

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS SAPONINAS *Furcraea ssp* SOBRE EL
METABOLISMO MICROBIANO DE LA MEZCLA LODO-ESTIÉRCOL DE CERDO
Y LÍQUIDO RUMINAL PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS A PARTIR DE
BAGAZO DE FIQUE

LILIANA CRISTINA MENDOZA FLÓREZ

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

2012

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS SAPONINAS *Furcraea ssp* SOBRE EL
METABOLISMO MICROBIANO DE LA MEZCLA LODO-ESTIÉRCOL DE CERDO
Y LÍQUIDO RUMINAL PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS A PARTIR DE
BAGAZO DE FIQUE

LILIANA CRISTINA MENDOZA FLÓREZ

Trabajo de Grado Presentado como Requisito para
Optar al Título de Ingeniero Químico

Director:

PhD. Humberto Escalante Hernández

Codirector:

PhD. Carolina Guzmán Luna

PhD. Liliana Castro Molano

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

2012

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 DIGESTIÓN ANAEROBIA	13
1.1.1 Actividad hidrolítica	14
1.1.2 Actividad metanogénica	15
1.2 SAPONINAS ESTEROIDALES.....	16
1.2.1 Procesos de extracción de saponinas	17
2. MATERIALES Y MÉTODOS	19
2.1 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS SAPONINAS SOBRE LA ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DEL INÓCULO MEZCLA LEC + LR	20
2.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS SAPONINAS SOBRE LA ACTIVIDAD METANOGÉNICA DEL INÓCULO MEZCLA LEC + LR	20
2.3 EXTRACCIÓN DE LA SAPONINA DEL BF	22
2.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS SAPONINAS SOBRE EL RENDIMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE METANO A PARTIR DE BAGAZO DE FIQUE	23
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
3.1 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS SAPONINAS SOBRE LA ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DEL INÓCULO MEZCLA LEC + LR	24
3.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS SAPONINAS SOBRE LA ACTIVIDAD METANOGÉNICA DEL INÓCULO MEZCLA LEC + LR	26
3.3 EXTRACCIÓN DE LA SAPONINA DEL BF	28
3.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS SAPONINAS SOBRE EL RENDIMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE METANO A PARTIR DE BAGAZO DE FIQUE	29
4. CONCLUSIONES	33
BIBLIOGRAFÍA	34

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de operación de la digestión anaerobia del BF.	23
Tabla 2. AH del inóculo en presencia de diferentes concentraciones de saponina	25
Tabla 3. Rendimiento de la producción de metano a diferentes concentraciones de saponina	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la saponina del BF (Osorio <i>et al.</i> , 2010)	16
Figura 2. Actividad hidrolítica del consorcio microbiano en presencia de diferentes concentraciones de saponina (<i>Furcraea ssp</i>)	24
Figura 3. Volumen acumulado de metano en presencia de diferentes concentraciones de saponina (<i>Furcraea ssp</i>)	26
Figura 4. Prueba de espuma y porcentaje de hemólisis del BF lavado.....	28
Figura 5. Comportamiento a diferentes concentraciones de saponina de: a) Concentración de ART, b) pH, c) volumen acumulado de metano	30
Figura 6. Distribución de medias para el rendimiento de la producción de metano	32
Figura 7. Curva estándar de glucosa	40

ANEXOS

ANEXO 1	38
ANEXO 2	
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES	40
ANEXO 3	
PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE SAPONINAS.....	41
ANEXO 4	
PROTOCOLO COMPROBACIÓN DE PRESENCIA DE SAPONINAS.....	42
ANEXO 5	
PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE SAPONINAS.....	43
ANEXO 6	
PROTOCOLO COMPROBACIÓN DE PRESENCIA DE SAPONINAS.....	44

LISTA DE SÍMBOLOS

AGV	=	Ácidos Grasos Volátiles
AGVT	=	Ácidos Grasos Volátiles Totales
AT	=	Alcalinidad Total
AH	=	Actividad Hidrolítica
AME	=	Actividad Metanogénica Específica
ART	=	Azúcares Reductores Totales
BF	=	Bagazo de fique
DA	=	Digestión Anaerobia
DBO	=	Demanda Biológica de Oxígeno
DQO	=	Demanda Química de Oxígeno
LR	=	Líquido Ruminal Bovino
LEC	=	Lodo Estiércol de cerdo
SSV	=	Sólidos Suspendidos Volátiles
SV	=	Sólidos Volátiles

RESUMEN

TÍTULO: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS SAPONINAS *FURCRAEA SSP* SOBRE EL METABOLISMO MICROBIANO DE LA MEZCLA LODO-ESTIÉRCOL DE CERDO Y LÍQUIDO RUMINAL PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS A PARTIR DE BAGAZO DE FIQUE ¹

AUTOR: LILIANA CRISTINA MENDOZA FLÓREZ²

Palabras clave: Bagazo de fique, saponinas, digestión anaerobia, metano, líquido ruminal, lodo-estiércol de cerdo

El bagazo de fique (BF) es un residuo de la producción de fibras vegetales procedentes del fique. Estudios recientes señalan que este material lignocelulósico puede ser usado como sustrato para la producción de biogás mediante digestión anaerobia (DA) alcanzando un rendimiento de 0,30 m³CH₄/kg SSV. Sin embargo, compuestos tensoactivos como las saponinas que están presentes en el jugo de fique con una concentración de 4,48 g/kg impregnan al bagazo y pueden afectar la producción de metano debido a la dificultad que tendrían los microorganismos a acceder a la fuente de carbono. Por tal razón, fue necesario evaluar el comportamiento metabólico del inóculo (líquido ruminal y lodo-estiércol de cerdo) en presencia de diferentes concentraciones de saponina (*Furcraea ssp*). Los experimentos realizados demostraron que la actividad hidrolítica del inóculo es favorecida por la presencia de saponinas ya que el consorcio microbiano logró romper el enlace glucosídico de las saponinas y degradó los azúcares presentes. En el caso de las bacterias metanógenas se presentó una leve activación del volumen de metano cuando se adicionó concentraciones de saponina inferiores a 60 ppm, no obstante, la producción de metano se inhibe si la cantidad agregada supera este valor. El efecto de altas concentraciones de saponinas sobre el rendimiento de la producción de metano a partir de BF lavado no se pudo comprobar debido a un alto error experimental.

¹Tesis de Grado

²Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director PhD. Humberto Escalante Hernández Codirectores: PhD. Carolina Guzmán Luna PhD. Liliana Castro Molano

ABSTRACT

TITLE: EVALUATION OF THE EFFECT OF SAPONINS *Furcraea ssp* ON MICROBIAL METABOLISM OF THE MIXTURE PORCINE MANURE-SLUDGE AND RUMINAL LIQUID IN THE PRODUCTION OF BIOGAS FROM FIQUE'S BAGASSE¹

AUTHOR: LILIANA CRISTINA MENDOZA FLÓREZ²

Key Words: fique's bagasse, saponins, anaerobic digestion, methane, porcine manure sludge, ruminal liquid.

Fique's bagasse (BF) is a residue from the production of fibers from the fique plant. Recent research points that this lignocellulosic material can be used as a substratum in the bio-gas production process due to anaerobic digestion, showing a methane yield 0,30 m³/kilogram of Suspended Volatile Solid. However, surfactant compounds, such as saponins, exist in the juice of fique showing a concentration of 4,48 g/kg; these saponins impregnate the bagasse and the methane production can become affected because of the microorganisms difficulty accessing the carbon source. Thus, it was necessary to evaluate the metabolic behavior of the used inoculum (ruminal liquid, porcine manure sludge,) presenting several concentration of saponins (*Furcraea ssp*). Performed tests showed that hydrolytic activity of the inoculums is enhanced by the presence of saponins since the microbial consortium managed to break the glycosidic bond in the saponins, and also managed to degradate the existing sugars. A slight activation of methane volumen was observed from the methanogenic bacteria when saponins concentration lower than 60 ppm was added. Nevertheless, methane production becomes inhibited if saponins concentration is higher than 60 ppm. The effect of high saponins concentration on the efficiency of methane production from fique's bagasse could not be checked because of high experimental errors.

