

**SELECCIÓN Y EVALUACIÓN DE ACTINOBACTERIAS AISLADAS DE “AGUAS
MIEL” PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO EN MUCÍLAGO DE CAFÉ**

ANGIE NATHALIA LIZARAZO ROMÁN

ERIKA LUCÍA RODRÍGUEZ LACHE

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS**

ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

BUCARAMANGA

2016

**SELECCIÓN Y EVALUACIÓN DE ACTINOBACTERIAS AISLADAS DE “AGUAS
MIEL” PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO EN MUCÍLAGO DE CAFÉ**

ANGIE NATHALIA LIZARAZO ROMÁN

ERIKA LUCÍA RODRÍGUEZ LACHE

**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**

2016

DEDICATORIA

A Dios, quien me ha protegido de todo mal y me ha colmado de sabiduría para tomar las mejores decisiones.

A mi padre José Rodrigo Lizarazo Arocha, quien ha sido la cabeza principal de esta familia, me ha apoyado incondicionalmente para alcanzar mis propósitos, me da consejos y ánimo cuando más lo necesito.

A mi madre Luz Marina Román Pabón, quien ha inculcado en mí valores y principios con los que he crecido como una persona íntegra para hacer bien a la comunidad.

A mi hermanito Andrey Rodrigo Lizarazo Román, quien a pesar de la distancia siempre estará para cuidarme como su pequeña hermana.

A mi familia, quienes han hecho parte de mi formación personal y realización profesional, en especial mi tía Susana y mi tía Marta.

A mi prima Marcela que más que prima es mi hermana y mi primo Mario que este es un título más para la familia.

Angie Nathalia Lizarazo Román.

DEDICATORIA

A mis padres Evangelista y Ruth, en ellos veo siempre la fortaleza, dedicación y amor para lograr todas las metas que me propongo

A mis hermanos Catalina y Rodolfo, quienes me han alcahueteado muchas de mis locuras.

A mis amigos quienes me acompañaron en esta etapa de mi vida, especialmente a Fer, Angélica, Edwar, Angel, Oscar, Diana, Camilo, Nathalia, Lesly y Félix.

En general a todos los que hicieron que cada momento en esta etapa fuera agradable.

Erika Lucía Rodríguez Lache.

AGRADECIMIENTOS

A los profesores de la Universidad Industrial de Santander quienes impartieron conocimientos académicos necesarios para nuestra vida profesional.

A la doctora Viviana Sánchez Torres que como nuestra directora nos acompañó y brindó su ayuda en el proceso de elaboración de este proyecto.

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

A la Doctora Oriana Danuta Serna Daza por guiarnos en algunos momentos de dificultad que se presentaron en este proyecto.

Al centro de investigación GIMBA por facilitarnos equipos para la realización de algunas pruebas.

A nuestros compañeros de carrera, especialmente a Félix quien estuvo presente en el desarrollo de este proyecto.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	16
1 OBJETIVOS	18
1.1 OBJETIVO GENERAL	18
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
2 MARCO TEORICO	19
2.1 FERMENTACIÓN OSCURA	19
2.2 MUCÍLAGO DE CAFÉ EN COLOMBIA	19
2.3 ACTINOBACTERIAS	20
2.4 RUTA METABÓLICA PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO	21
2.5 ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES (AGV)	21
2.6 AZUCARES REDUCTORES TOTALES (ART).	21
2.7 ACTINOBACTERIAS DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN CINBIN	22
3 METODOLOGÍA	24
3.1 MICROORGANISMOS Y CULTIVO	24
3.2 SELECCIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE HIDRÓGENO A PARTIR DE SACAROSA	25
3.3 SELECCIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE HIDRÓGENO USANDO COMO MEDIO DE CULTIVO MUCÍLAGO DE CAFÉ	26
3.3.1 Preparación y caracterización del mucílago de café.	26
3.3.2 Producción de hidrógeno usando mucílago de café como medio de cultivo.	26
3.4 RECONOCIMIENTO DE LAS CEPAS CON MAYOR PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO	27

3.4.1	Curva de producción de hidrógeno y pH.	27
3.4.2	Curva de crecimiento microbiano.	27
3.4.3	Ácidos grasos volátiles (AGV).	28
3.4.4	Azúcares reductores totales (ART).	28
3.4.5	Presencia de enzimas extracelulares.	28
3.4.6	Preservación de cepas.	28
4	RESULTADOS	29
4.1	SELECCIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE HIDRÓGENO A PARTIR DE SACAROSA	29
4.2	SELECCIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE HIDRÓGENO USANDO COMO MEDIO DE CULTIVO MUCÍLAGO DE CAFÉ	30
4.2.1	Curva de producción de hidrógeno.	32
4.2.2	Producción de hidrógeno en MCFD enriquecido con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno.	34
4.3	RECONOCIMIENTO DE LAS CEPAS CON MAYOR PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO	36
4.3.1	Curvas de crecimiento microbiano.	36
4.3.2	Ácidos grasos volátiles (AGV).	37
4.3.3	Azúcares reductores totales (ART).	38
4.3.4	Presencia de enzimas extracelulares.	39
5	CONCLUSIONES	40
6	RECOMENDACIONES	41
	BIBLIOGRAFÍA	42
	ANEXOS	48

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Metodología usada en el desarrollo del proyecto.	24
Figura 2. Densidad óptica final de las cepas en cultivo anaerobio con CYC líquido.	29
Figura 3. Producción de hidrógeno en CYC líquido.	30
Figura 4. Producción de hidrógeno en MCFD pH 4.41.	31
Figura 5. Producción de hidrógeno en MCFD con pH inicial 7.0.	32
Figura 6. Curva de producción de hidrógeno de la cepa MFSR 8 en MCFD con pH inicial 7.0 por 9 días.	33
Figura 7. Curva de pH del MCFD inoculado con la cepa MFSR 8 por 9 días.	34
Figura 8. Producción de hidrógeno de la cepa MFSR 8 en MCFD enriquecido con fuentes adicionales de carbono.	35
Figura 9. Producción de hidrógeno de la cepa MFSR 8 en MCFD enriquecido con fuentes adicionales de nitrógeno	36
Figura 10. Curva de crecimiento microbiano en CYC líquido.	37
Figura 11. Curva de ácidos grasos volátiles del MCFD con pH inicial 7.0.	38
Figura 12. Curva de azúcares reductores totales del MCFD con pH inicial 7.0.	39
Figura 13. Presencia de enzimas extracelulares (a) Proteasas, (b) Celulasas, (c) Amilasas.	39

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Asignación taxonómica de las cepas del phylum Actinobacteria aisladas de “aguas miel” con base en alineamientos BlastN del gen 16S rRNA.	23
--	----

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Esquema de las principales rutas de fermentación de glucosa implicadas en la producción de hidrógeno de Escherichia coli.	48
Anexo B. Medio de cultivo CYC Czapek-Dox–Extracto de Levadura–Casaminoácidos.	49
Anexo C. Análisis fisicoquímico de mucílago de café filtrado.	50
Anexo D. Medio Mínimo de Sales.	52
Anexo E. Protocolo para la determinación de ácidos grasos volátiles y alcalinidad total, estas dos últimas usando el método titrimétrico.	53
Anexo F. Protocolo para determinar la concentración de azúcares reductores por medio del método DNS.	56
Anexo G. Identificación cualitativa de bacterias productoras de amilasas, proteasas y celulasas.	58

RESUMEN

TITULO: SELECCIÓN Y EVALUACIÓN DE ACTINOBACTERIAS AISLADAS DE “AGUAS MIEL” PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO EN MUCÍLAGO DE CAFÉ *

AUTORES: ANGIE NATHALIA LIZARAZO ROMÁN
ERIKA LUCÍA RODRÍGUEZ LACHE**

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

DESCRIPCIÓN:

La fermentación bacteriana en residuos agroindustriales es una forma de obtención de productos valiosos para la industria, uno de estos productos es el hidrógeno, el cual es obtenido mediante el proceso de fermentación oscura. El hidrógeno es una alternativa energética que ha despertado gran interés debido a su alto contenido energético por unidad de masa, además su combustión no genera gases contaminantes para el medio ambiente.

En este proyecto de investigación se midió y cuantificó la producción de hidrógeno de catorce actinobacterias aisladas de aguas residuales del proceso de despulpado y lavado del café comúnmente llamadas “aguas miel”. Diez cepas presentaron producción de hidrógeno tomando como sustrato sacarosa, de estas, tres cepas presentaron producción de hidrógeno en mucílago de café fresco diluido a pH 4,41 y pH neutro. La cepa que presentó mayor producción de hidrógeno en mucílago de café fresco diluido con pH inicial 7.0 fue seleccionada para realizar curvas de producción de hidrógeno, pH, crecimiento bacteriano tomando como sustrato sacarosa, azúcares reductores (ART), ácidos grasos volátiles (AGV), prueba de producción de hidrógeno en mucílago de café fresco diluido enriquecido con fuentes adicionales de carbono o nitrógeno y presencia de enzimas extracelulares. A partir del análisis de estos resultados se buscó posibles factores que afecten la producción de hidrógeno. Se apreció que, al ajustar el pH inicial del mucílago de café fresco diluido a 7.0 se favoreció la fermentación oscura, esto se hizo evidente comparando la producción tanto de hidrogeno como de ácidos. También se observó que la cepa MFSR 8 presentó la mejor producción de hidrogeno (50 $\mu\text{mol/L}$), además de alta producción de ácidos grasos volátiles, por ende, se puede afirmar que es una cepa 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: SELECTION AND EVALUATION OF ACTINOMYCETES ISOLATED FROM “HONEY WATER” FOR THE PRODUCTION OF HYDROGEN IN COFFEE MUCILAGE *

AUTHOR: ANGIE NATHALIA LIZARAZO ROMÁN
ERIKA LUCÍA RODRÍGUEZ LACHE**

KEYWORDS: ACTINOMYCETES, HYDROGEN, MUCILAGE, COFFEE, FERMENTATION, DARK.

DESCRIPTION:

Fermenting bacteria in agroindustrial waste is a way of obtaining valuable industrial products, one of these products is hydrogen, which is obtained by the process of dark fermentation. Hydrogen is an energetic alternative that has aroused great interest because of its energy content per unit mass, also its combustion does not generate polluting gases to the environment.

