

**SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ACTINOBACTERIAS PRODUCTORAS DE
HIDRÓGENO AISLADAS A PARTIR DE COMPOST DE LA INDUSTRIA CAFETERA**

FELIX ANDRES SANTOS BASTILLA

CARLOS FERNANDO CADENA PABON

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2015

**SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ACTINOBACTERIAS PRODUCTORAS
DE HIDRÓGENO AISLADAS A PARTIR DE COMPOST DE LA INDUSTRIA
CAFETERA**

FELIX ANDRES SANTOS BASTILLA

CARLOS FERNANDO CADENA PABON

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de
Ingeniero Químico**

Directora

VIVIANA SANCHEZ TORRES

Ingeniera Química, Ph.D

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2015

DEDICATORIA

*A mi padre, por su lucha, entrega y sacrificio a la familia. Gracias por inculcarme tantos valores y principios, por enseñarme los caminos que debo transitar.
Infinitas gracias padre.*

A mi madre, por su comprensión y apoyo en todo momento. Gracias por su carisma y dedicación, este triunfo es vuestro.

A mis tías Diocelina y Margot, quienes me apoyaron incondicionalmente.

A mi hermana, mis sobrinos Daniel y Vale, una fuente de inspiración.

A Carolina, por todo su apoyo, paciencia y cariño.

A Cesar, por su amistad brindada en este trascurso escolar. A Edwar y Paola más que amigos, hermanos.

Carlos Fernando Cadena Pabón.

DEDICATORIA

Dedicado con todo el amor a mi madre Esperanza y a mi padre Félix, quien han sido el motor a lo largo de toda mi vida y mi impulso en los momentos difíciles.

Gracias por su apoyo incondicional y por todo su cariño.

A mi hermano Oscar que la compañía que siempre he tenido.

A toda mi familia por enseñarme el camino correcto.

A todos los que me acompañaron en este proceso universitario, especialmente a Maryi, Aidee, Leidy, Darwin, Pinto, Cristian, Claudia, Teffa, y Erika, gracias por todo lo que compartimos en estos años.

A Arias, Donovan y Fausto que más que amigos son hermanos.

Felix Andrés Santos Bastilla

AGRADECIMIENTOS

A todos los profesores de la escuela de ingeniería química por brindarnos las bases para nuestra vida profesional.

A la doctora Viviana Sánchez Torres por darnos su confianza para el desarrollo de esta tesis y por compartir sus conocimientos con nosotros.

Al centro de investigación CINBIN por brindarnos las herramientas para el desarrollo de esta tesis y a todos sus integrantes.

A la bióloga Oriana Danuta Serna Daza por guiarnos en los momentos difíciles de este proyecto.

Al doctor Julio A. Pedraza Avella por facilitarnos el detector de hidrógeno.

A la doctora Liliana del Pilar Castro Molano y a los integrantes del grupo de trabajo en investigación anaerobia por su apoyo.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	18
1. MARCO TEÓRICO	20
1.1. EL CAFÉ EN COLOMBIA	20
1.2. ACTINOBACTERIAS	22
1.3. HIDRÓGENO COMO COMBUSTIBLE	22
1.4. RUTAS DE PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE HIDRÓGENO.....	23
1.5. FERMENTACIÓN OSCURA.....	24
1.6. ACTINOBACTERIAS DEL GRUPO DE INVESTIGACION CINBIN	25
2. METODOLOGÍA	27
2.1. CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DEL CULTIVO.....	27
2.2. SELECCIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE HIDRÓGENO A PARTIR DE SACAROSA.....	28
2.3. SELECCIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE HIDRÓGENO A PARTIR DE MUCÍLAGO DE CAFÉ	29
2.3.1. Preparación y caracterización del mucílago.....	29
2.3.2 Producción de hidrógeno usando mucílago de café como medio de cultivo.	29
2.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS MEJORES CEPAS PRODUCTORAS	29
2.4.1. Curva de producción de hidrógeno	30
2.4.2. Crecimiento bacteriano	30
2.4.3. Curvas de pH.....	30

2.4.4. Azúcares Reductores Totales (ART)	30
2.4.5. Ácidos Grasos Volátiles (AGV).....	30
2.4.6. Enzimas extracelulares	31
2.4.6.1. Prueba cualitativa.	31
2.4.6.2. Prueba cuantitativa.	32
3. RESULTADOS	33
3.1 SELECCIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE HIDRÓGENO A PARTIR DE SACAROSA	33
3.1.1 Crecimiento en condiciones anaerobias.	33
3.1.2. Producción de hidrógeno en medio de cultivo CYC.....	34
3.2. SELECCIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE HIDRÓGENO A PARTIR DE MUCÍLAGO DE CAFÉ	35
3.2.1. Preparación y caracterización del mucílago.....	35
3.2.2. Producción de hidrógeno a partir de mucílago de café sin ajuste de pH como medio de cultivo.....	35
3.2.3. Producción de hidrógeno a partir de mucílago con ajuste de pH.....	36
3.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS MEJORES CEPAS PRODUCTORAS	38
3.3.1. Curvas de producción de hidrógeno	38
3.3.1.1. Curvas de producción de hidrógeno de las cepas con mejor producción en mucílago sin ajuste de pH.....	38
3.3.1.2. Curvas de producción de hidrógeno de las cepas con mejor producción en mucílago a pH 7.....	39
3.3.2. Crecimiento bacteriano.	40

3.3.2.1. Crecimiento bacteriano en mucílago sin ajuste de pH.	41
3.3.2.2. Crecimiento bacteriano en mucílago a pH 7.	42
3.3.3. Curvas de pH.	42
3.3.3.1. Curvas de pH en mucílago sin ajuste de pH.	43
3.3.3.2. Curvas de pH en mucílago a pH 7.	43
3.3.4. Azúcares Reductores Totales (ART).	43
3.3.4.1. ART en mucílago sin ajuste de pH.	43
3.3.4.2. ART en mucílago a pH 7.	45
3.3.5. Ácidos grasos volátiles.	45
3.3.5.1. AGV en mucílago sin ajuste de pH.	45
3.3.4.2. AGV en mucílago a pH 7.	46
3.3.5. Actividad Enzimática.	47
3.3.5.1. Prueba cualitativa.	47
3.3.5.2. Prueba Cuantitativa.	49
4. CONCLUSIONES.	52
BIBLIOGRAFIA.	53
ANEXOS.	57

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Composición café cereza	20
Figura 2. Proceso de obtención de café vía húmeda	21
Figura 3. Metodología experimental para la selección y caracterización de cepas de actinobacterias productoras de hidrógeno	27
Figura 4. Crecimiento anaerobio	33
Figura 5. Prueba de producción de hidrógeno en medio CYC	34
Figura 6. Producción de hidrógeno usando mucílago de café como medio de cultivo sin ajuste de pH	36
Figura 7. Producción de hidrógeno usando mucílago de café como medio de cultivo con ajuste de pH.	37
Figura 8. Curva de producción de hidrógeno a partir de mucílago sin ajuste de pH para las cepas ACPG 4, APG 15 y ACPG 16	39
Figura 9. Curva de producción de hidrógeno a partir de mucílago con ajuste de pH para las cepas ACPG 8, ACPG 10 y ACPG 11	40
Figura 10. Cuantificación de colonias	41
Figura 11. Curva de crecimiento a partir de mucílago sin ajuste de pH para las cepas ACPG 4, APG 15 y ACPG 16	41
Figura 12. Curva de crecimiento a partir de mucílago con ajuste de pH para las cepas ACPG 8, ACPG 10 y ACPG 11	42
Figura 13. Curva de pH a partir de mucílago sin ajuste de pH para las cepas ACPG 4, APG 15 y ACPG 16	43
Figura 14. Curva de pH a partir de mucílago con ajuste de pH para las cepas ACPG 8, ACPG 10 y ACPG 11	44
Figura 15. Curva de ART a partir de mucílago sin ajuste de pH para las cepas ACPG 4, APG 15 y ACPG 16	44

Figura 16. Curva de ART a partir de mucílago con ajuste de pH para las cepas ACPG 8, ACPG 10 y ACPG 11	45
Figura 17. Curva de AGV a partir de mucílago sin ajuste de pH para las cepas ACPG 4, APG 15 y ACPG 16	46
Figura 18. Curva de AGV a partir de mucílago con ajuste de pH para las cepas ACPG 8, ACPG 10 y ACPG 11	47
Figura 19. Prueba cualitativa de actividad enzimática: Amilasa	48
Figura 20. Prueba cualitativa de actividad enzimática: Proteasa	48
Figura 21. Prueba cualitativa de actividad enzimática: Celulasa	49
Figura 22. Curva de Unidades de actividad enzimática; amilasa	50
Figura 23. Curva de Unidades de actividad enzimática celulasa	51

LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Asignación taxonómica de las cepas aisladas	25

LISTA DE ANEXOS

	Pág
Anexo A. Ruta de fermentación de la glucosa por medio de bacterias anaerobias facultativas	57
Anexo B. Medio CYC	58
Anexo C. Protocolo de cuantificación de azúcares reductores con el reactivo de Miller	59
Anexo D. Identificación cualitativo de bacterias productoras de amilasas, proteasas y celulasas.	61

RESUMEN

TITULO: SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ACTINOBACTERIAS PRODUCTORAS DE HIDRÓGENO AISLADAS A PARTIR DE COMPOST DE LA INDUSTRIA CAFETERA*

AUTORES: FELIX ANDRES SANTOS BASTILLA
CARLOS FERNANDO CADENA PABON**

PALABRAS CLAVE: ACTINOBACTERIAS, HIDRÓGENO, MUCÍLAGO, CAFÉ, FERMENTACIÓN, OSCURA.

DESCRIPCION:

El hidrógeno es una alternativa energética que ha despertado gran interés debido a que posee un alto contenido energético por unidad de masa y además su combustión no genera gases contaminantes para el medio ambiente. Una de las formas para la obtención de hidrógeno es a la producción bacteriana, ésta se da a partir del proceso de fermentación oscura para la cual se pueden usar diferentes fuentes de carbono, como por ejemplo residuos agroindustriales.

En esta investigación se midió y se cuantificó la producción de hidrógeno de un grupo de actinobacterias aisladas a partir de compost usando como sustrato mucílago de café. Se seleccionaron 6 cepas que presentaron mejor producción de hidrógeno, 3 sin ajustar el pH del mucílago (pH 4) y las otras 3 con el pH del mucílago ajustado a 7. Posteriormente a esto, se realizó una caracterización de las cepas seleccionadas, la cual constó de 6 pruebas, producción de hidrógeno, pH, crecimiento bacteriano, azúcares reductores (ART), ácidos grasos volátiles (AGV) y enzimas extracelulares, cada una de estas pruebas se realizó en 4 días diferentes. A partir del análisis de estos resultados se buscaron algunos factores que pueden afectar la producción de hidrógeno, tanto de cada una de las bacterias como en general. Se pudo notar que, al ajustar el pH del mucílago a 7 se vio favorecida la fermentación oscura, esto se hizo evidente comparando las producciones tanto de hidrogeno como de ácidos producidos. También se observó que la cepa ACPG 8 presento la mejor producción de hidrogeno (58 $\mu\text{mol/L}$), además de alta producción de ácidos grasos volátiles y de enzimas extracelulares, por ende se puede afirmar que es la mejor facultada para realizar fermentación oscura.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Directora : Viviana Sánchez Torres, Ingeniera Química, Ph.D.

ABSTRACT

TITLE SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ACTINOBACTERIAS PRODUCTORAS DE HIDRÓGENO AISLADAS A PARTIR DE COMPOST DE LA INDUSTRIA CAFETERA*

AUTHORS: FELIX ANDRES SANTOS BASTILLA
CARLOS FERNANDO CADENA PABON**

KEY WORDS: ACTINOBACTERIAS, HYDROGEN, MUCILAGE, COFFEE, DARK, FERMENTATION.

DESCRIPTION:

Nowadays, looking for new energy sources, hydrogen has been viewed as a reliable choice because it has a high energy content per mass unit, also hydrogen combustion doesn't produce polluting gases to the environment. A way to produce hydrogen is by a bacterial process, from dark fermentation process which can use different carbon sources such as agro industrial wastes.

In this research, the hydrogen production from actinomycetes' group was measured and quantified. These bacteria were isolated from compost and using coffee's mucilage as a substrate from the farm 'El Roble' located on La Mesa de los Santos. From this test six strains were selected because they show the best hydrogen production; three of them with the mucilage's normal pH (around 4,0) and the other three with mucilage's pH adjusted to 7,0. After this, a seven tests characterization was made to the selected strains: hydrogen production, pH, bacterial growth, total reducer sugar, volatile fatty acids (VFA), and extracellular enzymes. Each test was made on four different days. Looking for some factors that may affect each bacteria and the production of hydrogen was based in the analysis of results from the characterization. In general way, when the pH was adjusted to 7,0 the dark fermentation was favored, and this was evident when the production of hydrogen and the production of VFA were compared. Also, the results showed that the ACPG 8 strain has the best hydrogen production (58 $\mu\text{mol/L}$), a high production of VFA and extracellular enzymes too. For these reasons the ACPG 8 strain is the better prepared strain to carry out dark fermentation process.

* Bachelor Thesis

** Faculty of Physical-Chemical Engineering. School of Chemical Engineering. Director: Viviana Sanchez Torres, Chemical Engineer, Ph.D.