¹Thesis

²Chemical Engineering Department. Advisors PhD. Humberto Escalante Hernández. Codirector PhD. Carolina Guzmán Luna PhD. Liliana Castro Molano

1. INTRODUCCIÓN

La digestión anaerobia (DA) de biomasa es un proceso bioquímico, mediante el cual se descompone la materia orgánica por la acción de un consorcio microbiano bajo condiciones libres de oxígeno, se estabiliza el residuo y se produce biogás (Li *et al.*, 2011). La DA es una tecnología que minimiza los problemas de efecto invernadero. Los microorganismos que intervienen en la degradación anaerobia se caracterizan por tener alta actividad hidrolítica (AH), es decir tiene la capacidad de degradar las moléculas orgánicas complejas y alta actividad metanogénica (AME), mecanismo de transformación de los compuestos formados en la actividad hidrolítica en metano (Angelidaki *et al.*, 2011).

La DA ha sido ampliamente utilizada en el tratamiento de los desechos agrícolas, residuos de alimentos y los lodos de aguas residuales, debido a que combina la reducción de la demanda química de oxígeno (DQO) y la demanda biológica de oxígeno (DBO) de los flujos de residuos con la producción de energía renovable (Li *et al.*, 2011).

La DA ha sido empleada para la estabilización de biomasa agrícolas, por ejemplo, a partir de la planta acuática *Cattailse* se alcanzó una conversión de sólidos volátiles a metano del 66%, empleando líquido ruminal como inóculo (Zhen-Hu *et al.*, 2006). A partir del sisal y del maíz se obtuvieron producciones de biogás con 60% v/v de metano (Mshandete *et al.*, 2004; Raposo *et al.*, 2006). Residuos como el suero de leche, la cebada y el arroz al ser sometidos a DA mostraron alto potencial de biometanización, generando producciones específicas de metano en términos de sólidos suspendidos volátiles (SSV) de 501, 229 y 195 ml CH₄/kgSSV, respectivamente (Dinuccio *et al.*, 2010). De igual forma, la producción de biogás a partir de bagazo de fique (BF) alcanza un rendimiento de 0,30 m³CH₄/kg SSV empleando como inóculo una mezcla de líquido ruminal bovino (LR) y lodo estiércol de cerdo (LEC) (Quintero *et al.*, 2012).

Por otra parte, las saponinas que se encuentran en el jugo de fique con una concentración de 4,48 g/kg (Universidad Pontificia Bolivariana, 2009), que impregnan el bagazo pueden afectar la producción de biogás. Las saponinas son metabolitos secundarios de las plantas y se definen como glicósidos de alto peso molecular formados por la unión de una cadena ramificada de azúcares (ramnosa, glucosa, arabinosa) y una aglicón mediante un enlace glucosídico, de acuerdo con la naturaleza de su aglicón se pueden clasificar en esteroidales, triterpenoides o alcaloides (Oleszek, 2002). Dado que las saponinas se caracterizan por formar abundante espuma, tener propiedades hemolíticas y tensoactivas (Hassan *et al.*, 2010; Soliva *et al.*, 2008), pueden influir en el metabolismo del consorcio microbiano.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo de investigación fue evaluar el comportamiento metabólico del consorcio microbiano de la mezcla del LEC y LR mediante la cuantificación de la AH, AME y el rendimiento de la producción de metano a diferentes concentraciones de las saponinas (*Furcraea ssp*) provenientes del bagazo de fique.

1.1 DIGESTIÓN ANAEROBIA

La degradación anaerobia es un proceso de varios pasos complejos realizados por la acción de tres grandes grupos fisiológicos de microorganismos: bacterias primarias (fermentación hidrolítica-acidogénica), bacterias oxidantes anaeróbicas (acetogénesis) y arqueas metanogénicas.

La DA se lleva a cabo en cuatro etapas: a) la hidrólisis de las macromoléculas b) la acidogénesis de los monómeros, c) la acetogénesis y d) la metanogénesis.

La hidrólisis consiste en la reducción de las macromoléculas complejas como carbohidratos, proteínas y lípidos, las cuales son hidrolizadas por la acción de

enzimas extracelulares de las bacterias hidrolíticas convirtiéndolos en monosacáridos, aminoácidos y ácidos grasos, respectivamente.

Durante la acidogénesis, los productos obtenidos de la hidrólisis son transformados en ácidos grasos volátiles (AGV) como ácido propiónico, acético, butírico, entre otros. En la acetogénesis, se genera acetato mayoritariamente, H₂ y CO₂. La metanogénesis es el paso final, donde actúa el consorcio metanogénico utilizando el acetato para producir biogás con elevada concentración de metano (CH₄) y dióxido de carbono (CO₂) (Parawira *et al.*, 2005).

1.1.1 Actividad hidrolítica

El término hidrólisis se utiliza en la DA para describir una amplia gama de procesos de despolimerización y solubilización, por el cual complejos compuestos orgánicos poliméricos son descompuestos en monómeros solubles gracias a la acción de enzimas extracelulares producidas por bacterias anaerobias facultativas (Angelidaki *et al.*, 2011).

La hidrólisis es ampliamente considerada como el paso limitante de la degradación de la materia orgánica particulada (por ejemplo, el estiércol, residuos de cosechas, etc). Por lo tanto, la tasa global del proceso está determinada por la tasa de hidrólisis del sustrato. También hay consideraciones especiales dependiendo de los componentes existentes en el sustrato, los cuales pueden estar formados por biofibras (son una mezcla de celulosa, hemicelulosa y lignina), carbohidratos, proteínas y grasas. Esto debido a que la lignina es muy resistente a la degradación por parte de los microorganismos anaerobios, afectando también a la biodegradación de la celulosa, hemicelulosa y de otros hidratos de carbono (Parawira *et al.*, 2005).

El pH es otra variable importante para proporcionar un sustrato estable y más favorable para el paso metanogénico. El pH óptimo en esta etapa se encuentra

entre 5 y 6, mientras que para la acetogénesis se recomienda pH entre 5,5 y 6,5 (De la Rubia *et al.*, 2009).

La AH indica la habilidad inherente de una población microbiana para degradar fuentes de carbono (celulosa, almidón, etc), se cuantifica como la velocidad específica de consumo de sustrato. El uso del reactivo 3,5-ácido dinitrosalicílico (DNS) para la determinación de azúcares reductores no sólo es un método ampliamente practicado, también es un ensayo recomendado por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) para la medición de la actividad de la celulasa (Najmus *et al.*, 2011).

1.1.2 Actividad metanogénica

Los microorganismos *Archaea* metanogénicos son responsables del paso final en el proceso de DA para la formación de metano a partir de acetato y alcoholes. Los metanógenos son anaerobios estrictos, tienen un metabolismo único formado por una serie de enzimas y coenzimas, generando una similiación de nutrientes lenta (Angelidaki *et al.*, 2011).

Para evaluar la AME se determina la capacidad del consorcio microbiano para generar metano, la cual se mide bajo condiciones controladas de temperatura. La actividad metanogénica se mide bajo condiciones de saturación de sustrato; por tanto, la concentración de AGV deberá ser suficiente para que su difusión en el biorreactor no constituya una limitante. La medición de la producción de metano se realiza por desplazamiento de líquido. El biogás producido burbujea en una solución alcalina (NaOH o KOH) con pH mayor a 12 en el cual el CO₂ es adsorbido y el volumen de gas metano desplazará un volumen igual de solución alcalina (Díaz Báez *et al.*, 2002).

1.2 SAPONINAS ESTEROIDALES

Cuando las saponinas son hidrolizadas se obtiene una aglicona, conocida comúnmente como sapogenina. En la planta de fique (*Furcraea ssp*) se encuentra una aglicona esteroidal, principalmente la hecogenina y la tigogenina (Barbosa, 2006). Osorio *et al.*, (2010) mediante espectrometría de masas (ESI-MS) propusieron una estructura química de las saponinas del bagazo de fique (BF), las cuales contienen una hecogenina y dos unidades de hexosa (Figura 1).