In this project, the production of hydrogen was measured and quantified in fourteen actinomycetes isolated from wastewater of the washing and pulping process of coffee commonly known as “honey water”. Ten strains showed hydrogen production using sacarose as substrate, of these, three strains showed hydrogen production in fresh coffee mucilage in pH 4,41 and neutral pH. The strain that showed the most production of hydrogen in fresh coffee mucilage with an initial pH of 7.0 was chosen to do curves of hydrogen production, pH, bacterial growth using sacarose as substrate, reducing sugars, volatile fatty acids, hydrogen production test in diluted fresh coffee mucilage enriched with additional sources of carbon and nitrogen and presence of extracellular enzymes. From the analysis of these results, possible factors affecting hydrogen production were sought. It was appreciated that, by adjusting the initial pH of the fresh coffee mucilage diluted to 7.0 the dark fermentation is favored. This was evident by comparing the production of both hydrogen and acids. It was also observed that the strain MFSR 8 showed the best hydrogen production (50 mmol/L) besides the high production of volatile fatty acids, therefore it is possible to say that it is an empowered strain to make dark fermentation.

* Bachelor Thesis

** College of Physicochemical Engineering. School of Chemical Engineering. Director: Viviana Sánchez Torres, Chemical Engineer, Ph.D.

INTRODUCCIÓN

El café es importante en la economía Colombiana debido a que es uno de los productos agrícolas de mayor exportación (Cano, Vallejo, Caicedo , Amador , & Tique , 2012). En febrero de 2016 tuvo una producción mensual que alcanzó 1113 miles de sacos de 60 kg (International Coffee Organization, 2016). En el proceso del café se estima que menos del 5% de la biomasa generada se aprovecha en la elaboración de la bebida, el resto queda en forma residual (Rodríguez Valencia & Zambrano Franco, 2010). Uno de los principales residuos es el mucílago, el cual es obtenido en el proceso de transformación de café cereza (con mesocarpio y endocarpio) en café pergamino (granos despulpados y secos) (Puerta, Influencia del porceso del beneficio en la calidad del café, 1999).

En la degradación anaerobia de sustratos orgánicos complejos intervienen miembros de los dominios Bacteria y Archaea. En condiciones anaerobias se produce lactato, piruvato, acetato y formiato, los cuales son utilizados por algunos grupos microbianos para la producción de CO₂, CH₄ y H₂ (Súa Rojas, 2015). La fermentación microbiana a partir de desechos agrícolas puede llegar a ser un método económico para la producción de hidrógeno a gran escala comparada con la implementada actualmente como el reformado del metano y la electrólisis (Das & Veziroglu, 2001). El hidrógeno es un combustible alternativo y prometedor, pues tiene alto contenido energético por unidad de masa, su combustión no produce contaminantes atmosféricos y tiene aplicabilidad para la generación de energía eléctrica utilizando celdas de combustible (Zhang, Evans, Mielenz, Hopkins, & Adams, 2007). El grupo *actinobacteria*, es importante ya que se hace evidente en la descomposición de tejidos animales, vegetales y del humus (Corredor , Andrade , Tohme, Duque, & Flórez, 2000).

En este trabajo se realizó un estudio del uso del mucílago de café como sustrato para la producción de hidrógeno, mediante el proceso de fermentación oscura por

catorce actinobacterias del cepario del Grupo de Investigación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular (CINBIN) de la Universidad Industrial de Santander, las cuales fueron aisladas de aguas residuales del proceso de despulpado y lavado del café, comúnmente llamadas “aguas miel”.

1 OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

- ✓ Evaluar la producción de hidrógeno de actinobacterias previamente aisladas de “aguas miel” en mucílago de café con ausencia de oxígeno.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Identificar la producción de hidrógeno de actinobacterias usando como medio de cultivo sacarosa.
- ✓ Determinar la producción de hidrógeno en mucílago de café fresco diluido.
- ✓ Identificar el efecto del pH en la producción de hidrógeno en mucílago de café.
- ✓ Evaluar el efecto de la adición de fuentes adicionales de carbono y nitrógeno en la producción de hidrógeno a partir de mucílago de café fresco diluido.
- ✓ Realizar curvas de crecimiento microbiano, ácidos grasos volátiles, azúcares reductores totales y presencia de enzimas extracelulares de la cepa con mayor producción de hidrógeno en mucílago de café.

2 MARCO TEORICO

2.1 FERMENTACIÓN OSCURA

La fermentación oscura consiste en la obtención de hidrógeno a partir de compuestos orgánicos ricos en carbohidratos en ausencia de luz por la acción combinada de un grupo de bacterias anaeróbicas (CEBAS-CDIC, CTC, & AGRUPAL, 2014). Entre los distintos procesos de producción de hidrógeno por vía biológica, el proceso de fermentación oscura presenta mayor posibilidad de escalado y aplicación industrial a corto plazo, gracias a la similitud de las condiciones de operación frente a los procesos de digestión anaerobia convencional. Los rendimientos de producción de gas en el proceso de fermentación oscura, al ser comparados en términos de volumen de reactor, son superiores a los demás procesos biológicos, en algunos casos capaces de lograr una mayor conversión de la materia orgánica en hidrógeno, pero con menores rendimientos a la misma unidad de reactor considerada. Otra ventaja que presenta el proceso producción de hidrógeno por fermentación oscura, es que no depende de fuentes de luz externa y por lo tanto no requiere transparencia en el licor en el que están presentes los microorganismos (Redondas, 2013).

2.2 MUCÍLAGO DE CAFÉ EN COLOMBIA

El café de Colombia es la denominación que se le otorga al café 100% Arábico producido en las regiones cafeteras de Colombia. La combinación de diversos factores climáticos y ambientales conduce a la producción de un café sobresaliente, además la arraigada tradición de la recolección selectiva del café, el proceso de beneficio o post cosecha por la vía húmeda, el proceso de secado y su posterior clasificación, garantizan una óptima calidad del producto (Federación Colombiana de Cafeteros, 2010).

La cereza de un café en un estado de madurez es un fruto de color rojo o amarillo, el cual tiene una piel exterior (exocarpio) que envuelve una pulpa dulce (mesocarpio), debajo de la pulpa están los granos que son utilizados para la elaboración de la bebida de café. El proceso de post cosecha o beneficio del café consiste en la transformación de la cereza en un producto seco, listo para el proceso de trilla. En Colombia, el café se beneficia por vía húmeda incluyendo los procesos de despulpado, fermentación, lavado y secado del grano. En el despulpado, a las cerezas se les retira la pulpa rápidamente después de la recolección, posteriormente se retira el mucílago (mesocarpio) por medio de la fermentación del grano o por medios mecánicos, terminada esta etapa se hace un lavado del grano donde se elimina completamente el mucílago del grano, después se seca el grano al sol o con secadores mecánicos (Federación Colombiana de Cafeteros, 2010). El mucílago y las mieles fermentadas de café se generan en forma discontinua, en cantidades que dependen de la producción de café, en cada época y zona cafetera colombiana (Puerta & Ríos, 2011).

2.3 ACTINOBACTERIAS

Las actinobacterias son bacterias filamentosas Gram positivas, abundantes en la rizosfera, por lo que se encuentran involucradas en el ciclaje de nutrientes en el suelo. La mayoría de estos microorganismos tienen diversas propiedades como producción de metabolitos secundarios (antibióticos, antifúngicos), descomposición de materia orgánica y producción de enzimas de interés industrial (amilasas, celulasas, xilanasas). Estos microorganismos utilizan mecanismos como: fijación de nitrógeno atmosférico, solubilización de fósforo en el suelo obteniendo formas solubles disponibles, formación de micorrizas arbusculares, producción de sideróforos, inducción de resistencia sistémica contra enfermedades y plagas, producción de enzimas para la degradación de materia orgánica y compuestos recalcitrantes, y generación de metabolitos secundarios con actividad antagónica contra microorganismos patógenos (Ferreira, 2012).

2.4 RUTA METABÓLICA PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO

Han sido realizados estudios estequiométricos en microorganismos productores de hidrógeno con el fin de aclarar las vías metabólicas utilizadas en su producción (Chen, Chang , & Lee, 2005). Estos estudios indican que la producción de hidrógeno por vía microbiana está basada principalmente en el metabolismo anaerobio del piruvato formado mediante el catabolismo de diferentes sustratos, los microorganismos facultativos generan hidrógeno usando el sistema de degradación piruvato-formiato-liasa (PFL). El piruvato se degrada en ácido fórmico y acetil-CoA por la acción del sistema PFL. El ácido fórmico es oxidado a dióxido de carbono por medio del sistema formiato-hidrogeno-liasa (FHL). Este complejo enzimático está constituido por formiato-deshidrogenasa e hidrogenasa permitiendo la producción de hidrógeno (Redondas, 2013) (Anexo A).

2.5 ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES (AGV)

La energía para el crecimiento microbiano es derivada de la fermentación de los carbohidratos, principalmente almidón y celulosa, cuya digestión anaerobia produce ácidos grasos volátiles (AGV), succinato, formato, lactato, etanol, dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), y trazas de hidrógeno (H₂); sin embargo, ellos también aportan esqueletos de carbono esenciales para la síntesis de biomasa microbiana (Alvarez, 2006).

2.6 AZUCARES REDUCTORES TOTALES (ART).

Los azúcares reductores son aquellos azúcares que poseen su grupo carbonilo (grupo funcional) intacto, y que a través del mismo pueden reaccionar como reductores con otras moléculas. Todos los monosacáridos son azúcares reductores, ya que al menos tienen un –OH hemiacetalico libre por lo que dan positivo a la reacción con reactivo de Fehling, a la reacción con reactivo Tollens y a la reacción de Benedict. Los ART provocan la alteración de las proteínas mediante la reacción

de glucosilación no enzimática también denominada reacción de Millard o glicación. Esta reacción se produce en varias etapas: las iniciales son reversibles y se completan en tiempos relativamente cortos, mientras que las posteriores transcurren más lentamente y son irreversibles. Se postula que tanto las etapas iniciales como finales de la glucosilación están implicadas en los procesos de envejecimiento celular y en el desarrollo de las complicaciones crónicas de la diabetes (Medina, 2013).

2.7 ACTINOBACTERIAS DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN CINBIN

Diferentes cepas fueron aisladas de aguas residuales del proceso de despulpado y lavado del café, comúnmente llamadas “aguas miel”. Se realizaron diluciones seriadas de las muestras recolectadas en agar CYC pH 7.0 (Agar Czapek-Dox–Extracto de Levadura–Casaminoácidos (Revollo Escudero, Serna Daza, & Hernandez Torres, 2012)) (Anexo B). Posteriormente se incubaron a temperatura ambiente durante 14 días. Se individualizaron diferentes cepas repicando colonias individuales en agar CYC bajo las mismas condiciones para la obtención de cultivos axénicos.

