

# PRODUCCIÓN DE ALCOHOL A PARTIR DE LA PULPA DE CAFÉ

Nelson Rodríguez Valencia\*

---

**RODRÍGUEZ V., N. Producción de alcohol a partir de la pulpa de café. Revista Cenicafé 64 (2): 78-93. 2013**

Para evaluar el aprovechamiento de la pulpa del café Variedad Castillo® en la producción de alcohol, se evaluaron 25 tratamientos, en un diseño completamente aleatorio en arreglo factorial 5x5, con cinco tipos de hidrólisis (natural, ácida, alcalina, enzimática con celulasas y enzimática con celulasas y pectinasas) y cinco inóculos de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (natural, dos levaduras prensadas comerciales y dos levaduras secas comerciales). Se utilizó pulpa proveniente del despulpado sin agua, con menos de 1 h de obtención, la hidrólisis ácida se realizó con ácido sulfúrico concentrado, la hidrólisis alcalina con hidróxido de sodio al 32%, la hidrólisis enzimática con celulasas y pectinasas comerciales. Se evaluó el pH, porcentaje de humedad y °Brix, en la pulpa y en las muestras finales de alcohol rectificado y deshidratado se determinaron los contenidos de alcohol y congéneres. El análisis de varianza mostró efecto de la interacción hidrólisis-inóculo en los rendimientos de alcohol y en el pH, °Brix y gravedad específica. La prueba de constrate al 5% mostró que los tratamientos con mayor rendimiento en la producción de alcohol fueron aquellos que involucraron la hidrólisis enzimática con celulasas (22,12 mL.kg<sup>-1</sup> de pulpa fresca), seguida de la hidrólisis enzimática con celulasas-pectinasas (20,96 mL.kg<sup>-1</sup> de pulpa fresca) y los tratamientos sin hidrólisis con levaduras comerciales (18,30 mL.kg<sup>-1</sup> de pulpa fresca). Los mayores contenidos de etanol se alcanzaron en los tratamientos: con hidrólisis enzimática con celulasas (97,78%), sin hidrólisis (96,92%), con hidrólisis enzimática utilizando celulasas y pectinasas (95,76%), con hidrólisis alcalina (95,59%) y con hidrólisis ácida (93,97%).

**Palabras clave:** Biocombustibles, alcohol carburante, subproductos del café, fermentación alcohólica.

---

## ALCOHOL PRODUCTION FROM COFFEE PULP

In order to evaluate the use of coffee pulp from the variety Castillo® in ethanol production, we evaluated 25 treatments in a completely randomized factorial arrangement 5 x 5, involving 5 types of hydrolysis (natural, acidic, alkaline, enzymatic with cellulases and pectinases) and 5 of the yeast inocula *Saccharomyces cerevisiae* (natural, two commercial yeast and two yeast commercial dry). The pulp of coffee, no water from the pulping of the fruit, was used less than 1 hour generated, acid hydrolysis was performed with concentrated sulfuric acid, alkaline hydrolysis with sodium hydroxide sodium to 32%, enzymatic hydrolysis was performed by adding commercial cellulases and pectinases. A pulp samples were evaluated pH, % humidity and °Brix and the final samples rectified and dehydrated alcohol were evaluated alcohol content and the main congeners. Analysis of variance showed the interaction effect of hydrolysis-yeast yields of alcohol and the pH, °Brix and Specific Gravity. Constrate test showed 5% higher performance treatments in the production of alcohol and among which there were no statistical differences were those that involved the enzymatic hydrolysis with cellulases (22,12 mL.kg<sup>-1</sup> of fresh pulp), followed by enzymatic hydrolysis with cellulases-pectinases (20,96 mL.kg<sup>-1</sup> of fresh pulp) and treatments without hydrolysis (18,30 mL.kg<sup>-1</sup> of fresh pulp). The highest mean levels of ethanol were achieved for treatments with cellulase enzymatic hydrolysis (97,78%), followed by treatment without hydrolysis (96,92%) of treatment with enzymatic hydrolysis using cellulases and pectinases (95,76%), treatment with alkaline hydrolysis (95,59%) and treatment with acid hydrolysis (93,97%).

**Keywords:** Biofuels, fuel alcohol, coffee pulp, coffee byproducts, alcoholic fermentation.

---

\* Investigador Científico III. Disciplina Gestión de Recursos Naturales y Conservación. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Manizales, Caldas, Colombia.

El fruto de café está compuesto por la pulpa, el mucílago y la semilla. La pulpa está formada por el exocarpio (epidermis) y parte del mesocarpio (mucílago); el color de la epidermis varía de verde a rojo o amarillo, dependiendo de la variedad de café y del grado de maduración del fruto (25). La pulpa es el primer producto que se obtiene en la etapa de beneficio del fruto y representa, en base húmeda, alrededor del 43,58% del peso del fruto fresco (25).

La pulpa de café tiene un contenido de humedad entre el 76% y el 80%. Está constituida por materia orgánica (entre el 88% y el 89% en base seca) y cenizas (entre el 11% y el 12% en base seca) (9, 34). Además, el contenido de otras sustancias en base seca es de 1,10% - 1,30% de nitrógeno, 29,50% de celulosa, 4,60% de hemicelulosa, 16,90% de lignina, 0,75% de cafeína y 3,70% de taninos (9). Rodríguez (31), reporta contenidos medios, en base seca, de 17,31% para azúcares reductores y de 18,49% para azúcares totales, con un valor medio de 3,59°Brix. De la pulpa de café fresca se han aislado levaduras de los géneros *Candida* sp., *Rhodotorula* sp. y *Toroplosis* sp. (6).

En Colombia, el promedio de la producción de pulpa de café es de 2,25 t.ha-año<sup>-1</sup> (29). Por cada millón de sacos de 60 kg de café almendra que Colombia exporta, se generan 162.900 t de pulpa fresca, que si no se utilizan adecuadamente producirían una contaminación en excretas y orina, equivalente a la generada por una población de 868.736 habitantes, durante un año. Los programas de renovación de cafetales establecidos por la Federación Nacional de Cafeteros propenden por estabilizar la producción en las próximas décadas, en 18 millones de sacos de café almendra, valores con los cuales la producción de pulpa de

café tendría un incremento cercano al 50%. En este sentido, si no se buscan alternativas atractivas para el uso de este subproducto puede generarse un gran impacto ambiental, sobre todo cuando ésta se dispone en cielo abierto hasta su descomposición total (produciendo gases y lixiviados).

A través del tiempo se han realizado diferentes investigaciones sobre la composición química y microbiológica de la pulpa de café, con el fin de obtener productos de valor agregado, tales como: levaduras alimenticias (15), alcohol (14), colorantes (13), biogás (10), abono orgánico (17, 24), pectinas (12, 31), miel de café (38), alimentos para animales (7, 9), baterías eléctricas (9, 11), materiales de construcción (9), productos químicos (9), hongos comestibles y medicinales (32, 33, 34) y ensilaje, como método de conservación para su posterior uso en la elaboración de otros productos (30).