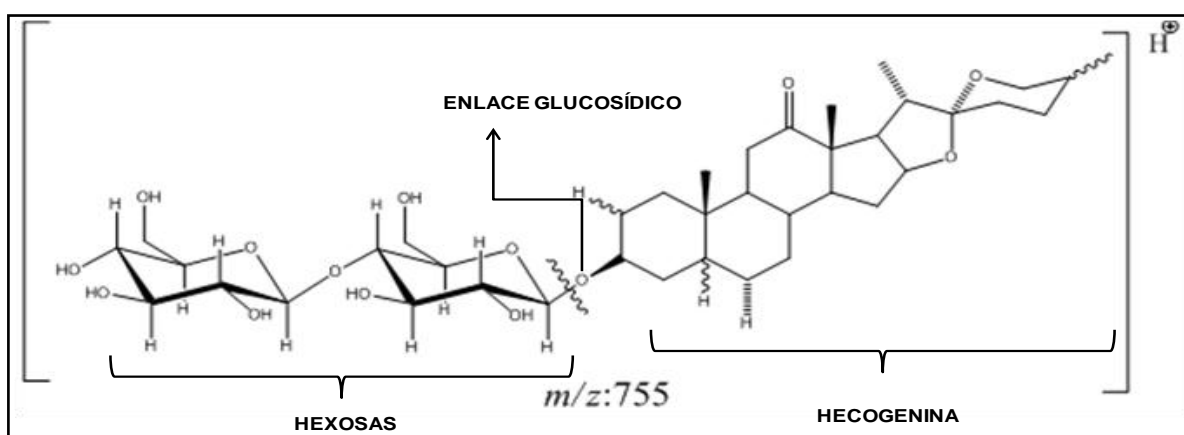


Figura 1. Estructura química de la saponina del BF (Osorio *et al.*, 2010)

Las investigaciones relacionadas con la influencia de las saponinas sobre los rendimientos de la producción de biogás son limitadas y contradictorias. Por ejemplo, se demostró que las saponinas reducen la concentración de protozoos presentes en el LR, causando supresión de la metanogénesis (Hu *et al.*, 2005). Resultados similares fueron reportados para la digestión anaerobia de harina de maíz y pasto empleando LR como inóculo (Hui Ling *et al.*, 2010). Patra *et al.*, 2010, confirmaron que altas concentraciones de saponinas inhiben la producción de metano. Sin embargo, el efecto directo de estos compuestos sobre la actividad metanogénica de las bacterias no se ha demostrado.

Por otra parte, Hu *et al.*, (2005) demostraron que la AH del rumen permitió degradar saponina del Quillay (Quillaja saponaria, árbol endémico de Chile) sin causar inhibición. Igualmente, comprobaron que las saponinas pueden ser utilizadas como estimulantes de la actividad metanogénica de los microorganismos causando incrementos del 16% en la producción de biogás a partir de la co-digestión de desechos de cocina y estiércol de ganado.

1.2.1 Procesos de extracción de saponinas

La extracción de saponinas a partir de diversos materiales biológicos ha sido reportada bajo múltiples procedimientos. Sin embargo, dada la naturaleza polar de estos compuestos, todos los métodos coinciden en la extracción en caliente o en frío, con agua o alcoholes de bajo peso molecular. Recientemente, algunos investigadores se han centrado en el desarrollo de métodos de extracción de saponinas usando como solventes metanol, etanol, butanol y mezclas de diferentes proporciones de estos alcoholes y agua (Hernández *et al.*, 2005).

- Extracción soxhlet: implica contacto sólido-líquido para la eliminación de uno o más compuestos de un sólido mediante disolución en una fase líquida de reflujo. Su ventaja más importante es llevar repetidamente la muestra en contacto con partes de disolvente fresco, lo que evita que el solvente se sature con el material extraíble y por tanto, mejora la eliminación del compuesto presente en el sólido. Además, existe un exceso de energía en forma de calor que ayuda a aumentar la cinética debido a que la temperatura del sistema es ligeramente mayor que el punto de ebullición del solvente (Vongsangnak *et al.*, 2004).
- Extracción asistida con ultrasonido: Es un método emplea sonidos de alta frecuencia para extraer las saponinas en el material vegetal. Las partículas

sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica aumentando tanto la penetración de disolvente como la liberación del producto intracelular ocasionado por la ruptura de las paredes que se debe principalmente a los efectos mecánicos de la cavitación acústica y como consecuencia el compuesto pasa rápidamente del fique al solvente (Vongsangnak *et al.*, 2004; Sáiz *et al.*, 2010).

- Extracción mediante lavado: Es posible debido a que la saponina tiene un alto grado de afinidad con el agua y otros solventes polares, este método depende del flujo de solvente y del tiempo de lavado.

Métodos analíticos para identificar saponinas

- ✓ *Prueba hemolítica*: forma de cuantificar indirectamente la presencia de saponinas es la realización, ya que las saponinas pueden formar complejos con los esteroides de la membrana eritrocitaria provocando un aumento de la permeabilidad y la consiguiente pérdida de hemoglobina (Gauthier *et al.*, 2009; Hassan *et al.*, 2010).
- ✓ *Ensayo de espuma*: Las saponinas tiene la capacidad de disolverse en agua para formar soluciones coloides, esta característica se utiliza para comprobar la presencia de estos compuestos en una solución acuosa. La forma de realizar esta prueba consiste en medir la altura y el tiempo que dura la espuma formada por una solución de saponinas mediante agitación (Oleszek *et al.*, 2002; Sparg *et al.*, 2004).
- ✓ *Métodos de determinación no biológicos*: Estos métodos identificación de saponina total incluyen espectrometría, densitometría, cromatografía de gases, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y electroforesis capilar. Mientras que los primeros tres métodos son utilizados para la

cuantificación de saponinas y/o saponinas en material vegetal, las recientes técnicas son capaces de realizar una detección rápida inicial de todos los compuestos presentes (Oleszek, 2002).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para evaluar el efecto de las saponinas sobre la DA del BF, se desarrollaron dos etapas: a) inicialmente se evaluó la influencia individual del tensoactivo sobre las AH y AME del consorcio microbiano y b) posteriormente, se procedió a extraer del BF la saponina y evaluar el mejoramiento del rendimiento de la DA.

Para la primera etapa se tuvieron como variables respuesta la AH y la AME del consorcio (LR + LEC) sometido a proceso de hidrólisis y metanogénesis a diferentes niveles de concentración del tensoactivo. Esta actividad permitió definir la máxima concentración de saponina que incide sobre las etapas de la DA. Posteriormente, para la segunda etapa, la variable de respuesta fue el rendimiento de la producción de metano, el BF libre de saponina fue saturado con este esteroide para realizar la DA y evaluar su incidencia.

Como inóculo se empleó la mezcla 1:1 de LR + LEC. El LR se recolectó en la planta de sacrificio animal “Frigorífico Vijagua” (Bucaramanga-Santander). El LEC se obtuvo de la laguna de estabilización de la “Porcícola Porto Ferrayo” (Mesa de los Santos-Santander).

El extracto de saponinas (*Furcraea ssp*) fue adquirido del Laboratorio CIBIOT de la Universidad Pontificia Bolivariana (Sede Medellín) que tiene estandarizado el proceso para extraerlo a partir del jugo de fique, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución con detección en *PDA* (*PhotoDiodeArray*) (anexo 1).

2.1 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS SAPONINAS SOBRE LA ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DEL INÓCULO MEZCLA LEC + LR

La AH del consorcio microbiano en presencia de las distintas concentraciones de saponina (*Furcraea ssp*) se basó en la capacidad de hidrólisis de la celulosa de acuerdo con el protocolo descrito por Hu, *et al* (2004). El volumen de inóculo a usar es equivalente a una concentración de 1,5 g/l de SSV y como sustrato se adicionó 10 g/l de celulosa, aforando con medio mineral balch (cisteína (0,5 g/l), NaHCO₃ (5 g/l) y Na₂S como agente reductor) hasta obtener un volumen de operación de 35 ml, a cada bioreactor se le agregó una concentración diferente de saponina (30 ppm, 60 ppm, 90 ppm y 120 ppm).

Se procesó un experimento control (sin saponinas). La temperatura de incubación fue de 39 ± 2 °C. Durante cada hora se tomaron muestras de los diferentes ensayos para cuantificar la concentración de ART (anexo 2) por el método colorimétrico definido por Miller, (1959). La AH fue determinada usando la máxima producción de ART y definida como la variable respuesta en esta etapa expresada en gD.Q.Oglucosa/gSSV*día.