La identificación de las cepas se llevó a cabo analizando las características macroscópicas, microscópicas y por medio de la secuenciación del gen 16S rRNA. La Tabla 1 muestra la asignación taxonómica de las cepas aisladas.

Tabla 1. Asignación taxonómica de las cepas del phylum Actinobacteria aisladas de “aguas miel” con base en alineamientos BlastN del gen 16S rRNA.

Aislado	Género más cercano (Nº de acceso)
MFSR-1	<i>Streptomyces</i> (EU384279)
MFSR-2	<i>Streptomyces</i> (FJ951435)
MFSR-3	<i>Arthrobacter</i> (KJ626449)
MFSR-4	<i>Micrococcus</i> (KF424616)
MFSR-5	<i>Micrococcus</i> (KJ843153)
MFSR-7	<i>Streptomyces</i> (KF996505)
MFSR-8	<i>Gordonia</i> (NC013441)
MFSR-9	<i>Gordonia</i> (JQ658421)
MFSR-10	<i>Streptomyces</i> (KF996505)
MFSR-11	<i>Leifsonia</i> (JX067673)
MFSR-13	<i>Micrococcus</i> (KC469953)
MFSR-15	<i>Streptomyces</i> (AB184106)
MFSR-17	No determinada
MFSR-20	<i>Streptomyces</i> (AY641538)

Fuente: (Súa Rojas, 2015)

3 METODOLOGÍA

En la Figura 1 se muestra un esquema de la metodología usada, la cual fue dividida en tres etapas principales.

Figura 1. Metodología usada en el desarrollo del proyecto.



3.1 MICROORGANISMOS Y CULTIVO

Las cepas evaluadas se reportan en la Tabla 1, las cuales se encuentran en el cepario del Grupo de Investigación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular (CINBIN) de la Universidad Industrial de Santander.

Los medios de cultivo usados fueron CYC pH 7.0 (Agar y líquido Czapek-Dox–Extracto de Levadura–Casaminoácidos) (Revollo Escudero, Serna Daza, & Hernandez Torres, 2012) (Anexo B) y mucílago de café fresco.

Las cepas aisladas fueron cultivadas en medio agar CYC, colonias independientes se seleccionaron para iniciar un cultivo fresco en tubos de ensayo con 6 ml de CYC

líquido, el cual se mantuvo por 5 días a 180 rpm y 25°C. El crecimiento microbiano se cuantificó midiendo la densidad óptica a 600 nm usando un espectrofotómetro UV/VIS Lambda 25 (PerkinElmer, USA) y se seleccionó el volumen necesario de cultivo para inocular los viales con una densidad óptica inicial de 0,5. Dicho volumen se centrifugó a 5000 rpm por 3 min, se descartó el sobrenadante y se suspendió la muestra en 0,5 ml de NaCl 0,15 M.

Para medir la concentración de hidrógeno, se usaron viales de 12 ml sellados herméticamente, los cuales fueron autoclavados a 120°C por 25 minutos y purgados con nitrógeno por 2 minutos garantizando anaerobiosis.

3.2 SELECCIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE HIDRÓGENO A PARTIR DE SACAROSA

Viales de 12 ml se llenaron con 5,5 ml de CYC líquido y se dejaron por 6 días a 25°C y 180 rpm, por triplicado. Se midió la densidad óptica a 600 nm y la producción de hidrógeno en cada uno de los viales con el equipo TETRA GAS (Crowcon, UK), el cual mide la concentración de hidrógeno en ppm y su rango de detección es 0 a 10.000 ppm en volumen, las cepas que no tenían producción significativa de hidrógeno fueron descartadas.

La siguiente ecuación se usó para determinar la concentración de hidrógeno en $\mu\text{mol/L}$.

$$\frac{\mu\text{mol H}_2}{L} = \frac{P V}{R T} \cdot \text{ppm}_r$$

$V_{\text{líquido}}$

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 [$Pa \cdot m^3 \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$]

T: Temperatura del gas en el vial [K]

ppm_r: Partes por millón reportado por el detector [$\mu mol/mol$]

V_{líquido}: Volumen del líquido en el vial [L]

3.3 SELECCIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE HIDRÓGENO USANDO COMO MEDIO DE CULTIVO MUCÍLAGO DE CAFÉ

3.3.1 Preparación y caracterización del mucílago de café. El mucílago de café fresco se extrajo del fruto mediante el desmucilaginador, se filtró en serie con mallas de 105 μm y 75 μm , posteriormente se conservó a 4°C. Se midió los sólidos suspendidos centrifugando 1 ml de mucílago de café fresco, descartando el sobrenadante y pesando el precipitado. Adicional a esto se midió el pH y se realizó un análisis fisicoquímico (Anexo C).

3.3.2 Producción de hidrógeno usando mucílago de café como medio de cultivo. Las cepas que produjeron hidrógeno en CYC líquido se inocularon en viales con mucílago de café fresco diluido (MCFD) pH 4.41, el cultivo se dejó el mismo tiempo y a las mismas condiciones de temperatura, agitación y tiempo que en CYC líquido, estos viales contenían 3 ml de mucílago de café fresco y 2,5 ml de agua destilada.

Con el fin de mejorar la producción de hidrógeno en MCFD, se ajustó el pH inicial a 7.0, pues es el pH óptimo para el crecimiento de las actinobacterias (Piedrahita & Gonzalez , 2014), y se repitió el procedimiento. De igual forma se agregaron varios reactivos para enriquecer el MCFD con fuentes de carbono y nitrógeno. Como fuentes de carbono se usaron glicerol puro, glicerol crudo y glucosa (concentración

de 5 g/L y 10 g/L cada uno), como fuentes de nitrógeno se usó sulfato de amonio (concentración de 0,5 g/L y 1 g/L) y extracto de levadura (concentración de 4 g/L y 8 g/L) (Ferreira , 2012), esta última prueba tuvo como control cultivos en MCFD sin fuentes adicionales de carbono o nitrógeno.

3.4 RECONOCIMIENTO DE LAS CEPAS CON MAYOR PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO

Para encontrar el tiempo que permita obtener la mayor producción de hidrógeno, la mejor cepa productora de hidrógeno en MCFD se cultivó en las mismas condiciones que el ensayo anterior durante 9 días y se tomaron muestras los días 1, 2, 3, 6 y 9. Cada medición se hizo al menos con dos cultivos independientes.

3.4.1 Curva de producción de hidrógeno y pH. En los días de toma de muestra, se registró la producción de hidrógeno en la fase gaseosa para cada uno de los viales con el equipo TETRA GAS (Crowcon, UK). Para determinar el pH una muestra del cultivo fue centrifugada a 5000 rpm por 3 minutos; 2 ml del sobrenadante se diluyeron en 18 ml de agua destilada y se midió el pH usando el pH-metro digital Orion 3 Star (Thermo scientific, USA).

3.4.2 Curva de crecimiento microbiano. Como el mucílago de café tiene presencia de sólidos suspendidos no se puede medir el crecimiento mediante la densidad óptica, por esta razón para caracterizar la cepa se realizaron cultivos en medio CYC pH 7.0 (Agar y líquido Czapek-Dox–Extracto de Levadura–Casaminoácidos) (Revollo Escudero, Serna Daza, & Hernandez Torres, 2012) (Anexo B), en las mismas condiciones de agitación, temperatura y tiempo de cultivo que las pruebas de producción de hidrógeno. La densidad óptica a 600 nm se midió a diferentes tiempos durante el cultivo.

3.4.3 Ácidos grasos volátiles (AGV). Se tomó una muestra de cultivo en MCFD y se centrifugó a 5000 rpm, 5 ml de sobrenadante se tomaron para determinar la concentración de ácidos grasos volátiles siguiendo el método titrimétrico (Anderson & Yang, 1992) (Anexo E), el control de esta prueba se realizó con MCFD sin inóculo.

3.4.4 Azúcares reductores totales (ART). Al cultivo se le determinó la concentración de azúcares reductores totales por medio del método de Miller (Miller, 1959) (Anexo F). Este método consiste en una reacción redox entre el ácido 3,5 dinitro-salicílico (DNS) y los azúcares reductores presentes en la muestra, el control de esta prueba se realizó con MCFD sin inóculo.

3.4.5 Presencia de enzimas extracelulares. Se realizó una prueba cualitativa con el fin de conocer la presencia de enzimas extracelulares como Amilasas, Celulasas y Proteasas (Song & Hu, 2006) (Shoichiro, 2008)(Anexo G).

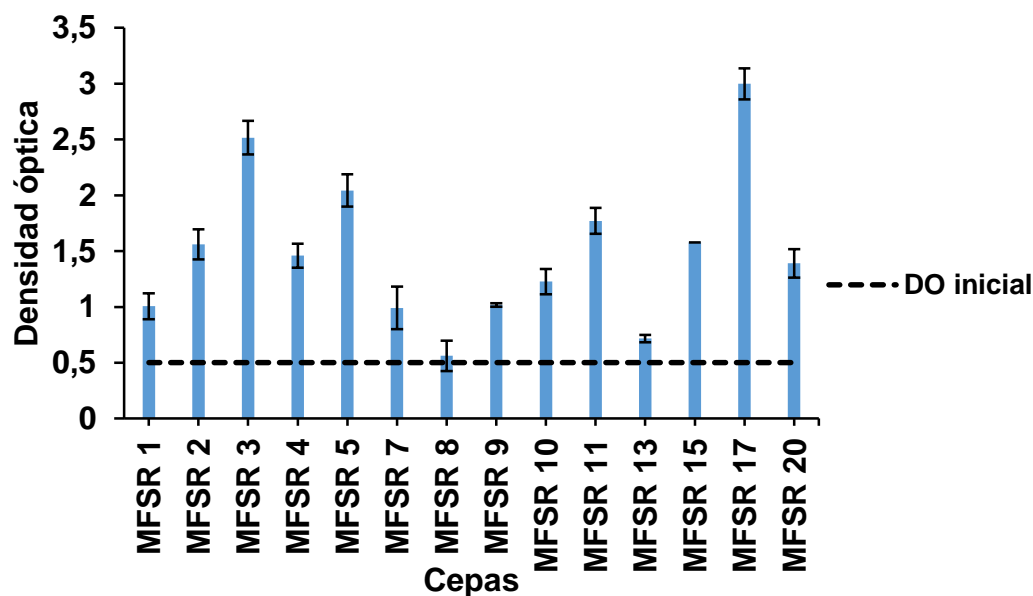
3.4.6 Preservación de cepas. Cultivos bacterianos en CYC líquido fueron criopreservados en 20% glicerol y almacenados a -70°C por triplicado (Sambrook & Russell , 2001).