INTRODUCCIÓN

Colombia es el tercer productor de café en el mundo con una producción en el 2014 de 12,5 millones de sacos equivalentes a 750 mil toneladas de café, superado únicamente por Brasil y Vietnam [1]. El beneficio de café se realiza por vía húmeda, en la cual, cerca del 5% de biomasa es aprovechada en la obtención del producto deseado, y el resto queda en forma de residuo, siendo el 58 % pulpa y mucílago [2]. La gran cantidad de residuos generados se convierte en un problema ambiental debido a que estos poseen alta carga orgánica y acidez que de no ser tratados puede contaminar suelos, fuentes hídricas y alterar comunidades biológicas, además de los malos olores generados por la descomposición que se da en forma natural.

Actualmente, la inestabilidad del mercado de los combustibles fósiles y el cambio climático han despertado un interés en la búsqueda de biocombustibles utilizando energías renovables. La biomasa vegetal, es considerada una materia renovable formada por procesos fotosintéticos, la cual posee un valor energético debido su composición elemental; carbono, nitrógeno, hidrógeno y oxígeno [2]. El mucílago de café, un subproducto del beneficio de café que resulta del proceso de desmucilaginado, y el cual está constituido principalmente por carbohidratos, lípidos y proteínas es un ejemplo de biomasa vegetal. Representa el 14,85% del peso del fruto fresco y por cada 1000 g de café cereza procesada se genera 149 g de mucílago [2]. Los azúcares y otros nutrientes presentes en el mucílago podrían ser aprovechados como sustrato en la producción biológica de hidrógeno, un recurso energético prometedor debido a que su combustión no genera emisiones y su rendimiento energético es 2,75 veces mayor que el de los hidrocarburos [3].

[1] International Coffee Organization. (Julio de 2015). Total production by all exporting countries. <http://www.ico.org>. Recuperado el 7 de Octubre de 2015, de <http://www.ico.org/prices/po-production.pdf>

[2] Rodríguez Valencia, N., & Zambrano Franco, D. A. (2010). Los subproductos del café: fuente de energía renovable. *Cenicafé*, 61, 3-6.

[3] Ramirez, S., & Vega de Kuyper, J. C. (2014). Fuentes de energía renovable y no renovable. Madrid: Alfaomega

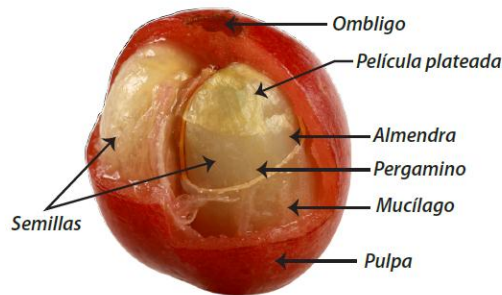
Por lo expuesto anteriormente, el presente trabajo se enfoca en utilizar el mucílago de café, como sustrato para el crecimiento de actinobacterias nativas, y evaluar su producción de hidrógeno mediante fermentación oscura. Las mejores cepas productoras fueron estudiadas con mayor profundidad.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 EL CAFÉ EN COLOMBIA

Colombia es el tercer productor mundial de café, produce anualmente 12,5 millones de sacos de 60 Kg cada uno [1] de los cuales cerca del 90% son exportados lo que representa una actividad de desarrollo económico para la nación. El fruto está constituido por tres partes: epidermis o exocarpio, mesocarpio o mucílago y pulpa. Las dos semillas ubicadas en el núcleo de la cereza, están recubiertas por dos cepas: pergamino y espermodermo o película plateada. A su vez, el mucílago cubre las dos semillas tal como se observa en la Figura 1[4].

Figura 1. Composición del café cereza.



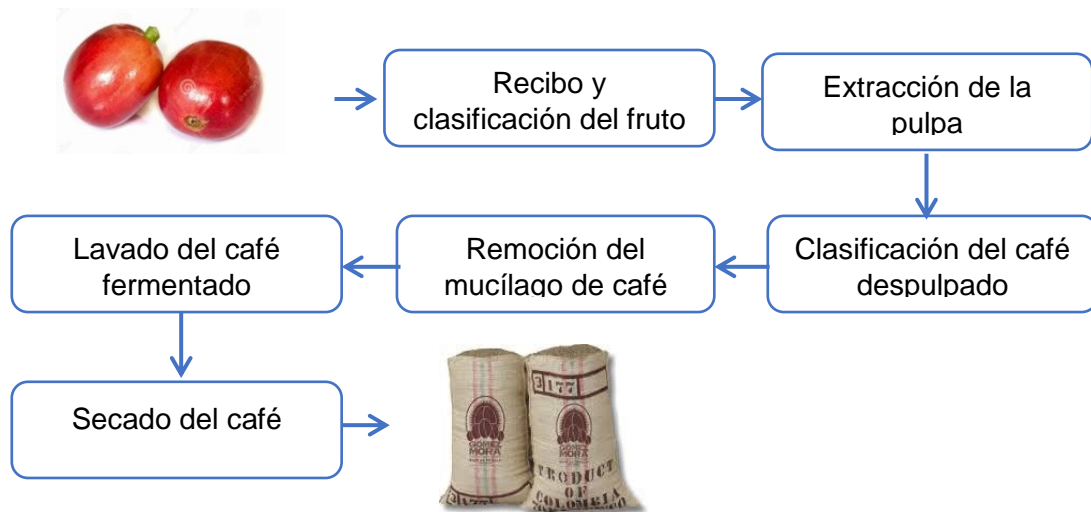
Fuente: Ramos Giraldo, P. J., Sanz Uribe, J. R., & Olveros Tascón, C. E. (2010). Identificación y clasificación de frutos de café en tiempo real, a través de la medición de color. *Cenicafé*, 61, 315-326.

[4] Ramos Giraldo, P. J., Sanz Uribe, J. R., & Olveros Tascón, C. E. (2010). Identificación y clasificación de frutos de café en tiempo real, a través de la medición de color. *Cenicafé*, 61, 315-326.

El proceso de transformar la cereza de café en pergamino seco se denomina beneficio, tradicionalmente en nuestro país éste se lleva a cabo por vía húmeda, el cual se caracteriza por utilizar agua en sus distintas etapas [5]. El proceso de beneficio del café consta de las etapas indicadas en la Figura 2.

El mucílago de café es removido utilizando un desmucilaginator mecánico o por fermentación. En el primero, el mucílago queda concentrado y sirve de alimento para animales; en cambio por fermentación, el mucílago es degradado y puede ser utilizado para la posterior producción de biogás [6]. El mucílago de café está compuesto en un 8,55% por carbohidratos, 0,93% proteínas, 0,12% lípidos entre otros (ácidos, alcohol y cenizas) [7].

Figura 2. Proceso de obtención de café vía húmeda.



[5] Asociación nacional del café. (2015). El beneficio húmedo. Recuperado el 4 de Octubre de 2015, de https://www.anacafe.org/glifos/index.php/Caficultura_Beneficiado_Humedo#Extracción_de_la_pulpa

[6] Rodríguez Valencia, N., & Zambrano Franco, D. A. (2011). Producción de alcohol a partir de mucílago de café. *Cenicafé*, 62, 59-69.

[7] Puerta Quintero, G. I., & Ríos Arias, S. (2011). Composición química del mucílago de café, según el tiempo de fermentación y refrigeración. *Cenicafé*, 62, 23-40

1.2 ACTINOBACTERIAS

Las Actinobacterias son un grupo de bacterias principalmente Gram positivas abundantes en el suelo o en lugares donde se presente descomposición aerobia de restos vegetales [8]. Éstas pueden utilizar como fuente de carbono diferentes compuestos orgánicos y como fuente de nitrógeno: amonio, nitratos, aminoácidos o proteínas. Su crecimiento es alto a temperaturas cercanas a 25°C y un pH neutro [9].

Este grupo de bacterias presentan gran utilidad en la industria debido a su producción de metabolitos secundarios, por ejemplo en la farmacéutica casi el 80% de los antibióticos son producidos a partir de diferentes especies de actinobacterias, especialmente del género *Streptomyces* [8]. Además, tienen la facultad de producir enzimas hidrolíticas extracelulares que les permiten degradar la materia orgánica presente en moléculas complejas [10], lo que hace factible su utilización en bioprocesos que utilicen residuos de las industrias agrícolas como sustrato.

1.3 HIDRÓGENO COMO COMBUSTIBLE

Energéticamente, el hidrógeno es el combustible con mayor relación energía/peso (33,33 KWhKg⁻¹) el cual es 2,7 veces mayor al de la gasolina [11]. Debido a su contenido energético, se ha convertido en una prometedora fuente de energía renovable, característica que otorga la materia prima y el proceso utilizado para obtenerlo [12].

[8] Pandey, A., Ali, I., Singh, K., Chatterji, T., & Singh, V. (2011). Isolation and characterization of Actinomycetes from soil and evaluation of antibacterial activities of Actinomycetes against pathogens. *Int J Appl Biol Pharm*, 4, 384-392.

de 2015, <http://www.inifta.unlp.edu.ar/extension/Hidrogeno.pdf>

[9] Leveau J.Y, B. M. (2000). *Microbiología Industrial: los microorganismos de interes industrial*. Zaragoza. Acribia.

[10] Boiron, P., & Provost, F. (1990). Enzymatic characterization of *Nocardia* spp. and related bacteria by API ZYM profile. *Medline*, 110, 51-56.

[11] Americo Peretti , H., & Visintin , A. (s.f.). Hidrógeno, combustible del futuro: ¿Por qué, cómo y dónde? Recuperado el 9 de Octubre

[12] Redondas Monteserín, V. (2013). Obtención de hidrógeno mediante fermentación oscura de residuos de comida y lactosuero. 31-39. León, España.

Además su combustión sólo genera agua, evitando así la emisión de gases que produzcan efecto invernadero [13].

En la actualidad el hidrógeno se produce principalmente a partir de combustibles fósiles, por ejemplo, reformado con vapor de gas natural, oxidación de hidrocarburos y gasificación de carbón mineral. En menor medida se produce por electrólisis [14]. El aprovechamiento energético de la biomasa puede darse a través de técnicas químicas (refinado, pirólisis, gasificación, esterificación, etc [15]) o biológicamente mediante la fermentación, donde el hidrógeno resulta como un subproducto de la degradación del sustrato.

1.4 RUTAS DE PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE HIDRÓGENO

La obtención de hidrógeno se da a partir de dos tipos de procesos, aquellos que requieren la energía lumínica y los que no dependen de ella. Dentro de los que requieren la luz se encuentra la biofotólisis y fotofermentación [16] [17]. Por el contrario la ruta independiente de luz es la fermentación oscura, llevada a cabo por bacterias estrictamente anaerobias o anaerobias facultativas mediante la fermentación de los azúcares presentes en carbohidratos. Éste procedimiento es el que origina este estudio. En los procesos fotosintéticos, hay un alto rendimiento de producción de hidrógeno respecto al sustrato consumido, pero su principal limitación es su baja velocidad de producción, en promedio $0,195 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1}\text{h}^{-1}$, esto representa una desventaja a la hora de diseñar el biorreactor que deberá tener un área grande de contacto con la luz. Es por ello que la fermentación

[13] Gutiérrez Jodra, L. (2005). El hidrógeno: combustible del futuro. Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 99(1), 49-67

[14] Guerra Plasencia, I., Ballesteros Perdices, M., & Heras Celemin, M. D. (2008). Fuentes de energía para el futuro. Ministerio de educación. Madrid.

[15] Aguer Horta, M., & Miranda Barreras, A. (2012). El hidrógeno, fundamento de un futuro equilibrado. Madrid: Diaz de Santos.

[16] Blanco Londoño, S., & Rodríguez Chaparro, T. (2012). Producción de biohidrógeno a partir de residuos mediante fermentación oscura: una revisión crítica (1993-2011). *Ingeniare*, 20(3), 398-411.

[17] Martínez, V., & García, R. (2010). Fermentación oscura, fotofermentación y biofotólisis: análisis de su aplicación en secuencia para la producción de hidrógeno biológico. 3. Argentina: Dirección General de Investigación y Desarrollo (DGID).

oscura tiene gran importancia, debido a que con ella se obtiene velocidades de producción de aproximadamente $21 \text{ mmol H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ [18].

1.5. FERMENTACIÓN OSCURA

Se entiende por fermentación al proceso catabólico de oxidación-reducción en donde no hay aceptor de electrones externo. Todo inicia con la glucólisis que requiere la presencia de la molécula NAD^+ (dinucleótido de nicotinamida adenina) que acepta los electrones liberados en la oxidación de la glucosa para producir NADH (dinucleótido de nicotinamida adenina reducida), piruvato y ATP. La oxidación de la glucosa se detiene cuando todo el NAD^+ se reduce a NADH , pero en la fermentación se regenera para poder seguir con la glucólisis [12].

La producción de hidrógeno microbiano se basa en la degradación anaerobia del piruvato formado en la glucólisis, que puede ser catalizado por dos tipos de sistemas enzimáticos: Piruvato-Formiato-Liasa (PFL) en microorganismos anaerobios facultativos, o Piruvato-Ferredoxina-Óxido-Reductasa (PFOR) en los microorganismos anaerobios estrictos. La fermentación mediante el sistema PFL (Anexo A) presenta como principales productos H_2 , CO_2 y etanol [17]. Aquí, el piruvato formado en la glucólisis es transformado en ácido fórmico y AcetilCoA. El ácido fórmico es oxidado a CO_2 por la acción del sistema Formiato-Hidrógeno-Liasa (FHL), permitiendo a su vez la producción de H_2 por acción de la hidrogenasa presente en este sistema enzimático. De la transformación del AcetilCoA se produce la regeneración del NAD^+ mediante la formación de etanol, y la producción de ATP al formarse ácido acético [12].

[18] Valdez Vázquez, I., & Poggi Varaldo, H. (2006). Producción de hidrógeno una opción biotecnológica. Morelos.