2.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS SAPONINAS SOBRE LA ACTIVIDAD METANOGÉNICA DEL INÓCULO MEZCLA LEC + LR

La determinación de la capacidad del inóculo para producir gas con las diferentes concentraciones de saponina (*Furcraea ssp*) se evaluó mediante el test de AME (Díaz Báez *et al.*, 2002). Los ensayos contenían un volumen de inóculo equivalente a 1,5 g/l de SSV y medio mineral balch, como sustrato se utilizó acetato de sodio con una concentración de 10% g/v. El volumen de operación fue de 35 ml y la temperatura de incubación fue de 39 ± 2 °C.

Para cuantificar el metano producido se hizo pasar el biogás a una botella con NaOH (0,1N). La presión del biogás desplaza la soda que fluye por una manguera hacia un colector donde se almacenaba y se cuantificaba el volumen obtenido. Los experimentos fueron realizados por duplicado durante 120 horas. El cálculo de la AME se realizó utilizando las ecuaciones 1 y 2.

$$AME = \frac{P}{FC * V * SSV} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

AME = Actividad metanogénica específica (g DQO/g SSV * día).

P = Máxima pendiente de la cinética de producción de metano para cada experimento (ml/día).

FC = Factor de conversión de g DQO (430 ml CH₄ húmedo/g DQO 39 °C

V = Volumen de operación utilizado en el ensayo (l).

SSV= Concentración de Sólidos Suspendidos Volátiles en el inóculo (g/l).

$$V_0 = V * \frac{(P_L - P_V) T_0}{P_0 T} P_V = 10e^{\left(16,573 - \frac{3988,842}{T - 39,47}\right)} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde:

V₀ = Volumen de gas en condiciones normales (ml).

V = Volumen de gas generado (ml).

P_L = Presión atmosférica en la medición (mbar).

P_V = Presión de vapor a la presión y temperatura de medida (mbar).

P₀ = Presión de metano en condiciones normales (1013,25 mbar).

T = Temperatura ambiental en el momento de la medida (K).

T_0 = Temperatura del metano en condiciones normales (273,15 K).

2.3EXTRACCIÓN DE LA SAPONINA DEL BF

El BF se obtuvo de una planta de procesadora ubicada en Mogotes, Colombia, posteriormente se filtró, desfibró y lavó durante 15 días (anexo 3) para obtener un fique libre de saponinas (Molgaard *et al.* 2000).

Para confirmar la ausencia de saponinas en el sustrato se efectuaron dos pruebas cuantitativas, la primera, denominada prueba de espuma (anexo 4), en la cual se midió la altura de la espuma formada por una suspensión de fique en agua después de 30 segundos de agitación de acuerdo con el protocolo descrito por Hernández *et al.*, (2005).

La segunda consistió en realizar una prueba de hemólisis al material seco obtenido por extracción soxhlet (anexo 5) de BF lavado durante 15 días, usando como solvente una mezcla etanol-agua (1:1), con un tiempo de extracción de seis (6) horas. Como variable de respuesta de esta prueba se calculó el porcentaje de hemólisis (anexo 6).

Determinación del porcentaje de hemólisis

Para este ensayo se tomó una muestra de sangre y se mezcló con anticoagulante EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético). Por otra parte, el extracto seco se diluyó en solución salina de concentración 0,85 g/l y se filtró al vacío, se tomó una muestra de 5 ml y se agregó 25 μ l de sangre. Posteriormente, se dejó interactuar la mezcla durante media hora y se centrifugó por 15 minutos a 3000g/min, para finalizar el sobrenadante se pasó por el espectro a una longitud de onda de 540nm y mediante la ecuación 3 se calculó el porcentaje de hemólisis:

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{\text{Absorbancia de cada tubo}}{\text{Absorbancia del patrón}} * 100 \quad (\text{Ec. 3})$$

2.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS SAPONINAS SOBRE EL RENDIMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE METANO A PARTIR DE BAGAZO DE FIQUE

El sustrato usado fue BF lavado durante 15 días y como inóculo, la mezcla de LR+LEC. En la Tabla 1 se presentan las condiciones de operación del proceso de DA. Se incluyó un experimento control (Sin saponinas) y en esta etapa se trabajó con las concentraciones de saponinas que más afectaron la AH y la AME. Los experimentos fueron realizados por triplicado. Como variables de respuesta se cuantificó la concentración de ART, AGV y el rendimiento de metano producido ($\text{m}^3\text{CH}_4/\text{kg}$ SSV adicionado). La estabilización del proceso se evaluó midiendo el pH y la relación entre ácidos grasos volátiles totales y alcalinidad total (AGVT/AT).

Tabla 1. Condiciones de operación de la digestión anaerobia del BF.

Parámetro	Valor
Temperatura	39°C
Volumen de reactor	50ml
Volumen de operación	35ml
Tiempo de operación	180 horas
Sustrato	Bagazo de fique lavado
Inóculo	LR+LC
RIS	1,3 g SSV inóculo/g SSV sustrato
Concentración de saponinas	90 ppm
	120 ppm

Los resultados experimentales fueron analizados con el *software StatGraphics plus 5.1, StatPoint Inc. (Virginia, EE.UU)*. El método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS SAPONINAS SOBRE LA ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DEL INÓCULO MEZCLA LEC + LR

En la figura 2 se presenta la variación de glucosa durante el tiempo de operación. Se observa que la presencia de saponina le aporta al medio una cantidad adicional de glucosa, en el caso del control (0 saponinas) el consumo fue proporcional y su producción de ART es constante a lo largo del tiempo hasta agotar todo el sustrato.

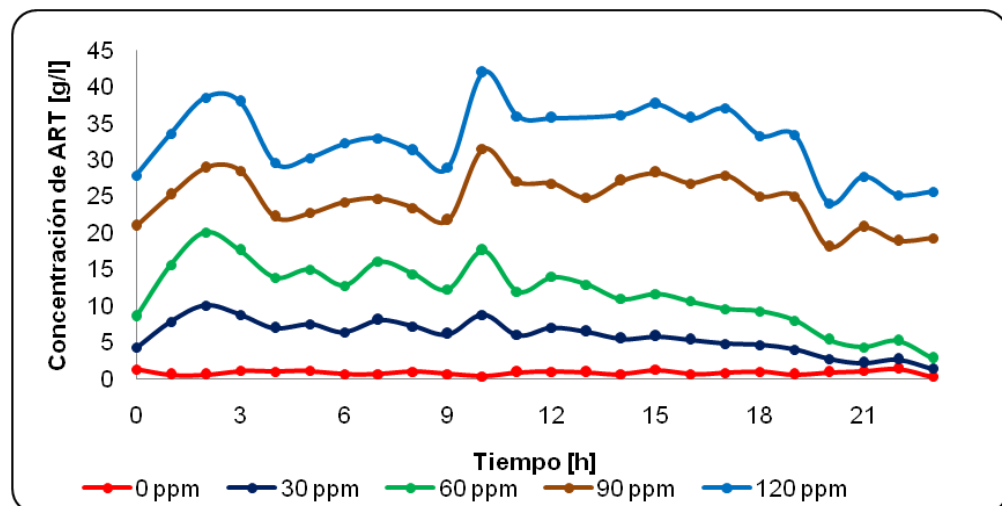


Figura 2. Actividad hidrolítica del consorcio microbiano en presencia de diferentes concentraciones de saponina (*Furcraea* spp)

El perfil de la concentración de ART a través del tiempo es similar durante las primeras 10 horas para las cuatro concentraciones escogidas. En las horas 2 y 10 se observa un comportamiento propio de enzimas extracelulares, encargadas de la hidrólisis y en la cual la actividad enzimática llega a su punto máximo y empieza su degradación (Mshandetea *et al.*, 2005)

Para las concentraciones de saponina de 30 ppm y 60 ppm se alcanzó la mayor producción de ART a la hora dos (2) de incubación, presentando una degradación total de azúcar al finalizar el tiempo de incubación. Por el contrario, las concentraciones de 90 ppm y 120 ppm presentan una mayor activación a la hora diez (10). Además, las dos concentraciones mayores cuentan con sustrato disponible para continuar con el proceso de hidrólisis. A partir de lo anterior, se afirma que el aumento de la concentración de saponina ocasiona un aumento significativo de la AH, esto es posible ya que el consorcio microbiano logra romper el enlace glucosídico de la saponina y degrada el azúcar presente en este compuesto, tal como lo señalaron Quintero *et al.* (2012) quienes demostraron que el LR tiene la capacidad de romper enlaces de macromoléculas.

