

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS SAPONINAS PRESENTES EN EL  
BAGAZO DEL FIQUE SOBRE LA PRODUCCIÓN DE METANO**

**LIDA ROCIO ROJAS CRISTANCHO**

**MARINELA PÉREZ MORENO**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUIMICAS  
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA  
BUCARAMANGA**

**2010**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS SAPONINAS PRESENTES EN EL  
BAGAZO DEL FIQUE SOBRE LA PRODUCCIÓN DE METANO**

**LIDA ROCIO ROJAS CRISTANCHO  
MARINELA PÉREZ MORENO**

**Proyecto de grado para optar el título de  
Ingeniero Químico**

**Director**

**HUMBERTO ESCALANTE HERNANDEZ  
Ingeniero Químico Ph. D.**

**Codirector (a)**

**LILIANA DEL PILAR CASTRO MOLANO  
Ingeniera Química**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERIAS QUIMICAS  
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA  
BUCARAMANGA**

**2010**

## DEDICATORIA

*A Dios por su inmenso amor al brindarme fortaleza, sabiduría y paciencia  
para poder sobrellevar cada una de las situaciones,*

*A mi Mamita hermosa Josefa Cristancho y a mi papá Mardoqueo Rojas por  
estar siempre a mi lado dándome todo su apoyo incondicional en el transcurso  
de la carrera les dedico este triunfo,*

*A mis hermanos Nelly, Doris, Esperanza, Libardo, Emilcen y Nairo por  
siempre estar a mi lado apoyándome y ofreciéndome siempre los mejores  
consejos que se le pueden dar a la hermanita menor,*

*A mis sobrinitos preciosos por sus recuerdos y cariñitos para mí,*

*A mis amigos quienes estuvieron a mi lado brindándome una voz de aliento  
para seguir adelante.*

**LIDA ROCIO ROJAS CRISTANCHO**

*A Dios por bendecirme con sabiduría y fortaleza para insistir e insistir adquiriendo la habilidad que mi meta requería; permaneciendo humilde y valiente ante los obstáculos y fracasos obteniendo este gran triunfo.*

*A mis padres Felipe y Magdalena por creer en mí, por su paciencia, apoyo y esperanza.*

*A mis hermanos Sandra, Mary Luz y Alex que me escucharon y animaron a superar mis angustias.*

*A mis compañeros y amigos que me ayudaron a permanecer perseverante y con un corazón entusiasta.*

*Soy el resultado de años de progreso y de una sucesión de realizaciones pequeñas, por eso me siento bien equipada para seguir luchando y aprovechando los triunfos que Dios a preparado para mí, porque sé que aún puedo obtener más, mejores y mayores.*

*Marinela Pérez Moreno*

## **AGRADECIMIENTOS**

A La Universidad Industrial de Santander.

Director del proyecto, PhD. Humberto Escalante Hernández, por su incondicional apoyo y orientación.

Al grupo de investigación en Biotecnología.

Al Químico, Carlos Osorio, por su colaboración en el proyecto.

A la ingeniera Química, Liliana del pilar castro, por su colaboración.

A los Bacteriólogos, Mabel Juliana Quintero, Alex Orlando por su colaboración.

A los Técnicos del Laboratorio de Procesos Escuela de Ingeniería Química, Eduardo Carreño, Wilson Carreño, por su colaboración y aporte.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
1. INTRODUCCIÓN.....	17
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	23
3. RESULTADOS.....	28
4. CONCLUSIONES.....	35
BIBLIOGRAFÍA.....	36
ANEXOS.....	40

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Condiciones de operación para la extracción soxhlet.....	24
Tabla 2. Variables para la digestión anaerobia de bagazo de fique sin saponinas.....	26
Tabla 3. Composición química de la muestra de bagazo de fique.....	28
Tabla 4. Experimentos para la extracción soxhlet.....	54
Tabla 5. Experimentos utilizados durante el montaje para producción de metano.....	55
Tabla 6. Porcentaje de medición de biogás y metano.....	56

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Estructura molecular generalizada de saponinas.....	19
Figura 2. Diagrama del proceso.....	23
Figura 3. Extracción de sapogeninas a diferentes pesos de bagazo de fique húmedo.....	29
Figura 4. Concentración de azúcares reductores.....	30
Figura 5. Concentración de AGV.....	31
Figura 6. Variación del pH durante el tiempo de digestión.....	32
Figura 7. Producción de metano.....	32
Figura 8. Análisis estadístico.....	34
Figura 9. Extracción Soxhlet.....	52
Figura 10. Secado del extracto.....	52
Figura 11. Filtrado del extracto.....	52
Figura 12. Desengrase.....	52
Figura 13. Hidrólisis.....	52
Figura 14. Extracción con cloroformo.....	52
Figura 15. Preparación del inóculo.....	53
Figura 16. Reactores Etiquetados.....	53
Figura 17. Reactores para toma de muestra de DNS.....	53

Figura 18. Reactores en la incubadora.....	53
Figura 19. Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores por el método Dinitro salicílico (DNS).....	48

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
Anexo I. Protocolo de la muestra de bagazo.....	40
Anexo II. Protocolo procedimiento para la obtención de saponinas crudas del bagazo del fique por medio del método Soxhlet.....	41
Anexo III. Protocolo método gravimétrico.....	43
Anexo IV. Protocolo toma de muestra de líquido ruminal.....	45
Anexo V. Protocolo determinación de azúcares reductores.....	46
Anexo VI. Protocolo determinación de ácidos grasos volátiles (AGV).....	48
Anexo VII. Realización del montaje experimental para fermentación.....	50
Anexo VIII. Fermentación y medición.....	51
Anexo IX. Fotografías del proceso.....	52
Anexos X. Datos experimentales durante el proceso.....	54

## RESUMEN

### TÍTULO

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS SAPONINAS PRESENTES EN EL BAGAZO DE FIQUE SOBRE LA PRODUCCIÓN DE METANO\*.

**AUTORES:** PÉREZ MORENO MARINELA\*\*

ROJAS CRISTANCHO LIDA ROCIO\*\*

**PALABRAS CLAVES:** Bagazo de fique, biogás, estiércol de cerdo, líquido ruminal, Método Soxhlet, Saponinas.

### DESCRIPCIÓN:

En este trabajo se estudia la viabilidad que se puede presentar sobre el beneficio del fique, al eliminar ciertos residuos presentes (saponinas) que pueden llegar a inhibir la producción de metano. El bagazo de fique (BF) contiene 4% de fibra extraída de la planta y el porcentaje restante corresponde a bagazo y jugo. El bagazo contiene 30% de fibrilla y un 70% de pulpa vegetal la cual tiene lignina, hemicelulosa, celulosa, compuestos orgánicos y tensoactivos como las saponinas; debido a esto se utilizó el método soxhlet (extracción sólido-líquido) con etanol al 50% para remover la mayor cantidad de estos residuos, presentes en el bagazo por medio de una serie de etapas como son: filtración, secado, desengrase, hidrolisis y cuantificación de saponinas. El bagazo de fique libre de saponinas fue utilizado para el desarrollo de las etapas de digestión anaerobia, junto con el inóculo líquido ruminal (LR) y estiércol de cerdo (EC) en proporción 1:1 (v/v), utilizando reactores de 50 ml, sustrato 0.8g y temperatura 39 °C en 8 días de experimentación. Se realizaron experimentos por duplicado comparándose con un experimento de Bagazo de fique sin extracción. Los resultados obtenidos mostraron mayor % de remoción de saponinas a 6h de extracción con 30g de bagazo de fique húmedo. La concentración de (AGV) ácidos grasos volátiles, (ART) azúcares reductores y el % de metano aumentaron con 6 y 8h de extracción. Las saponinas inhiben la producción de metano, al retirar 0,38% de saponina se incrementa la producción de metano 6%, en comparación al bagazo en estado natural. La cantidad de saponina presente es inversamente proporcional a la producción de metano.

---

*\*Trabajo de Grado. Modalidad Investigación.*

*\*\*Facultad de ingenierías químicas Físico-Químicas. Escuelas de Ingeniería Química. Director del proyecto: Ph.D. Humberto Escalante Hernández. Codirector: Liliana del Pilar Castro Molano.*

## SUMMARY

### TITLE

EVALUATION OF THE EFFECT OF THE PRESENT IN SAPONINS BAGASSE OF FIQUE ON THE PRODUCTION OF METHANE.

