

Uso de biomasa residual de la agroindustria de café y palma como medio de cultivo para
obtención de ácidos nucleicos a partir de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*

Juliana Valentina Galvis Pérez Cód.: 2181768

Britney Dayanne Ramírez Carreño Cód.: 2180885

Trabajo de Grado para Optar al Título de Químico

Director

Stelia Carolina Méndez Sánchez, PhD

Codirector

Diana Lizeth Urbina Duitama, MSc.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2024

Dedicatoria

Dedicamos este trabajo a Ricardo Galvis, Ángela Pérez, Juan Galvis, Juan Esteban Galvis, Ana Galvis. A cada uno de ustedes, nuestro más sincero agradecimiento y reconocimiento por el amor y apoyo incondicional que nos han brindado en cada etapa de este proceso. Gracias por creer en nosotras día a día, por no dejarnos caer en los momentos difíciles y por darnos la fuerza necesaria para enfrentar cualquier obstáculo. Su presencia, su fe en nuestro esfuerzo y sus palabras de aliento han sido pilares fundamentales en este camino.

Ustedes, con su esfuerzo y dedicación, nos han enseñado el valor de la perseverancia y la honestidad, valores que hoy nos acompañan y que han sido esenciales para alcanzar esta meta.

Este trabajo es fruto no solo de nuestro esfuerzo, sino también del ejemplo que nos han dado y de los sacrificios que han hecho por nosotras.

A nuestras queridas mascotas, que con su cariño incondicional y su lealtad nos han brindado compañía y alegría en los momentos de agotamiento. Su presencia silenciosa y su amor incondicional nos han recordado siempre la importancia de encontrar felicidad en las cosas simples y de seguir adelante con una sonrisa.

Este logro, que representa años de esfuerzo y dedicación, es también de ustedes. Sin cada uno de ustedes, esta meta no hubiera sido posible.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	12
1 Objetivos	15
1.1 Objetivo General	15
1.2 Objetivos Específicos.....	15
2 Marco Referencial.....	16
2.1 Marco Teórico.....	16
2.1.1 Agroindustria del Aceite de Palma	16
2.1.2 Agroindustria del Café	20
2.1.3 Saccharomyces cerevisiae.....	25
2.1.4 Extracción de material genético de microorganismos	28
2.2 Estado del Arte.....	30
3 Metodología	35
3.1 Metodología de Establecimiento de Condiciones óptimas de Crecimiento de Saccharomyces cerevisiae.....	35
3.1.1 Caracterización de POME de Palma y Mosto de Café	35
3.1.2 Establecimiento de Condiciones de Crecimiento	38
3.2 Metodología de Correlación de Crecimiento de Saccharomyces cerevisiae	42
3.2.1 Proceso de Obtención de Saccharomyces cerevisiae.....	42
3.2.2 Proceso de Aislamiento de Ácidos nucleicos	42
4 Resultados	45
4.1 Resultados de Caracterización	45

4.1.1	Medición de pH y cuantificación de proteínas en muestras de MOSTO de café y POME	46
4.1.2	Resultados de carbohidratos, carbohidratos totales, solidos totales, grasas y aceites, nitrógeno, calcio, sodio, nitrógeno, % de humedad y cenizas de mosto de café y POME de palma	49
4.2	Curvas de crecimiento en medio de POME y mosto de café.....	50
4.2.1	Curvas de crecimiento en medio de mosto variedad caturra, cenicafe y residuo de lavado con levadura de uso comercial, componentes traza y disolución buffer con agitación constante de 100 rpm y a una temperatura de 25°C.	50
4.2.2	Curvas de crecimiento en medio de POME con levadura de uso comercial, componentes traza y disolución buffer con agitación constante de 100 rpm y a una temperatura de 25°C.	58
4.3	Variación de pH con muestra de mosto caturra de 18 horas de fermentación con componentes traza y disolución buffer y concentración al 25%.....	59
4.4	Variación de componentes traza y disolución buffer con muestra de mosto caturra de 18 horas de fermentación y concentración al 25%	60
4.5	Aislamiento de ácidos nucleicos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> crecida en medio de mosto con 18 horas de fermentación y concentración al 25%	61
4.6	Balance de materia y energía	64
4.6.1	Balance de materia	64
4.7	Comparación de resultados	65
4.7.1	Análisis de pH.....	65
4.7.2	Análisis del aislamiento de ácidos nucleicos	66

5	Conclusiones	67
6	Recomendaciones	69
	Referencias Bibliográficas	70

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1 Industria y usos de la levadura.....	28
Tabla 2 Características de Diseño Experimental del Proceso.....	38
Tabla 3 Características de Composición del Medio de Cultivo.....	39
Tabla 4 Elementos de la Traza.....	40
Tabla 5 Medición de pH para mosto de variedad Caturra a 0h, 3h, 12h, 15h, 18h, variedad Cenicafe a 22h y residuo de lavado (RL).....	46
Tabla 6 Cuantificación de proteínas del mosto de variedad Caturra a 0h, 3h, 12h, 15h, 18h, variedad Cenicafe a 22h y residuo de lavado (RL).....	47
Tabla 7 Medición de pH para POME	48
Tabla 8 Cuantificación de proteínas de POME.....	48
Tabla 9 Caracterización de Mosto y POME	49
Tabla 10 Velocidad específica de crecimiento (μ)	51
Tabla 11 Velocidad específica de crecimiento (μ)	54
Tabla 12 Velocidad específica de crecimiento (μ)	56
Tabla 13 Absorbancia inicial y a la hora 6 de crecimiento para la variación de pH de la muestra caturra de 18 horas de fermentación con componentes traza y disolución buffer y concentración al 25%	59
Tabla 14 Variación de pH de la muestra caturra de 18 horas de fermentación con componentes traza y disolución buffer y concentración al 25%.....	59

Tabla 15 Densidad óptica inicial y pasada 6 horas de la curva de crecimiento de variedad caturra de 18 horas de fermentación con concentración al 25%, pH nativo sin componentes traza y disolución buffer	60
Tabla 16 Densidad óptica inicial y pasada 6 horas de la curva de crecimiento de variedad caturra de 18 horas de fermentación con concentración al 25%, pH nativo con componentes traza y disolución buffer	60
Tabla 17 Absorbancia (260/280 y 260/230) para el aislamiento de ácidos nucleicos en la muestra de 18 horas de fermentación variedad caturra con buffer y compuestos traza	63
Tabla 18 Absorbancia (260/280 y 260/230) para el aislamiento de ácidos nucleicos en la muestra de 18 horas de fermentación variedad caturra sin buffer y compuestos traza	64

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1 Diagrama de Flujo esquemático de una planta extractora de aceite de palma.	17
Figura 2 Esquema del proceso de producción de café.....	20
Figura 3 Curva típica de crecimiento microbiano. 1-Fase lag, 2-Fase de aceleramiento, 3-Fase exponencial, 4-Fase de desaceleración, 5-Fase estacionaria, 6-Fase de muerte.	26
Figura 4 Diagrama de la metodología.....	35
Figura 5 Diagrama del proceso del Aislamiento de ácidos nucleicos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
Figura 6 Comparación de las curvas de crecimiento de la levadura <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> en medio de mosto variedad caturra a 3h, 12h, 15h, 18h de fermentación, de variedad cenicafe a 22h de fermentación y residuo de lavado (RL) y crecimiento en medio YPD.....	50
Figura 7 Comparación de las curvas de crecimiento de la levadura <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> en medio de mosto variedad caturra a 3h, 12h, 15h, 18h de fermentación, de variedad cenicafe a 22h de fermentación y residuo de lavado (RL) y crecimiento en medio YPD.....	53
Figura 8 Comparación de las curvas de crecimiento de la levadura <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> en medio de mosto variedad caturra a 3h, 12h, 15h, 18h de fermentación, de variedad cenicafe a 22h de fermentación y residuo de lavado (RL) y crecimiento en medio YPD.....	55
Figura 9 Curva de crecimiento de la levadura <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> de la muestra de POME a una concentración de 25% y 50% con compuestos traza y disolución buffer con una agitación de 100 rpm y una temperatura de 34°C	58
Figura 10 Comparación de aislamiento de ácidos nucleicos en medio YPD, en medio de mosto de 18 horas de fermentación con y sin compuestos traza y disolución de buffer.....	62

Glosario

Agroindustria: Actividad económica que se dedica a la producción y procesamiento de productos agrícolas.

Biomasa residual: Material orgánico resultante de procesos productivos o agrícolas que no tiene un uso directo y se considera como desecho.

Café: Producto agrícola obtenido de los frutos de la planta Coffea.

Levaduras: Microorganismos unicelulares pertenecientes al reino de los hongos, utilizados en diversos procesos biotecnológicos y alimentarios.

Medio de cultivo: Sustancia o combinación de sustancias donde se cultivan microorganismos para su crecimiento y estudio.

Mosto del Café: Es un líquido resultante de la fermentación del mucilago o pulpa de café. El mucílago es la capa pegajosa que envuelve los granos dentro de la cereza de café

Obtención de ácidos nucleicos: Proceso de extracción y purificación de ácidos nucleicos, como ADN y ARN, a partir de una fuente de interés.

Palma: Planta de la familia de las Arecáceas utilizada principalmente por sus frutos y aceites.

POME: Es el acrónimo de "Palm Oil Mill Effluent" en inglés o "Efluente de la Palma de Aceite" en español. Se refiere al residuo líquido que se genera durante el proceso de extracción y producción de aceite de palma.

Saccharomyces cerevisiae: Especie de levadura ampliamente utilizada en la industria alimentaria y en investigaciones científicas debido a sus propiedades fermentativas.

Resumen

Título: Uso de biomasa residual de la agroindustria de café y palma como medio de cultivo para obtención de ácidos nucleicos a partir de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*^{1*}

Autor: Juliana Valentina Galvis Pérez y Britney Dayanne Ramírez Carreño ^{2*3*}

Palabras Clave: Ácidos nucleicos, biomasa residual, *saccharomyces cerevisiae*

Descripción: La producción de café contribuye con un 3.3% al Producto Interno Bruto (PIB) nacional, generando entre 0.155 y 0.22 m³ de mosto por tonelada procesada, mientras que el cultivo de palma aporta un 11% al PIB, dejando de 0.8 a 1.0 m³ de efluente líquido (POME) por cada tonelada de racimos de frutos frescos procesados. En la búsqueda de aportar al conocimiento y fomentar el uso circular de estos residuos, este proyecto se planteó con el objetivo de obtener ácidos nucleicos mediante la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando la biomasa residual agroindustrial del aceite de palma y del café como medio de cultivo.

El trabajo inició con la recolección de muestras en 2023, las cuales fueron sometidas a análisis en laboratorio para la cuantificación de proteínas totales mediante el método Bradford, de azúcares totales utilizando la técnica fenol-ácido sulfúrico y de nitrógeno total a través del método Kjeldahl. Posteriormente, se determinaron las condiciones óptimas de crecimiento de las levaduras mediante un diseño experimental que evaluó distintas concentraciones de POME y mosto de café.

Los resultados mostraron fluctuaciones en el pH del mosto, que inició en 4.43 y alcanzó un máximo de 4.85, antes de descender a 4.14. En cuanto a la cuantificación de proteínas, el porcentaje inicial fue de 0.0779 g proteína/g de muestra, con variaciones en el transcurso del tiempo, destacando un valor final de 0.0511 g proteína/g de muestra a las 22 horas. Este análisis subraya la influencia de las condiciones de fermentación en las propiedades químicas del mosto, lo que es crucial para optimizar procesos industriales.

Este estudio no solo proporciona una base sólida para el aprovechamiento eficiente de subproductos agrícolas, sino que también promueve un enfoque más sostenible en la producción y gestión de residuos en la industria química.

^{1*} Trabajo de Grado

^{2**} Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Química. Director: Stelia Carolina Méndez Sánchez.PhD. Codirector: Diana Lizeth Urbina Duitama. MSc.

Abstract

Title: Use of residual biomass from the coffee and palm agro-industry as a growing medium^{4*}

Author(s): Juliana Valentina Galvis Pérez y Britney Dayanne Ramírez Carreño ⁵

Key Words: Nucleic acids, residual biomass, must, POME, *Saccharomyces cerevisiae*

Description: Coffee production contributes 3.3% to the national Gross Domestic Product (GDP), generating between 0.155 and 0.22 m³ of must per ton processed, while palm cultivation contributes 11% to the GDP, leaving 0.8 to 1.0 m³ of liquid effluent (POME) for every ton of fresh fruit bunches processed. In the pursuit of enhancing knowledge and promoting the circular use of these residues, this project aimed to obtain nucleic acids using *Saccharomyces cerevisiae*, utilizing the agro-industrial residual biomass from palm oil and coffee as a growth medium.

The work began with the collection of samples in 2023, which were subjected to laboratory analysis for total protein quantification using the Bradford method, total sugar quantification using the phenol-sulfuric acid technique, and total nitrogen quantification through the Kjeldahl method. Subsequently, the optimal growth conditions for the yeast were determined through an experimental design that evaluated different concentrations of POME and coffee must.

The results showed fluctuations in the pH of the must, which started at 4.43 and peaked at 4.85 before declining to 4.14. Regarding protein quantification, the initial percentage was 0.0779 g protein/g of sample, with variations over time, highlighting a final value of 0.0511 g protein/g of sample at 22 hours. This analysis underscores the influence of fermentation conditions on the chemical properties of the must, which is crucial for optimizing industrial processes.

This study not only provides a solid foundation for the efficient utilization of agricultural by-products but also promotes a more sustainable approach to waste production and management in the chemical industry.

^{4*} Bachelor Thesis

⁵Faculty of Sciences. School of Chemistry. Chemistry. Director: Stelia Carolina Méndez Sánchez, PhD. Co-director: Diana Lizeth Urbina Duitama, MSc

Introducción

Colombia es un país que emplea como fuente de desarrollo la producción agroindustrial, donde se generan residuos, los cuales son parte del resultado de los procesos de producción, transformación y comercialización de productos agrícolas y pecuarios (Pérez *et al.*, 2023). Estos residuos representan un desafío para el país, porque su manejo inadecuado puede generar problemas ambientales, como contaminación del suelo y el agua, así como emisiones de gases de efecto invernadero (Escobal & Garro, 2020). Este proyecto desarrolló un estudio enfocado en aprovechar residuos de los cultivos de café y de palma de aceite, como medio de cultivo para el crecimiento de *Sacharomyces cerevisiae*, y a su vez emplear este hongo como una fuente para la obtención de ácidos nucleicos.

Colombia es uno de los principales productores de aceite de palma, está ubicado en el cuarto lugar a nivel mundial, con un aporte del 2% (Potter, 2020). La producción en el departamento de Santander aportó alrededor de 10.450 toneladas en el año 2021. Sin embargo, la producción de aceite de palma genera residuos que deben ser gestionados adecuadamente para prevenir impactos negativos en el medio ambiente. Uno de los residuos más importantes generados por esta industria es el POME (del inglés “Palm Oil Mill Effluent”) el cual proviene de la clarificación del aceite de palma, después de retirar el agua y las impurezas lodosas, este líquido contiene materia orgánica, nutrientes y compuestos tóxicos (Minagricultura, 2014). A pesar de estos residuos se consideran como desechos, existen iniciativas para darle valor agregado. Por ejemplo, el tratamiento del POME para obtener biogás es una opción atractiva, ya que puede utilizarse como fuente de energía renovable y reducir la carga contaminante del residuo, también el POME puede emplearse para obtener fertilizantes, ya que los nutrientes

extraídos pueden ser utilizados en la agricultura y silvicultura (Díaz, 2022). Incluso el POME puede utilizarse como materia prima para la producción de bioplásticos y bioquímicos, lo que genera una fuente adicional de ingresos para las empresas productoras de palma (Mesa, 2012) y posiblemente una disminución en su impacto ambiental. A partir del POME, es posible producir diversos químicos como ácidos orgánicos (ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico), enzimas útiles en la industria alimentaria y de detergentes, biopolímeros biodegradables como el polihidroxialcanoato (PHA), y alcoholes como etanol (Garritano, 2018). Existen diferentes métodos para la producción de químicos a partir de POME, algunos de los cuales incluyen la fermentación microbiana, la extracción y purificación de compuestos específicos, y la hidrólisis enzimática. En el caso de la fermentación microbiana, se utilizan microorganismos como bacterias o levaduras para descomponer los componentes orgánicos presentes en el POME y producir químicos como ácidos grasos volátiles, etanol, metanol o ácido láctico. Estos químicos pueden tener diversas aplicaciones, como la producción de bioplásticos, biogás o productos químicos Said *et al.* (2022).