La tabla 2 presenta la actividad hidrolítica del consorcio microbiano a diferentes concentraciones de saponina.

Tabla 2. AH del inóculo en presencia de diferentes concentraciones de saponina

Concentración de saponina [ppm]	AH [g DQO glucosa/ g SSV*día]
0	10,0
30	60,7
60	121,4
90	166,6
120	222,2

De acuerdo con los resultados obtenidos, la saponina se comporta como un activador de la capacidad hidrolítica del inóculo. Estos resultados se asemejan a los obtenidos en la hidrólisis de la *Quillaja saponaria* efectuada por bacterias presentes en el líquido ruminal después de 24 horas de incubación (Hart *et al.*, 2008). Sin embargo, su acción sobre los microorganismos varía, puesto que es particular para cada consorcio microbiano y depende del tipo de saponina. Ejemplo de esto lo muestran Wang *et al.* (2000) quienes encontraron que las saponinas a partir de *Yucca schidigera* inhiben la actividad hidrolítica de las bacterias presentes en el rumen.

3.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS SAPONINAS SOBRE LA ACTIVIDAD METANOGÉNICA DEL INÓCULO MEZCLA LEC + LR

Al usar acetato como sustrato se suprimen las primeras etapas de la digestión anaerobia, pero para el caso de los experimentos dopados con saponina es importante señalar que las bacterias hidrolíticas degradan este compuesto como se observó en la etapa anterior. En la figura 3 se presenta el volumen acumulado de metano en presencia de diferentes concentraciones de saponina.

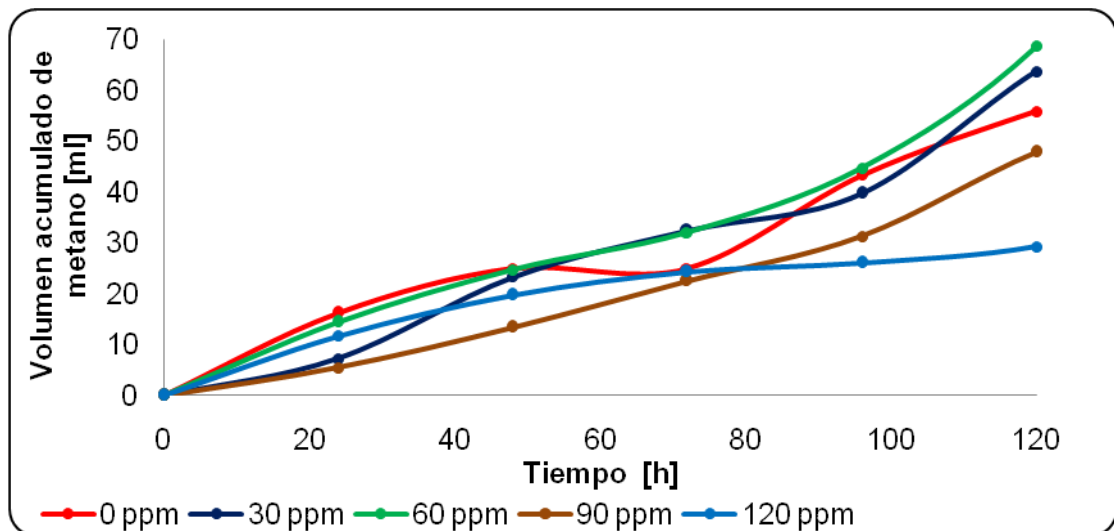


Figura 3. Volumen acumulado de metano en presencia de diferentes concentraciones de saponina (*Furcraea* spp)

Este experimento se llevó a cabo durante 120 horas ya que el metabolismo de las bacterias metanogénicas es mucho más lento que el de las bacterias hidrolíticas.

Como se aprecia en la figura 3 el aumento en el volumen acumulado de metano hasta la hora 85 horas es similar para todos los digestores. Sin embargo, finalizado el tiempo de incubación se observa que el volumen de metano para las concentraciones de 30 y 60 ppm aumentó en 14% y 23% respectivamente, en relación al volumen total acumulado del control (0 ppm), el cual fue de 55,73 ml de CH₄. Caso contrario ocurre con los experimentos dopados con 90 y 120 ppm de saponina los cuales presentan una disminución del 14% y 48%, respectivamente.

La Tabla 3 presenta la AME del inóculo bajo la acción de distantes concentraciones de saponina.

Tabla 3. AME del inóculo con diferentes concentraciones de saponina

Concentración de saponina [ppm]	AME [g DQO *g SSV⁻¹ *día⁻¹]
0	0,556
30	0,691
60	0,729
90	0,502
120	0,355

Teniendo en cuenta la producción de metano a partir de diferentes concentraciones de saponina, se puede inferir que las bacterias metanógenicas presentan una leve activación cuando se adicionan bajas concentraciones de saponina, no obstante, la producción se inhibe si la cantidad de saponina agregada es muy alta.

Los resultados conseguidos son similares a los obtenidos en investigaciones realizadas por Singh *et al.*, (2001) quienes utilizaron bajas concentraciones de saponina como agente estimulante para incrementar la producción de biogás, mientras que Hess *et al.*, (2003) realizaron fermentaciones con frutas tropicales que contenían una alta concentración de saponinas *Sapindus saponaria* la cual inhibía la liberación de metano a la atmósfera en 20% reduciendo el número de protozoos, sin afectar la cantidad de metanógenos presentes. Otros casos similares fueron discutidos para la degradación anaerobia de desechos de cocina y plantas desérticas (Prabhudessai *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2010; Patra & Saxena, 2010).

3.3 EXTRACCIÓN DE LA SAPONINA DEL BF

La Figura 4 presenta los resultados de actividad hemolítica y prueba de espuma del bagazo de fique.

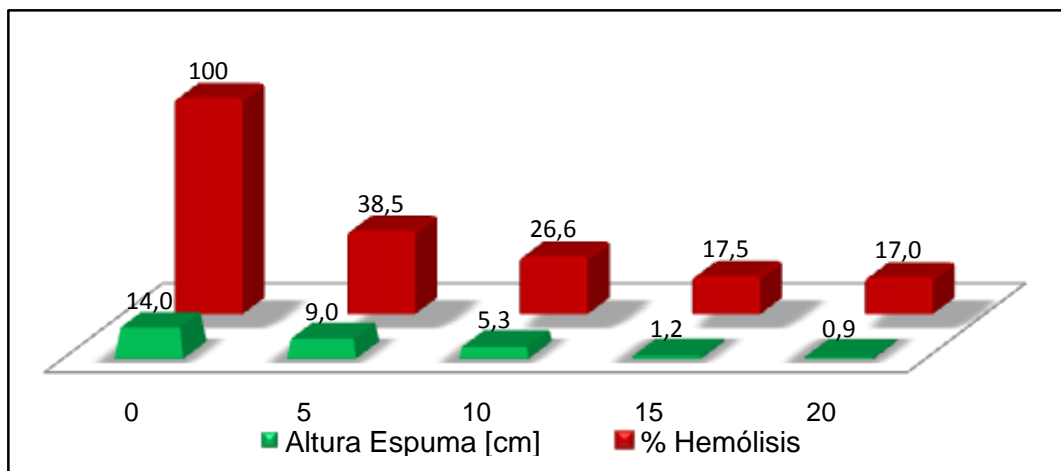


Figura 4. Prueba de espuma y porcentaje de hemólisis del BF lavado

Se observa que a mayor tiempo de lavado el porcentaje de hemólisis y la altura de la espuma disminuyen, lo que se traduce en que a mayor tiempo de lavado se reduce la cantidad de saponina presente en el bagazo. Asimismo, se aprecia que los datos obtenidos para un tiempo de lavado de 15 días y 20 días no presentan diferencias estadísticas significativas, por tal motivo, se decidió trabajar con el BF lavado durante 15 días.

Estos datos se ajustan al perfil señalado por algunos autores, entre los cuales se destacan Molgaard *et al.*,(2000) quienes investigaron la biodegradabilidad de los saponinas de *Bayas de Phytolacca dodecandra*, obtuvieron que el tiempo de biodegradación de dichas saponinas fue de 10 días en un medio acuoso bajo condiciones areobias (Sparg *et al.*, 2004).