**AUTHORS:** MORENO PÉREZ MARINELA\*\*

ROJAS CRISTANCHO LIDA ROCIO\*\*

**KEYWORD:** Bagasse of Fique, biogas pig manure, rumen fluid, Extraction Solid Liquid, Method Soxhlet, Saponinas, Saponins.

### DESCRIPTION

This work studies the viability of fique profit, eliminating some wastes (saponins) that can inhibit methane production. Fique's bagasse (BF) contains 4% of fiber, extracted from the plant and the remaining percentage corresponds to bagasse and juice. The bagasse contains 30% of fiber and 70% of vegetal pulp, which contains lignin, hemicellulose, cellulose, organic compounds and tensoactives like saponins; that's why Soxhlet method (solid-liquid extraction) with 50% ethanol to remove greater quantity of waste, present in bagasse, by doing the following next stages: filtration, drying, degreasing, hydrolysis and quantification of saponins.

The BF free of saponins was used for development of anaerobic digestion stages, together with the rumen fluid inoculum (LR) and pig dung (CD) 1:1 (v / v) using 50 ml reactors, 0.8g of substrate, 39 C of temperature for 8 days of experimentation. Experiments were conducted in duplicate and compared with a BF without extraction experiment. The results showed higher % extraction of removal of saponins, over 6 hours with 30g of wet BF. Concentration (VFA) and volatile fatty acids (ART) reducing sugars and the % of methane increased with 6 and 8 hours of extraction. The saponins inhibit the production of methane, 0.38% saponin removal increases the production of methane 6% compared to bagasse in nature. The amount of saponins is inversely proportional to the production of methane.

---

*\*Working Grade. Research Mode.*

*\*\*Physical-Chemical Engineering Faculty. School of Chemical Engineering. Project Director: Ph.D. Humberto Escalante Hernández. Join Manager: Liliana del Pilar Castro Molano.*

## 1. INTRODUCCIÓN

El fique es una planta de la familia Agavaceae, género *Furcraea* y especie *macrophylla*. Países como Bangladesh, India, China, Tailandia y Brasil, elaboran empaques, telas burdas, geotextiles, base para alfombras y cordelería, a partir de yute y sisal, las cuales son plantas que pertenecen a la familia del fique [1, 2].

El proceso de beneficio de la planta del fique, se realiza en tres etapas: a) Preparación o alistamiento, en la cual se cortan las hojas y se desorillan para eliminar las espinas: b) Extracción de fibra, en la que las hojas se pasan por la desfibradora para extraer la fibra, la cual constituye del 3 al 5% del peso de la hoja, siendo la pulpa el 95 al 97%. c) Procesamiento de la fibra: contempla las etapas de fermentación, lavado, secado y empaquetamiento de la fibra para su posterior comercialización.

Se estima que en Colombia, la industria de extracción de fibras de fique genera 20 800 kg de residuos compuestos por bagazo y jugo, por hectárea sembrada; estos residuos son descartados al medio ocasionando un problema ambiental. De acuerdo con la caracterización fisicoquímica, el Bagazo de Fique (BF) contiene celulosa, hemicelulosa, lignina, sacarosa, proteínas, esteroides, saponinas y sapogeninas; esta composición lo hace un sustrato apto para ser tratado por sistemas de bioconversión anaerobia [3]. Sin embargo, la presencia de saponinas puede llegar a inhibir el proceso de biometanización.

### *Digestión anaerobia*

La digestión anaerobia es un proceso biológico degradativo, en el cual parte de la materia orgánica contenida en un sustrato es convertida en una mezcla de gases, principalmente metano y dióxido de carbono, mediante la acción de un conjunto de microorganismos [4, 5].

La materia orgánica debe ser transformada para aportarle al microorganismo la fuente de carbono y a su vez la fuente de energía. En la degradación de la materia orgánica intervienen bacterias anaeróbicas facultativas, hidrolíticas fermentativas, acetogénicas y metanogénicas. El proceso de digestión anaerobia está comprendido por cuatro etapas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis, y metanogénesis.

La hidrólisis es la etapa en la cual las moléculas complejas presentes en la materia orgánica deben ser degradadas a compuestos simples como azúcares, aminoácidos y ácidos grasos, para que puedan ser asimiladas por los microorganismos [6, 7].

La acidogénesis, también llamada fermentación es la etapa en la cual las moléculas orgánicas solubles se convierten principalmente en ácidos grasos volátiles dentro del proceso anaerobio. Estos ácidos grasos volátiles (principalmente ácido acético y algo de propiónico y butírico) se generan una vez que las bacterias han asimilado los compuestos producidos en la hidrólisis [8].

En la etapa de acetogénesis algunos productos pueden ser metabolizados directamente, por los organismos metanogénicos ( $H_2$  y ácido acético, etanol, ácidos grasos volátiles y otros) deben ser transformados en productos más sencillos a través de las bacterias acetogénicas [7,8].

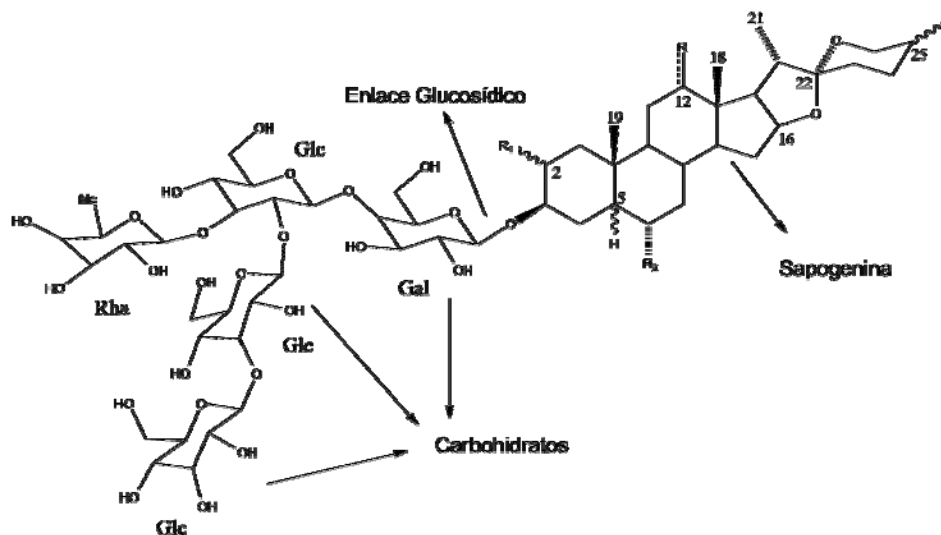
Finalmente en la metanogénesis los microorganismos completan el proceso de digestión anaerobia mediante la formación de metano a partir de sustratos monocarbonados o con dos átomos de carbonos unidos por un enlace covalente: acetato,  $H_2/CO_2$ , formato, metanol, metilaminas. Este proceso es realizado exclusivamente por bacterias del dominio *Archaea*, principalmente de los géneros *Methanosaeta* spp, *Methanosarcina* spp [6, 9].

Por otra parte, la codigestión es la mezcla de diferentes inóculos o consorcios microbianos en un proceso de digestión anaerobia [10, 11]. Los consorcios presentan alta eficiencia en la producción de metano y brindan la posibilidad de adaptarse fácilmente a diferentes sustratos. La utilización de consorcios en co-digestión, permite mejorar el equilibrio de nutrientes, diluir compuestos tóxicos, lograr un efecto sinérgico de los microorganismos e incrementar su actividad hidrolítica [11].

### *Saponinas del bagazo de fique*

Las saponinas son compuestos polares de alto peso molecular, están ampliamente distribuidas en el reino vegetal, cada molécula está constituida por un elemento soluble en lípidos (esteroides) y un elemento soluble en agua (el azúcar). Las saponinas forman espumas al ser agitadas en agua; poseen una estructura compleja en las cuales varias unidades de monosacáridos se enlazan mediante un enlace glicosídico a un compuesto denominado aglicón Figura 1. Las saponinas se clasifican en triterpénicas y esteroidales. Según estudios realizados anteriormente, las saponinas presentes en el bagazo de fique son de tipo esteroideal [12].