De igual manera, la pulpa de café seca se ha utilizado como combustible directo. Porres *et al.* (27), reportan un poder calorífico de 15,88 MJ.kg<sup>-1</sup> de pulpa seca, con un consumo en el secado mecánico de la misma de 36,92 MJ.kg<sup>-1</sup>, para un balance energético negativo en el proceso, debido a que por cada unidad de energía aplicada en el secado de la pulpa sólo se generaron 0,43 unidades de energía en la combustión del producto seco.

La producción de biocombustibles como bioetanol, biobutanol y biogás, a partir de la pulpa de café, es una alternativa que se está investigando, sobre todo por ser biocombustibles de segunda generación, los cuales se constituyen en fuentes de energía renovable, que permiten diversificar la matriz energética del país, y que a la vez reducen la emisión de gases de efecto invernadero, siendo amigables con el medio ambiente, sin alterar la productividad cafetera, ayudando a

contrarrestar la crisis alimentaria, ya que no se hace uso de productos destinados para la alimentación humana.

Para la producción de biogás a partir de la pulpa de café fresca, Arcila (4) reporta rendimientos de 25 L de biogás por 1,0 kg de pulpa alimentada a los digestores, equivalente a un poder calorífico de 0,54 MJ.kg<sup>-1</sup> de pulpa fresca.

Calle (9) reporta que en la fermentación de la pulpa y del mucílago de café predomina la formación de alcohol etílico, por lo que para una producción cafetera rentable recomienda obtener los materiales fermentables de la pulpa y el mucílago sin la utilización de agua, con el fin de contrarrestar la fermentación acética y asegurar el desarrollo óptimo de las levaduras. Así mismo, estudió las condiciones para la obtención de alcohol a partir de la pulpa y el mucílago de café, encontrando que de los subproductos generados en el beneficio de 100 kg de café cereza, en promedio pueden obtenerse 1,2 L de alcohol etílico de 85°, equivalente a un rendimiento de 14 L de alcohol anhidro por tonelada de residuos.

Cabrera *et al.* (8), reportan la obtención de 2,0 a 2,5 g de etanol en 48 h, cuando la fermentación se realiza a 28°C, a partir de 200 g de frutos de café. Igualmente, reportan mejoras en los rendimientos del proceso en un 20%, en 48 h, cuando realizaron un pretratamiento con una bacteria pectinolítica como *Erwinia herbicola* en asocio con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Rodríguez (29) reporta rendimientos de alcohol equivalentes a 12,31 mL de etanol por 1,0 kg de pulpa fresca: A partir de los jugos provenientes del prensado de la pulpa de café fresca, reporta rendimientos de 47,95 mL.L<sup>-1</sup> de jugo del primer prensado (contenido

de etanol de 98,43%) y de 22,62 mL.L<sup>-1</sup> de jugo del segundo prensado (contenido de etanol de 96,60%), realizado a las 24 horas sobre el residuo del primer prensado.

Rodríguez y Zambrano (35), en estudios de fermentación alcohólica, utilizando varias cepas de levaduras, en promedio registraron rendimientos de 25,17 mL de etanol por 1,0 kg de pulpa fresca.

El propósito de la investigación fue determinar los rendimientos de producción de etanol a partir de la pulpa de café proveniente del proceso de beneficio del fruto de café Variedad Castillo®, evaluando diferentes tipos de hidrólisis y diferentes inóculos comerciales de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, con el fin de determinar su potencial para la producción de bioetanol de segunda generación, de forma que se contribuya a diversificar la matriz energética nacional.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló durante el primer semestre del año 2010, en el laboratorio de Biodigestión, ubicado en el sector de La Granja de Cenicafé, a una altitud de 1.310 m (21).

### Materiales

**Pulpa de café.** El material se obtuvo del beneficio de 150 kg de café cereza Variedad Castillo® Naranja, sin seleccionar, en un equipo Becolsub 300, dotado de un desmucilagador mecánico operado con un caudal de agua de 550 mL.min<sup>-1</sup>.

**Microorganismos.** Se evaluaron cuatro cepas comerciales de *Saccharomyces cerevisiae* (Prensada 1-P1, Prensada 2-P2, Seca 1-S1 y seca 2-S2), una enzima comercial celulolítica-EC y una enzima comercial pectinolítica-EP.

**Tratamientos.** Se evaluaron 25 tratamientos así: Cinco tipos de hidrólisis (natural, ácida, alcalina, enzimática con celulasas, enzimática con celulasas y pectinasas) y cinco tipos de inóculo (natural, levadura prensada 1, levadura prensada 2, levadura seca 1 y levadura seca 2).

**Unidad experimental.** Estuvo conformada por una muestra de pulpa de 0,5 kg. Cada tratamiento estuvo constituido por seis unidades experimentales. Las unidades experimentales se asignaron a los tratamientos de acuerdo con el diseño experimental completamente aleatorio, en arreglo factorial 5 x 5.

### Condiciones de proceso

- Se utilizó pulpa fresca, con menos de 1 h de generada.
- Se utilizó una relación de 1,5 L de agua por 1,0 kg de pulpa fresca.
- La hidrólisis ácida se realizó con ácido sulfúrico concentrado (8,7 mL/0,5 kg de pulpa) y se adicionó  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (11,25 g/0,5 kg de pulpa) (31). Luego, el material se sometió a un proceso de autoclave a 121°C durante 20 min. (39).
- La hidrólisis alcalina se realizó con hidróxido de sodio al 32% (10 mL/0,5 kg de pulpa) y se adicionó  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (11,25 g/0,5 kg de pulpa) (31). Posteriormente, el material se sometió a un proceso de autoclave a 121°C durante 20 min. (39).
- La hidrólisis enzimática se realizó adicionando 0,5 mL de enzimas celulasas/0,5 kg de pulpa, con un pH en el rango entre 4,5 y 5,5 y se sometió durante 60 min. a una temperatura de 60°C, luego se dejó a temperatura ambiente durante 8 h. Cuando se utilizaron pectinasas se adicionaron

0,1 mL de enzimas/0,5 kg de pulpa y se sometió al mismo tratamiento térmico.

- Una vez terminada la etapa de hidrólisis, el pH del mosto obtenido se adecuó a un valor de  $5,0 \pm 0,5$  (18), utilizando ácido sulfúrico o hidróxido de sodio, y se adicionaron las cepas de levadura en una proporción de 2,5% p/v, para las levaduras prensadas (37) y del 1% p/v para la levadura seca (recomendación de la casa fabricante), a una temperatura de incubación de 30°C (18).
- En el proceso de destilación se adicionó aceite vegetal al 0,1% v/v como antiespumante.
- Las unidades experimentales se agitaron manualmente, seis veces al día (37).
- El tiempo de fermentación alcohólica se fijó en 15 h (37).

**Beneficio.** Se utilizaron tandas de 150 kg de café cereza Variedad Castillo Naranjal® sin seleccionar, proveniente de la Estación Central Naranjal. Una vez se recibió el café cereza se inició el proceso de beneficio, el cual incluyó el despulpado sin agua (1).