4 RESULTADOS

4.1 SELECCIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE HIDRÓGENO A PARTIR DE SACAROSA

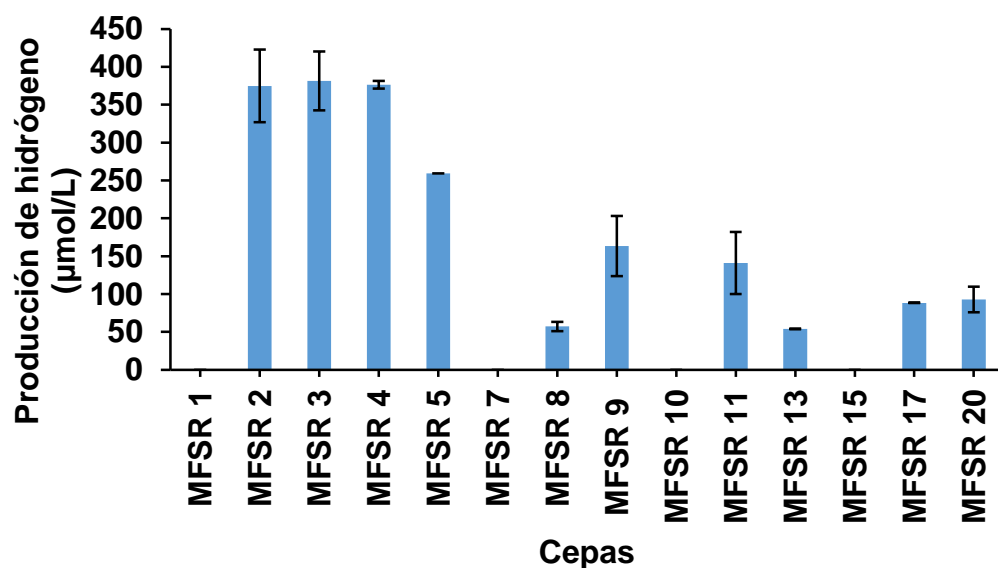
La densidad óptica determina la absorbancia a través de la muestra, indicando la turbidez de la misma, este es un método indirecto que ayuda a determinar el crecimiento bacteriano. La Figura 2 muestra la densidad óptica registrada después de 6 días de crecimiento en viales con 6 ml de cultivo en CYC líquido. Se observa crecimiento de todas las cepas en condiciones anaerobias, resaltando mayor crecimiento en la cepa MFSR 17 y MFSR 3. Algunas cepas no registran densidad óptica considerable a los 6 días de crecimiento, esto puede ser debido a que las células se encuentren realizando actividades de mantenimiento celular, o en fase de muerte.

Figura 2. Densidad óptica final de las cepas en cultivo anaerobio con CYC líquido.



Al mismo tiempo se cuantificó la producción de hidrógeno de cada una de las cepas, para conocer las cepas que poseen la capacidad de producir hidrógeno a partir de sacarosa. La Figura 3 muestra la concentración de hidrógeno en $\mu\text{mol/L}$ en la cual se evidencia que las cepas MFSR 2, MFSR 3, MFSR 4, MFSR 5, MFSR 8, MFSR 9, MFSR 11, MFSR 13, MFSR 17 y MFSR 20 producen hidrógeno en medio CYC líquido, destacando con mayor producción las cepas MFSR 2, MFSR 3 y MFSR 4.

Figura 3. Producción de hidrógeno en CYC líquido.

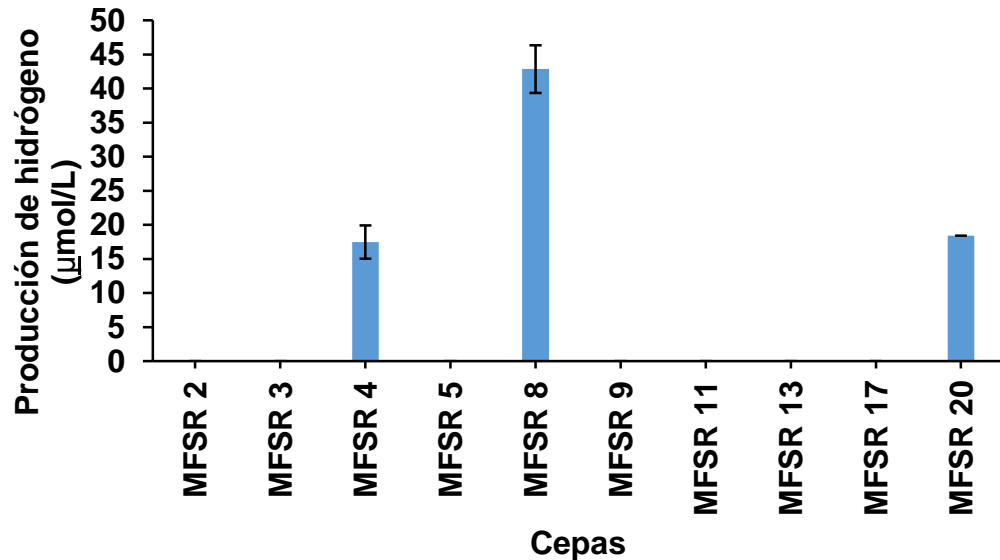


4.2 SELECCIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE HIDRÓGENO USANDO COMO MEDIO DE CULTIVO MUCÍLAGO DE CAFÉ

El mucílago de café presentó una relación de sólidos suspendidos de 0,0506 g/ml, pH 4.41, carbono orgánico total de 36,17 mg C/L, nitrógeno orgánico de 783,24 mg N/L, relación C/N de 0,04 y demanda química de oxígeno de 92184 mg O_2/L . La Figura 4 muestra la producción de hidrógeno en MCFD de las cepas anteriormente seleccionadas. Las cepas MFSR 4, MFSR 8 y MFSR 20 registraron producción de hidrógeno. Las demás cepas no presentan producción de hidrógeno,

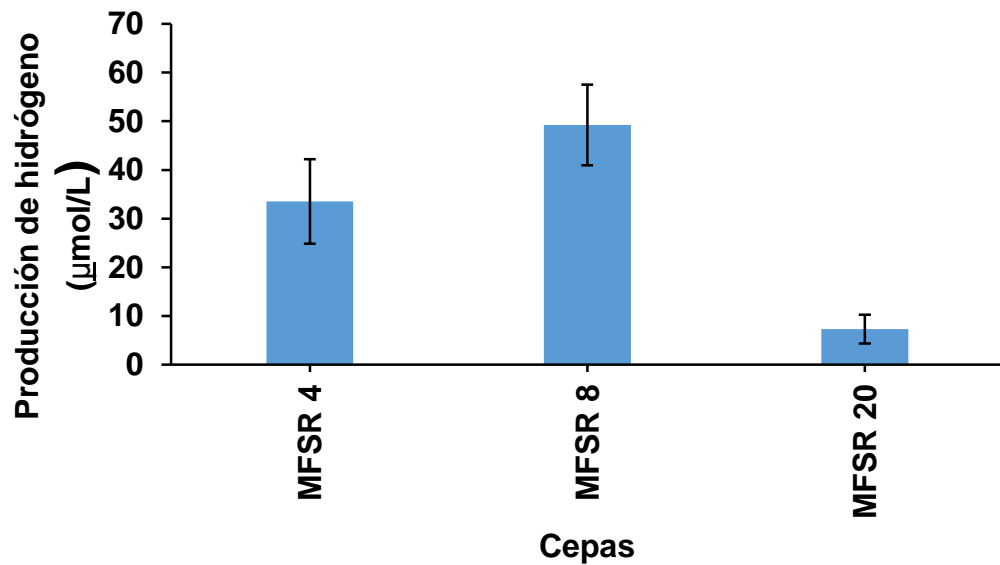
probablemente se debe a que el MCFD es una mezcla de sustratos más difíciles de metabolizar que la sacarosa, la cual es el principal sustrato en CYC líquido, además es posible que el MCFD tenga limitación de algunos nutrientes.

Figura 4. Producción de hidrógeno en MCFD pH 4.41.



Como se describe en la literatura el pH óptimo para el crecimiento es aproximadamente 7.0 y en vista de la presencia de mayor concentración de hidrógeno en CYC líquido con pH neutro, se ajustó el pH del MCFD con NaOH de 4.41 a 7.0. La Figura 5 muestra la producción de hidrógeno en este medio de cultivo con las cepas MFSR 4, MFSR 8 y MFSR 20. Se seleccionó la cepa MFSR 8 para continuar con el proyecto pues muestra la mayor producción de hidrógeno de 50 µmol/L.

Figura 5. Producción de hidrógeno en MCFD con pH inicial 7.0.



4.2.1 Curva de producción de hidrógeno. La Figura 6 muestra la curva de producción de hidrógeno de la cepa MFSR 8, en la cual se observa que al sexto día se obtuvo la mayor producción de hidrógeno (58 µmol/L), a partir de este día la concentración de hidrógeno comienza a descender, esto puede ser causado por un cambio en el metabolismo hacia el consumo de hidrógeno, dado que las actinobacterias pueden tener varias clases de hidrogenasas (Sanchez Torres, y otros, 2013), tales como, hidrogenasa consumidora de hidrógeno e hidrogenasa reversible, esta última tiene la capacidad de producir y consumir hidrógeno dependiendo de las condiciones de la siguiente reacción (Redondas, 2013).