Por otra parte, Colombia es uno de los mayores productores de café, en el año 2020 se produjeron aproximadamente 834.000 toneladas de café según datos del Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE) de Colombia. El departamento de Santander contribuyó significativamente a la producción nacional de café con alrededor de 32.340 toneladas. Durante la producción de café se generan varios residuos como la cascarilla de café y las aguas residuales, como el mosto que es un subproducto generado durante el proceso de fermentación del café (DANE - Histórico actualidad DANE, 2017). Una de las técnicas utilizadas para minimizar el impacto ambiental del mosto es la biodigestión, que transforma el residuo en biogás y biofertilizante (Mirón et al., 2021). El biogás generado puede ser utilizado

como fuente de energía renovable, mientras que el biofertilizante puede ser utilizado como abono orgánico en las plantaciones de café (Mahmoud et al., 2022). Otra oportunidad para agregar valor a los residuos generados durante la producción de café es comercializarlos al utilizar el mosto como materia prima para la producción de bebidas fermentadas, como el vino de café o la chicha de café, también se puede utilizar el mosto como ingrediente para la producción de cosméticos y productos de cuidado personal, esto al contener antioxidantes y otros nutrientes beneficiosos para la piel y el cabello (Muñoz *et al.*, 2013).

En el contexto de la industria del aceite de palma y el café, la búsqueda de alternativas para aprovechar los residuos generados se ha convertido en un área clave de investigación. Una propuesta interesante implica el uso de microorganismos capaces de aprovechar los nutrientes presentes en estos residuos, como medio de cultivo, y estos microorganismos sirven como una fuente para la obtención de nucleótidos. Estas biomoléculas son fundamentales en diversas aplicaciones de biología molecular, como las pruebas PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), RAPD (Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico) y NGS (Secuenciación de Próxima Generación). La obtención de nucleótidos a partir de estos residuos representa un enfoque biotecnológico innovador, y a su vez, contribuye significativamente al desarrollo de técnicas avanzadas en genética y biología molecular. Este enfoque tiene como objetivo no solo reducir el impacto ambiental de los residuos industriales de café y palma, sino también entender cómo sus características específicas influyen en la eficiencia de su uso como sustrato para *Saccharomyces cerevisiae*. En particular, se busca identificar qué factores limitan el medio de crecimiento y realizar una comparación entre el medio de mosto y POME. Bajo esta premisa, este trabajo de grado propone evaluar las condiciones óptimas para maximizar el crecimiento de biomasa de levadura y la extracción de ácidos nucleicos.

1 Objetivos

1.1 Objetivo General

Obtener ácidos nucleicos a partir de *Saccharomyces cerevisiae*, aprovechando los residuos de la producción de café y aceite de palma como un medio de cultivo.

1.2 Objetivos Específicos

Establecer condiciones óptimas de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, empleando residuos de la industria de palma y de café como medio de cultivo.

Correlacionar el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en el medio de cultivo con la cantidad de ácidos nucleicos aislados.

2 Marco Referencial

2.1 Marco Teórico

2.1.1 Agroindustria del Aceite de Palma

La palma africana es una planta tropical típica de clima cálido originaria de las regiones occidental y central del continente africano, especialmente del Golfo de Guinea, de ahí el nombre científico *Elaeis guineensis* Jacq, y se ha utilizado para la obtención de aceite desde la antigüedad. Produce dos tipos de aceites que son; aceite de frutas, que se comercializan como aceite de cocina, margarina, crema, etc y aceite de semilla. Y los aceites industriales, que se utilizan para fabricar cosméticos, jabones, detergentes, velas, lubricantes, etc (Wattanapenpaiboon & Wahlqvist, 2003). En Colombia se producen 470.946 toneladas de fruto y 101.512 toneladas de aceite de palma al año, en donde Santander aporta el 14% de la producción nacional. Las etapas de producción del aceite de palma se dividen en 6 etapas, las cuales se presentan en la Figura 1 y se describen a continuación:

Recepción de la fruta

Esterilización: Es la etapa más importante del proceso de extracción; se lleva a cabo, generalmente sometiendo los racimos de fruto fresco a la acción de vapor de agua en recipientes cilíndricos (autoclaves), donde los factores principales son el tiempo de cocción y la temperatura, dependiendo del tamaño de los racimos y del grado de madurez de los mismos, esta es una de las fases del proceso que genera mayor cantidad de efluentes (POME).

Figura 1

Diagrama de Flujo esquemático de una planta extractora de aceite de palma.



Desfrutado: Es la separación mecánica de los frutos presentes en los racimos mediante un tambor desfrutador rotatorio. La fruta esterilizada es llevada a este, la separación de los frutos de los raquis o también llamada tusa subproducto de la extracción primaria de aceite de palma (Instituto Colombiano Agropecuario, 2016).

Prensado: Comprende en primer lugar la digestión que consiste en macerar la fruta a una temperatura de 90°C. En segundo lugar, el prensado, donde se extrae mecánicamente por presión el aceite contenido en el mesocarpio de la fruta, requiere adicionar agua caliente con el fin de ayudar a arrastrar el aceite y mantener la 8 temperatura constante hasta la clarificación. De esta etapa se originan dos corrientes, una líquida que pasa a clarificación y una sólida que pasa al desfibrado.

Clarificación: Consiste en retirar el agua y las impurezas lodosas del aceite, mediante el filtrado, la decantación y centrifugación, buscando alcanzar altos rendimientos de aceite crudo con un mínimo de impurezas, al finalizar el proceso se obtiene un efluente de lodos residuales (POME).

Almacenamiento: Una vez que el aceite alcanza los niveles de pureza requerido es enviado a los tanques de almacenamiento y se obtiene un efluente de sedimentos (POME) (Peña & Lara, 2022).

En Colombia, después del proceso de extracción de aceite de palma se generan como residuos, aproximadamente 20 kg de lodo seco, 220 kg de racimos vacíos y entre 0,8 – 1,0 m³ de efluente líquido por cada tonelada de racimos de frutos frescos procesado (Cortés G. et al., 2006). El POME no es tóxico, pero si es de naturaleza ácida con un pH que oscila entre 4 y 5 (Althausen, 2015), tiene una apariencia espesa, de color marrón y consta de 95 a 96 % de agua, 4 a 5 % de sólidos totales, incluido 2 a 4 % de sólidos en suspensión, tiene un 9 alto contenido de nutrientes o minerales esenciales como K, N, Mg, Ca, P, Fe, B, Zn, Mn, Cu que favorecen el crecimiento de las plantas y de 0,6 a 0,7 % de aceite y grasa (Ng *et al.*, 2016).

Alternativas de aprovechamiento del POME

El POME se ha usado para la generación de biogás, este tiene un potencial para generar entre 25 y 35 m³ de biogás o 150-210 kWh de energía por medio de procesos de digestión anaerobia (Althausen, 2015). En un estudio reciente se utilizaron microalgas para producir biocombustibles (biometano, biohidrógeno y bioetanol), las microalgas tienen potencial en el tratamiento de POME, ya que es uno de los lugares más adecuados para el crecimiento de microalgas, porque tiene todos los elementos necesarios para que crezcan, que son luz, dióxido de carbono, nutrientes, agua y fósforo, además se pueden utilizar para eliminar los metales

pesados presentes en POME (Betancur & Hernández, 2018). La calidad de la materia prima de biodiesel a partir de la conversión de microalgas se basa en su alto contenido de biomasa, productividad de lípidos y composiciones adecuadas de ácidos grasos (Montero *et al.*, 2012). Una de las especies de microalgas *Chlorella* es la más común que se ha utilizado para el tratamiento de POME, que es de gran interés para la producción de materia prima de biodiesel debido a la capacidad de acumular una gran cantidad de lípidos bajo estrés (Low *et al.*, 2021).

El efluente líquido de aceite de palma se utiliza también en la producción biológica de hidrógeno mediante fermentación oscura. En la literatura se reportó el uso de dos consorcios microbianos y un cultivo puro de *Clostridium beijerinckii* que es una bacteria gram-positiva, y se cultivaron anaeróticamente en POME crudo, diluido e hidrolizado para comparar los rendimientos de producción de biohidrógeno en los tres medios, en donde el mayor rendimiento de H₂ se obtuvo con la bacteria gram positiva *Clostridium beijerinckii*. Se concluyó que POME tiene un potencial productor de hidrógeno en varias formas crudo, diluido e hidrolizado y puede incrementarse no sólo con la adición de sacarosa sino también con otros azúcares (Rosa *et al.*, 2020). El efluente de aceite de palma (POME) ha sido empleado como medio de cultivo óptimo para lograr el máximo crecimiento de *Hemianthus callitrichoides* (es una planta acuática ornamental que podría usarse para la fitorremediación y la decoración de acuarios), aprovechando el POME como fuente de carbono y nutrientes 10 como amoníaco, nitrato y fosfato. El índice de crecimiento medio del explante cultivado en medios Murashige y Skoog (MS), de concentración total de POME tuvo un valor de $7,34 \pm 0,17$ g/g. El POME de 50% de concentración registró un índice de crecimiento máximo de $3,92 \pm 0,37$ g/g (gramo de *H. callitrichoides* por gramo de medio). Como resultado para el medio se utilizó 50% de la concentración de POME con un suplemento de medios MS de fuerza completa para lograr un

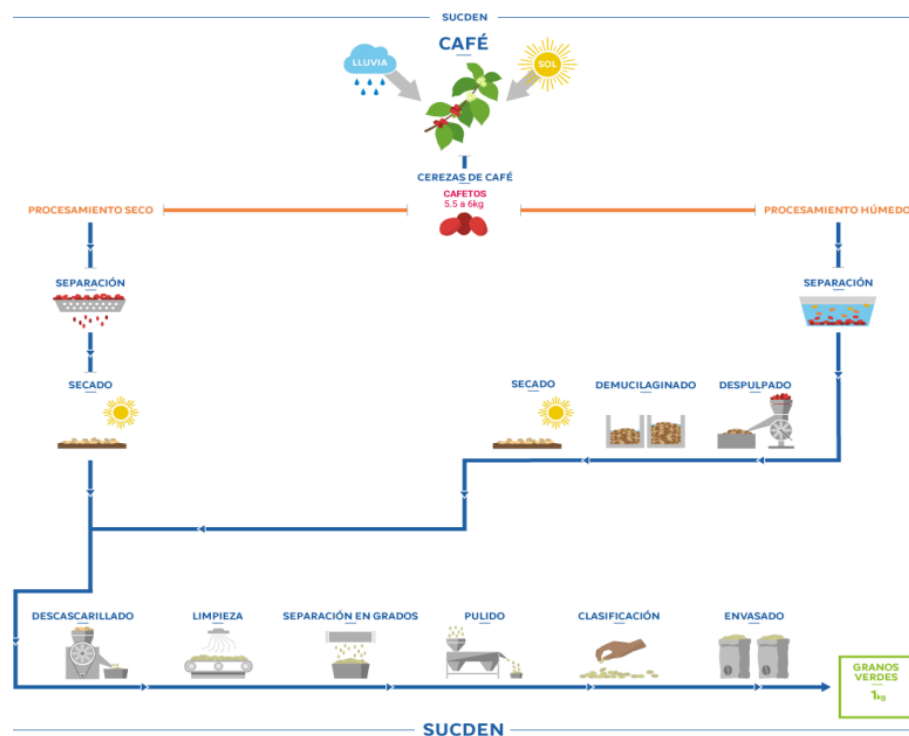
mayor índice de crecimiento de *Hemianthus callitrichoides* el cual fue de $8,46 \pm 0,49$ g/g siendo superior a los dos medios por separados (Ng et al., 2016).

2.1.2 Agroindustria del Café

Los países que tienen una mayor producción de café son aquellos que se encuentran ubicados en los trópicos, esto es debido a que el café requiere de un clima cálido con alto nivel de humedad (Iglesias, 2018). De las 30 especies del género *Coffea*, solo tres son significativas: café arábica, canephora y liberica. (Gualtieri A et al., 2007).

Figura 2

Esquema del proceso de producción de café



Nota: S & D SUCDEN, 2021.

Entre enero y marzo del año 2022 se produjeron más de 3,2 millones de sacos a nivel de Colombia (Federación Nacional de Cafeteros, 2021), por otro lado, en Santander hay 53,017

hectáreas de café en 75 municipios, produciendo 695.000 sacos por año, lo que posiciona a Santander como el sexto departamento en área y séptimo en producción a nivel nacional («Café de Santander», 2020).

Las etapas de producción del café se dividen en 4 las cuales se presentan en la Figura 2 y son:

Plantación: Es la primera etapa y más importante para producir café, ya que marca el inicio del ciclo que va de la siembra de la semilla hasta el crecimiento de la planta. Se puede realizar la plantación al sol o a la sombra, en función de las necesidades. Una vez plantado el cafeto, se debe esperar entre 3 y 4 años para producir la primera cosecha. Posteriormente, cada planta vivirá aproximadamente 20 años (Arabo, 2021).

Cosecha: la cosecha se produce de forma anual cuando las cerezas del café alcanzan la maduración. Existen dos formas métodos para realizarla:

Manual: es el proceso que se efectúa de forma manual y en plena fase de madurez, dejando aquellas plantas que aún se encuentran verdes.

Mecánica: es el proceso que se efectúa de forma industrial, es decir, mecánica. En este caso, las bayas que se recogen presentan diferentes grados de maduración, por lo que se deberá efectuar una revisión posterior de aquellas que no han alcanzado la madurez (Almirall Ramirez, 2022).

Despulpado o procesamiento: una vez terminada la cosecha, se eliminan todos los residuos y se procede a quitar las capas que envuelven los granos de café, para obtener el café limpio o verde. Una vez finalizado el proceso, se clasifica el producto obtenido mediante diferentes criterios. La fermentación puede durar entre 12 y 18 horas, dependiendo de las

siguientes variables: la temperatura del lugar, la altura de la masa de café en el tanque de fermentación, el uso de agua, el grado de madurez del café. (Arabo, 2021).

Secado: después de Despulpado los granos se lavan y se llevan a secar por aproximadamente 20 días en donde los granos se mueven regularmente para que todos se sequen por igual.

Tueste: en esta fase, el producto adquiere el sabor y aroma por el que reconocemos nuestra taza de café, mediante el procesamiento del grano en hornos. Gracias a ello, se consigue aumentar el tamaño del mismo, reducir su cafeína, perder la humedad y adquirir el color tostado típico que caracteriza el café (Almirall, 2022).

A nivel mundial los residuos de la agroindustria cafetera se han estimado en 22 millones de toneladas de pulpa de café, 8,6 millones de toneladas de mosto y 2,4 millones toneladas de pergamino, esta cantidad de residuos es correspondiente a la generada en un año en todo el mundo. Estos datos fluctúan anualmente de acuerdo con las variaciones en la producción agrícola y las técnicas de procesamiento que se utilizan. El mosto es del 15,5 al 22% del peso del fruto maduro, además posee un pH en café maduro de 5,6 a 5,75, una estructura rica en azúcares y pectinas que cubren el endospermo de la semilla y mide 0,4 mm de espesor, está compuesto por agua (84,2%), proteína (8,9%), azúcar (4,1%), sustancia pécnicas (0,91%) y ceniza (0,7%) (Castro & Garzón, 2019).

Alternativas de aprovechamiento del mosto de café

Se han realizado varios estudios sobre los posibles usos del mosto de café como materia prima en la producción de etanol, pectinas, alimentación animal, se utiliza en Industria cosmética y farmacéutica por sus propiedades formadoras de soluciones viscosas, se considera un demulcente, por lo que se puede utilizar en ciertas formulaciones, el objetivo es proteger la

mucosa del intestino, el estómago y bronquios (Samayoa Toledo et al., 2014). Por la composición microbiana y química, el mosto 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.

