

**ESTUDIO PRELIMINAR PARA LA PRODUCCIÓN BACTERIANA DE
HIDRÓGENO A PARTIR DE MUCÍLAGO DE CAFÉ DE LA REGIÓN LOS
SANTOS, SANTANDER**

**CARLOS ESTEBAN GONZÁLEZ VILLALOBOS
YESENIA LICETH PIEDRAHITA VÁSQUEZ**

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

2015

**ESTUDIO PRELIMINAR PARA LA PRODUCCIÓN BACTERIANA DE
HIDRÓGENO A PARTIR DE MUCÍLAGO DE CAFÉ DE LA REGIÓN LOS
SANTOS SANTANDER**

**CARLOS ESTEBAN GONZÁLEZ VILLALOBOS
YESENIA LICETH PIEDRAHITA VÁSQUEZ**

Trabajo de Grado para optar al título de Ingeniero Químico

Directora:

**VIVIANA SÁNCHEZ TORRES
Ingeniera Química, Ph.D.**

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

2015

A Dios que es mi guía, mi fuente de fortaleza, de paz, de amor, de tranquilidad, aquel que equilibra las cosas en este universo y que a la vez está representado en cada una de las personas que me rodearon y ayudaron en este camino.

A mis padres, que juntos me enseñan cada día que significa el ser amado por alguien.

A mis hermanos, que con su original y única forma de ser me acompañaron y apoyaron cada día.

A mis compañeros y amigos, por tantas experiencias vividas, apoyo y sonrisas.

A mis profesores que con la fuerza de su vocación creen y trabajan por un mundo mejor.

Carlos Esteban Gonzalez Villalobos

Quiero agradecer a Dios, por estar presente en mí bendiciendo cada una de mis acciones y proyectos, por brindarme fortaleza, por ser mi compañero y amigo en el camino de la vida para cumplir con firmeza, alegría y valor mis deberes y responsabilidades; a ti señor gracias por ser mi motor cada mañana.

A mis padres, Luz Marina Vásquez Lasso y José Arturo Piedrahita Rodríguez, por ser mi inspiración, mi motivo de superación, porque a ellos, seres incondicionales debo la vida y su esfuerzo por darme siempre lo mejor su apoyo, fuerza y amor.

A mi abuela Yolanda Lazo Vásquez, por confiar en mí, por guiarme siempre por el buen camino, por impulsarme día a día a ser mejor, por inculcarme valores como la humildad, sinceridad, responsabilidad y la perseverancia de luchar siempre por lo que quiero siempre de la mano de Dios.

A mis abuelos paternos Clara Rodríguez y Eduardo Piedrahita (Q.E.P.D), por su apoyo incondicional por acompañarme en la realización de mis proyectos, en especial a mi abuelo que me acompaña desde el cielo dedico esta etapa en mi vida.

A mi familia, por regalarme la fuerza y compañía en la realización de mis metas, mi ahijada Samantha que se ha convertido en el impulso para ser un buen ejemplo para su vida.

A mis amigos, por llenarme de momentos de alegrías, experiencias y amor.

A mis profesores, por guiarme en el camino del conocimiento, por aportar cada minuto de sus vidas para forjar grandes profesionales.

Yesenia Liceth Piedrahita Vásquez.

AGRADECIMIENTOS

Ph.D VIVIANA SANCHEZ TORRES, por la oportunidad de trabajar en su plan de investigación y por su respaldo como director del proyecto.

Dr. JORGE HERNÁNDEZ TORRES, por la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación CINBIN (Grupo de Investigación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular).

BIÓLOGA ORIANA DANUTA SERNA DAZA por su orientación, comprensión y apoyo para contribuir al buen desarrollo del presente proyecto.

La Universidad Industrial de Santander, los profesores de ingeniería química que hicieron parte de nuestra formación profesional.

CONTENIDO

	Pag.
INTRODUCCIÓN	16
1. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA.....	21
1.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA.....	22
1.2 FORMULACIÓN DEL MEDIO.....	23
1.3 CONSERVACIÓN CEPAS NATIVAS	24
1.4 DETECCIÓN DE HIDRÓGENO.....	25
1.5 DESPLAZAMIENTO ALCALINO.....	25
1.6 CRECIMIENTO BACTERIANO.....	26
2. RESULTADOS Y ANÁLISIS	27
2.1 CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES	27
2.2 MEDICIÓN DE SÓLIDOS SUSPENDIDOS	28
2.3 MEDICIÓN DE pH	28
2.4 FORMULACIÓN DEL MEDIO.....	28
2.5 FERMENTACIÓN DE MUCÍLAGO EN CULTIVOS ANAEROBIOS.....	31

3. CONCLUSIONES	37
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
BIBLIOGRAFÍA.....	43
ANEXOS	47

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura del fruto y del grano de un cafeto.	16
Figura 2. Generación de hidrógeno con producción simultánea de acetato, etanol, lactato y formiato a través de la ruta de la glucólisis.	18
Figura 3. Metodología experimental para el proceso obtención de hidrógeno.....	20
Figura 4. Crecimiento de algunas cepas nativas en el medio M 50%.....	29
Figura 5. Crecimiento de cepas nativas en diluciones en gotas	31
Figura 6. Producción de hidrógeno en mucílago al 50%.....	32
Figura 7. Desplazamiento alcalino	33
Figura 8. pH	34
Figura 9. Azúcares reductores	35

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Medios formulados a base de mucílago.....	23
Tabla 2. Azúcares reductores en mucílago.....	26
Tabla 3. Formulación del medio.....	28
Tabla 4. Crecimiento de bacterias nativas en medio mucílago diluido al 50%.....	28
Tabla 5. Resultados de crecimiento de las cepas en mucílago 50% en condiciones anaerobias	30

LISTA DE ANEXOS

	Pag.
Anexo A. Cepas nativas de actinomycetos del cepario del CINBIN.....	46
Anexo B. Medición de azúcares reductores mediante prueba de Miller (DNS)	47
Anexo C. Ilustraciones referentes a la medición de pH, desplazamiento alcalino y Grados Brix.	48

RESUMEN

TITULO: Estudio preliminar para la producción bacteriana de hidrógeno a partir de mucílago de café de la región los santos, Santander*

AUTORES: Carlos Esteban González Villalobos**
Yesenia Lizeth Piedrahita Vásquez

PALABRAS CLAVE: Actinobacteria, Bioenergía, Hidrógeno, Mucílago, Café.

En la industria cafetera de la región, el beneficio del café se hace por vía húmeda, generando una corriente líquida de mucílago como subproducto residual. Debido a su acidez y contenido de materia orgánica, el mucílago de café genera problemas ambientales cuando es vertido en fuentes hídricas. El mucílago del café presenta un alto contenido de pectinas y azúcares que lo convierten en un sustrato potencial para el crecimiento de microorganismos para la producción de biocombustibles como lo es el hidrógeno. El presente trabajo tiene como objetivo identificar cepas nativas productoras de hidrógeno a partir de mucílago de café, utilizando métodos de caracterización fisicoquímica de mucílago de café, obtenido de una planta de beneficio de café orgánico, determinándose el contenido de azúcares reductores (ART), contenido de sólidos disueltos y pH. Previamente, a partir de 'agua-miel' residual de la planta de beneficio se aislaron varias cepas de Actinobacterias en medio (CYC) suplementado con 50 µg/ml de nistatina. El crecimiento en medio sólido de estas cepas fue evaluado cualitativamente empleando diferentes formulaciones de 'medio mucílago' (mucílago de café y (NH₄)₂SO₄), y se seleccionó la formulación mucílago en dilución al 50% el cual logró el mejor crecimiento de las cepas analizadas con un contenido de 11 g/L de ART. Para las cepas que presentaron mejor crecimiento en dicho medio a base de mucílago, la producción de gas hidrógeno fue evaluada por medio del equipo de medición Crowcon T3 (Detector multigas personal). Las actinobacterias que mejor crecieron en este medio corresponden a los géneros Streptomyces y Arthrobacter. Las cepas M5, M8, M9, M13, M14 y C12, produjeron hidrógeno en condiciones anaerobias desplazando 1,7ml, 1,7ml, 1,5ml, 0,7ml, 0,7ml y 4ml respectivamente. Como conclusión se identificaron actinomycetos nativos capaces de generar hidrógeno a partir de mucílago de café.

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

SUMMARY

TITLE: Preliminary study for the bacterial production of hydrogen from coffee mucilage from Santos, Santander *

AUTHORS: Mr. Carlos Esteban Gonzalez Villalobos **
Ms. Yesenia Lizeth Piedrahita Vásquez **

KEY WORDS: Actinobacteria, Bioenergy, Hydrogen, Mucilage, Coffee.