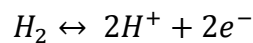
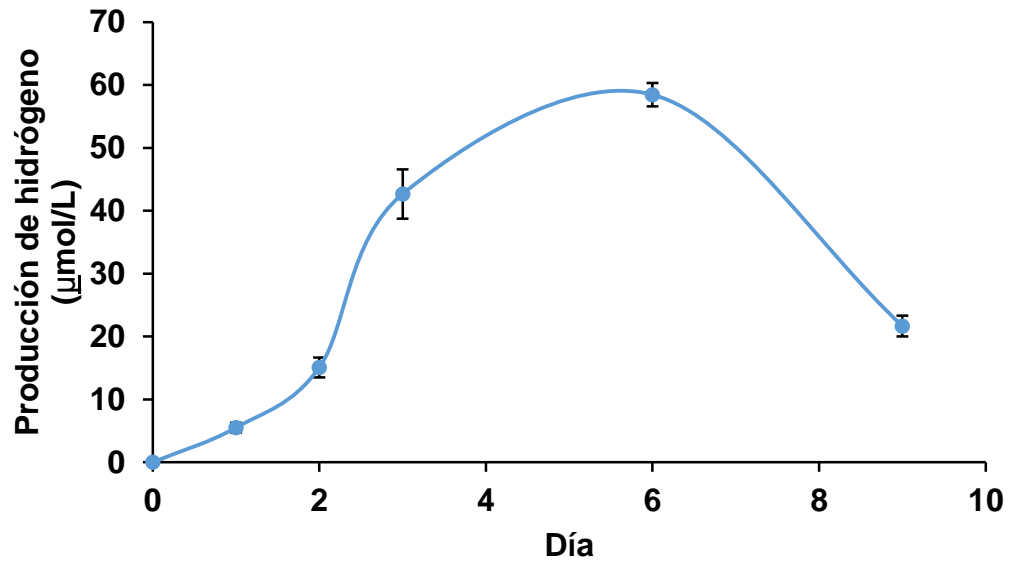
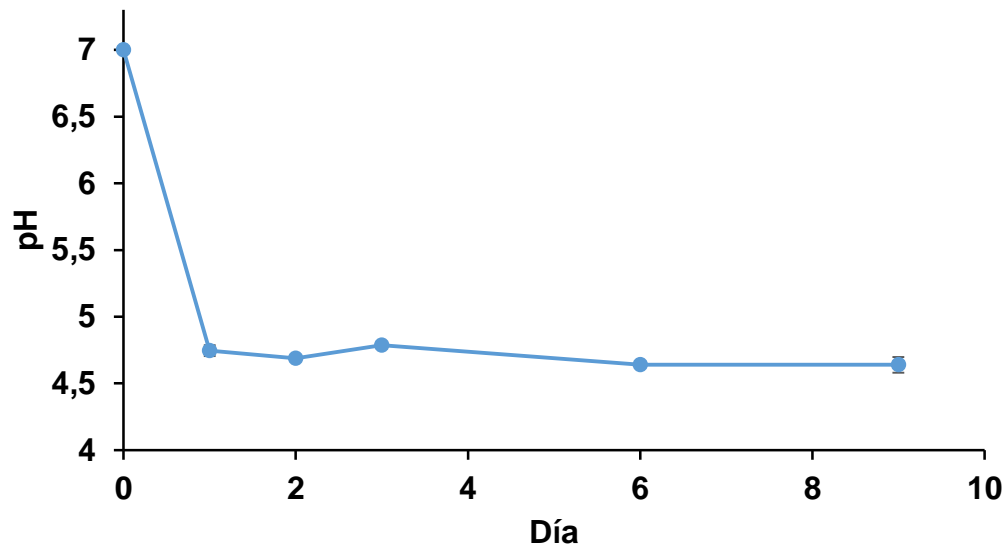


Figura 6. Curva de producción de hidrógeno de la cepa MFSR 8 en MCFD con pH inicial 7.0 por 9 días.



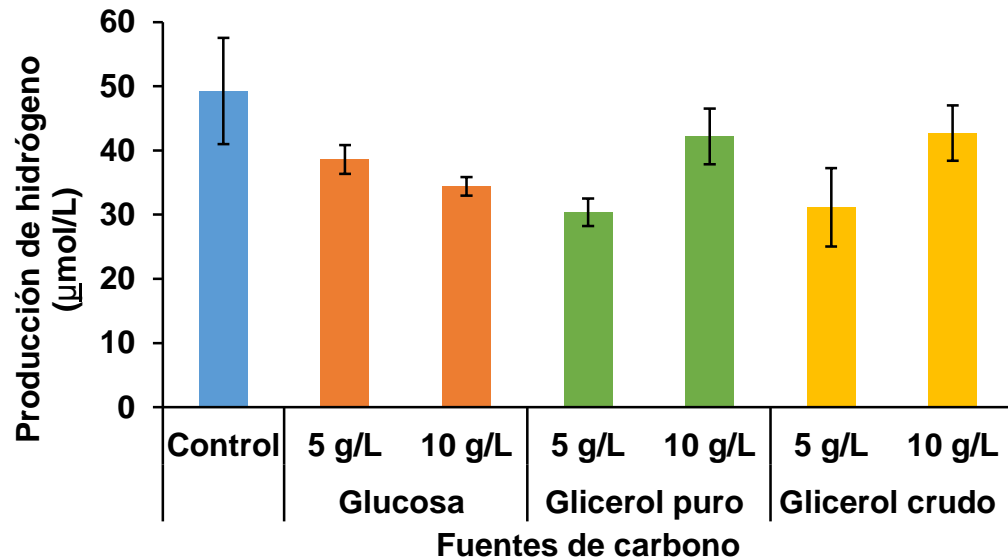
De igual forma, la Figura 7 muestra la curva del pH registrado para los mismos días, donde se observa un descenso abrupto del pH en el primer día de evolución, esto debido a la formación de ácidos tales como ácido butírico, succínico, propiónico, acético, láctico y fórmico, los cuales son productos de diferentes reacciones de fermentación del piruvato (Redondas, 2013), confirmando la existencia del proceso de fermentación oscura.

Figura 7. Curva de pH del MCFD inoculado con la cepa MFSR 8 por 9 días.



4.2.2 Producción de hidrógeno en MCFD enriquecido con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno. La concentración de las fuentes adicionales de carbono fue seleccionada según el rango de concentraciones que se ha reportado en la literatura. En la Figura 8 se observa que a los 6 días de crecimiento en los medios enriquecidos con fuentes de carbono la producción no mejora respecto al control el cual fue el dato presentado anteriormente en MCFD con pH inicial 7.0, sin ninguna adición de fuentes adicionales. La mayor concentración de hidrógeno se alcanzó usando 10 g/L de glicerol y 10 g/L de glicerol crudo respectivamente la cual fue 42 $\mu\text{mol/L}$.

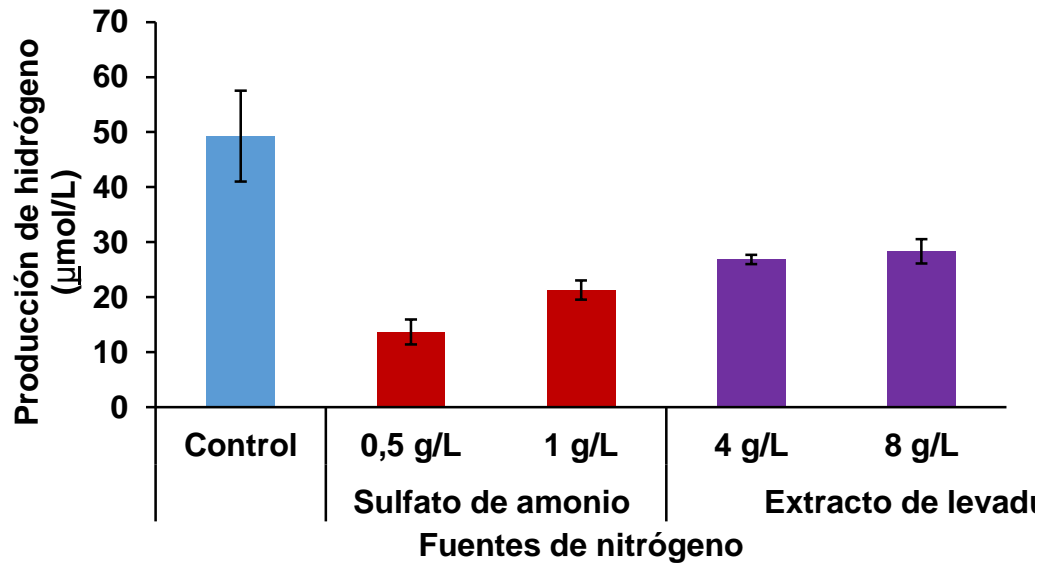
Figura 8. Producción de hidrógeno de la cepa MFSR 8 en MCFD enriquecido con fuentes adicionales de carbono.



Por otra parte, la concentración de la fuente adicional de nitrógeno se eligió en base a los estudios presentados en la literatura (Pérez , León, & Joseph, 2015). La Figura 9 muestra la producción de hidrógeno en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno, no se evidencia aumento en la concentración de hidrógeno al cabo de 6 días con respecto al control, el cual fue la producción presentada anteriormente en MCFD a PH 7.0 sin adición de fuentes adicional adicionales. La mayor concentración de hidrógeno alcanzada fue 28 µmol/L usando 8 g/L de extracto de levadura.

Se encontró que la adición de sustratos adicionales para enriquecer el MCFD no incidió en el aumento de la producción de hidrógeno de la cepa MFSR 8, esto puede ser porque las bacterias usaron las diferentes fuentes de carbono y nitrógeno para la producción de otros productos. Cabe resaltar que el pH inicial fue modificado a 7.0, para garantizar el pH óptimo para el crecimiento microbiano.

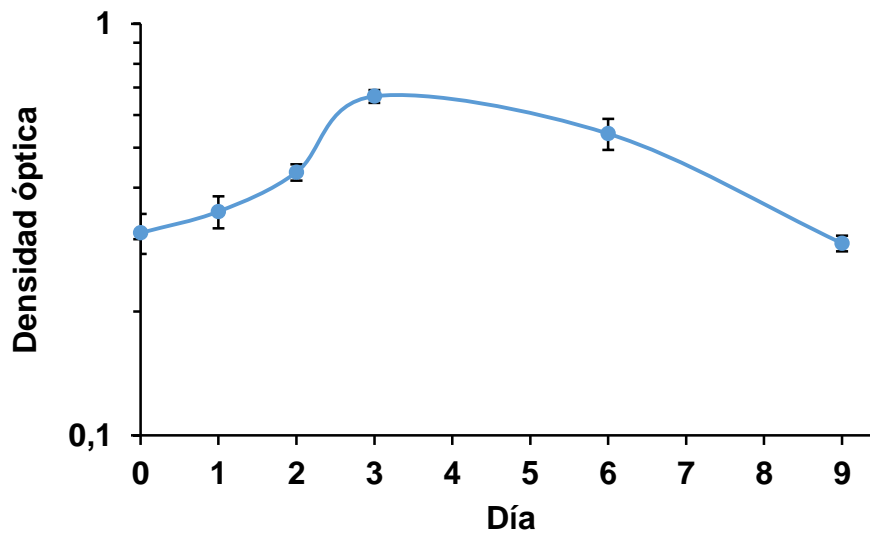
Figura 9. Producción de hidrógeno de la cepa MFSR 8 en MCFD enriquecido con fuentes adicionales de nitrógeno



4.3 RECONOCIMIENTO DE LAS CEPAS CON MAYOR PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO

4.3.1 Curvas de crecimiento microbiano. Se realizó una curva de crecimiento microbiano de la cepa MFSR 8 para caracterizar la cepa. En la Figura 10 se observa que la fase de latencia dura aproximadamente 1 día después de iniciar el cultivo en CYC líquido, seguido por la fase exponencial que permanece hasta el tercer día y continuando con un corto periodo en fase estacionaria antes de comenzar la fase de muerte. La velocidad específica de crecimiento máxima encontrada es $\mu_{\text{máx}} = 0,14 \text{ día}^{-1}$.