1.6 ACTINOBACTERIAS DEL GRUPO DE INVESTIGACION CINBIN

Peña *et al.* [19] aislaron actinobacterias a partir de muestras de compost provenientes de la Hacienda cafetera “El Roble” ubicada en el municipio de Los Santos, Santander. Se sembraron diluciones seriadas de las muestras recolectadas en cajas de Petri con agar Czapek-Dox y posteriormente se incubaron a temperatura ambiente durante 14 días. Se individualizaron varias cepas repicándolas en agar Czapek-Dox-Extracto de Levadura- Casaminoácidos (CYC) bajo las mismas condiciones para la obtención de cultivos axénicos.

La identificación de las cepas se llevó a cabo analizando las características macroscópicas y microscópicas y además mediante la secuenciación del gen 16S rRNA. De las 20 cepas (Tabla 1) se identificaron taxonómicamente 14 cepas. Para las cepas ACPG 8, ACPG 11, ACPG 15, ACPG 16, ACPG 18 y ACPG 19, debido a la baja calidad de la secuencia no fue posible su identificación molecular.

Tabla 1. Asignación taxonómica de las cepas aisladas

Cepa	Género
ACPG 1	<i>Micrococcus</i>
ACPG 2	<i>Streptomyces</i>
ACPG 3	<i>Micrococcus</i>
ACPG 4	<i>Nocardiosis</i>
ACPG 5	<i>Nocardiosis</i>
ACPG 6	<i>Microbacterium</i>
ACPG 7	<i>Micrococcus</i>
ACPG 8	No Identificada
ACPG 9	<i>Cellulomonas</i>
ACPG 10	<i>Cellulomonas</i>
ACPG 11	No Identificada
ACPG 12	<i>Micrococcus</i>
ACPG 13	<i>Arthrobacter</i>

[19] Peña Gamboa, A. C. (2015). Aislamiento y caracterización de actinobacterias provenientes del compost de residuos de producción de café orgánico. Trabajo de grado, Universidad Industrial de Santander.

Tabla 1. Continuación

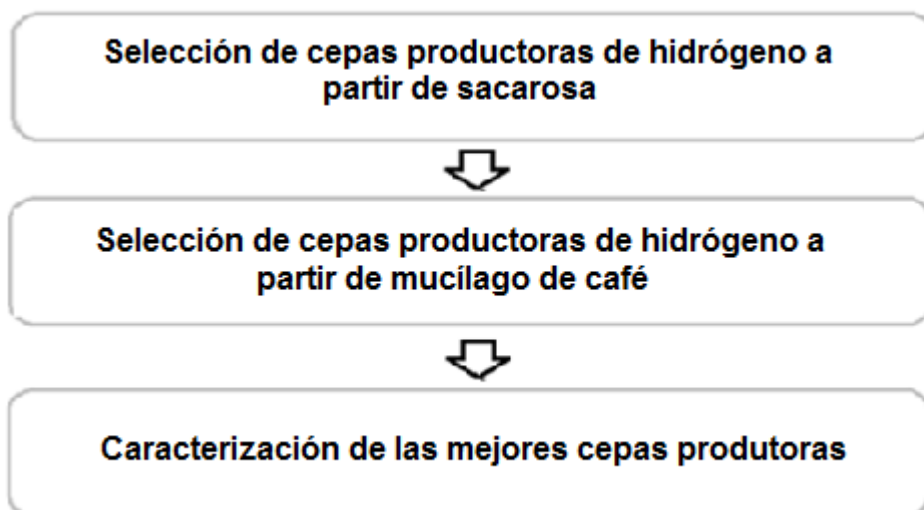
ACPG 14	<i>Streptomyces</i>
ACPG 15	No Identificada
ACPG 16	No Identificada
ACPG 17	<i>Cellulomonas</i>
ACPG 18	No Identificada
ACPG 19	No Identificada
ACPG 20	<i>Streptomyces</i>

Fuente: Peña Gamboa, A. C (2015). Aislamiento y caracterización de actinobacterias provenientes del compost de residuos de producción de café orgánico . Trabajo de grado, Universidad Industrial de Santander.

2. METODOLOGÍA

En la Figura 3 se muestra un esquema de la metodología usada, la cual fue dividida en 3 etapas principales.

Figura 3. Metodología experimental para la selección y caracterización de cepas de actinobacterias productoras de hidrógeno.



2.1 CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DEL CULTIVO

Se emplearon 20 cepas de actinobacterias (Tabla 1), pertenecientes al Grupo de Investigación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular (CINBIN). Las cepas se cultivaron en medio CYC (Anexo B), primero en cajas Petri con agar y luego a partir de colonias individuales en cultivos de 5 mL en tubos de ensayo a 180 RPM, durante dos días y a temperatura ambiente. El crecimiento microbiano se cuantificó midiendo la densidad óptica (DO) a 600 nm usando un espectrofotómetro UV/VIS Lambda 25 (PerkinElmer, USA). Las pruebas de selección de cepas productoras de hidrógeno a partir de sacarosa y mucílago, así como su caracterización se realizaron al menos por duplicado.

2.2 SELECCIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE HIDRÓGENO A PARTIR DE SACAROSA

Viales de vidrio de 12 mL con 5,5 mL de medio CYC fueron purgados durante 2 minutos y medio con nitrógeno para generar condiciones anaerobias. El medio CYC fue seleccionado porque es selectivo para actinobacterias (fue el empleado en el aislamiento), además tiene como fuente de carbono la sacarosa que es un disacárido fácil de metabolizar. Los viales se inocularon con los cultivos realizados en los tubos de ensayo con un DO inicial de 0,5 y se incubaron durante 6 días a 180 RPM y temperatura ambiente. Trascurrido este tiempo se midió la DO a 600 nm usando un espectrofotómetro UV/VIS Lambda 25 (PerkinElmer, USA) y la producción de hidrógeno usando un detector de gases Tetra, (Crowcon, UK), cuyo rango de detección es 0 a 10.000 ppm en volumen, si se considera la ley de los gases ideales y la presión y temperatura constantes la relación de ppm en volúmenes equivalente a una relación en ppm molar. La producción de hidrógeno usualmente se reporta en la literatura como $\mu\text{mol/L}$ de cultivo y se calculó con la fórmula: La producción de hidrógeno en $\mu\text{mol/L}$ se calculó con la fórmula:

$$\frac{\mu\text{mol } H_2}{L} = \frac{P V}{R T} * ppm_r$$

Donde:

P: presión del gas en el vial (Pa)

V: volumen del gas en el vial (m^3)

R: constante universal de los gases 8,314472 ($\text{Pa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$)

T: temperatura del gas en el vial (K)

ppm_r : partes por millón reportado por el detector ($\mu\text{mol/mol}$)

L_{liquido} : volumen del líquido en el vial (L)

2.3 SELECCIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE HIDRÓGENO A PARTIR DE MUCÍLAGO DE CAFÉ

2.3.1 Preparación y caracterización del mucílago.

El mucílago usado se obtuvo de la planta de beneficio de café “El Roble” ubicada en Los Santos, Santander. El mucílago se extrajo del fruto mediante el desmucilagador, después se tamizó en serie usando mallas de 850, 450 y 150 micrómetros (No. 20, 40 y 100). A este mucílago se le realizó una caracterización fisicoquímica donde se midió el pH, los azúcares reductores totales (ART), los sólidos suspendidos y la densidad.

2.3.2 Producción de hidrógeno usando mucílago de café como medio de cultivo.

Esta prueba fue realizada para las cepas que dieron positivo en la producción de hidrógeno a partir de sacarosa en medio CYC. Las cepas fueron inoculadas en viales preparados como en la sección 2.2 utilizando el mucílago de café diluido al 50% como medio de cultivo, sin ajuste de pH y con ajuste de pH con NaOH hasta pH 7. Se decidió trabajar sin el ajuste del pH ya que se desea aprovechar directamente el mucílago con el mínimo procesamiento posible y el pH 7 fue seleccionado porque es el pH óptimo para el crecimiento de las actinobacterias [20]. Los viales se incubaron a temperatura ambiente, 180 RPM durante 6 días. Al finalizar el cultivo se midió la producción de hidrógeno con el detector de gases Tetra (Crowcon, UK).

2.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS MEJORES CEPAS PRODUCTORAS

Las pruebas de caracterización fueron realizadas para las tres cepas con la mayor producción de hidrógeno a partir de mucílago de café sin ajuste de pH y a pH 7.

[20] Gonzalez Villalobos, C. E., & Piedrahita Vasquez, Y. L. (2015). Estudio preliminar para la producción bacteriana de hidrógeno a partir de mucílago de café de la región Los Santos Santander Bucaramanga. Trabajo de grado, Universidad Industrial de Santander

2.4.1 Curva de producción de hidrógeno. Las cepas fueron inoculadas en viales de vidrio del mismo modo que en la prueba de producción de hidrógeno descrita en la etapa 2.3.2 por 1, 3, 6 y 9 días. En cada uno de estos días se midió la producción de hidrógeno con un detector de gases (Tetra, Crowcon, UK).

2.4.2 Crecimiento bacteriano. La turbidez del mucilago imposibilita la cuantificación de crecimiento bacteriano por espectrofotometría, por lo tanto se hicieron diluciones seriadas de los cultivos en los viales desde 10^{-1} hasta 10^{-6} . Luego se sembraron 0,1 mL de cada una de estas diluciones en cajas de Petri con medio CYC sólido, se dejaron crecer por 1 día a temperatura ambiente, luego de esto se realizó un conteo de las colonias que aparecieron en las cajas.

2.4.3 Curvas de pH. Se tomaron 6 mL del cultivo de los viales y se pasaron a tubos eppendorf, se centrifugaron a 5000 RPM, se tomó 5 mL de sobrenadante, a estos se le agregaron 15 mL de agua destilada. Luego se le midió el pH usando un peachímetro digital Orion 3 Star (Thermo scientific, USA)

2.4.4 Azúcares Reductores Totales (ART). Al cultivo se le determinaron los azúcares reductores totales usando el método colorimétrico del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) de Miller (Anexo C), que consiste en una reacción redox entre el reactivo DNS y los azúcares reductores presentes en la muestra [21].

2.4.5 Ácidos Grasos Volátiles (AGV). Se tomaron 6 mL del mucílago, se centrifugaron a 5000 RPM para obtener un total de 5 mL de sobrenadante. Cada una de las muestras de 5 mL de mucílago centrifugado se le agregaron 25 mL de agua destilada, se midió el pH y se ajustó a 3 usando HCl (0,1 N). Se calentó en un balón de destilación por 2 minutos (a partir de la aparición de la primera

[21] Bello Gil, D., Carrera Bocourt, E., & Díaz Maqueira, Y. (mayo-agosto de 2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, XL, 45-50

burbuja) y luego se aplicó un baño de hielo. Se midió el pH y se ajustó a 6,5 usando NaOH (0,1 N). A partir de la cantidad de NaOH (0,1 N) usada para llevar la muestra desde un pH 3 hasta un pH 6,5 se halla la cantidad de AGV usando la fórmula: [22].

$$AGV (mg \text{ Ac. Acético}/L) = \frac{B * N \text{ NaOH}}{\text{Vol. Muestra}} * 60000$$

Dónde:

B = Volumen de NaOH (0.1 N) utilizado [mL]

N NaOH = 0,1

Vol. Muestra = 5 mL

60000 = 60 mg Ac. Acético / meq * 1000 mL/L

2.4.6 Enzimas extracelulares. Se realizaron pruebas cualitativas para determinar la producción de enzimas extracelulares (amilasa, celulasa y proteasa) de las cepas que presentaron mejor producción de hidrógeno usando como medio de cultivo mucílago de café con pH 4 y pH 7. También se realizaron pruebas de cuantificación de la actividad enzimática de las enzimas extracelulares amilasa y celulasa a las cepas que dieron positivo en la prueba cualitativa.

2.4.6.1 Prueba cualitativa. Las pruebas se realizaron en cajas de Petri observando el halo formado alrededor de las colonias productoras de enzimas debido a la degradación del sustrato correspondiente (Anexo D).

- **Amilasas.** Se repicaron las 6 cepas en cajas Petri utilizando como fuente de carbono almidón y se dejaron crecer por 1 día a temperatura ambiente. Se

[22] Anderson, G. (1992). Determination of bicarbonate and total volatile acid concentration in anaerobic digestion using a simple titration. Water environment research, 64, 53-59

evaluó la producción de amilasas de acuerdo a la degradación presente en el agar usando yodo para teñir el almidón.

- **Proteasas.** Se repicaron las 6 cepas en cajas Petri utilizando como fuente de carbono leche en polvo y se dejaron crecer por 1 día a temperatura ambiente. Se evaluó la producción de acuerdo a la degradación presente en el agar.
- **Celulasas.** Se repicaron las 6 cepas en cajas Petri utilizando como fuente de carbono celulosa y se dejó crecer por un día. Se agregó una capa de agar suave y se realizó tinción usando rojo congo 0,1 p/v, posteriormente se lavó con una solución de NaCl 1 M. Se evaluó la producción de celulasas de acuerdo a la degradación presente en el agar.

2.4.6.2 Prueba cuantitativa. Para realizar la cuantificación de enzimas se tomó 0,2 mL del sobrenadante del mucílago centrifugado, se pasó a tubos de ensayo de vidrio y se le agregó 1 mL de una solución del sustrato (almidón o celulosa) al 1%(p/v) y 0,8 mL de CaCl_2 5 mM. Se midió la cantidad de azúcares reductores usando el método del DNS. Luego se hizo reaccionar por una hora a 37°C y a 180 RPM, posteriormente se volvió a medir la cantidad de azúcares reductores usando el mismo método. Definimos una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que libera 1 μg de glucosa por minuto bajo las condiciones del ensayo [23] [24].