**Figura 1. Estructura Química de las saponinas**



Dada la naturaleza tensoactiva de las saponinas, la presencia de estos compuestos en el BF, pueden disminuir la bioproducción de metano al llegar a inferir de diversas formas sobre los microorganismos. Inicialmente se pueden presentar fenómenos interfaciales, en los cuales la fuerte adsorción de las moléculas de tensoactivos a la superficie donde ocurre la transferencia de masa, establece un fenómeno de actividad superficial, lo que puede generar resistencia al transporte de masa entre sustrato y la membrana celular de los microorganismos [13, 14]. Asimismo, los agentes tensoactivos de la saponina son adsorbidos sobre la superficie celular causando inhibición del crecimiento celular o lisis [15].

Las saponinas presentes en materiales vegetales, utilizados como sustratos en la producción de metano, han sido objeto de investigación, por ejemplo Miles, *et al.*, (1992) comprobaron que algunos consorcios microbianos son capaces de hidrolizar saponinas esteroidales sin que la producción de metano se vea afectada [16]. Sen, *et al.*, (1998) comprobaron que la presencia de saponinas a concentraciones bajas puede aumentar el transporte de nutrientes en células microbianas, mientras que altas concentraciones ocasionan lisis celular [15].

El efecto de la saponina sobre la producción de biogás depende en gran medida del tipo de saponina que está presente en el sustrato a degradar y la clase de consorcio microbiano. Algunos estudios revelan que existen ciertos microorganismos que son capaces de adaptarse a la presencia de la saponina y logran degradarla. Sin embargo aun no se sabe si dicha degradación disminuye la eficiencia del proceso de producción de metano [17].

Las saponinas tienen efectos anti protozoarios, ya que estas moléculas se unen al colesterol y otros esteroides de la membrana celular de los protozoos causando inestabilidad, lisis y muerte celular [15, 18]. Debido a la reducción de los protozoos, los cuales sirven a las bacterias como fuente de proteínas, se cree que

las saponinas extraídas de muchas plantas tiene el efecto de suprimir la emisión de metano [19]. La inhibición de la metanogénesis se refleja en una disminución significativa del biogás producido, el número de protozoos y la relación de acetato/propionato [20]. La presencia de saponinas puede reducir hasta en un 70% la concentración de protozoarios, especialmente aquellos presentes en el rumen de los bovinos [21]. Las saponinas pueden inhibir la fermentación, reduciendo la producción de metano, en un 13, 22, 25 y 26%. Se encontraron disminuciones en la producción de metano como lo reportó HU, *et al.*, (2005) [21, 22].

Las bacterias más susceptibles a ser inhibidas por la presencia de saponinas son las celulolíticas [23]; así mismo, las saponinas son capaces de suprimir la metanogénesis; ya que ellas aumentan la producción de propionato y disminuyen la producción de acetato y butirato, causando toxicidad sobre el proceso metabólico, impidiendo que se lleven a cabo las reacciones bioquímicas para la producción de metano [17].

Por lo anterior, se puede concluir que el efecto de las saponinas sobre la producción de biogás depende de diferentes factores: la caracterización fisicoquímica del sustrato, el tipo de saponina, su concentración y la clase de consorcio microbiano, por lo cual se hace necesario hacer la extracción de saponinas para determinar la incidencia de estas en el proceso de obtención de metano.

La extracción de saponinas se puede llevar a cabo por métodos como: soxhlet, Microondas, ultrasonido, Líquida a Presión (PLE) y destilación. Para escoger el método se tienen en cuenta las siguientes variables: eficiencia de extracción, factores tecnológicos, ambientales y económicos [24, 25].

Con respecto a la cuantificación de las saponinas, la literatura sugiere métodos cualitativos como la prueba de hemólisis, formación de espuma y pruebas colorimétricas como la propuesta por Lieberman Burchard [24, 26]. Además, existen métodos cuantitativos como la cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta eficiencia RMN, espectrometría de masa e incluso por espectro de absorción con ácido sulfúrico e infrarrojo [26, 27].

De acuerdo a lo anterior, es posible que el rendimiento del proceso dependa de la incidencia que tienen las saponinas sobre la etapa hidrolítica y metanogénica del bioproceso de metanización, debido a cambios en la fisiología de los consorcios microbianos ocasionándoles una reducción del crecimiento afectando su metabolismo.

El objetivo principal de este trabajo de investigación fue evaluar el efecto que tienen las saponinas presentes en el BF sobre la producción de biogás.

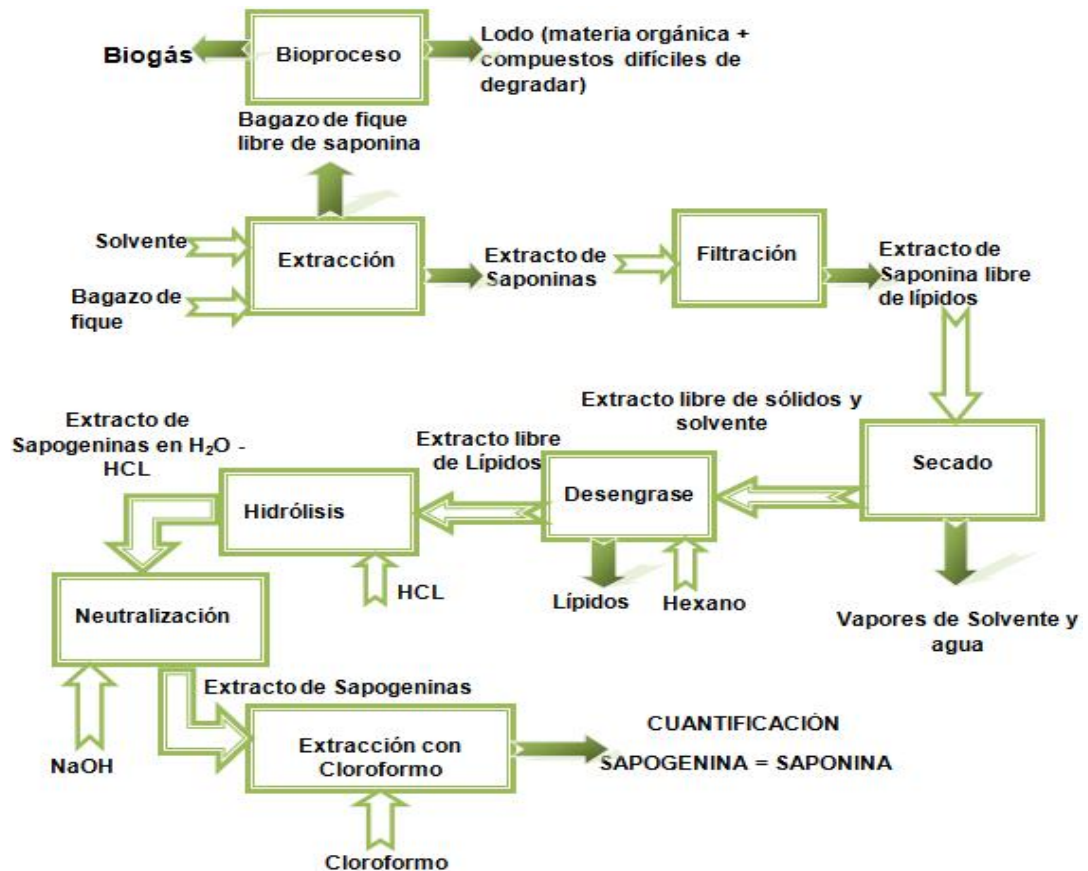
## 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### *Sustrato*

Como sustrato para la extracción soxhlet y para la producción de biogás se utilizó BF obtenido de una planta de beneficio ubicada en el municipio de Mogotes (Santander). Este muestreo se realizó teniendo en cuenta el protocolo de toma de muestra de campo (Anexo I).

### *Extracción y Cuantificación de saponinas*

**Figura 2. Diagrama de proceso para la extracción y cuantificación de saponinas a partir del BF**



Las muestras de bagazo se conservaron en recipientes refrigerados y se trasladaron al laboratorio para su correspondiente análisis. Se determinó al BF el contenido de Sólidos Totales (ST) y sólidos volátiles (SV). Los análisis se realizaron de acuerdo con los procedimientos establecidos por Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (University; APHA 1998) [28].

El proceso para extraer las saponinas se llevo a cabo mediante una extracción sólido-líquido, la cual extrae los componentes solubles del material empleando un disolvente apolar. Se utilizó el método convencional soxhlet para la extracción de saponinas.

