



PRODUCCIÓN DE BIO-
ALCOHOLES, A PARTIR DE
MUCILAGO OBTENIDO CON
TRES TECNOLOGÍAS
UTILIZADAS EN EL BENEFICIO
ECOLÓGICO DEL CAFÉ

Tesis de grado para optar por el
título de Magister en Desarrollo
Sostenible y Medio Ambiente
Juan Carlos López Núñez
Microbiólogo



**PRODUCCIÓN DE BIO-ALCOHOLES, A PARTIR DE MUCÍLAGO OBTENIDO
CON TRES TECNOLOGÍAS UTILIZADAS EN EL BENEFICIO ECOLÓGICO DEL
CAFÉ**

JUAN CARLOS LÓPEZ NÚÑEZ

Microbiólogo

Tesis de Grado para optar por el título de Magister en Desarrollo Sostenible y Medio
Ambiente

Director

Nelson Rodríguez Valencia. PhD.

Investigador Científico III. Disciplina Poscosecha. Cenicafé.

UNIVERSIDAD DE MANIZALES
MAESTRÍA EN DESARROLLO SOSTENIBLE Y MEDIO AMBIENTE
Manizales, Caldas
2017

DEDICATORIA

A mi padre Luciano, que en las manos del Señor siempre estuvo apoyándome.

A mi madre Myriam que con su amor siempre me inspira.

A Luz Ángela mi esposa y gran amor, quien mantiene mi inspiración.

A mis hermanas, Andrea y Ángela y los tíos Doris y Eduardo quienes siguen creyendo.

To my dear friends Margie and Steve who's support and friendship inspired me to continue believing. Margie "my house is your home" and Steve "never say no".

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos a las siguientes personas y/o entidades:

- A Nelson Rodríguez Valencia. PhD. Investigador Científico III. Disciplina de Poscosecha. Cenicafé, por su constante apoyo e insistencia.
- A Aristófeles Ortíz. MSc, Investigador Científico I. Disciplina de Calidad, Cenicafé, por su aporte incondicional con su conocimiento y amistad.
- A los señores Uriel López y Gabriel Ortíz de Mantenimiento, Cenicafé, porque con su trabajo fueron partícipes de estos resultados.
- A Carlos Eugenio Oliveros T. PhD. Investigador Principal y Javier Velásquez de la Disciplina de Poscosecha, y John Félix Trejos de Experimentación, Cenicafé, por su apoyo constante.
- A las directivas de la Universidad de Manizales, especialmente a los Doctores, Irma Soto Vallejo directora de la Maestría en Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente y John Fredy Betancur Pérez, coordinador de la Línea de Investigación de Biosistemas Integrados, por posibilitar una visión diferente sobre eventos aparentemente comunes.
- A las directivas Administrativas y Científicas del CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DEL CAFÉ – CENICAFE “Pedro Uribe Mejía”, por la oportunidad, recursos y tiempo facilitados.
- A todo el equipo de la Disciplina de Poscosecha de Cenicafé y a aquellos que de una u otra manera me soportaron.

Sin su apoyo y colaboración, no se hubiesen obtenido los resultados de este trabajo.

Gracias.

TABLA DE CONTENIDO

	Pag
Presentación	2
Dedicatoria	3
Agradecimientos	4
Tabla de Contenido	5
Índice de Tablas	7
Índice de Figuras	8
Índice de Gráficas	9
Índice de Anexos	10
Glosario	11
Abreviaturas	19
1 RESUMEN	20
2 SUMMARY	21
3 INTRODUCCIÓN	22
4 OBJETIVOS	23
5 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	24
6 HIPÓTESIS	24
7 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	24
8 JUSTIFICACIÓN	25
9 MARCO TEÓRICO	27
9.1 GENERALIDADES	27
9.2 EL FRUTO DEL CAFÉ	30
9.3 EL MUCÍLAGO	33
9.4 PROCESO DE BENEFICIO	37
9.5 BIOMASA DEL CAFÉ	39
9.6 SUB-PRODUCTOS DEL CAFÉ	42
9.7 BIO-ALCOHOLES	49
9.8 BIOALCHOLES COMO ENERGÍA - BIOCOMBUSTIBLES	57
9.9 IMPACTO AMBIENTAL	62
9.10 NORMATIVIDAD	65
10 MATERIALES Y MÉTODOS	69
10.1 Materiales Generales	69
10.2 Métodos Generales	70
10.3 Mucílago de Café	72
10.4 PRIMERA ETAPA (Materiales y Métodos)	75
10.5 SEGUNDA ETAPA (Materiales y Métodos)	78
10.6 TERCERA ETAPA (Materiales y Métodos)	84
11 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	87
11.1 PRIMERA ETAPA (Resultados)	87
11.2 SEGUNDA ETAPA (Resultados)	94
11.3 TERCERA ETAPA (Resultados)	102
12 CONCLUSIONES	108

13	RECOMENDACIONES	110
14	BIBLIOGRAFÍA	111
15	ANEXOS	118

INDICE DE TABLAS

Descripción	Pag
Tabla 1. Composición química (%) del mucílago del fruto del café.	34
Tabla 2. Ventajas y desventajas y producción en 2013 de diferentes biocombustibles	59
Tabla 3. Caracterización por grado de madurez del fruto de café cereza, utilizado en los diferentes experimentos.	74
Tabla 4. Características de los equipos para la obtención del mucílago utilizado en los diferentes experimentos	74
Tabla 5. Relación y descripción de los sustratos obtenidos a partir de tres sistemas implementados en el Beneficio Ecológico y evaluados durante la experimentación.	75
Tabla 6. Relación de tratamientos utilizando diferentes mucílagos en la evaluación del efecto de la esterilización sobre la disponibilidad de azúcares en el sustrato.	80
Tabla 7. Relación de tratamientos utilizando los sustratos S2 y S3 en la evaluación del efecto de la esterilización sobre la disponibilidad de azúcares en el sustrato.	81
Tabla 8. Relación de tratamientos utilizando diferentes mucílagos en la producción de alcoholes.	85
Tabla 9. Parámetros del ajuste lineal para la relación entre absorbancia y horas de fermentación	87
Tabla 10. Parámetros del ajuste lineal para la relación entre UFC y horas de fermentación	
Tabla 11. Composición porcentual de azúcares disponibles en medio YPDC	88
Tabla 12. Concentración de azúcares totales, durante el desarrollo de <i>S. cerevisiae</i> a diferentes temperaturas en medio sintético.	89
Tabla 13. Parámetros del ajuste exponencial para las diferentes temperaturas evaluadas, en el consumo de azúcares total a 36 h de evaluación	90
Tabla 14. Producción de alcoholes por <i>S. cerevisiae</i> en medio YPDC, después de 36 h de crecimiento en medio sintético YPDC.	91
Tabla 15. Porcentaje en solución alcohólica de cada alcohol encontrado en medio sintético YPDC después de 36 h de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i>	91
Tabla 16. Parámetros del ajuste al modelo logístico para la producción de alcohol totales en medio sintético de cultivo YPDC a diferentes temperaturas	92
Tabla 17. Comparaciones entre la composición de azúcares para cada sustrato y efecto de la esterilización	95
Tabla 18. Evaluación del efecto de la esterilización en el pH, temperatura y °Brix de los mucílagos evaluados,	96
Tabla 19. Análisis fisicoquímico mucílago fermentado proveniente del Ecomill® y del Becolsub®, con y sin esterilización.	98
Tabla 20. Efecto de la esterilización en la concentración de azúcares dado en °Brix.	98
Tabla 21. Efecto de la esterilización en el pH del sustrato,	99

Tabla 22. Resultados del análisis por HPLC de la concentración de azúcares disponibles de los sustratos S1 y S5, y efecto de la esterilización, antes de la fermentación alcohólica.	100
Tabla 23. Resultados del análisis por HPLC de la concentración de azúcares disponibles de los sustratos S1 y S5, después de 36 horas de fermentación.	100
Tabla 24. Resultados del análisis por Cromatografía de Gases de la producción de alcoholes a partir de los sustratos S1 y S5, y efecto de la esterilización del sustrato, antes de la fermentación alcohólica.	101
Tabla 25. Resultados del análisis por Cromatografía de Gases de la producción de alcoholes a partir de los sustratos S1 y S5, y efecto de la esterilización, después de 36 h de fermentación.	102
Tabla 26. Modelos evaluados para determinar el mejor ajuste del comportamiento en el consumo de azúcares totales, para cada uno de los tratamientos evaluados.	102
Tabla 27. Comparación de las tasas de consumo de azúcares totales, para cada uno de los tratamientos evaluados.	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Descripción	Pag
Figura 1. Composición del fruto del café (Fuente: el autor)	31
Figura 2. Fenología del desarrollo del fruto de café (Modificada de Arcila y Jaramillo, 2003)	32
Figura 3. Tanque Tina abierto con grano despulpado (Fuente: Cenicafé. Disciplina de Poscosecha. Copyrigh 2016).	36
Figura 4. Desmucilaginador mecánico. (Fuente: Cenicafé. Disciplina de Poscosecha. Copyrigh 2016)	37
Figura 5. Mapas de biomasa residual agrícola del café. Zonas de producción del cultivo del café y localización anual de los residuos. (Fuente: UPME Atlas potencial energético de Colombia, 2010)	41
Figura 6. Mapas de biomasa residual agrícola del café. Cantidades de residuos por municipio y potencial energético de los mismos. (Fuente: UPME Atlas potencial energético de Colombia, 2010)	42
Figura 7. Ruta catabólica de un azúcar reductor hasta la producción de etanol. Fermentación alcohólica.	52
Figura 8. Vía metabólica de producción de butanol en <i>Clostridium</i> spp. (Fuente: Lee <i>et al.</i> , 2008)	55
Figura 9. Vía de isovalorato para la producción de isobutanol. (Fuente: Lee <i>et al.</i> , 2008)	56
Figura 10. Vía metabólica de producción de isobutanol a partir de aminoácidos (Lee <i>et al.</i> , 2008)	57
Figura 11. Modelo de biorefinería para el aprovechamiento de subproductos de café. (Fuente: Hughes <i>et al.</i> , 2014)	62
Figura 12. Criterios para la diversificación de la canasta energética a través del uso de Biocombustibles. Ley 693 de 2001. (Fuente: autor)	66
Figura 13. Esquema del desarrollo metodológico de las diferentes etapas.	74
Figura 14. Crecimiento característico de colonias puras de <i>S. cerevisiae</i> aislada en agar YPD. (Fuente: el autor)	76
Figura 15. Procedimiento para la destilación simple; balón que contiene el mucílago fermentado de acuerdo con tratamientos (a); destilador en serpentín (b); mangueras transportadoras de agua para refrigeración del serpentín (c); balón colector de solución alcohólica (d). (Fuente: el autor)	82
Figura 16. Procedimiento para rectificación. ; balón conteniendo la solución alcohólica proveniente de la destilación simple (a); columna Vigreux para rectificación (b); condensador en serpentín vertical (c); balón colector de solución alcohólica con la primera rectificación (d). (Fuente: el autor).	83

ÍNDICE DE GRAFICAS

Descripción	Pag
Gráfica 1. Porcentaje de la producción de etanol en medio YPDC producido por <i>S. cerevisiae</i> , a diferentes temperaturas de incubación, ajustado al modelo logístico.	93
Gráfica 2. Dinámica del consumo de azúcares y producción de alcoholes, por <i>S. cerevisiae</i> utilizando como sustrato mucílago proveniente del proceso de beneficio de café con Ecomill® y 16 h de fermentación (I E.E)	104
Gráfica 3. Dinámica del consumo de azúcares y producción de alcoholes, por <i>S. cerevisiae</i> utilizando como sustrato mucílago proveniente del proceso de beneficio de café con Ecomill® y 20 h de fermentación. (I E.E)	104
Gráfica 4. Dinámica del consumo de azúcares y producción de alcoholes, por <i>S. cerevisiae</i> utilizando como sustrato mucílago proveniente del proceso de beneficio de café con Becolsub®. (I E.E)	105
Gráfica 5. Dinámica del consumo de azúcares y producción de alcoholes, por <i>S. cerevisiae</i> utilizando como sustrato mucílago proveniente del proceso de beneficio de café con Ecomill® y adición de enzima, sin fermentación. (I E.E)	105
Gráfica 6. Dinámica del consumo de azúcares y producción de alcoholes, por <i>S. cerevisiae</i> utilizando como sustrato mucílago proveniente del proceso de beneficio de café con Tanque Tina (primera cabeza de lavado). (I E.E)	106
Gráfica 7. Dinámica del consumo de azúcares y producción de alcoholes, por <i>S. cerevisiae</i> utilizando como sustrato mucílago proveniente del proceso de beneficio de café con Tanque Tina (segunda cabeza de lavado). (I E.E)	106

INDICE DE ANEXOS

Descripción	Pag
Anexo 1. Ficha técnica del producto comercial Fermipan ®	118
Anexo 2. Prueba de correlación entre Absorbancia y horas de fermentación para las tres temperaturas evaluadas, Etapa 1	119
Anexo 3. Evaluación del ajuste lineal entre Absorbancia y horas de fermentación para las tres temperaturas evaluadas, Etapa 1.	120
Anexo 4. Comparación de los modelos ajustados para la producción de alcoholes en la primera etapa: “Dinámica del consumo de azúcares por <i>Saccharomyces cereviciae</i> cepa comercial, a diferentes temperaturas”.	122
Anexo 5. Comparación de los modelos ajustados para la variable “consumo total de azucares” presentado para cada tratamiento evaluado	124
Anexo 6. Parámetros de los modelos ajustados para el consumo de azúcares total para cada tratamiento evaluado	134

GLOSARIO

Agricultura Autosuficiente

Es la explotación de la tierra que se hace con el único fin de abastecer al agricultor. En sentido más amplio se dice de la agricultura que produce sólo para el consumo de un grupo, pueblo o país, teniendo nula o escasa capacidad de venta en mercados exteriores.

Almácigo

Lugar en donde se siembran las chapolas provenientes del germinador, en bolsas, agrupadas en eras y expuestas parcialmente al sol, hasta cuando adquieren el desarrollo suficiente para su trasplante definitivo al campo. El almácigo permite atender las plantas en su etapa más delicada y hacer una buena selección del colino que se va a llevar al campo.

Almendra

Palabra que significa café listo para ser tostado.

Altura (sobre el nivel del mar)

La altura del cultivo es un factor de gran importancia ya que la calidad del grano obtenido es superior cuanto mayor sea esta, ya que en zonas altas el fruto va madurando más despacio y su calidad es mayor.

Año Cafetero

Período de un año comprendido entre el 1 de octubre y el 30 de septiembre del año siguiente.

Año Cosecha

Para los países de la Organización Internacional del Café, es el período de mayor recolección de granos. En la mayoría de estos países coincide con el año cafetero.

Arabicas no lavados

Clasificación comercial para los cafés de exportación de Bolivia, Brasil, Etiopía y Paraguay.

Arabigo

Palabra que expresa la variedad del café Arábica. También es el nombre que en algunas zonas del país se le da al café Pergamino.

Árboles (de sombra para cafetales)

En el cafetal se usa sombrío temporal y sombrío permanente. El primero tiene el propósito de proteger los cafetos durante los primeros años de vida. El segundo es el que quedará para el resto de la existencia del cafetal. El sombrío es artificial cuando ha sido sembrado de propósito y natural cuando se usan los árboles crecidos espontáneamente.

Arvense

Especies vegetales que conviven con los cultivos. Gran proporción de estas plantas interfieren con las especies plantadas afectando los rendimientos. Sin embargo otro número considerable de ellas posee características que las distinguen como especies útiles, ya que conservan los suelos y no desarrollan profusamente su follaje y su sistema radical.

Barreras vivas

Faja de vegetación a menudo arbustiva, sembrada generalmente en curva a nivel para contrarrestar la erosión y detener los arrastres.

Beneficiadero Ecológico o Belcolsub

Operaciones que se realizan para transformar el café cereza en pergamino seco, conservando la calidad del café, cumpliendo con las normas de comercialización, evitando pérdidas de café y eliminando procesos innecesarios, aprovechando los subproductos del grano, consiguiendo el mayor ingreso económico al caficultor y minimizando la contaminación del ambiente.

Beneficiadero (beneficio)

Técnicamente consiste en la serie de pasos o etapas de procesamiento a las que se somete el café para quitar o eliminar todas sus capas o cubiertas de la forma más eficiente sin afectar su calidad y su rendimiento. Es una transformación primaria del grano.

Beneficio húmedo

Se realiza mediante la utilización de agua. Comprende el despulpado, desmucilaginado o la fermentación y el lavado y el secado. Por esta vía se obtienen los llamados cafés lavados, finos o suaves.

Beneficio del Café

Conjunto de operaciones realizadas para transformar el café cereza en pergamino seco.

Biocombustibles

Son combustibles de origen biológico obtenidos de manera renovable a partir de restos orgánicos. Estos restos orgánicos proceden habitualmente del azúcar, trigo, maíz o semillas oleaginosas.

Biodiversidad

Es la variedad de los seres vivos que habitan en la tierra. Por ejemplo: los microorganismos, los hongos, los animales, las plantas y el ser humano. También comprende la diversidad de especies, de genética y de ecosistemas.

Biodiversidad y conservación en zonas cafeteras

La biodiversidad hace parte de los recursos naturales bióticos. La conservación y manejo adecuado, tanto de los recursos bióticos como de los abióticos, es fundamental en la búsqueda de la sostenibilidad de las zonas cafeteras.

Buenas Prácticas Agrícolas (BPA)

Utilización sostenible de los recursos naturales básicos para la producción, en forma benévola, de productos agrícolas alimentarios y no alimentarios inocuos y saludables, a la vez que se procuran la viabilidad económica y la estabilidad social.

Café

Término genérico para las frutas y granos de las plantas del género *Coffea* generalmente de especies cultivadas, también como de productos obtenidos a partir de estos frutos y granos en diferentes estados de transformación y empleo, destinados para el consumo. En el caso colombiano, estas plantas del género *Coffea* provienen de la especie botánica *Coffea arabica* Linnaeus.

Café almendra / café verde en almendra / Endospermo / café trillado

A partir de la cual se produce el café tostado y molido. Es básicamente el café pergamino sin su parte externa.

Café en baba

Cereza de café que ha sido “despulpado”.

Café Beneficiado

Café que ha sufrido el proceso de separación de la cascara y pergamino, o sea "Green coffee"

Café Cereza

Es el fruto del arbusto de café –cafeto-, que como tal se recoge en las fincas, en las épocas de cosecha, en las zonas cafeteras y luego se somete a un proceso de adecuación para que pueda ser comercializado (beneficio húmedo), el cual se realiza en la misma finca cafetera.

Café Despulpado

Café procesado por la vía húmeda o sea al que se le ha quitado la pulpa para entrar al proceso de fermentación antes de ser lavado.

Café Pasilla

Las pasillas son los granos de café que presentan defectos, como brocados, vinagres, negros, partidos, astillados.

Café Pergamino Seco

Es el producto del beneficio del grano el cual se obtiene después de quitarle la cáscara y el mucílago, lavarlo y secarlo hasta una humedad del 12%. / Nombre del café que comercializa el caficultor al interior del país. El contenido de agua está entre 10-12%.

Café Reposado

El café reposado o café reposo o café viejo o envejecido, es un defecto del café, da un sabor muy amargo y un aroma muy fuerte que evoca el nombre reposo o viejo, Sucede cuando los granos se almacenan durante mucho tiempo o se ha guardan en condiciones inadecuadas con alta humedad del grano, por encima del 12%, y en sitios muy calientes por encima de 25 °C.

Café Seco de Agua / Oreado

Café que ha sufrido un proceso de secado pero muy insipiente.

Café Sostenible

Cultivados por comunidades que tienen un serio compromiso con la protección del medio ambiente, a través de la producción limpia y la conservación de la riqueza biológica de sus zonas. También promueven el desarrollo social de las familias cafeteras que los producen.

Cafés Robustas

Variedad de la especie *Coffea canephora* más resistente a muchas de las enfermedades del café, especialmente a la roya. Se caracteriza por producir una bebida fuerte y amarga con mayor concentración de cafeína. Se cultiva generalmente en altitudes por debajo de 1.000 msnm en países como Brasil, Vietnam, Indonesia y Uganda.

Café Trillado

Es el café al que se ha sometido al proceso de quitarle sea la cascara cuando se trata de café sin lavar o el pergamino cuando se trata de café lavado.

Café mojado / escurrido / verde

Café pergamino con alto contenido de humedad, generalmente presente en la etapa final del proceso de beneficio (lavado).

Café Verde

A este estado del grano de café también se le conoce en ciertos países como “café oro”, “semilla” o “almendra”. Se obtiene después de la remoción del pergamino como resultado del proceso de trilla. El café verde es el insumo básico para la elaboración del café tostado, el soluble y los extractos de café, y es la forma más común en la que es exportado a otros países.

Café Verde en Almendra (café crudo, granos de café)

Término comercial que designa a la semilla seca de la planta de café. Este tipo de café no puede consumirse directamente y se hacen necesarios procesos adicionales para que pueda ser comestible.

Cafetales

Área o lugar plantado de cafetos.

Cafetales Tecnificados

Plantaciones con trazo y densidad mayor o igual a 2.500 árboles, de variedades: Caturra y Castillo.

Cafeto

Árbol que produce el café.

Caficultura

Actividad agrícola cuyo objetivo es el cultivo y la producción de café.

Calidad del café

Clasificación de los cafés de acuerdo a la altitud, variedad botánica, tipo de beneficiado, densidad, tamaño del grano, calidad de taza, color, imperfecciones del grano y la presencia de materia extraña. Cada país establece sus propios estándares de clasificación de la calidad. El

Café de Colombia es reconocido mundialmente por su buena calidad, por lo cual se vende a un mayor precio. Esta calidad depende de los cuidados y prácticas que siguen los caficultores, recolectores, procesadores, comercializadores, tostadores y consumidores, en los diferentes procesos, a través de las etapas de la cadena productiva del café.

Cenicafé

Centro Nacional de Investigación del Café: Situado en Chinchiná- Caldas / En 1938, la Federación de Cafeteros creó el Centro Nacional de Investigaciones de Café –Cenicafé–, con el objeto de estudiar los aspectos relacionados con la producción y la calidad del café, las plagas y las enfermedades, y la conservación de los recursos naturales de la zona cafetera colombiana.
<http://www.cenicafe.org/>

Cereza

Palabra usada para designar el café maduro antes de ser lavado o secado. Este nombre se debe al parecido que el café en esta condición tiene con la fruta llamada cereza.

Chapola

Plántula de café que ha emitido el primer par de hojas primarias.

Cisco

La película que cubre la almendra de café (endospermo). Esta es retirada generalmente en el proceso de trilla.

Cosecha Principal

En Colombia es el más importante de los dos periodos de recolección realizados en el curso de un año.

Cosecha Secundaria

Recolección de café de menor importancia, llamada "traviesa" o "mitaca", efectuada comúnmente 6 meses después de la cosecha principal.

DQO

La Demanda Química de Oxígeno - DQO es el parámetro utilizado para caracterizar la contaminación orgánica del agua residual, que se mide a partir de la cantidad de oxígeno disuelto necesario para la degradación química de los contaminantes orgánicos que contiene.

Desmucilagador

Es un equipo utilizado en el beneficio del café, por medio del cual se le desprende el mucílago, se lava y se clasifica el grano de café. Equipo que realiza el desmucilagado mecánico por medio de fricción y esfuerzos cortantes.

Desmucilagado

Desprendimiento del mucílago o baba del grano de café despulpado.

Despulpado

Es el proceso donde se separa la almendra del café de la cáscara y la pulpa. Gracias a la tecnología de Beneficio Ecológico o Becolsub®, desarrollado por el Centro Nacional de Investigaciones de Café –CENICAFÉ– en este proceso se utiliza una mínima cantidad de agua y se manejan los subproductos como la pulpa y las mieles para convertirlas en abono orgánico.

Deslim

Desmucilagador lavador y limpiador incorporados.

El Niño

El Niño es un evento climático natural que se produce por la interacción entre la atmósfera y el océano; su principal característica es el incremento de la temperatura en aguas superficiales del océano Pacífico en una gran área de la región ecuatorial. Como resultado de este calentamiento del océano, se afecta el clima terrestre, con disminución de las lluvias en algunas regiones y el incremento en otras, asociadas a cambios en el brillo solar y de la temperatura.

Federación Nacional de Cafeteros (FNC)

En 1927 los cafeteros colombianos se unieron con el fin de crear una organización que los representara nacional e internacionalmente, y que velara por su bienestar y el mejoramiento de su calidad de vida. Así nació la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia (FNC), considerada hoy como una de las ONG rurales más grandes del mundo. Toda la información sobre la Federación aquí: <https://federaciondecafeteros.org/>

Fermentación

Este proceso se realiza en tanques de fermentación y permite retirar el mucílago o mesocarpio. Su duración puede ser entre 12 y 18 horas. Es un proceso catabólico de oxidación incompleta, totalmente anaeróbico, siendo el producto final un compuesto orgánico.

Fermentado

Cambio Químico causado por levaduras y enzimas en el café crudo. Un sabor pronunciado de fermentación daña el sabor del café.

Finca Cafetera

Es una propiedad inmueble rústica, con una extensión continua o discontinua de tierra, utilizada total y parcialmente en la producción de café cereza o café pergamino.

Germinador

Es el sitio sobre o a nivel del suelo, acondicionado normalmente con una capa de arena lavada de río, en el cual se ponen las semillas de café para que germinen, las cuales permanecen ahí, hasta que aparezca el primer par de hojas. / Sitio donde brotan y comienzan a crecer las plantas de café. El sustrato para el germinador puede ser arena lavada de río o tierra desinfectada. El germinador para el café dura dos meses y el estado en que se transplantan al almácigo se llaman chapolas.

Inoculación

Es la adición de un organismo o sustancia a una suspensión o medio de cultivo.

La Niña

La Niña es un evento climático natural que se produce por la interacción entre la atmósfera y el océano; su principal característica es la disminución de la temperatura en las aguas superficiales del océano Pacífico, en una gran área de la región ecuatorial. Como resultado de este enfriamiento del océano se afecta el clima en la tierra, con disminución de las lluvias en algunas regiones y el incremento en otras, asociadas al cambio en el brillo solar y la temperatura.

Lavado

Lo más característico del Café de Colombia es el sistema de tratamiento de los granos de café, por vía húmeda que produce el famoso café lavado colombiano. La vía seca, es otro sistema que produce cafés con características diferentes.

Mucílago

Se genera en la etapa del desmucilaginado, representa en base húmeda, alrededor de 14,85% del peso del fruto fresco. Por cada millón de sacos de 60 kg de café almendra que Colombia exporta, se generan aproximadamente 55.500 toneladas de mucílago fresco, el cual si no se utiliza adecuadamente es fuente de contaminación. Sustancia incolora que recubre el fruto del café una vez se haya despulpado. El mucílago debe ser removido para permitir un fácil secado y una buena conservación del café.

Post-cosecha

Procesos de beneficio y secado, que se realizan a partir de la recolección de las cerezas de café.

pH

Medida de acidez o alcalinidad de una solución a una temperatura dada; se define como el logaritmo inverso de la actividad de los iones Hidrógeno.

Pulpa

Es la cáscara del grano de café formada por el exocarpio (epidermis) y parte del mesocarpio. En el beneficio ecológico la pulpa es uno de los subproductos y se deposita en fosas para su descomposición y posterior utilización en el cultivo.

Robusta

Modalidad de café, tiene el grano de café más pequeño, es resistente y posee un mayor nivel de cafeína. Se cultiva en África, Asia y Brasil. Es originario del Zaire.

Subproductos

Residuos del proceso de beneficio del café.

Sólidos Suspendidos Totales

Se refieren a la materia que permanece como residuo sobre un medio filtrante, después de filtrar el agua.

Sustrato

Área de condiciones uniformes, donde los organismos desarrollan sus funciones vitales y se relacionan entre sí.

Tanque tina

Tanque modificado en sus esquinas y ángulos para facilitar la operación de lavado.

Trilla de Café

Proceso de selección mecánica y óptica (que algunos llaman beneficio seco), en donde el café pergamino se convierte en café Almendra (también llamado café verde en almendra), el que dependiendo de sus características físicas y/o sensoriales (sabor) va a ser clasificado en:

- Café Excelso
- Café Pasilla (de máquinas ó de manos)
- Café consumo (nacional, superior, chorriado)
- Ripio (legalmente existe, pero en la práctica no).

Variedad

Es importante seleccionar el tipo de semilla a cultivar, hay diferentes variedades que en algunas zonas presentan mejor productividad que en otras, este punto es muy importante porque lo define la altura donde se harán las plantaciones.

Variedades Castillo® regionales

Las variedades Castillo® regionales son el resultado de la selección de los componentes (líneas) de rendimientos mayores que la variedad Colombia en determinados lugares. Su área de recomendación está determinada por las similitudes de clima y suelo (también llamados ecotopos), del lugar donde se evaluó con las áreas adyacentes. Se han liberado siete mezclas de componentes para igual número de zonas agroclimáticas. A cada mezcla o variedad regional, se le ha dado el nombre de la sub-estación experimental donde fueron seleccionadas. Actualmente se dispone de las siguientes variedades Castillo® regionales: NARANJAL, PARAGUAICITO, SANTA BARBARA, PUEBLO BELLO, EL ROSARIO, LA TRINIDAD y EL TAMBO.

ABREVIATURAS

Referencia	Abreviatura	Referencia	Abreviatura
Agua Destilada Estéril	ADE	Grados Celsius	° C
Análisis de Varianza	anova	Hora	h
Atmósferas	atm	Índice de refracción	IR
Café Cereza	cc	Límite Inferior	L.I
Café Pergamino Seco	cps	Límite Superior	L.S
Cromatografía de Gases	CG	No Detectado	ND
Coefficiente de Correlación	Coef. Corr.	Mínima Diferencia Significativa	MDS
Coefficiente de Determinación	Coef. Deter.	Promedio	Prom
Cromatografía Líquida de Alta Eficacia	HPLC	Temperatura	Temp
Detector de ionización de llama	FID	Tratamiento	Trat
Federación Nacional de Cafeteros	FNC	Unidad Experimental	U.E.
Grados Brix	° Brix	Unidades Formadoras de Colonia	UFC

1. RESUMEN

El mucílago como uno de los dos más importantes subproductos del beneficio del café, por su composición se considera como residuo energético relevante en la obtención de biocombustibles. Con el progresivo desarrollo de diferentes tecnologías para el beneficio ecológico del café, se ve la necesidad de indagar sobre el potencial que pudieran tener estos sustratos (mucílagos procesados de Becolsub®, Ecomill® (20 y 16 h de fermentación), Ecomill® con enzima y Tanque tina, primera y segunda cabeza de lavado), en la producción de bio-alcoholes. En cuanto a la producción de bio-etanol, se logró estandarizar tanto las técnicas de detección de azúcares por HPLC, como la detección de alcoholes por CG, las cuales resultan ser técnicas fiables para la repetitividad y por ende en la confiabilidad de los resultados. El efecto de la esterilización en autoclave (15 min a 120°C y 15 psi) de los diferentes sustratos, no causa reducción drástica en la concentración de azúcares disponibles para su uso por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, lo que permite un mayor entendimiento de los procesos fermentativos y dinámicas ocurridas en el consumo de glucosa, fructosa y sacarosa presentes en estos sustratos; sin embargo la disponibilidad de azúcares varía, dependiendo del origen del sustrato, al igual que la dinámica de su consumo en el tiempo, viéndose afectada la producción final de etanol. Durante los procesos de fermentación para cada uno de los sustratos, se logró establecer relación entre el crecimiento vegetativo de la levadura dado por UFC, la absorbancia (660 nm), el consumo de azúcares (g/día) y la producción de etanol (mL) durante 36 horas de fermentación. La implementación de alternativas como la bio-transformación de la biomasa energética proveniente del beneficio ecológico del café, permitirá que además de reducir el impacto al suelo y fuentes de agua por su inadecuada disposición, aumenten los ingresos a la cadena productiva del café y colaborar con la mitigación de necesidades energéticas que tienen muchas familias cafeteras de Colombia. El conocimiento generado, tendrá aplicabilidad relevante dentro de las iniciativas lideradas por la FNC, como el de las Centrales de Beneficio Comunitarias.

Palabras clave: Fermentación alcohólica, Bioalcoholes, Biorefinerías, Subproductos del café, mucílago de café, Beneficio ecológico.

2. SUMMARY

By its composition, mucilage as one of the two most important by-products of the coffee process, is considered as a significant energy waste to the biofuels production. With the progressive development of different technologies for the ecological coffee process, it is necessary to research about these substrates potential (mucilages from Becolsub®, Ecomill® (20 and 16 h of fermentation), Ecomill® with enzyme and Tina Tank, first and second wash water), in the production of bio-alcohols. In order to bio-ethanol production, it was possible to standardize both detection of sugars and the detection of alcohols by HPLC and GC, respectively, which prove to be reliable techniques for repeatability and therefore reliability of results. The sterilization by autoclaving effect (15 min/120°C/15 psi) on different substrates does not cause reduction in sugars concentration available for use by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, allowing a better understanding of the dynamic fermentative processes occurring in the consumption of glucose, fructose and sucrose present in these substrates; however the availability of sugars varies depending on the origin of the substrate, as well as the dynamics of their consumption over time, affecting the final ethanol production. During the fermentation processes for each of the substrates, it was possible to establish a relationship between the vegetative growth of the yeast given by CFU, absorbance (660 nm), sugar consumption (g / day) and ethanol production during 36 fermentation hours. Improving alternatives such as bio-transformation of energy waste from the ecological coffee process, will not only reduce the impact on the soil and water sources due to their inadequate disposal, but also increases incomes to the coffee production chain and aids mitigation energy needs for coffee families in Colombia. The knowledge generated will have relevant applicability within the initiatives led by the NCF, such as the Community Processing Centers.