3.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS SAPONINAS SOBRE EL RENDIMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE METANO A PARTIR DE BAGAZO DE FIQUE

Los resultados anteriores indican que bajas concentraciones de saponinas (30 y 60 ppm) estimulan la AH y AME del consorcio microbiano. Sin embargo, al evaluar las concentraciones de 90 y 120 ppm se apreció un aumento en la AH y una disminución en la AME. Por lo anterior, se evaluó la producción de metano dopando el bagazo de fique libre de saponinas (sustrato) con 90 ppm y 120 ppm.

En la figura 5 se presentan las variaciones en la concentración de azúcar, pH y producción de metano durante el tiempo de fermentación.

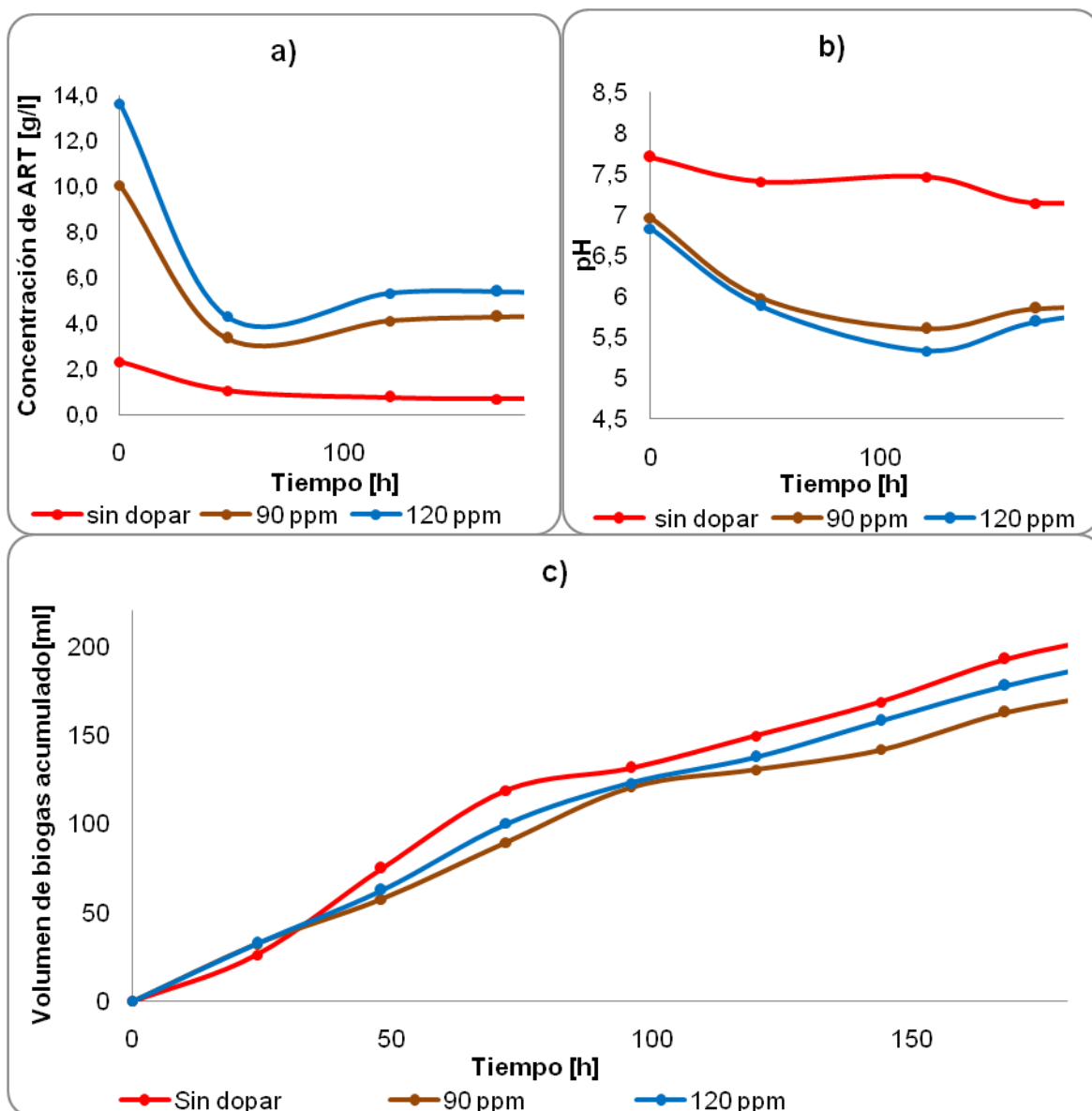


Figura 5. Comportamiento a diferentes concentraciones de saponina de: a) Concentración de ART, b) pH, c) volumen acumulado de metano

En cuanto a la concentración de ART (Figura 5a), se observa un incremento en la cantidad de glucosa hidrolizada respecto al experimento sin saponina, resultados similares a los obtenidos durante la determinación de AH usando celulosa como sustrato.

En la Figura 5b se presenta la variación de pH durante el tiempo de fermentación. Cuando el bagazo de fique es dopado con saponina, el proceso se desarrolla en un intervalo de pH entre 5,5 y 6,5. Este comportamiento se presenta debido a que las bacterias acidogénicas aprovechan los azúcares producto del rompimiento del enlace glucosídico de la saponina convirtiéndolos en ácidos ocasionando la reducción del pH.

El valor del pH es muy importante cuando se trabajan con microorganismos puesto que un cambio brusco ocasiona la inhibición o muerte de estos, particularmente los microorganismos metanogénicos son los más sensibles a bajos valores de pH (Carrhá *et al.*, 2006). Lo anterior, se correlaciona con la producción de metano (Figura 5c). El mayor volumen de metano se alcanzó con el bagazo libre de saponina.

El rendimiento de metano producido se presenta en la Tabla 4, mostrando que el bagazo dopado con 90 y 120 ppm presenta una disminución del rendimiento de metano producido. Sin embargo, es necesario un análisis estadístico para saber si existe una diferencia significativa en los datos.

Tabla 3. Rendimiento de la producción de metano a diferentes concentraciones de saponina

Concentración de saponina [ppm]	Rendimiento metano [m³ CH₄/kg SSV]
0	0,39
90	0,34
120	0,35

En la Figura 6 se muestra la distribución de los valores de medias y medianas (variable rendimiento de metano) utilizados para la evaluación de la incidencia de las saponinas sobre la producción de metano.

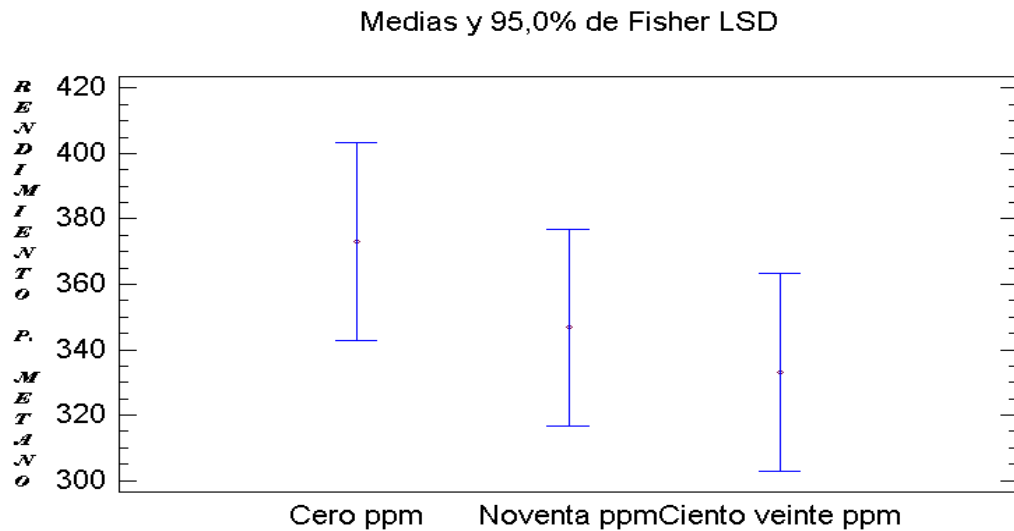


Figura 6. Distribución de medias para el rendimiento de la producción de metano

Los resultados demuestran que no hay diferencias estadísticamente significativas entre cualquier par de medias, con un nivel del 95,0% de confianza. Del análisis estadístico se puede afirmar que experimentalmente no se comprobó que la presencia de saponinas en concentraciones de 90 y 120 ppm afecte la producción de metano a partir de BF lavado.