[23] Espinel, E., & Lopez, E. (2009). Purificación y caracterización de alfa-amilasa de *Penicillium commune* mediante fermentación en fase sólida. *Revista Colombiana de Química*, 38, 36-41.

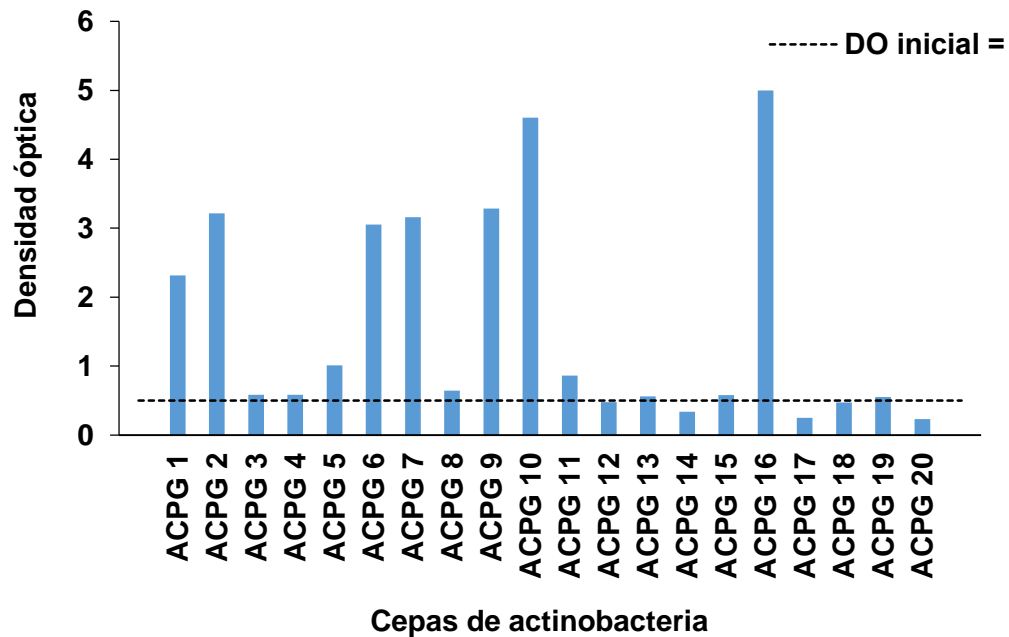
[24] Pachón Hernández, A. D., & Perea Calderón, D. A. (2010). Determinación cuantitativa de la actividad enzimática celulolítica de microorganismos aislados de suelos de cultivo de arroz. Trabajo de grado, Pontificia Universidad Javeriana.

3. RESULTADOS

3.1 SELECCIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE HIDRÓGENO A PARTIR DE SACAROSA

3.1.1 Crecimiento en condiciones anaerobias. Teniendo en cuenta que la DO inicial es de 0,5 se obtuvo que de las 20 cepas, 9 son claramente facultativas (Figura 4) debido a que presentan un DO final al menos dos veces mayor que el inicial, indicando el crecimiento anaerobio. Sin embargo es posible que las cepas cuya DO permaneció aproximadamente constante tengan actividad metabólica en fase estacionaria en actividades de mantenimiento celular, no siendo por lo tanto evidente el crecimiento.

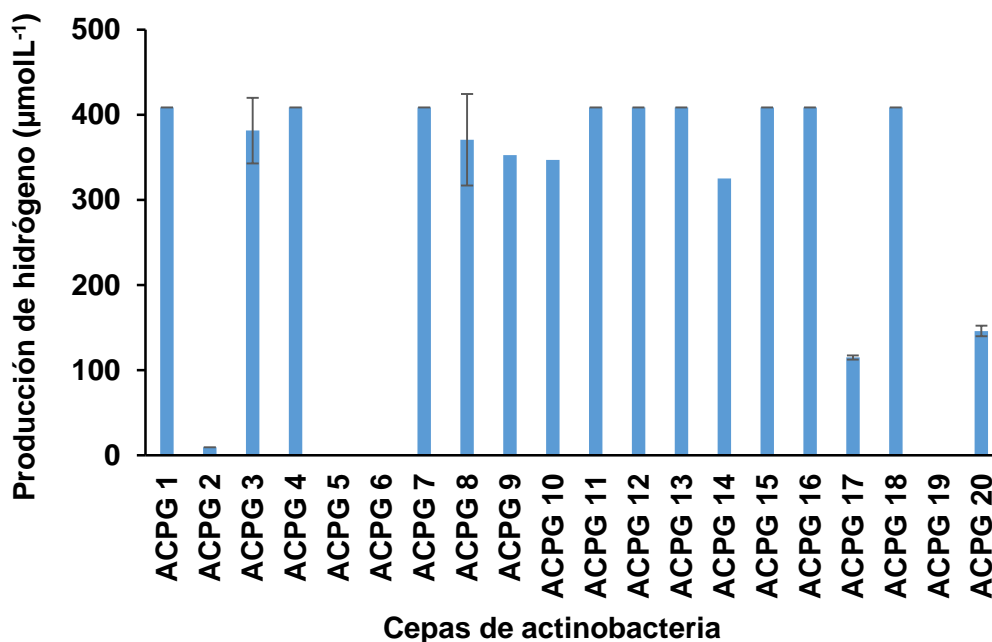
Figura 4. Crecimiento anaerobio



3.1.2. Producción de hidrógeno en medio de cultivo CYC. En la Figura 5 se reporta la producción de hidrógeno en $\mu\text{mol/L}$ de las 20 cepas. La máxima concentración de hidrógeno detectada por el medidor de gases utilizado es 10.000 ppm valor que corresponde a 408 $\mu\text{mol/L}$.

Las cepas ACPG 1, ACPG 4, ACPG 7, ACPG 11, ACPG 12, ACPG 13, ACPG 15, ACPG 16 y ACPG 18 presentaron la máxima producción detectada por el medidor de gases y las cepas ACPG 3, ACPG 8, ACPG 9, ACPG 10 y ACPG 14 presentaron alta producción de hidrógeno, por lo tanto a las 14 cepas mencionadas se les hizo la prueba de producción usando mucílago como medio. Comparando con la Figura 4 se observa que la producción de hidrógeno es independiente del crecimiento bacteriano ya que la mayoría de las cepas con la máxima producción no tuvo un crecimiento alto y cepas como la ACPG 2 presentaron crecimiento alto y producción de hidrógeno nula.

Figura 5. Prueba de producción de hidrógeno en medio CYC

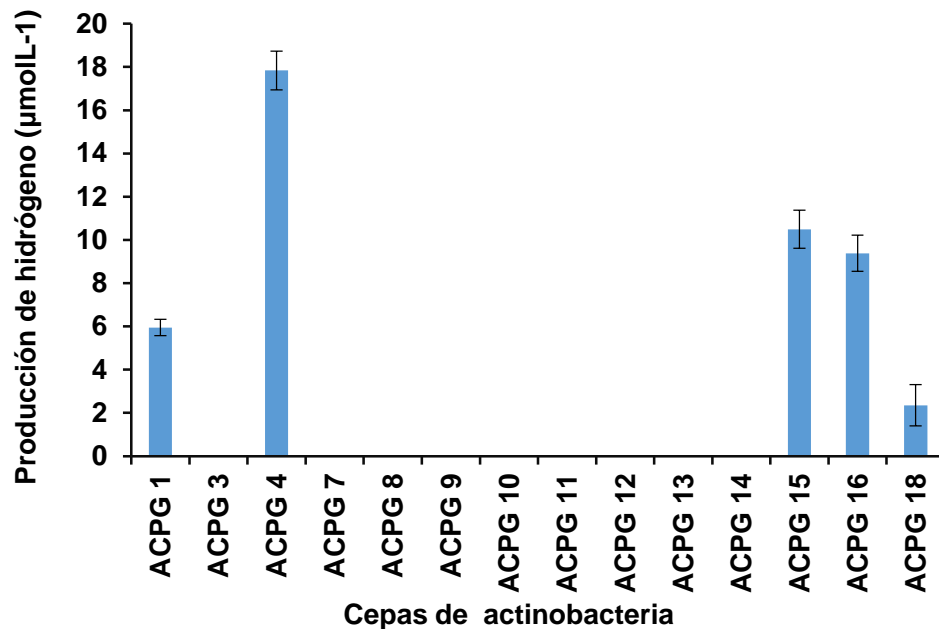


3.2. SELECCIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE HIDRÓGENO A PARTIR DE MUCÍLAGO DE CAFÉ

3.2.1 Preparación y caracterización del mucílago. A partir de las pruebas realizadas se halló que el mucílago tiene las siguientes características, la densidad es $1015,1 \text{ g mL}^{-1}$, el pH es 4,079, la cantidad de ART es $50,96 \text{ g ART L}^{-1}$ y la cantidad de sólidos suspendidos es $0,027 \text{ mg de sólidos suspendidos/ mL de mucílago}$.

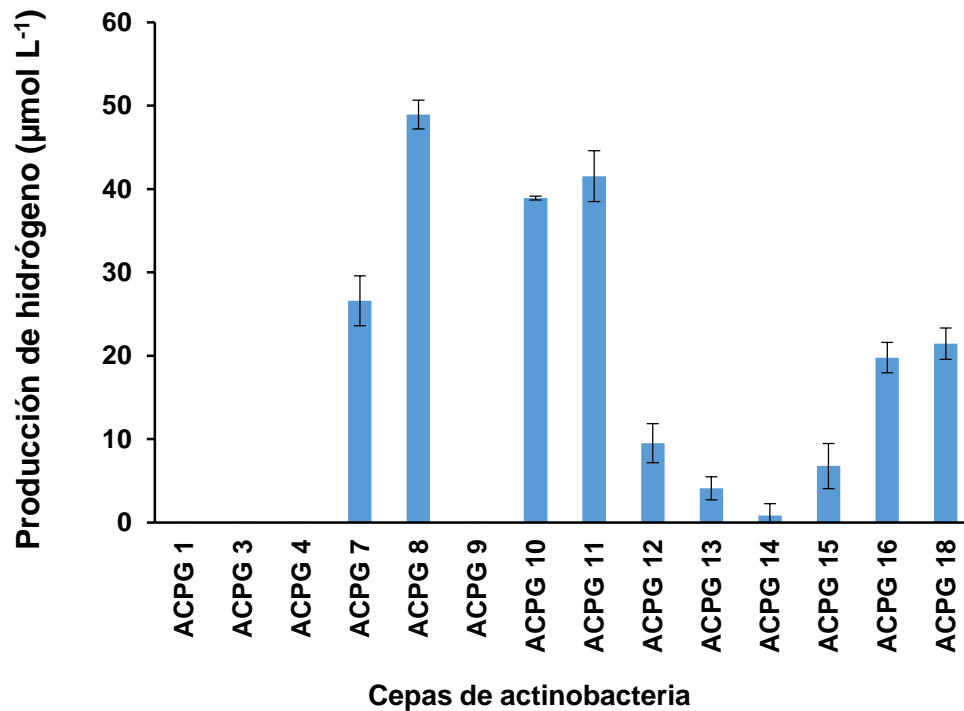
3.2.2 Producción de hidrógeno a partir de mucílago de café sin ajuste de pH como medio de cultivo. De las 14 cepas analizadas las cepas ACPG 1, ACPG 3, ACPG 4, ACPG 8, ACPG 12, ACPG 15, ACPG 16 y ACPG 18 produjeron hidrógeno usando mucílago de café como medio de cultivo sin ajustar el pH inicial (Figura 6). Se seleccionaron las cepas ACPG4, ACPG15 y ACPG16 para su posterior caracterización, por ser las mayores productoras de hidrógeno en este medio.

Figura 6. Producción de hidrógeno usando mucílago de café como medio de cultivo sin ajuste de pH.



3.2.3. Producción de hidrógeno a partir de mucílago con ajuste de pH. Con un pH neutro inicial, las cepas productoras de hidrógeno fueron ACPG 7, ACPG 8, ACPG 10, ACPG 11, ACPG 12, ACPG 13, ACPG 14, ACPG 15, ACPG 16 y ACPG 18 (Figura 7). La producción de hidrógeno de estas cepas a pH 7 es aproximadamente 5 veces la obtenida con mucílago sin ajuste de pH (a pH 4,079), Por lo tanto, el pH afecta la producción de hidrógeno siendo mejor el pH 7. Las cepas ACPG 8, CPG 10 y ACPG 11 al ser las mayores productoras fueron seleccionadas para una mayor caracterización.

Figura 7. Producción de hidrógeno usando mucílago de café como medio de cultivo con ajuste de pH.



La producción en sacarosa es mucho mayor que la producción en mucílago a cualquiera de los dos pH analizados, por lo tanto se puede concluir que esta producción no es la máxima que pueden alcanzar estas cepas. Probablemente la diferencia es debida a que el mucílago es una mezcla de sustratos más difíciles de metabolizar que la sacarosa, además es posible que tengan limitación de algunos nutrientes. Además el pH del medio CYC es aproximadamente 7, lo cual sugiere que a pH neutro inicial la producción de hidrógeno es mayor.