La extracción soxhlet consiste en el contacto sólido-líquido para la remoción de uno o de más compuestos de un sólido por la dilución de una fase de reflujo de líquido como refrigerante, esto ocurre por arrastre de vapor. El equipo utilizado consta de un balón de destilación fondo plano, una pieza soxhlet y un refrigerante (Anexo VIII, Figura 9).

Para extraer las saponinas del bagazo de fique, mediante el método soxhlet se tuvieron en cuenta las siguientes variables: tiempo de extracción, concentración del solvente, y la relación solvente/ muestra húmeda. Los valores de las variables se indican en la Tabla1:

**Tabla 1. Condiciones de operación para la extracción soxhlet**

Variable de entrada	Valor
Bagazo de fique	30g, 40g, 50g.
Tiempo de extracción	2h, 4h, 6h, 8h.
Temperatura	79°C
Relación solvente/agua	1
Cantidad de sapogenina	%

Como solvente para la extracción de las saponinas del BF se utilizó etanol, este solvente es eficiente y poco contaminante. Durante el proceso de extracción de saponinas se obtienen dos productos el BF húmedo y un licor extracto: el BF húmedo, se secó en una estufa convencional (*MEMMERT 2B30U*). El extracto se filtro, utilizando el equipo *Buchner*, mediante vacío proporcionado por una bomba de extracción (*Thomas* modelo 1130) (Anexo II) (Anexo VIII, Figura 11).

A continuación se realizó un desengrase al extracto (Extracción líquido-líquido) (Anexo VIII, Figura 12) para eliminar algunos lípidos y pigmentos propios del fique, que pueden interferir en la etapa de purificación del proceso.

En el desengrase se observa una fase polar, que se deposita en el fondo del embudo, se sometió a un proceso de hidrólisis ácida. La hidrólisis busca romper el enlace glicosídico de las saponinas esteroidales, para obtener finalmente la aglicona o sapogenina (Anexo II).

Para finalizar la hidrólisis se observó un cambio de color en el extracto que corresponde a la presencia de saponinas y la aparición de partículas suspendidas de color café oscuro (Anexo VIII, Figura 13).

La muestra hidrolizada, se neutralizó con NaOH en un embudo de decantación agitando continuamente hasta homogenizar (Anexo VIII, Figura 14). Por último, se determinó el porcentaje de sapogeninas presentes en el extracto por método gravimétrico (Anexo II) (Anexo III).

#### *Proceso de digestión anaerobia*

Para el proceso de digestión anaerobia se tomó como sustrato una muestra de BF libre de saponina, obtenido a partir de la extracción soxhlet. Las fermentaciones se realizaron teniendo en cuenta las variables que se presentan en la Tabla 2.

**Tabla 2. Variables para la digestión anaerobia de BF.**

<b>Variable de entrada</b>	<b>Unidad</b>
Volumen de operación	35 ml
Temperatura	39 °C
Sustrato	g.
Inóculo	ml
Relación: Sustrato/inóculo	1gSV/ gSV
<b>Variables de salida</b>	<b>Unidad</b>
Concentración de azúcares reductores	mg/ml
Concentración de ácidos volátiles	mg/L
Porcentaje de Metano	% CH <sub>4</sub>

### *Inóculo*

Como inóculo se empleo la co-digestión de líquido ruminal y estiércol de cerdo. La muestra de líquido ruminal (LR) fue tomada del frigorífico "El vijagual" ubicado en el Municipio de Rionegro (Santander) y el Estiércol de Cerdo (EC) fue recolectado en la Porcícola "Portoferrayo" del Municipio los Santos (Santander). En la co-digestión se utilizó en proporción 1:1 (v/v) de LR y EC.

### *Fermentación anaeróbica con el BF libre de saponina*

Los experimentos de digestión anaerobia se realizaron en bio-reactores de 50 mL, con un volumen de operación de 35 mL. Se utilizaron 0,8 g sustrato y 30 ml de inóculo, para una relación de 1 gSV sustrato /1 gSV inóculo. El tiempo de

operación fue de 8 días, a una temperatura de 39°C. En la experimentación se incluyó un experimento control, que contenía BF sin extracción (Anexo VIII B).

Se consideraron tres variables de salida para el bioproceso así: a) Para la etapa hidrolítica la concentración de azúcares reductores, determinados por el método colorimétrico del ácido dinitrosalicílico – DNS utilizando un espectrofotómetro GENESYS 20 *Thermo Spectronics*, a una longitud de onda de 540 nm [29], b) para la etapa acidogénica la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV), cuantificados de acuerdo al procedimiento de titulación descrito por Anderson y Yang (1992) (Anderson 1992) y c) para la etapa metanogénica se tomó como variable de respuesta el porcentaje de metano cuantificado con un detector de gases infrarrojo modelo PGD3-IR marca *Status Scientific Controls*.

El pH es una variable utilizada para el control del sistema anaerobio; en este trabajo esta variable se determinó durante todo el tiempo de operación con un pHmetro marca *SCHOTT* portátil.

Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el software (*StatGraphics plus 5.1*, *StatPoint Inc.*, Virginia, EE.UU). Se utilizó la prueba de Fisher (F) para comprobar las diferencias estadísticamente significativas entre los resultados.

### 3. RESULTADOS

#### *Caracterización del sustrato*

**Tabla 3. Composición química de la muestra de BF**

<b>Parámetros</b>	<b>Unidades</b>	<b>Bagazo de Fique</b>	<b>LR-EC</b>
<b>PH</b>		<b>4</b>	<b>8</b>
<b>Sólidos Totales</b>	<b>mg/l</b>	<b>19,5</b>	<b>43770</b>
<b>Sólidos Volátiles</b>	<b>mg/l</b>	<b>16,3</b>	<b>23640</b>
<b>C/N</b>		<b>63</b>	<b>ND</b>
<b>Alcalinidad</b>	<b>mgCaCo<sub>3</sub>/l</b>	<b>3300</b>	<b>3100</b>
<b>AGV</b>	<b>mgCaCo<sub>3</sub>/l</b>	<b>10800</b>	<b>7200</b>
<b>Celulosa</b>	<b>%</b>	<b>41,81</b>	<b>ND</b>
<b>Hemicelulosa</b>	<b>%</b>	<b>22,17</b>	<b>ND</b>
<b>Lignina</b>	<b>%</b>	<b>15,56</b>	<b>ND</b>

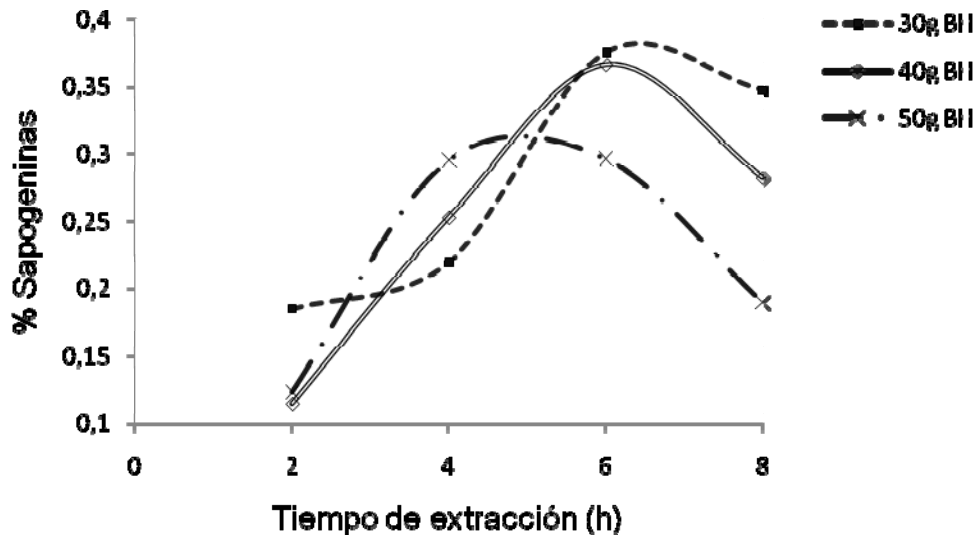
ND: No determinado

La materia orgánica del fique está compuesta por celulosa, hemicelulosa, lignina, sacarosa, proteínas, esteroides, saponinas y sapogeninas, La Tabla 3 muestra la composición fisicoquímica del BF, indicando que este residuo posee elevadas concentraciones de material orgánico lo que lo convierte en un sustrato adecuado para ser tratado por sistemas de bioconversión anaeróbica para la producción de etanol o biogás [30].