Keywords: Alcoholic fermentation, Bio-alcohol, Biorefinery, Coffee by-products, coffee mucilage, Ecological Coffee Processing.

3. INTRODUCCIÓN

La zona cafetera colombiana se encuentra asentada en las áreas de montaña de mayor vulnerabilidad frente a la variación climática. La institucionalidad cafetera en cabeza de la FNC, ha desarrollado programas que se han preocupado por el mantenimiento de las mejores condiciones ambientales, sociales y económicas de los productores. La FNC incluyó dentro de su plan estratégico 2008 – 2012, el ingreso al mercado de los servicios ambientales y en particular al del carbono. En dicha estrategia se ha incorporado la producción de biocombustibles a partir de subproductos de la agroindustria cafetera, como respuesta a la necesidad de buscar alternativas energéticas limpias, que guarden balance con el medio ambiente y que no utilicen zonas agrícolas para la producción de alimentos, lo que pudiera generar muy seguramente ingresos adicionales a los agricultores, además de contribuir a las iniciativas tendientes a la paulatina sustitución de combustibles de origen fósil.

En esta dirección, han sido promisorios los estudios realizados en Cenicafé desde 1950 haciendo énfasis en la obtención de diferentes alcoholes (Calle, 1951 b) y recientemente se han enfocado esfuerzos sobre la utilización de estos subproductos como fuente de energía renovable (Rodríguez y Zambrano, 2010). En estudios de fermentación alcohólica, realizados por Rodríguez y Zambrano, 2011, se encontró un valor promedio de 25,17 mL de etanol a partir de 1 Kg de pulpa fresca y de 58,37 mL de etanol a partir de 1 kg de mucílago fresco equivalente a 1,23MJ/Kg de mucílago fresco, resultados que cobran relevancia si se tiene en cuenta que la capacidad calorífica del etanol es de 21,08 MJ/l (Sánchez, 2003).

En el contexto actual en el que se desarrolla la caficultura en Colombia, en donde el desarrollo e implementación de Centrales Comunitarias de Beneficio de Café toman relevancia dentro de las políticas de la FNC y teniendo en cuenta la heterogeneidad del mucílago en cuanto a oferta y composición como fuente energética, es prioritario el desarrollo de investigaciones en que se ahonde en el conocimiento sobre el aprovechamiento de esta materia prima en la producción de bio-alcoholes, con énfasis en las tecnologías para el Beneficio Ecológico del Café.

4. OBJETIVOS

General:

Evaluar la capacidad de aprovechamiento del mucílago para la producción de bio-alcoholes, obtenido a partir de tres tecnologías utilizadas en el Beneficio Ecológico del café.

Específicos:

- 1- Evaluar el efecto de la temperatura, en el crecimiento vegetativo, utilización de azúcares disponibles y producción de etanol, de una cepa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, aislada de un producto comercial bajo condiciones de laboratorio.
- 2- Determinar la disponibilidad y cantidad de azúcares reductores del mucílago obtenido a partir de tres tecnologías utilizadas en el Beneficio Ecológico del café, después de someterlos a proceso de autoclavado.
- 3- Evaluar la dinámica del consumo de azúcares disponibles, crecimiento vegetativo y producción de bio-alcoholes, de una cepa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, aislada de un producto comercial, utilizando como sustrato el mucílago obtenido a partir de tres tecnologías utilizadas en el Beneficio Ecológico del café, bajo condiciones de laboratorio.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Es el mucílago del café obtenido del Beneficio Ecológico, un sustrato aprovechable en la producción de bio-alcoholes?

6. HIPÓTESIS

Con al menos uno de los procedimientos para generar mucílago a partir del Beneficio Ecológico, se logra mayor producción de alcohol.

7. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La necesidad y urgencia de buscar alternativas energéticas más limpias y que sean amigables con el ambiente, está en la agenda de las cadenas productivas agrícolas del país y en las directrices del Ministerio de Minas y Energía. El mucílago es un subproducto energético del café desaprovechado con potencial para producción de biocombustibles y por lo general su incorrecta disposición, genera contaminación afectando las características estructurales de los ecosistemas. En el marco del desarrollo de Centrales de Beneficio Comunitarias y de la mano del Beneficio Ecológico, la atomización de esta biomasa se concentrará en estas Centrales generando oportunidades de biotransformación a alcoholes principalmente, para que oportunamente sea aprovechada, disminuya la contaminación y genere valor a la cadena productiva, consolidando así una caficultura sostenible. Avanzar en el conocimiento de los procesos de transformación, rendimientos y estandarización de procedimientos en la obtención de bioalcoholes a partir de los residuos del café, cobra relevancia dentro de las estrategias que abordan la problemática de la familia cafetera desde el punto de vista, económico, social y ambiental.

8. JUSTIFICACIÓN

En Colombia y durante los últimos 10 años, la siembra de cultivos "energéticos" como la caña de azúcar, la palma, el maíz entre otros, y su masificación se ha convertido en política de estado. Estas decisiones han generado que zonas donde antaño se producían alimentos, hoy se utilicen para fines energéticos. Esta coyuntura en donde prima el deseo del lucro por el del aseguramiento y suministro de alimentos, además de poner en riesgo la seguridad alimentaria de la población en las zonas afectadas, genera aumento de la frontera agrícola lo que redundo en el surgimiento de problemas de plagas y enfermedades tanto para los cultivos como para las comunidades establecidas en dichas áreas.

Adicionalmente, la presión de los monocultivos establecidos para tales fines, incrementa la pérdida de biodiversidad tanto de fauna y flora como de la diversidad cultural de las comunidades que viven en la zona. Estas acciones, tarde o temprano hacen que se presente la intervención de las autoridades competentes, teniendo como única herramienta la sanción legal de los actores y/o comunidades que derivan su sustento de éstas actividades, estigmatizándolas y convirtiéndolos en victimarios en un sistema cerrado y repetitivo. En este orden de ideas y siendo el cultivo del café uno de los motores de desarrollo agrícola del país, no está exento de que prácticas continuas como la incorrecta disposición de los residuos del proceso del café en el suelo o fuentes hídricas, o coyunturales como que con el objeto de mantener la competitividad de la caficultura desde el 2010 se hayan adoptado estrategias para rejuvenecer el parque cafetero, renovando cerca de 60.000 ha/año de plantaciones que generan alrededor de un millón de toneladas de biomasa seca, hacen que las consecuencias puedan no ser tan diferentes. Aunado a esta realidad, y con el fin de dar espacios ciertos para lograr una caficultura sostenible, en la cual el caficultor sea el protagonista con mayor relevancia, es nuestro deber como investigadores, lograr que estos obstáculos se conviertan en oportunidades.

Es de esta forma que con el desarrollo de esta investigación, se aportan los pilares básicos para iniciar la construcción de una estrategia para el aprovechamiento de estos sub-productos, que aunque no es novedosa, se ha modificado sustancialmente tanto desde la visión para valorar

este sub-producto, pasando por su diversidad en cuanto a calidades, como el marco legal nacional y mundial en que los biocombustibles se rigen actualmente.

Adicionalmente, al eliminar o al menos reducir el impacto negativo que los desechos del proceso de café causan al ambiente, el caficultor mejora su calidad de vida, la de su familia y la de su comunidad, a la vez que puede mejorar sus ingresos económicos, al obtener un producto con connotación de sostenibilidad.

9. MARCO TEÓRICO

9.1 GENERALIDADES

9.1.1 EL CULTIVO DEL CAFÉ

El cultivo del café (*Coffea arabica* L.) es originario del norte de África y es cultivado con el objeto de producir un grano, cuyo rico contenido de sustancias aromáticas y estimulantes permite preparar una infusión altamente preciada como bebida y como sobremesa. El término café de Colombia está reconocido como Denominación de Origen protegida en otros países del mundo (FNC, 2013) como Ecuador, Bolivia y Perú. A nivel mundial, Colombia es el primer país productor de café y el mayor productor de café suave en el mundo (FNC, 2013). Los principales países importadores del café de Colombia son Estados Unidos, Alemania, Japón, Países Bajos y Suecia. Durante el siglo XX el café fue el producto primordial dentro de las actividades comerciales colombianas, registrando exportaciones de hasta 12 millones de sacos. Desde los años veinte, Colombia ocupó el primer lugar como productor mundial de café suave (FNC, 2013). Los principales departamentos productores de café en Colombia son: Nariño, Norte de Santander, Antioquia, Valle del Cauca, Cundinamarca, Huila, Tolima, Caldas, Quindío y Risaralda, conociendo los tres últimos como el Eje Cafetero.

Colombia tiene una superficie total de 113.891.400 hectáreas de las cuales 7.300.000 son aptas para producción de café. Entre las ventajas con las que cuenta a su favor, está la oferta ambiental, es decir las zonas fértiles donde brota el café. Pero no sólo esto favorece al café, al estar sembrado en diferentes alturas y regiones obtiene unas cualidades propias y únicas en el mundo.

El café necesita condiciones climáticas específicas para su producción, como condiciones de suelo, temperatura, precipitación atmosférica y altitud sobre el nivel del mar. Las condiciones ideales para el cultivo se encuentran entre los 1.200 y 1.800 msnm, con temperaturas templadas que oscilan entre los 17 y los 23 grados centígrados y con precipitaciones cercanas a los 2.000

milímetros anuales, bien distribuidos a lo largo del año. En la actualidad, el cultivo del café en Colombia está ubicado, en su gran mayoría, sobre el perfil de las laderas de sus tres cordilleras y existen zonas específicas donde se siembra un café especial.

En Colombia se recoge café durante todo el año; se presentan dos cosechas, una grande que se llama cosecha principal y una pequeña denominada traviesa o mitaca, que produce aproximadamente una tercera parte de la principal. Estas características permiten ofrecer al mundo café fresco durante todo el año.

9.1.2 PRINCIPALES ZONAS PRODUCTORAS DE CAFÉ EN COLOMBIA

En la actualidad, el cultivo del café en Colombia está ubicado, en su gran mayoría, sobre el perfil de las laderas de sus tres cordilleras; y en menor escala en la Sierra Nevada de Santa Marta. Las zonas cafeteras colombianas están ubicadas en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Caldas, Cauca, Cesar, Caquetá, Casanare, Cundinamarca, Guajira, Huila, Magdalena, Meta, Nariño, Norte de Santander, Quindío, Risaralda, Santander, Tolima y Valle.

La planta de café es perenne y se considera que alcanza su crecimiento y productividad máxima a los 6-8 años de edad, necesita entre 18 y 24 meses para dar la primera cosecha, durante ese tiempo existe una oportunidad para diversificar la producción y generar ingresos adicionales a los del café; mejorando la socio economía de los caficultores y de la región cafetera.

Después de esta edad (6-8 años) la planta se deteriora paulatinamente y su productividad disminuye a niveles de poca rentabilidad. El ritmo de envejecimiento dependerá de la calidad del sitio, la densidad de siembra, intensidad de la producción, disponibilidad de nutrimentos, presencia de plagas y enfermedades o estrés ambiental, entre otros.

A medida que la planta se envejece, el follaje se torna de un color verde pálido indicando cierto grado de senescencia, se observa defoliación en las ramas de la parte baja. Después de 3-4 cosechas la zona de producción se ha movido hacia la parte media y superior en el tallo principal

y hacia la parte exterior de las ramas, las hojas son de tamaño menor que el normal, se observa fuerte defoliación en la parte inferior y al interior de la planta, se produce la muerte de algunas ramas en la base de la planta. Este proceso es más acentuado en cafetos descopados. Cuando la zona de producción se limita a unas pocas ramas en la parte apical del tallo y a unos pocos nudos hacia el ápice de las ramas, y la planta se defolia severamente, se ha alcanzado un alto grado de senescencia y baja productividad por lo cual es necesario entrar a renovar la plantación (Camayo *et al.*, 2003).

9.1.3 SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE CAFÉ EN COLOMBIA

En Colombia se pueden distinguir dos grandes sistemas de producción de café:

- **Sistemas de producción de café a libre exposición solar:** Se desarrollan bien en las zonas con suelos de buenas características físicas y de fertilidad y una apropiada disponibilidad de agua (regímenes de lluvia suficiente y muy buena distribución durante todo el año) y de energía solar. En este tipo de sistemas se utilizan densidades de siembra altas, entre 7.500 y las 10.000 plantas por hectárea y son de una alta productividad (2500-4000 kg café pergamino seco por hectárea). Cerca del 30% de la caficultura colombiana se encuentra a plena exposición solar.
- **Sistemas agroforestales con café (café bajo sombra):** En estos sistemas se utilizan árboles para proporcionar diferentes niveles de sombrero dependiendo de la especie y el arreglo espacial. Se emplean principalmente en zonas con limitaciones para un adecuado desarrollo del cultivo, por condiciones climáticas o de suelos ya sea por la presencia de períodos secos prolongados o de suelos con limitaciones físicas y de fertilidad o erosionados. En estos sistemas la densidad de siembra óptima (2000-3000 plantas por hectárea) y la productividad (500 -1000 kg café pergamino seco por hectárea) son menores que en cafetales a libre exposición. Cerca del 60% de la caficultura colombiana se encuentra bajo algún tipo de sombrero.

9.1.4 VARIEDADES DE CAFÉ CULTIVADAS EN COLOMBIA

Existen numerosas especies de cafeto y diferentes variedades de cada especie. Las más importantes comercialmente son conocidas como Arábica y Robusta o *Canephora*. Ambas fueron halladas originalmente salvajes en regiones africanas.

- El 70% del café que se consume en el mundo pertenece a la especie *Coffea arábica* y se cultiva particularmente en América y en algunas regiones de África y Asia.
- El 30% restante del consumo está representado por la *Coffea canephora* o café robusta, la cual por sus condiciones especiales y resistencia a la roya, es sembrada en África.

Ambas especies se cultivan en distintos climas y altitudes: altura, para arábica y zona baja para canephora. En Colombia únicamente se cultivan los cafés arábigos los cuales producen una bebida suave, de mayor aceptación en el mercado mundial.

Las variedades de café arábigo que se siembran en Colombia son: Típica, Borbón, Maragogipe, Tabi, Caturra, Variedad Colombia, Variedad Castillo.

9.2 EL FRUTO DEL CAFÉ

Los granos de café o semillas están contenidos en el fruto del arbusto, los cuales en estado de madurez toman un color rojizo y se les denomina "cereza". Cada una de ellas consiste en una piel exterior que envuelve una pulpa dulce. El fruto del cafeto cuyas semillas tostadas y molidas se utilizan para el consumo humano está compuesto, de afuera hacia dentro, por:

Una cubierta exterior llamada pulpa, una sustancia gelatinosa azucarada que recibe el nombre de mucílago, una cubierta dura que se denomina pergamino o cáscara, una cubierta más delgada y fina llamada película y finalmente el grano o almendra que es la parte del fruto que, una vez tostada y molida, se utiliza para la producción de la bebida del café (Figura 1).

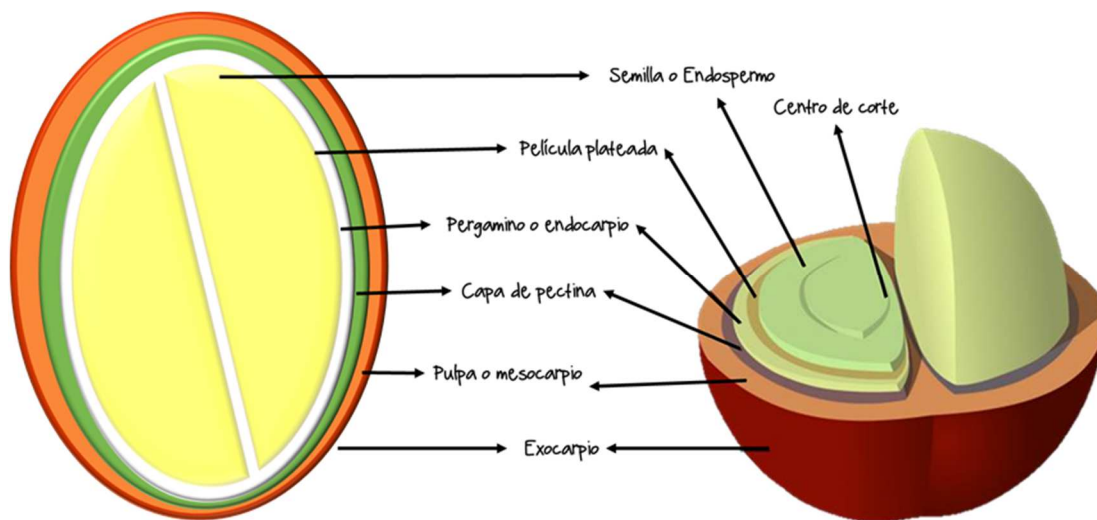


Figura 1. Composición del fruto del café (Fuente: el autor)

El desarrollo del fruto del café se puede dividir en cuatro etapas, en las cuales muestra características específicas en su desarrollo fenológico. La secuencia de desarrollo se ilustra en la figura 2.



Primera etapa

Es una etapa donde hay muy poco crecimiento en tamaño y peso del fruto. Va desde la fecundación hasta la sexta semana.



Segunda etapa

En esta etapa el fruto crece rápidamente en peso y volumen. También es denominada como la etapa de formación del grano lechoso. Va desde la sexta a la decimasexta semana.



Tercera etapa

El crecimiento exterior del fruto casi no se nota. Se da una gran demanda de nutrientes. Se endurece la almendra. Va de la decima sexta a la vigesima septima semana.



Cuarta etapa

Es la época de maduración o cambio de color del fruto. Va de la vigesima- septima a la trigesima- segunda semanas despues de la fecundación.

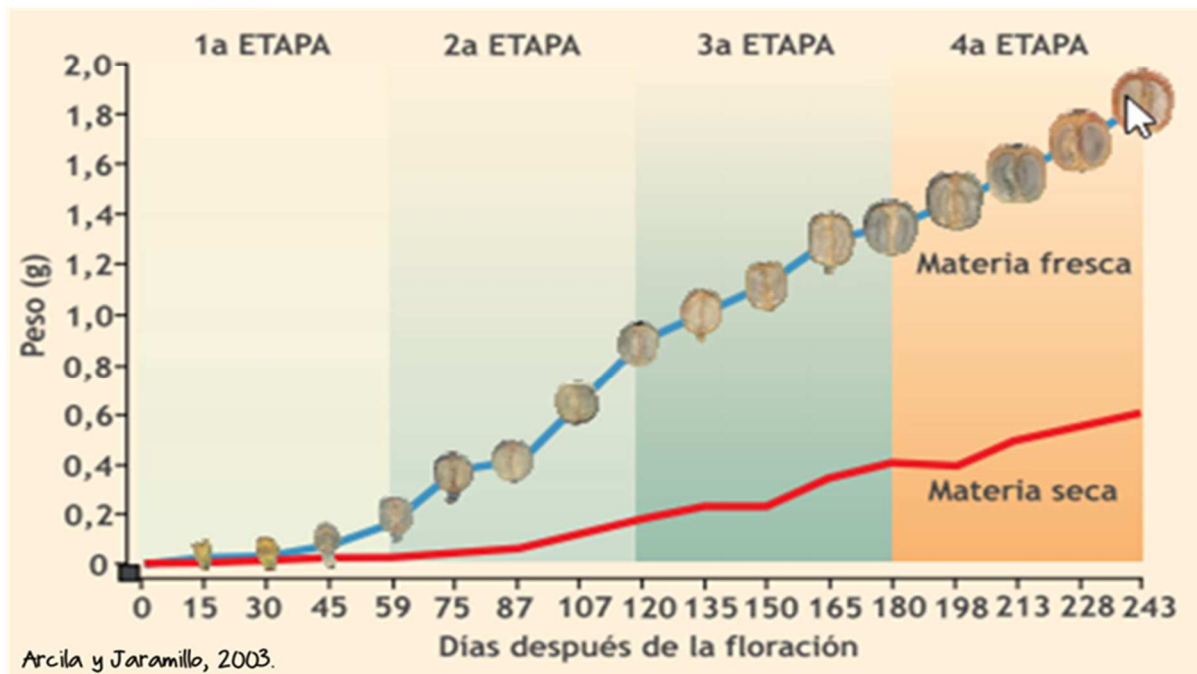


Figura 2. Fenología del desarrollo del fruto de café (Modificada de Arcila y Jaramillo, 2003)

En estudios realizados sobre la composición elemental de los frutos de café Colombia (Sadeghian *et al.*, 2006), se ha determinado que en la pulpa, la concentración de potasio es más alta con respecto a otras estructuras del fruto. Adicionalmente, el nitrógeno ocupa el segundo lugar, seguido por el calcio, fósforo, magnesio y azufre, cuyos contenidos son inferiores al 0,3% y se encuentran con mayor abundancia en la almendra. Por otra parte, en el mucílago, los porcentajes del N y K son similares pese a la carencia de azufre.

Es relevante mencionar que la pulpa del café contiene un 12% de azúcares reductores, 2% de No reductores y 6,5% de sustancias pécticas (Bressani, 1975), que en sumatoria constituyen un sustrato apto para ser transformado en bioalcoholes.

9.3 EL MUCÍLAGO

El mucílago constituye uno de los subproductos de mayor interés dentro del proceso del beneficio del café, el cual está localizado entre la pulpa y la cáscara del grano. Este material representa alrededor del 5% del peso seco de este (Bressani *et. al.*, 1972)

El mucílago es una capa de aproximadamente 0,5 a 2 mm de espesor que está fuertemente adherida a la cáscara del grano de café. Desde el punto de vista físico, el mucílago es un sistema coloidal líquido, liofílico, siendo por lo tanto un hidrogel. Químicamente, el mucílago contiene agua, pectinas, azúcares y ácidos orgánicos (Carbonell y Vilanova, 1974; Martínez, 1958). Durante la maduración del grano de café el pectato de calcio, localizado en la laminilla media y la protopectina de la pared celular, es convertido en pectinas.

Esta transformación o hidrólisis de las protopectinas resulta en la desintegración de la pared celular, dejando un plasma celular libre. Este plasma, que representa alrededor del 14% del peso del fruto (Carbonell y Vilanova, 1974; Puerta, 2010), además de pectinas, contiene azúcares y ácidos orgánicos derivados del metabolismo y la conversión del almidón (Carbonell y Vilanova,

1974; Rodríguez, 1999), cuyas proporciones varían en los datos reportados por los diferentes autores (Tabla 1).

Tabla 1. Composición química (%) del mucílago del fruto del café.

Variables	Carbonell y Vilanova (1974)	Rodríguez (1999)
Humedad	-	92,2
Azúcares reductores	30	63,74
Azúcares totales	45,8	79,74
Azúcares NO reductores	20	-
Contenido de pectina	35,8	10,97
Celulosa = Cenizas	17	-

Por otra parte Puerta (2010), reporta que de los carbohidratos del mucílago de café fresco, en promedio el 47,9% corresponde a azúcares reductores, 29,8% a azúcares no reductores como la sacarosa, el 7,3% constituye fibra y cerca de 15% a sustancias no fibrosas, la pectina. No obstante, estas proporciones no son permanentes o estables, ya que durante las fermentaciones, la glucosa y los monosacáridos son consumidos y fermentados por las levaduras y bacterias, los disacáridos son degradados en monosacáridos y varios polisacáridos son hidrolizados. No obstante, después de 74 horas de proceso, no todos los azúcares del mucílago son fermentados, ni todas las sustancias pécticas son degradadas, lo cual puede estar relacionado con la acidificación del medio (Avallone *et al.* 2000). Puerta (2010) reporta efecto de la temperatura en la concentración de azúcares reductores, de tal manera que, a temperatura ambiente la disminución de los mismos tiene una relación exponencial frente al tiempo de fermentación, mientras que en condiciones de refrigeración, el consumo es gradual y los cambios en la concentración se presentan después de las 31 h.

La velocidad de las degradaciones durante la fermentación del mucílago de café depende de la temperatura externa y del tiempo. A temperatura ambiente de 20,5°C la disminución de azúcares es significativa desde las primeras horas, mientras que en refrigeración el contenido de azúcares pueden conservarse hasta 30 horas, siendo este un método de almacenamiento de

mucílago, para su posterior utilización como sustrato de fermentación o en otros procesos industriales o pecuarios (Puerta, 2010).

9.3.1 LA CAPA DE PECTINA

Los compuestos pécticos, un grupo sustancias de gran importancia dentro de la conformación del mucílago, constituye cerca del 5% de las paredes celulares de los vegetales e incluye sustancias insolubles en agua como las protopectinas que tienen todos los grupos carboxilos esterificados con grupos metilo (-CH₃), los ácidos pécticos no metilados que contienen ácido D-galacturónico, sus sales los pectatos de Ca, los ácidos pectínicos esterificados y sus sales los pectinatos, y también las pectinas que son solubles en agua caliente (Arroyo, 2002; Puerta, 2009 y 2010). Las concentraciones de estos compuestos varían durante el proceso de fermentación por la actividad de pectinasas naturales del mucílago, que los despolimerizan parcialmente. Las pectinesterasas se encuentran de forma natural en los tejidos de las plantas, además, muchas bacterias, levaduras y hongos producen pectinasas como protopectinasas, poligalacturonasas, pectinesterasas y pectinaliasas.

En la fermentación del café está involucrada la pared celular y el material intercelular de las células parenquimatosas del fruto. La lámina media del mucilago del café es la que contiene fundamentalmente ácido pectínico, además de pectina y celulosa y la fracción insoluble está constituida principalmente por sustancias pécticas, en estrecha relación con otros materiales de la pared celular como hemicelulosas, fosfolípidos, galactolípidos y los azúcares ya mencionados. La degradación de este material celular y su eliminación de la película de pergamino de la semilla de café constituyen los procesos bioquímicos más importantes en la fermentación del café.

9.4 PROCESO DE BENEFICIO DEL CAFÉ

En los países cafeteros se han usado diversos métodos, prácticas y condiciones de beneficio para retirar el mucílago del grano de café. En Colombia, el café se procesa en las fincas por el método húmedo, y la mayoría de los caficultores usan el proceso de fermentación con el fin de separar el mucílago de los granos, para lo cual dejan los granos despulpados sin agua, en tanques abiertos, otros adicionan agua o dejan los granos inmersos en agua durante varias horas después de la fermentación (Figura 3). Además, en algunas fincas grandes, se usa el desmucilaginador mecánico (Figura 4) para remover el mucílago de café, y así se obtiene un residuo en menor tiempo, comparado con la fermentación, pero que es necesario disponer o utilizar de forma adecuada, para evitar su vertimiento directo a las fuentes de agua.



Figura 3. Tanque Tina abierto con grano despulpado (Fuente: Cenicafé. Disciplina de Poscosecha. Copyright 2016).



Figura 4. Desmucilaginador mecánico.
(Fuente: Cenicafé. Disciplina de
Poscosecha. Copyright 2016)

El mucílago y las mieles fermentadas de café se generan en forma discontinua, en cantidades que dependen de la producción de café, en cada época y zona cafetera colombiana. Así mismo, las cantidades de mucílago en los frutos y granos de café varían con la madurez del fruto, es así como los frutos maduros y frescos contienen en promedio 10,4% (entre 1,1% y 27,3%) en peso de mucílago y los granos despulpados un 18,8%. En consecuencia, por cada tonelada de café cereza que se procese en la finca pueden obtenerse entre 80 y 140 kilogramos de mucílago, según la madurez y la cantidad de agua usada en el desmucilaginado mecánico (Rodríguez *et al.*, 2015).

9.4.1 BENEFICIO ECOLÓGICO DEL CAFÉ

En cuanto al beneficio del café en Colombia, el proceso por el cual se transforma el fruto maduro de café (café cereza) una vez se ha cosechado en café pergamino seco (cps), se denomina beneficio húmedo pues utiliza agua para el lavado de la semilla. Este tipo de beneficio, ha permitido que el café colombiano, se destaque dentro de “los cafés suaves lavados” característica de calidad implícita asociada al beneficio húmedo. Este uso del agua, se asume con responsabilidad ambiental, ya que el desarrollo de metodologías tendientes a reducir

sustancialmente el consumo de agua para llevar a cabo el procesamiento del café y su adopción, posibilitan que el producto sea amigable con la naturaleza (Rodríguez *et al.* 2015). Dentro de estas metodologías, para el caficultor colombiano, se ha conformado lo que se conoce como el Beneficio Ecológico del Café, lo que define Roa y colaboradores en 1999 como “el conjunto de operaciones realizadas para transformar el café cereza en café pergamino seco, conservando la calidad exigida por las normas de comercialización, evitando pérdidas del producto y eliminando procesos innecesarios, lográndose además el aprovechamiento de los subproductos, lo cual representa el mayor ingreso económico para el caficultor y la mínima alteración del agua estrictamente necesaria en el beneficio”. Solo con el deseo de ampliar esta responsabilidad con el medio ambiente, la FNC ha ido mucho más allá, implementando el concepto del “Beneficio Ecológico sin Vertimientos”, en el que durante el beneficio, prima el uso racional del agua y los subproductos como la pulpa, el mucílago y las aguas residuales se tratan de forma tal que no se generan vertimientos en el proceso (Rodríguez *et al.* 2015). Para tal efecto, los lixiviados generados en el proceso de descomposición de la pulpa, se recirculan permanente sobre esta misma hasta lograr su completa incorporación, y las aguas tratadas provenientes de los sistemas de tratamiento, se utilizan en el riego de los cultivos de la zona.

Teniendo en cuenta la tipificación de los beneficiaderos ecológicos de café, para los que las dos características fundamentales son: que el consumo global de agua en el beneficio del café sea menor a 10L/kg de cps y que con la aplicación de buenas prácticas, se realice el manejo parcial o total a los subproductos (pulpa y mucílago), generados en el proceso de beneficio del café (Rodríguez *et al.* 2015), un aporte adicional a este concepto se tiene con la incorporación de tres tecnologías desarrolladas en Cenicafé. Tanque Tina y la práctica de cuatro enjuagues (Zambrano, 1993), con la que se utiliza menos de 5 L / kg de cps; Becolsub® (beneficio ecológico del café y aprovechamiento de los subproductos), en la que se usa el desmucilagador mecánico DESLIM, con un consumo específico de agua entre 0,7 y 1,0 L/kg de cps (Oliveros *et al.*, 1998 y 1999); y Ecomill® (Oliveros *et al.*, 2013), con un consumo de agua por kg de cps de menos de 0,5 L. Es así como con base en lo anterior, podemos concluir que del mismo subproducto, principalmente para el caso del mucílago, lo que antaño era un desecho, con la incorporación de nuevas tecnologías y prácticas, actualmente se puede contar con una materia prima invaluable para obtener una gama diferencial de co-productos.

9.5 BIOMASA DEL CAFÉ

El término biomasa, cobra gran importancia, ya que es el punto de partida de los procesos que se deben abordar. A priori, la biomasa es la cantidad de materia acumulada en un individuo, un nivel trófico, una población o un ecosistema. Según el Diccionario de la lengua española de la Real Academia Española, tiene dos acepciones:

f. Biol. Materia total de los seres que viven en un lugar determinado, expresada en peso por unidad de área o de volumen.

f. Biol. Materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía.

La primera acepción se utiliza habitualmente en Ecología. La segunda acepción, más restringida, se refiere a la biomasa “útil” en términos energéticos formales, de tal manera, las plantas transforman la energía lumínica en energía química a través de la fotosíntesis, y parte de esa energía química queda almacenada en forma de materia orgánica; la energía química de la biomasa puede recuperarse quemándola directamente o transformándola en combustible (Rodríguez 2013).

De manera equivocada se emplea el término biomasa como sinónimo de la energía útil que puede extraerse de ella, lo que genera bastante confusión debido a que la relación entre la energía útil y la biomasa es muy variable y depende de innumerables factores. La energía útil puede extraerse por combustión directa de biomasa (madera, excrementos animales, etc), pero también de la quema de combustibles obtenidos de ella mediante transformaciones físicas o químicas (gas metano de los residuos orgánicos), procesos en los que se pierde parte de la energía útil original. La biomasa puede ser útil directamente como materia orgánica en forma de abono y tratamiento de suelos (uso de estiércol o de coberturas vegetales) y servir de alimento a los organismos vivos de toda la cadena trófica.

En términos energéticos, se puede utilizar directamente, como es el caso de la leña, o indirectamente en forma de los biocombustibles, de tal manera que “biomasa” debe reservarse para denominar la materia prima empleada en la fabricación de biocombustibles.

La biomasa podría proporcionar energías sustitutivas a los combustibles fósiles, gracias a agrocombustibles líquidos (como el biodiésel o el bioetanol), gaseosos (gas metano) o sólidos (leña), pero todo depende de que no se emplee más biomasa que la producción neta del ecosistema explotado, de que no se incurra en otros consumos de combustibles en los procesos de transformación, y de que la utilidad energética sea la más oportuna frente a otros usos posibles, como abono y alimento (Carpintero, 2006).

Los usos potenciales de la biomasa como fuente alternativa de energía y sus posibles esquemas tecnológicos de aprovechamiento, exigen que se profundice en el conocimiento de los aspectos específicos relacionados con su oferta, composición y potencial energético. Para Colombia, la biomasa residual en el contexto agropecuario, es la considerada como residuos agrícolas de cosecha, conformada por subproductos generados durante la recolección y transformación de los cultivos. Teniendo en cuenta la relación entre la generación de biomasa residual y el porcentaje en producción agrícola nacional, el Ministerio de Minas y Energía, seleccionó ocho cultivos como prioritarios para el Atlas del Potencial Energético de la Biomasa Residual en Colombia (arroz, maíz, banano, café, caña de azúcar, caña panelera, palma de aceite y plátano). Para el caso de café, se señalan cinco áreas productoras en el país (Centro, eje cafetero, norte, oriente y sur), en las cuales, principalmente el área norte y eje cafetero presenta una importante cantidad de municipios con una producción entre 10 mil y 46 mil Ha cosechadas al año (Figura 5). En consecuencia, estas mismas áreas reflejan la presencia de municipios con producción entre 40 mil y 120 mil toneladas de residuos del cultivo al año con un potencial energético entre los 2 mil y 10 mil TJ/año (Figura 6).