En 2011, Ríos & Puerta caracterizaron la composición química mosto de café, dependiendo del tiempo de fermentación y refrigeración, para lo cual cuantificaron agua, cenizas, lípidos, proteína, azúcar total, azúcar, aporte calórico de reductores, fibra, alcohol, acidez total y materia fresca, fermentado a temperatura promedio de 20,5 °C y se congeló a 6,6 °C hasta por 74 horas". Durante la fermentación, el contenido de azúcares totales y reductores disminuyó a temperatura ambiente (Puerta Q. & Rios A., 2014), como también hubo un aumento de la acidez para formar etanol y los lípidos que degradado, mientras que estos cambios son más lentos en refrigeración de 1-8°, ya que inhibe el crecimiento de microorganismos termófilos y de algunos mesófilos, disminuyendo así la actividad de enzimas (Castro & Garzón, 2019).

Teniendo en cuenta las características de los residuos de café, se ha descrito que es posible emplearlos como medios de cultivo para microorganismos u otras especies, gracias a la cantidad de azúcares presentes en dicho mosto. En 2007, se informó sobre el uso del extracto de la pulpa de café como medio de cultivo adecuado para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis*. Para preparar el medio se utilizó un equipo Sohlex a una temperatura de 96 °C durante 4 horas, donde se hidrolizó la pulpa de café con soluciones diluidas de ácido sulfúrico en una relación de 1 parte de pulpa seca por cada 10 partes de volumen de ácido diluido. El proceso se llevó a cabo a presión atmosférica con ebullición a reflujo durante un tiempo determinado. Posteriormente, se centrifugó el hidrolizado ácido y se ajustó el

sobrenadante a un pH de 4,5, esterilizándolo a una presión de 15 psi durante 15 minutos (Gualtieri A et al., 2007).

Se prepararon tres medios de cultivo diferentes a partir del extracto ácido de la pulpa de café, los cuales contenían urea, K_2HPO_4 y extracto de malta líquido, respectivamente. También se preparó un cuarto medio de cultivo de control que consistía en el extracto ácido sin nutrientes. El tiempo de cultivo aeróbico fue de 8 horas. Mediante la hidrólisis química del residuo de la pulpa de café con ácido sulfúrico al 2%, se obtuvieron azúcares fermentables por parte de las levaduras *S. cerevisiae* y *Candida utilis*. Se logró obtener biomasa de levaduras con rendimientos y productividades comparables a los valores reportados en la literatura. Estos resultados sugieren que la biomasa de levaduras puede ser utilizada como fuente de proteínas en dietas de animales (Gualtieri A et al., 2007).

El uso alternativo del mosto como medio de cultivo para generar biomasa establece una conexión interesante con *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levadura desempeña un papel crucial en la fermentación alcohólica y encuentra en el mosto un sustrato con nutrientes y azúcares fermentables. Al utilizar el mosto como medio de cultivo, se aprovechan los componentes presentes en él, como los azúcares y otros nutrientes esenciales, para fomentar el crecimiento y la multiplicación de la levadura. La *Saccharomyces cerevisiae* exhibe una notable adaptabilidad a diversas condiciones de pH, temperatura y concentraciones de nutrientes, lo que la convierte en un organismo ideal para utilizar el mosto como medio de cultivo para generar biomasa. Esta relación entre el uso del mosto y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ofrece un amplio abanico de aplicaciones, como la producción de biomasa de levadura para la elaboración de alimentos, suplementos nutricionales o incluso biocombustibles, aprovechando de manera eficiente un

subproducto de la industria cervecera y potenciando así el desarrollo de procesos sostenibles y respetuosos con el medio ambiente (Halasz & Lasztity, 2017).

2.1.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae es un microorganismo facultativo, lo que significa que puede crecer tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Durante la fermentación, la levadura se enfrenta a diversos desafíos y se adapta fisiológicamente para sobrevivir. Uno de estos desafíos es la alta presión osmótica, que se produce debido a la concentración de solutos en el medio de fermentación. La levadura responde a esta presión osmótica mediante la regulación de su metabolismo y la síntesis de componentes celulares para mantener el equilibrio osmótico (Luna et al., 2010).

Además, a medida que la fermentación progresa, la fuente de carbono, como la glucosa, puede agotarse. En respuesta a esto, la levadura ajusta su metabolismo para utilizar otras fuentes de carbono disponibles en el medio, permitiéndole continuar su crecimiento y producción de metabolitos. Otro desafío que enfrenta la levadura durante la fermentación es la acumulación de etanol, que puede resultar tóxico para la célula. Para contrarrestar esto, la levadura activa mecanismos de defensa y detoxificación para eliminar o reducir la toxicidad del etanol y mantener su viabilidad y actividad metabólica. En resumen, *Saccharomyces cerevisiae*, se adapta fisiológicamente a condiciones de estrés durante la fermentación, como la alta presión osmótica, el agotamiento de la fuente de carbono y la presencia de etanol tóxico (López & Corona, 2016).

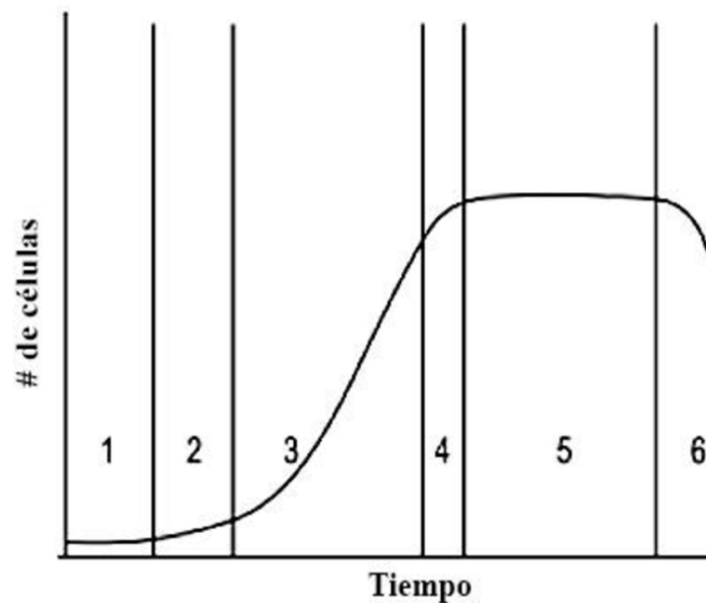
Además de las condiciones ambientales óptimas, la producción de levadura requiere una variedad de nutrientes esenciales y vitaminas. En el ámbito industrial, las principales materias primas utilizadas para fabricar levadura son el cultivo puro de levadura y la melaza de caña. La melaza de caña es una fuente de carbono primaria debido a su alto contenido de azúcares

fermentables, que oscila entre el 45% y el 55% en peso seco. Estos azúcares se encuentran principalmente en forma de sacarosa, glucosa y fructosa (Vaquera, 2018).

El cultivo de levadura en medios líquidos con glucosa como fuente de carbono muestra típicamente cinco fases de crecimiento distintas. Estas fases incluyen la fase de "lag" como se observa en la figura 3, donde la levadura se adapta al nuevo entorno, la fase logarítmica, en la cual las células experimentan una rápida duplicación. También se observa la fase de cambio diáuxico, en la cual la levadura cambia de metabolismo fermentativo a respiratorio, la fase post-diáuxica y finalmente, la fase estacionaria, donde el crecimiento de la levadura se detiene (Suárez-Machín et al., 2016).

Figura 3

Curva típica de crecimiento microbiano. 1-Fase lag, 2-Fase de aceleramiento, 3-Fase exponencial, 4-Fase de desaceleración, 5-Fase estacionaria, 6-Fase de muerte.



Nota: Martínez-Rosales et al., 2020.

Condiciones de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*

Los factores determinantes en el crecimiento de *S. cerevisiae* son la temperatura, oxígeno, pH, presión osmótica y los azúcares disponibles en el medio de crecimiento. La mayoría de las levaduras crecen entre 5 y 37°C. El valor óptimo es hasta 28°C. Sin embargo, la levadura crece estrictamente de manera óptima cuando está en su mejor momento de entorno natural. En general, las levaduras no son microorganismos termofílicos, la pirólisis comienza a 52°C y hay más células en la fase de crecimiento exponencial sensible que las células quiescentes (Hirano & Upper, 2000)

El rango de pH óptimo para el crecimiento de la levadura es de 4,5 a 6,5, aunque muchas especies pueden tolerar una amplia variación de pH de 2,8 a 3 a 2 a 8,5. Entre ellos, el pH intracelular oscila entre 5,8 y 6,8 (Villamil & Zapata, 1999).

El crecimiento de la levadura requiere una fuente de carbono orgánico y una fuente de nitrógeno mineral u orgánico. Algunos también requieren multivitaminas (tiamina, biotina, inositol, ácido pantoténico, etc.), el carbono es el compuesto principal de la célula de levadura, es alrededor del 50% del peso seco, los compuestos de carbono son utilizados por la levadura como fuente de carbono y energía. El carbono se puede proporcionar en forma de azúcares, aldehídos, sales de ciertos ácidos orgánicos, glicerol o etanol (Marrero et al., 2015).

Además del carbono las levaduras necesitan nitrógeno, fósforo (que desempeña un papel importante al producir etanol a partir de azúcares), potasio (que es quien actúa como catión regulador estimulando la respiración y fermentación), el magnesio (que se necesita para el funcionamiento de enzimas del metabolismo), el calcio (utilizado para favorecer el mantenimiento de la integridad celular en ambientes hostiles) y por último el manganeso que

permite que se aumente el nivel de nitrógeno de la síntesis de proteínas (Villamil & Zapata, 1999).

Es de conocimiento general que la levadura juega un papel importante en la producción de alimentos y bebidas por medio de la fermentación, también son utilizadas en diferentes áreas de biotecnología, en la Tabla 1 se enuncian algunos ejemplos

Tabla 1

Industria y usos de la levadura

Industria	Usos	Referencia
Alimentaria	saborizantes, pan, pigmentos aminoácidos y producción de enzimas	(Halasz & Lasztity, 2017)
Fermentaciones tradicionales	cerveza, vino y salsa de soya	(Cortés Rico & Ladino Soto, 2016)
Investigación en biología	estudio de biología molecular y celular, genómica y mecanismos de sistemas biológicos	(dos Santos et al., 2012)
Investigación biomédica	resistencia y metabolismo de drogas	(Hernández, 2021)

2.1.4 Extracción de material genético de microorganismos

Es posible aprovechar la levadura para la generación de biomasa gracias a su rápido crecimiento y a su vez sirve como una fuente biológica de obtención de ácidos nucleicos, en la literatura existe una gran variedad de protocolos y procedimientos para realizar el proceso de extracción de ácidos nucleicos, el cual depende del tipo de muestra, pero generalmente consiste en las siguientes etapas:

Colecta de la muestra: Una colecta y manejo apropiado de la muestra permite obtener ADN íntegro y sin contaminantes (Tan & Yiap, 2009).

Lisis celular: las interacciones entre las moléculas que conforman la pared, la membrana celular y nuclear se modifican o destruyen permitiendo que los ácidos nucleicos se liberen. Se utilizan soluciones básicas, detergentes o agentes caotrópicos que permiten disolver la membrana celular, así como inhibidores para inactivar las enzimas que degradan el ADN. Muchas soluciones de lisis contienen también EDTA, que forma un complejo con los iones de Mg^{2+} e impide el funcionamiento de las DNAsas. Los componentes celulares no solubles como el material fibroso y proteínas que permanecen en solución se separan del ADN por centrifugación (Torres Rosales, 2021)

Precipitación del ADN: Después de que son eliminados los lípidos y las proteínas, se recupera el ADN. Para ello, se adiciona etanol y soluciones con altas concentraciones de iones de sodio o amonio que se unen a los grupos fosfato, esta mezcla reduce las fuerzas repulsivas entre las cadenas y permite que el ADN se pliega sobre sí mismo haciéndolo insoluble (Tan & Yiap, 2009). Un paso de centrifugación permite que el ADN permanezca en el fondo del tubo mientras que el etanol es desechado. Los restos de etanol se eliminan con un lavado con etanol al 70% y el remanente se elimina por evaporación (Green et al., 2012).

Aislamiento de ácidos nucleicos de *S. cerevisiae*

Se han descrito diferentes métodos específicos para la extracción de ADN de levadura, estos difieren en el proceso de lisis de la pared celular de levadura y el protocolo que se usa para la purificación del ADN. Casi todos los métodos utilizados son variantes del procedimiento de agitación de perlas de vidrio y lisis de la pared celular mediante tratamiento enzimático (Osorio Cadavid et al., 2009).

En 1987, Hoffman y Winston propusieron un protocolo que utilizaba perlas de vidrio para romper las paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* y purificar el ADN mediante

fenol-cloroformo (Hoffman y Winston, 1987). Sin embargo, cuando se trabaja con muchas muestras, las perlas de vidrio resultan insuficientes. En cambio, se recomienda una técnica que involucra la lisis celular completa con detergentes, seguida de la extracción y eliminación de proteínas y lípidos. Este método proporciona ADN puro que puede ser aislado mediante precipitación en una solución de alcohol, y es ampliamente utilizado debido a la cantidad y calidad del ADN obtenido (Osorio Cadavid et al., 2009).

En 1992, Querol et al. propusieron un protocolo de extracción de ADN en el que se utilizaba la enzima Zimolasa para romper las células y liberar el ADN, sin necesidad de fenol-cloroformo. Este método ha sido ampliamente aceptado debido a la eliminación del uso de fenol en el proceso (Osorio Cadavid et al., 2009). Es un método rápido y sencillo para extraer ADN mitocondrial de levadura, que incluye la preparación de esferoplastos, la lisis de la membrana celular, la purificación de las mitocondrias mediante densidad, la lisis de las membranas mitocondriales y el aislamiento de mtDNA sin necesidad de gradiente de CsCl centrifugación. Este método no requiere el uso de fenol ni de colorantes cancerígenos como el bromuro de etidio y la bis-benzimida. El ADN obtenido es lo suficientemente puro para realizar análisis de RFLP, y el rendimiento es alto incluso con cepas silvestres (Querol & Barrio, 1990).

2.2 Estado del Arte

En las últimas décadas, la producción de bioetanol y otros bioproductos a partir de residuos agrícolas y subproductos industriales ha emergido como una solución sostenible para la gestión de residuos y la obtención de fuentes de energía renovables. Diversos estudios han abordado la optimización de procesos biotecnológicos, la valorización de residuos y la producción de bioproductos utilizando métodos innovadores y técnicas avanzadas.

Producción de Bioetanol y Bioproductos:

Khoshkho et al. (2022) investigaron el potencial de la pulpa seca de zanahoria como materia prima para la producción de bioetanol, empleando *Saccharomyces cerevisiae* y melaza de remolacha bajo condiciones controladas de 28 °C durante 72 horas. El estudio logró un rendimiento óptimo de etanol de 40,63 g/L, destacando la pulpa de zanahoria como una fuente prometedora para la producción de bioetanol con alto valor añadido.

Lopes et al. (2020) investigaron la utilización de pulpa de café y agua residual para la producción de bebidas destiladas. Utilizando *Saccharomyces cerevisiae* y combinando pulpa de café húmeda con sacarosa, el estudio logró una bebida con un 38% de etanol y una alta aceptación en términos de sabor (80%). Esto demuestra que los subproductos del café pueden ser transformados en bebidas destiladas de alta calidad, agregando valor a la cadena de producción del café.

Optimización de Procesos y Nuevas Tecnologías:

En el contexto de la producción de celulosa bacteriana, un estudio comparativo de mucílago de cacao y el medio de Hestrin y Schramm mostró que, a pesar de desafíos como el alto contenido de azúcar y bajo pH del mucílago, la adición de una fuente de nitrógeno mejoró significativamente la producción de celulosa bacteriana, alcanzando 13,13 g/L. Este hallazgo resalta el potencial del mucílago como fuente de carbono para la producción de celulosa en procesos industriales.