### Extracción y cuantificación de saponinas

La cuantificación de las saponinas es un proceso complejo debido a la estructura química de este compuesto, por esta razón se cuantifico la concentración de sapogeninas como una medida indirecta de las saponinas.

**Figura 3. Extracciones de Sapogeninas a diferentes pesos de BF húmedo.**

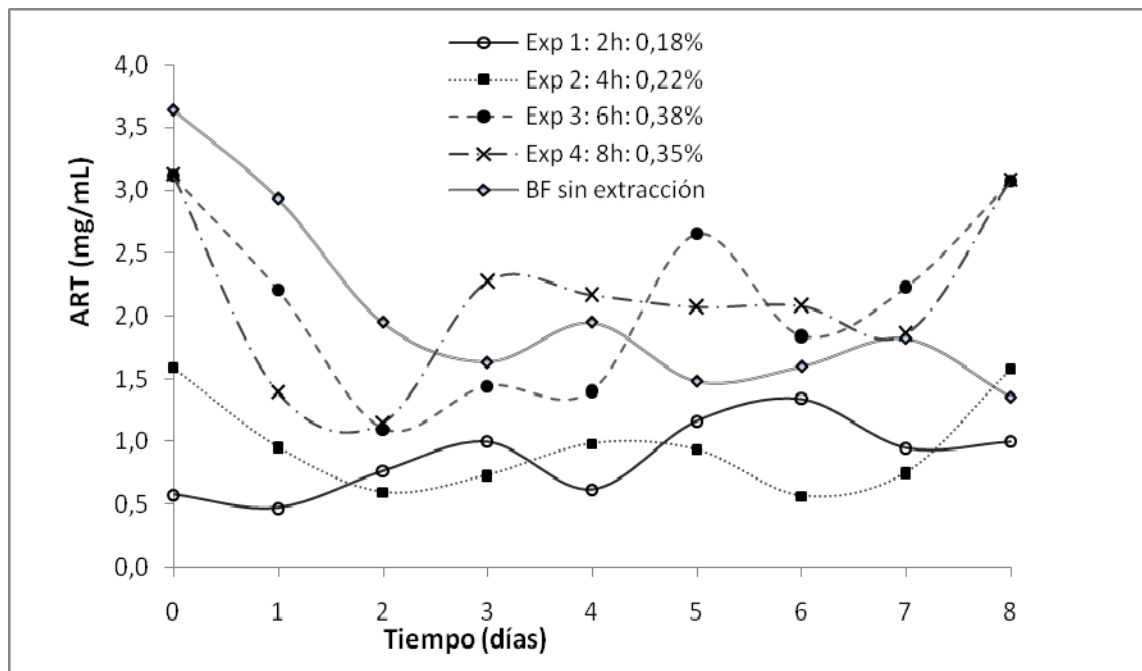


En la Figura 3 se observa que el mayor rendimiento de extracción de sapogenina se obtiene con 30g de bagazo húmedo (relación 1:10 g/ml bagazo-solvente), esto se debe a que una menor cantidad de muestra deja un mayor contacto con el solvente, permitiendo mejorar la transferencia de masa bagazo de fique-solvente durante el proceso soxhlet [31]. De igual forma se aprecia que la mayor concentración de sapogeninas se obtiene a las 6 horas de extracción y a las 8 horas el porcentaje de sapogeninas extraídas disminuye, debido a que estos compuestos son susceptible al calor y un tiempo largo de extracción conduce a su degradación térmica [32].

### *Determinación del efecto de las saponinas sobre la etapa hidrolítica*

En la figura 4 se observa la concentración de azúcares reductores para todos los experimentos generada en una serie de fluctuaciones con una concentración máxima de 3.65 mg/ml y una concentración mínima de 0.58 mg/ml. Se puede apreciar de manera indirecta la cantidad de sustrato consumido para la etapa metanogénica debido a un mayor metabolismo de los microorganismos con una rápida conversión de azúcares.

**Figura 4. Concentración de Azúcares reductores.**



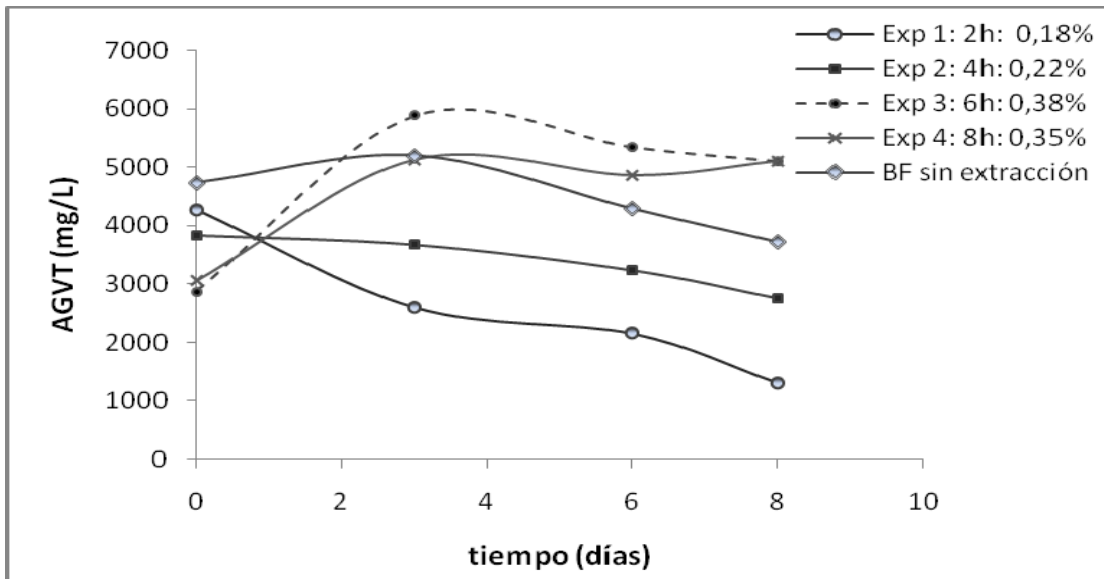
### *Incidencia de la producción de AGVs sobre la producción de metano*

La concentración de AGVs en la Figura 5 indica que los experimentos 3 y 4 presentaron una capacidad buffer disociada (no toxica) en el reactor, generando un aumento en la producción de metano. De acuerdo con los autores Hu, W., *et al.*

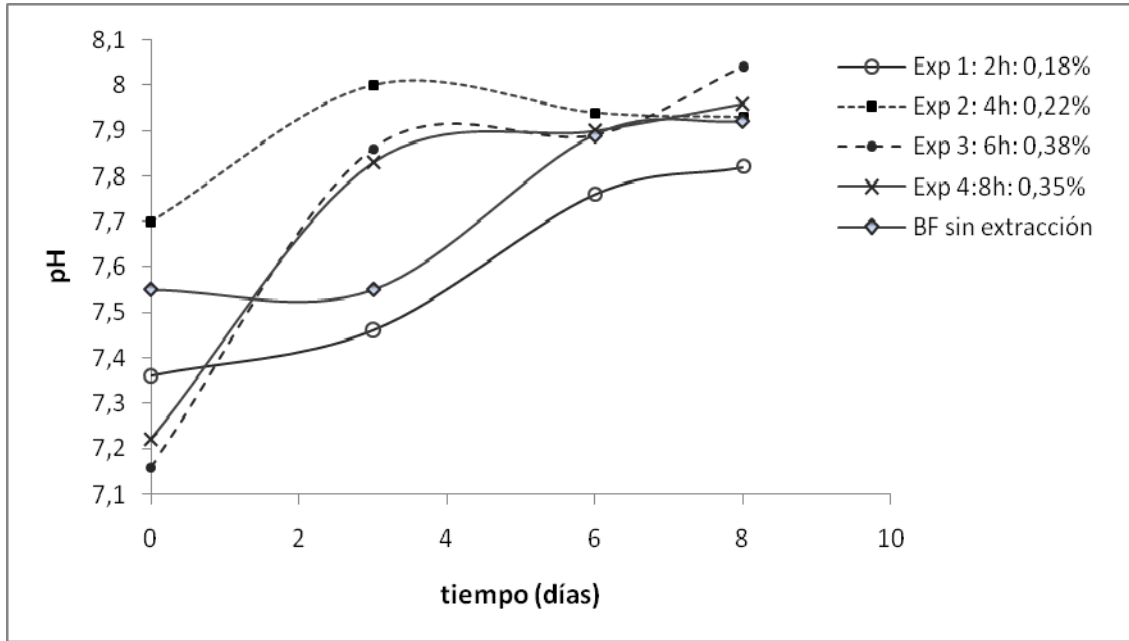
(2005) y García. R, *et al.* (2008) al aumentar la concentración de AGVs también se aumenta la producción de metano.