CONTENT:

In the coffee industry of the region, the benefit from coffee is done by humid procedure, generating a liquid flow of mucilage as residual derivative. Due to its acidity and the content of organic substance, the coffee mucilage creates environmental problems when it is poured over hydrological springs. The coffee mucilage has high content of pectins and sugars that turn it into a potential substratum for the growth of microorganisms for the production of biofuels such as the hydrogen. The current job has as an objective to identify native strains that produce hydrogen from coffee mucilage, using methods of characterization Physicochemical of coffee mucilage, this coffee mucilage had been obtained from a plant of the organic coffee benefit (the oak), so in this way the content of reducing sugars (ART), the content of dissolved solid and the pH has been determined. Previously, from residual 'mead' of the plant of benefit were isolated some actinobacterias strains in the environment (CYC) with 50 µg/ml of nystatin. The solid growing of these strains was evaluated qualitatively using different formulation of "mucilage-environment" (coffee mucilage and (NH₄)₂SO₄), and was selected the mucilage formulation in dilution of 50%, which achieved the greatest growing in the analyzed strains with a content of 11 g/L of ART. For the strains that had greatest growing in the environment based on mucilage, the production of hydrogen gas was evaluated by means of the measurement equipment Crowcon T3 (personal multigas detector). We obtained as a result that the formulation of the environment based on mucilage with which the best growth of the actinobacterias was achieved contains 11 g/L of ART without the need to provide additional supplement. The actinobacterias that best grew were from the type Streptomyces and Arthrobacter. The strains, M5, M8, M9, M13, M14 y C12 produced hydrogen in anaerobic conditions moving 1,7ml, 1,7ml, 1,5ml, 0,7ml, 0,7ml and 4ml respectively. As a conclusion, were identified native actinomycetes capable of generate hydrogen from coffee mucilage.

* Trabajo de grado

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

INTRODUCCIÓN

Los requerimientos energéticos, generación de gases de efecto invernadero y residuos aumentan con la población mundial, exponiendo la preocupación por temas de abastecimiento energético y el manejo de residuos. Con la finalidad de proponer soluciones ambientalmente amigables, se desarrollan al rededor del mundo investigaciones enfocadas en: el uso racional de los recursos, los análisis de ciclo de vida, y como lo expone el presente trabajo: las fuentes de energía renovable, el aprovechamiento de los residuos.

El empleo del hidrógeno como combustible es uno de los principales intereses debido a que puede quemarse directamente sin generar emisiones de gases contaminantes o usarse para la producción de electricidad en celdas de combustible. Además es el combustible con mayor poder calorífico superior (141,8 MJ/kg), aproximadamente 3 veces mayor que el de la gasolina (47,3 MJ/kg) [1]. Sin embargo, el uso masivo del hidrógeno se encuentra limitado por razones como lo son: altos costos de producción, desafíos para su implementación a gran escala, impacto ambiental asociado a los procesos de producción, entre otros [2].

Una posible alternativa ambientalmente amigable es la producción de hidrógeno por organismos vivos a partir de sustratos residuales como los desechos orgánicos de procesos agroindustriales para el presente trabajo, el proceso del beneficio del café.

Producción de café en Colombia: Colombia es el segundo exportador de café más grande del mundo. El beneficio del café se hace tradicionalmente por vía húmeda, lo que genera que el café colombiano tenga muy buenas propiedades en cuanto a calidad. Según indica la Federación Nacional de Cafeteros la zona

cafetera en el país abarca 3'050.141 hectáreas, con un área de café de 874.000 hectáreas, la producción anual es aproximadamente 12,1 millones de sacos de 60 kg anuales. Este producto le aporta al PIB agropecuario cerca del 12,4% [3].

El fruto de café (Figura 1) consiste en un grano al que se adhieren dos finas capas desde el interior hacia el exterior. Envolviendo la semilla se encuentra la piel de plata o plateada (3), seguida por otra llamada pergamino o endocarpio (4) y posteriormente está una capa más gruesa y esponjosa llamada mucílago (5) y por último, se encuentra la pulpa o mesocarpio (6) y la piel exterior o pericarpio (7) [4].

Figura 1. Estructura del fruto y del grano de un cafeto.



Fuente: TÉLLEZ REYES, Sayana y VEGA BUITRAGO, Jennifer, 2012

Solamente se utiliza el 9.5% del peso del fruto fresco en la preparación de la bebida, el 90.5% queda en forma de residuo [3]. Entre ellos se encuentra las aguas mieles, la pulpa y el mucílago, los cuales cuando son vertidos a las fuentes hídricas, ocasionan contaminación por cambios en el agua a nivel físico-químico y biológico [5].

Mucílago del café: El mucílago es una capa de aproximadamente 0,5 a 2 mm de espesor que está fuertemente adherida a la cáscara del grano de café, desde el punto de vista físico, el mucílago es un sistema coloidal líquido, estable en solución, siendo por lo tanto un hidrogel. Químicamente, posee 35,8% de sustancias pépticas, el 17% está representado por celulosa y ceniza y el 45,8% son azúcares. Se resalta la presencia de K, Ca, Mg y P [6] [7]. El mucílago se genera en la etapa del desmucilaginado, se remueve por fermentación natural o mecánicamente, y es necesario lavar el café para retirarlo, fluyendo de esta etapa lo que se denomina agua residual de lavado. La contaminación producida en la fermentación natural es de "30 g de demanda química de oxígeno (DQO) por kg de café cereza, la cual representa $\frac{1}{4}$ de la contaminación potencial generada por el beneficio húmedo del café". Por cada millón de sacos de 60 kg de café que Colombia exporta se genera aproximadamente 55.500 toneladas de mucílago fresco, que de tener un manejo inadecuado, la contaminación se asemeja a excretas de orina de una población de 310.000 habitantes por año [8].

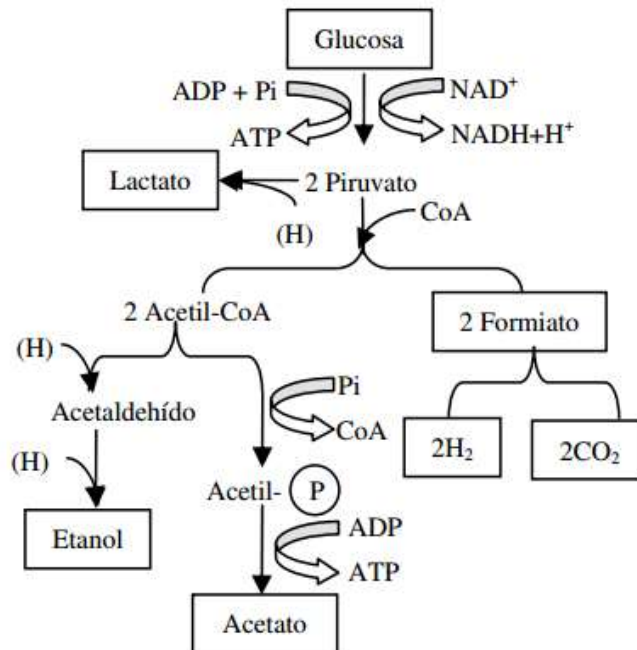
El principio de degradación que se desarrolla en el presente trabajo se fundamenta en la fermentación oscura [9].

Fermentación oscura: Consiste en la degradación de sustratos ricos en carbohidratos obteniendo como producto principal hidrógeno y como subproductos etanol, acetato, lactato, succinato, entre otros [10]. Este tipo de fermentaciones se llevan a cabo a diferentes temperaturas, desde mesófilas (25- 40°C), hasta termófilas (> 50°C), produciéndose biogás que contiene H₂, CO₂, CO, H₂S y, si las bacterias son metanogénicas CH₄.

La siguiente figura representa la ruta metabólica para la producción de hidrógeno por parte de microorganismos anaerobios facultativos. La formación de hidrógeno se lleva a cabo a partir de la hidrólisis de sustratos complejos en sustancias más simples, entre ellos la glucosa, por bacterias fermentativas hidrolíticas. En este

punto se desarrolla una serie de reacciones enzimáticas donde la glucosa es convertida a través de la vía metabólica de la glucólisis también conocida como vía Embden-Meyer-Parnas (EMP) al ácido pirúvico [11][12].

Figura 2. Generación de hidrógeno con producción simultánea de acetato, etanol, lactato y formiato a través de la ruta de la glucólisis.



Fuente: BLANCO, Sergio y RODRÍGUEZ, Tatiana, 2012

Se presenta mejor producción de hidrógeno con pH ácido (obedeciendo a las etapas de acidogénesis y acetogénesis de la fermentación) y presiones parciales de hidrógeno bajas [9].

En el presente trabajo se desarrolló un estudio preliminar para la producción de hidrógeno por organismos nativos aislados de sitios de tratamiento de residuos del proceso del beneficio del café en una hacienda cafetera de Los Santos, Santander (Coordenadas 6°56'29"N 73°02'11"O, Altitud 2428 msnm, Cordillera Oriental, Andes).