Ko et al. (2020) abordaron el desafío de los inhibidores en los hidrolizados de biomasa lignocelulósica, como el ácido acético, que afectan la eficiencia de conversión a bioetanol. Mediante la mejora genética, desarrollaron una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (XUSAE57) con un rendimiento superior en la conversión de xilosa a etanol, incluso en condiciones de alta

concentración de ácido acético. Este avance subraya la importancia de la ingeniería metabólica para mejorar la viabilidad económica de las biorrefinerías.

Agida et al. (2020) investigaron el impacto del efluente de molino de aceite de palma (POME) en la salud de pollos de engorde. Los resultados indicaron que el POME puede tener efectos beneficiosos en indicadores bioquímicos y hematológicos, sugiriendo un valor nutricional potencial para el POME y su posible influencia positiva en la salud y el rendimiento reproductivo de los pollos.

Tratamiento de Efluentes y Producción de Bioetanol:

Bala et al. (2018) evaluaron la eficacia de un consorcio microbiano mixto para el tratamiento de efluentes de planta de aceite de palma (POME). La secuenciación de genes 16S rRNA y 18S rRNA identificó varios microorganismos, incluyendo *Micrococcus luteus* y *Aspergillus niger*. El consorcio mostró una alta eficiencia en la reducción de demanda bioquímica de oxígeno (BOD), demanda química de oxígeno (COD) y sólidos suspendidos totales (TSS), con reducciones de hasta el 92,23%. El análisis HPLC indicó una descomposición significativa de la celulosa en el POME, demostrando la efectividad del consorcio en la biodegradación de este efluente.

Jackels & Jackels (2006) investigaron el impacto de las mediciones químicas durante la fermentación del café en la calidad del producto final. Los resultados mostraron que un descenso abrupto del pH al final de la fermentación podría servir como un indicador útil para evitar la sobrefermentación y optimizar la calidad del café, lo cual es crucial para los productores de café en países en desarrollo que buscan mejorar la uniformidad y competir en mercados internacionales.

Zinatizadeh et al. (2005) realizaron un estudio sobre la digestión anaerobia del POME en un biorreactor de flujo ascendente con película fija (UASFF) a 38 °C. La eficiencia de remoción de demanda química de oxígeno (DQO) osciló entre el 80,6% y el 98,6%, con una tasa de producción de metano de 0,287 a 0,348 L CH₄/g DQO removido al día. El estudio proporcionó datos valiosos sobre las constantes de semivelocidad y la relación entre carga orgánica y contenido de sólidos suspendidos volátiles en el reactor.

Flórez et al. (2022) abordaron la producción de bioetanol a partir de pulpa de café, destacando la necesidad de evitar la contaminación bacteriana y utilizar enzimas como la pectinasa para la conversión de celulosa y hemicelulosa en azúcares reductores. Se optimizaron las dosis de celulasa y hemicelulasa para el proceso de hidrólisis enzimática, con una producción potencial de etanol de 4.137 litros y una significativa reducción de CO₂ si el etanol se utiliza para reemplazar gasolina.

Finalmente, Walteros et al. (2020) llevaron a cabo un estudio para aislar y caracterizar cepas de *Saccharomyces cerevisiae* nativas de Colombia para la producción de cerveza. La cepa CW12 mostró características organolépticas únicas, con un contenido alcohólico de 4,5% v/v, indicando su potencial para la producción de una cerveza colombiana distintiva. Torres (2013) demostró que el sustrato de papa es más eficiente que el de naranja para la producción de proteína celular, y Arias (2020) destacó que el mucílago de café, combinado con melaza de caña, puede producir bioetanol con una pureza del 15,1% v/v y una concentración de 90,1% v/v tras purificación.

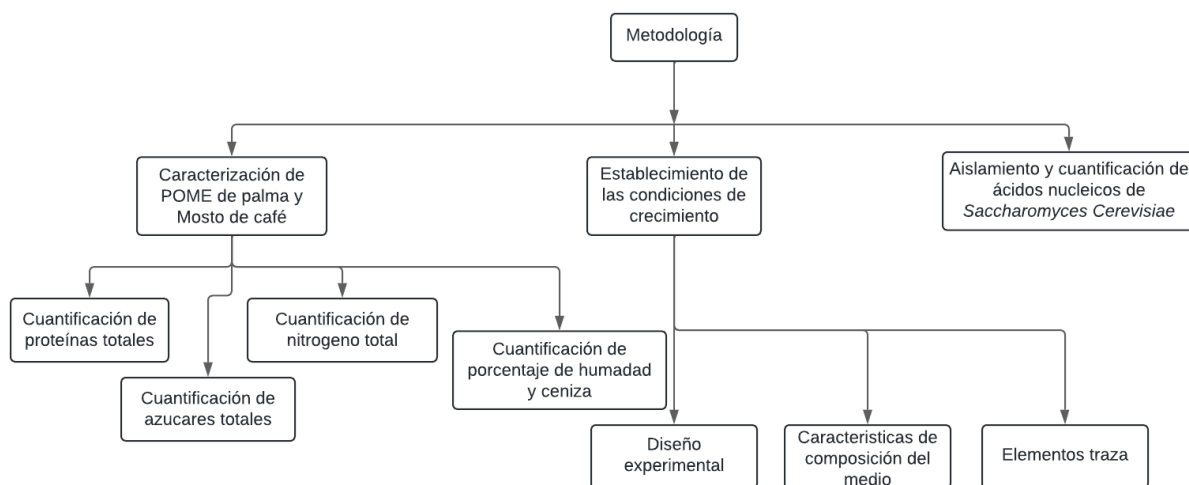
Estos estudios reflejan un avance significativo en la optimización de procesos biotecnológicos y la valorización de residuos, subrayando la importancia de la innovación continua en la biotecnología para mejorar la sostenibilidad y la eficiencia en la producción de

bioproductos y el manejo de residuos. La combinación de técnicas microbiológicas, enzimáticas y biotecnológicas ofrece soluciones prometedoras para la reducción de impactos ambientales y la creación de productos de alto valor añadido a partir de recursos subutilizados.

3 Metodología

Figura 4

Diagrama de la metodología



3.1 Metodología de Establecimiento de Condiciones óptimas de Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*

3.1.1 Caracterización de POME de Palma y Mosto de Café

Las muestras de POME de la palma y mosto de café, poseen sólidos suspendidos por lo que inicialmente por lo que fue necesario centrifugar hasta obtener dos fases bien definidas, con un sobrenadante traslúcido y un sedimento. Se cuantificó el porcentaje de sedimento obtenido por cantidad de muestra total. A los sobrenadantes se les midió los grados brix, pH, proteínas totales, nitrógeno total, grasas y aceites, fenoles totales, calcio, potasio, sodio, contenido de humedad, cenizas, proteína, carbohidratos totales y perfil de azúcares.

3.1.1.1 Cuantificación proteínas totales

La cuantificación de proteínas totales se realizó por medio del método de Bradford, el cual cuantifica la unión del colorante Azul de Coomasie a una proteína desconocida y se comparó con el estándar de diferentes concentraciones de proteína suero de albúmina bovina (BSA) (Bradford, 1976a).

El método Bradford es un método de cuantificación de proteínas que se basa en la reacción del colorante con los grupos amino presentes en las proteínas. En un medio ácido, el Coomassie Brilliant Blue G-250 se encuentra en su forma ácida, que es de color rojo. Cuando este colorante se une a las proteínas, su estructura cambia a su forma básica, que es de color azul. (Fernández & Apunte, 2019).

Para realizar este método, se preparó un estándar de BSA en concentración conocida y se hizo la lectura de absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 595 nm, con un espectrofotómetro.

3.1.1.2 Cuantificación de azúcares totales

Para medir el contenido de azúcares totales en la muestra, se utilizó la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Esta medición fue realizada por el laboratorio CICAT como un servicio técnico. El proceso de cuantificación de azúcares por HPLC se divide en varias etapas clave:

Preparación de la Muestra: Primero, se prepara la muestra diluyéndola y filtrándola para eliminar cualquier partícula que pudiera interferir con la cromatografía. Es crucial que la muestra esté limpia para asegurar mediciones precisas.

Separación de Azúcares: La muestra preparada se inyecta en el sistema HPLC, donde pasa a través de una columna cromatográfica. Aquí, los azúcares se separan según sus características físicas y químicas. La elección de la columna y las condiciones de operación, como el tipo de fase móvil y la temperatura, dependen del tipo de azúcares que queremos analizar.

Detección: Los azúcares separados se detectan con un detector específico, que puede ser un detector de índice de refracción (RI) o de UV, dependiendo del tipo de azúcares y de la sensibilidad necesaria. La información obtenida del detector se usa para medir la cantidad de cada azúcar en la muestra, basándose en el área de los picos en el cromatograma.

Cálculo de la Concentración: Finalmente, para calcular la concentración de azúcares totales, se comparan los tiempos de retención y las áreas de los picos con los estándares de referencia. Los resultados se expresan en unidades de concentración, como gramos por litro (g/L), utilizando curvas de calibración obtenidas con azúcares conocidos.

3.1.1.3 Cuantificación de Nitrógeno total

El contenido de nitrógeno de la muestra se midió por el método Kjeldahl (NTC1556). Esta medición fue realizada por el laboratorio CICAT como un servicio técnico. El contenido en la proteína se puede calcular de la siguiente manera, asumiendo una proporción entre la proteína y el nitrógeno del compuesto específico que se está probando.

Los procedimientos por seguir son diferentes según el nitrógeno liberado durante la etapa de destilación se recoge en solución de ácido bórico o exceso conocido de ácido clorhídrico o patrón de ácido sulfúrico (García *et al.*, 2013).

3.1.1.4 Cuantificación de porcentaje de humedad y cenizas

El contenido en agua de la muestra se calculó mediante diferencia de peso y se expresa en % de humedad, el valor de ceniza se determina por destrucción de la materia orgánica que está presente en la muestra por calcinación y determinación gravimétrica del residuo. Esta medición fue realizada por el laboratorio CICAT como un servicio técnico.

3.1.2 Establecimiento de Condiciones de Crecimiento

Para establecer las mejores condiciones de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* de origen comercial se realizó un diseño experimental que determinó la concentración óptima del residuo POME o mosto de café que promueve el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*. De igual forma, se tuvo en cuenta el nivel de pH, en el que se halló mayor concentración de levadura. Durante este proceso, también se consideraron las sales y, si era necesario, el uso de un buffer tamponante. En la Tabla 2 se muestra las principales características del diseño experimental, el que se observó la variación de crecimiento desde la hora 0, hasta 22 horas, estas horas son de fermentación del grano de café, esto se realizó con el fin saber cuál hora contenía las mejores condiciones de crecimiento, como también las distintas concentraciones de 25%, 50% y 100%, con variación de pH desde neutro, 5.5 y nativo, por último con suplementos y sin suplementos.

Tabla 2

Características de Diseño Experimental del Proceso

Diseño del Experimento	
Variables	Variaciones del proceso
Hora de fermentación	0h, 3h, 12h, 15h, 18h, 22h, y R.L

Diseño del Experimento	
Variables	Variaciones del proceso
Concentración	100%, 50%, 25%
pH	Neutro, 5,5 y nativo
Suplementos	Con suplementos y sin suplementos

Se monitoreo el crecimiento de la levadura en el medio de cultivo preparado, a partir de la biomasa residual (POME o mosto de café), al utilizar una curva de crecimiento de 10 horas y medir la absorbancia a 600 nm, de manera que se pudiese observar el cambio de la densidad celular en cada hora. Durante el proceso se mantuvo en agitación constante a 100 revoluciones por minuto y una temperatura de 35°C, de esta manera se obtuvo la generación de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*. En la Tabla 3 se presentan las características de composición del medio de cultivo, con las respectivas cantidades con concentración.

Tabla 3

Características de Composición del Medio de Cultivo

Composición del Medio de Cultivo	
Compuesto	Concentración (g/L)
Fosfato Monopotásico (KH ₂ PO ₄)	1.5
Fosfato Disódico (Na ₂ HPO ₄)	3
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0.2
Elementos traza	0.1

Tabla 4*Elementos de la Traza*

Elementos de la Traza	
Compuesto	Concentración (g/L)
Sulfato de Hierro (II) (FeSO ₄ .7H ₂ O)	10
Sulfato de Zinc (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	2.25
Sulfato de cobre pentahidratado (CuSO ₄ .5H ₂ O)	1
Sulfato de magnesio tetrahidratado MgSO ₄ .4H ₂ O	0.5
Cloruro de calcio dihidratado CaCl ₂ .2H ₂ O	2
Ácido bórico H ₃ BO ₄	0.23
Heptamolibdato de amonio (NH ₄) ₂ Mo ₇ O ₂₄	0.2
Ácido clorhídrico HCl	10

Adicionalmente, en la Tabla 4 se observan los elementos principales empleados para el proceso y las concentraciones específicas para cada caso.

3.1.2.1 Aislamiento de ácidos nucleicos de *Saccharomyces cerevisiae*

El aislamiento de ácidos nucleicos se realizó a partir de adaptaciones del método salting-out, el cual consistió en retirar el sedimento nativo de la muestra a una velocidad de 5000 gravedades durante 10 minutos. Al retirar el sedimento se agregó un buffer de resuspensión, el

cual contenía Tris-HCl, sacarosa y cloruro de magnesio. Luego de esto, se centrifugó a 4000 gravedades durante cinco minutos a temperatura de 4°C.

Una vez retirado el sobrenadante, se agregó el buffer de lisis, el cual contenía dodecilsulfato sódico al 10%, para desnaturalizar membranas, acetato de sodio utilizado para separar polisacáridos y EDTA, que actuaron como un agente quelante. Se realizaron 5 ciclos de sonicación con una amplitud del 40%, luego se agregó cloruro de sodio en una concentración de 1.5 M, para precipitar las proteínas y se centrifugó a 3000 gravedades por 5 minutos.

Se tomó el sobrenadante y se agregó 2-propanol frío, esto de forma lenta, y se dejó en un baño de hielo a -20°C por una hora. Luego se centrifugó a 10000 gravedades por 10 minutos, en este paso se pudo observar un pellet.

Como paso siguiente se retiró todo el sobrenadante y se dejó en procesos de secado la muestra. Posteriormente se suspendió en buffer TE.

3.1.2.2 Cuantificación de ADN extraído

La determinación cualitativa y cuantitativa de las muestras de ácidos nucleicos es fundamental para el éxito de los análisis posteriores y se realiza de forma rutinaria mediante espectroscopia UV-Vis en la mayoría de los laboratorios de biología molecular.

La relación de absorbancia 260/280 es un buen indicador de la contaminación por proteínas: si el valor es inferior o igual a 1,8, la muestra de ADN es pura.

La cuantificación de ADN se empleó un NanoDrop, el cual tiene un límite de detección entre 2.0 µg/mL y 27500 µg/mL. Se tomó un volumen de muestra de 1 µL para la información de la pureza del ADN por medio de la relación de absorbancia de 260/280 y 260/230, esto para mirar la presencia de proteínas y ARN (RNA/DNA Quantification - US, 2021).

3.2 Metodología de Correlación de Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*

3.2.1 Proceso de Obtención de *Saccharomyces cerevisiae*

Como parte del proceso para identificación de la correlación de crecimiento *Saccharomyces cerevisiae* se realizaron curvas a partir de la biomasa del mosto que se obtuvo a partir de procesos de fermentación de los granos de café

Luego como paso siguiente se analizaron distintas concentraciones, las cuales se diluían para que se le agregaran los compuestos traza y las sales. Posteriormente se esterilizaba el medio junto con los compuestos de traza y la sales.

Las levaduras se activaron en medio YPD durante 24 horas. Pasadas las 24 horas, se tomaron 10 mL de esa solución más 90 mL de YPD y se incubaron por otras 24 horas. Posteriormente, se centrifugó y el sedimento obtenido fue utilizado para la realización de las curvas de crecimiento.