Se presenta una significativa estabilidad en el potencial de hidrogeno debido a la solubilidad de los AGVs y el consumo de los mismos encontrándose en un intervalo de pH favorable (7,16 – 8,04). La mayor concentración de AGVs (5460 mg / L) fue producida por el experimento 3 presentando un alto rendimiento en la producción de metano. Además de acuerdo con los resultados obtenidos la etapa hidrolítica depende de la concentración de biomasa responsable de la producción de enzimas hidrolíticas las cuales pueden ser inhibidas por las saponinas Castillo, J., *et al.* (2005). Según Wina, E., *et al.* (2005) las bacterias celulolíticas son más susceptibles a la presencia de saponinas.

**Figura 5. Concentración de AGV**

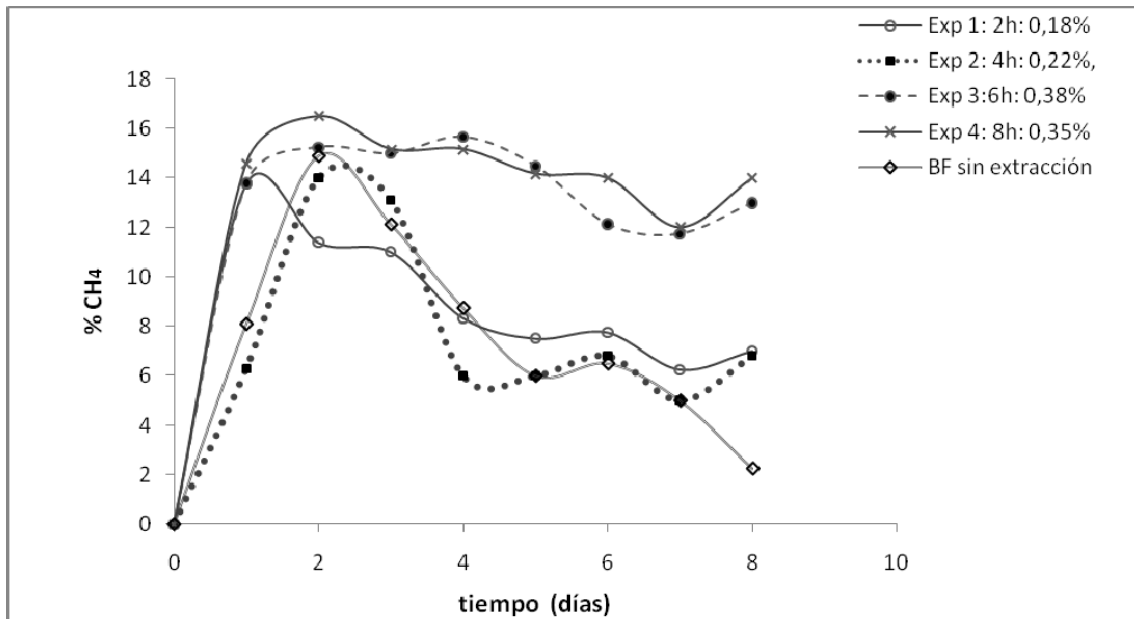


**Figura 6. Variación pH Vs tiempo**



*Efecto de las saponinas en la producción de metano*

**Figura 7. Producción de Metano**

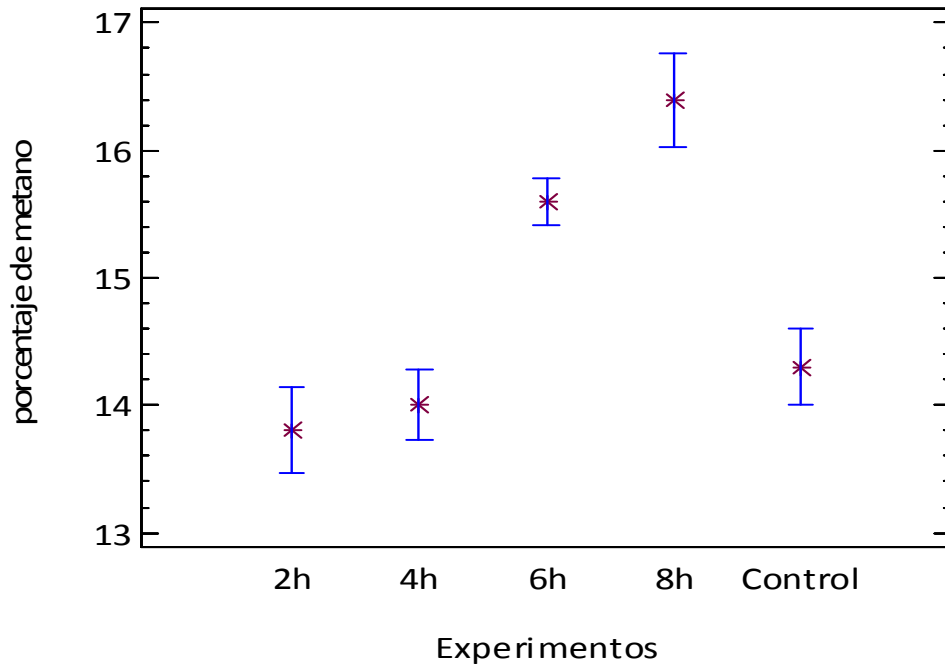


En la Figura 7 se observa que los mayores rendimientos los presentaron los experimentos 3 y 4 con valores de 15,67 y 16,5 % de Metano respectivamente. Las saponinas mostraron efectos inhibitorios sobre la digestión del bagazo de fique para la producción de metano. Estos resultados se relacionan con los presentados por Pen, B., *et al.* (2006) y Hu, W., *et al.* (2005) quienes demuestran que la cantidad de saponina presente en el sustrato es inversamente proporcional a la producción de metano.

#### *Análisis Estadístico*

La figura 8 presenta una comparación de muestras múltiples aplicada para determinar las medias significativamente diferentes entre varias muestras. Se observa que el grupo de experimentos con un tiempo de extracción de 2 y 4 horas y el control son significativamente diferentes del grupo de experimentos que tenían un tiempo de extracción de 6 y 8 horas cuando la diferencia real es igual a 0. Además entre cada grupo de medias se presenta un valor  $p < 0,05$  a un nivel de confianza del 95,0 %.

**Figura 8. Promedios de las producciones de metano a partir de bagazo de fique a un intervalo de confianza del 95%**



Según las condiciones de operación utilizadas y los resultados obtenidos se considera que los porcentajes de metano obtenidos fueron buenos, pero se pueden mejorar aumentando la escala de operación para así conseguir una mayor producción de biogás.

#### 4. CONCLUSIONES

Es posible retirar la saponina presente en el bagazo de fique, mediante el método de extracción soxhlet con etanol al 50% y durante un tiempo de 6 horas.

Al extraer las saponinas al bagazo de fique la concentración de Sólidos Totales, Sólidos Volátiles y la relación C/N no se afectó; por consiguiente este residuo sigue siendo un sustrato estable para la producción de biogás.

Es viable producir biogás a partir de bagazo de fique, utilizando como inóculo un consorcio microbiano compuesto de líquido ruminal y estiércol de cerdo en proporción 1:1 (v/v).