**Fermentación alcohólica.** Se pesaron muestras de 500 g de pulpa, las cuales se depositaron en bolsas de polipropileno autoclavables y se adicionaron 650 mL de agua de grifo. A la mezcla pulpa-agua se le determinaron las siguientes variables (28): °Brix, Gravedad Específica (GE) y pH; además, se realizó la hidrólisis en aquellos tratamientos que lo requerían y se ajustó al pH cuando se requirió (Figura 1).

La aclimatación de la levadura a la temperatura de fermentación se realizó en 100 mL de agua de grifo. Posteriormente, se adicionó el inóculo a las bolsas con la mezcla pulpa-

agua y se homogeneizó con la ayuda de un agitador manual; luego, se taparon las bolsas y se fermentaron las muestras durante 15 h (Figura 2).

**Destilación simple.** Al final del proceso de fermentación, la pulpa se prensó a un valor de 25 kN (Figura 3), se midió el volumen de prensado y a éste se le realizaron análisis de pH, Gravedad Específica y °Brix (28), posteriormente el prensado se llevó a un

proceso de destilación simple. Así mismo, al destilado se le determinó el grado alcohólico, con un hidrómetro, el cual proporcionó el valor del contenido de alcohol en % v/v, de acuerdo con el método 957.03 de la AOAC (2).

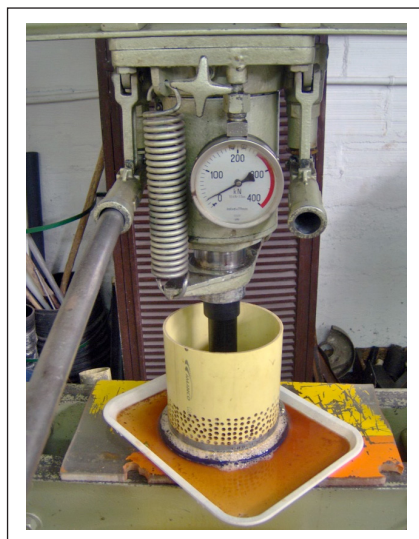
Con el volumen del destilado y los grados alcohólicos se determinó la cantidad de alcohol obtenido en el proceso de fermentación por cada kilogramo de pulpa fresca antes de fermentar.



**Figura 1.** Ajuste de pH luego de la hidrólisis.



**Figura 2.** Incubación de las muestras.



**Figura 3.** Prensado de la pulpa después de la fermentación.

**Rectificación del alcohol.** Las muestras provenientes de la destilación simple se unieron por tratamiento y se llevaron a procesos de rectificación, utilizando inicialmente una columna vigreux de 40 mm de diámetro y 50 cm de longitud, y posteriormente se utilizó una columna empacada con anillos *Rashing*.

**Deshidratación del alcohol.** Los destilados de la rectificación se pasaron por tamices moleculares, con un tamaño de 4A° para obtener el alcohol deshidratado.

**Determinación del contenido de etanol.** Para la determinación del contenido de etanol en las muestras rectificadas y deshidratadas por densidad se utilizó el método del picnómetro (2). Con los valores de densidad y las tablas donde se relaciona la densidad de soluciones de etanol saturado de aire y agua según la temperatura (16), basadas en Spieweck y Bettin (36), se determinó el contenido de etanol en % p/p.

Para la determinación por cromatografía del contenido de etanol se utilizó un cromatógrafo de gases, Hewlett Packard 6890, equipado con detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar AT1701 (30 m longitud, 1,0 µm espesor, 530 µm ID con fase estacionaria de 5% fenil-metil-siloxano).

Para la determinación del contenido de congéneres en las muestras destiladas y deshidratadas de alcohol se utilizó un cromatógrafo de gases con detección de espectrometría de masas, Shimadzu QP2010 plus, y una columna capilar SHRX1-5MS (30 m longitud, 0,25 µm espesor, 0,25 mm ID con fase estacionaria de 5% fenil-metil-siloxano).

**Vinazas.** Para la caracterización de las vinazas obtenidas en el proceso de destilación se realizaron análisis de pH (método potenciométrico, empleando como sensor un electrodo combinado Ref. InLab 413SG); sólidos totales (método gravimétrico) (3) y demanda química de oxígeno (método de reflujo cerrado, método colorimétrico) (23).

**Análisis estadístico.** La variable respuesta fue la producción de alcohol y como variables complementarias se determinaron el pH, la gravedad específica y los grados brix. Para

cada tratamiento se estimó el promedio y la desviación estándar. Se aplicó un análisis de varianza al 5%, con la variable de respuesta, bajo el diseño experimental propuesto y se seleccionó la mejor combinación hidrólisis x fermentación, de acuerdo con una prueba de contraste al 5%.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Condiciones climáticas.** Durante el período en el cual se realizó la experimentación, las condiciones climáticas fueron: 21,5°C de temperatura promedio, 79,7% de humedad relativa, 3.156,4 mm de precipitación y 1.435 horas de brillo solar.<sup>1</sup>

**Beneficio del fruto de café.** El promedio del peso obtenido en 10 tandas de café cereza beneficiado (1.500 kg), para la pulpa proveniente del despulpado sin agua, fue del 43,00% del peso del fruto fresco (CV=2,45%), con un promedio de 2,90 °Brix de la mezcla pulpa-agua (CV=9,34%), 1,01 de gravedad específica en promedio (CV= 0,10%) y un valor promedio de pH de 4,60 (CV =3,61). Montilla (25) reporta un valor de pulpa fresca del 43,58%, con respecto al peso del fruto de café.

**Proceso de destilación.** En la Tabla 1 se presentan los valores promedio de alcohol obtenido en la destilación simple de los prensados de la mezcla pulpa-agua, fermentada, para cada uno de los tratamientos evaluados. Los valores fueron calculados a partir de la determinación del grado alcohólico del destilado.

El análisis de varianza mostró efecto de la interacción hidrólisis-inóculo en los rendimientos de alcohol (variable respuesta), así

<sup>1</sup> JARAMILLO, R., A. Resultados de las variables climáticas durante el 2010 en Cenicafé-Sede La Granja. Septiembre 19 del 2011.



