \times 10^{-11}$
TEMPERATURA:PH	4	26,43	$2,54 \times 10^{-07}$

Tabla 9. Prueba *post-hoc* para la temperatura en la fermentación en estado sólido.

	TEMPERATURA		SUBCONJUNTO	
	(°C)	N	1	2
DHS de Tukey ^{a,b}	45	9	57,78	
	25	9	61,37	
	35	9		70,48
Sig.			0,17	1,00

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

^a Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 9,000. ^b Alfa = 0,05

Tabla 10. Prueba *post-hoc* para el pH en la fermentación en estado sólido.

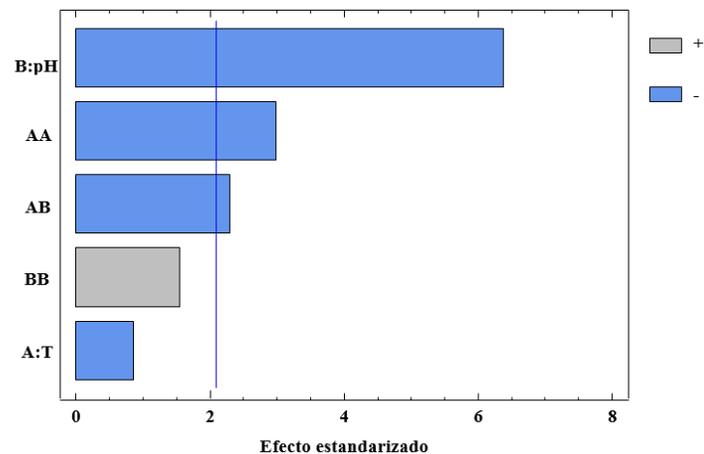
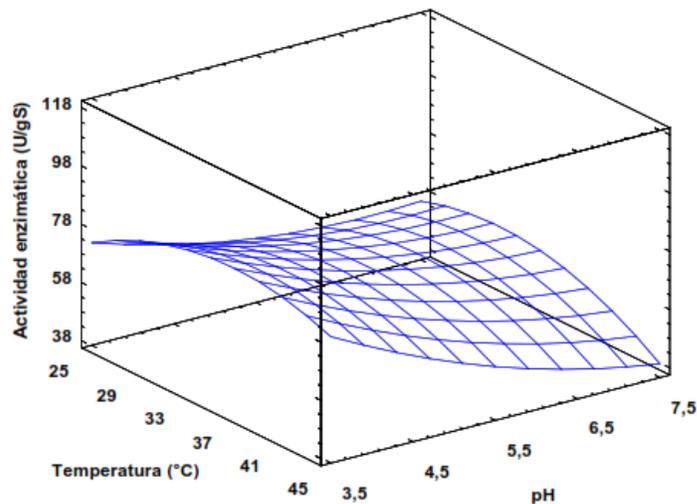
	pH	N	SUBCONJUNTO		
			1	2	3
DHS de Tukey ^{a,b}	7,5	9	51,63		
	5,5	9		59,45	
	3,5	9			78,56
Sig.			1,00	1,00	1,00

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

^a Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 9,000. ^b Alfa = 0,05

la actividad lipolítica, puesto que un medio con este carácter, junto con la acumulación de las proteasas produce inestabilidad en la enzima³⁴. Por otro lado, en el caso de la temperatura, si la temperatura es muy alta podría provocar una desnaturalización de la enzima³⁵, lo que podría explicar que la actividad de lipasa sea menor a una temperatura de 45°C.

En la figura 1 se muestra el diagrama de Pareto estandarizado para la fermentación en estado sólido. Esta herramienta identifica los factores que exhiben un mayor efecto acumulativo

**Fig. 1:** Diagrama de Pareto.**Fig. 2:** Diagrama de superficie respuesta.

sobre la variable respuesta y representa gráficamente los efectos estandarizados para cada factor. La figura muestra que, al modificar los valores del pH, por el efecto cuadrático de la temperatura y las interacciones pH-temperatura, existe un efecto inversamente proporcional sobre la variable respuesta; la actividad enzimática. Por lo tanto, se estableció que a medida que aumenta el pH y la temperatura, disminuye la actividad enzimática.

La actividad enzimática disminuye a la vez que el pH se vuelve más alcalino, mientras que para el caso de la temperatura el mejor valor se encuentra cerca de 35 °C (Fig. 2). Los resultados muestran que la actividad enzimática es más eficiente en un pH de 3,5 y a una temperatura alrededor de 35 °C.