Colombia indica que la biomasa residual del sector agrícola posee altos contenidos de oxígeno e hidrógeno y bajos contenidos de carbono. El número de enlaces C-O y C-H, en la estructura molecular de la biomasa son los responsables del valor de su PCI. La biomasa agrícola tiene valores de PCI que oscilan entre 7.862,64 y 19.374,25 KJ/Kg. Aun cuando la biomasa agrícola

tiene un PCI promedio de 16.000,04 KJ/Kg, este valor es bastante más bajo que el PCI del carbón, lo cual indica que la cantidad de energía que se puede obtener de estos residuos siempre será menor que la del carbón. No obstante, posee niveles elevados de material volátil, los cuales oscilan en un rango de 41,1% a 98 %, dependiendo de la especie vegetal fuente del residuo. Según Russos y colaboradores 1989, un bajo porcentaje de cenizas y un alto contenido de material volátil, son las ventajas que tiene la biomasa sobre los combustibles fósiles como el carbón. Por lo anterior, y dado su contenido de humedad, cenizas y material volátil, un alto porcentaje de la biomasa residual agrícola de Colombia es ideal para ser aprovechada mediante procesos como pirolisis, gasificación o fermentación.

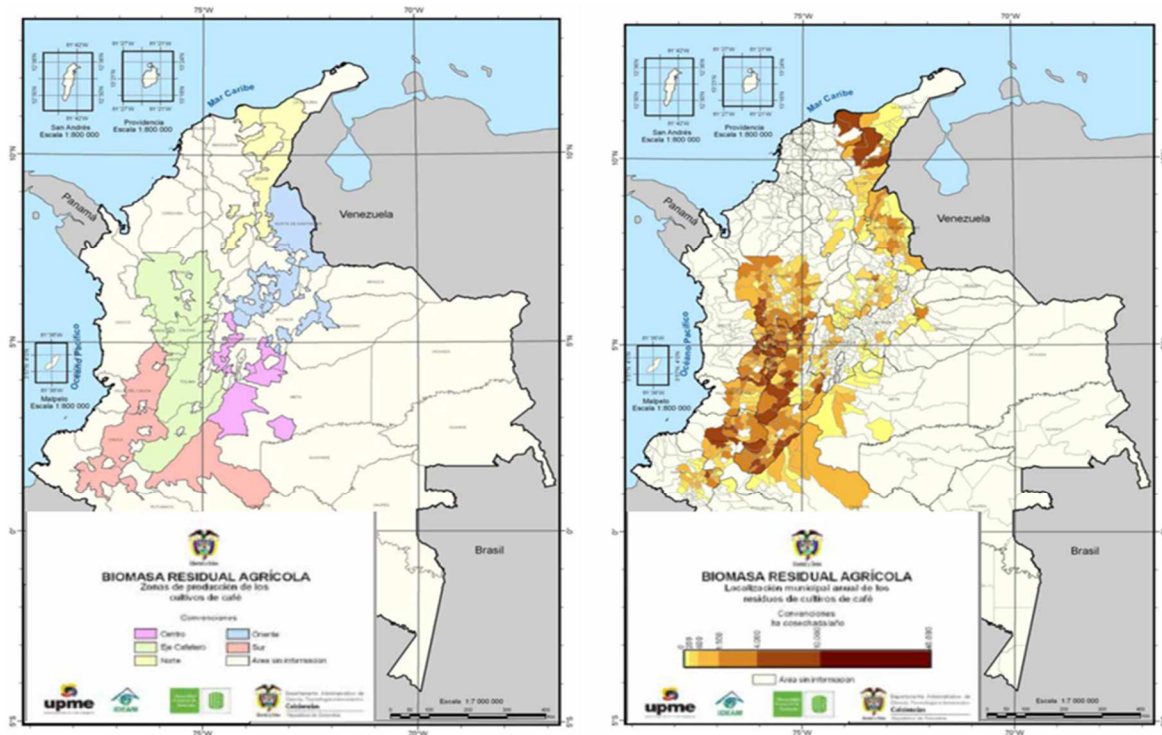


Figura 5. Mapas de biomasa residual agrícola del café. Zonas de producción del cultivo del café y localización anual de los residuos. (Fuente: UPME Atlas potencial energético de Colombia, 2010)

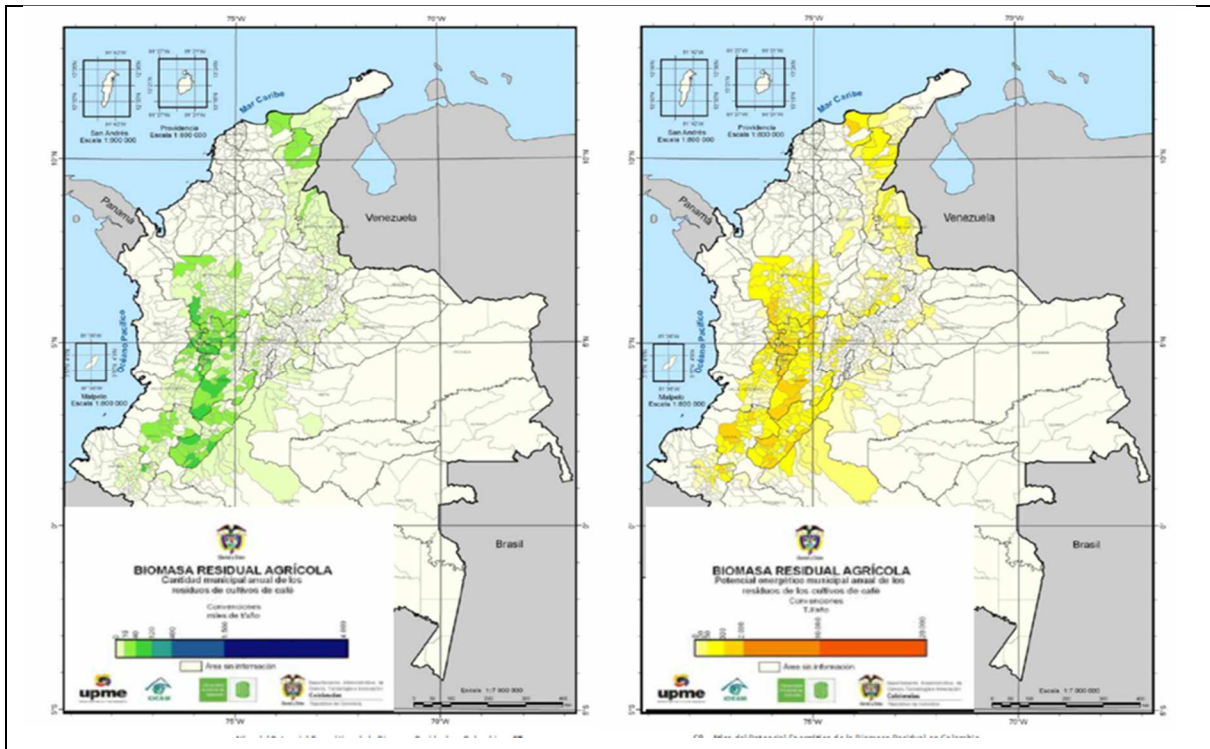


Figura 6. Mapas de biomasa residual agrícola del café. Cantidades de residuos por municipio y potencial energético de los mismos. (Fuente: UPME Atlas potencial energético de Colombia, 2010)

9.6 SUB-PRODUCTOS DEL CAFÉ

Anualmente se produce una cantidad considerable de materia orgánica representada por material vegetal en los diversos procesos de la producción agrícola, pero solo una cierta parte de esta producción es aprovechada directamente para la alimentación tanto humana como animal, dejando a la deriva una gran cantidad de mal llamados desechos los cuales se convierten en un potencial de contaminación ambiental. Generalmente estos son considerados un problema para el productor ya que no cuentan o no conocen alternativas de manejo para poder dar un uso apropiado a estos residuos.

Tales problemas son comunes en la zona cafetera de Colombia, la cual anualmente durante la época de cosecha genera una cantidad considerable de residuos, los cuales pueden ser usados de manera alternativa para disminuir el impacto ambiental.

Como se mencionó anteriormente, el beneficio del fruto puede realizarse de dos maneras, la primera de ellas es la vía húmeda que involucra el despulpado, desmucilaginado utilizando agua, secado del fruto y finalmente la eliminación de las envolturas internas por el trillado. La segunda vía, incluye la fermentación del fruto con todas sus cortezas, el secado y la eliminación de las envolturas en una única operación mecánica de trillado (Braham y Bressani, 1975). La vía húmeda es la más utilizada y el procesamiento de 100 kg de frutos de café maduros generan 20% de café trillado (oro) y el 80% restante está formado por subproductos, como pulpa fresca (40%), mucílago (20%), agua (17%) y pergamino y película plateada (3%) (Calle 1977).

Estudios realizados en Cenicafé entre 1950 y 1977, tendientes a buscar el aprovechamiento de estos subproductos, demostraron que a partir de la pulpa, el mucílago y los ripios de café pueden obtenerse, levaduras alimenticias (Calle, 1951 a), colorantes (Calle, 1955 b), abono orgánico (López y Calle, 1956), aceites (Calle, 1960), pectinas (Calle, 1962), miel de café (Valencia y Calle, 1968), alimentos para animales (Buitrago *et al.*, 1970), baterías eléctricas (Calle, 1973) entre otros.

9.6.1 LA PULPA

La pulpa como subproducto del cultivo del café, presenta una gran variedad de alternativas para ser reciclada en su totalidad, como la transformación de la misma en humus a partir del cultivo de lombrices. Su participación en la elaboración de abonos orgánicos fermentados tipo bocashi, de aboneras (composteras) y su utilidad como substrato para la reproducción biológica, principalmente de *Aspergillus oryzae*, *Bacillus megatherium* y *Saccharomyces cerevisiae*.

Suárez de Castro (1960) indica que 100 libras de pulpa de café seca equivalen, con base en su composición química, a 10 libras de fertilizante inorgánico de N-P-K en las proporciones 14 - 3-37; aquí queda reflejada la alta cantidad de potasio que contiene este subproducto para ser

utilizado como abono, especialmente en aquellos cultivos que manifiestan necesidades elevadas de este elemento, como las musáceas (banano, plátano, guineo).

Dentro de las múltiples aplicaciones de la pulpa de café, resulta muy atractivo la posibilidad de su utilización en los procesos de fermentación en estado sólido (FES) para la obtención de enriquecidos proteicos para la alimentación animal y para la producción de enzimas pectinolíticos de interés tecnológico en la industria de los alimentos y en otras agroindustrias como por ejemplo la cafetalera, específicamente en el proceso de beneficio húmedo del café para reducir los tiempos de fermentación (Antier *et al.*, 1993a; Boccas *et al.*, 1994; Bressani, 1979; Kashyap *et al.*, 2001; Loera *et al.*, 1999)

A pesar de todas estas posibilidades de utilización de la pulpa de café -en consideración a su composición y a su facilidad de degradación por microorganismos- no todas son tan factibles en la práctica, debido a que este residuo se genera solamente durante una época del año, como sustrato fresco tiene alto contenido en agua y presenta una alta posibilidad de contaminación por microorganismos, debido a la presencia de azúcares y pectinas.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, existe la posibilidad de la utilización de la pulpa de café como sustrato para la producción de los enzimas pécticos que se aplican tanto en el proceso de beneficio del café, específicamente en la etapa de fermentación del grano, como en las industrias alimentarias para procesos relacionados con la clarificación y la extracción de zumos de frutas, tratamientos enológicos, etc. (Antier *et al.*, 1993a; Kashyap *et al.*, 2001; Trejo-Hernández *et al.*, 1991).

Estos subproductos obtenidos durante el procesamiento de las cerezas de café por vía seca o vía húmeda, contienen cantidades apreciables de cafeína y taninos, con problemas de contaminación medioambiental, pero que por otro lado podrían ser objeto de recuperación. También son ricos en compuestos orgánicos naturales, que permiten utilizarlos como sustratos adecuados en procesos microbianos para la obtención de productos de alto valor añadido (Pandey *et al.*, 2000 a).

También puede ser utilizada como un sustrato eficiente para producir productos químicos y productos de alto valor añadido; etanol, proteína unicelular (SCP), enzimas, ácidos orgánicos, aminoácidos, compuestos aromáticos, hongos comestibles, metabolitos secundarios biológicamente activos. etc. (Pandey et al., 2000b y Pandey et al., 2000a).

De sus primeros usos como sustrato, tenemos la producción de enzimas como tanasas, pectinasas, cafeinasas, etc. (Antier *et al.*, 1993a). Ejemplo de ello es la producción de tanasa por fermentación en estado sólido utilizando una cepa de *Lactobacillus*. Este enzima despolimeriza los taninos a ácido gálico, que luego es descarboxilado en el rumen (Sabu *et al.*, 2006); la obtención de pectinasas por diferentes cepas de *Aspergillus niger* mediante FES (Antier et al., 1993b; Antier et al., 1993a; Loera *et al.*, 1999; Roussos *et al.*, 1995) la producción del enzima ácido clorogénico-hidrolasa a partir de una cepa de *Aspergillus niger*, que utiliza la pulpa como sustrato natural por ser especialmente rica en ácido clorogénico. Este enzima permite la liberación del ácido caféico, que posee propiedades antioxidantes (Asther et al., 2005).

Otras aplicaciones de la pulpa está en la obtención de compuestos aromáticos; acetaldehído, etil-acetato, propil-acetato entre otros, empleando una cepa del hongo *Ceratocystis fimbriata* o una cepa de la levadura *Pachysolen tannophilus* y utilizando la FES (Pedroni- Medeiros *et al.*, 2003). La producción de ácidos orgánicos como ácido cítrico y ácido giberélico: obtención de ácido cítrico por FES utilizando una cepa de *Aspergillus* sp. y obtención de giberelina, hormona vegetal, utilizando la pulpa como fuente de carbono y cepas de *Gibberella fujikuroi*. Producción de alcohol etílico, ácido acético, etc. (Marco-Méndez, 1981).

La pulpa también se utiliza como fertilizante, específicamente como abono orgánico, promoviendo su descomposición natural, lo que permite que pueda ser reutilizada nuevamente en los propios cultivos de café (Aranda, 1991); como combustible directo o para la producción de biogas mediante digestión anaeróbica, estimándose una producción por tonelada de pulpa en torno a 131 m³ de biogas, lo que puede ser equivalente a 100 litros de petróleo en valor como combustible (Bello-Mendoza y Sánchez, 1997; Calzada, 1990) y para forrajes (Tapia *et al.*, 1990).

Otras aplicaciones de interés son como fuente potencial de antocianos, colorante natural en elaborados de alimentos (Prata y Oliveira, 2006) y como aditivo de alimentos en acuicultura, en concreto de tilapias, criadas tanto en acuarios como en estanques (Ulloa-Rojas *et al.*, 2004; Ulloa-Rojas y Verreth, 2003).

En relación con la posibilidad de ser aplicada en alimentación animal Pandey y colaboradores (2000), hacen referencia a la presencia en la pulpa de un 50 % de carbohidratos, 10 % de proteínas, 18 % de fibra y un 2,5 % de grasa, por lo que se utiliza como suplemento en la alimentación de ganado. En este sentido reviste, por tanto, una particular importancia la biodegradación de los compuestos tóxicos presentes en ella, como la cafeína y los polifenoles, además de los taninos que son compuestos antinutricionales. Esto limita su uso como aditivo, por ejemplo, en la alimentación de las cabras y de otros rumiantes y animales monogástricos, porque la digestibilidad de la proteína es baja y hay retención de nitrógeno (Pandey *et al.*, 2000c).

Este proceso de detoxificación biológica de la pulpa de café se puede realizar utilizando FES y por diferentes géneros de hongos filamentosos como *Rhizopus* spp. y *Penicillium* spp. algunas bacterias como *Pseudomonas* spp., y *Bacillus* spp., y hongos superiores como *Pleurotus* spp., que tienen la capacidad de degradar la cafeína y los taninos presentes en la pulpa, mejorando así su valor nutricional y, facilitando su utilización como alimento animal (Brand *et al.*, 2000). Considerando lo anterior, varios investigadores han trabajado en esta dirección, detoxificando la pulpa mediante el empleo de hongos filamentosos capaces de utilizar la cafeína como única fuente de nitrógeno. (Pandey *et al.*, 2000b; Roussos *et al.*, 1995; Favela *et al.*, 1989).

Otros trabajos están relacionados con tratamientos biológicos y/o químicos para mejorar su valor nutricional, al reducir su contenido en celulosa y así, por ejemplo, tenemos la descomposición aerobia durante los procesos de ensilado o la inoculación con bacterias aeróbicas como *Bacillus* sp. etc. (Ulloa-Rojas *et al.*, 2002). La degradación bacteriana después de 21 días, aumenta la calidad nutricional de la pulpa mucho más que utilizando el ensilado y permite disminuir los factores antinutricionales debido a fenoles, cafeína y taninos. El empleo

de otras cepas de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma*, muestran una mayor capacidad para degradar la cafeína de la pulpa de café (Pandey *et al.*, 2000a; Brand *et al.*, 2000; Roussos *et al.*, 1995; Aquiahuatl *et al.*, 1988).

En este caso, tanto el cultivo de estos, como de otros microorganismos permiten aumentar simultáneamente el valor nutritivo de la pulpa de café -o sea, propiciar su enriquecimiento proteico- para su posterior utilización en la alimentación animal y eliminar la cafeína y otros componentes tóxicos y antifisiológicos presentes en la pulpa.

Otros trabajos (Favela, 1989; Ulloa-Rojas *et al.*, 2003) destacan algunas cepas de hongos filamentosos que degradan hasta un 95 % la cafeína -utilizada como única fuente de nitrógeno- y con cepas mejoradas de tales microorganismos se logra incrementar la capacidad de producir pectinasas.

El cultivo de hongos comestibles resulta especialmente atractivo y es ejemplo claro de las técnicas de biotransformación. Supone una conversión directa de un material residual agrícola en un alimento para el hombre. En este proceso se utilizan hongos comestibles como los *Pleurotus* spp., evaluados por su actividad comercial e importantes por su eficiencia biológica (Salmone *et al.*, 2005).

9.6.2 EL MUCÍLAGO

Por su alto contenido en diferentes tipos de azúcares, este subproducto es un excelente medio para la elaboración de biofertilizantes enriquecidos con minerales, y así llegar a ser utilizado en los cultivos del propio café y del plátano. En la preparación del abono orgánico tipo bocashi, se recomienda usar el mucílago o aguas mieles directamente, sustituyendo al máximo volumen de agua que se desee. El mucílago es un buen sustrato para el crecimiento de hongos, bacterias y otros microorganismos benéficos y deseables para la recuperación de la vida en los suelos que se encuentran agotados por el maltrato provocado por algunas de las prácticas utilizadas en la agricultura convencional.

Se han desarrollado varios estudios sobre los posibles usos del mucílago de café como materia prima en la producción de etanol, pectinas, alimentación animal, entre (Arias y Ruíz, 2001; Rodríguez y Zambrazo, 2010) y también se encuentran algunas publicaciones sobre la composición química de este subproducto (Elias, 1978; Arias y Ruíz, 2001).

Las fermentaciones son procesos bioquímicos realizados por levaduras, bacterias y enzimas, que degradan principalmente los azúcares de los sustratos (Schlegel, 1979; Roussos *et al.*, 1997). El mucílago de café está compuesto esencialmente por agua, azúcares y sustancias pécticas (Martínez, 1959; Rolz *et al.*, 1971; Menchu y Rolz, 1973; Elias, 1978) y contiene principalmente levaduras de los géneros *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Candida* y *Rhodotorula*, así como bacterias lácticas *Lactobacillus* y *Streptococcus*, y otras bacterias y hongos (Pee y Castelein, 1971, 1972; Puerta *et al.*, 1996; Arias y Ruíz, 2001; Avallone *at al.*, 2001). El recuento y tipos de microorganismos en la fermentación del café dependen de los contenidos en la cereza y mucílago y de las condiciones ambientales, como la temperatura y gases, entre otros (Schlegel, 1979; Puerta 2006, 2010).

Por su composición microbiana y química, el mucílago se fermenta en forma natural en las condiciones ambientales de las zonas cafeteras que presentan temperaturas que pueden variar entre el día y la noche de 12 a 34°C. La velocidad de estas degradaciones depende del sistema de fermentación y la temperatura externa también influye en el desarrollo y metabolismo de los microorganismos.

En los procesos fermentativos del beneficio del café, el hidrogeno es producido debido a la degradación de los azúcares por bacterias del grupo de los coliformes, *Escherichia coli* que metaboliza la glucosa en presencia de una mezcla ácida y a pH 7,8 mientras que, *Aerobacter aerogenes* se percibe por un bajo rendimiento de la mezcla ácida, particularmente del ácido láctico debido a que el ácido piruvico se convierte en acetilmetil-carbinol o butanodiol.

El factor más importante en la fermentación natural del café son los enzimas extracelulares producidos por microorganismos. La presencia en el mucilago de azúcares simples, polisacáridos, minerales, proteínas y lípidos, lo hacen un medio apropiado para el crecimiento microbiano.

Entre las bacterias presentes en la fermentación del café tenemos las bacterias del género *Leuconostoc* y *Lactobacillus* -productoras de ácido láctico-, bacterias coliformes –donde destacan las especies del género *Aerobacter* y *Escherichia*, especies pectinolíticas del género *Bacillus* y alguna variedad de hongo filamentoso pectinolítico (Masoud y Jespersen, 2006).

Una sucesión microbiana incluye a miembros de las Enterobacteriaceas, especies de *Enterococcus* y bacterias ácido-lácticas que están involucradas en la bajada del pH hasta cerca de 4,3, lo que tiende a inhibir la actividad de las enzimas pectinolíticas. Esto previene el crecimiento de muy diversos microorganismos contaminantes, cuyo crecimiento extensivo provoca el desarrollo de sabores indeseables.

En cuanto a las levaduras, se han encontrado algunas especies con la habilidad de degradar la pectina, gracias a que poseen pectinasas que son segregadas durante la fermentación del café, como por ejemplo *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* y *Schizosaccharomyces* sp, que han sido aisladas del café robusta fermentado en la India. Las enzimas de hongos son las más conocidas en la degradación del mucilago, así por ejemplo encontramos hongos del género *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* que han sido aisladas del café despulpado (Mahmoud y Jespersen, 2006).

9.7 BIO-ALCOHOLES

Los procesos fermentativos son la etapa más importante de un proceso de producción de un metabolito de alto valor agregado para ser usado en la gama de biocombustibles. En esta etapa, tres factores preponderantes han de ser considerados para garantizar la obtención de altos

rendimientos de producto y estos son: el sustrato, las condiciones de operación y el microorganismo fermentador.

9.7.1 METANOL.

El metanol es el alcohol más sencillo. Es un líquido incoloro, inflamable y tóxico. Su fórmula es CH_3OH . Se puede producir a partir de diversas fuentes: gas natural, carbón, madera, gas sintético (monóxido de carbono e hidrógeno), aunque actualmente casi el 70% de la producción procede del gas natural. Sin embargo, solo el que es procedente de materiales orgánicos y biomasa es denominado biometanol. Al igual que el etanol, se puede emplear como carburante, solo o en combinación con gasolina.

Actualmente hay varias rutas tecnológicas para la producción de biometanol, siendo la más común la destilación de los productos líquidos obtenidos a partir de madera y carbón, gas natural y petróleo. Con la disminución de la disponibilidad de los recursos energéticos fósiles, así como la creciente preocupación de la sociedad con la concentración atmosférica de gases de efecto invernadero, viene el desarrollo de métodos alternativos de obtención de diversos productos. El típico proceso de obtención de biometanol es a partir de biomasa lignocelulósica (Hamelinck & Faaij, 2002).

El bio-metanol se puede hacer de dos maneras:

1. *Síntesis de metanol en fase gaseosa*
2. *Síntesis de metanol en fase líquida*

En reactores de fase gaseosa, se intercambia calor entre el catalizador sólido de fase y los reactivos y productos en la fase de gas, y en los reactores de fase líquida el intercambio de calor entre los reactivos, el catalizador y producto se hace en suspensión en el proceso de líquido de intercambio de calor que es más eficiente (Hamelinck & Faaij, 2002).

9.7.2 ETANOL.

La fermentación alcohólica comprende toda una serie de reacciones bioquímicas a través de las cuales algunos microorganismos, por medio de un conjunto de enzimas producidas por ellos (o añadidas artificialmente), realizan una transformación de azúcares para convertirlos en etanol, dióxido de carbono y energía (Carpinteriro, 2006). La fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico exotérmico el cual libera moléculas de ATP, las cuales son necesarias para el funcionamiento metabólico de las levaduras. Debido a que el proceso es anaeróbico, la respiración celular de la cadena del ADP en ATP queda completamente bloqueada, siendo la única fuente de energía para las levaduras la glicólisis, la cual produce moléculas de ATP mediante la fosforilación a nivel de sustrato. En el balance total energético se generan 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa.



Tradicionalmente, los microorganismos más empleados en la obtención de etanol son las levaduras, aunque existen varios tipos de bacterias y hongos que también son capaces de sintetizarlo en cantidades considerables. La fermentación alcohólica se realiza en ausencia de oxígeno, excepto durante el tiempo de inoculación, durante el cual se insufla una pequeña cantidad para permitir un crecimiento limitado de los microorganismos para que estos superen su fase de latencia y entren en la fermentación ya en la fase exponencial (Vázquez y Dacosta, 2007).

En el caso de las levaduras, cuando éstas toman el azúcar del medio, se inicia toda una serie de reacciones intermedias, conocidas como la ruta glicolítica o ruta Embden-Meyerhof. A través de este proceso bioquímico, las levaduras rompen los azúcares en energía, intermediarios útiles para el crecimiento de las células, y una gran cantidad de productos finales (etanol, dióxido de carbono y calor), los cuales son excretados por las mismas. Sin embargo, existen otros microorganismos que siguen otras rutas metabólicas distintas durante la fermentación

alcohólica. Muchas bacterias, como *Zymomonas mobilis*, las cuales transforman los azúcares a partir de la ruta de Entner-Doudoroff, la cual, por sus características, obliga al microorganismo a producir menos biomasa (comparado con las levaduras) y canalizar más carbono hacia los productos finales. Las levaduras requieren que la glucosa sea catabolizada mediante la glucolisis o ruta de Embden-Meyerhof, para obtener el piruvato el cual posteriormente por la acción de enzimas específicas, se convierte anaeróticamente en etanol y dióxido de carbono (Madigan, *et al.*, 1998). La glicolisis es una ruta catabólica en la cual la glucosa es convertida a dos moléculas de piruvato, las cuales, en condiciones anaerobias, son transformadas, por acción de la acetil coenzima A, en acetaldehído y, posteriormente, con ayuda de la alcohol deshidrogenasa, se obtiene el etanol (Figura 7).

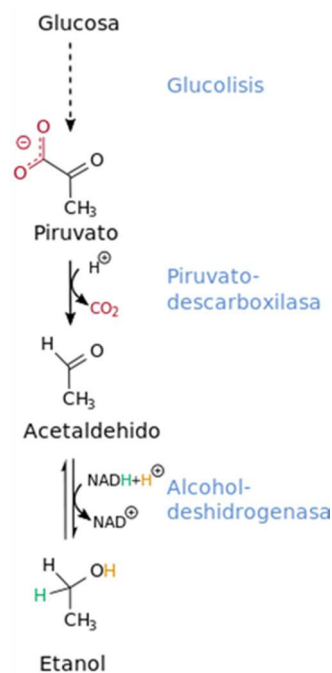


Figura 7. Ruta catabólica de un azúcar reductor hasta la producción de etanol. Fermentación alcohólica.

9.7.3 BUTANOL.

El alcohol butílico o 1-butanol es un alcohol primario constituido por 4 carbonos cuya fórmula es $C_4H_{10}O$; es un líquido incoloro, flamable, con un olor característico, su vapor irrita las membranas mucosas produciendo un efecto narcótico a altas concentraciones. El butanol es miscible en solventes orgánicos comunes y parcialmente miscible en agua. Hasta hoy, el butanol es considerado una mejor alternativa que el etanol como biocombustible ya que es menos corrosivo y menos soluble en agua que el etanol, siendo un combustible más adecuado para las máquinas de combustión interna utilizadas actualmente en los automóviles (Ezeji *et al.*, 2007). Aunque el primer reporte que existe en la literatura sobre la producción biológica del 1- butanol fue escrito por Louis Pasteur en 1862, es hasta 1915 con la patente de Chaim Weizmann donde se describe una idea clara del proceso de fermentación butílica. Apenas 35 años después, en 1950, el 66% del butanol utilizado en el mundo provenía de procesos fermentativos. En años posteriores la industria petroquímica tomaría casi la totalidad del mercado del butanol produciéndolo industrialmente mediante la reacción oxo del propileno, con el intermediario butiraldehído. La producción biológica del butanol ocurre naturalmente en algunas especies de microorganismos, como las bacterias *Butyribacterium methylotrophicum*, *Clostridium butyricum* o la arquea *Hyperthermus butylicus*. Sin embargo, el género más estudiado es el de *Clostridium* ya que son capaces de convertir diversas fuentes de carbono, como la glucosa, galactosa, celobiosa, manosa, xilosa y arabinosa, en combustibles y químicos como el butanol, acetona y etanol (Ezeji *et al.*, 2007). Sin embargo, la presencia de butanol, así como la acetona y etanol en los microorganismos resulta ser tóxica, lo cual limita su concentración en el medio de cultivo, originando bajos rendimientos y un alto costo durante su recuperación en las soluciones diluidas. En el caso de *Clostridium* su metabolismo se detiene cuando la presencia de solventes alcanza una concentración de 20 g/L, lo cual limita la concentración de fuentes de carbono que pueden ser utilizados en la fermentación, ocasionando una baja productividad y baja concentración de productos. Concentraciones de alrededor de 0,1 M de butanol generan un 50% de inhibición del crecimiento celular y consumo de azúcares. El butanol es más tóxico que otros solventes, ya que éste desestabiliza la membrana e interrumpe funciones asociadas a la membrana, tales como procesos de transporte, incluyendo el transporte de azúcares, entre otras (Lee *et al.*, 2008).

En años recientes y en ciertos países como China, ha resurgido el interés en la producción fermentativa como una alternativa al uso de combustibles fósiles (Ni & Sun, 2009). Desde hace una década, varios investigadores han tratado de desarrollar cepas hiperproductoras de butanol, apoyándose con las herramientas de biología molecular, ingeniería de vías metabólicas, así como en la optimización del proceso de fermentación mediante la producción y extracción simultánea de butanol.

Las cepas más usadas para la fermentación industrial butírica son principalmente del género *Clostridium*. Una vez que los azúcares son metabolizados a piruvato, la fermentación a butanol en *Clostridium* es catalizada por diversas enzimas: una acetato/butirato CoA transferasa, varias deshidrogenasas y una acetato descarboxilasa (Figura 8).

Durante el proceso de producción de butanol con *Clostridium* se presenta, entre otros, un cambio fisiológico importante en la bacteria: los ácidos acético y butírico son liberados al medio durante la fase de crecimiento exponencial los cuales son reabsorbidos al interior de la célula, para ser metabolizados a butanol, acetona y, en mucho menor medida en etanol. Esto se debe a que carece de homeostasis al nivel de pH, por lo que depende íntimamente del pH extracelular. La presencia de ácidos en el medio puede provocar una pérdida del potencial protónico de la célula, inactivándola. El pH es muy importante durante la fermentación acetona-butanol, ya que la solventogénesis inicia con un pH bajo; sin embargo si éste se encuentra por debajo de 4.5 (antes de que se forme una cantidad suficiente de ácidos orgánicos), la solventogénesis será disminuida e improductiva. Una forma sencilla de incrementar el crecimiento, utilización de los carbohidratos así como la producción de butanol es incrementando la capacidad amortiguante del medio. Dependiendo de las condiciones de cultivo y el tipo de sustrato empleado, las fermentaciones tipo lote toman de 2 a 6 días en completarse, la concentración final total de solventes producidos alcanza de 12 a 20 g/L, los cuales pueden ser separados por destilación del medio de fermentación (Lee *et al.*, 2008).

El hierro es un importante componente en la dieta de *Clostridium*, ya que se requiere de una profusa producción de ferredoxina en la conversión de piruvato en acetil-CoA. También se ha

demostrado que en condiciones limitantes de fosfato es posible prevenir la pérdida del plásmido pSOL1 que, como se mencionó anteriormente, es necesario para la síntesis fermentativa de butanol en cepas silvestres (Lee *et al.*, 2008).