3.2.2 Proceso de Aislamiento de Ácidos nucleicos

El aislamiento de ácidos nucleicos es un proceso mediante el cual se extrae el material genético presente en las células. Los ácidos nucleicos son moléculas que contienen la información genética esencial para el funcionamiento y desarrollo de los organismos vivos.

El objetivo del aislamiento de ácidos nucleicos es obtener una muestra de alta calidad y concentración. Los ácidos nucleicos aislados pueden ser utilizados en diversas aplicaciones biológicas y biotecnológicas, como la amplificación de genes, secuenciación genómica, estudios de expresión génica, entre otros. En la Figura 5 se describen los pasos empleados para el aislamiento de ácidos nucleicos.

Cultivo de Levadura:

Se cultivó levadura en medio YPD apropiado hasta que alcanzó una fase de crecimiento activa.

Recolección de Células:

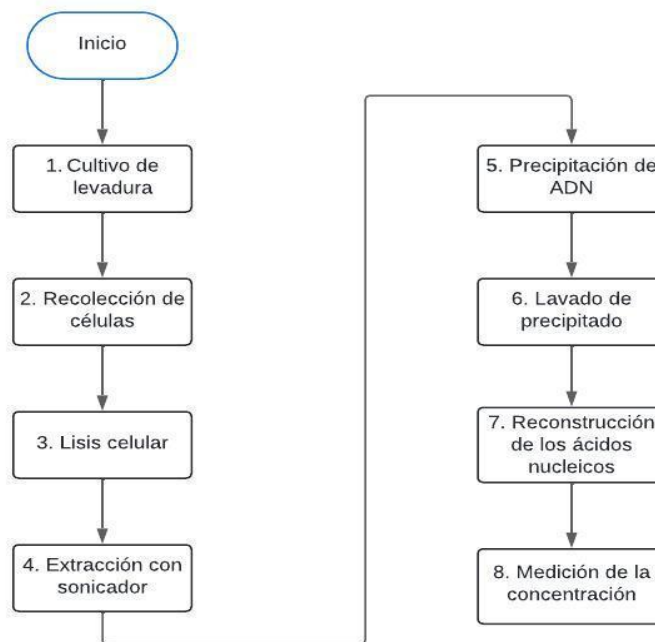
Las células de levadura se recolectaron mediante centrifugación para formar un pellet celular.

Lisis Celular

El pellet se sometió a un proceso de lisis celular, en el cual se rompen las membranas celulares para liberar el contenido celular, esto incluye el núcleo que contiene los ácidos nucleicos.

Figura 5

Diagrama del proceso del Aislamiento de ácidos nucleicos de Saccharomyces cerevisiae



Precipitación de los ácidos nucleicos:

Se añade alcohol isopropílico para precipitar ácidos nucleicos, que luego se recogió por centrifugación.

Lavado del Precipitado:

El precipitado de ácidos nucleicos se lava con etanol para eliminar restos de contaminantes.

Reconstitución de Ácidos nucleicos:

Los ácidos nucleicos se resuspenden en un tampón o solución adecuada

Medición de la Concentración

La concentración de los ácidos nucleicos se mide utilizando técnicas como la espectrofotometría para asegurar su calidad.

4 Resultados

4.1 Resultados de Caracterización

A partir de la caracterización de los residuos agroindustriales de café y palma, se puede determinar que la composición específica de carbohidratos en el POME limita su efectividad como sustrato para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*. El POME contiene una baja concentración de azúcares simples fermentables, como glucosa y fructosa, y está compuesto principalmente por otros carbohidratos menos accesibles para la levadura, como xilosa y ciertos oligosacáridos. Además, su alta proporción de lípidos y ácidos grasos complica el aprovechamiento del sustrato para la fermentación. Esta composición restringe la disponibilidad de fuentes de carbono fermentables, lo que explica por qué el POME resulta insuficiente para sostener un crecimiento óptimo de la levadura, en contraste con el mosto de café, que contiene una mayor concentración de glucosa y fructosa, carbohidratos preferidos por *S. cerevisiae* para su metabolismo y producción de biomasa.

Para la caracterización de los residuos de mosto de café, se realizó una colecta de las muestras en un fermentador a las cero horas, 3 horas, 12 horas, 15 horas, 18 horas y 22 horas, luego se colectó una muestra cuando se lavó el fermentador. La muestra de POME fue colectada en el proceso de clarificación y esterilización. El análisis de las mediciones de pH, cuantificación de proteínas, carbohidratos, carbohidratos totales, sólidos totales, grasas y aceites, nitrógeno, calcio, sodio, nitrógeno, % de humedad y cenizas se presentan a continuación:

4.1.1 Medición de pH y cuantificación de proteínas en muestras de MOSTO de café y POME

4.1.1.1 Resultado de MOSTO de Café

Tabla 5

Medición de pH para mosto de variedad Caturra a 0h, 3h, 12h, 15h, 18h, variedad Cenicafe a 22h y residuo de lavado (RL)

Variedad	Muestra	pH
Caturra	0h	4.43
Caturra	3h	4.57
Caturra	12h	4.85
Caturra	15h	4.57
Caturra	18h	4.14
Cenicafe	22h	4.24
Residuo de lavado	RL	4.18

Como se observa en la Tabla 5, en la muestra inicial (0h), el pH es de 4.43, después de 3 horas, el pH aumenta ligeramente a 4.57. Después de 12 horas, el pH continúa aumentando a 4.85. A las 15 horas, el pH vuelve a ser de 4.57, al igual que en las 3 horas. A las 18 horas, el pH disminuye a 4.14. Esto indica un cambio en la acidez, asociado posiblemente a procesos de fermentación de organismos ambientales propios del proceso de fermentación del mosto, y en la concentración de azúcar en la solución. En la última hora registrada (22h), el pH sube ligeramente a 4. Esto indica que la solución se está volviendo menos ácida pero la concentración de azúcar está disminuyendo. Finalmente, en la muestra RL, el pH es de 4.18. No se proporciona información sobre el tiempo en esta muestra debido a que no hace parte del proceso de fermentación.

Tabla 6

Cuantificación de proteínas del mosto de variedad Caturra a 0h, 3h, 12h, 15h, 18h, variedad Cenicafe a 22h y residuo de lavado (RL).

Muestra	% Proteínas en la muestra total (g proteína/g de muestra)
0h	0.0779±0,0029
3h	0.0363±0,0026
12h	0.0270±0,0024
15h	0.0483±0,0011
18h	0.0330±0,0018
22h	0.0511±0,0044
RL	0.0774±0,0078

A partir de la Tabla 6 se pudo notar que el porcentaje de proteínas en la muestra total varía en cada período de tiempo. A las 0h, el porcentaje de proteínas fue de 0.0779±0,0029, lo cual indica un valor relativamente alto con respecto a las otras horas de fermentación. Luego, a las 3h, el porcentaje de proteínas disminuyó significativamente a 0.0363±0,0026. Esto sugiere que hubo una disminución en la concentración de proteínas en la muestra.

Después de 12 horas, el porcentaje de proteínas en la muestra fue de 0.0270±0,0024, lo cual indica que continuó en disminución en comparación con las 0h. Sin embargo, esta disminución es menor que la observada a las 3h. Posteriormente, a las 15h, se registra un aumento en el porcentaje de proteínas a 0.0483 ±0,0011. Esto indica que la concentración de proteínas se incrementó en comparación con las mediciones anteriores. Sin embargo, a las 18h, el porcentaje de proteínas disminuye nuevamente a 0.0330±0,0018. Por último, a las 22h, se observa un aumento en el porcentaje de proteínas a 0.0511±0,0044, indicando un incremento en la concentración de proteínas en relación con la medición anterior.

Se puede concluir que hubo fluctuaciones en la concentración de proteínas en la muestra a lo largo del tiempo, con disminuciones y aumentos intermitentes. Esto puede sugerir cambios en el metabolismo o en las condiciones de las muestras en diferentes momentos.

4.1.3 Resultados de POME

Tabla 7

Medición de pH para POME

Muestra	pH
POME	4,36

Como se puede observar en la tabla 6 el pH de la muestra de POME es ácido y en comparación con el pH reportado en las muestras de mosto estas se encuentran en el mismo rango.

Tabla 8

Cuantificación de proteínas de POME

Muestra	% Proteínas en la muestra total (g proteína/g de muestra)
POME	0,096±0,065

Basado en la tabla 8 se puede observar que el porcentaje de proteínas en la muestra de POME es más alto que en las muestras de mosto a distintas horas de fermentación.

4.1.2 Resultados de carbohidratos, carbohidratos totales, sólidos totales, grasas y aceites, nitrógeno, calcio, sodio, nitrógeno, % de humedad y cenizas de mosto de café y POME de palma

Tabla 9

Caracterización de Mosto y POME

Parámetros		MOSTO CAFÉ	POME
Fructosa	g/100g de muestra (%)	2,45	N.D
Glucosa	g/100g de muestra (%)	1,83	N.D
Sacarosa	g/100g de muestra (%)	<0,1	N.D
Maltosa	g/100g de muestra (%)	<0,1	N.D
Lactosa	g/100g de muestra (%)	<0,1	N.D
Galactosa	g/100g de muestra (%)	<0,1	N.D
Xilosa	g/100g de muestra (%)	<0,1	N.D
Carbohidratos totales	g/100g de muestra (%)	5,97	4,38
Sólidos totales	%	45,6	7,75
Grasas y aceites	mg/L	<10	1459
N total	%	0,035	0,286
Ca total	mg/L Ca	134,7	572,393
K total	mg/L K	1367	4010,542
Na total	mg/L Na	1,662	80,569
Humedad	%	54,4	92,25
Cenizas	%	1,63	18,35

Nota: ND = No identificado

Esta caracterización fue realizada por el laboratorio-CICTA. Por cada 100 gramos de POME se observa que contiene alrededor de 5,97 gramos de carbohidratos, principalmente en forma de fructosa y glucosa, lo que lo hace rico en azúcares simples. Además, su pH es relativamente ácido, lo que puede afectar su sabor y calidad final. Con un contenido de sólidos totales del 45,6%, se vuelve bastante concentrado en compuestos solubles como azúcares, ácidos

orgánicos, minerales y aromas. En cuanto a grasas y aceites, apenas contiene menos de 10 mg/L, lo que lo convierte a la muestra baja en grasas. También se detectan minerales como calcio, potasio y sodio. Su contenido de humedad es del 54,4% y su contenido de cenizas es del 1,63%, lo que nos da una idea de su composición total y la cantidad de agua y residuos inorgánicos presentes. Por último, su contenido proteico es bastante bajo, con solo un 0,22%, por lo que no es una fuente significativa de proteínas.

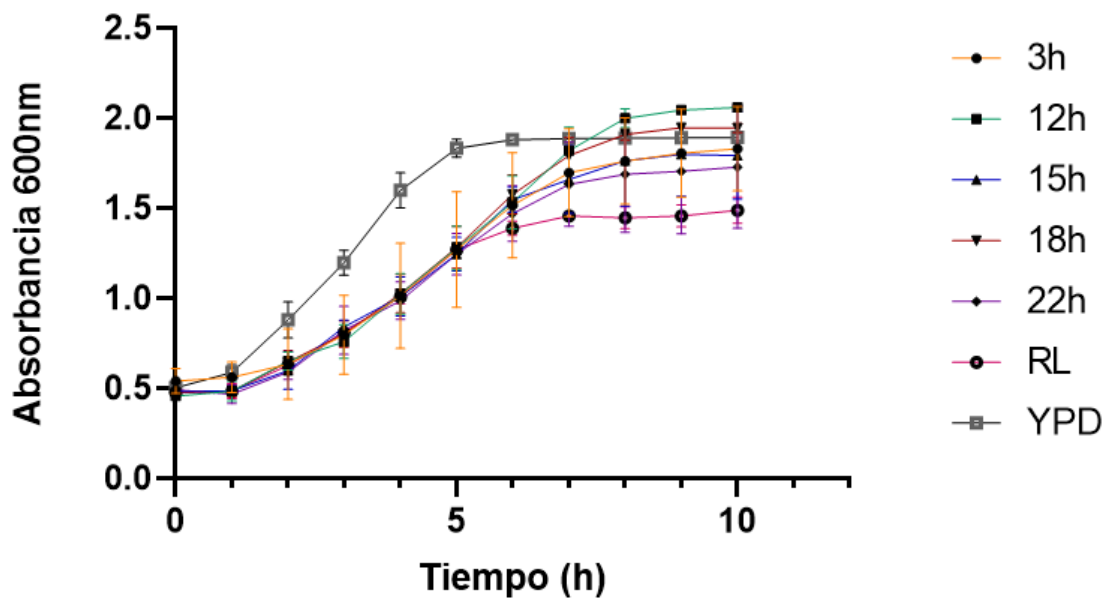
4.2 Curvas de crecimiento en medio de POME y mosto de café

4.2.1 Curvas de crecimiento en medio de mosto variedad caturra, cenicafe y residuo de lavado con levadura de uso comercial, componentes traza y disolución buffer con agitación constante de 100 rpm y a una temperatura de 25°C.

4.2.1.1 Curvas al 25%

Figura 6

*Comparación de las curvas de crecimiento de la levadura *Saccharomyces Cerevisiae* en medio de mosto variedad caturra a 3h, 12h, 15h, 18h de fermentación, de variedad cenicafe a 22h de fermentación y residuo de lavado (RL) y crecimiento en medio YPD.*



Como se puede observar en la figura 6 la 3h, 12h y 18h presentan una absorbancia más alta que la curva de YPD, esta curva fue realizada para tener un control con respecto a las curvas en medio de mosto, esto demuestra que tienen los nutrientes que la levadura necesita para crecer. La 15h y 22h tuvieron una absorbancia más baja sin embargo la diferencia no es significativa, por otro lado, el residuo de lavado (RL) presentó una absorbancia más baja que las demás, esto es debido a que este líquido remanente contiene toda la suciedad que tenían los granos de café, con esto se observó que no tenía los nutrientes suficientes para el crecimiento de la levadura.

Tabla 10

Velocidad específica de crecimiento (μ)

Hora	μ 3h	μ 12h	μ 15h	μ 18h	μ 22h	μ RL
1	0,0234	0,0545	0,0103	0,0138	-0,0493	0,0118
2	0,2445	0,2963	0,2089	0,2885	0,2322	0,2611
3	0,2223	0,1547	0,3382	0,2121	0,3315	0,2537
4	0,2475	0,2997	0,1830	0,2483	0,1822	0,2218
5	0,2163	0,2217	0,2104	0,2219	0,2331	0,2279
6	0,1549	0,1809	0,2160	0,2068	0,1654	0,0894

7	0,0952	0,1713	0,0701	0,1292	0,1054	0,0490
8	0,0376	0,0947	0,0612	0,0625	0,0335	-0,0071
9	0,0239	0,0224	0,0200	0,0194	0,0098	0,0076
10	0,0087	0,0071	-0,0032	-0,0007	0,0136	0,0210

La velocidad específica de crecimiento (velocidad de crecimiento por unidad de biomasa) está dada en unidades de tiempo (h^{-1}). Se da en la fase exponencial del crecimiento de la levadura y se define por la siguiente fórmula

$$\ln N - \ln N_0 = \mu (t - t_0)$$

$$\mu = \frac{\ln N - \ln N_0}{(t - t_0)}$$

Basado en los valores obtenidos, en la Tabla 10 se puede observar que en 3h, 12h, 22h y RL (residuo de lavado) el crecimiento exponencial es en la quinta hora mientras que en 15h y 18h el crecimiento exponencial es en la sexta hora. Esta hora es escogida para la siguiente fase debido a que la levadura aún no entra en la fase estacionaria (fase en la cual ya no se encuentran nutrientes y no hay división celular).

En 15h, 22h y RL, la mayor velocidad de crecimiento se presenta a la tercera hora donde los valores de μ son 0,3382, 0,3315 y 0,2537, respectivamente, sin embargo, también entran en rápido en la fase estacionaria mientras que, en la 3h, 12h y 18h la mayor velocidad de crecimiento se presenta en la cuarta hora donde los valores de μ son 0,2475, 0,2997 y 0,2483 tardando más en llegar a la fase estacionaria.