La mejor condición de fermentación fue la combinación de un pH de 3,5 y una temperatura de 35 °C, obteniendo $99,44 \pm 3,47$ U/gS. Este resultado fue mayor al reportado por Damaso³⁶, utilizando residuos agroindustriales suplementados con subproductos del proceso de refinado de aceite de maíz o aceite de oliva como sustrato, y *A. niger* como microorganismo. Sin embargo, la actividad enzimática obtenida fue menor a la reportada por Mohseni³⁷, al utilizar salvado de arroz como sustrato y el microorganismo *A. niger*. Estas diferencias entre los resultados se deben al sustrato empleado, al método de pre-tratamiento que se usó y las condiciones de fermentación utilizadas en cada experimento.

Conclusiones

El pre-tratamiento alcalino mostro tener un efecto en la disminución de los polifenoles, se observó que a una temperatura de 73 °C y un tiempo de 20 minutos mostro tener una mayor disminución en la concentración de polifenoles y taninos; sin embargo, el pre-tratamiento antes mencionado también demostró tener una remoción de lignina menor a la esperada, en comparación con los pre-tratamientos a una temperatura y tiempo mayor.

Por otro lado, el pH y temperatura óptimos para tener una mayor actividad enzimática fue de 3,5 y 35 °C, respectiva-

mente, obteniendo un resultado de $99,44 \pm 3,47$ U/gS, valor que confirma el posible uso de los residuos sólidos del beneficio del café como sustrato para la obtención de lipasa, aprovechando un subproducto que de otra manera sería desechado ocasionando un grave daño al medio ambiente.

Referencias

1. YA Vargas-Corredor, LI Pérez-Pérez. Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente. **Revista Facultad de Ciencias Básicas**, **14(1)**, 59–72 (2018).
2. AS Franca, LS Oliveira. Alternative uses for coffee husks: A solid waste from green coffee production. **Ingeniería Química, Biológica y Ambiental**, 21–24 (2009).
3. S Saval. Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro. **BioTecnología**, **16(2)**, 14–46 (2012).
4. JE Wong, S Guyot, R Rodríguez, G Gutiérrez, JC Contreras, G Saucedo, CN Aguilar. Alternativas Actuales para el Manejo Sustentable de los Residuos de la Industria del Café en México. **Revista Científica de La Universidad Autónoma de Coahuila**, **5(10)**, 33–40 (2013).
5. D Pujol, C Liu, J Gominho, MA Olivella, N Fiol, I Villaescusa, H Pereira. The chemical composition of exhausted coffee waste. **Industrial Crops and Products**, **50**, 423–429 (2013).
6. R Ravindran, GA Williams, AK Jaiswal. Spent coffee waste as a potential media component for xylanase production and potential application in juice enrichment. **Foods**, **8(11)**, 585 (2019).
7. EG Menezes, JR do Carmo, AG Menezes, GL Alves, CJ Pimenta, F Queiroz. Use of different extracts of coffee pulp for the production of bioethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, **169(2)**, 673–687 (2013).
8. P Murthy, M Naidu. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation utilizing coffee by-products. **World Applied Sciences Journal**, **8(2)**, 199–205 (2010).
9. AE Aceves, LM Castañeda. Producción biotecnológica de lipasas microbianas, una alternativa sostenible para la utilización de residuos agroindustriales. **Vitae**, **19(3)**, 244–247 (2012).
10. JS Kim, YY Lee, TH Kim. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, **199**, 42–48 (2016).
11. WG Ortiz. Tratamientos aplicables a materiales lignocelulósicos para la obtención de etanol y productos químicos. **Revista de Tecnología**, **13(1)**, 33–44 (2016).
12. EM Cardona, JA Rios, JD Peña, LA Rios. Pre-tratamiento Alcalino de Pasto Elefante (*Pennisetum sp*) y King Grass (*Pennisetum hybridum*) Cultivados en Colombia para la Producción de Bioetanol. **Informacion Tecnológica**, **24(5)**, 69–80 (2013).
13. CM Machado, CR Soccol, BH De Oliveira, A Pandey. Gibberellic acid production by solid-state fermentation in coffee husk. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, **102(1)**, 179–191 (2002).
14. CN Aguilar, M Cruz, R Rodríguez, G Gutierrez-Sánchez, A Ramírez-Coronel, C Augur. Catechin degradation by several fungal strains isolated from Mexican desert. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, **14(2)**, 426–429 (2004).
15. W Tejerina, R Farfán, C Cuevas. Efectos del amoníaco, sulfuro y taninos sobre la actividad de un lodo anaerobico. **Avances En Energías Renovables y Medio Ambiente**, **11**, 23–28 (2007).
16. J Serna, L Torres, K Martínez, M Hernández. Aprovechamiento de la pulpa de café como alternativa de valorización de subproductos. **Revista Ion**, **31(1)**, 39 (2018).
17. R Bermúdez, N García, M Serrano, M Rodríguez, I Mustelie. Conversión de residuales agroindustriales en productos de valor agregado por fermentación en estado sólido. **Tecnología Química**, **34(3)**, 263–274 (2014).
18. J Shi, Z Pan, TH McHugh, D Wood, Y Zhu, RJ Avena-Bustillos, E Hirschberg. Effect of berry size and sodium hydroxide pretreatment on the drying characteristics of blueberries under infrared radiation heating. **Journal of Food Science**, **73(6)**, 259–265 (2008).
19. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Methods of analysis of association of official analytical chemists. AOAC International, United States (2019).
20. E.A Godoy, JC De Carvalho, AM Alves, DA Lazo. 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 (2007).
21. M Schwanninger, B Hinterstoisser. Klason lignin: Modifications to improve the precision of the standardized determination. **Holzforschung**, **56(2)**, 161–166 (2002).
22. EG Menezes, JR do Carmo, JG Alves, AG Menezes, IC Guimarães, F Queiroz, CJ Pimenta. Optimization of alkaline pretreatment of coffee pulp for production of bioethanol. **Biotechnology Progress**, **30(2)**, 451–462 (2014).
23. Y Chen, RR Sharma-Shivappa, D Keshwani, C Chen. Potential of agricultural residues and hay for bioethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, **142(3)**, 276–290 (2007).
24. SI Mussatto, LF Ballesteros, S Martins, JA Teixeira. Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. **Separation and Purification Technology**, **83(1)**, 173–179 (2011).
25. KL Bajaj, AK Devsharma. A colorimetric method for the determination of tannins in tea. **Mikrochimica Acta**, **68(3–4)**, 249–253 (1977).
26. Y Gutiérrez, J Dustet, J Martínez. 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, Cuba (2008).