**Tabla 1.** Promedio del alcohol obtenido por cada 500 g de pulpa de café fermentada.

	<b>Tratamiento</b>	<b>Promedio* (mL de alcohol)</b>	<b>D.E.</b>
1	Fermentación natural	1,84 EFGH	0,26408
2	Levadura prensada 1	8,69 ABCD	1,12956
3	Levadura prensada 2	9,66 ABCD	0,54092
4	Levadura seca 1	9,23 ABCD	1,02455
5	Levadura seca 2	9,04 ABCD	1,59848
6	Hidrólisis ácida + Fermentación natural	0,60 H	0,06577
7	Hidrólisis ácida + Levadura prensada 1	1,44 FGH	0,54816
8	Hidrólisis ácida + Levadura prensada 2	2,25 EFGH	1,11614
9	Hidrólisis ácida + Levadura seca 1	2,87 EFGH	0,79046
10	Hidrólisis ácida + Levadura seca 2	5,63 CDEFG	1,58296
11	Hidrólisis alcalina+ Fermentación natural	0,78 GH	0,09887
12	Hidrólisis alcalina + Levadura prensada 1	5,90 BCDEF	0,75096
13	Hidrólisis alcalina + Levadura prensada 2	6,04 BCDEF	0,55897
14	Hidrólisis alcalina + Levadura seca 1	6,76 ABCDE	0,67450
15	Hidrólisis alcalina + Levadura seca 2	5,11 DEFGH	0,82563
16	Hidrólisis enzimática 1+ Fermentación natural	1,50 FGH	0,29541
17	Hidrólisis enzimática 1+ Levadura prensada 1	10,32 ABC	1,05207
18	Hidrólisis enzimática 1+ Levadura prensada 2	11,48 A	0,59078
19	Hidrólisis enzimática 1+ Levadura seca 1	11,62 A	0,89875
20	Hidrólisis enzimática 1+ Levadura seca 2	10,83 AB	0,68888
21	Hidrólisis enzimática 2+ Fermentación natural	1,27 FGH	0,18354
22	Hidrólisis enzimática 2+ Levadura prensada 1	11,59 A	0,49548
23	Hidrólisis enzimática 2+ Levadura prensada 2	9,81 ABCD	1,87421
24	Hidrólisis enzimática 2+ Levadura seca 1	8,99 ABCD	1,59038
25	Hidrólisis enzimática 2+ Levadura seca 2	11,52 A	0,78372

(\*) Valor promedio de seis réplicas. Promedios con la misma letra no presentaron diferencias significativas. D.E: Desviación Estándar.

como en el pH, °Brix (Tabla 2) y la gravedad específica (variables complementarias).

La prueba de constrate al 5% mostró que los tratamientos con mayor rendimiento en la producción de alcohol y entre los cuales no se presentaron diferencias estadísticas, fueron los que involucraron la hidrólisis enzimática con celulasas (Hidrólisis enzimática 1) y levaduras comerciales, con un valor promedio de 22,12 mL.kg<sup>-1</sup> de pulpa fresca, seguido de la hidrólisis enzimática con celulasas-pectinasas (Hidrólisis enzimática 2) y levaduras comerciales, con un promedio

de 20,96 mL.kg<sup>-1</sup> de pulpa fresca, y los tratamientos sin hidrólisis y levaduras comerciales con un valor de 18,30 mL.kg<sup>-1</sup> de pulpa fresca.

Los tratamientos que se sometieron a procesos en autoclave a 121°C, como la hidrólisis ácida y alcalina, alcanzaron valores promedio de 6,09 mL.kg<sup>-1</sup> y 11,91 mL.kg<sup>-1</sup> de pulpa fresca, respectivamente, cuando se inocularon con levaduras comerciales. Estos tratamientos fueron estadísticamente diferentes de aquellos sometidos a hidrólisis enzimática y de los tratamientos sin hidrólisis.

Con respecto al valor de pH, al final del proceso de fermentación sólo los tratamientos con hidrólisis alcalina presentaron valores por encima de 5,0, y fueron estadísticamente diferentes de los demás tratamientos. Los tratamientos enzimáticos con los que se alcanzaron los mayores rendimientos de alcohol mostraron valores de pH entre 4,39 y 4,44.

El pH óptimo para las levaduras se encuentra en un rango entre 4,5 y 5,5 (26).

Estudios reportan que el pH más favorable para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* se encuentra en el rango entre 4,4 y 5,0, con un pH de 4,5 para su crecimiento óptimo, pero no se desarrolla bien en medio alcalino, a menos que se haya adaptado previamente al mismo (20). El pH del medio tiene una gran influencia en los productos finales obtenidos en el proceso de fermentación anaerobia y tiende a disminuir debido a la producción de ácidos.

**Tabla 2.** Valores de las variables complementarias.

Tratamiento	pH		°Brix	
	Promedio*	D.E.	Promedio*	D.E.
1 Fermentación natural	4,12 BC	0,05924	3,78 C	0,12494
2 Levadura prensada 1	4,32 B	0,03180	2,35 D	0,06191
3 Levadura prensada 2	4,30 B	0,06112	2,28 D	0,04773
4 Levadura seca 1	4,29 B	0,06157	2,35 D	0,08851
5 Levadura seca 2	4,37 B	0,02301	2,42 D	0,06540
6 Hidrólisis ácida + Fermentación natural	3,90 C	0,03756	3,70 C	0,16125
7 Hidrólisis ácida + Levadura prensada 1	4,16 BC	0,12489	8,42 A	0,16003
8 Hidrólisis ácida + Levadura prensada 2	4,21 BC	0,14813	7,90 A	0,16330
9 Hidrólisis ácida + Levadura seca 1	4,16 BC	0,09562	7,62 A	0,47499
10 Hidrólisis ácida + Levadura seca 2	4,21 BC	0,13539	7,95 A	0,21564
11 Hidrólisis alcalina+ Fermentación natural	4,17 BC	0,06752	4,28 C	0,27618
12 Hidrólisis alcalina + Levadura prensada 1	5,41 A	0,07178	6,22 B	0,24687
13 Hidrólisis alcalina + Levadura prensada 2	5,27 A	0,07265	6,30 B	0,32660
14 Hidrólisis alcalina + Levadura seca 1	5,29 A	0,04695	6,25 B	0,21409
15 Hidrólisis alcalina + Levadura seca 2	5,32 A	0,05076	5,77 B	0,35746
16 Hidrólisis enzimática 1+ Fermentación natural	4,17 BC	0,06956	3,83 C	0,15635
17 Hidrólisis enzimática 1+ Levadura prensada 1	4,44 B	0,02548	2,50 D	0,07746
18 Hidrólisis enzimática 1+ Levadura prensada 2	4,41 B	0,03870	2,65 D	0,11475
19 Hidrólisis enzimática 1+ Levadura seca 1	4,39 B	0,03180	2,60 D	0,08165
20 Hidrólisis enzimática 1+ Levadura seca 2	4,41 B	0,02704	2,67 D	0,06667
21 Hidrólisis enzimática 2+ Fermentación natural	4,14 BC	0,04549	4,02 C	0,13017
22 Hidrólisis enzimática 2+ Levadura prensada 1	4,40 B	0,03810	2,48 D	0,12494
23 Hidrólisis enzimática 2+ Levadura prensada 2	4,39 B	0,02236	2,52 D	0,12494
24 Hidrólisis enzimática 2+ Levadura seca 1	4,41 B	0,02319	2,40 D	0,17321
25 Hidrólisis enzimática 2+ Levadura seca 2	4,40 B	0,02608	2,52 D	0,07923

(\*) Valor promedio de seis réplicas. Promedios con la misma letra no presentaron diferencias significativas. D.E: Desviación Estándar.