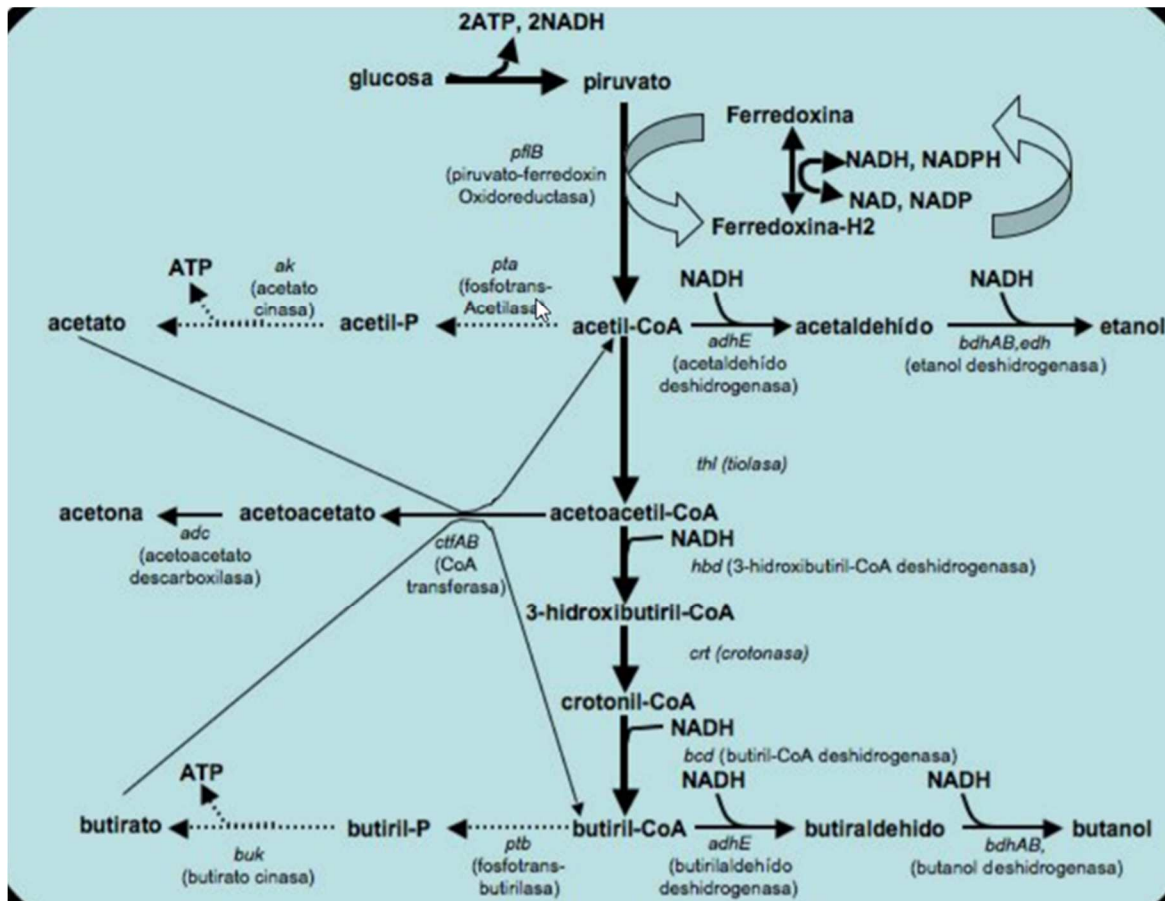


Figura 8. Vía metabólica de producción de butanol en *Clostridium* spp. (Fuente: Lee *et al.*, 2008)

Los clostridios se reconocen como productores naturales de butanol y se emplean en la producción a escala industrial. Para la producción del isobutanol, la vía metabólica corresponde al paso de acetoacetyl-CoA, acetoacetato, y con la intervención de un coctel enzimático, a la obtención de isobutanol (Figura 9) sin quedar en acetona como producto intermedio (Dong *et al.*, 2012). Sin embargo, las complejas características metabólicas y la dificultad de realizar manipulaciones genéticas sobre estas bacterias fomentaron la explotación de otras fábricas de células bien establecidas.

En el 2008, Lee y colaboradores, plantearon que las proteínas y por tanto los aminoácidos liberados de la hidrólisis de las proteínas, puedan utilizarse como materia prima para la para la producción de biocombustibles. De hecho, generaron la estrategia que aprovecha los cetoácidos como intermediarios en la biosíntesis de aminoácidos y el metabolismo de la degradación para producir alcoholes con *S. cerevisiae*, encontrando que la vía hacia el isocetovalerato es prometedor para la producción de isobutanol (figura 10).

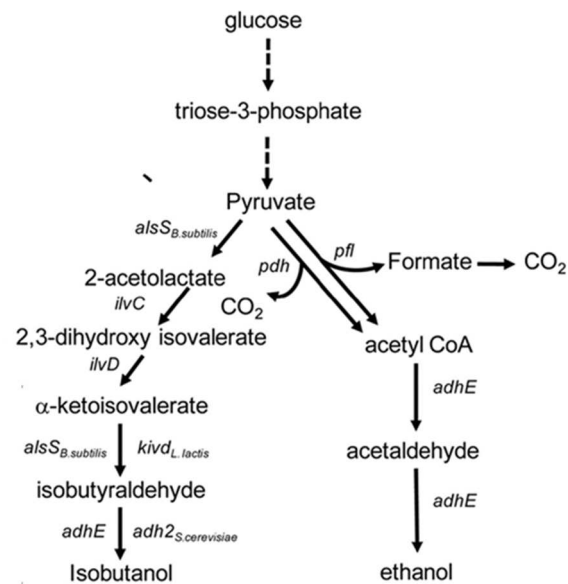


Figura 9. Vía de isovalerato para la producción de isobutanol. (Fuente: Lee *et al.*, 2008)

destacando sus ventajas y desventajas y dependiendo del insumo o tecnología empleada para producirlos, se clasifican en cuatro generaciones (Guo *et al.*, 2015).

Biocombustible		Ventajas	Desventajas	Producción anual
Sólidos	Leña	Renovable, fácilmente disponible, barato, mayor eficiencia energética.	Voluminoso, baja densidad de energía; las emisiones son altamente peligrosas procedentes de la combustión incompleta; inadecuado para quemadores automatizados	17 X 10 ⁸ m ³
	Chips de madera	Más convenientes para el manejo, transporte y almacenamiento que la leña; bajas emisiones de SO ₂ y NO _x que durante la combustión de carbón	Implica costos para el astillado; tiende a deteriorarse durante el almacenamiento; en comparación con el carbón es más voluminoso y menor densidad de energía; escoria en ceniza y ensuciamiento de la caldera; inadecuado para la combustión precisa/completa	3,5 X 10 ⁸ t
	Pellets de madera	Convenientes para el manejo, transporte y almacenamiento; bajas emisiones de SO ₂ y NO _x ; adecuadas para combustión completa	Altos costos de procesamiento; menor contenido de energía que el carbón; solo es utilizado en los quemadores de combustible sólido	20 x 10 ⁶ t
	Carbón	De estable y alto contenido energético, combustión limpia	Altos costos de producción; mayor almacenamiento inconveniente para transporte; no puede ser utilizado en quemadores de combustible y de gas	51 x 10 ⁶ t
Líquidos	Etanol de maíz / caña de azúcar	Substituto renovable para la gasolina; combustión con bajas emisiones; sistemas de producción de materia prima existentes	Baja eficiencia neta de energía; corrosivo para los dispositivos de abastecimiento de combustible existentes; compite en la producción de materiales base para la alimentación	23 x 10 ⁹ gal.

Tabla 2. Ventajas y desventajas y producción en 2013 de diferentes biocombustibles
(Fuente: Guo *et al.*, 2015)

Biocombustible		Ventajas	Desventajas	Producción anual
	Etanol celulósico	Una alternativa a la gasolina a partir de biomasa no alimentaria	Baja eficiencia neta de energía; no es económicamente rentable.	$< 5 \times 10^6$ gal.
	Biodiesel	Sustituto renovable para el diésel fósil; sistemas de producción de materia prima existentes	Compite por la producción de alimentos; la materia prima se limita a lípidos; corrosivo para los dispositivos existentes; sustancial costo de procesamiento	63×10^8 gal.
	Pirolisis bio-aceite	Materias primas renovables; tecnología de conversión sencilla	Tecnología inmadura, es necesaria mejora e implementación antes de su uso como combustibles	$< 1 \times 10^6$ gal. Producción piloto
	Biocombustibles “drop-in”	Materias primas renovables; sustituto de la gasolina; compatible con los sistemas de abastecimiento de combustible existentes	Tecnología de conversión inmadura y complicada; altos costos	Estado de desarrollo incipiente
Gaseosos	Biogás	A partir de residuos orgánicos, abundantes fuentes de materia prima; se ajusta a la red de gas natural existente.	Uso común en áreas rurales; requiere de gran cantidad de materia prima y correcta eliminación de residuos	$\sim 25 \times 10^9$ m ³ CH ₄
	Gas de síntesis	Tecnología de producción madura; como materia prima para productos químicos industriales	Carboncillo y bio-aceite como subproductos; estrictos requisitos de materia prima	$4,5 \times 10^{11}$ m ³
	Gas de síntesis	Tecnología de producción madura; como materia prima para productos químicos industriales	Carboncillo y bio-aceite como subproductos; estrictos requisitos de materia prima	$4,5 \times 10^{11}$ m ³

9.8.1 EL CAFÉ Y LOS BIO-COMBUSTIBLES.

En cuanto a la obtención de biocombustibles y particularmente con el objeto de indagar sobre alternativas viables que permitan mezclar la gasolina derivada de petróleo, resultados de experimentos desarrollados en Cenicafé cobran relevancia ante esta posibilidad. Calle en 1951(b), encontró que de 100 Kg de café cereza se pueden obtener 6% de melaza, por extracción y concentración del jugo de la pulpa y del mucílago, con un contenido del 35% de azúcares totales. Por fermentación alcohólica obtuvo, en promedio, 1,2 L de alcohol etílico de 85°/100 kg de café cereza y más recientemente, Rodríguez y Zambrano en 2010, reportan producciones promedio de etanol de 25,2 mL, a partir de 1 kg de pulpa fresca con un contenido de etanol del 98,19% y para el mucílago los resultados de los experimentos permiten estimar una producción aproximada de 58 mL con un contenido de 98,6% de etanol (Rodríguez y Zambrano 2011).

Para el caso del bio-butanol, no obstante que presenta una volatilidad más baja que el etanol (su presión de vapor es 7,5 veces menor que la del etanol), tiene un contenido energético similar al de la gasolina y es menos higroscópico y corrosivo (Lee *et al.*,2008), no se han realizado investigaciones que evidencien el potencial de estos subproductos, por lo que resulta de importancia estratégica abordar éste tema.

9.8.2 BIORREFINERÍAS - CENTRALES DE BENEFICIO

Como se mencionó anteriormente, la no inclusión de una estrategia que reúna las ventajas de los desarrollos de las tres primeras generaciones de biocombustibles, y que permita articular con los avances en la biotecnología, deriva solamente en la cuarta generación de biocombustibles. Esta estrategia articuladora es el desarrollo de Biorrefinerías.

Un ejemplo de la aplicación de este concepto, se presenta para uno de los productos agrícolas de importancia en la economía del país. El café, crucial para la economía de muchos países debido a su cultivo, procesamiento, comercialización y mercadeo, proporciona empleo a millones de personas en el mundo. En los países productores de café, una mejor tecnología

para el tratamiento de las significativas cantidades de subproductos del café es fundamental para evitar daño ecológico debido principalmente a su incorrecta disposición en fuentes de agua o suelo. En trabajos adelantados por Hughes y colaboradores en 2014, se proponen una etapa inicial de bioconversión en la que participa un mutante irradiado de la levadura *Kluyveromyces marxianus* para producir bioetanol a partir de azúcares. Los residuos de esta fermentación, principalmente proteínas y azúcares agotados se utilizaron en una segunda etapa conducida por la levadura oleaginosa *Yarrowia lipolytica* en donde se degrada aún más este sustrato por la acción de proteasas, para producir amoníaco que sirviera como base para la producción de biofertilizantes, péptidos y aminoácidos libres para la alimentación animal. Los residuos de esta segunda etapa, se enriquecieron con fracciones molidas lignocelulósicas provenientes de troncos de café y borra tratadas previamente por medio de hidrólisis enzimática para liberar azúcares, mezcla que serviría como sustrato para el desarrollo de una levadura recombinante *Saccharomyces cerevisiae*, con capacidad también de expresar productos peptídicos valiosos (Hughes *et al.*, 2013 y 2015).

Las proteínas y sólidos residuales de lignina de esta tercera etapa, se sometieron a choque térmico y se llevaron a un fermentador para una cuarta etapa de fermentación en donde *Rhodotorula glutinis* convierte el metano en intermediarios isoprenoides. Los residuos de esta cuarta etapa, se pueden combinar con otros y transfieren a pyrocracking y reacciones de hidroformilación para convertir amoníaco, proteínas, isoprenos, ligninas, y aceites en gas renovable (Figura 11). Cualquier residuo restante se puede termoconvertir en biocarbón como un potenciador del humus del suelo. Es de esta forma como se presentan resultados que comprueban que es posible la integración de múltiples tecnologías de conversión bioquímicos y termoquímicos para el tratamiento de los residuos de café, con potencial de contribuir a la sostenibilidad económica y ambiental de un producto agrícola como el café (Hughes *et al.*, 2014).

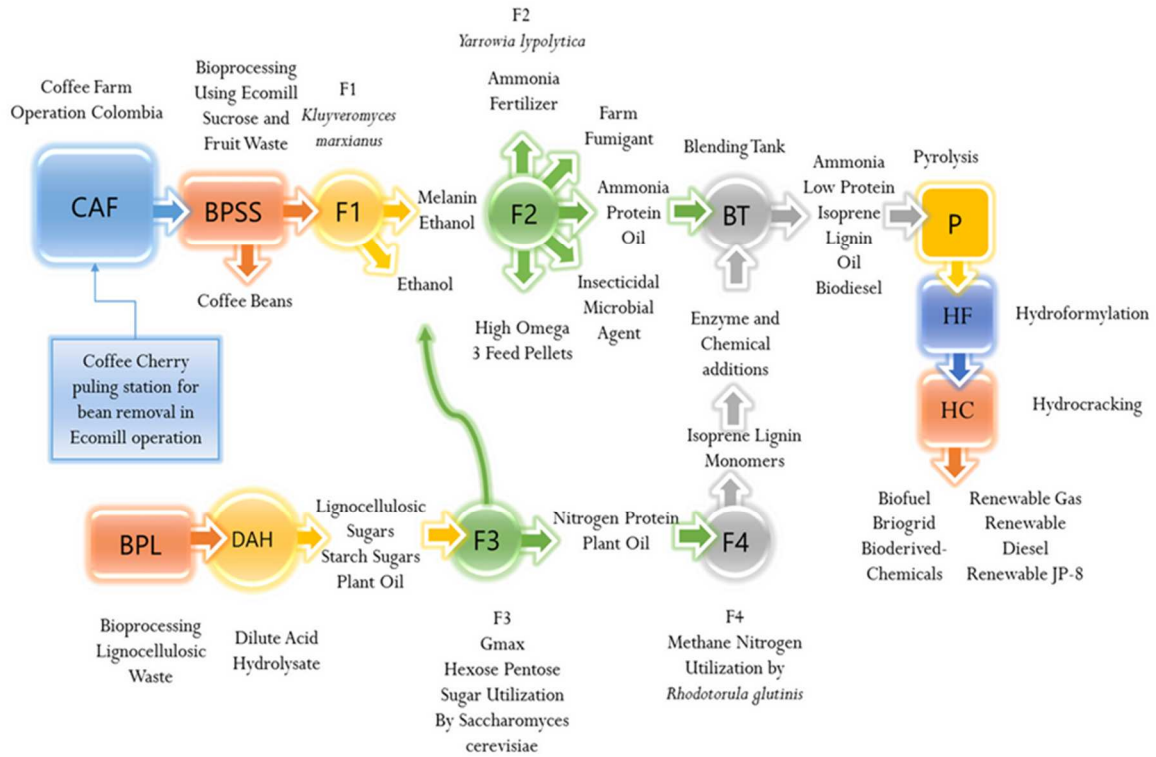


Figura 11. Modelo de biorefinería para el aprovechamiento de subproductos de café. (Fuente: Hughes *et al.*, 2014)

Aunque en mayor o menor grado y dependiendo del entorno social y cultural de las comunidades en donde se instalen estas biorrefinerías, desafortunadamente, y en términos generales, sus diseños están basados en principios ingenieriles y las valoraciones se basan en perspectivas netamente económicas. Esta situación dificulta la adopción de tecnologías, tornando la inversión de recursos económicos estériles en cuanto la adopción masiva por los agricultores. Más aún, si las valoraciones desconocen componentes ambientales y sociales y su interacción, centrándose en rendimientos netamente económicos, no tendrán éxito alguno.

9.9 IMPACTO AMBIENTAL

9.9.1 DE LOS DESECHOS DE CAFÉ

La preocupación cada vez más explícita y creciente en todo el mundo, sobre el impacto ambiental de los residuos agrícolas provenientes de procesos agrícolas, ganaderos o del

desarrollo urbano principalmente, hace que los esfuerzos se concreten dentro del marco de la sostenibilidad. Es así como el concepto de biorrefinería cobra valor como alternativa de una plataforma que adiciona a la cadena productiva un valor adicional, con el aprovechamiento de las múltiples fuentes de residuos, reduce los costos operativos, implementa de forma eficiente el uso del agua, la reutilización del CO₂ o presenta alternativas de co-generación. Esta concepción busca integrar indicadores de sostenibilidad como la energía final utilizada y el costo total de producción (Sánchez *et al.*, 2015).

El consumo mundial de café para el 2015, se estimó en 152,1 millones de sacos de 60 Kg, caracterizándose por un aumento sostenido durante los últimos cinco años del 2% (OIC, 2016). En Colombia la producción de café fue cercana de 14,2 millones de sacos de 60 Kg (FNC, 2017) provenientes de 931.746 Ha. Durante el proceso de cultivo, beneficio e industrialización del café, se genera una gran cantidad de residuos o subproductos sólidos y líquidos, siendo la pulpa y mucílago, los dos principales subproductos. La producción media de pulpa es de 2,25 toneladas frescas/ha-año y la de mucílago de 768 kg frescos/ha-año (Rodríguez, 2009).

De esta forma, se puede calcular que por cada millón de sacos de 60 kg de café almendra que Colombia exporta, se generan aproximadamente 162.900 toneladas de pulpa fresca y 55.500 toneladas de mucílago fresco, cantidades que si no se les da un correcto uso producen una contaminación superior a la generada durante un año, en excretas y orina, por una población equivalente a la de La Sultana – El Popal (Manizales), en la que tan solo 270 viviendas generan un caudal de agua residual doméstico de 2.2 L/s y en promedio cada uno de sus habitantes aporta 88g DQO / hab – día (CORPOCALDAS, Aguas de Manizales, 2013).

9.9.2 DE LOS BIOCOMBUSTIBLES DE PRIMERA Y SEGUNDA GENERACIÓN

Existen grandes preocupaciones sobre el posible impacto negativo que el uso de biomasa para la producción de combustibles puede tener sobre la seguridad alimentaria, pues este nuevo uso que se le puede dar a los commodities agrícolas introduce un nuevo determinante en el mercado de alimentos que puede afectar tanto su disponibilidad como su precio. De igual manera, el impacto que los biocombustibles pueden tener sobre el medio ambiente es una fuente de preocupación y se puede convertir en un obstáculo para su desarrollo. Existen varias controversias sobre los beneficios y costos de la producción y consumo de biocombustibles en el mundo. Las dos mayores críticas a los biocombustibles son la presión que su producción puede hacer sobre el uso de suelo, incentivando la deforestación y aumentando el precio de los alimentos, y el alto nivel de emisiones ligados a su producción. Por ejemplo, la producción de etanol a partir de maíz puede generar altas cantidades de GEI a través del uso de tractores, fertilizantes y plantas de procesamiento. De igual manera, el biodiesel fabricado con palma de aceite puede tener una gran huella de carbono, así como consecuencias muy negativas para la biodiversidad si se deforesta bosque tropical para las plantaciones de palma. En particular deben ser tenidos en cuenta temas asociados al balance energético (ciclo de vida), las emisiones locales y globales y la expansión de la frontera agrícola, los cambios de uso de suelo y los impactos que esto tiene sobre la biodiversidad y la calidad del suelo y de los recursos hídricos (García y Calderón, 2012).

A nivel internacional, especialmente en Europa (Stehfest *et al*, 2009), se ha discutido ampliamente el impacto de los biocombustibles en la biodiversidad. Este impacto se da por el cambio de uso de suelo asociado con la producción de biocombustibles. En la medida en que se pierden ecosistemas complejos como selvas o bosques para sembrar monocultivos, las pérdidas de biodiversidad son enormes y difícilmente justificables por los posibles beneficios de los biocombustibles. La base de todo ecosistema es la diversidad. Los monocultivos por definición no tienen diversidad vegetal, y por ende, disminuye la diversidad animal. Al desaparecer predadores naturales, se propagan con más facilidad plagas que deben ser controladas con pesticidas que contaminan el suelo, el agua y el aire. Por otra parte, el daño a los suelos es considerable al no haber rotación en el monocultivo. Se agotan los nutrientes del

mismo y es necesario remplazarlos con fertilizantes químicos. Este es el caso de Malasia e Indonesia. En Malasia, de 1990 a 2005, más de la mitad de la expansión en los cultivos de palma de aceite ocurrió en detrimento de bosques tropicales. Mientras que los bosques secundarios (plantaciones forestales) pueden albergar el 80% de las especies que se encuentran en un bosque virgen, una plantación de palma de aceite puede albergar solamente al 20% de esas especies (GSI, IISD, 2014). Una situación similar ocurrió en Indonesia, donde el acelerado ritmo de deforestación entre 1990 y 2005 (atribuido a varias causas y no solamente a una mayor demanda por la palma de aceite) llevó a la pérdida de más de 28 millones de hectáreas de selvas; en 1.7 millones de ellas hay plantaciones de palma de aceite operando (GSI, IISD, 2014).

Si se consideran también otros indicadores ambientales adicionales a la emisión de GEI y la demanda de energía no renovable, los biocombustibles de primera generación muestran mayores impactos sobre acidificación, eutrofización, y eco toxicidad, principalmente causados por el uso de fertilizantes y pesticidas. Estos efectos negativos pueden ser minimizados con la implementación de las mejores prácticas agrícolas y considerando tratamientos alternativos, tales como control biológico de insectos y pestes. Los subproductos de la producción de etanol y biodiesel como vinazas en la producción de etanol, y metanol y glicerina en la producción de biodiesel necesitan un manejo especial para evitar impactos dañinos al ambiente. Finalmente, la elección del vehículo afecta directamente el consumo de combustibles, y por lo tanto el impacto ambiental generado durante la etapa de uso. Es así que los instrumentos de política dirigidos a promover el uso de biocombustibles deben ser complementados con la promoción de vehículos eficientes y alternativas de transporte público (GSI, IISD, 2014).

9.10 NORMATIVIDAD

La aprobación de la Ley 693 marcó la entrada de Colombia en la nueva era mundial de los combustibles de origen vegetal, utilizados desde hace muchas décadas (particularmente el etanol), debido al atractivo económico en razón del Protocolo de Kyoto y la dinámica de precios internacionales del petróleo. La promulgación de la Ley tuvo como propósito principal la diversificación de la canasta energética colombiana a través del uso de alternativas compatibles con el desarrollo sostenible en lo ambiental, lo económico y lo social (Figura 12). Mediante la reglamentación de la Ley se estableció un comprensivo marco legal y normativo, que además

de promover el uso de los agrocarburos, proporcionó los estímulos necesarios para la producción, comercialización y consumo.

Posteriormente, la expedición de la Ley 939 de 2004, permitió ampliar el espectro en el uso de los biocombustibles generando las condiciones para estimular la producción y comercialización de biocombustibles no solo de origen vegetal, sino de origen animal, para su uso en motores diesel, abarcando aquella parte del sector transporte no contemplada en la Ley 693 de 2001. La nueva Ley estableció disposiciones relacionadas con el esquema tributario, excluyendo al biodiesel del pago del impuesto a las ventas e impuesto global al ACPM y generando los incentivos para la financiación de proyectos particularmente de cultivos de tardío rendimiento.



Figura 12. Criterios para la diversificación de la canasta energética a través del uso de Biocombustibles. Ley 693 de 2001. (Fuente: autor)

En general, la regulación de este subsector ha sido dinámica y se ha venido ajustando en la medida que varían las circunstancias internas o externas, esto con el fin de obtener un desarrollo coherente de la naciente industria de los biocombustibles en el país.

La Ley 1151 de 2007, por la cual se expide el Plan Nacional de Desarrollo 2006-2010, encarga de la coordinación, puesta en marcha y desarrollo de los Biocombustibles en Colombia al Ministerio de Minas y Energía; propende por encontrar y promover políticas que no solo desarrollen el mercado de biocombustibles para diversificar la canasta energética, sino que permitan sentar las bases para avanzar hacia el desarrollo sostenible en un contexto de sostenibilidad social, ambiental, económica y financiera.

9.9.2 ESTRATEGIAS PARA COLOMBIA

A partir de los retos identificados para Colombia, el documento CONPES 3510 publicado en marzo de 2008, recomienda implementar estrategias orientadas a generar las condiciones necesarias para el mejoramiento de la eficiencia productiva de la agroindustria de los biocombustibles, de manera económica, social y ambientalmente sostenible, a través de:

- Fortalecer la coordinación entre las entidades gubernamentales que tienen injerencia en el desarrollo de la industria de los biocombustibles, mediante la creación de la Comisión Intersectorial para el manejo de biocombustibles.
- Promover la reducción gradual de los costos de producción y transformación de biomásas, con criterios de sostenibilidad ambiental y social.
- Incorporar los desarrollos previstos del mercado de biocombustibles como una variable para la planeación de la infraestructura de transporte.
- Incentivar la producción eficiente, económica, social y ambientalmente sostenible de biocombustibles en las regiones aptas para ello.
- Definir un plan de investigación y desarrollo en biocombustibles.
- Armonizar la política nacional de biocombustibles con la política nacional de seguridad alimentaria.
- Definir un nuevo esquema de regulación de precios de los biocombustibles

- Continuar con la política de mezclas de biocombustibles y combustibles fósiles
- Garantizar el cumplimiento de la normatividad ambiental y de la política ambiental en toda la cadena productiva.
- Desarrollar acciones específicas para abrir nuevos mercados

10. MATERIALES Y MÉTODOS

Todo el desarrollo experimental, se realizó en los laboratorios de la Disciplina de Poscosecha ubicada en Centro Nacional de Investigaciones del Café (Cenicafé) en el municipio de Chinchiná, departamento de Caldas (Latitud 5°0' N; Longitud 75° 36' W; altitud 1310 m), con una temperatura promedio de 21 °C, humedad relativa promedio del 81,0%, precipitación de 3090,2 mm y 1.565,6 horas de brillo solar. Para cumplir con los objetivos propuestos, el experimento se realizó en cuatro etapas.

A continuación se describen los materiales y métodos generales tenidos en cuenta en todas las etapas de la experimentación.

10.1 Materiales Generales

10.1.1 Microorganismo:

Para la realización de todos los experimentos se utilizó la levadura seca *Saccharomyces cerevisiae* (SCP1), aislada del producto comercial Fermipan®; dicho producto en trabajos previos realizados por Rodríguez y Zambrano en 2011, mostró que en comparación con otros productos comerciales evaluados, obtenía los mayores rendimientos en la producción de bio-etanol. En el anexo 1, se presenta la ficha técnica del producto.

10.1.2 Medio de cultivo para aislamiento, preservación y multiplicación de *S. cerevisiae* :

Para el aislamiento de la levadura, se utilizó el medio sintético Papa Dextrosa Agar Merck® enriquecido con extracto de levadura (10%) (PDAEL).

Para la preservación de la levadura se utilizaron dos medios de cultivo sólidos: PDA Merck® y YPDA Sigma Aldrich® (65 g/L); este último también para la multiplicación.

10.2 Métodos Generales

10.2.1 Estimación de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) de *S. cerevisiae*.

Para la estimación de UFC / mL, a partir de cada sustrato o muestra (10E0) para el que se requiera hacer la estimación, se realizaron diluciones seriadas en ADE (1: 9) hasta la dilución que fuera pertinente para cada experimento desarrollado. De cada una de las tres últimas diluciones, en caja Petri de vidrio (9 cm de diámetro), en medio YPDA, se sembró (100 μ L) en superficie y con la ayuda de un rastrillo bacteriológico estéril se dispersó el inóculo en la superficie del medio. Posteriormente las cajas se incubaron a 30°C durante 48 h en completa oscuridad. Finalmente, los conteos del número de UFC por cada caja Petri se ajustaron al número de UFC/mL para 10E0, multiplicando el promedio de UFC de las tres cajas por el recíproco de la dilución sembrada.

10.2.2 Preparación del inóculo de *S. cerevisiae* y ajuste de la concentración:

A partir de colonias puras preservadas en PDA o YPDA, con un tiempo de crecimiento no superior a 15 días y con la ayuda de asa bacteriológica, en Erlenmeyer de 250 mL de capacidad, se suspendieron dos colonias de la levadura en 100 mL de medio líquido YPD. El Erlenmeyer se llevó a incubación a 30 °C durante 48 h, a 90 rpm en oscuridad constante. Finalizado este tiempo, el inóculo se ajustó a una densidad óptica (DO) de 0,5 (DO $\lambda= 600$ nm), determinado en espectrofotómetro (HACH DR6000®). Este procedimiento se realizó cada vez que fuera necesario para la realización de los diferentes experimentos.

10.2.3 Determinación del crecimiento vegetativo de *S. cerevisiae*:

El crecimiento de la levadura se determinó por medio de dos metodologías: estimación de UFC / mL a partir de siembra de diluciones seriadas en ADE (1:9) crecidas en medio sintético YPDA e incubadas a 30°C durante 48 h en completa oscuridad; y mediante la determinación de absorbancia ($\lambda= 600$ nm), en espectrofotómetro (HACH DR6000®) y cubeta de 2 mL.

10.2.4 Determinación de azúcares y alcoholes:

La determinación de azúcares presentes en las muestras de mucilago, se realizó mediante el análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), empleando un detector de Índice de Refracción (IR).

Las muestras que contenían azúcares fueron centrifugadas a 8500 rpm durante 15 min. El sobrenadante se filtro por medio de una membrana de 0,2 μm PVDF, un (1) μL se inyectó directamente al cromatografo para su posterior análisis bajo las siguientes condiciones:

Columna: Sugar Pack, 4,0 x 300 mm

Fase Móvil: EDTA 50 mM

Modo de elución: Isocrático.

Detector: Índice de Refracción (IR), Temperatura: 90°C

Volumen inyección: 20 μL

Flujo: 0,7 mL/min

La identificación de los Carbohidratos en las muestras se realizó mediante la comparación de los tR de cada estándar, analizados bajo las mismas condiciones cromatográficas, utilizando HPLC-IR como técnica analítica y su cuantificación por estándar externo para cada carbohidrato identificado.

El perfil de Alcoholes del mucilago fue determinado por CG-FID. Las muestras que contenían alcoholes se centrifugaron a 8500 rpm durante 15 min. El sobrenadante se filtro por medio de una membrana de 0,2 μm PVDF, un (1) μL se inyectó directamente al cromatografo para su posterior análisis bajo las siguientes condiciones:

Columna: Agilent, J&W DB-624UI, 30 m, 0.25 mm ID, 1.4 μm (Ref. 122-1334UI).

Gas de arrastre: Helio, 1,2 mL/min (flujo constante).

Inyección: 1 μL , con división de flujo (Split) 70:1, 260°C

Horno: 50 °C durante 1 minuto

50 - 100 °C rampa de 6 °C /min, se mantiene por 2 min.

100 - 150 °C rampa de 15 °C /min, se mantiene por 1 min.

Post-run a 220°C por 2 min.

Detector: FID, 230°C, utilizando Nitrógeno como gas auxiliar a 15 mL/min.

La identificación de los Alcoholes en las muestras se realizó mediante la comparación de los tR de cada estándar, analizados bajo las mismas condiciones cromatográficas, utilizando GC-FID como técnica analítica y su cuantificación por estándar externo para cada alcohol identificado.

10.2.5 Determinación del pH y Temperatura:

Estos parámetros se determinaron por medio de pH metro Metter Toledo ®, Modelo Seven Compact pH/ION. Para cada muestra requerida se tomaron al menos cinco datos.

10.2.6 Determinación de °Brix e índice de refracción:

Estos parámetros se determinaron por medio de Colorímetro – Refractómetro Portable Meters Hanna Instruments ®, Modelo HI 96800 (Refractive Index / Brix 0 – 85% Brix; 1,3300 – 1,5080 nD; 1,3330 – 1,5040 nD₂₀). Para cada muestra requerida se tomaron al menos cinco datos.

10.3 Mucílago de Café

El mucílago se obtuvo a partir del proceso de beneficio de 450 kg de frutos de cc, cosechado en lotes de café cultivados en la Estación Experimental Naranjal de Chinchiná. En la tabla 3, se relacionan las características del grado de madurez de los frutos de cc utilizados para los diferentes experimentos.

Tabla 3. Caracterización por grado de madurez del fruto de café cereza, utilizado en los diferentes experimentos.

Cosecha (#)	Fecha de cosecha	M+SM+G (%)	P+VP+V (%)
1	Sept/15/2015	94,6	3,7
2	Oct/16/2015	88,9	10,4
3	Jun/1/2016	80.83	19.14
4	Jun/2/2016	72.42	24.89

M: maduro
 SM: sobremaduro
 G: guayaba
 P: pintón
 VP: Verde-Pintón
 V: verde

Para el procesamiento o beneficio de los frutos de cc, se emplearon los sistemas implementados en el Beneficio Ecológico del café: Becolsub® 300, Ecomill® 3000 (ambos equipos con desmucilagador mecánico) y Tanque Tina. En la tabla 4, se resumen las características operativas de los sistemas utilizados para la obtención del mucílago.