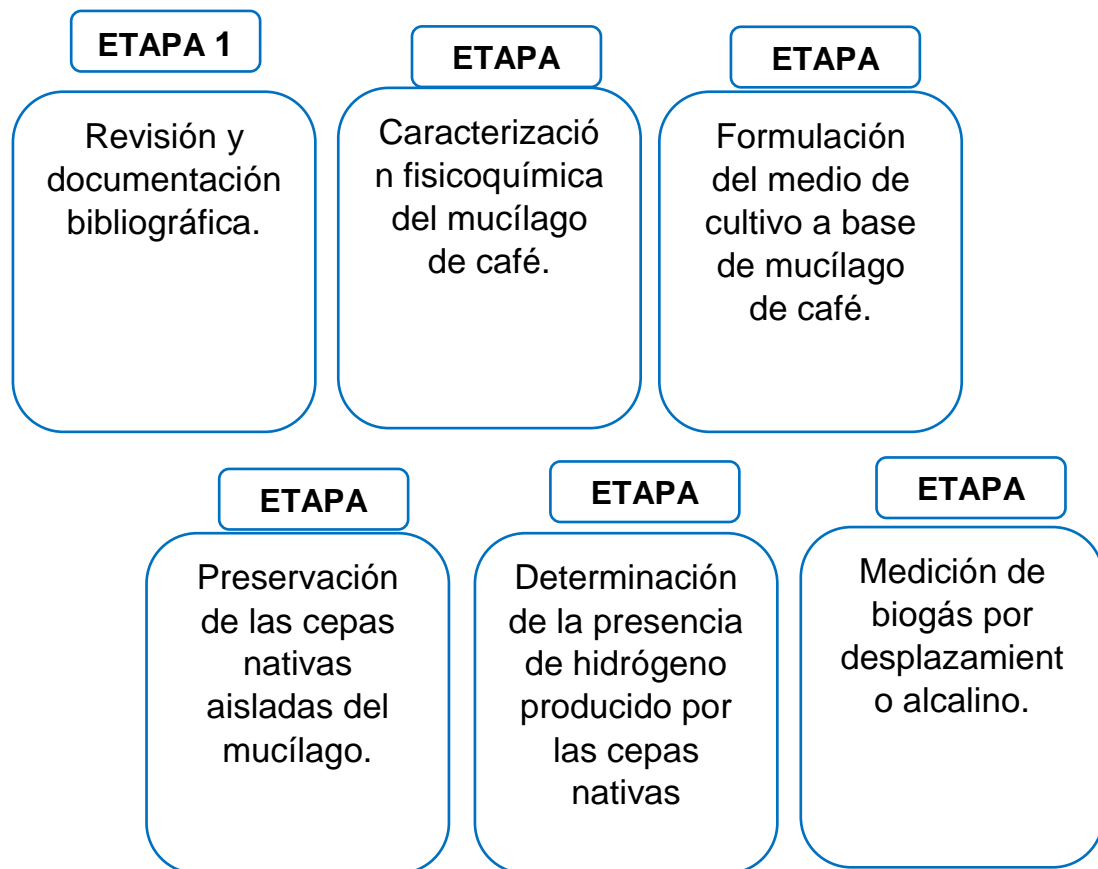
Tiene como objetivos: Formular un medio a base de mucílago de café, que funcione de manera adecuada como sustrato para bacterias nativas; Segundo: conocer cualitativamente la detección de hidrogeno y desplazamiento alcalino que las bacterias puedan generar a partir del medio formulado, para de esta manera seleccionar, del total bacterias, algunas como posibles productoras de hidrogeno: Tercero: Evaluar el comportamiento de las bacterias con respecto a un control positivo; Cuarto: Evaluar el principio de fermentación oscura como una alternativa al tratamiento de residuos orgánicos agroindustriales, en este caso para la producción de biohidrógeno.

Este trabajo de grado hace parte del proyecto VIE 1334 “Aislamiento y caracterización de cepas nativas de actinomicetos para la producción de hidrógeno a partir de mucílago de café”. El aislamiento y caracterización de las cepas nativas corresponden a trabajos de grado que están siendo desarrollados por estudiantes de biología. El presente trabajo de grado buscó definir las condiciones de cultivo para la producción de hidrógeno a partir de mucílago de café y realizar una evaluación inicial de la producción de hidrógeno de las cepas de actinomicetos aislados por los estudiantes de biología.

1. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA

En la Figura 3 se muestra en forma de esquema cada una de las etapas que se tuvieron en cuenta como metodología para la obtención de hidrógeno.

Figura 3. Metodología experimental para el proceso obtención de hidrógeno



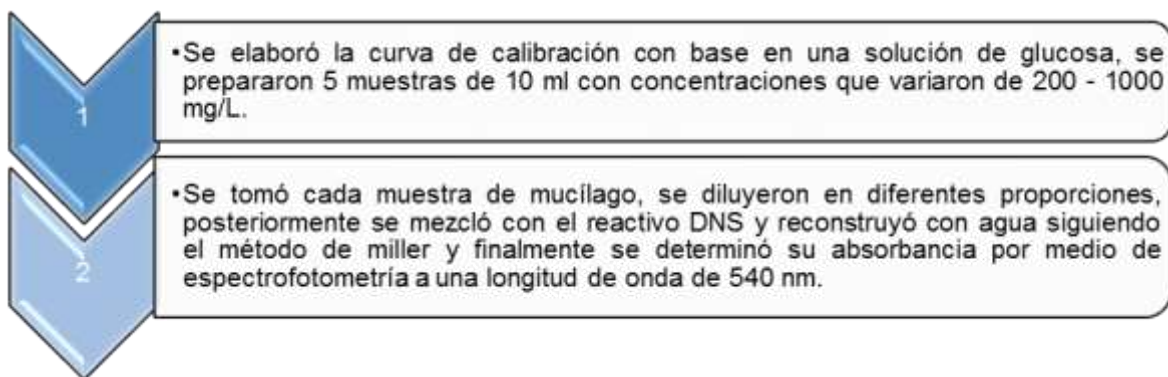
1.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

El mucílago de café obtenido durante el proceso de beneficio de café de la en Los Santos – Santander, se utilizó como sustrato para la realización de las pruebas experimentales. Al mucílago de café recolectado se le realizó una caracterización fisicoquímica: determinación de pH, contenido de azúcares y sólidos totales. A la muestra de mucílago de café se le determinó el pH, esta medición se realizó por triplicado con el equipo Orion 3 Star previamente calibrado.

1.1.1 Cuantificación de contenido de azúcares en el mucílago. Se determinó por el método colorimétrico del ácido 3,5 dinitro-salicílico (DNS) de Miller, que consiste en una reacción redox entre el reactivo DNS y los azúcares reductores contenidos en la muestra [14]. En la búsqueda de aplicabilidad y máximo aprovechamiento del mucílago como sustrato se usaron muestras de configuración:

- Mucílago no licuado, tamizado y diluido en agua en proporción 1 a 1.
- Mucílago licuado, tamizado y diluido en agua en proporción 1 a 1.
- Muestras derivadas de los sólidos restantes durante el proceso de tamizado del mucílago, licuados con 100 ml de agua y tamizado.

Donde se usaron mallas de 850, 450 y 150 micrómetros (No. 20, 40 y 100 respectivamente) en serie para tamizar y una licuadora comercial Oster, licuando por 2 minutos las muestras. Para determinar la concentración de azúcares reductores de las muestras, se realizó el siguiente proceso con al menos dos réplicas:



Se hizo una comparación del contenido de azúcares presentes en cada muestra y el gasto energético requerido en cada proceso, para así escoger el tratamiento ideal a utilizar durante la realización de la investigación y las siguientes caracterizaciones.

1.1.2 Sólidos suspendidos. El mucílago una vez tamizado y diluido en agua 1:1, se realizó la medición de sólidos totales. Los sólidos totales son el total entre la suma entre los sólidos disueltos y los sólidos suspendidos. Para la medición de los sólidos suspendidos se pesaron 6 tubos Ependorff (capacidad de 1,5 ml), y se centrifugó 1 ml de la muestra de mucílago a 10.000 revoluciones por 5 minutos y finalmente un calentamiento de las muestras por 24 horas para completar el secado [20].

1.2 FORMULACIÓN DEL MEDIO

Se hizo una evaluación cualitativa del crecimiento de diferentes cepas bacterianas, entre las que se encuentran: *Bacillus subtilis* (Bsub), *Bacillus circulans* (Bcirc), *Rhizobium meliloti* (Rmel), *Burkholderia cepacia* (Bcep), *Pseudomonas putida* (Pput) y Actinomycetos nativos, en distintas configuraciones de medios de cultivo sólido a base de mucílago de café. Las configuraciones de medios de cultivo se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 1. Medios formulados a base de mucílago.

CONFIGURACIONES DE MEDIO	ABREVIATURA
Mucílago tamizado con malla de 150 micrómetros	M Puro
Mucílago tamizado con malla de 150 micrómetros + (0,3g/ml) sulfato de amonio[15]	M Puro + Amonio
Mucílago tamizado con malla de 150 micrómetros y diluido al 50% + (0,3g/ml) sulfato de amonio[15]	M 50% + Amonio
Mucílago tamizado con malla de 150 micrómetros y diluido al 50%	M 50%

Durante 10 días, se analizó el crecimiento de estas cepas a través de una inspección visual, donde se observó el tiempo que necesitaban para crecer y la proporción cualitativa de crecimiento de las cepas [15].