Hubo diferencias estadísticas en la variable °Brix entre los tratamientos sometidos a hidrólisis ácida y alcalina, siendo diferentes entre sí, y de los tratamientos sin hidrólisis y con hidrólisis enzimática, sin diferencias estadísticas entre estos últimos tipos de hidrólisis, a un nivel de significancia del 5% (Tabla 2). Los °Brix miden el contenido de sólidos solubles presentes en el jugo fermentado de pulpa, en el cual se encuentran azúcares, ácidos, sales y demás compuestos solubles en agua. En este estudio se observó que los tratamientos con mayores contenidos de °Brix en el jugo fermentado fueron los que mostraron menores rendimientos de alcohol y menores valores de pH, siendo los ácidos generados durante el proceso fermentativo los que incrementaron los contenidos de sólidos solubles en el fermentado.

Los menores valores de alcohol obtenidos en los tratamientos sometidos a temperaturas de 121°C se debieron a la caramelización, que a esta temperatura se presenta para algunos azúcares.

Zuluaga (40) reporta un valor de azúcares libres en pulpa de café del 22,65% en peso seco, de los cuales la D-Fructosa en sus 2 anómeros ( $\alpha$  y  $\beta$ ) representa el 43,8% del total de azúcares libres, seguida de la D-Glucosa en sus 2 anómeros ( $\alpha$ : 15,1% y  $\beta$ : 15,1%), la sacarosa (14,1%), la D-Galactosa (10,1%) y el inotisol (1,2%).

La temperatura de caramelización para la D-Fructosa es de 110°C, para la D-Glucosa, D-Galactosa y sacarosa de 160°C. La caramelización o pirólisis de los azúcares se presenta cuando éstos se calientan por encima de su punto de fusión, dando lugar a la aparición de reacciones de enolización, deshidratación y fragmentación, que provocan la formación de derivados furánicos (22).

Los rendimientos de alcohol de los tratamientos con hidrólisis alcalina y ácida e inoculación con levaduras comerciales representaron el 65,08% y el 33,28% de los valores alcanzados en los tratamientos sin hidrólisis inoculados con levaduras comerciales, lo cual se explica porque la fructosa representa cerca del 50% de los azúcares reductores presentes en la pulpa de café y sufre reacciones de caramelización por encima de los 110°C, que generan productos diferentes a los alcoholes.

En promedio, los rendimientos de alcohol para los tratamientos con hidrólisis enzimática y adición de levaduras comerciales fueron de 21,54 mL.kg<sup>-1</sup> de pulpa fresca, superiores en un 17,64% a los valores encontrados para los tratamientos sin hidrólisis y adición de levaduras comerciales.

En todos los tipos de hidrólisis evaluados no hubo diferencias estadísticas en los rendimientos de alcohol obtenidos con las diferentes levaduras comerciales, pero los rendimientos de alcohol sí fueron diferentes estadísticamente de los tratamientos que sólo contenían los microorganismos naturales de la pulpa de café, excepto para los tratamientos sometidos a hidrólisis ácida y alcalina.

Para los tratamientos con fermentación natural no se presentaron diferencias estadísticas en los rendimientos de alcohol entre los diferentes tipos de hidrólisis. Lo anterior se explica por la cantidad y diversidad de levaduras nativas presentes en la pulpa de café, del orden de  $3 \times 10^8$  UFC/g (5), que representaron una tasa de inoculación cercana a 2,5 mg de levaduras naturales por gramo de pulpa fresca, entre las que se encuentran levaduras como *Saccharomyces* sp., *Torulopsis* sp., *Rhodotorula* sp. y *Candida* sp., con una tasa de inoculación equivalente a la décima parte de la utilizada con levaduras

comerciales prensadas (25 mg de levadura *S. cerevisiae*/g de pulpa fresca).

Rodríguez (29) evaluó la producción de etanol a partir de la fermentación alcohólica de los jugos provenientes del prensado de la pulpa de café fresca y de la fermentación de la mezcla pulpa fresca-agua en relación 1:1, sin hidrólisis, utilizando tres levaduras comerciales, con promedios de los rendimientos de alcohol, medido por hidrometría, de 47,95 mL.L<sup>-1</sup> de jugo del primer prensado (contenido de etanol de 98,43%) y de 22,62 mL.L<sup>-1</sup> de jugo del segundo prensado (contenido de etanol de 96,60%), equivalentes a un rendimiento de etanol de 12,31 mL.kg<sup>-1</sup> de pulpa fresca. Así mismo, reporta rendimientos de alcohol de 25,73 mL.kg<sup>-1</sup> de pulpa fresca, con fermentación de la mezcla pulpa fresca-agua en relación 1:1 y levaduras comerciales. Con respecto a los menores rendimientos de alcohol registrados en este estudio, 18,30 mL.kg<sup>-1</sup> de pulpa fresca, para los tratamientos sin hidrólisis, equivalentes al 71% de los encontrados por Rodríguez (29), pudieron estar influenciados por la época de cosecha, debido a que en el 2007 la pulpa utilizada para la experimentación provenía del café de la cosecha principal (segundo semestre del año) y para este estudio se trabajó con pulpa proveniente de café de la cosecha de mitaca (primer semestre del año).

Las muestras de alcohol obtenido por tratamiento, después de la deshidratación, se caracterizaron por la técnica de cromatografía de gases para identificar los compuestos presentes en las mismas (Tabla 3).

De acuerdo con los contenidos de etanol determinados por cromatografía (Tabla 3), éstos variaron entre 83,91% correspondiente al tratamiento hidrólisis ácida y fermentación con levadura prensada

1 y 99,97% correspondiente al tratamiento hidrólisis enzimática con celulasas y fermentación con levadura seca 2.

Los mayores promedios de los contenidos de etanol se alcanzaron para los tratamientos con hidrólisis enzimática con celulasas (97,78%), seguido de los tratamientos sin hidrólisis (96,92%), los tratamientos con hidrólisis enzimática utilizando celulasas y pectinasas (95,76%), los tratamientos con hidrólisis alcalina (95,59%) y aquellos tratamientos con hidrólisis ácida (93,97%).

Los análisis cromatográficos mostraron como principales compuestos asociados al etanol, en orden de importancia, dietilacetil del acetaldehído (dietoxietano), propanol, isobutanol, butanol, pentanol, alcohol amílico, alcohol isoamílico, ftalato de dietilo y etilacetato, que en algunos casos alcanzaron valores mayores al 1%.

El propanol, isobutanol, butanol, pentanol, alcohol amílico y alcohol isoamílico, forman parte del denominado aceite de fusel o también llamado alcohol de fusel, por estar formado por alcoholes con más de dos átomos de carbono, su formación durante la fermentación de los azúcares depende del tipo de microorganismo utilizado en la fermentación, la cantidad de nitrógeno presente en el sustrato a fermentar, el pH, la temperatura y el grado de agitación durante la etapa de fermentación. Valores de temperatura por encima del considerado óptimo para el microorganismo utilizado en la fermentación y valores de pH por debajo del óptimo, favorecen la producción de estos congéneres.