3.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS MEJORES CEPAS PRODUCTORAS

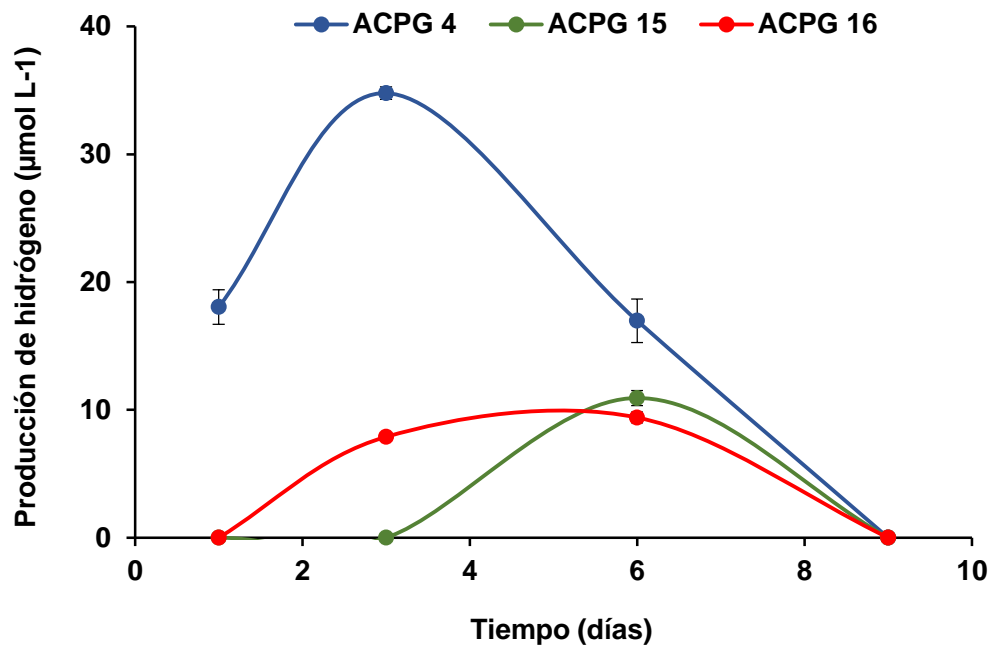
3.3.1 Curvas de producción de hidrógeno

3.3.1.1 Curvas de producción de hidrógeno de las cepas con mejor producción en mucílago sin ajuste de pH. Se cuantificó la producción de hidrógeno para las cepas ACPG 4, ACPG 15 y ACPG 16 en mucílago de café sin ajuste de pH a diferentes días. La cepa ACPG 4 fue la mejor productora de hidrógeno con una producción máxima de 37 $\mu\text{mol/L}$ al tercer día. Las cepas ACPG 15 y ACPG 16 presentan su máxima producción en el día 6. Podemos observar que la producción de hidrógeno de las tres cepas cae súbitamente hasta llegar a cero el día 9. Una de las posibles razones de esta disminución podría ser un cambio en el metabolismo hacia el consumo de hidrógeno, dado que las cepas bacterianas pueden tener varias clases de hidrogenasas [25] y algunas consumen el hidrógeno o son reversibles [26].

[25] Sanchez Torres, V., Mohd Yusoff, M., Nakano, C., Maeda, T., Ogawa, H. I., & Wood, T. K. (2013). Influence of *Escherichia coli* hydrogenases on hydrogen fermentation from glycerol. *Int J Hydrogen Energy*, 30, 3905-3912.

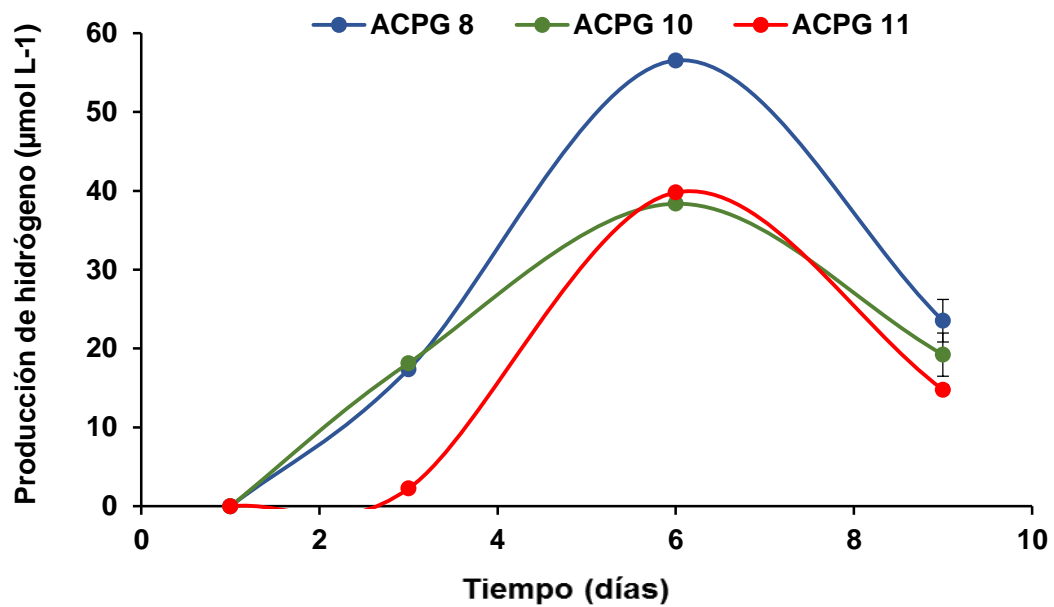
[26] Maeda, T., Sanchez Torres, V., & Wood, T. K. (2007). *Escherichia coli* hydrogenase 3 is a reversible enzyme possessing hydrogen uptake and synthesis activities. *Appl Microbiol Biotechnol*, 76, 1035-1042.

Figura 8. Curva de producción de hidrógeno a partir de mucílago sin ajuste de pH para las cepas ACPG 4, APG 15 y ACPG 16.



3.3.1.2 Curvas de producción de hidrógeno de las cepas con mejor producción en mucílago a pH 7. Se cuantificó la producción de hidrógeno de las cepas ACPG 8, ACPG 10 y ACPG 11 usando mucílago con pH ajustado a 7. Las tres cepas presentan un comportamiento semejante con máxima producción el día 6. También se puede observar que la ACPG 8 es la cepa con mayor producción en mucílago con pH ajustado y su producción máxima fue 58 $\mu\text{mol/L}$.

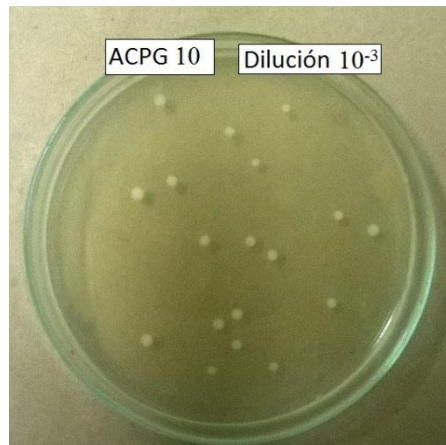
Figura 9. Curva de producción de hidrógeno a partir de mucílago a pH 7 para las cepas ACPG 8, ACPG 10 y ACPG 11.



3.3.2 Crecimiento bacteriano.

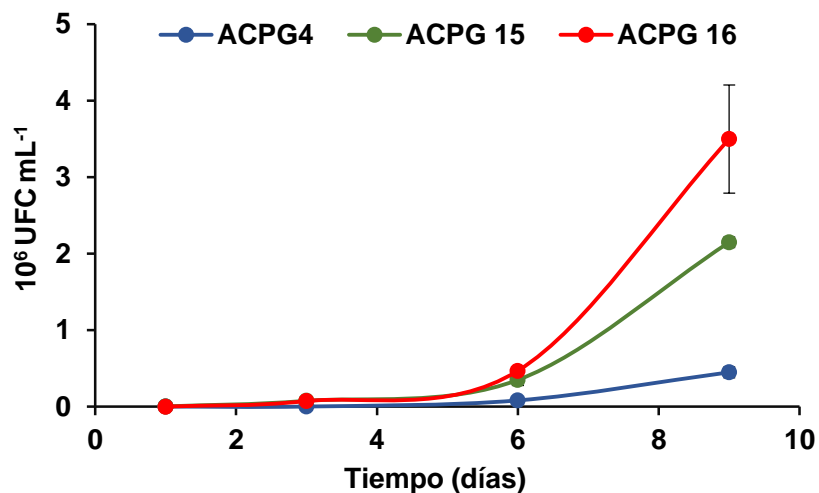
Para cada uno de los tiempos en que se cuantificó la producción de hidrógeno se calcularon las unidades formadoras de colonias por mL de cultivo (UFC mL^{-1}) realizando el conteo de colonias en cajas de Petri como la que se muestra en la Figura 10.

Figura 10. Cuantificación de colonias



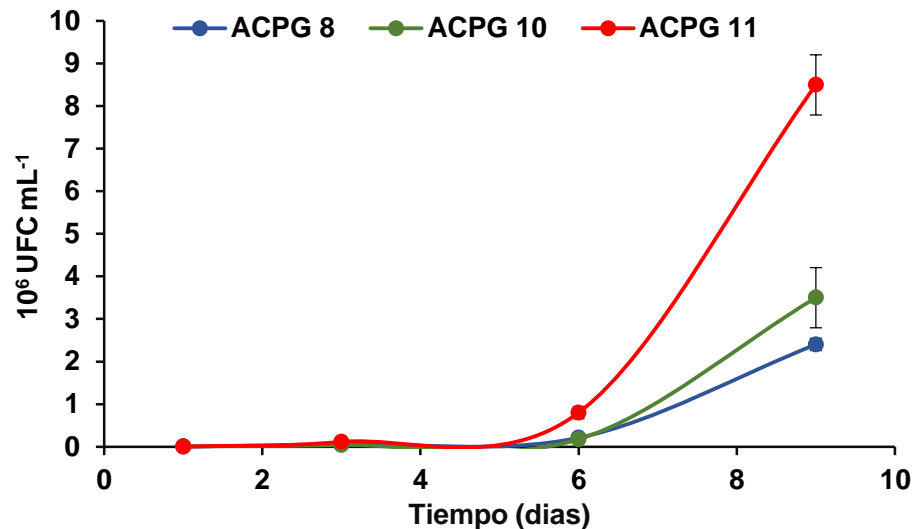
3.3.2.1 Crecimiento bacteriano en mucílago sin ajuste de pH. En la figura 11 se observa que el crecimiento en mucílago sin ajuste de pH es lento y que hay una fase de latencia de aproximadamente 3 días. El máximo de crecimiento se presentó al día 9. La cepa ACPG 16 presentó un mayor crecimiento bacteriano con $1,44 \times 10^7$ UFCmL⁻¹. El crecimiento bacteriano no tiene relación con la producción de hidrógeno ya que la ACPG 4 presenta una alta producción de hidrógeno y un bajo crecimiento bacteriano.

Figura 11. Curva de crecimiento a partir de mucílago sin ajuste de pH para las cepas ACPG 4, APG 15 y ACPG 16.



3.3.2.2 Crecimiento bacteriano en mucílago a pH 7. El crecimiento bacteriano en mucílago a pH 7 (Figura 12) fue mayor que el de las cepas evaluadas sin ajuste de pH lo cual indica que el pH neutro es más apropiado para el crecimiento. También se presentó una fase de latencia de aproximadamente 3 días y al igual que en medio de mucilago sin pH ajustado presenta el máximo de crecimiento en el día 9. La cepa ACPG 11 presento mayor crecimiento con $2,79 \times 10^7$ UFC mL⁻¹

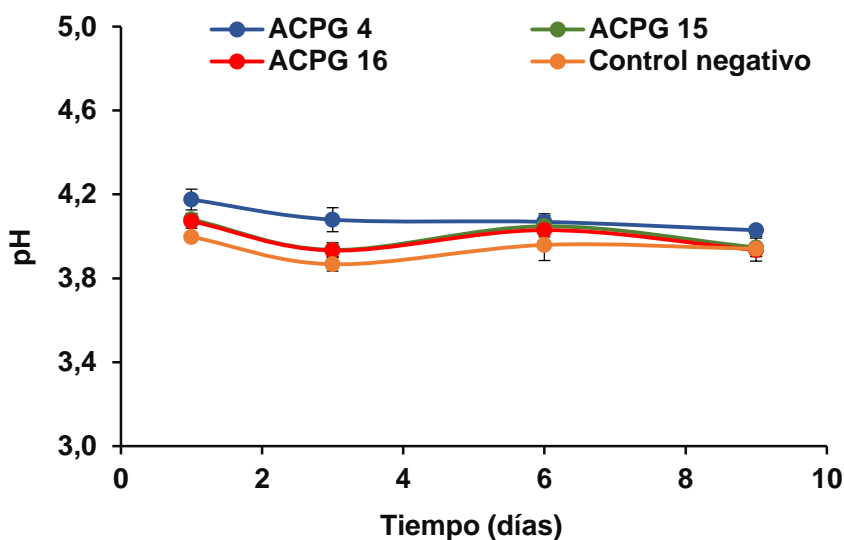
Figura 12. Curva de crecimiento a partir de mucílago con ajuste de pH para las cepas ACPG 8, ACPG 10 y ACPG 11.



3.3.3 Curvas de pH. Como se obs El pH inicial del mucílago tiene una gran influencia en la producción de hidrógeno y crecimiento bacteriano. En la fermentación oscura se producen diferentes ácidos orgánicos (succínico, acético, láctico y fórmico), por lo tanto la disminución del pH en el transcurso del tiempo indica que el proceso de fermentación está activo, por ende se ve necesario analizar el comportamiento de este en los días de referencia.

3.3.3.1 Curvas de pH en mucílago sin ajuste de pH. Como se observa en la Figura 13, el pH no varía durante el tiempo, por lo tanto la cantidad de ácidos producidos por la fermentación no es tan alta para disminuir el pH del medio.

Figura 13. Curva de pH para el crecimiento en mucílago sin ajuste de pH para las cepas ACPG 4, APG 15 y ACPG 16.