Tabla 4. Características de los equipos para la obtención del mucílago utilizado en los diferentes experimentos

Equipo	Especificaciones		
	kg cc / h	kg cps / h	mL de agua / kg cps
Ecomill® 3000	7200	1500	480
Becolsub® 300	300	63	760
Tanque Tina	31	13,5	500

Con los equipos descritos y variando condiciones durante el proceso, se logró obtener seis tipos de mucílago como materia prima o sustrato como se relaciona en la tabla 5.

Tabla 5. Relación y descripción de los sustratos obtenidos a partir de tres sistemas implementados en el Beneficio Ecológico y evaluados durante la experimentación.

Sustrato (#)	Descripción
S1	Mucílago proveniente del beneficio con Ecomill® 3000 con 16 h de fermentación.
S2	Mucílago proveniente del beneficio con Ecomill® 3000 con 20 h de fermentación.
S3	Mucílago proveniente del beneficio con Becolsub® 300
S4	Mucílago proveniente del beneficio con Ecomill® 3000 con 0 h de fermentación y uso de enzima.
S5	Mucílago proveniente del beneficio con Tanquetina, primera cabeza de lavado
S6	Mucílago proveniente del beneficio con Tanquetina, segunda cabeza de lavado

Un esquema de la relación de las etapas realizadas en el trabajo, se presenta en la figura 13.

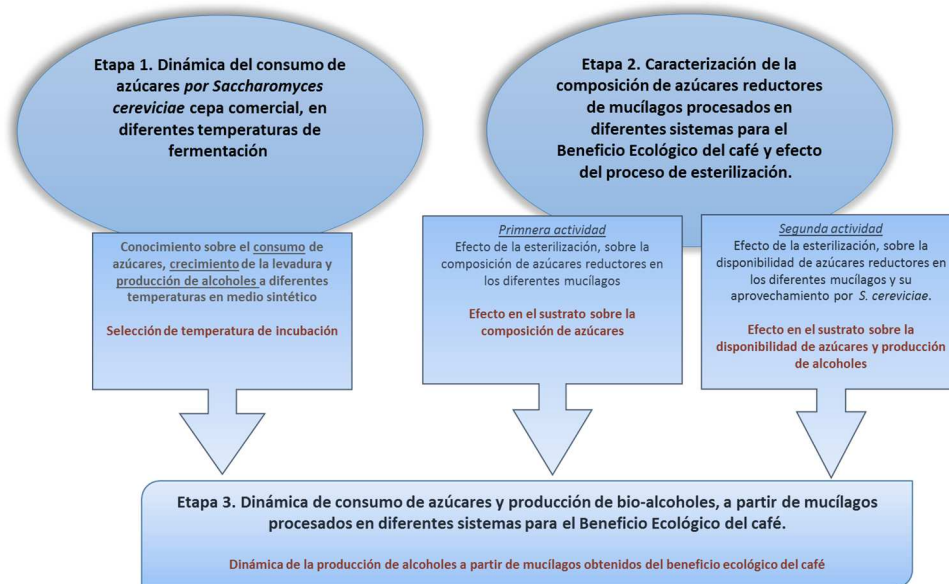


Figura 13. Esquema del desarrollo metodológico de las diferentes etapas.

10.4 PRIMERA ETAPA (Materiales y Métodos)

Dinámica del consumo de azúcares por *Saccharomyces cerevisiae* cepa comercial, en diferentes temperaturas de fermentación.

Esta etapa se desarrolló con el fin de dar cumplimiento con el primer objetivo específico: evaluar el efecto de la temperatura, en el crecimiento vegetativo, utilización de azúcares disponibles y producción de bio-alcoholes, de una cepa de la levadura *S. cerevisiae*, aislada de un producto comercial bajo condiciones de laboratorio. Esta etapa se considera de carácter exploratorio.

Los medios utilizados para la multiplicación y preservación de *S. cerevisiae* y las metodologías para preparación de inóculo, crecimiento vegetativo y determinación de azúcares y alcoholes, y determinación de pH, °Brix y temperatura, fueron los mismos descritos en materiales y métodos generales.

10.4.1 Métodos Primera Etapa

Aislamiento y estimación de UFC a partir de producto comercial:

Del producto comercial Fermipan®, se tomaron cinco gramos de producto y se diluyeron en 45 mL de una solución de ADE y Tween 80® al 1%. Después de 30 minutos en agitación constante, tiempo para el que se observó completa dispersión del producto en la solución, se realizaron diluciones seriadas en ADE (1: 9) hasta 10E-6.

De cada dilución por triplicado se sembró 0,1 mL en superficie en medio PDAEL. Todas las cajas Petri se incubaron a 30°C durante 48 h en completa oscuridad. Al final de este tiempo, se realizaron recuentos del número de UFC. Para el reporte de la concentración de UFC / g, se escogió la dilución que presentara un rango entre 30 – 300 UFC / caja.

En la figura 14, se presenta una imagen del crecimiento de colonias de *S. cerevisiae* en medio YPD.

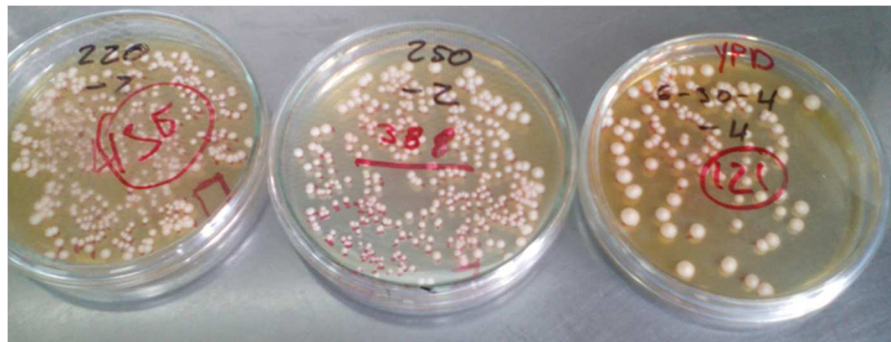


Figura 14. Crecimiento característico de colonias puras de *S. cerevisiae* aislada en agar YPD. (Fuente: el autor)

10.4.2 Materiales Primera Etapa

Medio de cultivo líquido para la dinámica de consumo de azúcar a diferentes temperaturas:

El medio de cultivo utilizado en la evaluación de la dinámica de consumo de azúcares a diferentes temperaturas fue caldo líquido YPDC (extracto de levadura Merck® 10g/L; bacto peptona BD® 20g/L; D-(+)-glucosa Sigma® ($\geq 99,5\%$ GC)) 20g/L; pH 6,14).

10.4.3 Diseño Experimental Primera Etapa.

Esta etapa del experimento, se realizó bajo un diseño completamente aleatorio, conformado por tres tratamientos o temperaturas (20, 30 y 35 °C). Cada tratamiento contó con cinco repeticiones o unidad experimental (U.E), consistentes en un erlenmeyer de 250 mL de capacidad, conteniendo 120 mL de medio líquido YPD. Cada erlenmeyer se inoculó con la levadura previamente crecida y ajustada la concentración (0,5 DO $\lambda= 600$ nm). Todas las U.E se llevaron a incubación en condiciones de oscuridad a las tres temperaturas evaluadas, durante

36 horas, a 100 rpm. Muestras de 5 mL de cada U.E por tratamiento, se tomaron a diferentes tiempos (0, 6, 18, 24 y 36 horas), una vez se dio inicio al experimento.

10.4.4 Variables evaluadas Primera Etapa.

Como variable principal se evaluó la concentración (ppm) de glucosa, fructosa y sacarosa, determinadas por HPLC y la producción de alcohol (%) (metanol, etanol, butanol, isobutanol, propanol y total de alcohol) por CG, para cada tiempo de evaluación.

Como variable secundaria se consideró el crecimiento vegetativo de las levaduras, dadas en UFC / mL a partir de siembra de diluciones seriadas (hasta 10E6 dependiendo del tiempo de colectada la muestra) en ADE (1:9) crecidas en medio sintético YPDA; paralelamente y para cada UE se determinó la absorbancia ($\lambda = 660$ nm), en espectrofotómetro (HACH DR6000®), en cubeta de 2 mL.

10.4.5 Análisis de resultados

Para el análisis de todas las variables, se realizó un análisis descriptivo (estimación de promedios y variación por tratamiento).

Para determinar el consumo de azúcares totales dado como la diferencia entre la concentración en ppm del total de azúcares al inicio y al final de la incubación, en porcentaje, se analizaron los promedios y se estimó la tasa de consumo por hora del total de azúcares disponibles, como la relación entre la concentración total de azúcar en ppm (Y) y el tiempo ($\ln(X + 1)$), ajustándola a un modelo exponencial ($y = ae^{bx}$), para cada una de las temperaturas evaluadas. Adicionalmente, se estableció la relación entre UFC y absorbancia, con respecto al tiempo, para cada tratamiento.

El porcentaje de alcoholes producidos y obtenido por CG, se estimó para cada tiempo de evaluación y el total de alcoholes independiente de la temperatura se ajustó al modelo logístico ($y = a / (1 + be^{-cx})$), con el fin de determinar la tasa de producción de alcoholes totales dada en porcentaje, al final de las 36 h de crecimiento.

Para las variables de respuesta, se realizó un anava de acuerdo con el modelo de análisis para el diseño completamente aleatorio, al 5%; para los casos donde el análisis mostró efecto entre tratamientos, se procedió a realizar la prueba de comparación de promedios Tukey al 5%, para determinar diferencias estadísticas entre tratamientos.

El análisis estadístico se realizó con la ayuda del programa Statistical Analysis System SAS versión 9,0 (SAS, 2008).

10.5 SEGUNDA ETAPA (Materiales y Métodos)

Caracterización de la composición de azúcares reductores de mucílago procesados en diferentes sistemas para el Beneficio Ecológico del café y efecto del proceso de esterilización.

Esta etapa se desarrolló con el fin de dar cumplimiento con el segundo objetivo específico: determinar el efecto del proceso de autoclavado sobre el mucílago del café y caracterizar en cuanto a disponibilidad y cantidad de azúcares reductores, el mucílago obtenido a partir de tres tecnologías utilizadas en el Beneficio Ecológico del café.

10.5.1 Materiales Segunda Etapa

Los medios utilizados para la multiplicación y preservación de *S. cerevisiae* y las metodologías para preparación de inóculo, determinación de azúcares y alcoholes, y determinación de pH, °Brix y temperatura, fueron los mismos descritos en materiales y métodos generales.

Para el desarrollo de esta etapa, se realizaron dos actividades:

10.5.1.1 Primera actividad: Efecto de la esterilización, sobre la composición de azúcares reductores en los diferentes mucílagos.

Mucílago de café:

El mucílago obtenido para esta actividad se obtuvo de frutos de café de las cosechas 3 y 4 (Tabla 3), obteniendo los diferentes sustratos (Tabla 5) y sometidos al proceso de esterilización, contando con 12 tratamientos (Tabla 6).

10.5.1.2 Diseño Experimental Segunda Etapa, primera actividad.

Una vez obtenidos los seis diferentes mucilagos (sustratos) (Tabla 5), como se explicó en materiales y métodos generales, en erlenmeyers de capacidad de 250 mL se dispensaron volúmenes de 100 mL (U.E.) y se llevaron a esterilización en autoclave por 15 min a 120°C y 15 psi. De cada U.E y por sustrato, se tomaron muestras antes y después de la esterilización, conformando un total de 12 tratamientos con cinco repeticiones (U.E.). Esta actividad, se realizó bajo un diseño completamente aleatorio. En la tabla 6, se presenta un resumen de los tratamientos evaluados.

10.5.1.3 Variables evaluadas Segunda Etapa, primera actividad.

Como variable de principal se evaluó la concentración (g/L) de sacarosa, glucosa, fructosa y azúcares totales, determinada por HPLC. Como variables secundarias se determinó pH, °Brix y temperatura.

Tabla 6. Relación de tratamientos utilizando diferentes mucílagos en la evaluación del efecto de la esterilización sobre la disponibilidad de azúcares en el sustrato.

Tratamiento (#)	Sustrato (#)	Descripción
T1	S1	Sin esterilización
T2	S2	Sin esterilización
T3	S3	Sin esterilización
T4	S4	Sin esterilización
T5	S5	Sin esterilización
T6	S6	Sin esterilización
T7	S1	Con esterilización
T8	S2	Con esterilización
T9	S3	Con esterilización
T10	S4	Con esterilización
T11	S5	Con esterilización
T12	S6	Con esterilización

10.5.1.4 Análisis de resultados Segunda Etapa, primera actividad.

Para el análisis de todas las variables, se realizó un análisis descriptivo (estimación de promedios y variación por tratamiento).

Adicionalmente, se realizó un anava de acuerdo con el modelo de análisis para el diseño completamente aleatorio exploratorio, al 5%; para los casos donde el análisis mostró efecto entre tratamientos, se procedió a realizar la prueba de comparación de promedios Tukey al 5%, para determinar diferencias estadísticas entre tratamientos.

El análisis estadístico se realizó con la ayuda del programa Statistical Analysis System SAS versión 9,0 (SAS, 2008).

Segunda actividad: Efecto de la esterilización, sobre la composición de azúcares reductores en los diferentes mucílagos y su aprovechamiento por *S. cerevisiae*.

10.5.2 Materiales Segunda Etapa, segunda actividad.

Mucílago de café:

Para la determinación del efecto de la esterilización en la composición del mucílago del café y en la producción de alcoholes, se utilizaron los frutos de las cosechas 1 y 2 (Tabla 1), para obtener los sustratos que se utilizaron S2 y S3 (Tabla 3). En la tabla 7, se relacionan los tratamientos evaluados.

Tabla 7. Relación de tratamientos utilizando los sustratos S2 y S3 en la evaluación del efecto de la esterilización sobre la disponibilidad de azúcares en el sustrato.	
Tratamiento (#)	Descripción
T1	S2 con esterilización
T2	S2 sin esterilización
T3	S3 con esterilización
T4	S3 sin esterilización
S2: Mucílago proveniente del beneficio con Ecomill® 3000 con 20 h de fermentación.	
S3: Mucílago proveniente del beneficio con Becolsub® 300	

10.5.3 Diseño Experimental Segunda Etapa, segunda actividad.

La U.E, estuvo conformada por un frasco Shoot con capacidad de 1 L conteniendo 300 mL de sustrato según combinación (Tabla 7). Para los tratamientos con esterilización, cada U.E se llevó a esterilización en autoclave por 15 min a 120°C y 15 psi., y posteriormente se inocularon con 2 g de levadura comercial, ajustando a pH 5,0 con HCL (5M) o NaOH (5 M) según se requiriera. Todas las U.E (cuatro por tratamiento), se incubaron durante 36 h a 30°C (temperatura seleccionada en la etapa 1) y 100 rpm., en oscuridad constante. Muestras de 20 mL se tomaron antes y después del proceso de fermentación.

Finalizado el tiempo de fermentación (36 h), todas las U.E por tratamiento se unieron en un balón de fondo plano de 3,5 L para realizar la destilación simple.

Para el proceso de destilación simple, se adicionó como antiespumante aceite vegetal (1% v/v). Cada balón se mantuvo hasta ebullición y a partir de este tiempo, se contabilizó 1 h recuperando en este lapso el producto destilado en recipiente individual por tratamiento. Al destilado, se le determinó el grado alcohólico en porcentaje v/v, por medio de un hidrómetro y composición por CG. En la figura 15, se presenta el esquema del sistema utilizado para la destilación.



Figura 15. Procedimiento para la destilación simple; balón que contiene el mucílago fermentado de acuerdo con tratamientos (a); destilador en serpentín (b); mangueras transportadoras de agua para refrigeración del serpentín (c); balón colector de solución alcohólica (d). (Fuente: el autor)

Posteriormente al volumen de solución alcohólica obtenida de la destilación simple, se realizó el proceso de rectificación (Figura 16), utilizando inicialmente una columna Vigreux de 40 mm de diámetro y 50 cm de longitud y posteriormente en una columna empacada con anillos Rashing.

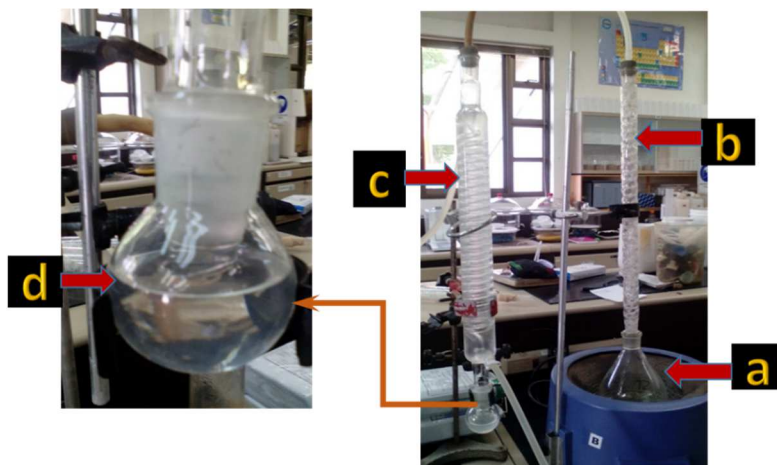


Figura 16. Procedimiento para rectificación. ; balón conteniendo la solución alcohólica proveniente de la destilación simple (a); columna Vigreux para rectificación (b); condensador en serpentina vertical (c); balón colector de solución alcohólica con la primera rectificación (d). (Fuente: el autor).

10.5.4 Variables evaluadas Segunda Etapa, segunda actividad.

Como variables principales, se consideró la concentración de glucosa, fructosa y sacarosa (g/L) determinada por HPLC y la producción de etanol por CG, antes y después de la fermentación. Como variables secundarias se determinó pH, °Brix y temperatura. Con el volumen obtenido de la destilación simple, se determinaron los alcohólicos y la cantidad de alcohol por litro de sustrato para cada tratamiento. Después de la rectificación, se determinó el contenido de etanol por tratamiento, por medio del método del hidrómetro.

10.5.5 Análisis de resultados Segunda Etapa, segunda actividad.

Para el análisis de todas las variables, se realizó un análisis descriptivo (estimación de promedios y variación por tratamiento).

Adicionalmente, se realizó un anava de acuerdo con el modelo de análisis para el diseño completamente aleatorio, al 5%; para los casos donde el análisis mostró efecto entre tratamientos, se procedió a realizar la prueba de comparación de promedios Tukey al 5%, para determinar diferencias estadísticas entre tratamientos.

El análisis estadístico se realizó con la ayuda del programa Statistical Analysis System SAS versión 9,0 (SAS, 2008).

10.6 TERCERA ETAPA (Materiales y Métodos)

Dinámica de consumo de azúcares y producción de bio-alcoholes, a partir de mucílagos procesados en diferentes sistemas para el Beneficio Ecológico del café.

Esta etapa se desarrolló con el fin de cumplir con el tercer objetivo específico: evaluar la dinámica del consumo de azúcares disponibles, crecimiento vegetativo y producción y producción de bio-alcoholes, de una cepa de la levadura *Saccharomyces cereviciae*, aislada de un producto comercial, utilizando como sustrato el mucílago obtenido a partir de tres tecnologías utilizadas en el Beneficio Ecológico del café, bajo condiciones de laboratorio.

10.6.1 Materiales Tercera Etapa

Los medios utilizados para la multiplicación y preservación de *S. cereviciae* y las metodologías para preparación de inóculo, determinación de azúcares y alcoholes, y determinación de pH, °Brix y temperatura, fueron los mismos descritos en materiales y métodos generales.

Mucílago de café:

Para el desarrollo de esta etapa, se utilizaron los frutos de las cosechas 3 y 4 (Tabla 3), y todos los sustratos relacionados en la tabla 8.

Tabla 8. Relación de tratamientos utilizando diferentes mucílago en la producción de alcoholes.	
Tratamiento (#)	Sustrato (#)
T1	S1
T2	S2
T3	S3
T4	S4
T5	S5
T6	S6

10.6.2 Diseño Experimental Tercera Etapa.

Esta etapa del experimento, se realizó bajo un diseño completamente aleatorio, conformado por seis sustratos o tratamientos (mucílago obtenido de procesos del Beneficio Ecológico) tabla 8. Cada tratamiento contó con cinco repeticiones o unidad experimental (U.E), consistentes en un Erlenmeyer de 250 mL de capacidad, conteniendo 120 mL de sustrato y llevados a esterilización en autoclave por 15 min a 120°C y 15 psi. Posteriormente, cada U.E se inoculó con la levadura previamente crecida y ajustada la concentración (0,5 DO $\lambda= 600$ nm). Todas las U.E se llevaron a incubación en condiciones de oscuridad a 30 °C, durante 36 horas, a 100 rpm. Muestras de 5 mL de cada U.E por tratamiento, se tomaron a diferentes tiempos (0, 6, 18, 24 y 36 horas), una vez se dio inicio al experimento.

10.6.3 Variables evaluadas Tercera Etapa.

Como variables principales se evaluó la concentración (g/L) de glucosa, fructosa y sacarosa, determinadas por HPLC y la producción de alcoholes por CG, para cada tiempo de evaluación.

Como variable secundaria se consideró el crecimiento vegetativo de las levaduras, dadas en UFC / mL a partir de siembra de diluciones seriadas (hasta $10E8$ dependiendo del tiempo de colecta de la muestra) en ADE (1:9) crecidas en medio sintético YPDA durante los mismos tiempos de evaluación; adicionalmente, se determinaron las variables de pH, °Brix y temperatura, para cada tiempo de evaluación.

10.6.4 Análisis de resultados Tercera Etapa.

Para el análisis de todas las variables, se realizó un análisis descriptivo (estimación de promedios y variación por tratamiento).

Se estimó el porcentaje de consumo de azúcares como la diferencia entre el porcentaje para el tiempo cero y cada uno de los tiempos evaluados y la tasa diaria de consumo, obtenida a partir de la comparación del mejor modelo que explicara la relación entre la concentración en ppm de azúcar (Y) en función del tiempo ($\ln(X + 1)$) por tratamiento.

Para la producción de alcoholes, se estimó el porcentaje de alcoholes obtenido por CG para cada tiempo de evaluación y el total de alcoholes independiente del sustrato se ajustó a los tres mejores modelos que explicaran el comportamiento. Posteriormente y bajo el modelo seleccionado, se estimaron las derivadas del porcentaje de alcoholes en relación con el tiempo de evaluación dado por (dy/dx) , para cada tratamiento.

Para las variables de respuesta, se realizó un anava de acuerdo con el modelo de análisis para el diseño completamente aleatorio, al 5%; para los casos donde el análisis mostró efecto entre tratamientos, se procedió a realizar la prueba de comparación de promedios Tukey al 5%, para determinar diferencias estadísticas entre tratamientos.

El análisis estadístico se realizó con la ayuda del programa Statistical Analysis System SAS versión 9,0 (SAS, 2008).

11. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

11.1 PRIMERA ETAPA (Resultados)

Dinámica del consumo de azúcares por *Saccharomyces cerevisiae* cepa comercial, a diferentes temperaturas.

Aislamiento y estimación de Unidades Formadoras de Colonia (UFC)

El resultado de la estimación del número de UFC / g de Fermipan® se realizó a partir de las diluciones 10E6 y 10E7, encontrando un número promedio de $4,9 \pm 0,3 \text{ E}8 \text{ UFC/ g}$.

En relación con el crecimiento vegetativo de la *S. cerevisiae*, el análisis de correlación (Pearson) entre la absorbancia y Ln (UFC) con el tiempo de evaluación para las tres temperaturas evaluadas, fue significativa ($< 0,0001$), al igual que el ajuste lineal. Los parámetros de los ajustes lineales para la absorbancia y Ln (UFC) en relación con el tiempo de fermentación, se presentan en las tablas 9 y 10 respectivamente. En los Anexos 2 y 3, se presentan los resultados de los respectivos análisis.

Tratamiento (Temperatura)	Parámetros			
	a	b	E.E	Coef. Corr
25 °C	-0,23	0,33	0,28	0,84
30 °C	-0,05	0,48	0,19	0,96
35 °C	-0,02	0,46	0,21	0,94

Tabla 10. Parámetros del ajuste lineal para la relación entre UFC y horas de fermentación					
Tratamiento (Temperatura)	Parámetros				
	a	b	E,E	Coef, Deter,	Coef, Corr
25 °C	13,8	7,1E+05	2,9E+06	0,93	0,96
30 °C	14,2	2,3E+06	2,5E+07	0,54	0,73
35 °C	14,3	2,5E+06	2,2E+07	0,66	0,81

Los resultados sobre la composición de azúcares del medio YPDC (Tabla 11) determinada por HPLC, muestran que del 100% de azúcares disponibles en el medio, el 97% corresponden a azúcares reductores y de esos el 95% es glucosa, lo que es consistente con la composición del medio utilizado. El porcentaje de sacarosa (azúcar disponible mas no reductor), se encontró entre el 2,2% y el 3,9% (L. I y L.S, respectivamente). Adicionalmente, el anava (5% ANAVA - $P < 0,0001$) y la prueba de comparación de promedios (Tukey 95%), no mostraron diferencias entre la concentración inicial de azúcares totales, lo que indica que para el tiempo cero de la experimentación, todos los tratamientos evaluados iniciaron con una concentración similar de azúcares totales, lo que reduce el error tipo II para el análisis de los resultados durante el tiempo de crecimiento (Tabla 12).

Tabla 11. Composición porcentual de azúcares disponibles en medio YPDC			
%	Sacarosa	Glucosa	Fructosa
Promedio	3,01	95,6	1,36
L.I	2,20	94,8	1,33
L.S	3,90	96,5	1,4

Para la variable de respuesta “consumo de azúcares totales” (en medio líquido sintético YPDC), considerada como la diferencia entre la concentración en ppm de azúcares totales al inicio y al final de la incubación dada en porcentaje, el análisis mostró diferencias significativas (Tukey 95%) para el tratamiento mantenido a 25°C. Lo anterior se puede interpretar, como el

consumo hasta del 96% de los azúcares totales, por parte de *S. cerevisiae*, durante 36 h a temperaturas de 30 y 35 °C, en comparación con el consumo a 25°C que resultó inferior (63%) (Tabla 12). Este comportamiento guarda relación con los resultados encontrados en el incremento de la absorbancia y de UFC a medida que transcurre el tiempo de crecimiento (Tablas 9 y 10 respectivamente), al ser mayores las tasas de crecimiento halladas para estas temperaturas.

Tabla 12. Concentración de azúcares totales, durante el desarrollo de *S. cerevisiae* a diferentes temperaturas en medio sintético.

Tratamiento (Temperatura)	Inicial (0 horas)			Final (36 horas)			Consumo		
	Prom (ppm)	L.I	L.S	Prom (ppm)	L.I	L.S	%	L.I	L.S
25 °C	14989 a	14826	15152	5565 a	4750	6379	62,9 b	57,8	68,0
30 °C	14996 a	14842	15150	656 b	646	667	95,6 a	95,2	95,7
35 °C	15009 a	14867	15151	609 b	522	696	95,9 a	95,4	96,5

Promedios seguidos con la misma letra no presentan diferencias estadísticas (Tukey 95%)
Intervalo de confianza (Nivel 95%)

La determinación de la tasa de consumo por hora del total de azúcares disponibles, se estimó como la integral del área descrita por el modelo ajustado para la relación entre la concentración total de azúcar en ppm (Y) y el tiempo ($\ln(X + 1)$), al modelo de regresión exponencial ($y = ae^{bx}$), para cada una de las temperaturas evaluadas. En la tabla 13, se presentan los parámetros de los modelos exponenciales por tratamiento y la tasa de consumo de azúcares total por hora durante la totalidad del tiempo evaluado.

Tabla 13. Parámetros del ajuste exponencial para las diferentes temperaturas evaluadas, en el consumo de azúcares total a 36 h de evaluación

Temperatura	Parámetros					Consumo / h de azúcares (0-36 h)
	a	b	E,E	Coef. Det	Coef. Corr	(ppm)
25 °C	0,13	1,73	9,04	0,89	0,94	10,52
30 °C	2,30	1,06	14,80	0,88	0,94	27,09
35 °C	3,27	0,96	13,63	0,90	0,95	29,64

De acuerdo con los resultados encontrados, el mayor consumo promedio por hora del total de azúcares presentes en el medio YPDC durante 36 h de crecimiento, se obtuvo a una temperatura de incubación de 35 °C con 29,64 ppm / h. El menor consumo se obtuvo a 25 °C con 10,52 ppm / h.

En relación con la variable de respuesta, producción de alcoholes (%) (metanol, etanol, butanol, isobutanol, propanol y total de alcoholes) por CG, para cada tiempo de evaluación, en la tabla 12 se presentan los alcoholes registrados por CG al final de las 36 h de crecimiento en medio sintético YPDC.

Bajo las condiciones evaluadas, los resultados del porcentaje de producción total de alcoholes determinados por CG, no mostraron diferencias significativas entre tratamientos (5% ANAVA - $P < 0,0001$); los porcentajes estuvieron entre 1,8 % y 2,7 % para 25 °C y 35 °C, respectivamente. Para el análisis de los porcentajes de alcoholes individuales, en ninguna de las temperaturas evaluadas se detectó producción de propanol, y los porcentajes de isobutanol fueron mínimos (0,02%). El anava, mostró diferencias significativas para los porcentajes de butanol ($Pr F = 0,0004$) y la prueba de comparación de promedios (Tukey 95%), mostró diferencias entre tratamientos, siendo el porcentaje de butanol producido a 25 °C, el menor

(0,31 %) (Tabla 14). Este mismo comportamiento se refleja en el análisis del porcentaje de cada alcohol (Tabla15).

Tabla 14. Producción de alcoholes por *S. cerevisiae* en medio YPDC, después de 36 h de crecimiento en medio sintético YPDC.

TRATAMIENTOS (Temperaturas evaluadas)										
Alcoholes registrados	25 °C			30 °C			35 °C			Anava (p < 0,05)
	Promedio (%)	L.I	L.S	Promedio (%)	L.I	L,S	Promedio (%)	L.I	L.S	
Metanol	0,02 a	0,01	0,03	0,03 a	0,02	0,03	0,03 a	0,02	0,03	0,1518
Etanol	0,85 a	0,21	1,49	2,19 a	-0,11	4,49	2,28 a	1,02	3,53	0,1727
Propanol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	----
Butanol	0,31 a	0,30	0,33	0,37 b	0,34	0,39	0,37 b	0,35	0,38	0,0004
Isobutanol	0 a	0	0	0,015 a	-	0,04	0,019 a	0,005	0,03	0,0588
Total	1,18	0,5	1,82	2,61	0,25	4,97	2,71	1,43	3,98	0,1527

Promedios seguidos de la misma letra no son diferentes significativamente (Tukey 95%),
Comparación sobre las filas
Intervalo de confianza (Nivel 95%)

Tabla 15. Porcentaje en solución alcohólica de cada alcohol encontrado en medio sintético YPDC después de 36 h de crecimiento de *S. cerevisiae*

TRATAMIENTOS (Temperaturas evaluadas)										
Alcoholes registrados	25 °C			30 °C			35 °C			Anava (p < 0,05)
	Promedio (%)	L.I	L.S	Promedio (%)	L.I	L.S	Promedio (%)	L.I	L.S	
Metanol	1,71 a	0,56	2,85	1,47 a	0,17	2,77	1,28 a	-0,06	2,63	0,8100
Etanol	64,98 a	39,06	90,91	76,50 a	57,99	95,01	81,25 a	68,67	93,82	0,2890
Propanol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Butanol	33,31 a	8,10	58,52	21,43 a	3,46	39,40	16,16 a	4,89	27,43	0,2339
Isobutanol	0 b	0	0	0,41 ab	-0,06	0,88	0,57 a	0,17	0,97	0,0220

Promedios seguidos de la misma letra no son diferentes significativamente (Tukey 95%),
Comparación sobre las filas
Intervalo de confianza (Nivel 95%)

El anava para los resultados del porcentaje individual en masa alcohólica, dado como la relación entre el porcentaje total de alcoholes y el porcentaje para cada alcohol en cada temperatura evaluada, solamente mostró diferencias significativas para el porcentaje de isobutanol (5% anava - $P < 0,0001$). Para todas las temperaturas evaluadas, los porcentajes de etanol fueron superiores (65%, 77% y 81%, para 25 °C, 30 °C y 35 °C respectivamente), seguidos por butanol (33%, 21% y 16%, para 25 °C, 30 °C y 35 °C respectivamente).

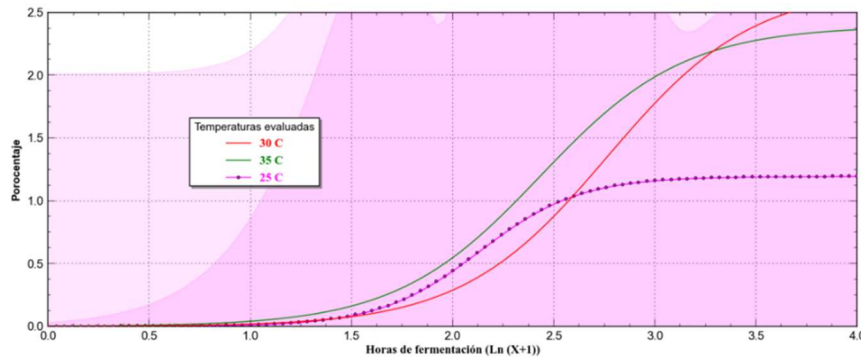
Para el análisis del porcentaje de alcoholes producidos ajustado al modelo de regresión logístico ($y = a / (1 + be^{-cx})$) dado como el porcentaje de alcoholes producido (Y) y el tiempo (Ln (X + 1)), se analizó la integral hasta las 36 h generada por el modelo, para cada tratamiento. En la tabla 16, se presentan los parámetros de los modelos logísticos por tratamiento, y la tasa del porcentaje de producción de alcoholes / h.