1.3 CONSERVACIÓN CEPAS NATIVAS

En esta etapa se trabajó con la totalidad las cepas nativas disponibles (26) (Anexo A), las cuales fueron aisladas en un medio selectivo para actinomicetos provenientes de laguna de tratamiento de aguas residuales con mucílago, obtenidas del beneficio del café; estas cepas hacen parte del cepario estudiado por el Centro de Investigación en Biotecnología Industrial y Biotecnología Molecular – CINBIN, localizado en el parque tecnológico de Guatiguará. La preservación de las cepas, se realizó en el medio agar CYC pH 7.0 (agar czapek-dox- extracto de levadura- cas aminoácidos) [16]. Se inocularon las cepas en cajas Petri, posteriormente fueron envueltas en bolsas de ziploc y conservadas a temperatura ambiente (+/- 25°C), condición requerida por las cepas para su óptimo crecimiento [17].

1.4 DETECCIÓN DE HIDRÓGENO

Con el fin de determinar la presencia de hidrógeno producido por las cepas bacterianas nativas (Anexo A), se llevó a cabo un precultivo de las cepas en medio líquido CYC pH 7.0. Las muestras se agitaron por un periodo de un día, posteriormente fueron inoculadas en viales de 10 ml sellados con agrafes de aluminio de 20 mm de diámetro y tapones de caucho butílico, rellenos con 5 ml de medio líquido mucílago al 50%, purgados con nitrógeno durante 4 minutos para garantizar la anaerobiosis [23]. Finalmente, después de transcurridos 6 días [26] se realizó la medición de presencia de hidrógeno en los viales con el equipo CROWCON T3 con un Rango de 0-4 % máx. En medición (LEL) [19]. Para esta y las siguientes pruebas se escogió como control positivo la bacteria *Escherichia coli* por ser conocida como una especie productora de hidrógeno [21] [22] y como control negativo el mucílago sin inocular.

1.5 DESPLAZAMIENTO ALCALINO

En esta etapa mediante el método desplazamiento de líquido de una solución alcalina se determinó el contenido de biogás producido en los viales; la solución alcalina (NaOH 0,1 N) se encargó de absorber el CO₂ producido, permitiendo sólo la medición de biogás [27]. Se dispuso de viales que contenían el medio seleccionado, debidamente purgado, en el cual se inocularon las cepas a evaluar [23]. Finalmente después de 6 días de crecimiento [26] se realizó el desplazamiento para la medición de biogás producido bajo el montaje ilustrado en la Anexo C.

1.6 CRECIMIENTO BACTERIANO

Se realizaron diluciones seriadas para observar el crecimiento de las bacterias de forma cualitativa. Se tomaron los cultivos después 6 días de crecimiento [26] en los viales con sustrato mucílago tamizado al 50%, y luego de la medición de hidrógeno, desplazamiento alcalino y pH, se sacaron diluciones de 10^{-1} a 10^{-6} y se sembraron en cajas de Petri con medio czapek dox agar [24].

2. RESULTADOS Y ANÁLISIS

2.1 CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

La curva de calibración con glucosa bajo el método de Miller se encuentra en el anexo B. Con los datos de la calibración se relacionan las muestras referentes a mucílago con diferentes tipos de procesamiento como lo muestra la Tabla 2.

Tabla 2. Azúcares reductores en mucílago.

MUESTRA	PROMEDIO (gr AR / L MUCÍLAGO)
Mucílago tamizado y diluido en agua en proporción 1:1	34 ± 1
Mucílago licuado, tamizado y diluido en agua en proporción 1:1	35 ± 1
Muestras derivadas de los sólidos restantes durante el proceso de tamizado, licuados con el mismo volumen de agua y tamizados nuevamente	1 ± 0,1

Se encontró que las muestras de mucílago no licuado, tamizado y diluido en proporción 1:1 tienen 34 ± 1 g de AR/L (gramo de azúcares reductores contenidos en un litro de muestra), siendo este un buen valor para el crecimiento de bacterias [25]. Por lo tanto se escogió este procesamiento del mucílago para el resto del trabajo. A pesar de que las muestras de mucílago licuado tienen un valor cercano, no es atractiva por el gasto energético. En cuanto a las muestras derivadas de los sólidos restantes durante el proceso de tamizado, se encuentra que no disuelven una cantidad significativa de azúcares reductores en la solución de muestra.

2.2 MEDICIÓN DE SÓLIDOS SUSPENDIDOS

Mediante el uso de la siguiente ecuación, se hicieron los cálculos correspondientes a la medición de sólidos suspendidos en el mucílago:

$$\text{Concentración de sólidos suspendidos (mg/ml)} = \frac{(A - B) \times 1000}{\text{Vol (ml)}}$$

Dónde:

A = Peso del residuo seco más Ependorff en mg
B = Peso del Ependorff en mg
Vol. (ml) = Volumen de muestra (ml de la muestra)

El mucílago tiene un contenido de sólidos suspendidos de 0,0121 mg de sólidos suspendidos / ml muestra de mucílago.

2.3 MEDICIÓN DE pH

Para la medición del pH, se tomaron 3 mediciones a la muestra mucílago al 50% y se promediaron estos valores, obteniendo un pH de $5,4 \pm 0.01$.

2.4 FORMULACIÓN DEL MEDIO

Se propuso cuatro tipos de medios, con el fin de evaluar el comportamiento de algunas cepas conocidas y cepas provenientes del mucílago y generar el medio adecuado para el crecimiento de las mismas como se muestra a continuación.

Se observó que el medio mucílago al 50% fue el más adecuado para las bacterias nativas, posteriormente se realizó una segunda evaluación cualitativa del crecimiento en mucílago diluido al 50 %, como sustrato sólido para las cepas nativas provenientes de la laguna de tratamiento de mucílago (Tabla 4).

Tabla 3. Formulación del medio.

Medio	USO	Mucílago (ml)	Agua (ml)	Agar (g)	Sulfato de amonio (g)	Resultado
M Puro	Bsub, Bcirc, Rmel, Bcep, Pput + 2 nativas	30	0	0,45	0	Ninguna crece de forma satisfactoria, contaminación localizada
M 50%	Bsub, Bcirc, Rmel, Bcep, Pput + 2 nativas	15	15	0,45	0	Crece de manera satisfactoria una de las bacterias nativas (MFSR11)
M Puro + Amonio	Bsub, Bcirc, Rmel, Bcep, Pput + 2 nativas	30	0	0,45	0,03	Ninguna crece de forma satisfactoria
M Puro + Amonio	Bsub, Bcirc, Rmel, Bcep y Pput	30	0	0,45	0,03	Se evidencia crecimiento leve de <i>Pseudomonas putida</i>
M Puro	Bsub, Bcirc, Rmel, Bcep y Pput	30	0	0,45	0	Se evidencia crecimiento leve de <i>Pseudomonas putida</i>
M 50% + Amonio	Bsub, Bcirc, Rmel, Bcep y Pput	15	15	0,45	0,03	Se evidencia crecimiento leve de <i>Pseudomonas putida</i>
M 50%	Bsub, Bcirc, Rmel, Bcep y Pput	15	15	0,45	0	Se evidencia crecimiento leve de <i>Pseudomonas putida</i>
M Puro	4 Nativas	30	0	0,45	0	Evidencia crecimiento de MFSR10 y MFSR11
M Puro + Amonio	4 Nativas	30	0	0,45	0,03	Crecimiento leve de MFSR10 y MFSR11
M 50%	4 Nativas	15	15	0,45	0	Crecimiento satisfactorio de MFSR10 y MFSR11

Tabla 4. Crecimiento de bacterias nativas en medio mucílago diluido al 50%.

Codigo	Día 1		Día 2		Día 4		Día 6	
MFSR1	0	0	0	0	0	0	0	0
MFSR2	2	2	3	3	3	3	3	3
MFSR3	1	0	2	1	2	1	3	1
MFSR4	0	0	1	1	1	1	1	1
MFSR5	1	1	1	1	2	2	3	3
MFSR7	0	1	1	1	2	1	2	2
MFSR8	0	0	0	0	0	0	0	0
MFSR9	1	1	3	3	3	3	3	3
MFSR10	2	2	3	3	3	3	3	3
MFSR11	2	2	2	2	3	3	3	3
MFSR13	1	1	2	2	3	3	3	3
MFSR14	1	1	1	1	0	0	0	0
MFSR15	0	0	0	0	0	0	0	0
MFSR18	2	2	3	3	3	3	3	3
MFSR19	0	0	1	1	2	2	3	3
MFSR20	2	2	3	3	3	3	3	3
MFSR21	0	0	1	1	1	1	2	2

Nota: Las mediciones indican: 0 (no crece), 1 (Crecimiento leve), 2 (Crecimiento medio), y 3 (Crecimiento satisfactorio) .Las dos medidas por fecha indican el original y duplicado. Esta fue una escala cualitativa que se decide usar como referencia.

La figura 4 muestra bacterias nativas creciendo en el medio M 50% (Mucílago en dilución al 50%).

Figura 4. Crecimiento de algunas cepas nativas en el medio M 50%.



Se evidenció que las bacterias MFSR1, MFSR4, MFSR8, MFSR14 y MFSR15 no crecieron de manera satisfactoria en la configuración de mucílago como medio sólido en solución al 50%, sin embargo el 70% de las cepas evaluadas (12 cepas), crecieron de manera satisfactoria.