El butanol se produce por la fermentación de azúcares por acción de microorganismos como *Clostridium acetobutylicum* y *Escherichia coli*, esta última se ha encontrado de forma

**Tabla 3.** Análisis cromatográfico del alcohol obtenido a partir de pulpa de café.

Compuesto	Pulpa sin hidrólisis				Pulpa con hidrólisis ácida			
	Tipo de levadura				Tipo de levadura			
	Sc (P1)	Sc (P2)	Sc (S1)	Sc (S2)	Sc (P1)	Sc (P2)	Sc (S1)	Sc (S2)
	mg.L <sup>-1</sup> alcohol anhidro				mg.L <sup>-1</sup> alcohol anhidro			
Etanol	96,3000	96,4800	96,6100	98,3100	83,9100	97,9800	96,4200	97,5700
Propanol	0,5802	0,5615	0,3849	0,2636	0,6807	0,2589	0,4247	0,1988
Isobutanol	1,1264	1,1116	0,5737	0,4728	1,2078	0,3720	0,7838	0,4195
Butanol	0,6556	0,7197	-	0,3533	3,0028	-	-	-
Pentanol	0,3489	0,3522	0,3776	0,1252	2,1153	0,1021	-	0,3152
Alcohol amílico	0,1593	0,1504	0,1020	0,0562	0,4280	-	0,1310	0,1418
Ftalato de dietilo	0,2773	0,0938	0,0600	0,0393	-	0,0295	0,2908	0,1160
Dietilacetel	0,3845	0,3488	1,0529	0,3179	2,0356	0,2761	0,4620	0,2711
EtilAcetato	0,0731	0,0621	0,0147	-	-	0,1319	0,0673	0,1438
2-Metil-3-Buten-2-ol	-	-	0,0498	0,0201	-	-	-	-
Hexanal	-	-	-	-	1,1744	-	-	-
3-Furaldehído	-	-	-	-	1,0006	-	-	-
Dimetilacetel	-	-	-	-	-	0,0405	-	-
Dietoxihexano	-	-	-	-	-	0,0386	0,0180	0,0098
Alcohol isoamílico	-	-	-	-	-	-	0,3200	-
Otros congéneres	0,0947	0,1199	0,7744	0,0416	4,4448	0,7704	1,0824	0,8140

Compuesto	Pulpa con hidrólisis alcalina				Pulpa con hidrólisis enzimática (celulasas)			
	Tipo de levadura				Tipo de levadura			
	Sc (P1)	Sc (P2)	Sc (S1)	Sc (S2)	Sc (P1)	Sc (P2)	Sc (S1)	Sc (S2)
	mg.L <sup>-1</sup> alcohol anhidro				mg.L <sup>-1</sup> alcohol anhidro			
Etanol	97,6400	93,9900	95,2300	95,4900	96,4500	96,8500	97,8300	99,9690
Propanol	0,1091	0,2398	0,3229	0,3571	0,3020	0,5772	0,3302	0,0043
Isobutanol	0,2128	0,6772	0,8715	0,8527	0,4031	0,9007	0,4176	0,0042
Butanol	-	-	1,0293	0,1099	0,4501	0,3024	0,3834	0,0041
Pentanol	-	0,9080	0,9178	0,4499	0,1683	0,6347	0,2129	0,0004
Alcohol amílico	0,0341	0,2000	0,2439	0,2818	0,0493	0,2241	0,0678	0,0002
Nitroetanol	0,0683	0,0990	0,1241	-	-	-	-	-
Ftalato de dietilo	0,0331	0,0545	0,1146	0,0260	0,0907	0,0993	0,0588	0,0016
Dietilacetel	0,4350	2,1076	0,8350	0,4744	1,9459	0,3394	0,6168	0,0150
EtilAcetato	0,0274	0,0413	-	0,0576	0,0963	0,0391	0,0632	0,0011
Alcohol isoamílico	0,1491	-	-	-	-	-	-	-
Otros congéneres	1,2911	1,6826	0,3109	1,9006	0,0443	0,0331	0,0193	0,0001

Continúa...

...continuación

Compuesto	Pulpa con hidrólisis enzimática (celulasas+pectinasas)			
	Tipo de levadura			
	Sc (P1)	Sc (P2)	Sc (S1)	Sc (S2)
	<b>mg.L<sup>-1</sup> alcohol anhidro</b>			
Etanol	93,5500	98,7300	92,8400	97,9300
Propanol	0,1689	0,2832	0,9930	0,3960
Isobutanol	0,3208	0,2572	1,2259	0,4817
Butanol	0,0142	0,3297	0,9229	0,4103
Pentanol	0,4339	0,0459	0,2653	0,0749
Alcohol amílico	0,1247	0,0188	0,0885	0,0367
Ftalato de dietilo	0,0226	0,0530	0,2877	0,1633
Dietilacetil	0,0987	0,2404	3,1637	0,4339
EtilAcetato	0,0027	0,0314	0,1164	0,0527
Otros congéneres	5,2635	0,0104	0,0966	0,0205

Nomenclatura. Sc: *Saccharomyces cerevisiae*. P: Levadura comercial prensada. S: Levadura comercial seca.

natural en la pulpa de café (6). El etilacetato se forma por la acción de levaduras diferentes a *Saccharomyces cerevisiae*, que forman parte de los microorganismos presentes naturalmente en la pulpa (*Candida* sp., *Rhodotorula* sp., *Torulopsis* sp.) (6), cuya acción se inhibe cuando la concentración de etanol en el fermentado es mayor al 5% (19).

Los derivados furánicos son compuestos que presentan gran interés en la agricultura, debido a que poseen un conjunto de propiedades bioactivas que posibilitan su uso como fungicidas y bactericidas. Los análisis cromatográficos de los destilados obtenidos permitieron detectar en valores menores al 0,1%: 2,3-Dihidrofurano en el tratamiento 3 (sin hidrólisis); 2-Furancarboxaldehído en el tratamiento 14 (hidrólisis alcalina) y 3-Furaldehído en los tratamientos 14 (hidrólisis alcalina), 16 y 17 (hidrólisis enzimática con celulasas) y con un valor del 1% en el tratamiento 7 (hidrólisis ácida).

La oxidación de alcoholes es uno de los métodos más importantes para la obtención

de carbonilos (cetonas y aldehídos). Los hemiacetales se forman por la reacción de un equivalente de alcohol con el grupo carbonilo de un aldehído o cetona, esta reacción se cataliza con ácido y es equivalente a la formación de hidratos. Los hemiacetales reaccionan con un segundo equivalente de alcohol para formar acetales, los cuales pueden emplearse, por su estabilidad, como grupos protectores del carbonilo.

El ftalato de dietilo es un líquido incoloro e inodoro producido por reacción del anhídrido ftálico con un alcohol apropiado (normalmente alcoholes de entre 6 y 13 carbonos). El anhídrido ftálico se obtiene por la reacción del ácido ftálico con el anhídrido acético, que se forma por la pirolisis del ácido acético, uno de los productos más comunes de los procesos fermentativos.

**Valor experimental de producción de alcohol a partir de la pulpa.** Se encontró un valor experimental promedio de 18,30 mL.kg<sup>-1</sup> de pulpa fresca, para los tratamientos sin hidrólisis. Si los contenidos de etanol

en la solución alcohólica se mantuvieran en los rangos encontrados por cromatografía, se obtendría un rendimiento de etanol de 17,74 mL.kg<sup>-1</sup> de pulpa fresca. Rodríguez (29), para tratamientos sin hidrólisis, reporta un rendimiento de 25,15 mL.kg<sup>-1</sup> de pulpa fresca.