Se comprobó que la presencia de saponinas en el bagazo de fique afecta la producción de biogás; al retirar un 0,38% de saponina se incrementa la producción de metano en 6%, en comparación al bagazo en estado natural.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, CORPOICA, CADEFIQUE COLOMBIA. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural: Guía Ambiental del Subsector Fiquero. Bogotá D. C. 2006, pp. 121
- [2] Corporación Bucaramanga Emprendedora. Caracterización de la cadena productiva agroindustrial del fique del departamento de Santander. Bucaramanga. 2005, pp. 1-135.
- [3] CASTRO, L., ESCALANTE, H. *Producción de biogás a partir del bagazo generado durante el beneficio de fique*. Universidad del Quindío - 9, 10 y 11 de septiembre– Armenia, Colombia.
- [4] SALMINEN, J., RINTALA, J. Anaerobic digestion of organic solid poultry slaughterhouse waste. En *Bioresource Technology*. Vol 86. 2002, pp. 13-26.
- [5] MARTINEZ, A., Saponinas Esterodes, in *Química Farmacéutica*. Universidad de Antioquia. 2001. Medellín.
- [6] MADIGAN, M, M.J., PARKER J, Brock. *Biología de los microorganismos*. Prentice Hall Iberia: Madrid, 8 ed., 1999 pp.562-564.
- [7] RAPOSOA, B., M.A, MARTIN A., RUBIA M.A., RINCÓN B. Influence of inoculum–substrate ratio on the anaerobic digestion of sunflower oil cake *Engineering Journal*, 2009. 149(1-3): pp. 70-77.
- [8] TANG, Y., S.T., IKBAL, MORIMURA S., KIDA K, The effects of micro-aeration on the phylogenetic diversity of microorganisms in a thermophilic anaerobic municipal solid-waste digester. . *Water Research* 2004. 38: pp. 2537-2550.
- [9] VALDEZ, I., VAZQUEZ A, H.C.M.P.-V., Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2009. 13: pp. 1000–1013.
- [10] AGDAD, D., SPONZA. Co-digestion of mixed industrial sludge with municipal solid wastes in anaerobic simulated landfilling bioreactors. En *Journal of Hazardous Materials*. Vol 140, 2007, pp. 75-85
- [11] YEN, H., BRUNE, D. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. En *Bioresource Technology*. Vol 98. 2007, pp. 130-134.
- [12] JEAN, P., VINCKEN, HENG, L., GROOT, A., GRUPPEN, H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* 68, 2007, pp. 275-297.

- [13] HERNANDEZ, E.U., Estudio de una Emulsion o/w de una Resina Epoxi Dispersa en agua mediante el uso de un Copolimero Tribloque, in Ciencias en Ingenieria Quimica. 2007, Instituto Politécnico Nacional Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas: Mexico.
- [14] SIDERIUS, A., S.K.K., and DEREK G. LEAIST. Surfactant Diffusion Near Critical Micelle Concentrations. *Solution Chemistry*, 2002. 31(8): pp. 607-625.
- [15] C.R. SOLIVA A, A.B.Z.a., CL´EMENT C., H.D. HESS a, 1, V. FIEVEZ B., KREUZER M. In vitro screening of various tropical foliages, seeds, fruits and medicinal plants for low methane and high ammonia generating potentials in the rumen. *Animal Feed Science and Technology*, 2008. 147: pp. 53-71.
- [16] HESS, H., M.K.A., DIAZ T., LASCANO C., CARULLA J., SOLIVA C., MACHMÜLLER A. Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Animal Feed Science and Technology*, 2003. 109: pp. 79-94.
- [17] HART, K., D.R.Y.A.N.-R., DUVAL S., MCEWAN N., NEWBOLD C. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 2008. 147: pp. 8–35.
- [18] SANTOS, A., H.J.A.C. Efecto in vitro de extractos ricos en saponinas de *Pithecellobium saman* y *Sapindus saponaria* sobre el crecimiento de dos bacterias celulolíticas ruminales. *REVISTA CORPOICA*, 2005. 6(1): pp. 20-25.
- [19] KAMRA, D., N.A., CHAUDHARY L. Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. *International Congress Series*, 2006. 1293: pp. 156–163.
- [20] ANGARITA, E.I.C.A. Efecto de la inclusión de aceite de coco sobre la producción de metano y parámetros de fermentación ruminal en novillas utilizando la técnica cell túnel, in *Ciencias Agropecuarias*. 2007, Universidad de Cundinamarca: Fusagasuga-cundinamarca.
- [21] HU, W. LIU, J., YE, J, WU, Y. GUO Y. Effect of tea saponin on rumen fermentation in vitro. *Animal Feed Science and Technology*. 2005. Vol 120:pp. 333-339.
- [22] RUSSELL, J., R.J. Factors that alter rumen microbial ecology. *Agricultural*, 2001. 292: pp. 1119-1122.
- [23] RODRÍGUEZ, F., T.E.D.M., MACKENZIE G., GUATIVA L., AFANADOR G. Asilamiento patrón de fermentación de carbohidratos y caracterización morfológica

de bacterias celulíticas del rumen de bovinos alimentados con heno de raigrás en Colombia. CORPOICA, 2000. 1: pp. 23-28.

[24] HERNANDEZ, R., E.L., DÍAZ L., VILLANUEVA S. Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de Agave Lechugilla Torrey Universidad de Guadalajara, 2005. 3(11): pp. 1-10.

[25] JIANYONG, W., L.L., CHAU F. Ultrasound-assisted extraction of gingseng saponins from gingseng roots and cultured gingseng cells Ultrasonics sonochemistry, 2001. 8: pp. 347-352.

[26] ANISH, M., Análisis de los Alimentos. , ed. Análisis de los Alimentos. ed. ACRIBIA. 2004: Madrid.

[27] SANTOS, W., R.R.B., TORRES L., PALATNIKS M., PARENTEJF J., AND PALATNIK C. Haemolytic activities of plant saponins and adjuvants. Effect of periantra mediterranea saponin on the humoral response to the FML antigen of Leishmania donovani Vaccine, 1997. 15(9): pp. 1024-1029.

[28] APHA, A.a.W., Standard methods for the examination of water and wastewater. 1998, washington, USA.

[29] MILLER. G., Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry, 1959. 31(3): p. 426-428.

[30] ESCALANTE, H. "Estudio preliminar de la bioproducción de metano a partir de los residuos del proceso de beneficio del fique." Revista Ion, Universidad Industrial de Santander 2009. 22: pp. 21-25.

[31] OLESZEK, W. Chromatographic determination of plant saponins. J. Chromatogr. A. 2002. (967): pp. 147-162.

[32] MUIR, A., PATON, D., BALLANTYNE, K., AUBIN, A. Process for recovery and purification of saponins and sapogenins from Quinoa. US Patent 2002. pp. 6, 355,249.

[33] CASTILLO, J., MARTINÉZ, A. Estudio de la hidrólisis enzimática en la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos mediante la digestión anaerobia. Universidad Industrial de Santander .2005.pp 21.

[34] WINA, E., MUETZEL S. The Impact of Saponins or Saponin-Containing Plant Materials on Ruminant ProductionsA Review. J. Agric. Food Chem. 2005. pp. 53, 8093-8105 8093.Indonesia.

[35] PEN, B., SAR, C. Effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* extracts on *in vitro* ruminal fermentation and methane emission. *Animal Feed Science and Technology*. , Japan.2006.pp. 175–186.

[36] GARCÍA, R., GONZÁLEZ, S. Screening the activity of plants and spices for decreasing ruminal methane production *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*. Spain.2008.pp. 36–52.

## **ANEXOS**

### **ANEXO I**

#### **PROTOCOLO DE LA MUESTRA DE BAGAZO.**

**Objetivo:** Recoger muestra de bagazo húmedo generado durante el beneficio del fique.

#### **Materiales y Reactivos**

- Nevera de icopor
- Hielo
- Alcohol al 70%
- Tiras reactivas de PH
- Guantes de látex
- Bolsas plásticas
- Cinta de enmascarar
- Marcadores permanentes

#### **Procedimiento**

1. Escoger hojas de fique en las que no se observen daños ocasionados por alguna clase de microorganismos o esté lacerada.
2. Limpiar la maquina desfibadora de hojas de fique, con alcohol al 70% antes de proceder a tomar la muestra de bagazo.
3. Solicitar al manipulador de la máquina que comience la operación del desfibrado de la hoja de fique. Descartar la primera fracción expulsada del bagazo, tomar la fracción del medio igualmente descartar la última parte.
4. Llenar la totalidad de las bolsas de la toma de muestra, sin dejar espacios de aire, medir PH y cerrar inmediatamente.
5. Llevar la nevera de icopor con hielo, las bolsas con las muestras, debidamente cerrados y rotulados.