2.5 FERMENTACIÓN DE MUCÍLAGO EN CULTIVOS ANAEROBIOS

2.5.1 Crecimiento. Como evidencia de crecimiento, luego de 6 días de haber sido inoculadas y estar bajo agitación constante, se hicieron diluciones en forma seriada en factores de 10 desde 10^{-1} hasta 10^{-6} , entre más concentrada la muestra, se da crecimiento en las muestras de mayor dilución, se sembró en medio CYC sólido en forma de gotas cada una de las muestras como se indica en la (Figura 5), los resultados de crecimiento se muestran en la Tabla 5, donde “0” indica que la bacteria no creció, “1” que la bacteria creció hasta 10^{-1} , “2” que la bacteria creció hasta 10^{-2} , “3” que la bacteria creció hasta 10^{-3} , “4” que la bacteria creció hasta 10^{-4} , “5” que la bacteria creció hasta 10^{-5} y “6” que la bacteria creció hasta 10^{-6} .

Tabla 5. Resultados de crecimiento de las cepas en mucílago 50% en condiciones anaerobias

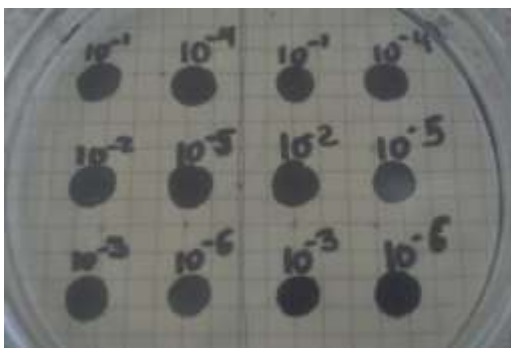
Código	C+	C	MFSR1	MFSR2	MFSR3	MFSR4	MFSR5	MFSR7	MFSR8	MFSR9	MFSR10	MFSR11	MFSR13	MFSR14	MFSR16	MFSR17	MFSR18	MFSR19	MFSR20	ACPG5	ACPG9	ACPG11	ACPG12	ACPG14	ACPG15	ACPG16	ACPG17	ACPG20
Crecimiento	3	0	0	3	0	2	4	6	6	4	3	5	4	3	0	0	0	0	1	0	3	4	5	0	6	2	5	6

Se optó por este sistema de medición del crecimiento debido a dificultades en la medición de número de colonias por a la naturaleza de las mismas cepas, ya que algunas crecen en formas de masas diferentes, o generan capas de humedad alrededor que no permiten el conteo. La Figura 5 nos muestra la forma en como crecieron las bacterias con duplicado en el mismo plato de medio CYC, mediante las diluciones, encontrando como en el control negativo no hay presencia de bacterias y en las demás imágenes si lo hay.

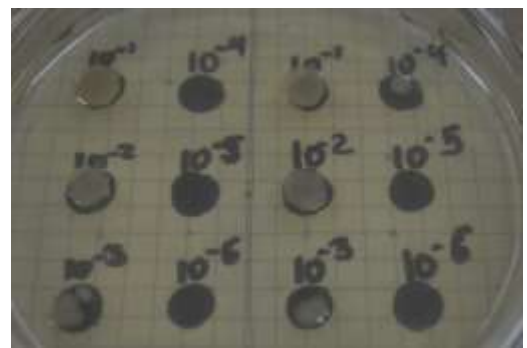
En la etapa de crecimiento se encuentra que las bacterias MFSR1, MFSR3, MFSR 16, MFSR17, MFSR18, MFSR19 y ACPG5 y ACPG14 no crecieron, y que las

bacterias que mejor desempeño en su crecimiento tuvieron fueron MFSR5, MFSR7, MFSR8, MFSR9, MFSR11, MFSR13 y ACPG12, ACPG15, ACPG17 y ACPG20. Esto se puede considerar principalmente debido a su capacidad de metabolizar los sustratos complejos del mucílago y la presencia de enzimas hidrolíticas para degradar a ácidos láctico, péptico y demás ácidos presentes.

Figura 5. Crecimiento de cepas nativas en diluciones en gotas



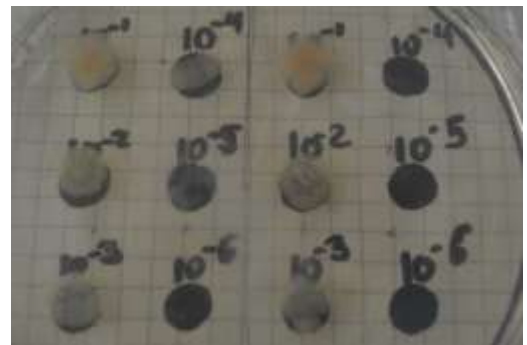
Control -



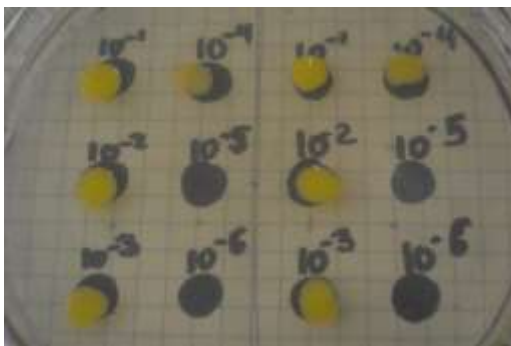
E. coli (Control +)



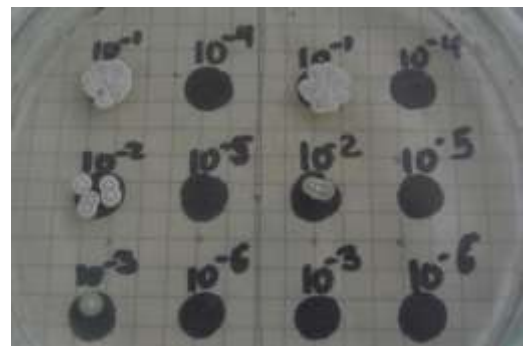
MFSR7



MFSR8



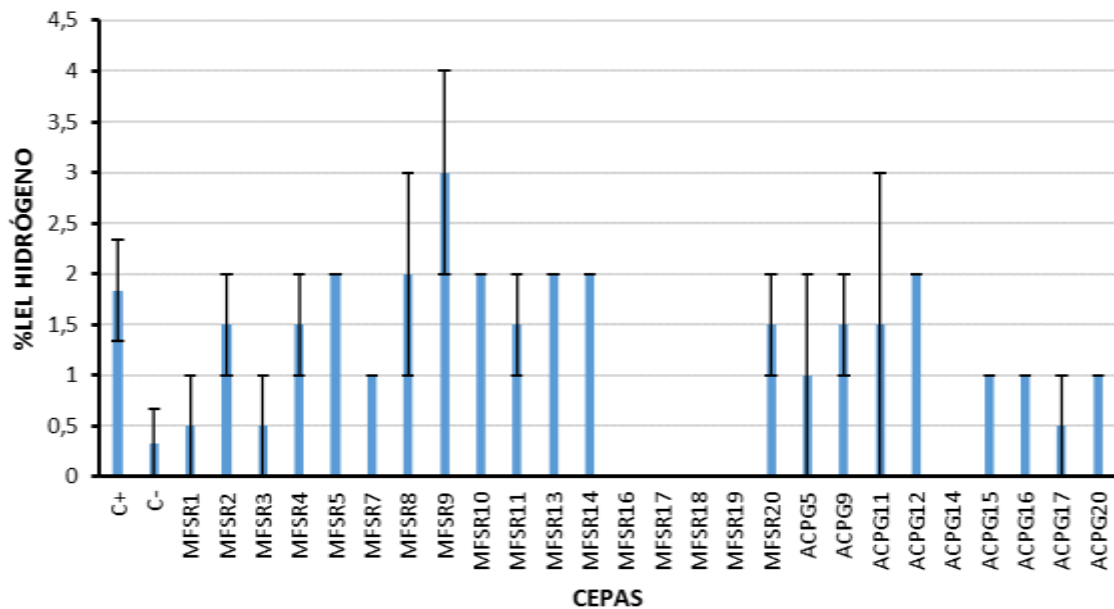
MFSR13



MFSR14

2.5.2 Producción de H₂. Las mediciones de hidrógeno y oxígeno, se hicieron con el equipo TETRA 3 Detector multigas personal CROWCON, considerando como relevantes las mediciones de hidrógeno mayores a 1,5 %LEL (Lower Explosive Limit o límite inferior de explosividad que se refiere a la cantidad mínima de gas requerida para combustión). Los resultados se ilustran en la Figura 6.