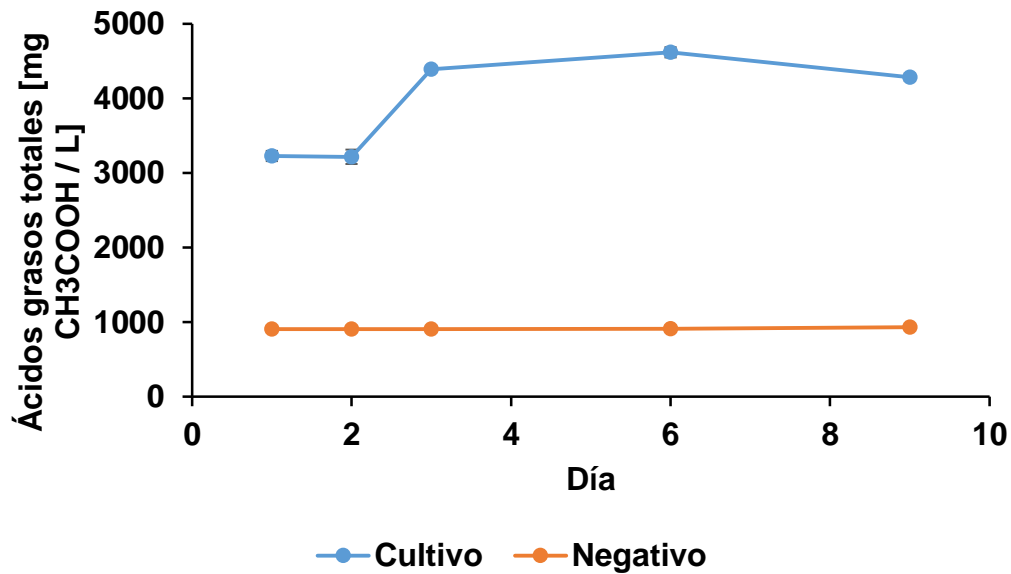
Figura 10. Curva de crecimiento microbiano en CYC líquido.



4.3.2 Ácidos grasos volátiles (AGV). Diferentes ácidos orgánicos con cadenas de menos de seis carbonos se producen cuando se lleva a cabo la fermentación oscura, dichos ácidos se denominan ácidos grasos volátiles.

La figura 11 muestra la diferencia de AGV producidos durante 9 días en el cultivo de MCFD con pH inicial 7.0 comparado a un control negativo el cual fue MCFD sin inóculo. Se observa incremento de los mismos desde el primer día de cultivo, esto permite confirmar la existencia de un proceso fermentativo debido a que los ácidos volátiles son productos de este proceso

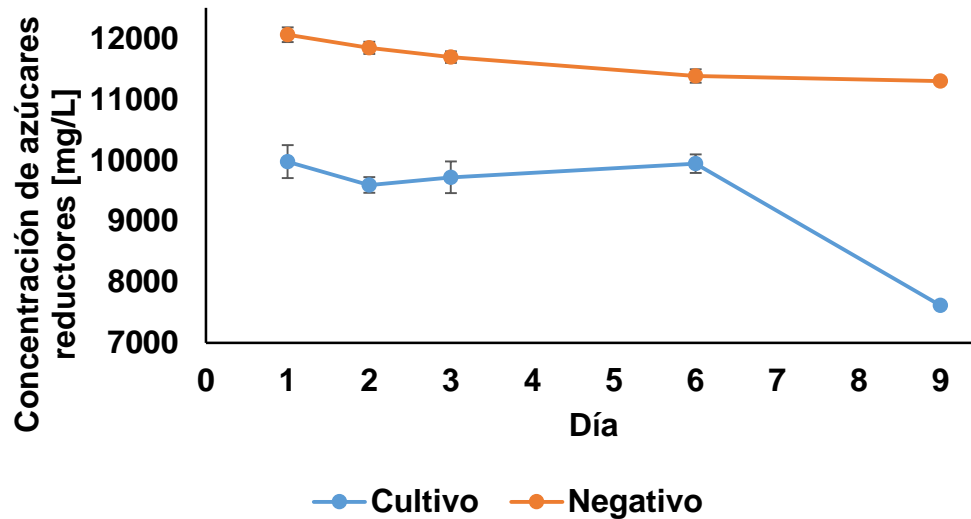
Figura 11. Curva de ácidos grasos volátiles del MCFD con pH inicial 7.0.



4.3.3 Azúcares reductores totales (ART). Durante la fermentación se lleva a cabo una oxidación de los ART por parte de las bacterias, obteniendo como productos etanol, ácido láctico, entre otros. Por lo tanto, se realizó una cuantificación de ART para comprobar el consumo de sustrato para la formación de nuevos productos mediante diferentes rutas metabólicas.

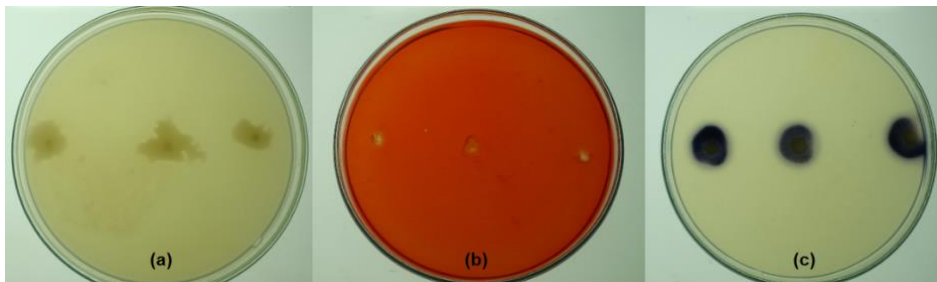
La Figura 12 presenta el consumo de los ART que se han empleado en la oxidación a lo largo de 9 días en el cultivo de MCFD con pH inicial 7.0, con respecto al control negativo, el cual fue MCFD sin inóculo. Se observa un consumo considerable desde el primer día en comparación con el control, demostrando que existe un metabolismo del sustrato hacia la formación de productos.

Figura 12. Curva de azúcares reductores totales del MCFD con pH inicial 7.0.



4.3.4 Presencia de enzimas extracelulares. De acuerdo a los protocolos seguidos, se repicaron tres colonias independientes en el medio correspondiente y se dejaron en incubación por dos días a temperatura ambiente. En la Figura 13 se aprecia la ausencia de las enzimas analizadas (proteasas, celulasas y amilasas). Posiblemente la cepa MFSR 8 produce otro tipo de enzima extracelular para degradar los compuestos complejos presentes en el mucílago de café.

Figura 13. Presencia de enzimas extracelulares (a) Proteasas, (b) Celulasas, (c) Amilasas.



5 CONCLUSIONES

- ✓ Las cepas MFSR 2, MFSR 3, MFSR 4, MFSR 5, MFSR 8, MFSR 9, MFSR 11, MFSR 13, MFSR 17 y MFSR 20 producen hidrógeno usando como sustrato sacarosa, en medio CYC líquido a los 6 días.
- ✓ Las cepas MFSR 4, MFSR 8 y MFSR 20 registran producción de hidrógeno a los 6 días de cultivo, usando como sustrato mucílago de café fresco diluido con pH sin ajustar (pH 4,41).
- ✓ Las cepas MFSR 4, MFSR 8 y MFSR 20 producen hidrógeno usando como sustrato mucílago de café fresco diluido con pH ajustado (pH 7), siendo la MFSR 8 la mejor con una producción de 50 $\mu\text{mol/L}$ presentada a los 6 días de cultivo.
- ✓ El enriquecimiento del mucílago de café fresco diluido con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno no afecta positivamente en la producción de hidrógeno.
- ✓ Realizando los cultivos en mucílago pH 7 se obtiene mayor producción de hidrógeno que sin el pH ajustado (pH 4,41).
- ✓ La inoculación de la cepa MFSR 8 en los viales se debe hacer preferiblemente el día 2 o 3 de crecimiento en cultivo CYC líquido, ya que en estos días presenta la fase exponencial de crecimiento.

6 RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar otro método de inoculación en los viales donde se garantice que la mayoría de las células del cultivo se encuentren vivas, debido a que la prueba de Densidad óptica (DO) garantiza que existan un determinado de células pero que no todas estén vivas en el cultivo.
- ✓ Realizar una continuación del proyecto, con el fin de aprovechar los residuos agroindustriales como mucilago de café, glicerol crudo, suero de leche, entre otros, modificando variables como pH, temperatura, tiempo de crecimiento o disponibilidad de nutrientes en los medios para mejorar la producción de hidrógeno u otros productos valiosos.

BIBLIOGRAFÍA

ALVAREZ, Diana. Eficiencia de la fermentación in vitro de los tractos gastrointestinales del monogástrico y del rumiante. Trabajo de grado ingeniero agrónomo. Palmira, Valle. Universidad Nacional de Colombia, facultad de ingeniería, 2006.

ANDERSON , G., and YANG, G. Determination of bicarbonate and total volatile acid concentration in anaerobic digesters using a simple titration. Water Environment Research, [online] 1992 ,N 64 [cited 11th, February, 2016] p. 53-59.

CANO, Carlos., VALLEJO, César., CAICEDO , Edgar., AMADOR , Juan., & TIQUE Evelyn. El mercado mundial del café y su impacto en Colombia. En Borradores de la economía [online], Mayo 2012, no 710. [Citado 17, Febrero, 2016]. Disponible en: http://www.banrep.gov.co/sites/default/files/publicaciones/archivos/be_710.pdf.

CEBAS-CDIC, CTC, & AGRUPAL. fermentación oscura, En Agro waste [online], Marzo 2013 [citado 12, Marzo, 2016]. Disponible en: <http://www.agrowaste.eu/wp-content/uploads/2013/02/FERMENTACION-OSCURA.pdf>

CHEN, Wen., LEE, Kuo., and CHANG , Jo. Fermentative hydrogen production with Clostridium butyricum CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. International Journal of Hydrogen Energy [online], August 2005, No 30, [cited 16th, March, 2016], p 1063-1070.