4. CONCLUSIONES

Las saponinas esteroideas (*Furcraea ssp*) presentes en el bagazo de fique son un compuesto estimulante para la actividad hidrolítica de los microorganismos presentes en la mezcla (LR+ LEC), puesto que las bacterias hidrolíticas logran romper el enlace glucosídico existente en la molécula de saponina degradando los azúcares.

Concentraciones de saponina superiores a 60 ppm inhiben la actividad metanogénica de los microorganismos presentes en el inóculo, debido a una disminución del pH ocasionado por la producción de ácidos grasos que se generan producto de la hidrólisis de la saponina.

No se pudo demostrar la disminución de la producción de metano al dopar el bagazo de fique lavado con altas concentraciones de saponina debido a que el error experimental es alto.

BIBLIOGRAFÍA

Almeida, A., Das, K. C., & Balagurusamy, N. (2010). "Biochemical methane potential of Desert plants: aloe vera and Opuntia robusta in comarca Lagunera, México". Third International Symposium on Energy from Biomass and Waste. Venice, Italy; Noviembre.

Angelidaki, I., Karakashev, D., Batstone, D. J., Plugge, C., & Stams, A. (2011). Biomethanation and Its Potential. *Methods in Enzymology* , 328 - 351.

Barbosa, E. (2006). Obtención de saponinas crudas y carbohidratos a partir del jugo de fique a nivel de planta piloto. Contenido de hecogenina y tigogenina en el jugo de las variedades cenizo y tunoso común. Bogotá: Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia.

Carrhá Leitão, R., Cornelius, A., Zeeman, G., & Lettinga, G. (2006). The effects of operational and environmental variations on anaerobic wastewater treatment systems: A review. *Bioresource Technology* 97 , 1105–1118.

De La Rubia, M., Raposo, F., Rincón, B., & Borja, R. (2009). Evaluation of the hydrolytic–acidogenic step of a two-stage mesophilic anaerobic digestion process of sunflower oil cake. *Bioresource Technology* 100 , 4133–4138.

Díaz Báez, M. C., Espitia Vargas, S. E., & Molina Pérez, F. (2002). *Digestión anaerobia una aproximación a la tecnología*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.

Dinuccio, E., Balsari, P., Gioelli, F., & Menardo, S. (2010). Evaluation of the biogas productivity potential of some Italian agro-industrial biomasses. *Bioresource Technol* 101 , 3780-3783.

Gauthier, C., Legaul, J., Girard-Lalancette, K., Mshvildadze, V., & Pichette, A. (2009). Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of

semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17 , 2002-2008.

Hart, K. J., Newbold, C., McEwan, N., Duval, S., & Ruiz, Y. (2008). Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and technology* , 8-35.

Hassan, S. M., Haq, A. U., Byrd, J. A., Berhow, M. A., Cartwright, A. L., & Bailey, C. A. (2010). Haemolytic and antimicrobial activities of saponin-rich extracts from guar meal. *Food Chemistry* 119 , 600-605.

Hernández, R., Lugo, E., Díaz, L., & Villanueva, S. (2005). Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de Agave Lechuguilla Torrey. *e-Gnosis* 3 , art 11 .

Hess, H. D., Kreuzer, M., Díaz, T., Lascano, C., Carulla, J. E., Soliva, C., y otros. (2003). Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Animal Feed Science and Technology* 109 , 79–94.

Hu, W. L., Liu, J.-X., Guo, Y.-Q., Ye, J.-A., & Wu, Y. M. (2005). Effect of tea saponin on rumen fermentation in vitro. *Animal Feed Science and Technology* , 333-339.

Hui Ling, M., Wang, J., Zhou, Y.-y., & Liu, J.-X. (2010). Effects of addition of tea saponins and soybean oil on methane production, fermentation and microbial population in the rumen of growing lambs. *Livestock Science* , 56-62.

Li, Y., Park, S., & Zhu, J. (2011). Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15 , 821 - 826.

Miller, G. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem* 31 , 426 - 428.

Mshandete, A., Kivaisi, A., Mugassa Rubindamayugi, B., & Mattiasson. (2004). Anaerobic batch codigestion of sisal pulp and fish wastes. *Bioresource Technol* , 19-24.

Mshandetea, A., Björnssona, L., Kivaisi, A., Rubindamayugi, S., & Mattiasson, B. (2005). Enhancement of anaerobic batch digestion of sisal pulp waste by mesophilic aerobic pre-treatment. *Water Research* 39 , 1569–1575.

Najmus Saqib, A. A., & Whitney, P. J. (2011). Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars. *Biomass and bioenergy* 35 , 4748 -4750.

Oleszek, W. A. (2002). Chromatographic determination of plant saponins. *Journal of Chromatography A* 967 , 147 -162.

Osorio, C., Blanco, C., & Combariza, M. (2010). "Saponinas obtenidas a partir del bagazo de fique (*Furcraea Macrophylla*)".XXIX Congreso Latinoamericano de Química. Cartagena, Colombia, Octubre.

Parawira, W., Murto, M., Read, J.S., & Mattiasson, B. (2005). Profile of hydrolases and biogas production during two-stage mesophilic anaerobic digestion of solid potato waste. *Process Biochemistry* 40 , 2945 - 2952.

Patra, A., & Saxena, J. (2010). A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry.*, 7 , 1198–1222.

Prabhudessai, V., Gangul, A., & Mutnuri, S. (2009). Effect of caffeine and saponin on anaerobic digestion of food waste. *Ann Microbiol.*, 59 , 643-648.

Quintero, M., Castro, L., Ortíz, C., Guzmán, C., & Escalante, H. (2012). Enhancement of starting up anaerobic digestion of lignocellulosic substrate: fique's bagasse as an example. *Bioresource Technology* 108 , 8 - 13.

Raposo, F., Banks, C. J., Siegert, I., Heaven, S., & Boria, R. (2006). Influence of inoculum to substrate ratio on the biochemical methane potential of maize in batch tests. *Process biochem* 41 , 1444-1450.

Sáiz Abajo, M. J., & López Giral, N. (11 de Enero de 2010). Obtención y aplicación de extractos naturales. España: CNTA.

Singh, S., Kumar, S., Jain, M., & Kumar, D. (2001). Increased biogas production using microbial stimulants. *Bioresource Technology* , 313-316.

Soliva, C., Zeleke, A., & Clément, C. (2008). In vitro screening of various tropical foliage, seeds, fruits and medicinal plants for low methane and high ammonia generating potentials in the rumen. *Animal Feed Science and Technology* 147 , 53-71.

Sparg, S. G., Light, J., & Standen, V. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology* , 219-243.

Universidad Pontificia Bolivariana. (2009). BIOTRANSFORMACIÓN DE COMPUESTOS ESTEROIDALES PRESENTES EN EL JUGO DE FIQUE.

Vongsangnak, W., Guaa, J., Chauvatcharin, S., & Zhong, J.-J. (2004). Towards efficient extraction of notoginseng saponins from cultured cells of *Panax notoginseng*. *Biochemical Engineering Journal* 18 , 115–120.

Wang, Y., Zhang, Y., Zhu, Z., Zhu, S., Li, Y., Li, M., y otros. (2007). Exploration of the correlation between the structure, hemolytic activity and cytotoxicity of steroid saponins. *Bioorganic y Medicinal Chemistry* , 2528-2532.

Zhen-Hu, H., & Han-Qing, Y. (2006). Anaerobic digestion of cattail by rumen cultures. *Waste manage* 26 , 1222-1228.