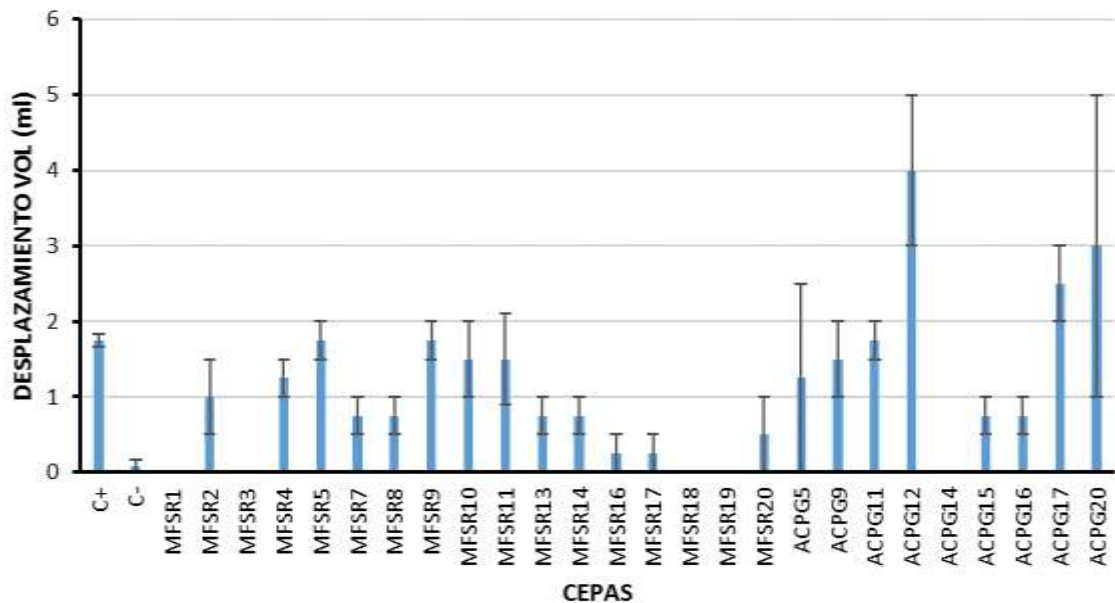
Figura 6. Producción de hidrógeno en mucílago al 50%



Se encuentra que las bacterias nativas presentan un mejor comportamiento en la degradación del sustrato que el *E.coli* (Control +), esto debido a que las bacterias nativas al ser aisladas de sitios expuestos al mucílago están adaptadas a la utilización de este sustrato. Resaltan como posibles bacterias productoras de hidrógeno las cepas MFSR5, MFSR8, MFSR9, MFSR10, MFSR13, MFSR14 y ACPG12.

2.5.3 Volumen desplazado. El desplazamiento alcalino es el método utilizado para la medición de volumen, esta medición se da por duplicado inmediatamente con viales replica diferentes a los de medición de hidrógeno. Se toman como valores relevantes los superiores a 1,5 ml. Los resultados se ilustran en la figura 7.

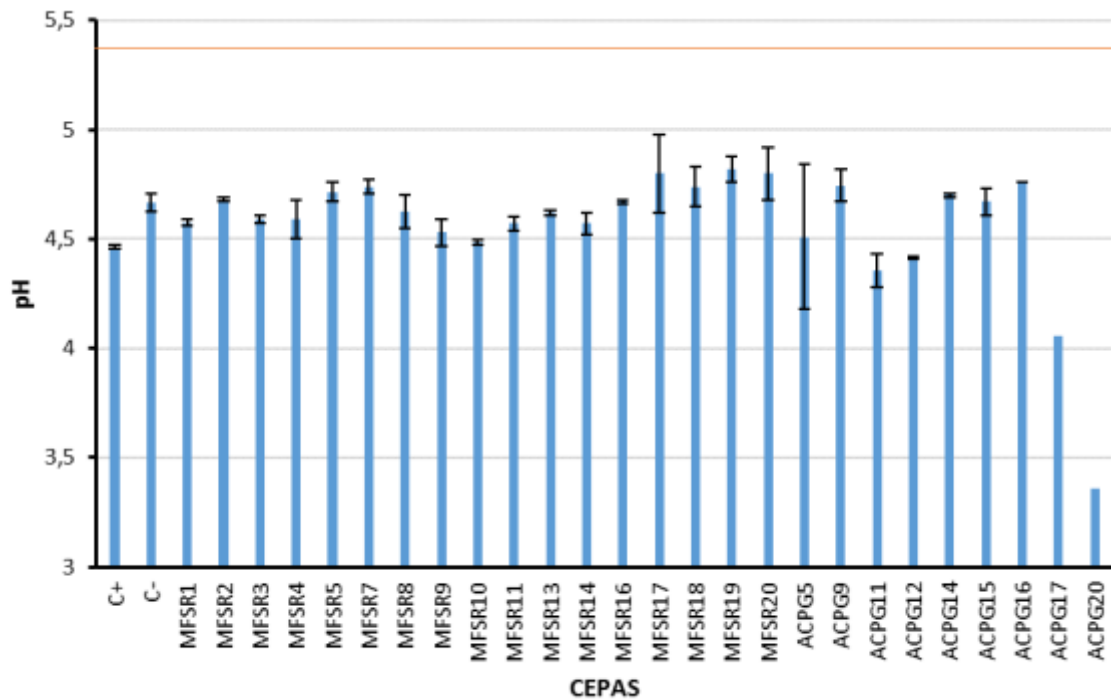
Figura 7. Desplazamiento alcalino



Se encuentra que las bacterias que desplazaron la mayor cantidad de gas son MFSR5, MFSR9, MFSR10, MFSR11, y ACPG9, ACPG11, ACPG12, ACPG17 y ACPG20. Sin embargo se considera que el volumen desplazado puede contener, además de hidrógeno, metano. Se comparan las bacterias que mejor desempeño en desplazamiento de volumen y %LEL de hidrógeno presentaron, obteniendo como posibles mejores bacterias productoras de hidrógeno las MFSR5, MFSR9, MFSR10 y ACPG12.

2.5.4 pH. La medición de pH se da por duplicado inmediatamente después de la medición de hidrógeno y dilución para crecimiento. Se realiza con el equipo Orion 3 Star (Anexo C). Los resultados se ilustran en la siguiente Figura 8.

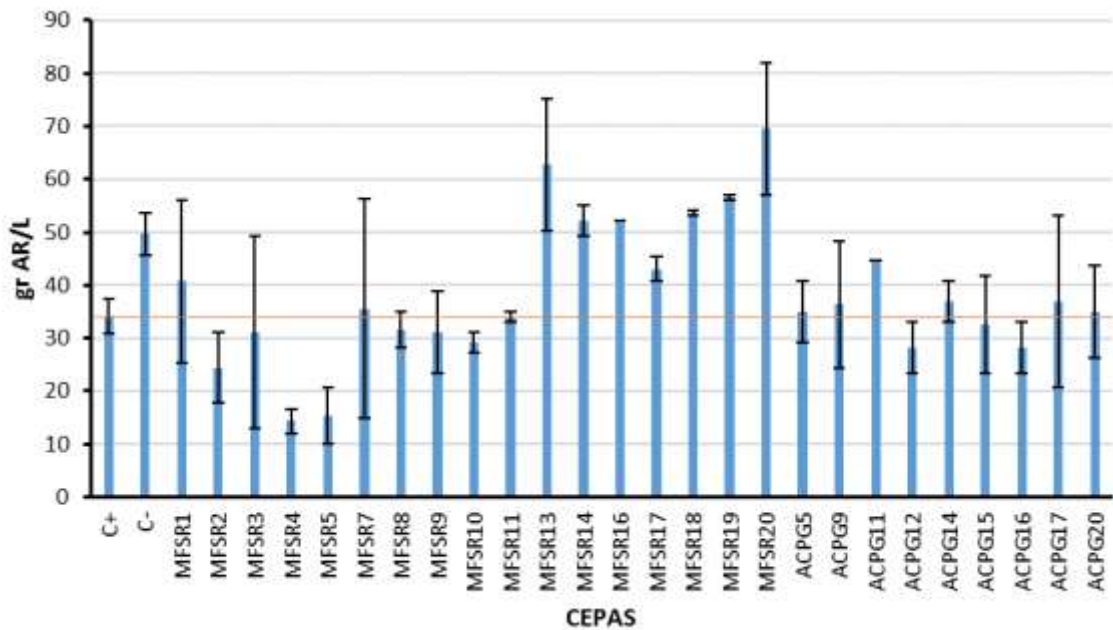
Figura 8. pH



En la Figura 8 se presenta como valor de pH inicial 5,4 (Línea roja) de forma que se evidencia que en promedio el medio mucílago tiende a la acidez después de la prueba, con lo que podemos inferir la producción de ácidos orgánicos por parte de las bacterias durante su proceso de fermentación [13], los cuales son otros productos de las rutas metabólicas de fermentación en las que se sintetiza el hidrógeno.

2.5.5 Azúcares reductores. Los azúcares reductores fueron medidos mediante el método de Miller [14] para cada una de las cepas por duplicado. Los resultados encontrados se ilustran mediante la Figura 9.

Figura 9. Azucares reductores



Se tiene como valor inicial 34 gr AR/L (gramos de azúcares contenidos por litro de muestra) (Línea roja), los valores encontrados después del crecimiento de las cepas, oscilan en rangos superiores a los AR (azúcares reductores) iniciales, puede ser debido a que las cepas nativas produzcan enzimas hidrolíticas que aumenten la disponibilidad de azúcares reductores.