3.3.3.2 Curvas de pH en mucílago a pH 7. La formación de ácidos durante la ruta de fermentación hace que el pH disminuya, lo cual se observa en la Figura 14.

3.3.4 Azúcares Reductores Totales (ART). Los ART son oxidados por bacterias durante la fermentación para producir etanol, ácido láctico, entre otros compuestos.

3.3.4.1 ART en mucílago sin ajuste de pH. Como podemos observar en la Figura 15, los azúcares reductores son oxidados durante los 9 días de análisis. Las tres cepas presentaron un comportamiento semejante, el cual refleja una oxidación lineal.

Figura 14. Curva de pH para el crecimiento en mucílago a pH 7 para las cepas ACPG 8, ACPG 10 y ACPG 11.

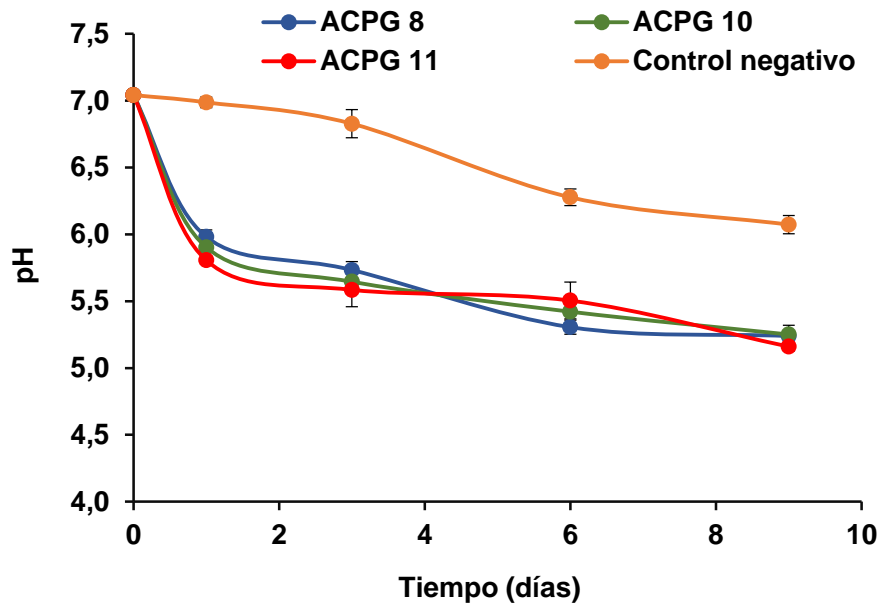
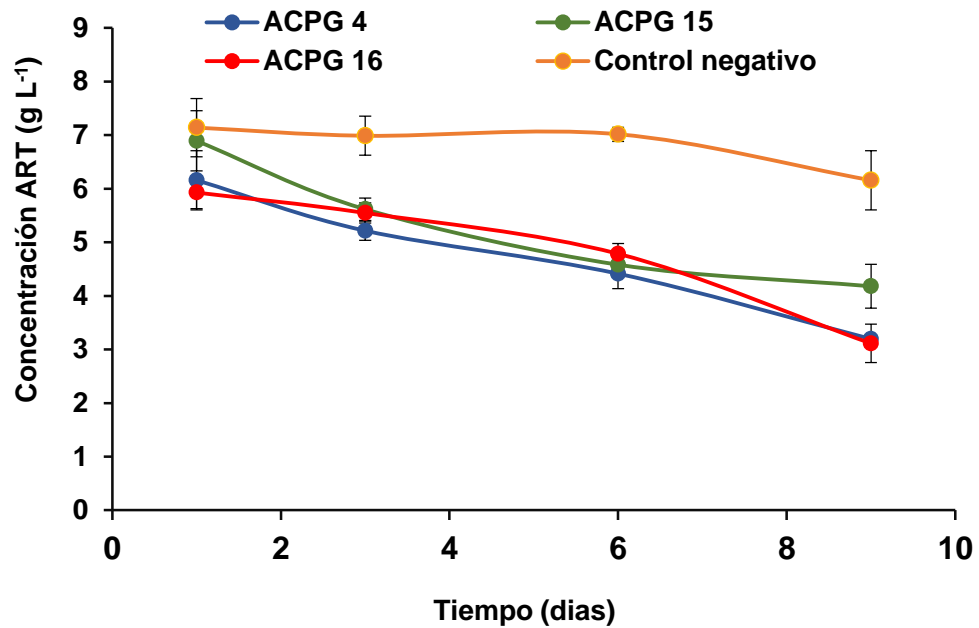
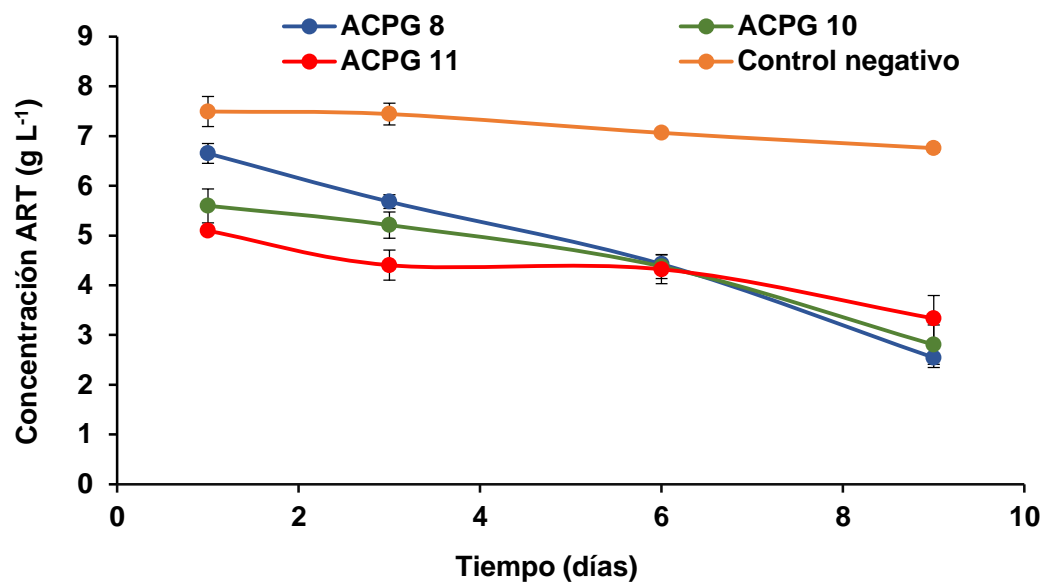


Figura 15. Curva de ART para el crecimiento en mucílago sin ajuste de pH para las cepas ACPG 4, APG 15 y ACPG 16.



3.3.4.2 ART en mucílago a pH 7. Se obtuvieron resultados similares a los obtenidos para el mucílago a pH 4, por lo tanto podemos concluir que el consumo de azúcares reductores es independiente del pH del medio utilizado (Figura 16).

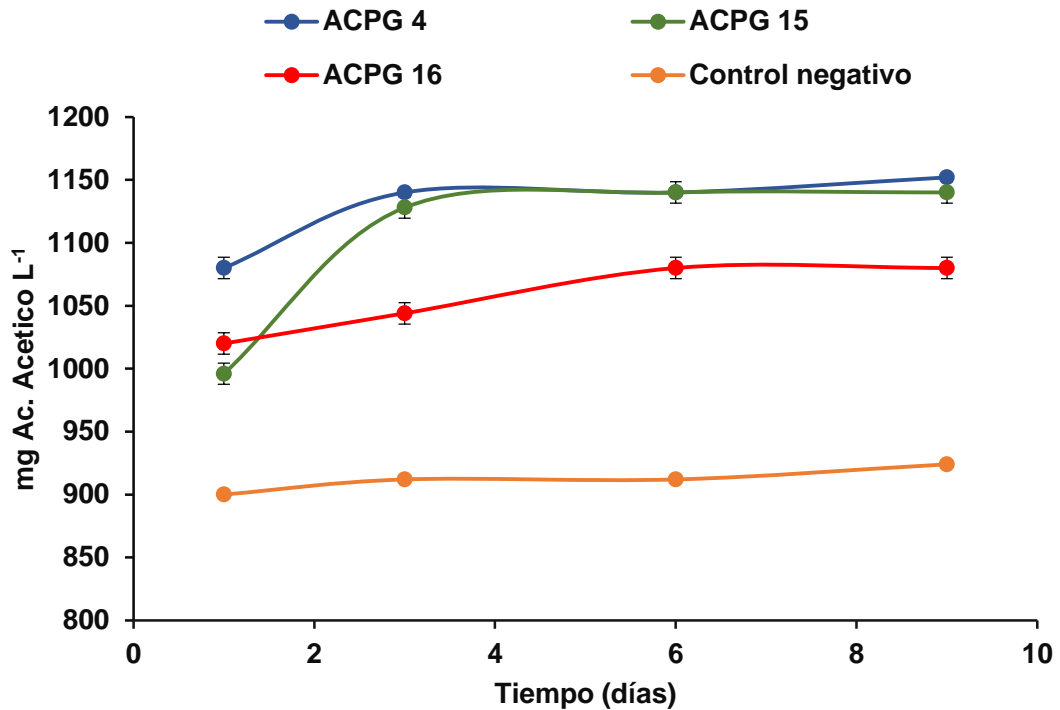
Figura 16. Curva de ART a partir de mucílago a pH 7 para las cepas ACPG 8, ACPG 10 y ACPG 11



3.3.5 Ácidos grasos volátiles

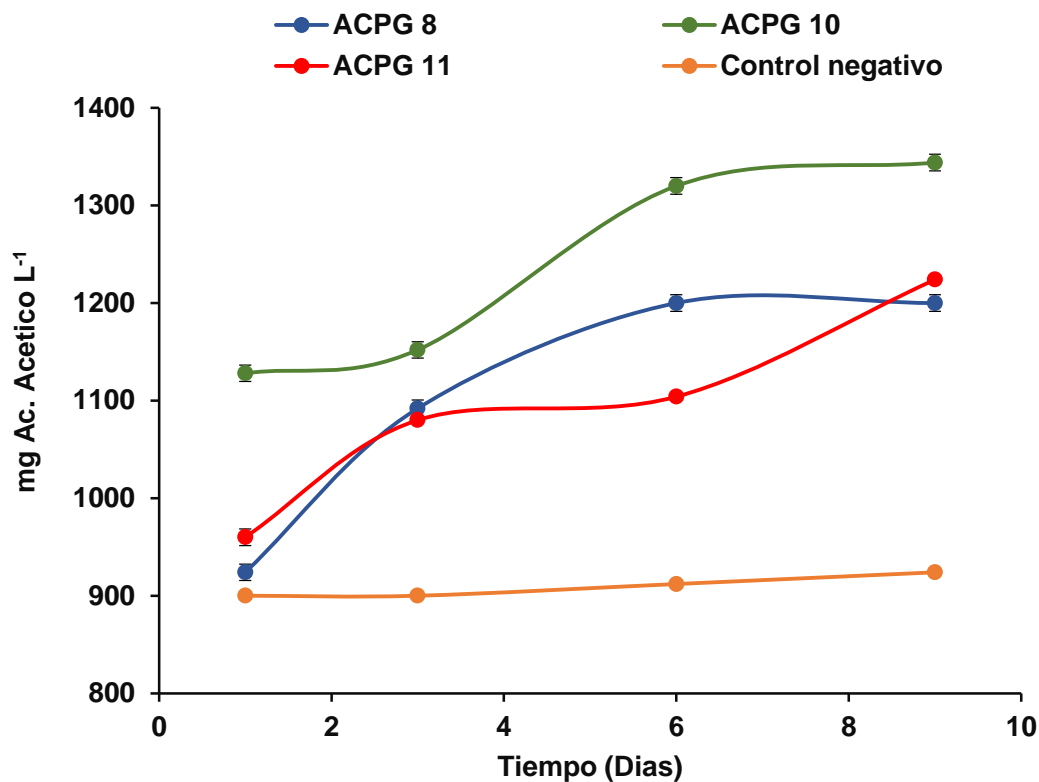
3.3.5.1 AGV en mucílago sin ajuste de pH. Durante la fermentación oscura se producen diferentes ácidos orgánicos con cadenas de menos de seis carbonos (AGV). En la Figura 17 se observa que desde el primer día de cultivo hay una diferencia entre la cantidad de AGV del control negativo y la de los medios inoculados con cada una de las cepas.

Figura 17. Curva de AGV a partir de mucílago sin ajuste de pH para las cepas ACPG 4, APG 15 y ACPG 16.



3.3.4.2 AGV en mucílago a pH 7. De la Figura 18 se puede observar que la producción de AGV es mucho mayor en las cepas a las cuales se le ajustó el pH inicial a 7 en comparación con las que se cultivaron sin ajustar el pH (Figura 17). Este comportamiento respalda los resultados obtenidos para la producción de hidrógeno, los cuales indican que la fermentación oscura se da mejor a pH 7 que a pH 4.

Figura 18. Curva de AGV a partir de mucílago con ajuste de pH para las cepas ACPG 8, ACPG 10 y ACPG 11.