CORREDOR , Pilar., ANDRADE , Eugenio., TOHME, Joseph., DUQUE, Myriam., & FLÓREZ, Camilo. Abundancia y diversidad de las comunidades de Streptomyces en seis coberturas vegetales de la franja cafetera del Quindío, Colombia. En Acta

Biológica Colombiana Universidad Nacional de Colombia. [online], 2000, Vol 2. [Citado 22, febrero, 2016].

DAS, Debabrata., and VEZIROGLU, Nejat. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. International Journal of Hydrogen energy [online], January 2001, No 26. [Cited 13th, January, 2016] p 13-28.

DÍAZ, Pedro., & PRADA, Yessica. Estudio comparativo de las transformaciones del glicerol crudo proveniente de la industria del biodiesel en ácido láctico por una cepa nativa de *Lactobacillus* sp y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. Trabajo de grado Químico. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, 2012.

FEDERACIÓN COLOMBIANA DE CAFETEROS. Café de Colombia [online], 2010 [citado 13, Marzo, 2016]. Disponible en :http://www.cafedecolombia.com/particulares/es/el_cafe_de_colombia/

FERREIRA , María. Diseño y optimización de un medio de cultivo para tres aislamientos de actinobacterias aisladas de suelos colombianos potenciales promotoras de crecimiento vegetal (pgpr). Trabajo de grado de Microbiología Industrial. Bogotá, D.C.: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, 2012.

GÓMEZ, Javier & CANCINO, Juan. Caracterización de los productos obtenidos a partir de la fermentación de glicerol crudo con microorganismos nativos. Trabajo de grado de Química. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, 2011.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. Montly export statistics [online]. February 2016. [Cited 13th Abril,2016].

MAEDA, Toshinari., SÁNCHEZ, Viviana., and WOOD, Thomas. Escherichia coli hydrogenase 3 is a reversible enzyme possessing hydrogen uptake and synthesis activities. Applied Microbiology Biotechnology [online]. August 2007, No 76. [Cited 18th, November, 2015]. p 1035-1042.

MEDINA, Toledo. Determinación de azúcares reductores totales (ART) [online]. Lima: Universidad Interamericana para el desarrollo. 2013. [Citado 28, Marzo, 2016]. Disponible en: <http://es.slideshare.net/FranklinToledo1/determinacion-de-azucares-reductores-totales-art>

MILLER, Lorenz. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry [online],1959,No 31. [Cited 26th, January, 2016]. p 426-428.

PARÉS, Ramon., & JUAREZ, Antonio. Bioquímica de los microorganismos. Barcelona, España: Reverté S.A.1997. 334 p.

PÉREZ , Bianca., LEÓN, Antonio.,and JOSEPH, Sebastian. Optimization of Bioethanol Production from Coffee Mucilage. BioResources. 2015. Vol 10, No 3. [Cited 13th, March, 2016].

PIEDRAHITA, Yesenia., & GONZALEZ , Carlos. Estudio preliminar para la producción bacteriana de hidrógeno a partir de mucílago de café de la región de Los Santos, Santander. Trabajo de grado Ingeniería Química. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ingenierías Físicoquímicas 2015.

PRIETO, David., & ROJAS, Leidy. Evaluación de la influencia de variables fisicoquímicas en el proceso de fermentación de glicerol crudo utilizando un microorganismo nativo. Trabajo de grado Ingeniería Química. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. 2011.

PUERTA, Gloria. Influencia del proceso del beneficio en la calidad del café. Cenicafé [online] Marzo 1999.No 50 [Citado 20, Febrero, 2016]. p 78-88. Disponible en: <http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/58/1/arc050%2801%29078-088.pdf>

PUERTA, Gloria., & RÍOS, Sara. (2011). Composición química del mucílago de café, según el tiempo de fermentación y refrigeración. Cenicafé [online]. 2011, No 62. [Citado 1, Marzo, 2016].p 23-40. Disponible en: <http://www.cenicafe.org/es/documents/2.pdf>

REDONDAS, Vanessa. Obtención de hidrógeno mediante la fermentación oscura de residuos de comida y lactosuero. Trabajo de Doctorado. León, España: Universidad de León. Facultad de Ingenierías. 2013.

REVOLLO, Enrique, SERNA, Oriana, & HERNANDEZ, Jorge. Caracterización de actinobacterias raras, degradadoras de lignocelulosa: demostración de actividad lacasa en dos aislados de *Tsukamurella* sp y *Cellulosimicrobium* sp. Revista Colombiana de Biotecnología [online]. Diciembre 2012, Vol 14. No 2. [Citado 23, Enero, 2016].

RODRÍGUEZ, Yeimmy. Búsqueda de microorganismos nativos presentes en el glicerol crudo, subproducto de la transesterificación de aceite de palma, capaces de utilizar el glicerol como fuente de carbono. Trabajo de grado Ingeniería Química.

Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. 2010.

RODRÍGUEZ, Nelson., & ZAMBRANO, Diego. Los subproductos del café: fuente de energía renovable. Cenicafé [online]. Marzo 2010. [Citado 4, Febrero, 2016]. Disponible en: <http://www.jotagallo.com/agricola/assets/cenicafe-avance-tecnico-393-subproductos-del-cafe.pdf>

ROVETTO, L., & ANTONINI, S. (2011). Utilización de glicerol para la generación de hidrógeno. Córdoba, Argentina: Universidad Nacional de Córdoba [online]. 2011. [Citado 12, Marzo, 2016]. Disponible en: http://www.cab.cnea.gov.ar/ieds/images/2011/hyfuseen_2011/trabajos/12-167.pdf

SAMBROOK, Joseph., and RUSSELL , D.. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Fourth Edition. New York,USA.Cold Spring Harbor Laboratory Press.2012

SÁNCHEZ , Viviana., MOHD Zulkhairi., NAKANO, Chieri., MAEDA , Toshinari., OGAWA , Hiroaki, & WOOD, Thomas. K. (2013). Influence of Escherichia coli hydrogenases on hydrogen fermentation from glycerol. International Journal of Hydrogen Energy [online], No 30. [Cited 13, December, 2016]. p3905-3912.

SHOICHIRO, M. Screening of cellulolytic bacteria. Ogawa Laboratory Protocol. 2008 [Cited 23th March, 2016].

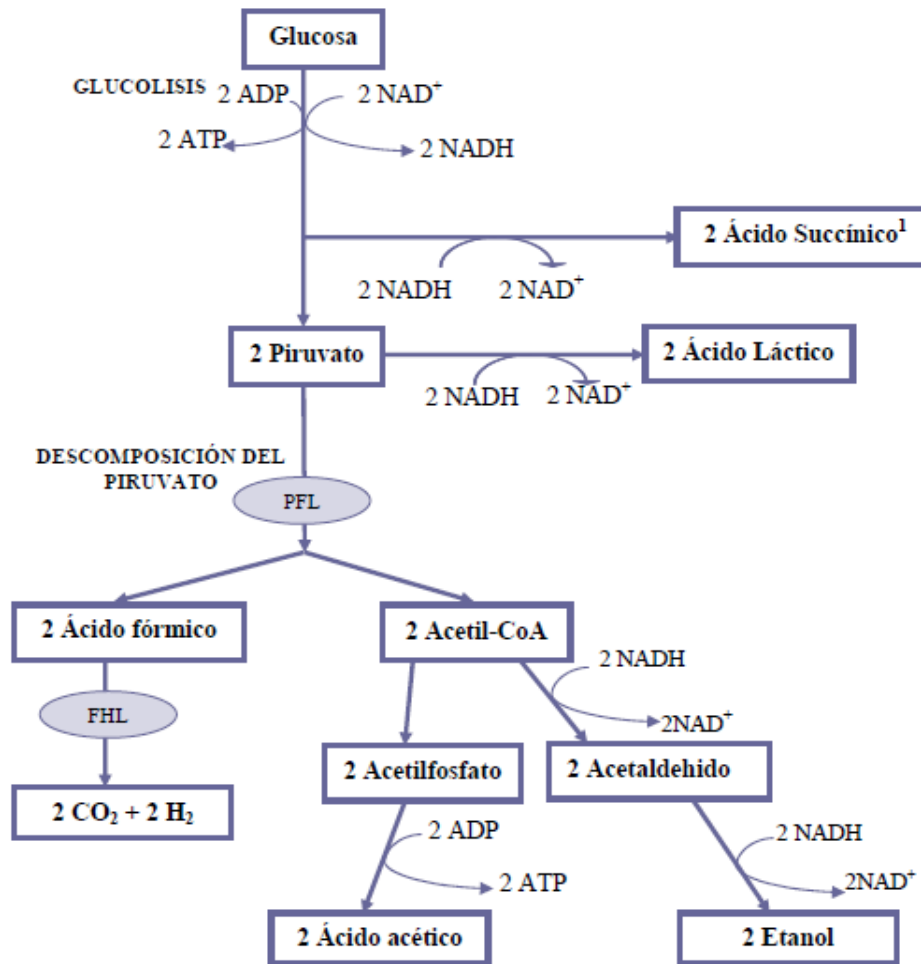
SONG Yu, and HONG Hu. (2006). Isolation and characterization of thermophilic bacteria capable of lysing microbial cells in activated sludge. IWA Publishing [online]. February 2006, No 9. [Cited 24th, January,2016]. p 35-43.

SÚA, María. Aislamiento y caracterización de actinobacterias cultibables de " aguas miel" en un sistema de producción de café orgánico (residuo post-cosecha). Trabajo de grado Biología. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. 2015.

ZHANG, Percival., EVANS, Barbara., MIELENZ, Jonhatan., HOPKINS, Robert., and ADAMS, Michael. High-Yield hydrogen production from starch and water by a synthetic enzymatic pathway. Plos one [online]. May 2007- [Cited 22 March, 2016].

ANEXOS

ANEXO A. ESQUEMA DE LAS PRINCIPALES RUTAS DE FERMENTACIÓN DE GLUCOSA IMPLICADAS EN LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO DE *ESCHERICHIA COLI*.



Fuente:

REDONDAS, Vanessa. Obtención de hidrógeno mediante la fermentación oscura de residuos de comida y lactosuero. Trabajo de Doctorado. León, España: Universidad de León. Facultad de Ingenierías. 2013.

ANEXO B. MEDIO DE CULTIVO CYC CZAPEK-DOX-EXTRACTO DE LEVADURA-CASAMINOÁCIDOS.

Componente	g/L
Sacarosa	30
Agar Bacteriológico	15
Casaminoácidos	6
NaNO ₃	3
Extracto de levadura	2
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,5
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0,01
KCl	0,5

Fuente:

REVOLLO, Enrique, SERNA, Oriana, & HERNANDEZ, Jorge. Caracterización de actinobacterias raras, degradadoras de lignocelulosa: demostración de actividad lacasa en dos aislados de *Tsukamurella* sp y *Cellulosimicrobium* sp. Revista Colombiana de Biotecnología [online]. Diciembre 2012, Vol 14. No 2. [Citado 23, Enero, 2016].