Tabla 16. Parámetros del ajuste al modelo logístico para la producción de alcohol totales en medio sintético de cultivo YPDC a diferentes temperaturas							
Temperatura (°C)	Parámetros						Producción de alcoholes (0-36 h) / h (%)
	a	b	c	E,E	Coef. Deter	Coef. Corr	
25 °C	1,2	5,5E+03	4,0	4,7E-01	0,74	0,86	0,49
30 °C	2,7	2,1E+03	2,8	6,5E-01	0,85	0,92	0,79
35 °C	2,4	9,2E+02	2,8	6,0E-02	0,99	0,99	0,66

De acuerdo con las condiciones en que se realizó este experimento la mayor tasa de producción de alcoholes totales / h se registra para el tratamiento mantenido a 30°C siendo 1,2 y 1,6 veces mayor que a 35°C y 25°C, respectivamente.

Teniendo en cuenta que de la producción total de alcoholes producidos al final del tiempo de crecimiento, el etanol fue el que presentó para todas las temperaturas evaluadas el

mayor porcentaje, en la gráfica 1, se presenta la curva descrita y bajo el modelo ajustado de regresión logístico ($y = a/(1 + be^{-ct})$), para cada temperatura,



Gráfica 1. Porcentaje de la producción de etanol en medio YPDC producido por *S. cerevisiae*, a diferentes temperaturas de incubación, ajustado al modelo logístico.

Bajo las condiciones evaluadas en este experimento, se puede observar que medida que la temperatura aumenta, *S. cerevisiae* incrementa su metabolismo, sin embargo temperaturas inferiores a 30 °C aunque pueden favorecer el crecimiento vegetativo, no favorecen otras variables como el aprovechamiento de los recursos (para este caso azúcares fermentables) traducido en la producción de alcoholes. A diferencia del comportamiento en temperaturas mayores o iguales a 30 °C, para las cuales la acumulación de biomasa “deja de ser prioritaria”, pasando a volver más eficiente el aprovechamiento de la variable consumo de azúcares totales, en la producción de energía en otras formas, como la producción de alcoholes.

11.2 SEGUNDA ETAPA (Resultados)

Caracterización de la composición de azúcares reductores de mucílagos procesados en diferentes sistemas para el Beneficio Ecológico del café y efecto del proceso de esterilización.

11.2.1 Primera actividad: Efecto de la esterilización, sobre la composición de azúcares reductores en los diferentes mucílagos,

El anava (5% - $P < 0,0001$) y la prueba de comparación de promedios (Tukey 95%), no mostraron diferencias estadísticas significativas en la concentración de azúcares totales para los mucílagos evaluados, con y sin esterilización (tabla 17). Para ambos casos, la mayor concentración de azúcares totales la presentó T4 y T10 seguida por los tratamientos T7-T1; T8-T2; T3-T9, T5-T11 y T6-T12, respectivamente. Esta tendencia se mantiene para la concentración de glucosa, mas no para la sacarosa ni la fructosa, azúcares para los que las mayores concentraciones las presentaron T1 y T7 respectivamente (Tukey 95%). Esta diferencia a favor de no esterilización para sacarosa es inversa para el caso de la concentración de fructosa, cuyo incremento puede ser explicado por la degradación de inulina presente en el mucílago del café, mas no reportado en este estudio.

Tabla 17. Comparaciones entre la composición de azúcares para cada sustrato y efecto de la esterilización.

T	Sistema	Esterilización	Sacarosa (g/L)			Glucosa (g/L)			Fructosa (g/L)			Total (g/L)		
			Prom *	L.I	L.S	Prom *	L.I	L.S	Prom*	L.I	L.S	Prom *	L.I	L.S
T1	Becolsu b®	NO	8,7 *	7,8	9,6	14,9	13,7	16,2	12,5 *	8,0	17,0	36,1	30,7	41,5
T7	Becolsu b®	SI	4,1 *	3,9	4,5	16,4	15,9	16,9	19,9 *	18,9	21,0	40,5	39,0	42,0
T2	Ecomil 16 h ferm	NO	4,4	3,7	5,1	11,5	10,2	12,8	17,6	15,7	19,5	34,1	30,2	38,0
T8	Ecomil 16 h ferm	SI	4,4	3,8	5,1	12,3	10,8	13,1	19,1	16,9	21,3	35,9	31,5	40,2
T3	Ecomil 20 h ferm	NO	5,7	3,6	7,7	6,4	5,0	7,9	13,2	10,4	15,9	25,3	19,6	30,9
T9	Ecomil 20 h ferm	SI	7,2	6,0	8,4	7,4	7,1	7,8	15,7	15,0	16,4	30,3	28,4	32,2
T4	Ecomil enzima	NO	4,4	4,2	4,6	19,4	18,7	20,1	22,7	21,4	24,0	46,5	45,1	47,9
T10	Ecomil enzima	SI	4,4	4,1	4,7	20,0	18,9	21,2	24,2	22,9	25,5	48,6	46,1	51,1
T5	Tanque tina 1C	NO	1,9	1,5	2,3	5,6	5,1	6,0	12,5	11,8	13,2	20,0	19,1	20,9
T11	Tanque tina 1C	SI	2,0	1,7	2,3	5,6	4,8	6,4	12,9	12,5	13,3	20,5	19,5	21,5
T6	Tanque tina 2C	NO	0,03	-0,01	0,07	1,5	1,2	1,7	3,9	3,7	4,1	5,4	5,0	5,8
T12	Tanque tina 2C	SI	0,06	0,05	0,08	1,7	1,4	1,9	4,1	3,6	4,5	5,8	5,2	6,4

* Promedios seguidos del signo son diferentes estadísticamente (Tukey 5%),

L,S: Límite Superior

L,I: Límite Inferior

Intervalo de Confianza (95%)

Prom, Promedio

Tabla 18. Evaluación del efecto de la esterilización en el pH, temperatura y ° Brix de los mucílagos evaluados

Trat	Descripción	Esterilizado	pH			Temperatura °C			° Brix (%)		
			Prom,	L,I	L,S	Prom,	L,I	L,S	Prom,	L,I	L,S
T1	Becolsub®	NO	5,18	5,17	5,19	25,9	25,5	26,2	7,5	7,2	7,7
T2	Ecomil 16 h ferm	NO	4,2	4,0	4,5	25,5	24,9	26,1	7,2	7,0	7,4
T3	Ecomil 20 h ferm	NO	3,9	3,9	3,9	21,0	20,5	21,5	7,1	7,0	7,2
T4	Ecomil enzima	NO	4,4	4,3	4,4	26,2	24,8	27,6	8,8	7,9	9,7
T5	Tanque tina 1C	NO	3,5	3,4	3,7	26,2	25,2	27,1	6,0	5,9	6,2
T6	Tanque tina 2C	NO	3,6	3,4	3,8	26,8	26,2	27,3	2,0	1,9	2,1
T7	Becolsub®	SI	4,7	4,6	4,9	24,8	23,3	26,3	7,8	7,6	8,0
T8	Ecomil 16 h ferm	SI	4,1	3,8	4,3	26,3	24,2	28,4	7,7	6,9	8,4
T9	Ecomil 20 h ferm	SI	3,9	3,8	3,9	26,2	23,2	29,2	7,3	6,9	7,6
T10	Ecomil enzima	SI	4,3	4,2	4,5	26,8	25,4	28,3	10,0	9,5	10,5
T11	Tanque tina 1C	SI	3,6	3,5	3,7	25,7	24,2	27,3	6,1	5,9	6,2
T12	Tanque tina 2C	SI	3,8	3,5	4,2	26,2	24,6	27,8	2,1	2,1	2,2

Intervalo de Confianza (95%)

Para las variables complementarias, se observa una disminución del pH a medida que el mucílago sufre procesos de fermentación siendo los más ácidos los obtenidos en el tanque tina y con Ecomil® con las diferentes horas de fermentación (Tabla 18). En cuanto a la variable ° Brix responde gradualmente a la composición de los mucílagos, mostrando diferencias para los mucílagos que han sido degradados por la acción de los microorganismos externos durante la fermentación, Esta metodología podría ser utilizada como método rápido para determinar la concentración de azúcares totales, en protocolos de laboratorio.

En términos generales, el efecto del proceso de esterilización mediante autoclave (15 min a 120°C y 15 psi.), no afecta la composición de los azúcares para los mucílagos evaluados, Las pocas diferencias encontradas, obedecen a la naturaleza del sustrato debido al sometimiento a tiempos de fermentación, como es el caso de los tratamientos T5-T11 y T6 – T12.

Aunque la composición de azúcares no se afecta, los procesos de hidrólisis naturales generados particularmente por las enzimas naturales con que cuenta el mucílago, pueden ser no ser suficientes para mantener la integridad del sustrato (mucílago), el sometimiento a temperaturas de refrigeración. Con el objeto de realizar estudios detallados sobre las dinámicas de degradación de estos azúcares, se hace necesario someter los sustratos a procesos térmicos como el de esterilización, además se logra evitar la contaminación por organismos contaminantes.

11.2.2 Segunda actividad: Efecto de la esterilización, sobre la composición de azúcares reductores en los diferentes mucílagos y la producción de alcoholes por *S. cerevisiae*.

Para el desarrollo de esta actividad se seleccionaron dos mucílagos contrastantes: el primero proveniente del Becolsub® y el segundo del Ecomill® con un tiempo de 20 h de fermentación (Tabla 7) con un tratamiento de esterilización en autoclave (15 min a 120°C y 15 psi). Cabe anotar que todos los sustratos se ajustaron a pH 5,0 con NaOH (1M) antes de la inoculación con la levadura.

En la tabla 19, se presentan los análisis fisicoquímicos de los sustratos con y sin sometimiento a esterilización y en las tablas 20 y 21, se presentan los resultados del efecto de la esterilización en el variable porcentaje de azúcares dado en °Brix y pH respectivamente.

Tabla 19. Análisis fisicoquímico mucílago fermentado proveniente del Ecomill® y del Becolsub®, con y sin esterilización

Variable	T 1	T 2	T 3	T 4
Sólidos totales [ppm]	68.462,5	66.163,75	76.046,25	67.562,5
Sólidos suspendidos totales [ppm]	32,4	38	27,6	16,4
DQO [ppm]	89,8	88,4	83,2	85,6
Color [U Pto-Co]	33,6	32,6	16	14
Turbiedad [NTU]	9,6	9,4	5,2	5
pH	5,11	4,9	4,86	4,71
Volumen (mL)	300	300	300	300

T1: Mucílago con 20 h de fermentación obtenido del Ecomill® con esterilización
T2: Mucílago con 20 h de fermentación obtenido del Ecomill® sin esterilización
T3: Mucílago obtenido del Becolsub® con esterilización
T3: Mucílago obtenido del Becolsub® sin esterilización
ppm: partes por millón
DQO: Demanda Química de Oxígeno
U Pt-Co: Platino-Cobalto
NTU: Unidades neferométricas de turbiedad

Tabla 20. Efecto de la esterilización en la concentración de azúcares dado en °Brix

Antes de fermentación				Después de 36 h de fermentación		
Tratamiento	°Brix (%)			°Brix (%)		
	Prom. *	L.I	L.S	Prom. *	L,I	L,S
T1	6,82 c	6,66	6,98	5,96 b	5,77	6,15
T2	7,12 b	7,02	7,22	6,36 a	6,10	6,62
T3	7,54 a	7,47	7,61	4,24 c	4,13	4,35
T4	7,48 a	7,24	7,72	4,14 c	4,03	4,25
ANAVA Pr>F	< 0,0001 MDS: 0,2289			< 0,0001 MDS: 0,2591		

* Promedios seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey 5%)
Intervalo de Confianza (95%)

Tabla 21. Efecto de la esterilización en el pH del sustrato						
Antes de fermentación				Después de 36 h de fermentación		
Tratamiento	pH (unidades)			pH (unidades)		
	Prom. *	L.I	L.S	Prom.*	L.I	L.S
T1	3,93 c	3,92	3,94	5,96 b	5,77	6,15
T2	3,92 c	3,91	3,94	6,36 a	6,10	6,62
T3	4,89 b	4,86	4,91	4,24 c	4,13	4,35
T4	5,18 a	5,17	5,19	4,14 c	4,03	4,25
ANAVA Pr>F	< 0,0001 MDS: 0,0253			< 0,0001 MDS: 0,2591		
* Promedios seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey 5%), Intervalo de Confianza (95%)						

En términos generales, para ninguno de los sustratos evaluados se presentó diferencias significativas entre antes o después de la esterilización para la variable evaluada. Los resultados obtenidos, ratifican lo hallado en la primera actividad. Las diferencias encontradas, obedecen a la naturaleza del sustrato debido al mayor tiempo de fermentación (20 h), del sustrato proveniente del Ecomill®.

Lo anterior se reitera en los resultados de las concentraciones individuales de los azúcares evaluados (fructosa, glucosa y sacarosa), antes de fermentación (Tabla 22) y después de 36 h de fermentación (Tabla 23), en donde el efecto de la esterilización no presenta diferencias entre los sustratos.

Tabla 22. Resultados del análisis por HPLC de la concentración de azúcares disponibles de los sustratos S1 y S5, y efecto de la esterilización, antes de la fermentación alcohólica

Tratamiento	Fructosa (g/L)			Glucosa (g/L)			Sacarosa (g/L)		
	Prom. *	L.I	L.S	Prom.*	L.I	L.S	Prom.*	L.I	L.S
T1	2,06 b	1,74	2,39	7,38 b	6,43	8,33	0,41 c	0,32	0,51
T2	1,97 b	1,91	2,04	6,94 b	6,76	7,13	0,36 c	0,35	0,37
T3	8,9 2 a	4,82	12,82	9,74 b	4,11	15,38	17,92 a	13,14	22,69
T4	11,11 a	7,90	14,33	14,64 a	11,41	17,88	8,94 b	7,41	10,47
ANAVA Pr>F	< 0,0001 MDS: 2,7079			0,0004 MDS: 3,4581			< 0,0001 MDS: 2,6396		

* Promedios seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey 5%), Intervalo de Confianza (95%)

La dinámica del aprovechamiento de los azúcares disponibles por parte de *S. cerevisiae* aunque se mantiene un remanente de glucosa en todos los sustratos, es completo (Tabla 23).

Tabla 23. Resultados del análisis por HPLC de la concentración de azúcares disponibles de los sustratos S1 y S5, después de 36 horas de fermentación

Tratamiento	Fructosa (g/L)			Glucosa (g/L)			Sacarosa (g/L)		
	Prom. *	L.I	L.S	Prom. *	L.I	L.S	Prom. *	L.I	L.S
T1	0,0	0,0	0,0	0,28 a	0,26	0,31	0,0	0,0	0,0
T2	0,0	0,0	0,0	0,29 a	0,27	0,30	0,0	0,0	0,0
T3	0,0	0,0	0,0	0,24 a	0,16	0,31	0,0	0,0	0,0
T4	0,0	0,0	0,0	0,25 a	0,21	0,30	0,0	0,0	0,0
ANAVA Pr>F	-----			0,0423 MDS: 0,0488			-----		

* Promedios seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey 5%), Intervalo de Confianza (95%)

En términos generales, la comparación de la concentración promedio de azúcares disponibles en los sustratos S1 y S5 mostró diferencias significativas entre sustratos (ANOVA 5% - $P < 0,05$), siendo más acentuada esta diferencia después de ser sometidos a esterilización para los tratamientos T1 y T2 en comparación con T3 y T4 respectivamente (Tabla 22).

Lo anterior se debe posiblemente, por la presencia de microorganismos que degradan principalmente las fuentes de sacarosa como azúcar primario en la formación de azúcares menos complejos, favorecidos por el tiempo previo de fermentación mantenido en los tratamientos T1 y T2. La prueba de comparación de promedios (Tukey 95%), para las variables fructosa y glucosa, mostró la formación de dos grupos estadísticamente diferentes mientras que para la variable sacarosa, la formación de tres grupos estadísticamente diferentes.

En cuanto a la producción de alcoholes para cada uno de los sustratos evaluados, los resultados se presentan en las tablas 24 y 25. Se observa producción de los alcoholes evaluados y la principal producción es la de etanol. Esta depende principalmente del tipo de sustrato, debido a que la presencia de microorganismos originada a partir del proceso de fermentación por el tipo de sistema (Ecomill® con fermentación de 20 h), es estadísticamente diferente antes de la esterilización, en comparación con el sustrato proveniente del Becolsub®, independiente si se esteriliza o no el sustrato. Esta tendencia se refleja pasado el proceso de fermentación en donde es mayor esta tendencia particularmente en el principal alcohol producido (etanol) (Tabla 24).

Tabla 24. Resultados del análisis por Cromatografía de Gases de la producción de alcoholes a partir de los sustratos S1 y S5, y efecto de la esterilización del sustrato, antes de la fermentación alcohólica

Tratamiento	2-Butanol (g/L)			Etanol (g/L)			Metanol (g/L)		
	Prom. *	L.I	L.S	Prom. *	L.I	L.S	Prom. *	L.I	L.S
T1	1,03 d	0,98	1,07	11,32 b	9,20	13,43	1,62 b	1,38	1,85
T2	1,59 c	1,33	1,85	12,84 a	12,38	13,30	1,55 b	1,37	1,73
T3	2,46 a	2,44	2,49	0,0 c	0,0	0,0	1,94 a	1,79	2,08
T4	2,07 b	1,65	2,49	0,12 c	0,0	0,34	1,96 a	1,93	1,98
ANAVA Pr>F	< 0,0001 MDS: 0,2611			< 0,0001 MDS: 1,1444			< 0,0001 MDS: 0,1735		

* Promedios seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey 5%)

Intervalo de Confianza (95%)

Tabla 25. Resultados del análisis por Cromatografía de Gases de la producción de alcoholes a partir de los sustratos S1 y S5, y efecto de la esterilización, después de 36 h de fermentación

Tratamiento	2-Butanol (g/L)			Etanol (g/L)			Metanol (g/L)		
	Prom. *	L.I	L.S	Prom. *	L.I	L.S	Prom. *	L.I	L.S
T1	0,0	0,0	0,0	19,81 a	10,50	29,13	1,87 a	1,57	1,16
T2	0,0	0,0	0,0	33,85 ab	25,50	42,21	1,59 ab	1,18	2,00
T3	0,0	0,0	0,0	40,43 a	34,52	46,34	1,57 b	1,43	1,70
T4	0,0	0,0	0,0	26,80 bc	22,47	31,13	0,94 c	0,91	0,98
ANAVA Pr>F	-----			0,0001 MDS: 7,6337			< 0,0001 MDS: 0,2764		

* Promedios seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey 5%), Intervalo de Confianza (95%)

11.3 TERCERA ETAPA (Resultados)

Dinámica de consumo de azúcares y producción de bio-alcoholes, a partir de mucílagos procesados en diferentes sistemas para el Beneficio Ecológico del café,

El análisis de la concentración (ppm) del total de azúcares totales disponibles, considerados como la sumatoria de los azúcares independientes (reductores y no reductores) se ajustaron a las tres regresiones que explicaron mejor el modelo (tabla 26), con la ayuda del programa CurveExpert Professional 2,4®.

Tabla 26. Modelos evaluados para determinar el mejor ajuste del comportamiento en el consumo de azúcares totales, para cada uno de los tratamientos evaluados

Armónico *	Exponencial *	Hiperbólico*
$y = q_0 / (1 + x/a)$	$y = ae^{bx}$	$y = q_0 (1 + bx/a)^{-1/b}$

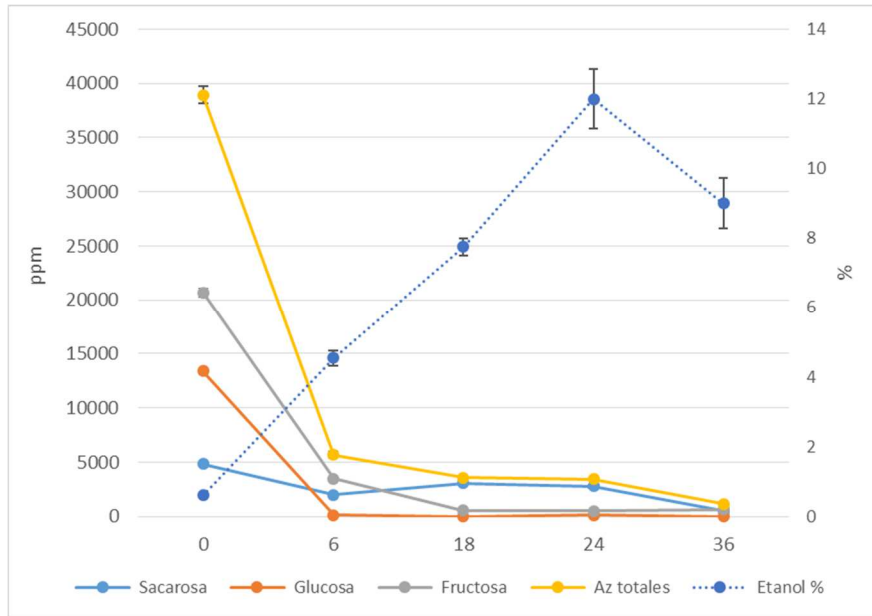
Para cada tratamiento, los modelos se ajustaron mediante la prueba Akaike (AIC por sus siglas en ingles) y la prueba F (según el caso), se determinó como el mejor modelo el Exponencial. En el Anexo 2, se presentan los resultados de las comparaciones y en el Anexo 3, se presentan los parámetros para cada modelo ajustado para la variable consumo de azúcares.

En la tabla 27, se presenta la comparación de las tasas de consumo para los tratamientos evaluados, para las que se presentaron diferencias (5% ANAVA - $P < 0,0001$) el anava mostró diferencias significativas para los tratamientos análisis de varianzan las tasas para el consumo de azúcares totales.

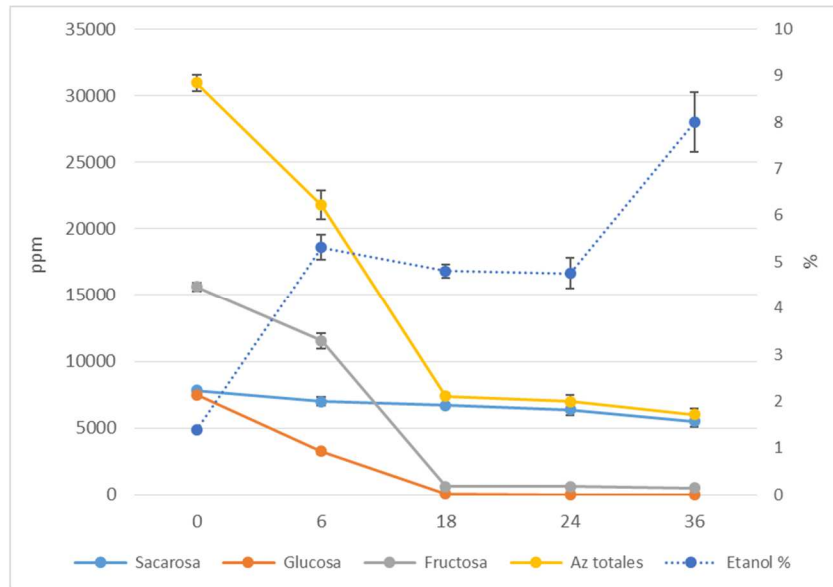
Tabla 27. Comparación de las tasas de consumo de azúcares totales, para cada uno de los tratamientos evaluados.

Tratamiento	Ajuste modelo exponencial $y = ae^{bx}$		
	Pendiente (b)	L,I	L,S
T1	- 0,95 b	-1,18	-0,71
T2	- 0,39 a	-0,42	-0,37
T3	- 0,56 a	-0,57	-0,54
T4	- 0,51 a	-0,52	-0,48
T5	-0,41 a	-0,43	-0,39
T6	- 1,06 b	-1,28	-0,83
ANAVA Pr>F	< 0,0001 MDS: 0,2112		
* Promedios seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey 5%), Intervalo de Confianza (95%)			

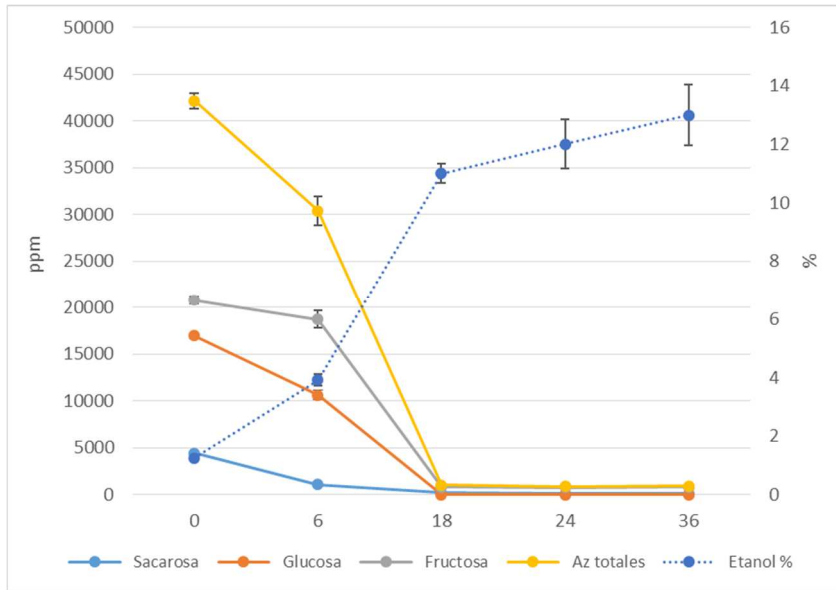
En las gráficas de 2 a 7, se presenta la tendencia del modelo propuesto y presentado por el ajuste al modelo seleccionado (Anexo 5).



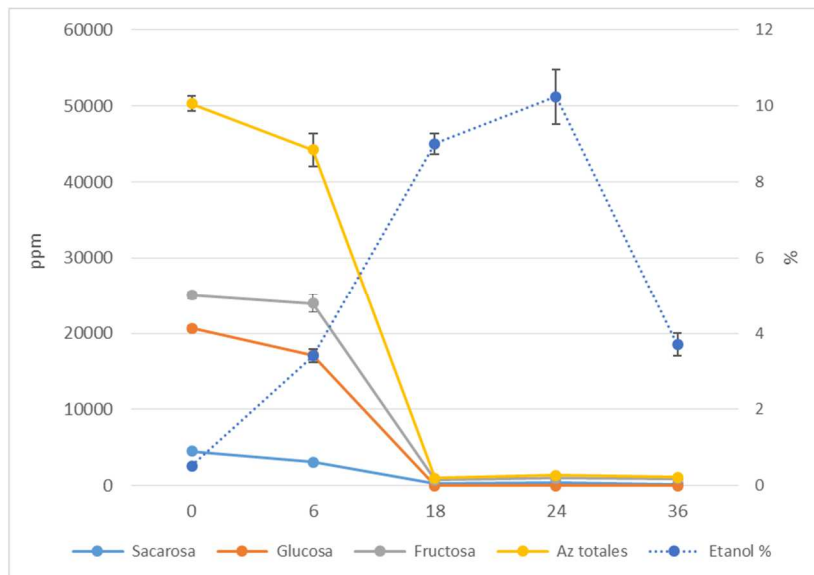
Gráfica 2. Dinámica del consumo de azúcares y producción de alcoholes, por *S. cerevisiae* utilizando como sustrato mucílago proveniente del proceso de beneficio de café con Ecomill® y 16 h de fermentación (I E.E)



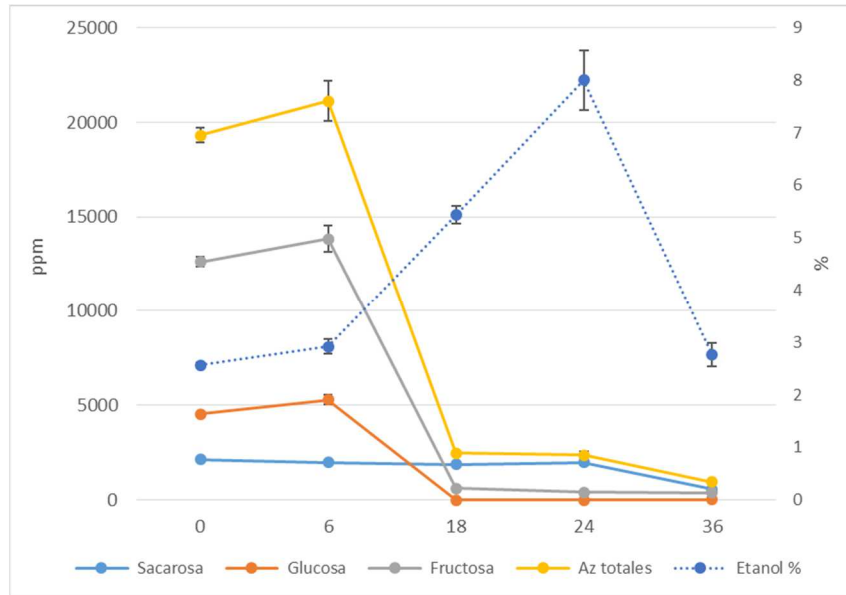
Gráfica 3. Dinámica del consumo de azúcares y producción de alcoholes, por *S. cerevisiae* utilizando como sustrato mucílago proveniente del proceso de beneficio de café con Ecomill® y 20 h de fermentación. (I E.E)



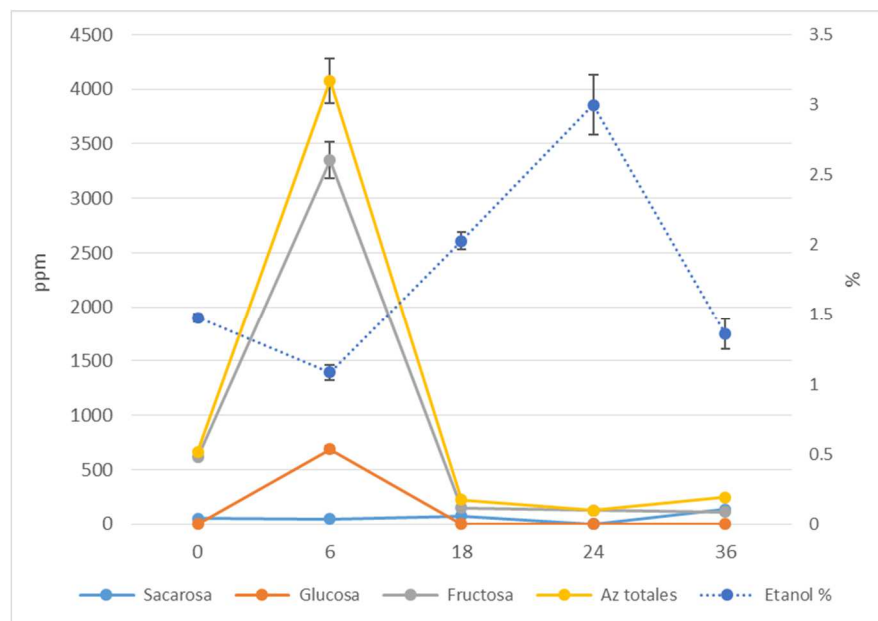
Gráfica 4. Dinámica del consumo de azúcares y producción de alcoholes, por *S. cerevisiae* utilizando como sustrato mucílago proveniente del proceso de beneficio de café con Becolsub®. (I E.E)



Gráfica 5. Dinámica del consumo de azúcares y producción de alcoholes, por *S. cerevisiae* utilizando como sustrato mucílago proveniente del proceso de beneficio de café con Ecomill® y adición de enzima, sin fermentación. (I E.E)



Gráfica 6. Dinámica del consumo de azúcares y producción de alcoholes, por *S. cerevisiae* utilizando como sustrato mucílago proveniente del proceso de beneficio de café con Tanque Tina (primera cabeza de lavado). (I E.E)



Gráfica 7. Dinámica del consumo de azúcares y producción de alcoholes, por *S. cerevisiae* utilizando como sustrato mucílago proveniente del proceso de beneficio de café con Tanque Tina (segunda cabeza de lavado). (I E.E)

La actividad de *S. cerevisiae*, es clara con residuos bajos en azúcares totales, y la dinámica de consumo se refleja igualmente en la producción de etanol. No obstante, los remanentes de azúcares aprovechables son inferiores a los mejores tratamientos (mucílago obtenido de proceso de Ecomill® con enzima y de Becolsub®, para el caso del mucílago obtenido a partir del tanque tina (cabezas de lavado 1 y 2) presenta una posibilidad de optimizar su uso.

Las producciones de etanol, para las que en términos generales, los tiempos máximos de producción están entre las 16 y 20 h de fermentación para todos los tratamientos, siendo los mucílagos provenientes del Becolsub® (14 %), Ecomill® con enzima y cero horas de fermentación (11%) los de mayor producción respectivamente. Este último, presenta un comportamiento particular (gráficas 2 – 7). Al final del tiempo de fermentación, el porcentaje de etanol disminuye; posiblemente se deba esto al incremento de crecimiento vegetativo en las primeras horas de fermentación pues la aparente mayor disponibilidad de azúcares reductores (principalmente de fructosa) provenientes de inulina y de la degradación del ácido galacturónico y glucosa como fuente adicional de la degradación de la pectina remanente en el mucílago (y no detectables) debida a la pectinasa adicionada como parte del proceso de desmucilaginado, hacen que posiblemente se active la producción de las enzimas propias de la levadura y agoten el sustrato disponible más rápido y se vea afectada la producción de etanol.

12. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados encontrados, el mayor consumo promedio por hora del total de azúcares presentes en el medio YPDC durante 36 h de crecimiento, se obtuvo a una temperatura de incubación de 35 °C con 29,64 ppm / h. El menor consumo se obtuvo a 25 °C con 10,52 ppm / h. Bajo las condiciones evaluadas, los resultados del porcentaje de producción total de alcoholes determinados por CG, no mostraron diferencias significativas entre tratamientos (5% ANAVA - $P < 0,0001$); los porcentajes estuvieron entre 1,8 % y 2,7 % para 25 °C y 35 °C, respectivamente.

Para el análisis de los porcentajes de alcoholes individuales, en ninguna de las temperaturas evaluadas se detectó producción de propanol, y los porcentajes de isobutanol fueron mínimos (0,02%). El anava, mostró diferencias significativas para los porcentajes de butanol (Pr F= 0,0004) y la prueba de comparación de promedios (Tukey 95%), mostró diferencias entre tratamientos, siendo el porcentaje de butanol producido a 25 °C, el menor (0,31%). Este mismo comportamiento se refleja en el análisis del porcentaje de cada alcohol.

De la producción total de alcoholes producidos al final del tiempo de crecimiento, el etanol fue el que presentó para todas las temperaturas evaluadas el mayor porcentaje.

En términos generales, el efecto del proceso de esterilización mediante autoclave (15 min a 120°C y 15 psi,), no afecta la composición de los azúcares para los mucílagos.

Para las variables complementarias, se observa una disminución del pH a medida que el mucílago sufre procesos de fermentación siendo los más ácidos los obtenidos en el tanque tina y con Ecomill® con las diferentes horas de fermentación, En cuanto a la variable ° Brix responde gradualmente a la composición de los mucílagos, mostrando diferencias para los mucílagos que han sido degradados por la acción de los microorganismos externos durante la fermentación.

En cuanto a la producción de alcoholes para cada uno de los sustratos evaluados, se observa una mayor producción de etanol, la cual depende principalmente del tipo de sustrato utilizado.

Las producciones de etanol fueron máximas para tiempos de fermentación entre las 16 y 20 h, siendo los mucílago provenientes del Becolsub® (14%) y Ecomill® con enzima y cero horas de fermentación (11%) los de mayor producción respectivamente.

Los atributos que se puedan dar de una manera puntual y que ayuden a valorizar un subproducto como el caso del mucílago del café, que bien llamado puede ser “residuo energético” y de la mano de herramientas de punta como la biotecnología, permitirá llevarlos a niveles en los que antaño, no se podía pensar; su valorización es una oportunidad para la generación de bioproductos que fortalecerían la cadena productiva del café.

Aunque la estrategia para aprovechar el mucílago del café como fuente energética no es novedosa, los resultados aquí presentados aportan elementos para modificar sustancialmente tanto la visión sobre su valoración, pasando por su diversidad en cuanto a composición y calidad como el marco legal nacional y mundial en que los biocombustibles se rigen actualmente.

Adicionalmente y no menos relevante, al reducir el impacto negativo que los desechos del proceso de café causan al ambiente, el caficultor mejora su calidad de vida, la de su familia y la de su comunidad, a la vez que puede mejorar sus ingresos económicos, al obtener un producto con connotación de sostenibilidad.

13. RECOMENDACIONES

A partir de los parámetros obtenidos, realizar trabajos para la producción de alcoholes en volúmenes de 1, 10 y 100 L con el fin de estandarizar los parámetros de producción en su escalamiento.

Evaluar el uso potencial de los sustratos obtenidos, en la obtención de subproductos como aceites, amoniaco entre otros, a partir de bio-transformación con otros microorganismos como *Yarrowia lipolytica*.

Evaluar la obtención de co-productos a partir del uso de los residuos obtenidos de la fermentación de los diferentes sustratos, en el marco del concepto de biosistemas integrados.

14. BIBLIOGRAFIA

- ANTIER, P.; MINJARES; A; ROUSSOS, S. y VINIEGRA-GONZALES, G. (1993a). New approach for selecting pectinase producing mutants of *Aspergillus niger* well adapted to solid state fermentation. *Biotech. Adv.*, 11, 429-440.
- ANTIER, P.; MINJARES; A; ROUSSOS, S; RAIMBAULT, M. y VINIEGRA-GONZALES, G. (1993). Pectinase hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C 28B25 for solid state fermentation of coffee pulp. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 15, 1-17.
- AQUIAHUATL, M.; RAIMBAULT, M.; ROUSSOS, S. y TREJO, M.R. (1988). Coffee pulp detoxification by solid state fermentation: isolation, identification and physiological studies. In: M. Raimbault (Ed.). *Proceeding of the Seminar on solid state fermentation, Bioconversion of Agro-industrial raw materials*. ORSTOM, Montpellier, France.
- ARANDA, E. (1991). El vermicompostaje: una nueva alternativa para la transformación de la pulpa de café en abono orgánico. En: *Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria cafetalera*, 2,10. Manizales, Colombia., 4-7 Noviembre.
- ARCILA, P. J.; JARAMILLO, R.A. (2003). Relación entre la humedad del suelo, la floración y el desarrollo del fruto del cafeto. *Avances Técnicos. Cenicafé No. 311*. 8p.
- ARIAS, M.; RUIZ C., A.A. Fermentación alcohólica de mucílago de café con levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Ciencia y tecnología de alimentos* 11(1):66-74. 2001.
- ASTHER, M.; ESTRADA- ALVARADO, M. I.; HAON, M.; NAVARRO, D.; ASTHER, M.; LESAGE-MEESSEN, L. y RECORD, E. (2005). Purification and characterization of a chlorogenic acid hydrolase from *Aspergillus niger* catalysing the hydrolysis of chlorogenic acid. *Journal of Biotechnology*, 115, 47-56.
- AVALLONE, S.; GUIRAUD, J.P.; GUYOT, B.; OLGUIN P., E.; BRILLOUET, J.M. Polysaccharide constituents of coffee-bean mucilage. *Journal of food science* 65(8):1308-1311. 2000.
- BELLO-MENDOZA, R. y SÁNCHEZ, J. E. (1997). Anaerobic filter treatment of wastewater from mushroom cultivation on coffee pulp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13, 51-55
- BOCCAS, F.; ROUSSOS, S; GUTIERREZ, M; SERRANO, L. y VINIEGRA, G. (1994). Production of pectinase from coffee pulp in solid state fermentation system: selection of wild fungal isolate of high potency by a simple three- step screening technique. *J. Food Sci. Technol.*, 31, p. 22-26.

BRAND, D.; PANDEY, A.; ROUSSOS, S. y SOCCOL, C.R. (2000). Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 127-133.

BUITRAGO A., J.; CALLE V., H.; GALLO C., J.T.; CORSO M., M.A. (1970). Evaluación de la melaza de café en dietas para cerdos en crecimiento y acabado. *Revista ICA (Colombia)* 5(4):407-410.

BRESSANI, R. 1975. Use of coffee processing waste as animal feed and industrial raw material. En: Reunión Anual del Instituto de Tecnólogos de Alimentos (IFT). 8-12 de junio de 1975. Chicago, EE.UU.

BRESSANI, R.; ESTRADA, E.; JARQUÍN, R. 1972. Pulpa y pergamino de café. I. Composición química y contenido de aminoácidos de la proteína de la pulpa. *Turrialba (Costa Rica)* 22: 299-304.

BRESSANI, R. (1979). Pulpa de café: composición, tecnología y utilización. Ed. Española. España.

CALZADA, J. F. (1990). Biogás de subproductos del beneficio húmedo del café. División de investigación aplicada. Instituto Americano de Investigación y Tecnología Industrial (ICAITI). Guatemala.

CALLE V., H. (1977). Subproductos del café. Chinchiná, CENICAFÉ. 84 p. (Boletín Técnico N° 6).

CALLE V., H. (1973). Baterías eléctricas con pulpa y mucílago de café. Chinchiná, CENICAFÉ. 4 p (Avances Técnicos N° 25).

CALLE V., H. (1962). Métodos de extracción de las pectinas del café. *Cenicafé* 13(2):69-74.

CALLE V., H. (1960). Aceites del café. *Cenicafé* 11(9):251-258.

CALLE., H. (1955 b). Perspectivas para el empleo de la pulpa y ripios del café como materiales curtientes. *Cenicafé* 6(62):69-71.

CALLE., H. (1951 a). Propagación de levaduras alimenticias en la pulpa y mucílago del café. *Revista Cafetera de Colombia* 10(122):3730-3732.

CALLE., H. (1951 b). Producción de alcohol con los desperdicios del café. *Cenicafé* 2(22):33-34.

CAMAYO V., G.C.; CHAVES C., B.; ARCILA P., J.; JARAMILLO R., (2003). Desarrollo floral del cafeto y su relación con las condiciones climáticas de Chinchiná, Caldas. *CENICAFE* 54 (1): 35-29.

CARBONELL, A.; VILANOVA, M. 1974. Beneficiado rápido y eficiente del café mediante el uso de soda cáustica. En: Cleves, R. Justificación de un proyecto para investigar la obtención de pectina a partir del mucílago del café. Departamento de Estudios Técnicos y Diversificación. Proyecto 1. Subproyecto 5. Oficina del Café, San José, Costa Rica.

CARPINTERO, O. (2006). «Biocombustibles y uso energético de la biomasa: un análisis crítico». *El ecologista* (49). ISSN 1575-2712.

CORPOCALDAS. (2013). Informe Aguas de Manizales S.A ESP. Plan de Saneamiento y Manejo de Vertimientos de Manizales. Documento inedito. 64 pp

ELIAS, L.G. Composición química de la pulpa de café y otros subproductos. p. 19-29. En: PULPA de café: Composición tecnología y utilización. Bogotá: CIID, 1978. 152 p.

EZEJI T.; QURESHI N.; BLASHEK H.P. (2007). Production of acetone-butanol-ethanol (ABE) in a continuous flow bioreactor using degermed corn and *Clostridium beijerinckii*. *Process Biochem* 42 (1): 34-39.

FAVELA, E.; HUERTA, S.; ROUSSOS, S.; OLIVARES, G.; NAVA, G.; VINIEGRA, G. y GUTIÉRREZ, M. (1989). Producción de enzimas a partir de pulpa de café y su aplicación en el beneficio húmedo. Primer Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetalera. México.

FEDERACIÓN NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA – FNC. (2013). Gerencia General. Informe del gerente General de la Federación Nacional de Cafeteros al LXXIX Congreso Nacional de Cafeteros. Bogotá (Colombia), FNC, 2013. 71p.

FEDERACIÓN NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA – FNC. (2017). FNC en cifras (Tomado de: <https://www.federaciondecafeteros.org/static/files/FNCCIFRAS2017.pdf>) Última consulta: 30/01/2017

GLOBAL SUBSIDIES INITIATIVE – GSI.IISD. (2014). The impact of fossil-fuel subsidies on renewable electricity generation. <http://www.iisd.org/sites/default/files/publications/impact-fossil-fuel-subsidies-renewable-electricity-generation.pdf> (Última consulta febrero 2017)

GUO Y, et al. (2015) YeastFab: the design and construction of standard biological parts for metabolic engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 43(13):e88.

HAMELINK C.N.; FAAIJ A.P.C. (2002). Future prospects for production of methanol and hydrogen from biomass. *Journal Power Sources*. 111: 1-22

HUGHES, S.R.; BANG, S.S.; COX, E.J.; SCHOEPKE, A.; OCHWAT, K.; PINKELMAN, R.; NELSON, D.; QURESHI, N.; GIBBONS, W.R.; KURTZMAN, C.P.; BISCHOFF, K.M.; LIU S.; COTE, G.L.; RICH, J.O.; JONES, M.A.; CEDEÑO, D.; DORAN P., J.; RIAÑO H., N.M.; RODRIGUEZ V., N.; LÓPEZ N., J.C. 2013. Automated UV-C mutagenesis of *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-1109 and selection for microaerophilic growth and ethanol production at elevated temperature on biomass sugars. *Journal of laboratory automation* 18(4):276-290.

HUGHES, S.R.; LÓPEZ N., J.C.; JONES, M.A.; MOSER, B.R.; COX, E.J.; LINDQUIST, M.; GALINDO L., L.A.; RIAÑO H., N.M.; RODRIGUEZ V., N.; GAST H., F.; CEDEÑO, D.L.; TASAKI, K.; BROWN, R.C.; DARZINS, A.; BRUNNER, L. 2014. Sustainable conversion of coffee and other crop wastes to biofuels and bioproducts using coupled biochemical and

thermochemical processes in a multi stage biorefinery concept. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98(20):8413-8431.

HUGHES, S.R.; COX, E.J.; BANG, S.S.; PINKELMAN, R.J.; LÓPEZ N., J.C.; SAHA, B.C.; QURESHI, N.; GIBBONS, W.R.; FRY, M.R.; MOSER, B.R.; BISCHOFF, K.M.; LIU, S.; STERNER, D.E.; BUTT, T.R.; RIEDMULLER, S.B.; JONES, M.A.; RIAÑO H., N.M. 2015. Process for assembly and transformation into *Saccharomyces cerevisiae* of a synthetic yeast artificial chromosome containing a multigene cassette to express enzymes that enhance xylose utilization designed for an automated platform. *Journal of Laboratory Automation* DOI: 10.1177/2211068215573188.

KOPPERLAAR R. 2012. World energy consumption beyond 500 exajoules. Santa Rosa, California; Post Carbon Institute; (<http://www.resilience.org/stories/2012-02-16/world-energy-consumption-beyond-500-exajoules>). Última consulta: 18/02/2016.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S. y TEWARI, R. (2001). Applications of pectinases in the comercial sector: a review. *Bioresource Technology*, 77, 215-227.

LOERA, O.; AGUIRRE, J. y VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. (1999). Pectinase production by a diploide construct from two *Aspergillus niger* overproducing mutants. *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 103-108.

LEE S.Y. et al. (2008). Fermentative butanol production by *Clostridia*. *Biotechnology Bioenergy* 102 (2): 209-28.

LÓPEZ A., M.; CALLE V., H. (1956). Valor comparativo de la pulpa de café descompuesta como abono. *Cenicafé* 7(81):285-297.

MÁDIGAN, M.; MARTINKO, J.; PARKER J. (1998). *Biología de los Microorganismos*. 8° Edición, traducido de *Book Biology of Microorganisms*, Prentice Hall, Inc

MARCOS-MÉNDEZ, M. (1981). Posibilidades reales de utilización o tratamiento de los desechos del beneficiado e industrialización del café en Venezuela. *FUDECO. Boletín Informativo. Suplemento técnico No. 27*. Venezuela.

MARTÍNEZ N., N.G. Coffee mucilage: Its chemical composition. *Coffee and tea industries and the flavor field* 82(8):17-18. 1959.

MASOUD, W. y JESPERSEN, L. (2006). Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa. *International Journal of Microbiology*, 110, 291-296.

MENCHU E., J.F.; ROLZ, C. Coffee fermentation technology. *Café cacao* the 17(1):53-61. 1973.

NI Y.; SUN Z. (2009). Recent progress son industrial fermentative production of acetone-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum* in China. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 83(3):415-23.

OLIVEROS T., C.E.; ÁLVAREZ G., J.; ÁLVAREZ M., F.; RAMÍREZ G., C.A.; ÁLVAREZ H., J.R. El BECOLSUB 100: Beneficio ecológico para pequeños productores. Avances Técnicos Cenicafé No. 261:1-4. 1999.

OLIVEROS T., C.E.; SANZ U., J.R.; RAMÍREZ G., C.A.; ÁLVAREZ G., J.; ÁLVAREZ H., J.R. El BECOLSUB 300. Avances Técnicos Cenicafé No. 253:1-8. 1998.

OLIVEROS T., C.E.; SANZ U., J.R.; RAMÍREZ G., C.A.; TIBADUIZA V., C.A. Ecomill. Tecnología de bajo impacto ambiental para el lavado del café. Avances Técnicos Cenicafé (Colombia) No. 432:1-8. 2013.

ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DEL CAFÉ- OIC, (2016). Informe del Mercado del Café. Febrero 2016. (Tomado de: <http://www.ico.org/documents/cy2015-16/cmr-0216-c.pdf>). Última fecha de consulta 7/2/2017.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T; VANDENBERGHE, L. P. S. y MOHAN, R. (2000a). Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. Bioresource Technology, 74, 81-87.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; BRAND, D.; MOHAN, R. y ROUSSOS, S. (2000b). Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. Biochemical Engineering Journal, 6, 153-162.

PEDRONI-MEDEIROS, A. B.; CHRISTEN, P.; ROUSSOS, S.; GERN, J. C. y SOCCOL, C. R. (2003). Coffee residues as substrates for aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in solid state fermentation. Brazilian Journal of Microbiology, 34 (3), Jul/Sep.

PRATA, E. R. y OLIVEIRA, L. S. (2006). Fresh coffee husks as potential sources of anthocyanins. LWT. Article in press, available online in ScienceDirect.

PEE, W. VAN; CASTELEIN, J. The yeast flora of fermenting robusta coffee. East African agricultural and forestry journal 36(3):308-310. 1971.

PEE, W. VAN; CASTELEIN, J.M. Study of the pectinolytic microflora, particularly the enterobacteriaceae from fermenting coffee in the Congo. Journal of food science 37(1):171-174. 1972.

PUERTA Q., G.I. La humedad controlada del grano preserva la calidad del café. Chinchiná: CENICAFÉ, 2006. 8 p. (Avances Técnicos No. 352).

PUERTA Q., G.I. Fundamentos del proceso de fermentación en el beneficio del café. Chinchiná: CENICAFÉ, 2010. 12 p. (Avances Técnicos No. 402).

REPUBLICA DE COLOMBIA. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Resolución 1207 del 2014. Uso de aguas residuales tratadas. 11 p.

ROA, G.; OLIVEROS, C.E.; ÁLVAREZ, J.; RAMIREZ, C.A.; SANZ, J.R.; DÁVILA, M.T.; ÁLVAREZ, J.R.; ZAMBRANO, D.A.; PUERTA, G.I.; RODRÍGUEZ, N. (1999). Beneficio Ecológico del café. Chinchiná (Colombia), CENICAFÉ. 1999. 300 p.

RODRÍGUEZ V., N.; RÍOS A., R. Caracterización del mucílago de café utilizado como materia prima para la producción de pectinas. p.v. En: INFORME anual de actividades de investigación: Disciplina química industrial. Chinchiná: CENICAFÉ, 1999. p.v.

RODRÍGUEZ V., N. (2009). Estudio de un biosistema integrado para el postratamiento de las aguas residuales del café utilizando macrófitas acuáticas. Valencia (España). Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente, 2009. 508 p. Esp. (Tesis: Doctor).

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

RODRÍGUEZ V., N.; ZAMBRANO F., D.A. (2010). Los subproductos del café: Fuente de energía renovable. Chinchiná: CENICAFE, 2010. 8 p. (Avances Técnicos No. 393).

RODRÍGUEZ V., N.; ZAMBRANO F., D.A. (2011). Producción de alcohol a partir del mucílago de café. *Cenicafé* 62(1):56-69.

RODRÍGUEZ V., N.; SANZ U., J.R.; OLIVEROS T., C.E.; RAMÍREZ G., C.A. (2015). Beneficio del café en Colombia: Prácticas y estrategias para el ahorro uso eficiente del agua y el control de la contaminación hídrica en el proceso de beneficio húmedo del café. Editado en: Manizales: CENICAFE, 35 p.

ROLZ, C.; MENCHU E., J.F.; ESPINOSA, R.; GARCÍA P., A. Coffee fermentation studies. p. 259-269. En: COLLOQUE International sur la chimie des cafés. (5: Junio 14-19 1971: Lisboa). París: ASIC: 1971. 434 p.

ROUSSOS, S.; AQUIAHUATL, A.; CASSAIGNE, J.; FAVELA, E.; GUTIERREZ, M.; HANNIBAL, L.; HUERTA, S.; NAVA, G.; RAIMBAULT, M.; RODRIGUEZ, W.; SALAS, J.; SANCHEZ, R.; TREJO, M. y VINIEGRA-GONZALEZ, G. (1989). Detoxificación de la pulpa de café por fermentación sólida. In: S. Roussos; R. Licon y M.Gutierrez Rojas (eds). I Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetalera. SIBAC, Jalapa, México.

ROUSSOS, S.; LONSANE, B.K.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA, G. Advances in solid state fermentation. Dordrecht: Kluwer academic, 1997. 631 p.

SABU, A.; AUGUR, C.; SWATI, C. y PANDEY, A. (2006). Tannase production by *Lactobacillus* sp. ASR-S1 under solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 41, 575-580

SALMONES, D.; MATA, G. y WALISZEWSKI, K. N. (2005). Comparative culturing of *Pleurotus* spp. on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. *Bioresource Technology*, 96, 537-544

SÁNCHEZ, M. S. (2003). Energías Renovables: Conceptos y Aplicaciones. .WWF. Fundación Natura. Quito. Ecuador. 153 p

SÁNCHEZ A.; MAGAÑA G.; PARTIDA M.I.; SÁNCHEZ S. 2015. Bi-dimensional sustainability analysis of a multi-feed biorefinery design for biofuels co-production from

lignocellulosic residues and agro-industrial wastes. Chemical Engineering Research and Design, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cherd.2015.10.041>

SAS. SAS/STAT. (2008) User's Guide 9, 0 version. New York: SAS Institute, 2009.

SADEGHIAN KH., S.; MEJÍA M., B.; ARCILA P., J. Composición elemental de frutos de café y extracción de nutrientes por la cosecha en la zona cafetera de Colombia. Cenicafé 57(4):251-261.2006.

SCHLEGEL, H.G. Microbiología general. Barcelona: Omega, 1979. 448 p.

STEHFEST, E., BOUWMAN, L., van VUUREN, D.P. et al. Climatic Change (2009) 95: 83. Doi: 10.1007/s10584-008-9534-6

SUÁREZ DE CASTRO, F. 1960. Valor de la pulpa del café como abono. Instituto Salvadoreño de Investigaciones del Café. Santa Tecla, El Salvador. Boletín Informativo, Suplemento N. ° 5.

TAPIA, I.; HERRERA-SALDANA, M. R.; VINIEGRA, G.; GUTIERREZ, M. y ROUSSOS, S. (1990). Pulpa de café fermentada: su uso como aditivo en la alimentación de rumiantes. En: Taller de Valorización de los subproductos del café, 11-15 Junio, Quito. Ecuador.

TREJO- HERNÁNDEZ, M. R.; ORIOL, E.; LÓPEZ, A.; ROUSSOS, S.; VININEGRA, G.; RAIMBAULT, M. (1991). Producción de pectinasas de *Aspergillus niger* por fermentación sólida sobre soporte. Micología Neotropical Aplicada, 4.

ULLOA-ROJAS, J. B.; WEERD, J. H.; HUISMAN, E. A. y VERRETH, J. A. (2004). Tropical agricultural residues and their potential uses in fish feeds: the Costa Rican situation. Waste Management, 24, 87-97.

ULLOA-ROJAS, J. B. y VERRETH, J. A. (2003). Growth of *Oreochromis aureus* fed with diets containing graded levels of coffee pulp and reared in two cultura systems. Aquaculture, 217, 275-283.

ULLOA-ROJAS, J. B.; VERRETH, J. A.; WEERD, J. H. y HUISMAN, E. A. (2002). Effect of different chemical treatments on nutritional and antinutritional properties of coffee pulp. Animal Feed Science and Technology, 99, 195-204.

UPME. 2010. Atlas del potencial energético de la biomasa residual en Colombia. 180 p.



VÁSQUEZ, H.J.; DACOSTA, O. (2007). Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. Ingeniería Investigación y Tecnología. VIII. 4. 249-259.

VALENCIA A., G.; CALLE V., H. (1968). La miel de café y su composición. Cenicafé 19(4):135-139.

ZAMBRANO F., D. A. (1993). Fermente y lave su café en el tanque tina. Chinchiná, CENICAFÉ. 8 p. (Avances Técnicos N° 197).

15. ANEXOS

Anexo 1. Ficha técnica del producto comercial Fermipan®

Levadura seca instantánea

Fermipan Brown es una levadura seca instantánea seleccionada de *Saccharomyces cerevisiae* elaborada bajo los más estrictos procedimientos de control, asegurando así una calidad constante y una conservación de su alto poder fermentativo. Consiste de pequeños cilindros beige con una superficie porosa.

APLICACION

- Fermipan Brown es una levadura particularmente efectiva en masas azucaradas (más de 5% sobre el peso total de la harina).
- Por otro lado, su perfil de fermentación en una masa con poco contenido de azúcar le permite ser más efectiva en el caso de procesos de fermentación de más de 4 horas.

INGREDIENTES

Levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), monoestearato de sorbitol, ácido ascórbico.

COMPOSICION

- Parámetros físico-químicos**

Materia seca	>95%
Proteína	47.8% +/- 5.3
Fosfórico de fósforo (P ₂ O ₅)	2.55% +/- 0.45
- Parámetros microbiológicos (UFC/g)**

Mesófilas aeróbicas	<1 x 10 ⁶
Coliformes totales	<100
E. coli	<10
E. coli (OEI+)	<1

ENVASE

Fermipan Brown es envasada al alto vacío en paquetes aluminizados formando bloques sólidos y empacada en caja de cartón corrugado. Una vez abierta, la levadura se presenta en forma de polvo.

CARACTERISTICAS DE LA CAJA

Presentación	#de paquetes	Dimensiones de la caja	Peso neto (kg)	Peso bruto (kg)
500 g	20	35x28x20	10.0	10.6

MODO DE EMPLEO

Opción 1: Incorporar Fermipan Brown a la harina en seco.
Opción 2: Incorporar Fermipan Brown directamente a la masa.
Opción 3: Rehidratar Fermipan Brown con agua tibia (32°C±2°C).

RECOMENDACION

Evitar el contacto de Fermipan Brown con agua fría y el hielo.

DOSIFICACION

1 kg de levadura Fermipan Brown equivale aproximadamente a 3 kg de levadura prensada. Por su alto contenido de materia seca, es indispensable compensar la diferencia de peso con agua para la masa (para 1 kg de Fermipan Brown, agregar 2 litros de agua).

ALMACENAMIENTO


El emvasado especial de Fermipan Brown permite una conservación de hasta 2 años a partir de la fecha de producción. Conservar el producto en un lugar fresco y seco.

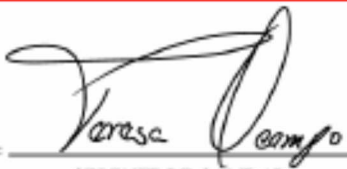
CODIFICACION

Las fechas de producción y de caducidad así como el número de lote de fabricación están impresos en el paquete y en la caja.

SAFMEX, S.A. DE C.V. / FERMEX, S.A. DE C.V.

km 57.5 Carretera México-Toluca, Estado de México, MEXICO
Tel. (52-722) 218 5600 Fax (52-722) 211 98 78



ELABORO: 
GERENTE DE CALIDAD

FECHA DE EMISION: Enero 31, 2013

Anexo 2. Prueba de correlación entre Absorbancia y horas de fermentación para las tres temperaturas evaluadas, Etapa 1.

1

----- TRAT=25 -----

The CORR Procedure

2 Variables: HORAS ABS

Simple Statistics

Variable	N	Mean	Std Dev	Sum	Minimum	Maximum	Label
HORAS	30	14,33333	13,15251	430,00000	0	36,00000	HORAS
ABS	30	0,47583	0,51037	14,27500	0,00900	1,27500	ABS

Pearson Correlation Coefficients, N = 30
Prob > |r| under H0: Rho=0

	HORAS	ABS
HORAS	1,00000	0,94534
HORAS		<,0001
ABS	0,94534	1,00000
ABS		<,0001

10:54 Tuesday, November 30, 2016 2

----- TRAT=30 -----

The CORR Procedure

2 Variables: HORAS ABS

Simple Statistics

Variable	N	Mean	Std Dev	Sum	Minimum	Maximum	Label
HORAS	30	14,33333	13,15251	430,00000	0	36,00000	HORAS
ABS	30	0,97170	0,64267	29,15100	0,01000	1,55200	ABS

Pearson Correlation Coefficients, N = 30
Prob > |r| under H0: Rho=0

	HORAS	ABS
HORAS	1,00000	0,82516
HORAS		<,0001
ABS	0,82516	1,00000
ABS		<,0001

10:54 Tuesday, November 30, 2016 3

----- TRAT=35 -----

The CORR Procedure

2 Variables: HORAS ABS

Simple Statistics

Variable	N	Mean	Std Dev	Sum	Minimum	Maximum	Label
----------	---	------	---------	-----	---------	---------	-------

HORAS	30	14,33333	13,15251	430,00000	0	36,00000	HORAS
ABS	30	0,99290	0,62551	29,78700	0,01000	1,53500	ABS

Pearson Correlation Coefficients, N = 30
 Prob > |r| under H0: Rho=0

	HORAS	ABS
HORAS	1,00000	0,78269
HORAS		<,0001
ABS	0,78269	1,00000
ABS	<,0001	

Anexo 3. Evaluación del ajuste lineal entre Absorbancia y horas de fermentación para las tres temperaturas evaluadas, Etapa 1.

1

----- TRAT=25 -----

The REG Procedure
 Model: MODEL1
 Dependent Variable: ABS ABS

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	6,75059	6,75059	235,34	<,0001
Error	28	0,80315	0,02868		
Corrected Total	29	7,55374			

Root MSE	0,16936	R-Square	0,8937
Dependent Mean	0,47583	Adj R-Sq	0,8899
Coeff Var	35,59310		

Parameter Estimates

Variable	Label	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	Intercept	1	-0,04995	0,04616	-1,08	0,2884
HORAS	HORAS	1	0,03668	0,00239	15,34	<,0001

10:54 Tuesday, November 30, 2016 2

----- TRAT=30 -----

The REG Procedure
 Model: MODEL1
 Dependent Variable: ABS ABS

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	8,15553	8,15553	59,74	<,0001
Error	28	3,82218	0,13651		
Corrected Total	29	11,97770			

Root MSE 0,36947 R-Square 0,6809
 Dependent Mean 0,97170 Adj R-Sq 0,6695
 Coeff Var 38,02280

Parameter Estimates

Variable	Label	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	Intercept	1	0,39378	0,10070	3,91	0,0005
HORAS	HORAS	1	0,04032	0,00522	7,73	<,0001

10:54 Tuesday, November 30, 2016 3

----- TRAT=35 -----

The REG Procedure
 Model: MODEL1
 Dependent Variable: ABS ABS

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	6,95097	6,95097	44,28	<,0001
Error	28	4,39564	0,15699		
Corrected Total	29	11,34661			

Root MSE 0,39622 R-Square 0,6126
 Dependent Mean 0,99290 Adj R-Sq 0,5988
 Coeff Var 39,90491

Parameter Estimates

Variable	Label	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	Intercept	1	0,45937	0,10799	4,25	0,0002
HORAS	HORAS	1	0,03722	0,00559	6,65	<,0001

Anexo 4. Comparación de los modelos ajustados para la producción de alcoholes en la primera etapa: “Dinámica del consumo de azúcares por *Saccharomyces cerevisiae* cepa comercial, a diferentes temperaturas”.