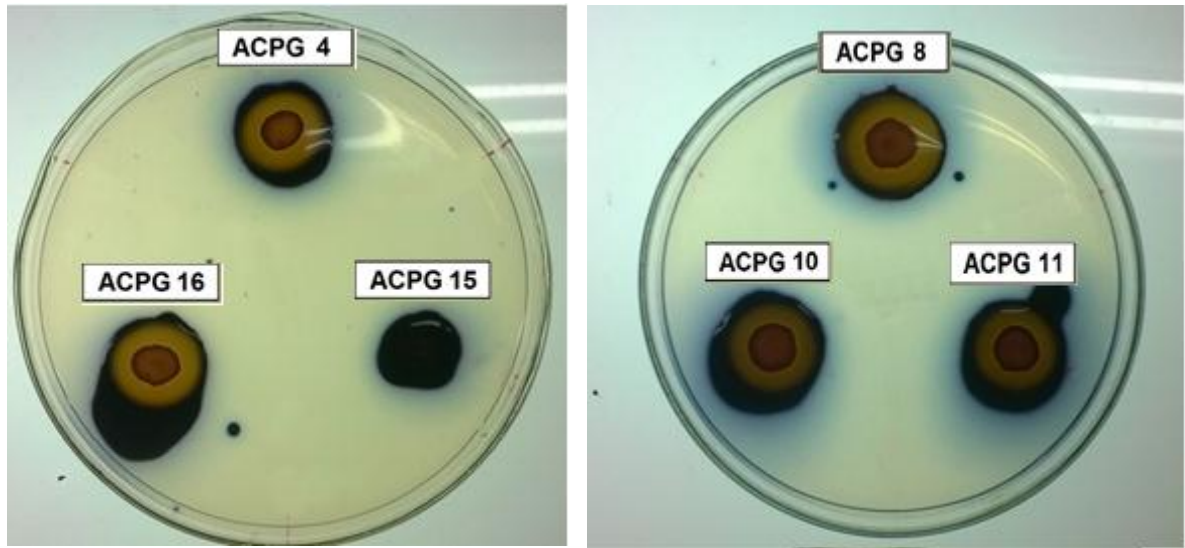
3.3.5 Actividad Enzimática

3.3.5.1 Prueba cualitativa

- **Amilasas.** El yodo reacciona con el almidón produciendo una tinción azul violeta debido a que el yodo se introduce en los espacios abiertos de las hélices de amilosa [27]. En la Figura 19 se observa que alrededor de las cepas ACPG 4, ACPG 8, ACPG 10, ACPG 11 y ACPG 16 no se realizó tinción azul violeta indicando la degradación del almidón.

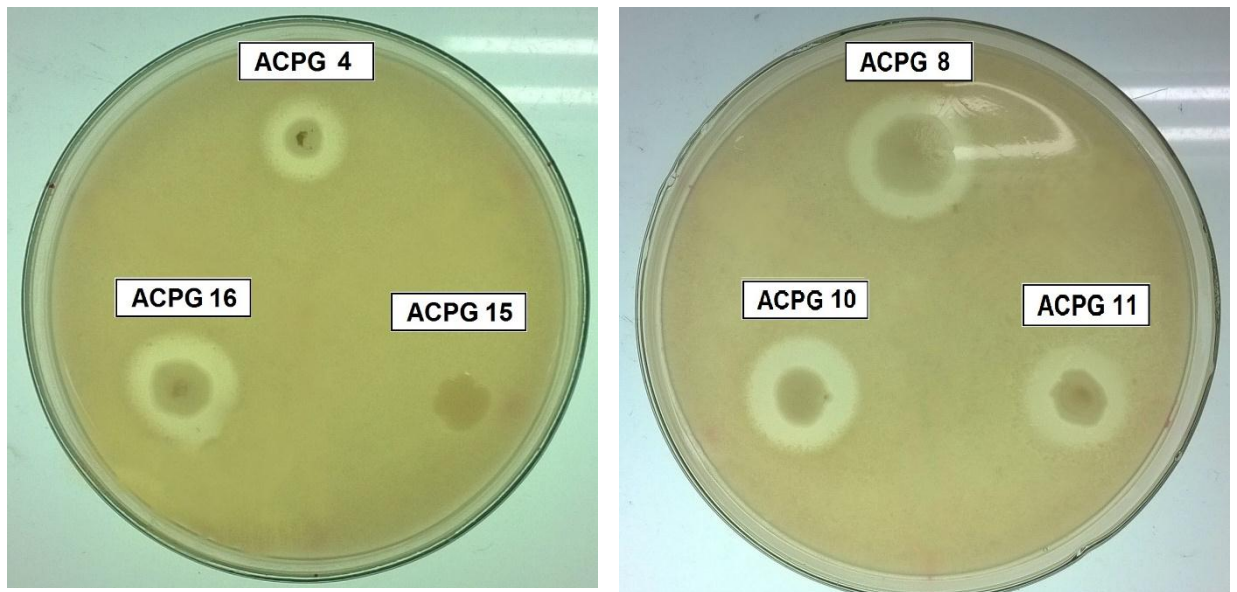
[27] Guarnizo F., A., Martínez, P., & otro autor. (s.f.). Experimentos de química orgánica con enfoque en ciencias de la vida. Armenia: Ediciones Elizcon.

Figura 19. Prueba cualitativa de actividad enzimática: Amilasa.



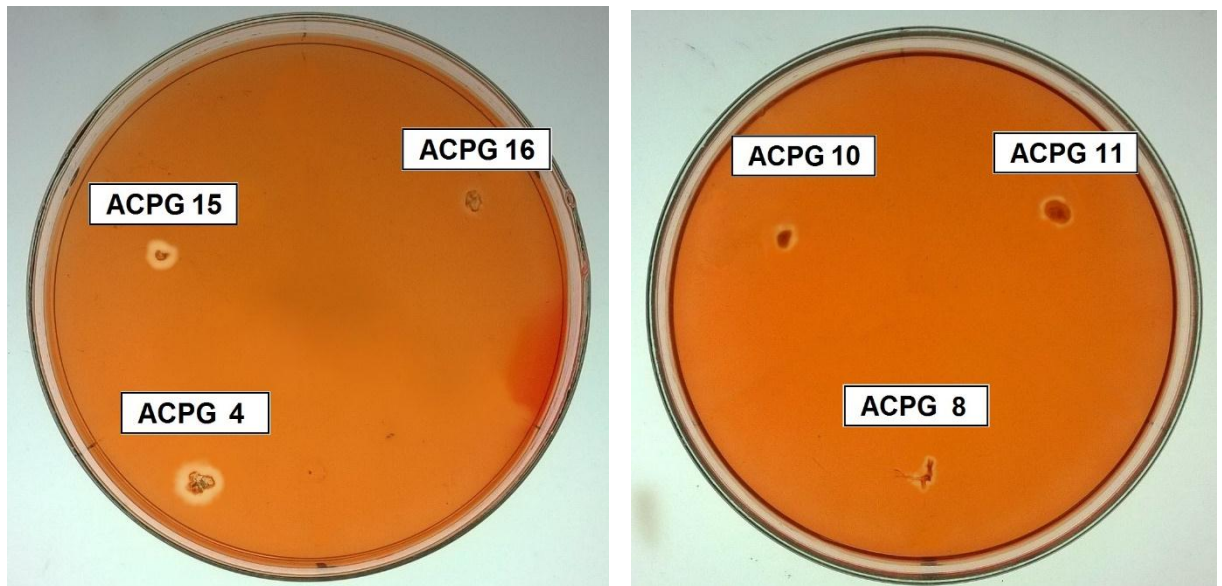
- **Proteasas.** Alrededor de las cepas ACPG 4, ACPG 8, ACPG 10, ACPG 11 y ACPG 16 se observan halos transparentes (Figura 20), lo que significa que estas cepas hidrolizaron las proteínas para su alimento, por el contrario la cepa ACPG 15 no presentó actividad de hidrólisis de proteína.

Figura 20. Prueba cualitativa de actividad enzimática: Proteasa



- **Celulasas.** En esta prueba el indicador es el rojo Congo, el cual forma complejos con las moléculas no hidrolizadas de carboximetilcelulosa permitiendo así observar zonas claras alrededor de las colonias que produzcan celulasas [28]. En la Figura 21 se puede observar que aparecen halos alrededor de las cepas ACPG 4, ACPG 8, ACPG 10, ACPG 11 y ACPG 15, los cuales indican la presencia de celulasas extracelulares.

Figura 21. Prueba cualitativa de actividad enzimática: Celulasa



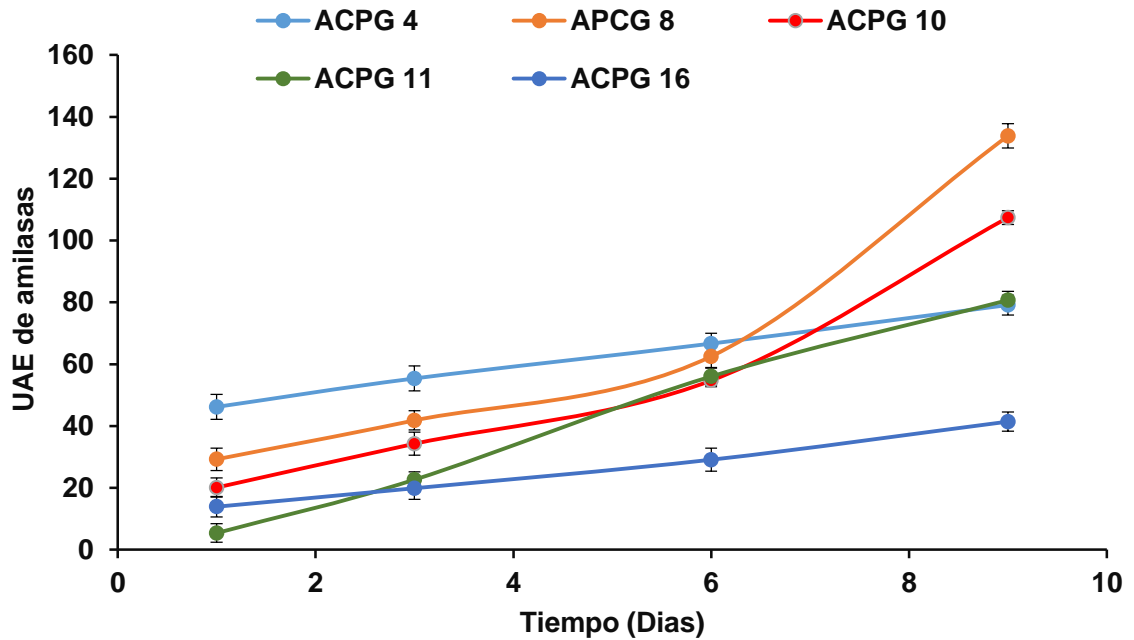
3.3.5.2 Prueba Cuantitativa

- **Amilasas.** Para complementar las pruebas cualitativas, se hizo una prueba cuantitativa en el cual se midió la cantidad de azúcares reductores presentes en una muestra rica en almidón antes y después de ponerlos a reaccionar con el sobrenadante de los cultivos en mucílago. La definición de unidad de actividad enzimática (UAE) es la cantidad de enzima necesaria para producir 1

[28] Gaitan Bohorquez, D., & Perez Perez, L. I. (2007). Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de Crisantemo.

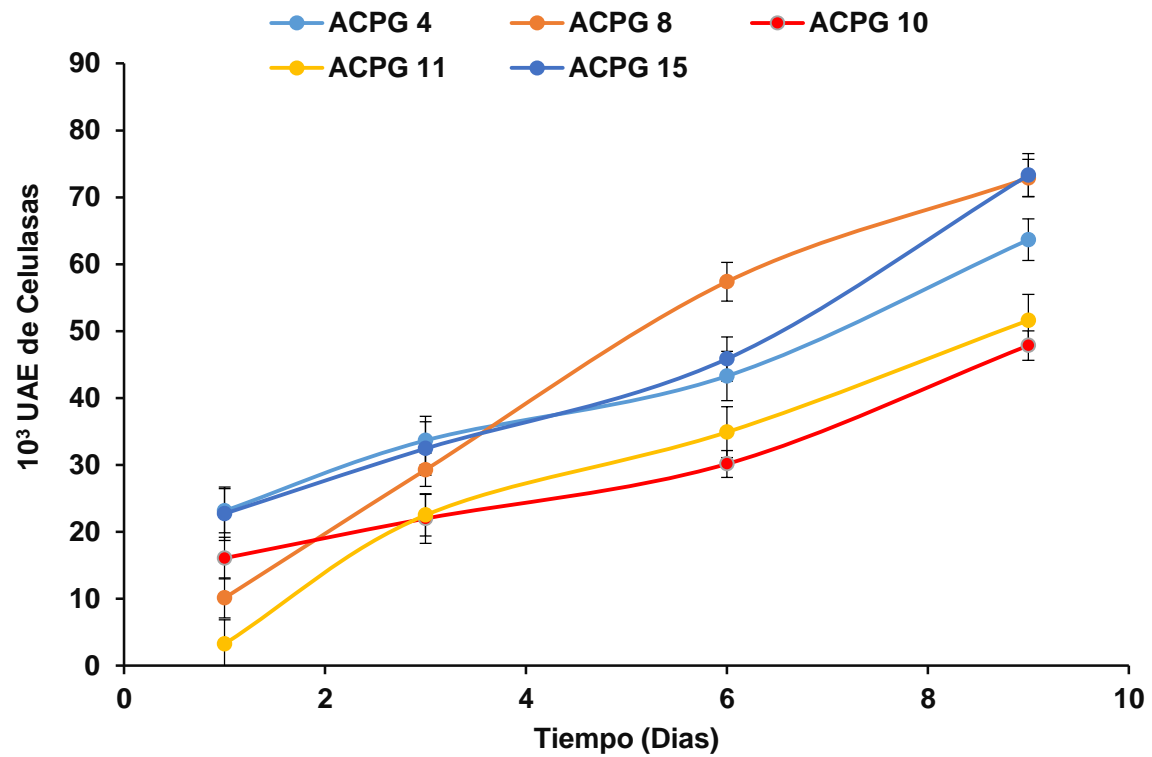
g de azúcar reductor por minuto a las condiciones de cada experimento. De la Figura 22 se puede concluir que la cepa ACPG 8 es la que más amilasa extracelular produce.