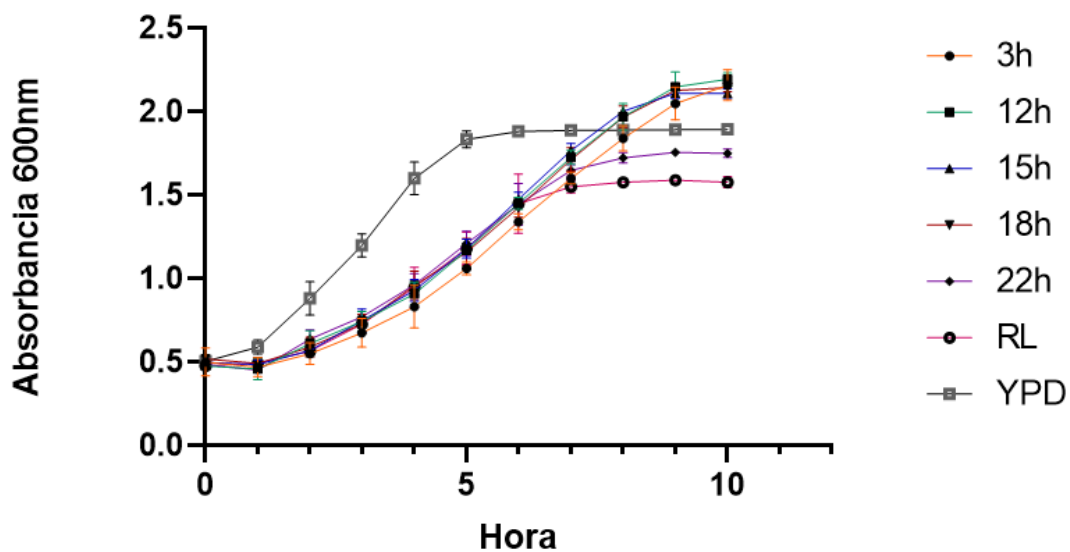
En general, se puede concluir que el microorganismo presenta una menor tasa de crecimiento en las primeras horas de fermentación y tiende a disminuir a lo largo del tiempo. Sin embargo, es importante tener en cuenta que estos valores son solo una representación de un

período de tiempo específico y podría haber variaciones en la tasa de crecimiento en diferentes condiciones o en momentos posteriores.

4.2.1.2 Curvas al 50%

Figura 7

Comparación de las curvas de crecimiento de la levadura Saccharomyces Cerevisiae en medio de mosto variedad caturra a 3h, 12h, 15h, 18h de fermentación, de variedad cenicafe a 22h de fermentación y residuo de lavado (RL) y crecimiento en medio YPD.



A partir de la figura 7 se puede apreciar que no hay diferencia significativa entre los valores de absorbancia de la curva YPD y las curvas de crecimiento 3h, 12h, 15h y 18h, mientras que con el cultivo de 22h mantiene la misma diferencia, por otro lado, el residuo de lavado aumentó la densidad óptica, sin embargo, la diferencia con la curva de crecimiento YPD sigue siendo significativa.

Tabla 11*Velocidad específica de crecimiento (μ)*

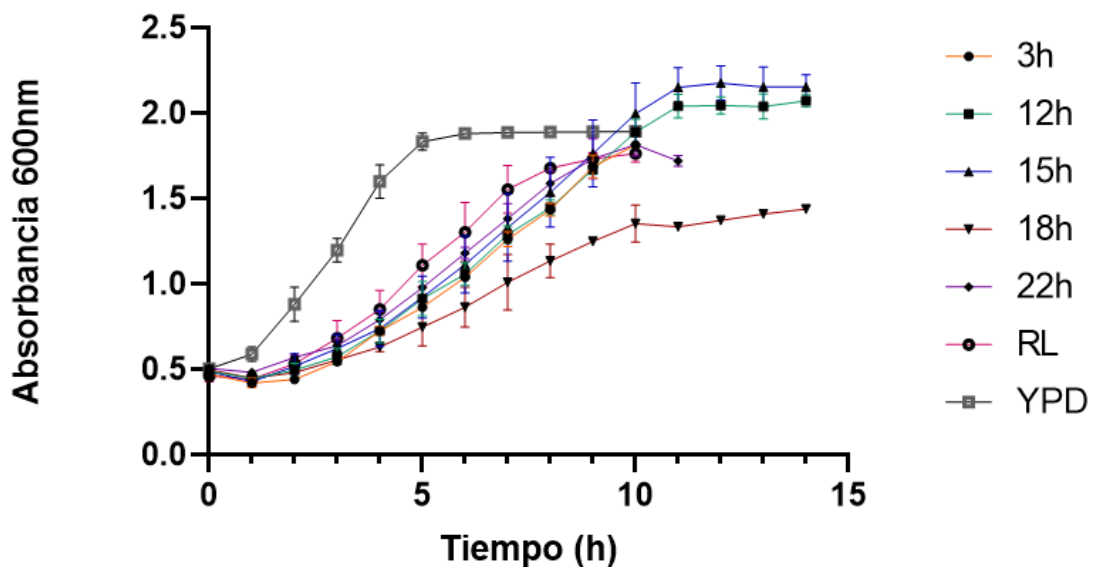
Hora	μ 3h	μ 12	μ 15	μ 18	μ 22	μ RL
1	-0,0635	-0,0414	-0,0265	-0,0562	-0,0705	0,0341
2	0,1602	0,2870	0,1569	0,1839	0,3431	0,1401
3	0,2035	0,1988	0,2744	0,2109	0,1883	0,2490
4	0,2096	0,1986	0,2187	0,2740	0,2229	0,2657
5	0,2433	0,2536	0,2387	0,1901	0,2296	0,2208
6	0,2341	0,2148	0,2240	0,2069	0,1773	0,2031
7	0,1784	0,1744	0,1799	0,1847	0,1313	0,0688
8	0,1392	0,1322	0,1258	0,1383	0,0451	0,0163
9	0,1068	0,0874	0,0524	0,0786	0,0196	0,0088
10	0,0528	0,0209	-0,0011	0,0070	-0,0046	-0,0079

Al tomar como base la Tabla 11 se puede observar que los valores de μ varían a lo largo del tiempo y pueden ser positivos o negativos. Los valores negativos indican una disminución en la población, mientras que los valores positivos indican un aumento. Al analizar el comportamiento de los datos, se puede observar que la velocidad de crecimiento es mayor en la sexta hora de haber iniciado el cultivo exceptuando 22h en donde la mayor velocidad de crecimiento fue en la quinta hora de haber iniciado el cultivo

4.2.1.3 Curvas al 100%

Figura 8

*Comparación de las curvas de crecimiento de la levadura *Saccharomyces Cerevisiae* en medio de mosto variedad caturra a 3h, 12h, 15h, 18h de fermentación, de variedad cenicafe a 22h de fermentación y residuo de lavado (RL) y crecimiento en medio YPD.*



Basado en la figura 8 se puede observar que las curvas 12h y 15h aumentaron su densidad óptica con respecto al control, por otro lado, el cultivo 18h disminuyó su densidad óptica, esto se puede deber a la turbidez que presentó la muestra. De igual forma que sucedió con las demás muestras la curva de 22h mantuvo su densidad óptica, esto se puede deber a que es una diferente variedad de café. El residuo de lavado aumentó la densidad óptica llegando a valores semejantes al control, pero esta muestra al contener tanta suciedad es muy difícil de manipular y hacer crecer levadura por lo que esta fue descartada.

Tabla 12*Velocidad específica de crecimiento (μ)*

Hora	μ 3h	μ 12	μ 15	μ 18	μ 22	μ RL
1	-0,11579	-0,08931	-0,12612	-0,09945	-0,04355	-0,04052
2	0,04998	0,10222	0,18852	0,06461	0,16562	0,18169
3	0,20990	0,15009	0,18243	0,14532	0,11349	0,25097
4	0,28446	0,23170	0,17289	0,12845	0,21291	0,21825
5	0,17643	0,23204	0,22197	0,16955	0,21348	0,26598
6	0,18666	0,14713	0,18755	0,14551	0,18861	0,16095
7	0,19356	0,19838	0,17837	0,15613	0,15753	0,17578
8	0,12782	0,11560	0,14375	0,11580	0,13953	0,07741
9	0,16194	0,14290	0,13802	0,09619	0,08643	0,03129
10	0,07320	0,12325	0,12394	0,08075	0,04678	0,01794
11		0,07790	0,07448	-0,01451	-0,05460	
12		0,00147	0,01156	0,02772		
13		-0,00327	-0,00986	0,02768		
14		0,01638	-0,00077	0,01932		

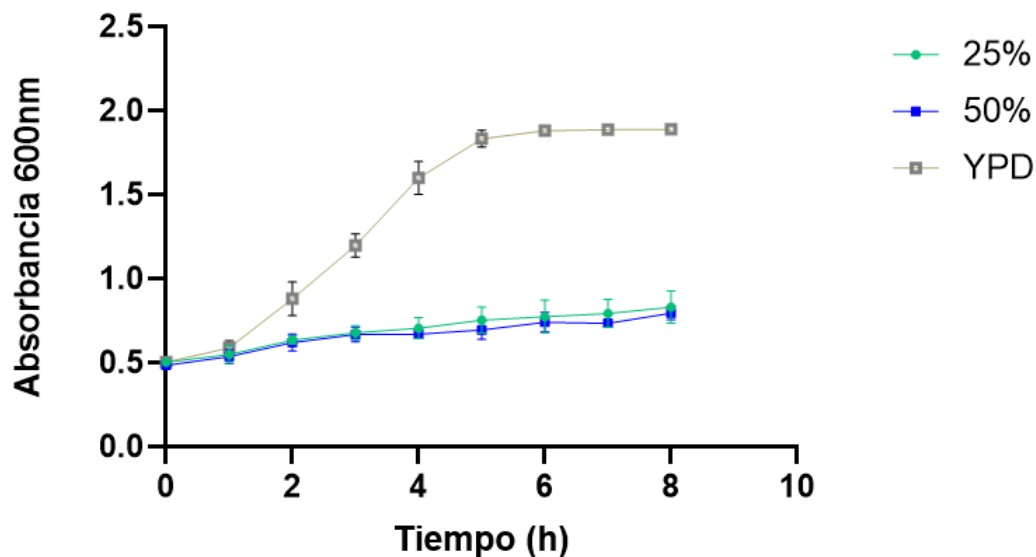
Como se observa en la Tabla 12, la velocidad específica de crecimiento (μ) es un indicador importante para medir la capacidad de crecimiento de una levadura en un medio específico. En este caso, se han registrado los valores de μ de la levadura *Saccharomyces Cerevisiae* en el cultivo de mosto de café a diferentes horas. En general, se observa que la levadura presenta una tasa de crecimiento mayor en la séptima hora de haber iniciado el cultivo con excepción de 22h la cual tiene el crecimiento exponencial hasta la octava. Los valores negativos se dan por que las células ya no presentan tanto crecimiento sino por el contrario están muriendo.

El cultivo de 25%, 50% y 100% de concentración no varían significativamente en el valor de la velocidad específica de crecimiento, lo cual quiere decir que el cultivo al 25% proporciona la cantidad de nutrientes suficientes para el crecimiento de las levaduras. Teniendo la concentración óptima para el crecimiento de la levadura es necesario elegir la hora de fermentación a la cual la levadura tiene el valor de la fase exponencial más alto sin que haya entrado en la fase estacionaria ya que en esta fase se la producción de alcoholes lo cual no es beneficioso para el crecimiento de las levaduras. Se eligió la hora de fermentación 18 debido a que tiene un valor alto de la velocidad específica de crecimiento y esta hora de fermentación ya es considerada como residuo por lo cual es aprovechable para ser utilizado como medio de cultivo. Se pudo inferir que el mayor valor de μ en la hora de fermentación 18 es a la sexta hora por lo que esta se toma para hacer las demás fases.

4.2.2 Curvas de crecimiento en medio de POME con levadura de uso comercial, componentes traza y disolución buffer con agitación constante de 100 rpm y a una temperatura de 25°C.

Figura 9

Curva de crecimiento de la levadura *Saccharomyces Cerevisiae* de la muestra de POME a una concentración de 25% y 50% con compuestos traza y disolución buffer con una agitación de 100 rpm y una temperatura de 34°C



Por lo observado en la gráfica, las curvas realizadas con medio POME tuvieron una baja densidad óptica, con esto se puede inferir que este medio no posee los nutrientes que necesita la levadura para poder crecer, debido a esto se descartó el medio POME para las siguientes fases.

4.3 Variación de pH con muestra de mosto caturra de 18 horas de fermentación con componentes traza y disolución buffer y concentración al 25%

Tabla 13

Absorbancia inicial y a la hora 6 de crecimiento para la variación de pH de la muestra caturra de 18 horas de fermentación con componentes traza y disolución buffer y concentración al 25%

	Promedio		
	pH 4	pH 5,5	pH 7
Abs 0	0,493±0,013	0,494±0,011	0,489±0,008
Abs 6	1,58±0,158	1,785±0,03	1,738±0,059

Tabla 14

Variación de pH de la muestra caturra de 18 horas de fermentación con componentes traza y disolución buffer y concentración al 25%

	Promedio		
	Inicial	Hora 0	Hora 6
18h pH nativo	4±0,02	4,04±0,08	3,92±0,07
18h pH 5,5	5,49±0,21	5,15±0,07	5,03±0,29
18h pH 7	7,17±0,14	5,55±0,16	5,29±0,13

La Tabla 14 muestra los valores promedio con desviación estándar para tres variables diferentes (inicial, hora 0 y hora 6) en tres condiciones diferentes (18h pH nativo, 18h pH 5,5 y 18h pH 7).

Se puede observar en la tabla 14 los valores de pH nativo no tuvieron cambios, el pH 5,5 tuvo una baja disminución, sin embargo el pH 7 si tuvo una variación significativa pasando de 7,17 a 5,29 finalizando a la hora 6 en un valor muy cercano al pH 5,5. En la tabla 13 se

reportaron los resultados de la absorbancia inicial y pasadas 6 horas, estos valores arrojados no tuvieron una variación significativa por lo cual para la siguiente fase se escogió el pH nativo ya que este implicaría menor costo al no modificar el pH, sin afectar el crecimiento de la levadura

En cuanto a la desviación estándar, se puede notar que los valores son muy bajos en general, indicando una baja dispersión de los datos en cada grupo. Los valores más altos se encuentran en 18h pH 5,5 tanto en la hora 0 como en la hora 6.

4.4 Variación de componentes traza y disolución buffer con muestra de mosto caturra de 18 horas de fermentación y concentración al 25%

Tabla 15

Densidad óptica inicial y pasada 6 horas de la curva de crecimiento de variedad caturra de 18 horas de fermentación con concentración al 25%, pH nativo sin componentes traza y disolución buffer

Hora	Promedio
0	0,48±0,006
6	1,67±0,025

Tabla 16

Densidad óptica inicial y pasada 6 horas de la curva de crecimiento de variedad caturra de 18 horas de fermentación con concentración al 25%, pH nativo con componentes traza y disolución buffer

Hora	Promedio
0	0,491±0,021
6	1,678±0,064

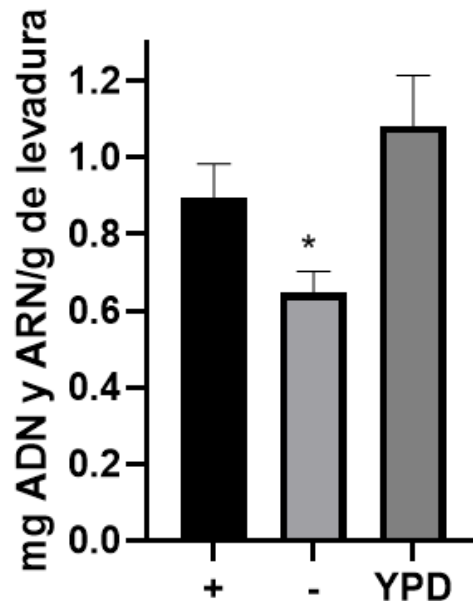
Los resultados de la Tabla 15 y 16 tiene un número de repeticiones igual a tres en los cuales se pueden observar que la densidad óptica no varía considerablemente ya que la muestra a la cual no se le agregó sales, obtiene una absorción de 1,670 mientras que la muestra que se le agregó sales obtuvo una absorbancia de 1,678. Esto indica que no hay una variación significativa, lo cual lleva a la conclusión que no es necesario añadir estas sales siendo esto un beneficio, ya que reduce el costo del crecimiento de la levadura. La desviación estándar es mayor a las 6 horas en comparación con las 0 horas. Esto indica que los valores individuales en las mediciones a las 6 horas están más dispersos alrededor del promedio en comparación con las mediciones a las 0 horas.