3. CONCLUSIONES

- Se demostró que el medio mucílago diluido al 50%, se comporta de manera adecuada como sustrato de bacterias nativas, sin necesidad de la adición de otras sustancias como fuentes de nutrientes.
- Se detectó hidrógeno y desplazamiento alcalino de manera significativa por parte de las bacterias nativas MFSR9, ACPG12, MFSR5 y MFSR10 (en orden de relevancia), encontrándolas como posibles productoras de hidrógeno.
- Se encuentra que las bacterias nativas presentan un mejor comportamiento en la degradación del sustrato que el E.coli (Control +).
- Se determina que el proceso de fermentación oscura es una alternativa real para el tratamiento de residuos orgánicos agroindustriales, en este caso para la producción de biohidrógeno.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] ARANGO GÓMEZ, Jorge; SIERRA VARGAS, Fabio y SILVA LEAL Vladimir. Análisis exploratorio de investigaciones sobre los motores de combustión interna que trabajan con biogás. En: Revista Tecnura. Enero - marzo de 2014. Vol. 18, no. 39, p. 152 – 164.

[2] VALENCIA BOTERO, Mónica y CARDONA ÁLZATE, Carlos. Análisis del ciclo de vida para la producción de hidrógeno como combustible del futuro. En: Revista Cubana de Química. Mayo/Agosto, 2013. vol. 25 nº 2 p. 165-179.

[3] RODRÍGUEZ, Nelson. Manejo de residuos en la agroindustria cafetera [Online]. En: Biblioteca virtual de desarrollo sostenible y salud ambiental. Seminario internacional gestión integral residuos sólidos peligrosos siglo XXI. Medellín, Colombia. Noviembre, 1999. Disponible en internet: <<http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/acodal/xxx.pdf>> p. 2

[4] TÉLLEZ REYES, Sayana y VEGA BUITRAGO, Jennifer. Digestión anaerobia del mucílago de café utilizando estiércol bovino como inóculo. Trabajo de grado Ingeniero Química. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías físico-químicas. Escuela de ingeniería química, 2012. p. 19

[5] SARASTY ZAMBRANO, Dan. Alternativas de tratamiento del mucílago residual producto del beneficiadero del café. Trabajo de grado Especialista en Química Ambiental. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de química, 2012. p.18

[6] SARASTY ZAMBRANO, Dan. Alternativas de tratamiento del mucílago residual producto del beneficiadero del café. Trabajo de grado Especialista en Química

Ambiental. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de química, 2012. p.11

[7] RESTREPO, Jairo. Caracterización física y química de los frutos del café [Online]. Infocafes, todo café, todo sabor, todo pasión. Disponible en internet: <<http://www.infocafes.com/descargas/biblioteca/90.pdf>> p.4

[8] SARASTY ZAMBRANO, Dan. Alternativas de tratamiento del mucílago residual producto del beneficiadero del café. Trabajo de grado Especialista en Química Ambiental. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de química, 2012. p. 9

[9] BEDOYA, Andrea, et al. Producción biológica de hidrógeno: una aproximación al estado del arte. En: Dyna, Año 75, Nro. 154, ISSN 0012-7353. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Marzo de 2008. p. 137-157
Disponible en Internet:
<<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/dyna/article/view/1723/11614>>
[Citado: Noviembre 15 de 2014] p. 137-157

[10] PERNA Verónica. Producción de biohidrógeno a partir de suero lácteo utilizando un reactor UASB y un reactor de lecho fijo. Trabajo de grado Magíster en Biotecnología. Uruguay, Montevideo: Universidad de la República. Facultad de Ciencias. Escuela de Biotecnología, 2011. p. 15 y 16

[11] OH, You-Kwan., RAJ, Subramanian Mohan., JUNG, Gyoo Yeol., y PAR, Sunghoon. Status of the metabolic engineering of microorganisms for biohydrogen production. *Bioresource Technology* 102 (2011) 8357–8367.

[12] MATHEWS, Juanita y WANG, Guangyi. Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. International journal of hydrogen energy 34 (2009) 7404–7416.

[13] BLANCO, Sergio y RODRÍGUEZ, Tatiana. (2012). Producción de biohidrógeno a partir de residuos mediante fermentación oscura. Ingeniare. Revista chilena de ingeniería, vol. 20 N° 3, 2012, pp. 398-411.

[14] BELLO GIL, Daniel; CARRERA BOCOURT, Emilia y DÍAZ MAQUEIRA Yuset. Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. En: ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, vol. XL, núm. 2, mayo-agosto, 2006, pp. 45-50

[15] A. K. N. FELIX. K. F. CAVALCANTE. I. W. L. FRANCA. D. W. F. OLIVEIRA. V. M. M. MELO. H. B. DE SANTANA, L. R. B. GONCALVES e R. S. DE SANTIAGO-AGUIAR. ESTABILIDADE E PROPRIEDADE EMULSIFICANTE DA SURFACTINA Bacillus subtilis LAMI005. En: XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Septiembre de 2012.

[16] SIGMA-ALDRICH. 70185 Czapek Dox Agar [Online]. [Citado 18 ene, 2015]. Switzerland. p. 75 – 76 Disponible en internet: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Fluka/Usage/70185_czapek_dox_agar.pdf>

[17] SRINIVASAN, M.C.; LAXMAN, R.S. y DESHPANDE, M.V. Physiology and nutritional aspects of actinomycetes: an overview. En: World Journal of Microbiology and Biotechnology 7. Division of Biochemical Sciences, National Chemical Laboratory, Poona-411008, India. Septiembre 1990. p. 171-184

[18] HERNANDEZ PARDO Mario. Hydrogen production from anaerobic co-digestion of coffee mucilage and swine manure. Tesis de grado Doctor en

Ingeniería. Nantes, Francia: Escuela de Minas de Nantes. Colombia: Universidad de los Andes. Noviembre, 2012.

[19] CROWCON Gas Detection you can trust. M07658, Manual de Usuario Tetra 3, Detector multigas personal. Ed 4. 2007. Disponible en internet: <<http://www.crowcon.com/uk/products/portables/tetra-3.html>>

[20] CENTRO DE INVESTIGACIONES HIDRÁULICAS E HIDROTÉCNICAS. Procedimiento para la Medición de Sólidos Totales. Universidad Tecnológica de Panamá, Laboratorio de Sistemas Ambientales. Rv 1. 2006. p. 1-6

[21] MAEDA, Toshinari., SANCHEZ, Viviana y WOOD, Thomas. (2012). Hydrogen production by recombinant *Escherichia coli* strains. *Microbial Biotechnology*. p. 214–225.

[22] MAEDA, Toshinari., SANCHEZ, Viviana y WOOD, Thomas. (2007). Metabolic engineering to enhance bacterial hydrogen production. *Microbial biotechnology*. p. 30-39.

[23] TORRES, Patricia; BARBA, Luz Edith y PIZARRO, Carlos. Mitigación de la toxicidad anaerobia de lixiviados mediante mezclas con agua residual doméstica. *Rev.fac.ing.univ. Antioquia* [online]. 2010, n.53 [cited 2015-01-21], pp. 64-74. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-62302010000300006&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0120-6230.

[24] DI CAPUA Cecilia, BORTOLOTTI Ana, FARÍAS María Eugenia and CORTEZ Néstor. UV-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from Andean wetlands display high catalase activity. In: *FEMS Microbiol Lett* (Federation of European Microbiological Societies). March 2011. no. 317, p. 181–189

[25] FAJARDO, Erika y SARMIENTO Sandra. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de grado Microbiólogo Industrial. Bogotá, D.C. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. p. 63-87

[26] ERAI R. Adolfo y OSPINA C. Nini J. Enriquecimiento de consorcios microbianos nativos para el aislamiento de actinomicetos productores de hidrógeno. Trabajo de grado Ingenieros químicos. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. 2015

[27] TORRES Patricia y PÉREZ Andrés. (2010). Actividad metanogénica específica: una herramienta de control y optimización de sistemas de tratamiento anaerobio de aguas residuales. Revista EIDENAR. Ejemplar 9.

BIBLIOGRAFÍA

ARANGO GÓMEZ, Jorge; SIERRA VARGAS, Fabio y SILVA LEAL Vladimir. Análisis exploratorio de investigaciones sobre los motores de combustión interna que trabajan con biogás. En: Revista Tecnura. Enero - marzo de 2014. Vol. 18, no. 39, p. 152 – 164.

A. K. N. Felix, et al. ESTABILIDADE E PROPRIEDADE EMULSIFICANTE DA SURFACTINA Bacillus subtilis LAMI005. En: XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Septiembre de 2012.

BEDOYA, Andrea, et al. Producción biológica de hidrógeno: una aproximación al estado del arte. En: Dyna, Año 75, Nro. 154, ISSN 0012-7353. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Marzo de 2008. p. 137-157
Disponibile en Internet:
<<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/dyna/article/view/1723/11614>>
[Citado: Noviembre 15 de 2014]

BELLO GIL, Daniel; CARRERA BOCOURT, Emilia y DÍAZ MAQUEIRA Yuset. Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. En: ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, vol. XL, núm. 2, mayo-agosto, 2006, pp. 45-50

CANUL CHAN, Michael. Estudio de los parámetros de operación de un reactor anaerobio para la producción de hidrógeno a partir de residuos orgánicos. Tesis de grados Maestro en Ciencias en Bioprocesos. México D.F: Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. 2010

CENTRO DE INVESTIGACIONES HIDRÁULICAS E HIDROTÉCNICAS. Procedimiento para la Medición de Sólidos Totales. Universidad Tecnológica de Panamá, Laboratorio de Sistemas Ambientales. Rv 1. 2006. p. 1-6

CROWCON Gas Detection you can trust. M07658, Manual de Usuario Tetra 3, Detector multigas personal. Ed 4. 2007. Disponible en internet: <<http://www.crowcon.com/uk/products/portables/tetra-3.html>>

ELAIYARAJU P y PARTHA N. Biogás production from co-digestion of orange peel waste and jatropha de-oiled cake in an anaerobic batch reactor. Afr J Biotechnol. 2012; 11:3339-45.