Figura 22. Curva de unidades de actividad enzimática; amilasa.



- **Celulasas.** Para cuantificar la producción de celulasas extracelulares se midieron los azúcares reductores presentes en una muestra rica en celulosa antes y después de reaccionar con las enzimas presentes en el sobrenadante de los cultivos, para cada una de las cepas que dieron positivo en la prueba cualitativa.
- De esta prueba se pudo observar que las cepas ACPG 8 y ACPG 15 son las que mayor producción de celulasa extracelular presentan.

Figura 23. Curva de Unidades de actividad enzimática; celulasa.



4. CONCLUSIONES

- Las cepas ACPG 1, ACPG 3, ACPG 4, ACPG 7, ACPG 8, ACPG 9, ACPG 10, ACPG 11, ACPG 12, ACPG 13, ACPG 14, ACPG 15, ACPG 16 y ACPG 18 producen hidrógeno usando como sustrato sacarosa.
- Las cepas ACPG 4, ACPG 15 y ACPG 16 son las mejores productoras de hidrógeno usando mucílago con pH sin ajustar (pH 4), siendo la ACPG 4 la mejor de las tres con una producción de 37 $\mu\text{mol/L}$ a los 3 días de cultivo.
- Las cepas ACPG 8, ACPG 10 y ACPG 11 son las mejores productoras de hidrógeno usando mucílago con pH ajustado (pH 7), siendo la ACPG 8 la mejor de las tres con una producción de 58 $\mu\text{mol/L}$ presentada a los 6 días.
- No existe una relación directa entre la producción de hidrógeno y el crecimiento anaerobio de las cepas.
- Realizando los cultivos en mucílago pH 7 se obtiene mayor producción de hidrógeno que sin el pH ajustado (pH 4).

BIBLIOGRAFIA

- Aguer Horta, M., & Miranda Barreras, A. (2012). El hidrógeno, fundamento de un futuro equilibrado. Madrid: Diaz de Santos.
- Americo Peretti , H., & Visintin , A. (s.f.). Hidrógeno, combustible del futuro: ¿Por qué, cómo y dónde? Recuperado el 9 de Octubre de 2015, <http://www.inifta.unlp.edu.ar/extension/Hidrogeno.pdf>
- Anderson , G. (1992). Determination of bicarbonate and total volatile acid concentration in anaerobic digestion using a simple titration. *Water environment research*, 64, 53-59.
- Bello Gil, D., Carrera Bocourt, E., & Díaz Maqueira, Y. (mayo-agosto de 2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azucar utilizando el metodo del ácido 3,5 dinitrosalicílico. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azucar*, XL, 45-50.
- Blanco Londoño, S., & Rodruiguez Chaparro, T. (2012). Producción de biohidrógeno a partir de residuos mediante fermentación oscura: una revisión crítica (1993-2011). *Ingeniare*, 20(3), 398-411.
- Boiron, P., & Provost, F. (1990). Enzymatic characterization of *Nocardia spp.* and related bacteria by API ZYM profile. *Medline*, 110, 51-56.
- Espinel, E., & Lopez, E. (2009). Purificación y caracterización de alfa-amilasa de *Penicillium commune* mediante fermentación en fase sólida. *Revista Colombiana de Química*, 38, 36-41.

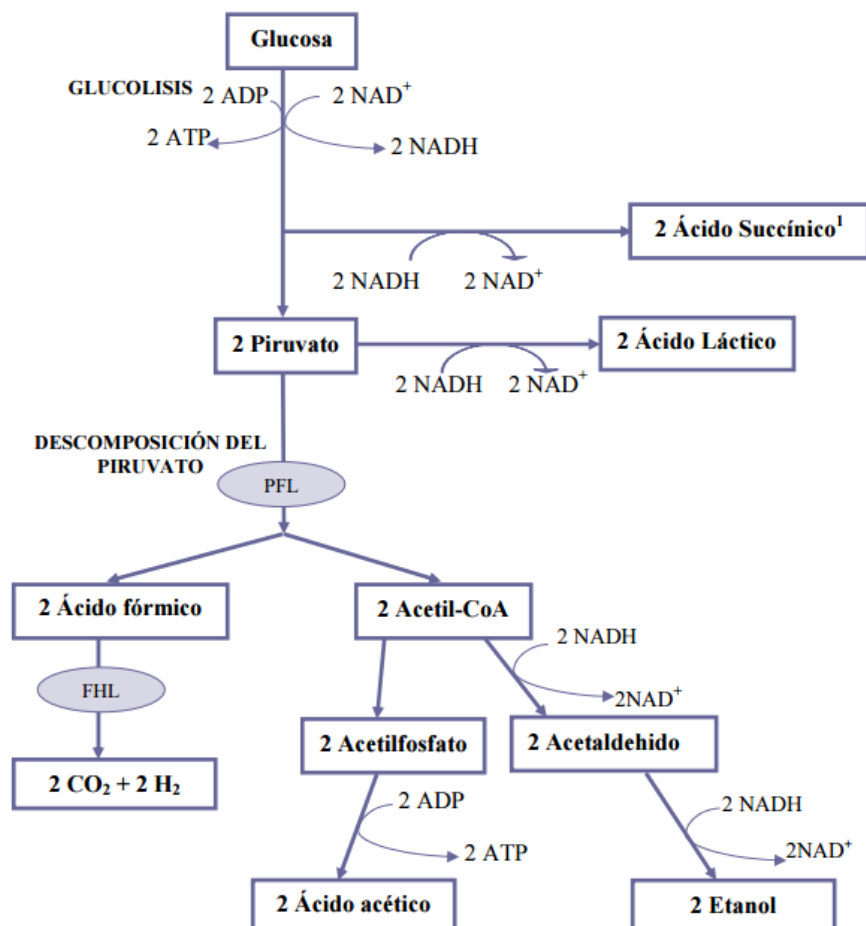
- Gaitan Bohorquez, D., & Perez Perez, L. I. (2007). Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de Crisantemo.
- Gonzalez Villalobos , C. E., & Piedrahita Vasquez , Y. L. (2015). Estudio preliminar para la producción bacteriana de hidrógeno a partir de mucílago de café de la región Los Santos Santander Bucaramanga. Trabajo de grado, Universidad Industrial de Santander
- Guarnizo F., A., Martinez, P., & otro autor. (s.f.). Experimentos de química orgánica con enfoque en ciencias de la vida. Armenia: Ediciones Elizcon.
- Gutiérrez Jodra, L. (2005). El hidrógeno: combustible del futuro. Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 99(1), 49-67
- Maeda , T., Sanchez Torres, V., & Wood , T. K. (2007). *Escherichia coli* hydrogenase 3 is a reversible enzyme possessing hydrogen uptake and synthesis activities. Appl Microbiol Biotechnol, 76, 1035-1042.
- Martinez, V., & Garcia, R. (2010). Fermentación oscura, fotofermentación y biofotólisis: análisis de su aplicación en secuencia para la producción de hidrógeno biológico. 3. Argentina: Dirección General de Investigación y Desarrollo (DGID).
- Pachón Hernández , A. D., & Perea Calderón , D. A. (2010). Determinación cuantitativa de la actividad enzimática celulolítica de microorganismos aislados de suelos de cultivo de arroz. Trabajo de grado, Pontificia Universidad Javeriana.

- Pandey, A., Ali, I., Singh, K., Chatterji, T., & Singh, V. (2011). Isolation and characterization of Actinomycetes from soil and evaluation of antibacterial activities of Actinomycetes against pathogens. *Int J Appl Biol Pharm*, 4, 384-392.
- Peña Gamboa , A. C. (2015). Aislamiento y caracterización de actinobacterias provenientes del compost de residuos de producción de café orgánico . Trabajo de grado, Universidad Industrial de Santander.
- Puerta Quintero, G. I., & Ríos Arias, S. (2011). Composición química del mucílago de café, según el tiempo de fermentación y refrigeración. *Cenicafé*, 62, 23-40.
- Ramirez, S., & Vega de Kuiper, J. C. (2014). Fuentes de energía renovable y no renovable. Madrid: Alfaomega
- Ramos Giraldo, P. J., Sanz Uribe, J. R., & Olveros Tascón, C. E. (2010). Identificación y clasificación de frutos de café en tiempo real, a través de la medición de color. *Cenicafé*, 61, 315-326.
- Redondas Monteserín, V. (2013). Obtención de hidrógeno mediante fermentación oscura de residuos de comida y lactosuero. 31-39. León, España.
- Rodríguez Valencia , N., & Zambrano Franco, D. A. (2010). Los subproductos del café: fuente de energía renovable. *Cenicafé*, 61, 3-6.
- Sanchez Torres, V., Mohd Yusoff, M., Nakano, C., Maeda, T., Ogawa, H. I., & Wood, T. K. (2013). Influence of *Escherichia coli* hydrogenases on hydrogen fermentation from glycerol. *Int J Hydrogen Energy*, 30, 3905-3912.

Valdez Vázquez, I., & Poggi Varaldo, H. (2006). Producción de hidrógeno una opción biotecnológica. Morelos.

ANEXOS

Anexo A. Ruta de fermentación de la glucosa por medio de bacterias anaerobias facultativas.



Fuente: [17]

ANEXO B. Medio CYC²⁹

Componente	g/L
Sacarosa	30
Nitrato de sodio	3
Sulfato de magnesio	0,5
Cloruro de potasio	0,5
Sulfato de hierro (III)	0,01
Fosfato dipotásico	1
Extracto de levadura	2
Casaminoácidos	6

²⁹ Para CYC sólido se agregan 15 g/L de agar

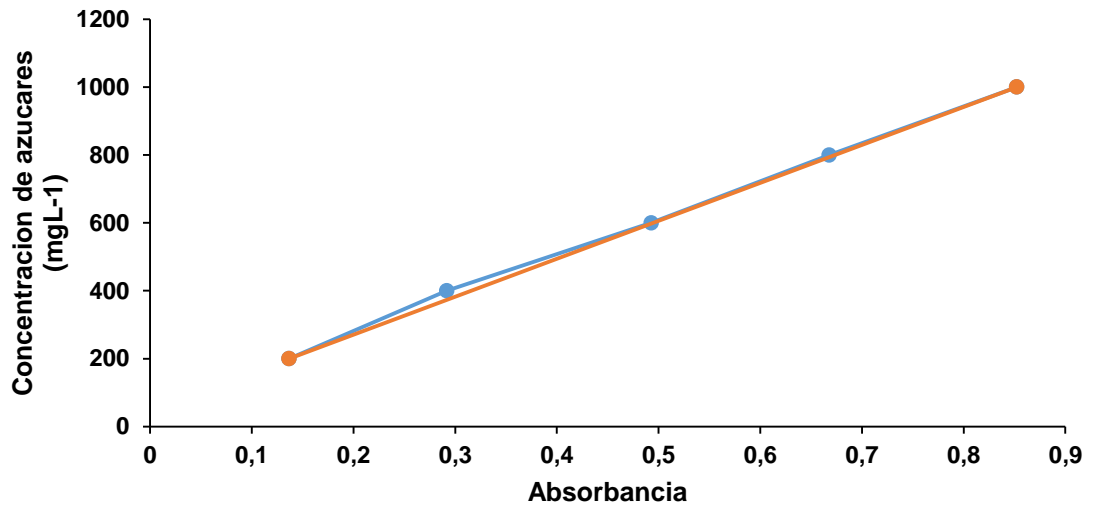
ANEXO C. Protocolo de cuantificación de azúcares reductores con el reactivo de Miller

El método Miller o DNS es una técnica utilizada para la cuantificación de concentración de ART, en la cual se usa el reactivo 3,5 ácido Dinitrosalicílico para hidrolizar polisacáridos presentes en la muestra. El protocolo para determinar la concentración de ART del medio de cultivo en los días de estudio es el siguiente:

- Preparar las muestras de mucilago, diluirlas en caso de que sea necesario para evitar conseguir una absorbancia entre 0 y 1. Además, se debe utilizar una muestra denominada “Blanco” la cual sería agua.
- Mezclar 0,5 mL de cada una de las muestras preparadas anteriormente con 0,5mL del reactivo DNS almacenado.
- Ebulir por 5 minutos en baño de María e inmediatamente detener la reacción con baño de agua y hielo.
- Reconstruir las muestras con 5mL de agua destilada.
- Agitar y dejar en reposo por 15 min.
- Determinar la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540nm.
- Realizar el procedimiento anterior por triplicado.

La curva de calibración se realiza tomando muestras iniciales con distintas concentraciones de glucosa y repetir los pasos anteriormente descritos.

Curva de calibración



ANEXO D. Identificación cualitativa de bacterias productoras de amilasas, proteasas y celulasas.³⁰

Medio para el ensayo de amilasa.

Componente	g/L
Almidón soluble	5
Extracto de levadura	1
Triptona	2
CaCl ₂	0,0032
MgCl ₂	0,1
K ₂ HPO ₄	0,36
Na ₂ HPO ₄	1,3

Medio para el ensayo de proteasas.

Componente	g/L
Leche en polvo descremada	10
Extracto de levadura	3

Medio para el ensayo de celulasas.

- 10X M9 bufer (pH 7.0)

Componente	g/L
Na ₂ HPO ₄	60
KH ₂ PO ₄	30
NaCl	5
NH ₄ Cl	10

- Platos (1 L)

Componente	
10X M9 bufer	100 ml
Extracto de levadura	1 g
Carboximetilcelulosa	2 g

³⁰ Para todos los medios se le agregaron 15 g/L de agar