4.5 Aislamiento de ácidos nucleicos de *Saccharomyces cerevisiae* crecida en medio de mosto con 18 horas de fermentación y concentración al 25%

Para el aislamiento de ácidos nucleicos se utilizó el medio de mosto a una concentración del 25% sin modificar el pH natural de la muestra debido a que en la muestra de POME no se obtuvo el crecimiento de la levadura lo cual quiere decir que no tiene los nutrientes suficientes. Los resultados se presentarán a continuación.

Figura 10

Comparación de aislamiento de ácidos nucleicos en medio YPD, en medio de mosto de 18 horas de fermentación con y sin compuestos traza y disolución de buffer



La Figura 10 presenta resultados de concentración y cantidad de ácidos nucleicos en la muestra caturra 18h de fermentación utilizando buffer y compuestos traza (+), sin buffer y compuestos traza (-) y el control de levaduras crecidas en medio YPD. Aquí hay una descripción e interpretación detallada de los resultados:

En las concentraciones de ácidos nucleicos se puede observar una variabilidad en donde las muestras con buffer (+) tienden a mostrar concentraciones más altas de ácidos nucleicos en comparación con las muestras sin buffer (-).

Se realizó un análisis de varianza utilizando el test de Tukey's, el cual compara las muestras con buffer, sin buffer y YPD, dio como resultado que hay diferencia significativa entre las muestras con buffer y sin buffer como también entre las muestras de YPD y sin buffer. Como se puede observar en la Figura 11 al analizar las muestras con YPD en comparación con las

muestras con buffer o sin buffer, estas presentaron una mayor concentración con YPD, siendo la más cercana la muestra que tiene buffer.

Tabla 17

Absorbancia (260/280 y 260/230) para el aislamiento de ácidos nucleicos en la muestra de 18 horas de fermentación variedad caturra con buffer y compuestos traza

Promedio Abs 260/280	1,932±0,084
Promedio Abs 260/230	1,509±0,178

La tabla 17 presenta valores de absorbancia (A 260/280 y A 260/230) de la extracción de ácidos nucleicos en medio de mosto con compuestos traza y buffer para evaluar la calidad de los ácidos nucleicos extraídos.

Para los valores de absorbancia (A 260/280) el promedio obtenido fue de 1,932 lo que muestra un resultado aceptable ya que el rango válido es de 1,8 a 2,0. Este resultado indica que la muestra no estaba contaminada por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas, teniendo una buena pureza. Compáren con la literatura y pongan referencias sobre los valores “óptimos”.

Para los valores de absorbancia (A 260/230) el promedio obtenido fue de 1,508 lo que indica que la muestra puede estar contaminada con sales caotrópicas fenoles o carbohidratos ya que el rango ideal está entre 2,0 - 2,2. Referencias, ver comentario anterior.

Tabla 18

Absorbancia (260/280 y 260/230) para el aislamiento de ácidos nucleicos en la muestra de 18 horas de fermentación variedad caturra sin buffer y compuestos traza

Promedio Abs 260/280	1,915±0,056
Promedio Abs 260/230	1,468±0,192

La tabla 18 presenta valores de absorbancia (A 260/280 y A 260/230) de la extracción de ácidos nucleicos en medio de mosto sin compuestos traza y buffer para evaluar la calidad de los ácidos nucleicos extraídos.

Para los valores de absorbancia (A 260/280) el promedio obtenido fue de 1,915 lo que muestra un resultado aceptable estando en el rango válido es de 1,8 a 2,0. Este resultado indica que la muestra no estaba contaminada por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas, teniendo una buena pureza.

Para los valores de absorbancia (A 260/230) el promedio obtenido fue de 1,468 lo cual está por debajo del rango adecuado, esto indica posibles contaminaciones o impurezas en el proceso como sales caotrópicas fenoles o carbohidratos.

4.6 Balance de materia y energía

4.6.1 Balance de materia

En la Hacienda El Roble, se generan aproximadamente 20 litros de mosto por cada 100 kilogramos de cereza de café procesada. Este subproducto, rico en compuestos fermentables, fue aprovechado en este proyecto para estimular el crecimiento de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. A partir de este proceso de fermentación, se estima teóricamente la obtención de 0,50

kilogramos de biomasa de levadura. Esta biomasa contiene, a su vez, un total de 0,45 gramos de ácidos nucleicos.

4.7 Comparación de resultados

4.7.1 *Análisis de pH*

Los resultados obtenidos del análisis del pH del mosto de café en diferentes intervalos de tiempo durante el proceso de fermentación ofrecen una visión importante sobre los cambios químicos que ocurren en la solución. Como se observa en la Tabla 5, el pH inicial del mosto es de 4.43. Esta acidez inicial es consistente con los valores típicos encontrados en muestras de mosto de café antes del inicio de la fermentación, donde los ácidos presentes en el café contribuyen a un pH relativamente bajo (Sikora et al., 2017). A las 3 horas, el pH muestra un ligero aumento a 4.57. Este incremento podría ser indicativo de una disminución inicial en la concentración de ácidos libres, probablemente debido a la acción de las bacterias o levaduras que comienzan a metabolizar algunos de los compuestos ácidos presentes (Davis et al., 2019). Sin embargo, a las 12 horas, el pH continúa aumentando a 4.85, sugiriendo que la fermentación está generando compuestos menos ácidos, lo que podría ser resultado de la producción de ácidos orgánicos menores y otras reacciones metabólicas. El descenso en el pH a 15 horas, donde vuelve a ser 4.57, podría reflejar un equilibrio dinámico en la fermentación, donde las tasas de producción y consumo de ácidos están en un punto de ajuste. Esta fluctuación en el pH puede ser atribuida a la variabilidad en la actividad microbiana o a cambios en la concentración de azúcares fermentables que afectan el equilibrio ácido-base (Kwon et al., 2021). A las 18 horas, el pH disminuye a 4.14, indicando un incremento en la acidez de la solución. Este comportamiento

es típico en procesos de fermentación más prolongados, donde la acumulación de ácidos orgánicos como ácido acético y ácido láctico puede contribuir a una mayor acidez (Gänzle et al., 2016). La posterior ligera elevación del pH a 4.00 en la muestra de 22 horas sugiere que el proceso de fermentación podría estar alcanzando una fase de maduración donde las tasas de producción y consumo de ácidos están equilibradas nuevamente, aunque la disminución en la concentración de azúcares podría estar influyendo en la reducción de la acidez (López et al., 2020). Davis, C. R., et al. (2019).

4.7.2 Análisis del aislamiento de ácidos nucleicos

La concentración y la calidad del aislamiento de ácidos nucleicos fue evaluada por un nanodrop cuya concentración media es 717,61 ng/μL y relación media A260/A280 es 1.93. Estos resultados fueron comparados con la concentración de ácidos nucleicos obtenidos por el método reportado en el artículo “Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras” cuya concentración es 124,8 ng/μL y relación A260/A280 1,86. Para el protocolo de extracción de ADN se utilizó la enzima Beta-glucoronidasa la cual aumenta el costo. Lo que se buscó en este proyecto fue modificar el método para así obtener buenos resultados bajando el costo de producción.

5 Conclusiones

El uso de biomasa residual agroindustrial como medio de cultivo para *Saccharomyces cerevisiae* es prometedor para la producción de ácidos nucleicos, aunque se requiere una optimización adicional de las condiciones para mejorar la eficiencia del proceso.

Por medio de este trabajo se pudo obtener ácidos nucleicos a partir de *Saccharomyces cerevisiae* aprovechando el residuo producido por la fermentación del café llamado mosto, estableciendo las mejores condiciones para el crecimiento de la levadura (18 horas de fermentación al 25% de concentración, pH nativo de la muestra con buffer y compuestos traza), por otro lado, el residuo producido por la industria de palma de aceite no obtuvo resultados positivos, ya que este no presenta nutrientes suficientes para el crecimiento de la levadura.

Los resultados indicaron que el pH de las soluciones experimentales mostró una tendencia a aumentar en las primeras horas y luego disminuir, sugiriendo cambios en la acidez y en la concentración de azúcares a medida que avanzaba la fermentación.

En cuanto a la concentración de proteínas, se observaron fluctuaciones significativas a lo largo del tiempo, con disminuciones iniciales seguidas de aumentos posteriores. Estos cambios podrían estar relacionados con el metabolismo de la levadura y la adaptación a las condiciones del medio.

Los resultados evidencian que el mosto de café es un medio de cultivo más eficiente que el POME para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* debido a su mayor concentración de carbohidratos fermentables como la fructosa y la glucosa. Las diferencias en la composición de los residuos confirman que el POME carece de nutrientes esenciales para el metabolismo de la

levadura, lo que limita su efectividad como sustrato. La variación en las concentraciones de mosto también afecta los rendimientos de biomasa, indicando que ajustes precisos en la concentración pueden mejorar el crecimiento. La velocidad específica de crecimiento también varió, con los cultivos mostrando una mayor tasa de crecimiento a las 3 y 12 horas en comparación con las 15 y 22 horas, lo que sugiere diferencias en la fase exponencial de crecimiento y la entrada a la fase estacionaria.

6 Recomendaciones

Automatización y Control: La implementación de sistemas automatizados para el monitoreo de parámetros de cultivo y el control de condiciones facilitará la recolección de datos y permitirá realizar ajustes en tiempo real durante la fermentación. Esto puede mejorar la eficiencia del proceso y la calidad de los resultados obtenidos.

Evaluación de Aplicaciones Prácticas

Estudios de Escalabilidad: Es crucial realizar estudios de escalabilidad para evaluar la viabilidad de aplicar los resultados obtenidos en cultivos a mayor escala o en condiciones industriales. Esto ayudará a validar la aplicabilidad de los medios de cultivo desarrollados y su potencial para aplicaciones a gran escala.

Investigación en Aplicaciones Biotecnológicas: Explorar cómo los ácidos nucleicos producidos en este estudio pueden ser utilizados en aplicaciones biotecnológicas, como la síntesis de productos bioactivos o en la investigación genómica, puede abrir nuevas vías para la aplicación práctica de los resultados obtenidos.

Estas recomendaciones están orientadas a profundizar en la comprensión de los procesos involucrados en la fermentación y a mejorar la eficiencia y aplicabilidad de la producción de ácidos nucleicos utilizando biomasa residual agroindustrial. Se sugiere que futuras investigaciones consideren estos aspectos para avanzar en la optimización de procesos y explorar nuevas aplicaciones prácticas.

Referencias Bibliográficas

- Agida, C., Amaduruonye, W., Nsa, E., & Nathaniel, J. (2020). Serum biochemistry, haematological profile and organ. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 5(6), 202-211. Obtenido de <https://www.researchgate.net/publication/348355834>
- Albarracín Torres, K. (2020). Estudio de parámetros para la propagación de las cepas de levadura cervecera *saccharomyces cerevisiae* y *saccharomyces carlsbergensis* para la fabricación de cerveza artesana. *Repositorio Universidad Politécnica de Madrid*, 1-104. Obtenido de https://oa.upm.es/63464/1/TFM_KATY_ALBARRACIN_TORRES.pdf
- Altervista. (2021, octubre 21). The Bradford method to quantify protein (indirect cell quantitation). *CellCulture*. <https://cellculture.altervista.org/the-bradford-method-to-quantify-cell-protein/>
- Althausen, M. (2015). *Tratamiento de POME - Convertir un Residuo en un Recurso*. 6.´
- Álvarez Llamas, A. (2023). Análisis de la posible asociación específica de moléculas de ARN a los centros organizadores de microtúbulos del huso en *Saccharomyces cerevisiae*. *Universidad de Sevilla*, 1-68. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/dctes?codigo=315004>
- Arabo. (2021, noviembre 18). *Etapas del Proceso de Producción del Café | Café Arabo* [Café Arabo]. <https://cafearabo.com/etapas-proceso-produccion-cafe/>
- Arias Amaya, N. (2020). Determinación de las características fisicoquímicas y microbianas del mucílago del café para la bioproducción de alcohol y la simulación de su obtención con el Software Aspen Hysys y Aspen Plus. *Repositorio Universidad Autónoma de Bucaramanga*, 1-130. Obtenido de

- Campos, R. C., Pinto, V. R. A., Melo, L. F., Rocha, S. J. S. S. da, & Coimbra, J. S. (2021). New sustainable perspectives for “Coffee Wastewater” and other by-products: A critical review. *Future Foods*, 4, 100058. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100058>
- Castro, E. C., & Garzón, N. V. V. (2019). *Evaluación del mucílago del café (Coffea arabica L. Caturra) como potencial prebiótico en una bebida de arroz*.
- Cortés G., C. A., Cayón S., D. G., Aguirre, V. H., & Chaves C., B. (2006, enero 1). *Respuestas de palmas de vivero a la aplicación de residuos de la planta extractora: I. Desarrollo vegetativo y distribución de materia seca / Palmas*. CID Palmero. <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:6Kf6IIZ75QUJ:https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/1186&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=co>
- Cortés Rico, M. E., & Ladino Soto, O. B. (2016). Elaboración de una bebida alcohólica usando subproductos del proceso de beneficio del café (pulpa de café). *Revista Nova*, 2(1), 44-49. <https://doi.org/10.23850/25004476.619>
- DANE - *Historico actualidad DANE 2016*. (2017, abril 17). <https://www.dane.gov.co/index.php/actualidad-dane/historico-actualidad-dane-2016>
- dos Santos, S., Teixeira, M., Cabrito, T., & Sá-Correia, I. (2012). Yeast Toxicogenomics: Genome-Wide Responses to Chemical Stresses with Impact in Environmental Health, Pharmacology, and Biotechnology. *Frontiers in Genetics*, 3. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2012.00063>
- Duque Aldana., C. E. (2018). Valorización de los residuos de la industria cervecera para utilización como biosorbente. *Repositorio Universidad Federal de Sao Carlos*, 1-53.
- Obtenido de

[https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/9925/Disserta%
?sequence=1&isAllowed=](https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/9925/Disserta%c3%a7%c3%a3o.pdf?sequence=1&isAllowed=)

Escobal Chavez, F. R., & Garro Custodio, K. M. (2020). Efecto del porcentaje de *Saccharomyces Cerevisiae* en la calidad y tiempo del compost obtenido con biomasa residual del Mercado Corralón. *Repositorio Universidad César Vallejo*, 1-52. Obtenido de https://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12692/47882/Escobal_CFR-Garro_CKM-SD.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Favaro, L., Jansen, T., & Heber van Zyl, W. (2019). Exploring industrial and natural *Saccharomyces cerevisiae* strains for the bio-based economy from biomass: the case of bioethanol. University of Padova, Legnaro, Italy, 800-816. Obtenido de <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07388551.2019.1619157>

Fedepalma. (2014, agosto 29). *De Santander sale el 14% de la producción palmicultora del país / Fedepalma*. De Santander sale el 14% de la producción palmicultora del país. <https://web.fedepalma.org/node/923>

Federación Nacional de Cafeteros. (2021, mayo 18). Café crece 21,4% en primer trimestre y jalona PIB agropecuario de 3,3%. *Federación Nacional de Cafeteros*. <https://federaciondecafeteros.org/wp/listado-noticias/cafe-crece-214-en-primer-trimestre-y-jalona-pib-agropecuario-de-33/>