27. A Vilcacundo-Alcívar, F Macías-Menéndez, J Ponce-Rodríguez, Y Gómez-Salcedo, E Rosero-Delgado. (En prensa). Evaluación del proceso de hidrólisis de residuales sólidos del beneficio de café para la producción de enzimas lipasas. **Bases de la Ciencia**, **5(3)**, (2020)
28. A Nema, S Patnala, V Mandari, S Kota, S Devarai. Production and optimization of lipase using *Aspergillus niger* MTCC 872 by solid-state fermentation. **Bulletin of the National Research Centre**, **43(1)**, 1-8 (2019).
29. M Encalada, P Fernández, N Jumbo, A Quichimbo. Ensilaje de pulpa de café con la aplicación de aditivos, en el cantón Loja. **Bosques Latitud Cero**, **7(2)**, 71-82 (2017).
30. AN Salazar, RS Acuña, MG de Salcedo. Composición química de la pulpa de café a diferentes tiempos de ensilaje para su uso potencial en la alimentación animal. **Zootecnia Tropical**, **27(2)**, 135–141 (2009).
31. F Giroto, MC Lavagnolo, A Pivato. Spent Coffee Grounds Alkaline Pre-treatment as Biorefinery Option to Enhance their Anaerobic Digestion Yield. **Waste and Biomass Valorization**, **9(12)**, 2565–2570 (2018).
32. R Gurram, M Al-Shannag, S Knapp, T Das, E Singaas, M Alkasrawi. Technical possibilities of bioethanol production from coffee pulp: A renewable feedstock. **Clean Technologies and Environmental Policy**, **18(1)**, 269–278 (2016).
33. J Zhu, C Wan, Y Li. Enhanced solid-state anaerobic digestion of corn stover by alkaline pretreatment. **Bioresource Technology**, **101(19)**, 7523–7528 (2010).
34. MC Cujilema-Quitio, G León-Revelo, MR Porro, L Taramona-Ruiz, L Ramos-Sanchez. Producción de lipasas por fermentación sólida con *Aspergillus niger*: influencia del pH. **Revista Centro Azúcar**, **45**, 1–9 (2018).
35. OA Figueroa, JE Zapata, CP Sánchez. Optimización de la hidrólisis enzimática de proteínas de plasma bovino. **Informacion Tecnologica**, **27(2)**, 39–52 (2016).
36. MC Damaso, MA Passianoto, SC De Freitas, DM Freire, RC Lago, S Couri. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, **39(4)**, 676–681 (2008).
37. S Mohseni, GD Najafpour, Z Vaseghi, S Mahjoub. Solid State Fermentation of Agricultural Residues for Lipase in a Tray-Bioreactor. **World Applied Sciences Journal**, **16(7)**, 1034–1039 (2012).