Overview	Sum of Squares	DOF	AICC
Logistic	0,00727494	2	-22,6638

Polynomial Regression (degree=3)	0,00402302	1	-5,6258
Comparison			
The best regression is (chosen via the AIC test): Logistic			
The best regression is (chosen via the F-Test): Logistic			
Justification			
Akaike's Information Criterion		AICC	
Logistic		-22,6638	
Polynomial Regression (degree=3)		-5,6258	
Delta = 17,038			
Probability = 0,0001996			
The likelihood that Logistic is the better model is 99,98%,			
F-Test			
The more complicated model (Polynomial Regression (degree=3)) has a better sum of squares than the simpler model (Logistic), Performing an F test, NOTE that the result of an F test is strictly not valid unless the simpler model is a subset of the more complex model; i.e., the simpler model can be obtained by setting some parameters in the more complex model to certain constants, CurveExpert Pro cannot currently tell if this is the case, so it presents F-Test results regardless,			
F = 0,808328			
P = 0,533803			
If the simpler model were correct, the sum of squares would increase by approximately the gain in degrees of freedom when moving from the complex model to the simple one (i.e., F = 1), With an F value of 0,808328, the simpler regression (Logistic) is the better fit to the data,			

Overview			
	Sum of Squares	DOF	AICC
Logistic	0,00727494	2	-22,6638
Exponential	0,378689	3	-9,56905
Comparison			
The best regression is (chosen via the AIC test): Logistic			
The best regression is (chosen via the F-Test): Logistic			
Justification			
Akaike's Information Criterion		AICC	
Logistic		-22,6638	
Exponential		-9,56905	
Delta = 13,0947			
Probability = 0,00143183			
The likelihood that Logistic is the better model is 99,8568%,			
F-Test			
The more complicated model (Logistic) has a better sum of squares than the simpler model (Exponential), Performing an F test, NOTE that the result of an F test is strictly not			

valid unless the simpler model is a subset of the more complex model; i.e., the simpler model can be obtained by setting some parameters in the more complex model to certain constants, CurveExpert Pro cannot currently tell if this is the case, so it presents F-Test results regardless,
F = 102,108
P = 0,009652
If the simpler model were correct, the sum of squares would increase by approximately the gain in degrees of freedom when moving from the complex model to the simple one (i.e., F = 1), There is a 0,9652% probability that the simpler regression (Exponential) is the better fit to the data,

Overview			
	Sum of Squares	DOF	AICC
Logistic		2	-22,6638
Linear	0,500167	3	-8,17792

Comparison
The best regression is (chosen via the AIC test): Logistic
The best regression is (chosen via the F-Test): Logistic

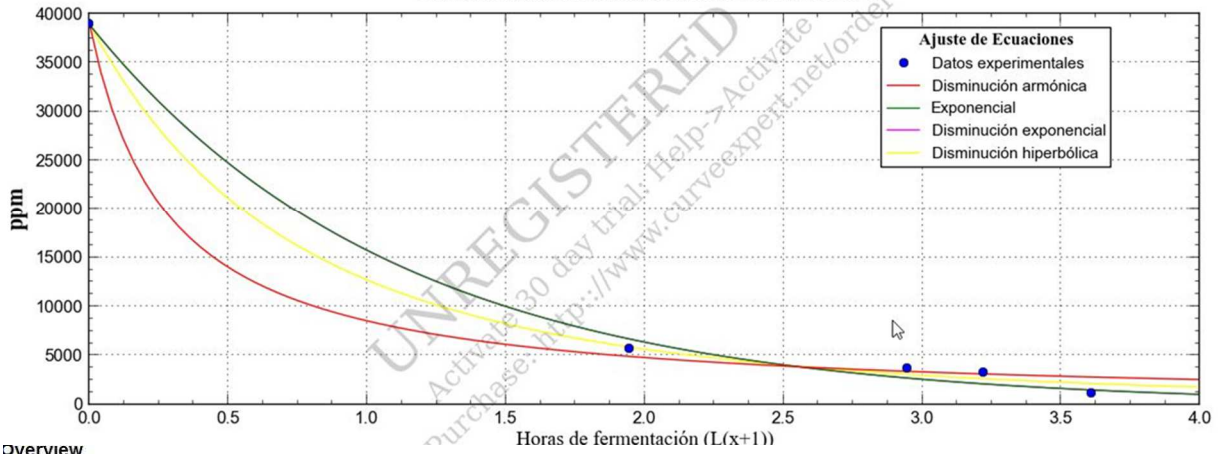
Justification	
Akaike's Information Criterion	AICC
Logistic	-22,6638
Linear	-8,17792
Delta = 14,4859	
Probability = 0,0007147	
The likelihood that Logistic is the better model is 99,9285%, F-Test	

The more complicated model (Logistic) has a better sum of squares than the simpler model (Linear), Performing an F test, NOTE that the result of an F test is strictly not valid unless the simpler model is a subset of the more complex model; i.e., the simpler model can be obtained by setting some parameters in the more complex model to certain constants, CurveExpert Pro cannot currently tell if this is the case, so it presents F-Test results regardless,
F = 135,504
P = 0,00729915
If the simpler model were correct, the sum of squares would increase by approximately the gain in degrees of freedom when moving from the complex model to the simple one (i.e., F = 1), There is a 0,729915% probability that the simpler regression (Linear) is the better fit to the data,

Anexo 5. Comparación de los modelos ajustados para la variable “consumo total de azucares” presentado para cada tratamiento evaluado

Tratamiento 1

Concentración de azúcares total. Tratamiento 1



Overview

	Sum of Squares	DOF	AICC
Hyperbolic Decline	1.66628e+06	2	73.5833
Exponential	3.23849e+06	3	70.2392

Comparison

The best regression is (chosen via the AIC test): **Exponential**

The best regression is (chosen via the F-Test): **Exponential**

Justification

Akaike's Information Criterion

	AICC
Exponential	70.2392
Hyperbolic Decline	73.5833

Δ = 3.34409
 Probability = 0.158152

The likelihood that Exponential is the better model is 84.1848%.

F-Test

The more complicated model (Hyperbolic Decline) has a better sum of squares than the simpler model (Exponential). Performing an F test. NOTE that the result of an F test is strictly not valid unless the simpler model is a subset of the more complex model; i.e., the simpler model can be obtained by setting some parameters in the more complex model to certain constants. CurveExpert Pro cannot currently tell if this is the case, so it presents F-Test results regardless.

$F = 1.88709$
 $P = 0.303238$

If the simpler model were correct, the sum of squares would increase by approximately the gain in degrees of freedom when moving from the complex model to the simple one (i.e., $F = 1$). There is a 30.3238% probability that the simpler regression (Exponential) is the better fit to the data. The probability threshold for rejecting the simple model is

Overview

	Sum of Squares	DOF	AICC
Hyperbolic Decline	1.66628e+06	2	73.5833
Harmonic Decline	3.38301e+06	3	70.4575

Comparison

The best regression is (chosen via the AIC test): **Harmonic Decline**

The best regression is (chosen via the F-Test): **Harmonic Decline**

Justification

Akaike's Information Criterion

	AICC
Harmonic Decline	70.4575
Hyperbolic Decline	73.5833

Delta = 3.1258
Probability = 0.173231

The likelihood that Harmonic Decline is the better model is 82.6769%.

F-Test

The more complicated model (Hyperbolic Decline) has a better sum of squares than the simpler model (Harmonic Decline). Performing an F test. NOTE that the result of an F test is strictly not valid unless the simpler model is a subset of the more complex model, i.e., the simpler model can be obtained by setting some parameters in the more complex model to certain constants. CurveExpert Pro cannot currently tell if this is the case, so it presents F-Test results regardless.
F = 2.06056
P = 0.28764

If the simpler model were correct, the sum of squares would increase by approximately the gain in degrees of freedom when moving from the complex model to the simple one (i.e., F = 1). There is a 28.764% probability that the simpler regression (Harmonic Decline) is the better fit to the data. The probability threshold for rejecting the simple model is

Overview

	Sum of Squares	DOF	AICC
Exponential	3.23849e+06	3	70.2392
Harmonic Decline	3.38301e+06	3	70.4575

Comparison

The best regression is (chosen via the AIC test): **Exponential**

The best regression is (chosen via the F-Test): **Exponential**

Justification

Akaike's Information Criterion

	AICC
Exponential	70.2392
Harmonic Decline	70.4575

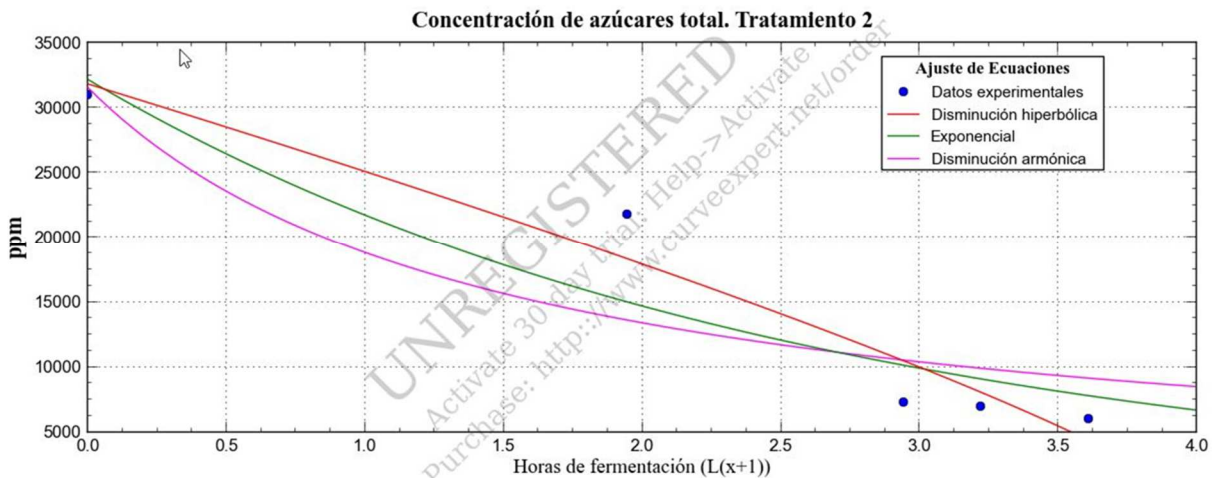
Delta = 0.218293
Probability = 0.47274

The likelihood that Exponential is the better model is 52.726%.

F-Test

Cannot do F test. both models have the same number of degrees of freedom (DOF). So, the best regression is the one with the lowest sum of squares (Exponential).

Tratamiento 2



Overview

	Sum of Squares	DOF	AICC
Hyperbolic Decline	2.64439e+07	2	87.4055
Exponential	6.29466e+07	3	85.0751

Comparison

The best regression is (chosen via the AIC test): **Exponential**

The best regression is (chosen via the F-Test): **Exponential**

Justification

Akaike's Information Criterion

	AICC
Exponential	85.0751
Hyperbolic Decline	87.4055

Delta = 2.33037
Probability = 0.237727

The likelihood that Exponential is the better model is 76.2273%.

F-Test

The more complicated model (Hyperbolic Decline) has a better sum of squares than the simpler model (Exponential). Performing an F test. NOTE that the result of an F test is strictly not valid unless the simpler model is a subset of the more complex model, i.e., the simpler model can be obtained by setting some parameters in the more complex model to certain constants. CurveExpert Pro cannot currently tell if this is the case, so it presents F-Test results regardless.

F = 2.76076
P = 0.238489

If the simpler model were correct, the sum of squares would increase by approximately the gain in degrees of freedom when moving from the complex model to the simple one (i.e., F = 1). There is a 23.8489% probability that the simpler regression (Exponential) is the better fit to the data. The probability threshold for rejecting the simple model is

Overview

	Sum of Squares	DOF	AICC
Hyperbolic Decline	2.64439e+07	2	87.4055
Harmonic Decline	9.57314e+07	3	87.1714

Comparison

The best regression is (chosen via the AIC test): **Harmonic Decline**

The best regression is (chosen via the F-Test): **Harmonic Decline**

Justification

Akaike's Information Criterion

	AICC
Harmonic Decline	87.1714
Hyperbolic Decline	87.4055

Delta = 0.234072
Probability = 0.470774

The likelihood that Harmonic Decline is the better model is 52.9226%.

F-Test

The more complicated model (Hyperbolic Decline) has a better sum of squares than the simpler model (Harmonic Decline). Performing an F test. NOTE that the result of an F test is strictly not valid unless the simpler model is a subset of the more complex model, i.e., the simpler model can be obtained by setting some parameters in the more complex model to certain constants. CurveExpert Pro cannot currently tell if this is the case, so it presents F-Test results regardless.

F = 5.24033
P = 0.149254

If the simpler model were correct, the sum of squares would increase by approximately the gain in degrees of freedom when moving from the complex model to the simple one (i.e., F = 1). There is a 14.9254% probability that the simpler regression (Harmonic Decline) is the better fit to the data. The probability threshold for rejecting the simple model is

Overview

	Sum of Squares	DOF	AICC
Exponential	6.29466e+07	3	85.0751
Harmonic Decline	9.57314e+07	3	87.1714

Comparison

The best regression is (chosen via the AIC test): **Exponential**

The best regression is (chosen via the F-Test): **Exponential**

Justification

Akaike's Information Criterion

	AICC
Exponential	85.0751
Harmonic Decline	87.1714

Delta = 2.0963
Probability = 0.259581

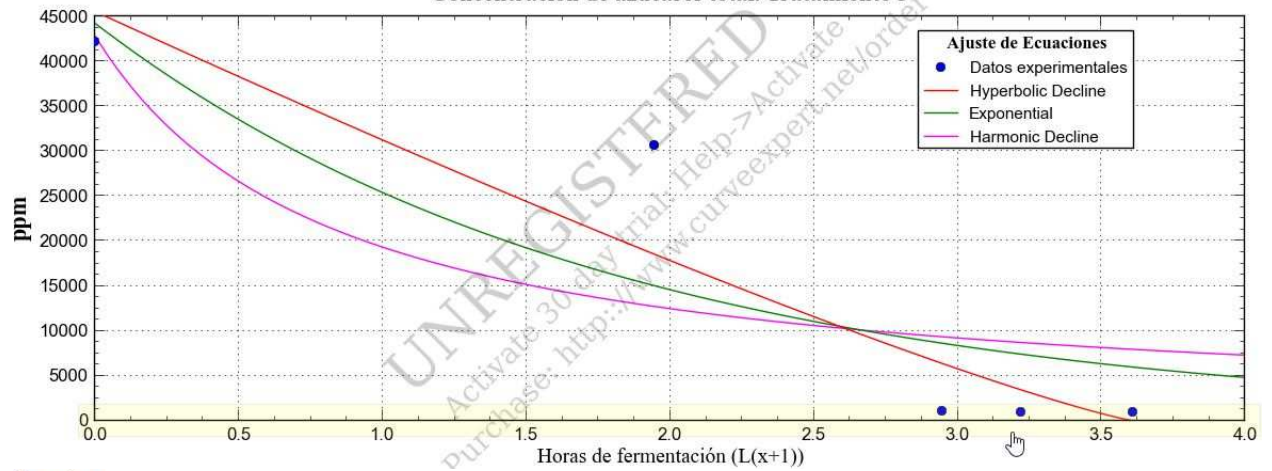
The likelihood that Exponential is the better model is 74.0419%.

F-Test

Cannot do F test, both models have the same number of degrees of freedom (DOF). So, the best regression is the one with the lowest sum of squares (Exponential).

Tratamiento 3

Concentración de azúcares total. Tratamiento 3



Overview

	Sum of Squares	DOF	AICC
Hyperbolic Decline	1.94567e+08	2	97.3843
Exponential	3.74114e+08	3	93.9865

Comparison

The best regression is (chosen via the AIC test): **Exponential**

The best regression is (chosen via the F-Test): **Exponential**

Justification

Akaike's Information Criterion

	AICC
Exponential	93.9865
Hyperbolic Decline	97.3843

Delta = 3.39775
Probability = 0.154612

The likelihood that Exponential is the better model is 84.5388%.

F-Test

The more complicated model (Hyperbolic Decline) has a better sum of squares than the simpler model (Exponential). Performing an F test. NOTE that the result of an F test is strictly not valid unless the simpler model is a subset of the more complex model; i.e., the simpler model can be obtained by setting some parameters in the more complex model to certain constants. CurveExpert Pro cannot currently tell if this is the case, so it presents F-Test results regardless.

F = 1.8456
P = 0.307234

If the simpler model were correct, the sum of squares would increase by approximately the gain in degrees of freedom when moving from the complex model to the simple one (i.e., F = 1). There is a 30.7234% probability that the simpler regression (Exponential) is the better fit to the data. The probability threshold for rejecting the simple model is

Overview

	Sum of Squares	DOF	AICC
Hyperbolic Decline	1.94567e+08	2	97.3843
Harmonic Decline	5.01463e+08	3	95.4513

Comparison

The best regression is (chosen via the AIC test): **Harmonic Decline**

The best regression is (chosen via the F-Test): **Harmonic Decline**

Justification

Akaike's Information Criterion

	AICC
Harmonic Decline	95.4513
Hyperbolic Decline	97.3843

Delta = 1.93291
Probability = 0.275587

The likelihood that Harmonic Decline is the better model is 72.4413%.

F-Test

The more complicated model (Hyperbolic Decline) has a better sum of squares than the simpler model (Harmonic Decline). Performing an F test. NOTE that the result of an F test is strictly not valid unless the simpler model is a subset of the more complex model; i.e., the simpler model can be obtained by setting some parameters in the more complex model to certain constants. CurveExpert Pro cannot currently tell if this is the case, so it presents F-Test results regardless.

F = 3.15464
P = 0.217695

If the simpler model were correct, the sum of squares would increase by approximately the gain in degrees of freedom when moving from the complex model to the simple one (i.e., F = 1). There is a 21.7695% probability that the simpler regression (Harmonic Decline) is the better fit to the data. The probability threshold for rejecting the simple model is

Overview

	Sum of Squares	DOF	AICC
Exponential	3.74114e+08	3	93.9865
Harmonic Decline	5.01463e+08	3	95.4513

Comparison

The best regression is (chosen via the AIC test): **Exponential**

The best regression is (chosen via the F-Test): **Exponential**

Justification

Akaike's Information Criterion

	AICC
Exponential	93.9865
Harmonic Decline	95.4513

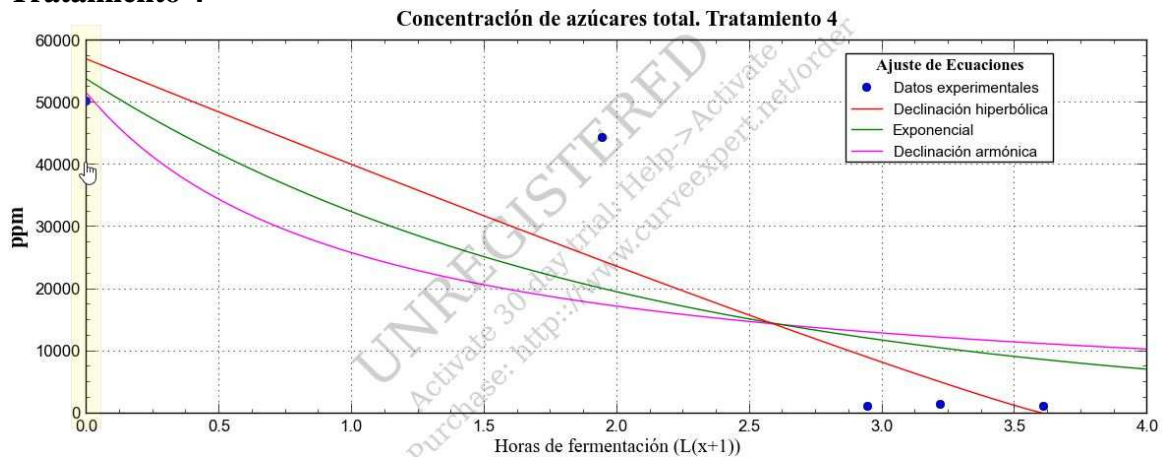
Delta = 1.46484
Probability = 0.324664

The likelihood that Exponential is the better model is 67.5336%.

F-Test

Cannot do F test. both models have the same number of degrees of freedom (DOF). So, the best regression is the one with the lowest sum of squares (Exponential).

Tratamiento 4



Overview

	Sum of Squares	DOF	AICC
Hyperbolic Decline	5.13101e+08	2	102.233
Exponential	8.59533e+08	3	98.1456

Comparison

The best regression is (chosen via the AIC test): **Exponential**

The best regression is (chosen via the F-Test): **Exponential**

Justification

Akaike's Information Criterion

	AICC
Exponential	98.1456
Hyperbolic Decline	102.233

Delta = 4.08709
Probability = 0.114707

The likelihood that Exponential is the better model is 88.5293%.

F-Test

The more complicated model (Hyperbolic Decline) has a better sum of squares than the simpler model (Exponential). Performing an F test. NOTE that the result of an F test is strictly not valid unless the simpler model is a subset of the more complex model; i.e., the simpler model can be obtained by setting some parameters in the more complex model to certain constants. CurveExpert Pro cannot currently tell if this is the case, so it presents F-Test results regardless.

F = 1.35035
P = 0.36514

If the simpler model were correct, the sum of squares would increase by approximately the gain in degrees of freedom when moving from the complex model to the simple one (i.e., F = 1). With an F value of 1.35035, the simpler regression (Exponential) is the better fit to the data.

Overview

	Sum of Squares	DOF	AICC
Hyperbolic Decline	5.13101e+08	2	102.233
Harmonic Decline	1.08058e+09	3	99.2899

Comparison

The best regression is (chosen via the AIC test): **Harmonic Decline**

The best regression is (chosen via the F-Test): **Harmonic Decline**

Justification

Akaike's Information Criterion

	AICC
Harmonic Decline	99.2899
Hyperbolic Decline	102.233

Delta = 2.94278
Probability = 0.186731

The likelihood that Harmonic Decline is the better model is 81.3269%.

F-Test

The more complicated model (Hyperbolic Decline) has a better sum of squares than the simpler model (Harmonic Decline). Performing an F test. NOTE that the result of an F test is strictly not valid unless the simpler model is a subset of the more complex model; i.e., the simpler model can be obtained by setting some parameters in the more complex model to certain constants. CurveExpert Pro cannot currently tell if this is the case, so it presents F-Test results regardless.

F = 2.21194
P = 0.275321

If the simpler model were correct, the sum of squares would increase by approximately the gain in degrees of freedom when moving from the complex model to the simple one (i.e., F = 1). There is a 27.5321% probability that the simpler regression (Harmonic Decline) is the better fit to the data. The probability threshold for rejecting the simple model is

Overview

	Sum of Squares	DOF	AICC
Exponential	8.59533e+08	3	98.1456
Harmonic Decline	1.08058e+09	3	99.2899

Comparison

The best regression is (chosen via the AIC test): **Exponential**

The best regression is (chosen via the F-Test): **Exponential**

Justification

Akaike's Information Criterion

	AICC
Exponential	98.1456
Harmonic Decline	99.2899

Delta = 1.1443
Probability = 0.360741

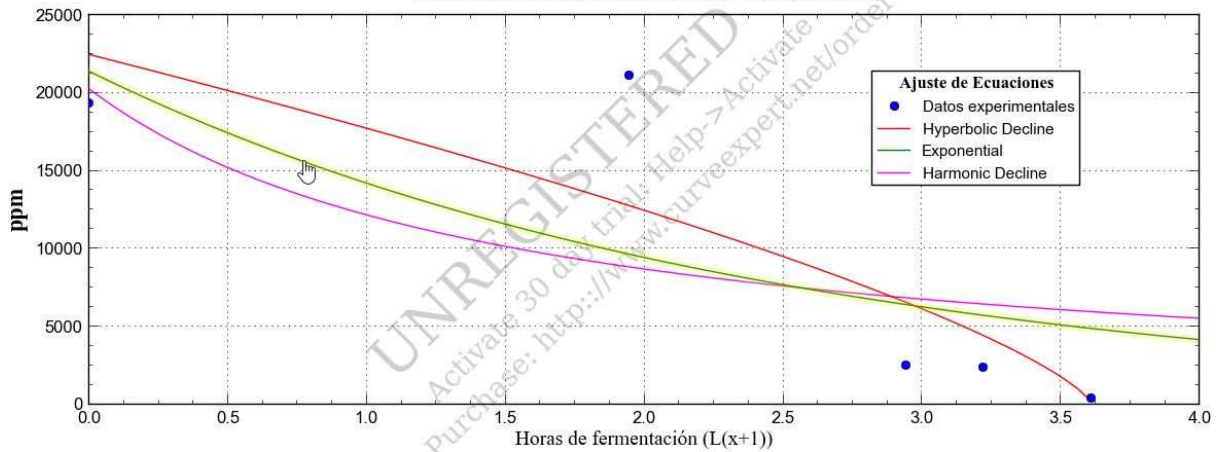
The likelihood that Exponential is the better model is 63.9259%.

F-Test

Cannot do F test: both models have the same number of degrees of freedom (DOF). So, the best regression is the one with the lowest sum of squares (Exponential).

Tratamiento 5

Concentración de azúcares total. Tratamiento 5



Overview

	Sum of Squares	DOF	AICC
Hyperbolic Decline	1.00518e+08	2	94.0821
Exponential	1.82635e+08	3	90.4011

Comparison

The best regression is (chosen via the AIC test): **Exponential**

The best regression is (chosen via the F-Test): **Exponential**

Justification

Akaike's Information Criterion

	AICC
Exponential	90.4011
Hyperbolic Decline	94.0821

Delta = 3.68092
Probability = 0.136997

The likelihood that Exponential is the better model is 86.3003%.

F-Test

The more complicated model (Hyperbolic Decline) has a better sum of squares than the simpler model (Exponential). Performing an F test. NOTE that the result of an F test is strictly not valid unless the simpler model is a subset of the more complex model; i.e., the simpler model can be obtained by setting some parameters in the more complex model to certain constants. CurveExpert Pro cannot currently tell if this is the case, so it presents F-Test results regardless.

F = 1.63386
P = 0.329462

If the simpler model were correct, the sum of squares would increase by approximately the gain in degrees of freedom when moving from the complex model to the simple one (i.e., F = 1). There is a 32.9462% probability that the simpler regression (Exponential) is the better fit to the data. The probability threshold for rejecting the simple model is

Overview

	Sum of Squares	DOF	AICC
Exponential	1.82635e+08	3	90.4011
Harmonic Decline	2.18398e+08	3	91.2953

Comparison

The best regression is (chosen via the AIC test): **Exponential**

The best regression is (chosen via the F-Test): **Exponential**

Justification

Akaike's Information Criterion

	AICC
Exponential	90.4011
Harmonic Decline	91.2953

Delta = 0.894153
Probability = 0.390056

The likelihood that Exponential is the better model is 60.9944%.

F-Test

Cannot do F test, both models have the same number of degrees of freedom (DOF). So, the best regression is the one with the lowest sum of squares (Exponential).

Overview

	Sum of Squares	DOF	AICC
Hyperbolic Decline	1.00518e+08	2	94.0821
Harmonic Decline	2.18398e+08	3	91.2953

Comparison

The best regression is (chosen via the AIC test): **Harmonic Decline**

The best regression is (chosen via the F-Test): **Harmonic Decline**

Justification

Akaike's Information Criterion

	AICC
Harmonic Decline	91.2953
Hyperbolic Decline	94.0821

Delta = 2.78677
Probability = 0.198868

The likelihood that Harmonic Decline is the better model is 80.1132%.

F-Test

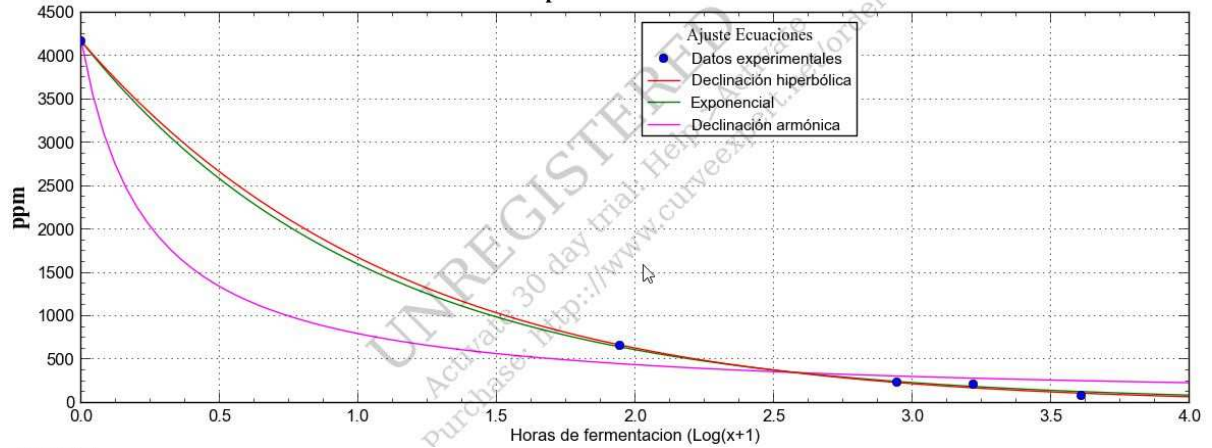
The more complicated model (Hyperbolic Decline) has a better sum of squares than the simpler model (Harmonic Decline). Performing an F test. NOTE that the result of an F test is strictly not valid unless the simpler model is a subset of the more complex model; i.e., the simpler model can be obtained by setting some parameters in the more complex model to certain constants. CurveExpert Pro cannot currently tell if this is the case, so it presents F-Test results regardless.

F = 2.34544
P = 0.265325

If the simpler model were correct, the sum of squares would increase by approximately the gain in degrees of freedom when moving from the complex model to the simple one (i.e., F = 1). There is a 26.5325% probability that the simpler regression (Harmonic Decline) is the better fit to the data. The probability threshold for rejecting the simple model is

Tratamiento 6

Comparacion ecuaciones T6



Overview

	Sum of Squares	DOF	AICC
Hyperbolic Decline	1936.93	2	39.7971
Exponential	3180.17	3	35.6096

Comparison

The best regression is (chosen via the AIC test): **Exponential**

The best regression is (chosen via the F-Test): **Exponential**

Justification

Akaike's Information Criterion

Exponential
Hyperbolic Decline

AICC
35.6096
39.7971

Delta = 4.18752
Probability = 0.109705

The likelihood that Exponential is the better model is 89.0295%.

F-Test

The more complicated model (Hyperbolic Decline) has a better sum of squares than the simpler model (Exponential). Performing an F test. NOTE that the result of an F test is strictly not valid unless the simpler model is a subset of the more complex model, i.e., the simpler model can be obtained by setting some parameters in the more complex model to certain constants. CurveExpert Pro cannot currently tell if this is the case, so it presents F-Test results regardless.

F = 1.28372
P = 0.374753

If the simpler model were correct, the sum of squares would increase by approximately the gain in degrees of freedom when moving from the complex model to the simple one (i.e., F = 1). With an F value of 1.28372, the simpler regression (Exponential) is the better fit to the data.

Overview

	Sum of Squares	DOF	AICC
Hyperbolic Decline	1936.93	2	39.7971
Harmonic Decline	87500.6	3	52.1831

Comparison

The best regression is (chosen via the AIC test): **Hyperbolic Decline**

The best regression is (chosen via the F-Test): **Hyperbolic Decline**

Justification

Akaike's Information Criterion

Hyperbolic Decline
Harmonic Decline

AICC
39.7971
52.1831

Delta = 12.386
Probability = 0.00203949

The likelihood that Hyperbolic Decline is the better model is 99.7961%.

F-Test

The more complicated model (Hyperbolic Decline) has a better sum of squares than the simpler model (Harmonic Decline). Performing an F test. NOTE that the result of an F test is strictly not valid unless the simpler model is a subset of the more complex model, i.e., the simpler model can be obtained by setting some parameters in the more complex model to certain constants. CurveExpert Pro cannot currently tell if this is the case, so it presents F-Test results regardless.

F-Test

The more complicated model (Hyperbolic Decline) has a better sum of squares than the simpler model (Harmonic Decline). Performing an F test. NOTE that the result of an F test is strictly not valid unless the simpler model is a subset of the more complex model; i.e., the simpler model can be obtained by setting some parameters in the more complex model to certain constants. CurveExpert Pro cannot currently tell if this is the case, so it presents F-Test results regardless.

F = 88.3496
P = 0.0111301

If the simpler model were correct, the sum of squares would increase by approximately the gain in degrees of freedom when moving from the complex model to the simple one (i.e., F = 1). There is a 1.11301% probability that the simpler regression (Harmonic Decline) is the better fit to the data.

Overview

	Sum of Squares	DOF	AICC
Exponential	3180.17	3	35.6096
Harmonic Decline	87500.6	3	52.1831

Comparison

The best regression is (chosen via the AIC test): **Exponential**

The best regression is (chosen via the F-Test): **Exponential**

Justification

Akaike's Information Criterion

Exponential	AICC	35.6096
Harmonic Decline	AICC	52.1831

Delta = 16.5736
Probability = 0.000251761

The likelihood that Exponential is the better model is 99.9748%.

F-Test

Cannot do F test, both models have the same number of degrees of freedom (DOF). So, the best regression is the one with the lowest sum of squares (Exponential).

Anexo 6. Parámetros de los modelos ajustados para el consumo de azúcares total para cada tratamiento evaluado

Tratamiento	Parámetro	Modelo		
		Armónico *	Exponencial *	Hiperbólico*
		$y = q_0 / (1 + x/a)$	$y = ae^{bx}$	$y = q_0 (1 + bx/a)^{-1/b}$
T1	q_0	3,89E+04	---	3,89E+04
	a	2,80E-01	3,89E+04	7,34E-01
	b	---	-9,05E-01	3,38E-01
	E,E	1,06E+03	1,04E+03	9,13E+02
	r	9,98E-01	9,98E-01	9,99E-01
	r2	9,97E-01	9,97E-01	9,98E-01
	AIC	7,05E+01	7,02E+01	7,36E+01
T2	q_0	3,15E+04	---	3,18E+04
	a	1,48E+00	3,22E+04	4,84E+00
	b	---	-3,92E-01	-1,22E+00
	E,E	5,65E+03	4,58E+03	3,64E+03
	r	9,00E-01	9,35E-01	9,73E-01
	r2	8,10E-01	8,75E-01	9,47E-01
	AIC	8,72E+01	8,51E+01	8,74E+01
T3	q_0	4,28E+04	---	4,55E+04

	a	8,23E-01	4,42E+04	3,11E+00
	b	---	-5,55E-01	-8,60E-01
	E,E	1,29E+04	1,12E+04	9,86E+03
	r	8,26E-01	8,73E-01	9,36E-01
	r2	6,81E-01	7,62E-01	8,76E-01
	AIC	9,55E+01	9,40E+01	9,74E+01
T4	q_0	5,15E+04	---	5,70E+04
	a	1,01E+00	5,38E+04	3,32E+00
	b	---	-5,05E-01	-9,18E-01
	E,E	1,90E+04	1,69E+04	1,60E+04
	r	7,61E-01	8,15E-01	8,94E-01
	r2	5,79E-01	6,65E-01	8,00E-01
	AIC	9,93E+01	9,81E+01	1,02E+02

Anexo 6 (continuación), Parámetros de los modelos ajustados para el consumo de azúcares total para cada tratamiento evaluado

Tratamiento	Parámetro	Modelo		
		Armónico * $y = q_0 / (1 + x/a)$	Exponencial * $y = ae^{bx}$	Hiperbólico* $y = q_0(1 + bx/a)^{-1/b}$
T5	q_0	2,03E+04	---	2,25E+04
	a	1,50E+00	2,14E+04	4,94E+00
	b	---	-4,09E-01	-1,37E+00
	E,E	8,53E+03	7,80E+03	7,09E+03
	r	6,87E-01	7,47E-01	8,70E-01
	r2	4,72E-01	5,58E-01	7,57E-01
	AIC	9,13E+01	9,04E+01	9,41E+01
T6	q_0	4,17E+03	---	4,17E+03
	a	2,37E-01	4,17E+03	1,13E+00
	b	---	-9,59E-01	-7,10E-02
	E,E	1,71E+02	3,26E+01	3,11E+01
	r	9,96E-01	1,00E+00	1,00E+00
	r2	9,93E-01	1,00E+00	1,00E+00
	AIC	5,22E+01	3,56E+01	3,98E+01

* Nivel de confianza 95%