ANEXO C. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DE MUCÍLAGO DE CAFÉ FILTRADO.

	LABORATORIO QUÍMICO DE CONSULTAS INDUSTRIALES	Código: F-PA-02	
	POST-ANALITICO	Versión: 05	
	INFORME DE RESULTADOS	Fecha: 2012/01/16 Página 1 de 2	

Informe de resultados No.	I-16-089	Fecha de emisión:	Marzo 15 de 2016
Cliente:	ERIKA LUCIA RODRIGUEZ – PROFESORA VIVIANA SANCHEZ		
Dirección del cliente:	Carrera 16 A W No. 61-60		
Solicitud de servicio No.	16-079	No. de muestras:	01
Fecha de recepción de las muestras:	Marzo 02 de 2016		
Muestras recibidas por:	Amparo López		
Fecha de análisis:	Marzo 02 de 2016 – Marzo 15 de 2016		

1. ANALISIS FISICOQUIMICO

Codificación de la Muestra:	16-079-01	Tipo de muestra:	Puntual
Identificación de la muestra:	MUCILAGO FRESCO		
Matriz de la muestra:	Agua Cruda		
Muestreo realizado por:	El Cliente		
Lugar y punto de muestreo:	Mesa de los Santos / Hacienda El Roble		
Fecha del muestreo:	Diciembre 20 de 2015		

PARAMETRO	RESULTADO	METODO
Carbono Orgánico Total (mg C/L)	36,17	Espectrofotométrico/ SM 5310 C
Nitrógeno Orgánico (mg N _{org} /L)	783,24	Kjeldahl/Titrimétrico/ SM 4500-N _{org} C

Relación Carbono Nitrógeno	0,04	Relación Matemática
Demanda Química Oxígeno (mg O ₂ /L)	92184	Titrimétrico -Reflujo Cerrado/SM 5220 C

Observaciones: *Ninguna*

Nota 1: Estos resultados son válidos únicamente para las muestras analizadas y reportadas por el laboratorio.

Nota 2: En caso de ser copia del resultado original se realizará la siguiente aclaración: Copia del resultado original.

Estimado cliente: Para nosotros es muy importante conocer sus inquietudes, sugerencias, felicitaciones, quejas y/o reclamos en los servicios prestados por el laboratorio, con el propósito de mejorar nuestros servicios. Le agradecemos que se comunique con el laboratorio, donde un miembro del personal amablemente recibirá su solicitud y pronto estaremos en comunicación con usted para aclarar y/o resolver su requerimiento.

Informe de resultados No. I-16-089

Solicitud de servicio No. 16-079

Revisó y aprobó:



Luz Yolanda Vargas Fiallo

Directora del Laboratorio

Química. M.Sc Química UIS

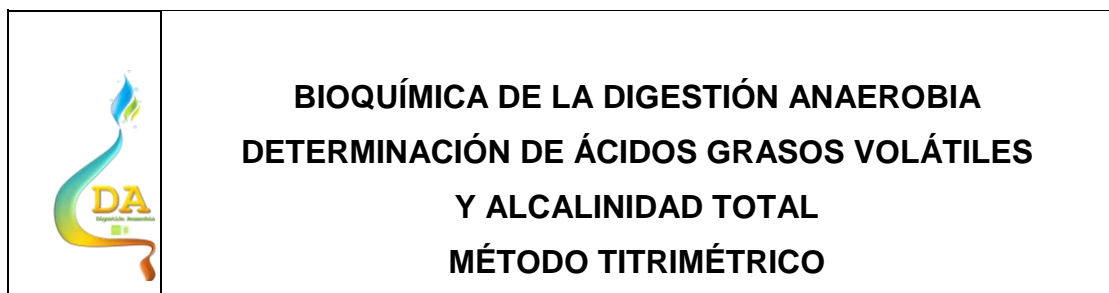
MP PQ 1144

Elaboró: Amparo López G

ANEXO D. MEDIO MÍNIMO DE SALES.

Componente	g/L
H ₃ BO ₃	0,3
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,2
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,1
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,03
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0,03
NiCl ₂ · 6H ₂ O	0,02
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,01

ANEXO E. PROTOCOLO PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES Y ALCALINIDAD TOTAL, ESTAS DOS ÚLTIMAS USANDO EL MÉTODO TITRIMÉTRICO.



Definición

Los ácidos grasos volátiles -AGV- son ácidos orgánicos (acético, propiónico, butírico y láctico) producto de la fermentación de carbohidratos, lípidos y proteínas por bacterias acidogénicas durante la digestión anaerobia. La alcalinidad es una medida de la capacidad de una muestra de neutralizar ácidos. Los carbonatos y bicarbonatos son los compuestos que más contribuyen a la alcalinidad total -AT- y se forman por reacción del dióxido de carbono con la materia orgánica.

Fundamento

Cuando una muestra se lleva a pH 3.0 con HCL 0.1N, el bicarbonato presente es convertido en dióxido de carbono; los ácidos grasos volátiles -AGV- están presentes en forma no ionizada en la solución. Cuando la muestra se somete a calentamiento hasta el punto de ebullición con un sistema de condensación para remover el CO₂ y posteriormente se titula con NaOH 0.1N hasta pH 6.5, los ácidos grasos volátiles son convertidos a su forma disociada. Los equivalentes de bicarbonato y ácidos grasos se pueden calcular a partir de los volúmenes de ácido y base utilizados en la titulación.

Procedimiento

1. Centrifugar entre 7 y 20 mL de muestra (el volumen depende de los sólidos que ésta tenga) a 5000 rpm por 30 minutos en un tubo Falcon de 50 mL.
2. Pasar el sobrenadante a un tubo o vaso de precipitado y medir el pH inicial.

3. A 5 mL de la muestra, adicionar 25 mL de agua destilada -AD- y llevar a la plancha de agitación usando agitador magnético (perla) en vaso de 50 mL.
4. Medir nuevamente el pH. Si es mayor de 6.5, se agrega HCl 0.1N hasta pH 6.5 para iniciar la titulación con HCl 0.1N hasta pH 3.0. Anotar el volumen utilizado (A).
5. Pasar la muestra a un balón de destilación, conectar al equipo y calentarlo con mechero o estufa hasta ligera ebullición por 2 min.
6. Desmontar el balón del destilador e introducirlo en hielo para hacer choque térmico.
7. Pasar la muestra al vaso y llevarla nuevamente a agitación con la perla mientras se mide el pH y se adiciona NaOH 0.1N hasta pH 6.5. Anotar el volumen gastado (B).

Cálculos

Para hallar la concentración de AT y AGV, se despeja la ecuación:

$$V_1 * C_1 = V_2 * C_2$$

AT: Se expresa como carbonato de calcio (mg CaCO₃/L). Entonces:

$$AT(mg CaCO_3/L) = \frac{A * N HCl}{Vol. muestra} * 50000$$

En donde:

A = Volumen de HCl utilizado

N HCl = 0.1 Vol. muestra = 5 mL

50000 = 50 mg CaCO₃/meq x 1000 mL/L

AGV: Se expresa como ácido acético (mg ácido acético/L). Entonces:

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

En donde:

B= Volumen de NaOH utilizado

N NaOH= 0.2 Vol. Muestra= 5ml
60000= 60 mg Ac. Acético/ meg* 1000 ml/L

Fuente:

ANDERSON,G.. And YANG, G., 1992. Determination of bicarbonate and total volatile acid concentration in anaerobic digesters using a simple titration. Water Environment Research 64, 53–59.

ANEXO F. PROTOCOLO PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES POR MEDIO DEL MÉTODO DNS.

Protocolo DNS

Para la aplicación del método DNS de Miller se necesita preparar el reactivo DNS con el fin de determinar los azúcares reductores presentes en los medios de cultivo que utilizaremos en la producción de surfactina. El procedimiento se indica a continuación:

Preparación reactivo DNS

1. Disolver 8g de NaOH en agua destilada
2. Adicionar 150 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado y 5g de DNS (ácido 3,5-dinitrosalisílico)
3. Con un agitador magnético agitar la mezcla hasta que se disuelva completamente el DNS
4. Aforar la mezcla a 500mL con agua destilada y almacenar en un frasco ámbar a 4°C.

El procedimiento anterior debe realizarse en ausencia de luz. La concentración de azúcares reductores se determina utilizando una curva de calibración absorbancia en función de concentración, utilizando glucosa.

Para obtener esta curva se requiere:

1. Preparar 5 muestras que contengan concentraciones de glucosa las cuales varíen de 200-1000 mg/L. Además, se debe utilizar una muestra denominada "Blanco" la cual sería la base y tendría una concentración de 0mg/L de glucosa.

2. Mezclar 0,5 mL de cada una de las 6 muestras preparadas anteriormente con 0,5mL del reactivo DNS almacenado.
3. Ebulir por 5 minutos en baño de maria e inmediatamente detener la reacción con baño de agua y hielo.
4. Reconstruir las muestras con 5mL de agua destilada.
5. Agitar y dejar en reposo por 15 min.
6. Determinar la absorbancia de las muestras en un espectro-fotometro a una longitud de onda de 540nm.
7. Realizar el procedimiento anterior 3 veces y con el promedio determinar la curva de calibración de la glucosa, teniendo en cuenta que el R^2 debe ser mayor a 0,96 y la desviación estándar de 10% máximo.

Fuente:

ÁVILA R., RIVAS B., HERNÁNDEZ R., CHIRINOS M. Contenido de azucares totales, reductores y no reductores en Agave cocui Trelease. Centro de Investigaciones en Ciencias Básicas, Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda, Núcleo Académico Los Perozos. Santa Ana de Coro, Falcón, Venezuela.

ANEXO G. IDENTIFICACIÓN CUALITATIVA DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE AMILASAS, PROTEASAS Y CELULASAS.

.¹

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

¹ Para todos los medios se le agregaron 15 g/L de agar

Extracto de levadura 1 g

Fuente:

SONG Yu, and HONG Hu. (2006). Isolation and characterization of thermophilic bacteria capable of lysing microbial cells in activated sludge. IWA Publishing [online]. February 2006, No 9. [Cited 24th, January,2016]. p 35-43.

SHOICHIRO, M. Screening of cellulolytic bacteria. Ogawa Laboratory Protocol. 2008 [Cited 23th March, 2016].