Fernández Rivero, D., & Apunte Benalcázar, D. I. (2019). Obtención de un medio enriquecido en proteínas a partir de residuos de papa (*Solanum tuberosum*) por fermentación microbiana. *Repositorio Universidad Técnica de Ambato*, 1-88. Obtenido de <https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/30185>

- Flórez Pardo, L. M., Valencia Catillo, N., Vélez Durán, Y. M., Jurado Rosero, J. A., & Lozano Moreno, J. A. (2022). Comprehensive analysis of ethanol production from coffee mucilage under sustainability indicators. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 182, 1-11. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0255270122003865>
- García Martínez, E., Fernández Segovia, I., & Fuentes López, A. (2013). *Aplicación de la determinación de proteínas de un alimento por el método Kjeldahl. Valoración con una base fuerte*. <https://riunet.upv.es/handle/10251/29832>
- García-Campos, M. A. (2014). *Las catalasas de D. hansenii: Análisis de la complementación heteróloga en una mutante acatalasémica de S. cerevisiae*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3171.8566>
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *The Journal of investigative dermatology*, 133(3), e6. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- Garritano, A. N., de Oliveira Faber, M., De Sá, L. R. V., & Ferreira Leitão, V. S. (2018). Palm oil mill effluent (POME) as raw material for biohydrogen and methane production via dark fermentation, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, volume 92, Pages 676-684, ISSN 1364-0321, <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.031>. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032118302521>
- Gavilanes Bustamante, A. C. (2022). Validación del método Kjeldahl para determinación del contenido de proteína en harinas y derivados de cereales de origen andino (quinua y amaranto). Repositorio DSpace en ESPOL, 1-105. Obtenido de <https://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/57443>

- Green, M. R., Sambrook, J., & Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning: A laboratory manual* (4th ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Gualtieri A, M. J., Villalta R, C., Díaz T, L. E., Medina, G., Lapenna, E., & Rondón, M. E. (2007). Producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis* usando residuos de pulpa de *Coffea arabica* L. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 38(2), 31-37.
- Guia Feliche, G. A. (2019). Producción de levadura de panificación (*Saccharomyces cerevisiae*) en un medio de cultivo formulado a base de melaza de caña de azúcar. *Repositorio Universidad Central de Venezuela*, 1-76. Obtenido de <http://saber.ucv.ve/bitstream/10872/20472/1/Tesis%20Gabriel%20Guia%20Feliche%20C D.pdf>
- Halasz, A., & Lasztity, R. (2017). *Use of Yeast Biomass in Food Production*. Routledge.
- Hernández, J. P. R. (2021). *Obtención De Microcápsulas De Mucílago De Café Mediante Secado Por Aspersión Usando Almidón De Plátano Modificado Químicamente Y Maltodextrina*.
- Hirano, S. S., & Upper, C. D. (2000). Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 64(3), 624-653. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.624-653.2000>
- Hoffman, C. S., & Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57(2-3), 267-272. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90131-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90131-4)

- Ibrahim, A. H., Dahlan, I., Adlan, M. N., & Dasti, A. F. (2012). Comparative Study on Characterization of Malaysian Palm Oil Mill Effluent. *Research Journal of Chemical Sciences* _, 2(6), 1-5. Obtenido de <https://isca.me/rjcs/Archives/vol2/i12/1.ISCA-RJCS-2012-082.pdf>
- Iglesias, D. P. S. (2018). *Coffea arabica* Linn y *Coffea canephora* Pierre ex Froehner.
- Instituto Colombiano Agropecuario. (2016, abril 13). *El ICA promueve el buen uso del raquis para evitar la mosca de los establos* | ICA - Instituto Colombiano Agropecuario. Portal Corporativo ICA. <https://www.ica.gov.co/noticias/todas/2016/el-ica-promueve-el-buen-uso-del-raquis-para-evitar>
- Jackels, S., & Jackels, C. (2006). Characterization of the Coffee Mucilage Fermentation Process Using Chemical Indicators: A Field Study in Nicaragua. *Food Chemistry and Toxicology*, 70(5), 1-5. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/227688635_Characterization_of_the_Coffee_Mucilage_Fermentation_Process_Using_Chemical_Indicators_A_Field_Study_in_Nicaragua
- Khoshkho, S. M., Mahdavian, M., & Karimi, F. (2022). Production of bioethanol from carrot pulp in the presence of *Saccharomyces cerevisiae* and beet molasses inoculum; A biomass based investigation. *Chemosphere*, 286, 1-15. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653521021603>
- Ko, J. K., Enkh-Amgalan, T., Gong, G., Um, Y., & Lee, S.-M. (2020). Improved bioconversion of lignocellulosic biomass by *Saccharomyces cerevisiae* engineered for tolerance to acetic acid. *GCB Bioenergy*, 12(1), 90-100. Obtenido de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/gcbb.12656>

- Lagos Espinoza, M. I. (2023). Estudio de las propiedades funcionales y estructurales de la proteína de estrés térmico BiP (Proteína de Unión a Inmunoglobulina) : un regulador maestro con importante rol terapéutico. Repositorio Académico de la Universidad de Chile, 1-105. Obtenido de <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/195812>
- Lopes, A. C. A., Andrade, R. P., de Oliveira, L. C. C., Lima, L. M. Z., Santiago, W. D., de Resende, M. L. V., & Ferreira, W. (2020). Production and characterization of a new distillate obtained from fermentation of wet processing coffee by-products. *Journal of Food Science and Technology*, 57, 4481-4491. Obtenido de <https://link.springer.com/article/10.1007/s13197-020-04485-4>
- López-Legarda, X., Taramuel-Gallardo, A., Arboleda, C., Segura-Sánchez, F., & Restrepo-Betancur, E. L. F. (2017). *Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales.*
- Low, S. S., Bong, K. X., Mubashir, M., Cheng, C. K., Lam, M. K., Lim, J. W., Ho, Y. C., Lee, K. T., Munawaroh, H. S. H., & Show, P. L. (2021). Microalgae Cultivation in Palm Oil Mill Effluent (POME) Treatment and Biofuel Production. *Sustainability*, 13(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/su13063247>
- Luna, C., García-Martínez, T., Curto, M., & Mauricio, J. C. (2010). *Análisis comparativo del proteoma de una cepa industrial de Saccharomyces cerevisiae en dos condiciones de cultivo.*
- Mahmoud, E., Atabani, A. E., & Badruddin, I. A. (2022). Valorization of spent coffee grounds for biogas production: A circular bioeconomy approach for a biorefinery. *Fuel*, 328, 125296. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.125296>

- Marrero, Y., Montoya, C. A., Ruiz, O., & Elías, A. (2015). *Crecimiento de Pichia guilliermondii cepa Levica 27 en diferentes fuentes de energía y nitrógeno*.
- Martínez Núñez, R. (2022). Cuantificación Absoluta de Proteínas por Espectrometría de Masas. Repositorio Universidad de Valencia, 1-27. Obtenido de https://www.researchgate.net/profile/Rafael-Martinez-Nunez/publication/375956971_Cuantificacion_Absoluta_de_Proteinas_por_Espectrometria_de_Masas/links/6564d0193fa26f66f430f3c4/Cuantificacion-Absoluta-de-Proteinas-por-Espectrometria-de-Masas.pdf
- Martínez-Rosales, A., Trujillo, N., & Ramirez, E. (2020). Crecimiento y metabolismo de Fischerella TB22 en medio de cultivo BG11 0 (Growth and metabolism of Fischerella TB22 in BG110 culture medium). *Boletín Micológico*, 35, 26-34. <https://doi.org/10.22370/bolmicol.2020.35.1.2425>
- Mesa D., J. 37055. (2012, diciembre 25). *Palma de aceite: Fuente de oportunidades, progreso y desarrollo*.
- Minagricultura. (2014, abril 13). *Agro de Santander y más de cien mil familias se han beneficiado con \$216.741 millones en ayudas directas del MinAgricultura*. [https://www.minagricultura.gov.co/noticias/Paginas/Agro-de-Santander-y-m%C3%A1s-de-cien-mil-familias-se-han-beneficiado-con-\\$216-741-millones-en-ayudas-directas-del-MinAgricultura.aspx](https://www.minagricultura.gov.co/noticias/Paginas/Agro-de-Santander-y-m%C3%A1s-de-cien-mil-familias-se-han-beneficiado-con-$216-741-millones-en-ayudas-directas-del-MinAgricultura.aspx)
- Muñoz Muñoz, D., Fernando, M., & Javier, A. (2013). *Potencial energético de residuos agroindustriales del departamento del Cauca, a partir del poder calorífico inferior*.
- Ng, Y. S., Lim, C. R., & Chan, D. J. C. (2016). Development of treated palm oil mill effluent (POME) culture medium for plant tissue culture of *Hemianthus callitrichoides*. *Journal of*

- Environmental Chemical Engineering*, 4(4, Part B), 4890-4896.
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2016.05.004>
- Osorio Cadavid, E., Ramírez, M., López, W. A., & Mambuscay, L. A. (2009). Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(1), 125-131.
- Peña Castillo, O. C., & Lara Quiñones, L. S. (2022). *Evaluación del tratamiento del efluente de la palma de aceite (POME) en el proceso de extracción en la planta Extractora Vizcaya S.A.S.* <https://bibliotecadigital.udea.edu.co/handle/10495/29353>
- Pérez Rodríguez, C. P., Ríos, L. A., Duarte González, C. S., & Montaña, A. (2023). Aprovechamiento de la biomasa residual como fuente de energía renovable en Colombia: escenario de gasificación potencial. *Repositorio Universidad Nacional de Colombia*, 1(65), 65-82. Obtenido de <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/13997/13869>
- Potter, L. (2020). Colombia's oil palm development in times of war and 'peace': Myths, enablers and the disparate realities of land control. *Journal of Rural Studies*, 78, 491-502.
<https://doi.org/10.1016/j.jrurstud.2019.10.035>
- Preciado Guerrero, V. A. (2023). Producción y caracterización de levaduras enriquecidas con Cr (III) como suplemento alimenticio. *Repositorio Universidad de Guanajuato*, 1-86. Obtenido de <http://repositorio.ugto.mx/handle/20.500.12059/9598>
- Puerta Q., G. I., & Rios A., S. (2014). *Composición química del mucílago de café según el tiempo de fermentación y refrigeración.* <https://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/478>
- Querol, A., & Barrio, E. (1990). A rapid and simple method for the preparation of yeast mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Research*, 18(6), 1657.

- Reyes, J. M., & Barrenechea Ramírez, S. (2022). Estimación del potencial energético técnico a partir de biomasa residual agroindustrial y pecuario en el Perú. *Revista de innovación y transferencia productiva*, 3(1), 1-15. Obtenido de <https://revistas.itp.gob.pe/index.php/ritp/article/view/32/114>
- RNA/DNA Quantification—US. (2021). <https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/nucleic-acid-quantitation.html>
- Rosa, D., Medeiros, A. B. P., Martinez-Burgos, W. J., do Nascimento, J. R., de Carvalho, J. C., Sydney, E. B., & Soccol, C. R. (2020). Biological hydrogen production from palm oil mill effluent (POME) by anaerobic consortia and *Clostridium beijerinckii*. *Journal of Biotechnology*, 323, 17-23. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.06.015>
- S & D SUCDEN. (2021, marzo 6). *Diagrama de flujo del proceso*. Sucden. <https://www.sucden.com/es/products-and-services/coffee/process-flowchart/>
- Said, F. M., Hamid, N. F., Razali, M. A.-A., & Daud, F. S. (2022). Lignocellulosic of oil palm biomass to chemical product by fermentation. En F. M. Said, N. F. Hamid, M. A.-A. Razali, & F. S. Daud, *Elaeis guineensis* (pág. 359). Londres: IntechOpen. Obtenido de https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=Ip9IEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA325&dq=biochemical+products+POME+Microbial+fermentation&ots=_MJ1tSpvrO&sig=1piRAJZUqcfCr0OhMT0VyCFCIGI#v=onepage&q&f=false
- Saldíva Iglesias, P. (2018). El cultivo de café: *Coffea arabica* Linn y *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. *Repositorio Universidad Autónoma del Estado de México*, 1-39. Obtenido de <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/94831/Cultivo%20del%20Caf%C3%A9%202018.pdf>

- Samayoa Toledo, A. L., Borrayo Herrera, B. L., Pérez Solares, A. G., Morataya Sazo, M. de los Á., & Montenegro Álvarez, L. F. (2014). *UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA - PDF Descargar libre*. <https://docplayer.es/207015137-Universidad-de-san-carlos-de-guatemala-facultad-de-ciencias-quimicas-y-farmacia.html>
- Santos Tanamachi, K., Alvarado Ahedo, N. C., Gárate Ruiz, J. R., Restrepo Elorza, M. d., González Guerra, G. M., Gómez Castro, F. I., & Hernández Castro, S. (2022). Revaloración de residuos de fruta y verdura para la producción de biocombustibles. *Revista Jovenes en la Ciencia*, 16, 1-15. Obtenido de <https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/3654>
- Soo, P. L., Bashir, M. J. K., & Wong, L.-P. (2022). Recent advancements in the treatment of palm oil mill effluent (POME) using anaerobic biofilm reactors: Challenges and future perspectives. *Journal of Environmental Management*, 320, 115750. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115750>.
- Sudhakar, M., Ravel, M., & Perumal, K. (2021). Pretreatment and process optimization of bioethanol production from spent biomass of *Ganoderma lucidum* using *Saccharomyces cerevisiae*. *Fuel*, 306, 1-13. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0016236121015611>
- Tan, S. C., & Yiap, B. C. (2009). DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009, 574398. <https://doi.org/10.1155/2009/574398>
- Torres Vargas, G. M. (2013). CUnificación del contenido de proteína celular (SCP) en biomasa de levadura de *Saccharomyces Cerevisiae* producida a partir de residuos de cáscara de

- naranja (*Citrus sinensis* L var) y papa (*Solanum tuberosum*) variedad Diacol-Capiro (R-12). *Repositorio UNAD*, 1-129. Obtenido de https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/1070/TorresVargasGoldaMeyer_2013.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- Vanegas Escudero, A. L. (2019). Alternativas ambientales para el aprovechamiento de la biomasa residua de la palma aceitera (*Elaeis Guineensis*) en procesos industriales y agrícolas. *Fundación Universidad Autónoma de Colombia*, 77-93. Obtenido de <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/publicaciones-e-investigacion/article/view/3467/3409>
- Vaquera, K. L. B. (2018). Optimización de un medio de cultivo para la producción de levaduras con interés biotecnológico. *Jóvenes en la Ciencia: Verano de la Investigación Científica. Vol. 4, Num 1 (2018)*. <http://repositorio.ugto.mx/handle/20.500.12059/5091>
- Villamil, Y., & Zapata, Y. (1999). Caracterización de levaduras fermentadoras aisladas de frutas en descomposición con potencial aplicación productora de etanol. *Trabajo de Grado (Microbiología Industrial)*. Pontificia Universidad Javeriana. Bogota.
- Walteros Pinzón, C. D., Fernández Niño, M. Á., & Reyes Barrios, L. H. (2020). Caracterización de cepas de levadura colombiana *Saccharomyces cerevisiae* para su potencial uso en la producción de cerveza "Colombian Ale". *Repositorio Universidad de los Andes*, 1-56. Obtenido de <https://repositorio.uniandes.edu.co/server/api/core/bitstreams/4703e87f-2c57-438e-89be-f71f0a83a239/content>
- Wattanapenpaiboon, N., & Wahlqvist, M. W. (2003). Phytonutrient deficiency: The place of palm fruit. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 12(3), 363-368.

Zinatizadeh, A. A., Mohamed, A. R., Najafpour, G., & Isa, M. H. (2005). Kinetic evaluation of palm oil mill effluent digestion in a high rate up-flow anaerobic sludge fixed film bioreactor. *Process Biochemistry*, 8(5), 1-13. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/222575492_Kinetic_evaluation_of_palm_oil_mill_effluent_digestion_in_a_high_rate_up-flow_anaerobic_sludge_fixed_film_bioreactor#fullTextFileContent.