ANEXO 1



Página 1 de 1

LABORATORIO CIBIOT - ÁREA ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO Reporte de resultados

EMPRESA SOLICITANTE	UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
INTERESADO	Liliana del Pilar Castaño Molano
DESCRIPCIÓN	Jugo de Figue
FECHA MUESTREO	NA
FECHA ANÁLISIS	2011-04-08
FECHA INFORME	2011-04-12

Análisis realizados	Cuantificación de Saponina
Método empleado	Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detección en PDA

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS REALIZADAS	
Prueba	Resultado
Valoración de Saponinas (g Saponinas / Kg extracto CHCl ₃)	4.094
Valoración de Saponinas (g Saponinas / Kg extracto Butanol)	5.322
Rendimiento (g Saponinas / Kg Jugo de Figue)	0.034
Densidad Jugo de Figue (Kg/L)	1.04
Rendimiento extracción (g Saponinas extracto CHCl ₃ / g Saponinas extracto Butanol)	0.769

CONTROL DE INFORME	PROFESIÓN Y NOMBRE	FIRMA
Elaborado por	Q.F. Yesid Vélez S., MSc	<i>Yesid Vélez</i>
Revisado por	I.Q. Margarita Enid Ramírez C., DSc	<i>Margarita Enid R.C.</i>

UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA - CENTRO DE ESTUDIOS Y DE INVESTIGACION EN BIOTECNOLOGIA - CIBIOT
CIRCULAR P N° 7001, BARRIO LAURELES, BLOQUE 112º PISO, MEDELLIN - COLOMBIA
TELÉFONO: +57303 8114057 e-mail: yesid.velez@upb.edu.co

ANEXO 2

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

El método DNS o del ácido dinitrosalicílico es un método colorimétrico, desarrollado para la cuantificación de azúcares reductores. Este método es un método rápido y reproducible.

Reactivo DNS

- Mezclar y disolver en 250 ml de agua destilada 8 g de NaOH y 150 g de tartrato sodio potasio.
- Posteriormente agregar 5 g de ácido dinitrosalicílico.
- Aforar a 500 ml con agua destilada
- Almacenar a temperatura ambiente y proteger de la luz.

Procedimiento

- Agregar 1 ml de reactivo a 1 ml de muestra usando tubos tapa rosca.
- Dejar en baño con agua en ebullición durante 5 minutos.
- Detener la reacción en un baño de hielo.
- Agregar 5 ml de agua destilada, y dejar reposando durante 15 minutos.

Leer densidad óptica a 540 nm contra un blanco obtenido con el procedimiento anterior, pero agregando agua destilada en vez de muestra.

Construcción de la curva estándar de glucosa

Se preparan las muestras de glucosa con concentraciones conocidas, se aplica el método DNS y se lee su absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. Con los datos obtenidos, se traza un gráfico lineal de la concentración de glucosa (azúcar reductor) como una función de absorción, y así se determina la ecuación que relaciona las dos cantidades.

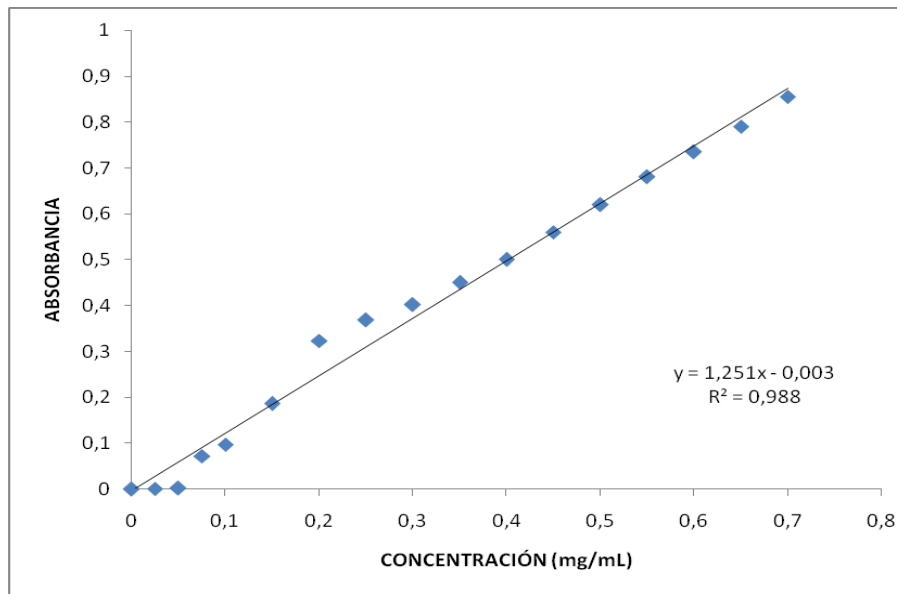


Figura 7. Curva estándar de glucosa

ANEXO 3

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE SAPONINAS

Método de lavado

Objetivo: Extraer la mayor cantidad de saponinas presentes en el bagazo de fique.

Materiales

- 2 vasos precipitados de 500 ml
- Un tamiz
- Agua destilada
- Balanza

Procedimiento

- Pesar 45 g de bagazo de fique
- Depositar esta cantidad en un vaso precipitado
- Agregar 450 ml de agua destilada, una relación de (1:10)
- Agitar hasta homogenizar
- Con el tamiz y el otro vaso colar
- Realizar este proceso 5 veces al día durante 15 días consecutivos.

ANEXO 4

PROTOCOLO COMPROBACIÓN DE PRESENCIA DE SAPONINAS

Prueba de espuma

Al agitar una solución acuosa de una muestra que contenga saponina, se forma una espuma estable como la obtenida al agitar la solución acuosa de un jabón. Puesto que existen otras sustancias que pueden formar también espuma, se debe asumir este ensayo como una prueba presuntiva de la presencia de saponinas esteroidaes.

Materiales

- Tubos de ensayo
- Pipeta
- Pipeteador
- Regla
- Cronometro

Procedimiento

- Medir con la pipeta 5 ml del extracto.
- Depositar los 5 ml de extracto en un tubo de ensayo.
- Agitar manualmente durante 30 segundos el tubo de ensayo.
- Medir con la regla la longitud de espuma producida.

ANEXO 5

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE SAPONINAS

Método de extracción soxhlet

1. Se pesa la cantidad de muestra correspondiente para cada experimento y se coloca en un trozo de gasa para luego introducirlo en pieza de extracción soxhlet.
2. En el balón se introducen 250 ml de etanol al 75%, y se coloca el agitador magnético.
3. En una plancha de calentamiento y agitación se coloca un recipiente con aceite mineral y sobre él balón.
4. Se coloca en el soporte el balón y sobre él se pone el tubo de extracción soxhlet, en la parte superior del tubo extractor va el tubo refrigerante, a este se le conectan las mangueras de la conexión al agua, se sella la parte superior del tubo refrigerante con un algodón húmedo con sulfato sódico anhídrido y se sujeta con un trozo de cinta. El tiempo de extracción es de 6 horas.
5. Cuando se termina la extracción se deja enfriar el extracto y se procede a hacer filtración al vacío con papel de filtro. Con el fin de eliminar sólidos presentes en el extracto.
6. Para eliminar el solvente se coloca el extracto en un recipiente de boca ancha para facilitar la evaporación y luego se lleva a la estufa a una temperatura de 55°C, se deja hasta que todo el solvente sea evaporado.

ANEXO 6

PROTOCOLO COMPROBACIÓN DE PRESENCIA DE SAPONINAS

Prueba de fragilidad osmótica

Preparar las Soluciones de trabajo, diluyendo la cantidad necesaria de la solución madre de saponinas en 100 ml, con solución salina 0,85%.

Procedimiento:

- Colocar 5 ml de cada una de las concentraciones anteriores en tubos de ensayo, adicionar 0,02 ml de sangre anticoagulada (EDTA, heparina, defibrinada) y mezclar.
- Dejar en reposo a temperatura ambiente por 30 minutos.
- Mezclar y centrifugar a 3000 gravedades por 10 minutos.
- Leer la absorbancia de cada uno de los sobrenadantes a 540 nm, utilizando como blanco el sobrenadante del tubo el sobrenadante de un tubo con solución salina 0,85% y glóbulos rojos, y como 100% el sobrenadante de un tubo con una solución de NaCl 0,10% y glóbulos rojos.

Patrón: Absorbancia tubo de 0,10 de NaCl (100% hemólisis)

Blanco: Absorbancia tubo de 0,85 (8,5g /l) de Nacl (0% hemólisis)

Cálculos:

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{\text{Absorbancia de cada tubo}}{\text{Absorbancia del patrón}} * 100$$