**Valor teórico de producción de alcohol a partir de la pulpa de café.** Rodríguez (31) reporta un contenido medio de azúcares fermentables, en peso seco, para la pulpa de café fresca del 17,31% (n= 16; CV = 18,11%), así como valores de azúcares totales del 18,49% (n= 16; CV = 16,69%) y un valor de humedad de la pulpa del 77,42% (n= 16; CV = 3,04%).

Al tener en cuenta las relaciones estequiométricas de la fermentación alcohólica de los carbohidratos (1 mol de hexosa genera 2 moles de etanol), a partir de 1 kg de pulpa fresca se podrían obtener 25,2 mL de etanol, si todos los azúcares fermentables se transforman en etanol.

En la Tabla 4 se registran los rendimientos que podrían esperarse si los subproductos generados en el beneficio, por 1 millón de sacos de café verde tipo exportación, se utilizan para la producción de etanol.

Para los cálculos se utilizaron los factores de conversión generados por Montilla (25), para café sin seleccionar, a saber: 6,23 kg de café cereza/kg café verde, 0,4358 kg de pulpa fresca/kg de café cereza y 0,1485 kg de mucílago fresco/kg de café cereza.

Considerando los rendimientos de etanol obtenidos a partir de la pulpa de café en la presente investigación y los reportados por Rodríguez (29), puede concluirse que es posible obtener entre 1.619.388 y 1.938.301 Gal de etanol de la pulpa y el mucílago generados de la producción de 1 millón de sacos de café verde.

Lo anterior es equivalente a obtener entre 1,64 y 1,96 L de etanol a partir de la pulpa y el mucílago provenientes del beneficio de 100 kg de café cereza.

Cabrera *et al.* (8) reportan que “*se pueden obtener entre 2,0 a 2,5 g de etanol en 48 h, cuando la fermentación se realiza a 28°C, a partir de 200 g de cerezas frescas*”, lo que equivaldría a tener entre 1,26 y 1,58 L de etanol/100 kg de café cereza.

Así mismo, Calle (9) reporta que de los subproductos generados en el beneficio de 100 kg de café cereza pueden obtenerse 1,2 L de alcohol etílico de 85°, en promedio, equivalentes a 1,02 L de etanol/100 kg de cereza. De igual manera, Calle (15), después de 210 destilaciones realizadas en 200 kg de café, reportó un rendimiento industrial de 1 L de alcohol de 90° por 12,5 kg de cps, lo cual equivaldría a tener 1,5 L de etanol/100 kg de café cereza.

**Vinazas del proceso de destilación del alcohol de pulpa.** En la Tabla 5 se presentan los resultados relacionados con la caracterización de las vinazas (volumen, pH, Demanda Química de Oxígeno y Sólidos Totales)

**Tabla 4.** Etanol de los subproductos generados en el beneficio por 1 millón de sacos de café verde.

Subproducto	Toneladas generadas	Litros de etanol/tonelada	Galones americanos etanol
Pulpa fresca	162.900	17,74	763.500
Mucílago fresco	55.500	58,37 (29)	855.888
Galones de etanol/millón de sacos de café verde			1.619.388

**Tabla 5.** Caracterización de las vinazas obtenidas del proceso de destilación del fermentado pulpa - agua en los tratamientos sin hidrólisis y con levaduras comerciales.

Parámetro	Relación Vinaza/vino	pH	ST	DQO (ppm)	DQO/ST
Promedio	0,70	4,57	25925	42826	1,65
D.E.	0,06	0,71	3410	8741	0,22
C.V. (%)	9,27	15,58	13,15	20,41	13,59
Datos	24	24	24	24	24

obtenidas del proceso de destilación simple de las diferentes muestras fermentadas de pulpa-agua, para los tratamientos sin hidrólisis.

Las vinazas provenientes de la destilación simple del fermentado pulpa - agua (relación 1:1,5) representaron el 70% del volumen inicial de la muestra fermentada, con un pH promedio de 4,57, un valor promedio de sólidos totales de 25.925 ppm y un valor promedio de DQO de 42.826 ppm.

Rodríguez (29), reporta que las vinazas provenientes de la destilación simple del fermentado pulpa - agua relación (1:1) representaron el 50% del volumen inicial de la muestra fermentada, con un pH promedio de 4,41, un valor promedio de sólidos totales de 69.886 ppm y un valor promedio de DQO de 129.615 ppm.

La presente investigación permite concluir que con la hidrólisis enzimática de la pulpa de café, previa a la fermentación alcohólica, se alcanzan los mayores rendimientos en la producción de bioetanol. En el análisis de varianza se encontró que la variable “tipo de hidrólisis” tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la variable dependiente “rendimiento de alcohol”, empleando celulasas y pectinasas, respecto a las demás hidrólisis. Para el tipo de levaduras empleadas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los rendimientos de alcohol.

De igual manera, puede concluirse que puede obtenerse 1 L de etanol a partir de

56 kg de pulpa fresca, generándose 62 L de vinazas, las cuales deben tratarse por digestión anaerobia, con el fin de disminuir el impacto ambiental que éstas ocasionarían sobre los recursos naturales, generándose en el proceso otro biocombustible aprovechable como es el biogás.

## AGRADECIMIENTOS

El autor expresa su agradecimiento a la doctora Esther Cecilia Montoya de la Disciplina de Biometría de Cenicafé, por la asesoría estadística, a la practicante de Ingeniería Agroindustrial Paula Andrea Jaramillo Jiménez por su apoyo en la ejecución de la investigación, al técnico Uriel López y al auxiliar Samuel Castañeda, de la Disciplina de Calidad y Manejo Ambiental por el apoyo logístico. Así mismo, agradece a la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia por el apoyo económico para la realización de la investigación QIN0806 “Producción de alcohol carburante a partir de subproductos del café”.

## LITERATURA CITADA

1. ÁLVAREZ G., J. Desulpado de café sin agua. Chinchiná : Cenicafé, 1991. 6 p. (Avances Técnicos No. 164).
2. AOAC INTERNATIONAL. Official methods of analysis. 16a. ed. Gaithersburg : AOAC, 1997. 2 vols.
3. APHA; AWWA; WPCF. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Madrid : Ediciones Díaz de Santos, 1992. 1914 p.