GONZALEZ, E. Temas selectos sobre aprovechamiento de los residuos del beneficiado húmedo del café. Trabajo de grado Ingeniero Bioquímico. México D.F.: Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. 1982. p. 132.

GUTIÉRREZ, Alexis. EL BIOGÁS: ALTERNATIVA ENERGÉTICA EMERGENTE. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. Octubre, 2007. [En línea]: <http://www.odepa.cl/articulo/el-biogás-alternativa-energetica-emergente-2/> [Citado 1 nov, 2014].

GUZMÁN, Paola; GARCÍA A, Gabriel y LARIOS Emmanuel. Determinación de azúcares reductores método DNS. Fundación Universidad de América Campus de los Cerros. Septiembre, 2013. p.2 -5. [En línea]: <http://www.academia.edu/4403544/DETERMINACION_DE_AZUCARES_REDUC_TORES_METODO_DNS> [Citado 18 ene, 2015].

HERNANDEZ PARDO Mario. Hydrogen production from anaerobic co-digestion of coffee mucilage and swine manure. Tesis de grado Doctor en Ingeniería. Nantes,

Francia: Escuela de Minas de Nantes. Colombia: Universidad de los Andes. Noviembre, 2012.

LÓPEZ CASTILLO Ana y CASTILLO ARAÚZ Antonio. Validación del mucílago de café para la producción de etanol y abono orgánico. Trabajo de grado Ingeniero Agroindustrial. Estelí, Nicaragua: Universidad Nacional de Ingeniería, 2012.

MARTI ORTEGA, Nuria. Phosphorus presipitation in anaerobic digestión process. En: Dissertation, Academic book publishers. Universitat de València. Boca ratón, Florida. 2006. ISBN: 1-58112-332-9

PERNA Verónica. Producción de biohidrógeno a partir de suero lácteo utilizando un reactor UASB y un reactor de lecho fijo. Trabajo de grado Magíster en Biotecnología. Uruguay, Montevideo: Universidad de la República. Facultad de Ciencias. Escuela de Biotecnología, 2011

PUERTA QUINTERO Gloria, Factores, procesos y controles en la fermentación del café. En: Revista CENICAFÉ, fondo nacional del café. Avances técnicos 422. Agosto, 2012. ISSN - 0120 – 0178.

RESTREPO, Jairo. Caracterización física y química de los frutos del café [Online]. Infocafes, todo café, todo sabor, todo pasión. Disponible en internet: <<http://www.infocafes.com/descargas/biblioteca/90.pdf>>

RODRÍGUEZ, Nelson. Manejo de residuos en la agroindustria cafetera. En: Biblioteca virtual de desarrollo sostenible y salud ambiental. Seminario internacional gestión integral residuos sólidos peligrosos siglo XXI. Medellín, Colombia. Noviembre, 1999. [En línea]: <<http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/acodal/xxx.pdf>> [Citado 20 Dic, 2015]

RODRÍGUEZ, Nelson y ZAMBRANO Diego. Los subproductos del café: Fuente de energía renovable. En: Revista CENICAFÉ, fondo nacional del café. Avances técnicos 393. Marzo, 2010. ISSN - 0120 – 0178.

SARASTY ZAMBRANO, Dan. Alternativas de tratamiento del mucílago residual producto del beneficiadero del café. Trabajo de grado Especialista en Química Ambiental. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de química, 2012.

SRINIVASAN, M.C.; LAXMAN, R.S. y DESHPANDE, M.V. Physiology and nutritional aspects of actinomycetes: an overview. En: World Journal of Microbiology and Biotechnology 7. Division of Biochemical Sciences, National Chemical Laboratory, Poona-411008, India. Septiembre 1990. p. 171-184

TÉLLEZ REYES, Sayana y VEGA BUITRAGO, Jennifer. Digestión anaerobia del mucílago de café utilizando estiércol bovino como inóculo. Trabajo de grado Ingeniero Química. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías físico-químicas. Escuela de ingeniería química, 2012.

U.S. DEPARTMENT OF ENERGY. Biomass Energy Data Book [Online]. EEUU. Septiembre, 2011, Edición 4. [En línea]: <<http://cta.ornl.gov/bedb>> [Citado 18 ene, 2015].

VALENCIA BOTERO, Mónica y CARDONA ÁLZATE, Carlos. Análisis del ciclo de vida para la producción de hidrógeno como combustible del futuro. En: Revista Cubana de Química. Mayo/Agosto, 2013. vol. 25 n° 2 165-179.

ANEXOS

Anexo A. Cepas nativas de actinomicetos del cepario del CINBIN

Fuente de aislamiento*	Código Cepa
Aguas de la laguna de tratamiento de mucílago	MFSR1
Aguas de la laguna de tratamiento de mucílago	MFSR2
Aguas de la laguna de tratamiento de mucílago	MFSR3
Aguas de la laguna de tratamiento de mucílago	MFSR4
Aguas de la laguna de tratamiento de mucílago	MFSR5
Aguas de la laguna de tratamiento de mucílago	MFSR7
Aguas de la laguna de tratamiento de mucílago	MFSR8
Aguas de la laguna de tratamiento de mucílago	MFSR9
Aguas de la laguna de tratamiento de mucílago	MFSR10
Aguas de la laguna de tratamiento de mucílago	MFSR11
Aguas de la laguna de tratamiento de mucílago	MFSR13
Aguas de la laguna de tratamiento de mucílago	MFSR14
Aguas de la laguna de tratamiento de mucílago	MFSR15
Aguas de la laguna de tratamiento de mucílago	MFSR16
Aguas de la laguna de tratamiento de mucílago	MFSR19
Aguas de la laguna de tratamiento de mucílago	MFSR20
Aguas de la laguna de tratamiento de mucílago	MFSR21
Compostaje	ACPG5
Compostaje	ACPG9
Compostaje	ACPG11
Compostaje	ACPG12
Compostaje	ACPG14
Compostaje	ACPG15
Compostaje	ACPG16
Compostaje	ACPG17
Compostaje	ACPG20

* Planta de beneficio de café, Los Santos – Santander.

Anexo B. Medición de azúcares reductores mediante prueba de Miller (DNS)

Se hicieron diluciones escalonadas de glucosa con réplica para elaborar la curva de calibración con la cual se compararon las demás muestras para determinar su contenido de azúcares. Los datos de las diluciones son los siguientes:

Muestra			Abs. a 540nm
Muestra GLUCOSA (A)	0	mg/L	0
	200	mg/L	0,196
	400	mg/L	0,399
	600	mg/L	0,605
	800	mg/L	0,809
	1000	mg/L	1,032
Pendiente	Intercepto	Desv. Estándar	Coef. Corr
0,00104	-0,0164	0,00679	1

Se encuentran curvas con una muy buena tendencia lineal de valores sin diferencias significativas entre replica y original.

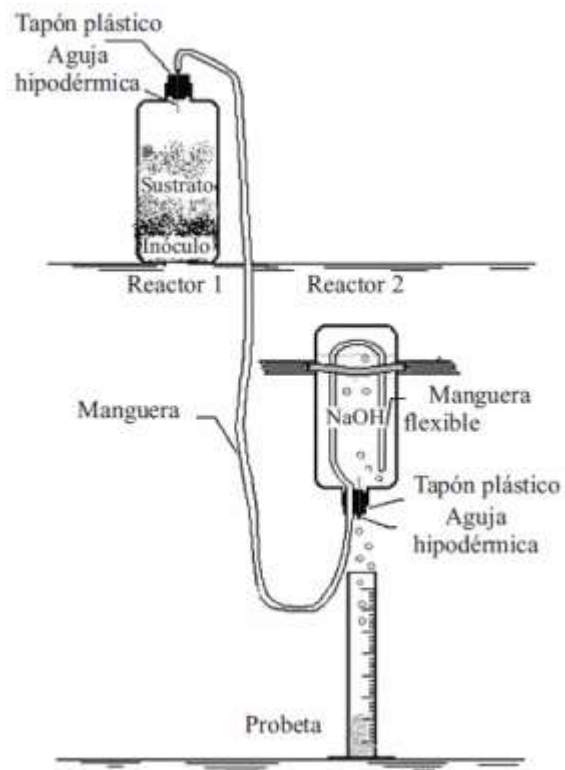


Muestras con glucosa para calibración

Anexo C. Montajes para la medición de pH y desplazamiento alcalino



Medidor de pH:
Orion 3 star (Thermo Scientific)



Descripción gráfica del montaje método desplazamiento alcalino

Fuente: Elaiyaraju and Partha, 2012