4. ARCILA O., F. Producción de biogás a base de pulpa de café. Chinchiná : Cenicafé, 1979. 17 p.
5. BLANDÓN C., G.; DÁVILA A., M.T.; RODRÍGUEZ V., N. Caracterización microbiológica y fisico-química de la pulpa de café sola y con mucilago, en proceso de lombricompostaje. *Cenicafé* 50(1):5-23. 1999.
6. BLANDÓN, G.; RODRÍGUEZ, N.; DÁVILA, M.T. Caracterización microbiológica y fisico-química de los subproductos del beneficio del café en proceso de compostaje. *Cenicafé* 49(3):169-185. 1998.
7. BUITRAGO A., J.; CALLE V., H.; GALLO C., J.T.; CORSO M., M.A. Evaluación de la melaza de café en dietas para cerdos en crecimiento y acabado. *ICA* 5(4):407-410. 1970.
8. CABRERA, S. DE; CALZADA, J.F.; GIL, L.A.; ARRIOLA, M.C. DE. Etanol de cerezas y mucilago de café. p. 129-137. En: SIMPOSIO Internacional sobre la utilización integral de los subproductos del café. (3 : Febrero 16-18 1987 : Guatemala). Guatemala : ICAITI : ANECAFE : PNUMA, 1987.
9. CALLE V., H. Subproductos del café. Chinchiná : Cenicafé, 1977. 84 p. (Boletín Técnico No. 6).
10. CALLE V., H. Cómo producir gas combustible con pulpa de café. Chinchiná : Cenicafé, 1974. 11 p. (Boletín Técnico No. 3).
11. CALLE V., H. Baterías eléctricas con pulpa y mucilago de café. Chinchiná : Cenicafé, 1973. 4 p. (Avances Técnicos No. 25).
12. CALLE V., H. Métodos de extracción de las pectinas del café. *Cenicafé* 13(2):69-74. 1962.
13. CALLE V., H. Perspectivas para el empleo de la pulpa y ripios del café como materiales curtientes. *Cenicafé* 6(62):69-71. 1955.
14. CALLE V., H. Producción de alcohol con los desperdicios del café. *Cenicafé* 2(22):33-34. 1951.
15. CALLE V., H. Ensayo sobre cultivo de levaduras alimenticias en pulpa de café. *Cenicafé* 2(14):33-36. 1951.
16. CESMEC. Tablas de densidad de soluciones etanol-agua. [en línea]. Santiago de Chile : CESMEC, {s.f.}. Disponible en internet: [http://www.cesmec.cl/medios/Metrologia/concentracion\\_densidad\\_etanol.xls](http://www.cesmec.cl/medios/Metrologia/concentracion_densidad_etanol.xls). Consultado en Octubre de 2007.
17. DÁVILA, M.T.; RAMÍREZ, C.A. Lombricultura en pulpa de café. Chinchiná : Cenicafé, 1996. 11 p. (Avances Técnicos No. 225).
18. EL R., A.H.; EL A., M.S.; EL D., A.I.; SALLAM, L.A.; ALLAM, R. Some physiological parameters for ethanol production from beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae* Y-7. *Bioresource technology* 42(3):183-189. 1992.
19. ESTELA E., W.; RYCHTERA, M.; MELZUCH, K.; HATTA S., B.; LUDEÑA C., Z.; SARMIENTO C., V.; CHAQUILLA Q., G. Actividad fermentativa de *Saccharomyces ludwigii* y evaluación de la síntesis de compuestos de importancia sensorial durante la fermentación de jugo de manzana. *TIP* 14(1):12-23. 2011.
20. FAJARDO C., E.; SARMIENTO F., S. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Bogotá : Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias básicas, 2007. 120 p. Tesis: Microbiólogo industrial.
21. FNC; CENICAFÉ. Anuario meteorológico cafetero 2007. Chinchiná : Cenicafé, 2009. 568 p.
22. GIL H., A. Tratado de nutrición: Composición y calidad nutritiva de los alimentos. 2a. Ed. Madrid : Editorial médica Panamericana, 2010. 786 p.
23. HACH COMPANY. DR/2000 Spectrophotometer: Procedures manual. Loveland : HACH, 1988. 394 p.
24. LÓPEZ A., M.; CALLE V., H. Valor comparativo de la pulpa de café descompuesta como abono. *Cenicafé* 7(81):285-297. 1956.
25. MONTILLA P., J. Caracterización de algunas propiedades físicas y factores de conversión del café. Manizales : Universidad de Caldas. Facultad de ciencias agropecuarias, 2006. 107 p. Tesis: Ingeniería agrónoma.
26. OSPINA M., A.; PALACIOS G., M. Efecto del cultivo de levaduras sobre la carga orgánica de los efluentes de Sucromiles S.A. Cali : Universidad del Valle, 1994. 172 p.
27. PORRES, C.; CALZADA, J.F.; ROLZ, C. Combustión de la pulpa de café. p. 16-19. En: SIMPOSIO Internacional sobre la utilización integral de los subproductos del café. (3 : Febrero 16-18 1987 : Guatemala). Guatemala : ICAITI : ANECAFE : PNUMA, 1987.

28. RÍOS A., S. Manual de análisis químico del mucílago del café: Disciplina de química industrial. Chinchiná : Cenicafé, 1995. 56 p.
29. RODRÍGUEZ V., N. Balance energético en la producción de etanol a partir de la pulpa y el mucílago de café y poder calorífico de los subproductos del proceso del cultivo de café. Chinchiná : Cenicafé, 2007. 7 p.
30. RODRÍGUEZ V., N. Ensilaje de pulpa de café. Chinchiná : Cenicafé, 2003. 8 p. (Avances Técnicos No. 313).
31. RODRÍGUEZ V., N. Avances del experimento QIN-08-02: Obtención de pectinas a partir de la pulpa y el mucílago del café. En: Informe anual de actividades 1998-1999. Chinchiná : Cenicafé, 1999. 90 p.
32. RODRÍGUEZ V., N.; JARAMILLO L., C. Cultivo de hongos medicinales sobre residuos agrícolas de la zona cafetera. Chinchiná : Cenicafé, 2005a. 72 p. (Boletín Técnico No. 28).
33. RODRÍGUEZ V., N.; JARAMILLO L., C. Cultivo de hongos comestibles del género *Pleurotus* en residuos agrícolas de la zona cafetera. Chinchiná : Cenicafé, 2005b. 56 p. (Boletín Técnico No. 27).
34. RODRÍGUEZ V., N.; ZULUAGA V., J. Cultivo de *Pleurotus pulmonarius* en pulpa de café. Cenicafé 45(3):81-92. 1994.
35. RODRÍGUEZ V., N.; ZAMBRANO F., D.A. Los subproductos del café: Fuente de energía renovable. Chinchiná : Cenicafé, 2010. 8 p. (Avances Técnicos No. 393).
36. SPIEWECK, F.; BETTIN, H. Review: Solid and liquid density determination. *Technisches messen* 59:285-292. 1992.
37. VALDÉS D., B.E. Productos de la fermentación de plátano maduro; etanol y una bebida alcohólica: informe final del experimento. Chinchiná : Cenicafé, 2001. 95 p.
38. VALENCIA A., G.; CALLE V., H. La miel de café y su composición. *Cenicafé* 19(4):135-139. 1968.
39. YU, Z.; ZHANG, H. Ethanol fermentation of acid-hydrolyzed cellulosic pyrolysate with *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource technology* 93(2):199-204. 2004.
40. ZULUAGAV., J. Utilización integral de los subproductos del café. p. 63-76. En: ROUSSOS, S.; LICONA, R.; GUTIÉRREZ. M. Seminario internacional sobre biotecnología en la agroindustria cafetalera. Veracruz [México] : {s.l.}, 1989.