6. Conservar refrigerado hasta su uso.

**Nota:** Rotular todo el material que contenga todas las muestras con nombre del lugar, día y fecha de la toma de muestra.

## **ANEXOS II**

### **PROTOCOLO PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE SAPONINAS**

#### **CRUDAS DEL BAGAZO DEL FIQUE POR MEDIO DEL MÉTODO SOXHLET.**

**Objetivo:** Cuantificar la cantidad de saponinas presentes en el bagazo de fique.

#### **METODO SOXHLET**

##### Materiales

- Balón fondo plano.
- Tuvo Soxhlet.
- Refrigeran.
- Termómetro.
- Soportes.
- Pinzas.
- Agitador magnético.
- Calentador.
- Mangueras.
- Plancha de calentamiento.

#### **REACTIVOS**

- 150 mililitros de Etanol.
- 150 mililitros de agua.

- 30 gramos de bagazo de fique.
- Aceite mineral.

## **PROCEDIMIENTO**

1. Pesar (30, 40, 50) gramos de bagazo de fique húmedo con PH 4 (Se hace una previa calibración de la balanza).
2. Colocar el bagazo de fique (en un dedal se puede usar una gasa o algo similar que permita el paso de solvente a través de la muestra de bagazo).
3. Preparar una mezcla de solventes etanol/agua 50:50 a un volumen de 300 ml (relación 1:10 muestra: solvente).
4. Extraer por un tiempo de (2, 4, 6, 8) horas para eliminar las saponinas de la muestra.
5. Al completar el tiempo requerido para la extracción se procede a retirar el bagazo de soxhlet y el extracto, a cada caso se procede hacer un tratamiento específico.
6. El bagazo se lava después de la extracción para retirar alguna posible cantidad de solvente con muestra que se haya retenido, luego se pasa a pesar (peso húmedo).
7. Luego se lleva a secar hasta temperatura constante para una posterior fermentación.
8. Filtrar la pulpa que se encuentre en el extracto después de realizada la extracción.
9. El extracto que sale de la extracción se lleva a secar a 55°C para remover el solvente del extracto por evaporación.
10. Este extracto se disuelve con 200 ml de agua destilada para disolver las partículas que están presentes.
11. En el desengrase se tomó una alícuota de 25 ml de hexano y 25 ml de extracto, se llevaron a un embudo de decantación agitando vigorosamente para lograr que ambos solventes entraran en contacto y así favorecer la transferencia de masa y obtener la separación de fases y así eliminar los lípidos presentes.

12. Luego se lleva a la hidrólisis con 10 ml de ácido 2N y 25 ml de extracto desengrasado su duración es de 4 horas.
13. Se pasa a una neutralización con 10 ml de NaOH en un embudo de decantación agitando continuamente hasta homogenizar. Luego se dejó en reposo por unos minutos hasta observar la precipitación de los sólidos presentes.
14. Este filtrado es lavado tres veces con cloroformo en un embudo de decantación agitando continuamente. La muestra fue secada a temperatura ambiente por cuatro horas.
15. Determinar el porcentaje de saponinas.

### **ANEXO III**

#### **PROTOCOLO MÉTODO GRAVIMÉTRICO.**

(Análisis químicos cuantitativos y cualitativos)

Es un análisis cuantitativo por medio de la pesada, algo que se tiene que pesar, muestra a analizar.

El método gravimétrico consiste en la obtención del peso (balanza analítica) del compuesto estable del elemento que se desea contar (identificar y saber cuánto).

En el método de precipitación el analito se convierte en un precipitado poco soluble, que se filtra, se purifica, y se convierte en un compuesto de composición conocida mediante el tratamiento térmico el cual finalmente se pesa. A partir de la masa de este compuesto se determina la cantidad original del analito (lo que se va a analizar).

## OPERACIONES DEL METODO GRAVIMETRICO

- Muestreo: dependiendo de que sea, si es sólido se muestreara por cuarteo y si es liquido por botella.
- preparación de la muestra: si es sólida hay que pulverizar.
- pesado de la muestra: una vez obtenida la muestra se procede a pesar con exactitud una porción que será inversamente proporcional a la cantidad del constituyente que se desea determinar a fin de obtener una cantidad de precipitado que nos permita trabajar con comodidad las siguientes operaciones de este método. Se debe de pesar de 1 a 3 g de la muestra cuando mucho.
- solución de la muestra: cuando se desconoce totalmente la naturaleza de la muestra se sugiere analizar un análisis cualitativo, no solo por los constituyentes si no por la solubilidad de la muestra. Cuando sea totalmente soluble en agua, la cantidad de muestra pesada se coloca en un vaso de pp. y después de disolverla con el volumen conveniente esta lista para procesar las siguientes operaciones. La muestra puede estar disuelta también en agua fría o caliente. Si la muestra es insoluble en agua fría y en agua caliente se tratara con el reactivo aconsejado por el análisis preeliminar; colocándola en el vaso de pp. agregando poco a poco el reactivo. Podemos tratar una muestra con ácido. Se usa vaso de pp. y matraz erlenmeyer, y para evitar proyecciones se usa vidrio de reloj y embudo. Como regla general puede decirse que cuando dichas sustancias insolubles tienen caracteres ácidos se puede usar un fundente básico y viceversa; el objeto de la fusión es transformar los compuestos insolubles en sales que sean solubles en agua o ácidos.
- .
- precipitación: operación fundamental en el análisis gravimetrico y de más influencia en los resultados que se obtengan. Y consiste en la transformación en el seno de un liquido de un compuesto que contenga el elemento o radical por cuantear y que sea lo suficientemente insoluble en las condiciones del método para que prácticamente la separación sea total. Por regla general, toda

precipitación se hace calentando previamente el líquido a una temperatura cercana a la ebullición, adicionando en reactivo poco a poco agitando la mezcla con la varilla de vidrio, dejándolo resbalar por las paredes del vaso para evitar pérdidas por salpicaduras; el reactivo siempre se debe de agregar en exceso. Toda formación de un precipitado es el resultado de una reacción química que da lugar ya sea a la liberación de un metal insoluble o a la formación de un compuesto insoluble que contiene el elemento que se valora o se cuantea. La precipitación se inicia con pequeñísimos núcleos que crecen con mayor o menor rapidez a medida que se adiciona el reactivo; hay casos en los que la aparición del precipitado no ocurre tan pronto se adiciona el reactivo (algunos fosfatos y oxalatos dobles). algunas muestras deben ser dejadas en digestión es decir pasando durante algunas horas, de preferencia en caliente pero debajo del punto de ebullición.

## **ANEXO IV**

### **TOMA DE MUESTRA DE LIQUÍDO RUMINAL**

**Objetivo:** Recoger la muestra de líquido ruminal para aumentar los rendimientos de la producción de metano a partir del bagazo de fique.

### **MATERIALES**

- Nevera de icopor
- Frascos plásticos grandes
- Guantes de nitrilo y de látex
- Cinta transparente gruesa
- Dotación( tapabocas, botas de caucho, casco, pantalón y camisa blanca)

## **PROCEDIMIENTO**

1. Escoger el mejor saco ventral teniendo cuidado que el líquido ruminal no se encuentre ni muy aguado ni muy seco.
2. Se llenan muy bien los frascos dejándolos muy bien tapados en el momento de finalizar la toma de muestra.
3. Depositar los frascos en la nevera de icopor
4. Sellar muy bien la nevera con cinta.

## **ANEXO V.**

### **PROTOCOLO DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES.**

**Objetivo:** Determinar la presencia de azúcares reductores producidos por la degradación de la celulosa, durante los procesos de fermentación.

### **MATERIALES**

- Tubos tapa rosca
- Gravillas
- Espectrómetro
- Pera
- Micro pipetas
- Vaso de precipitado
- Puntas
- Pipeta

## **Reactivo DNS**

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

## **PROCEDIMIENTO**

1. Agregar 1 ml de reactivo a 1 ml de muestra con su respectiva réplica usando tubos tapa rosca.
2. Dejar en baño con agua en ebullición durante 5 minutos.
3. Detener la reacción en un baño de hielo.
4. Agregar 10 ml de agua destilada, y dejar reposando durante 15 minutos.
5. Ubicar los tubos en una gravilla para facilitar su manipulación.
6. Leer la concentración de azúcares a 540 nm contra un blanco obtenido con el procedimiento anterior, pero agregando agua destilada en vez de muestra.

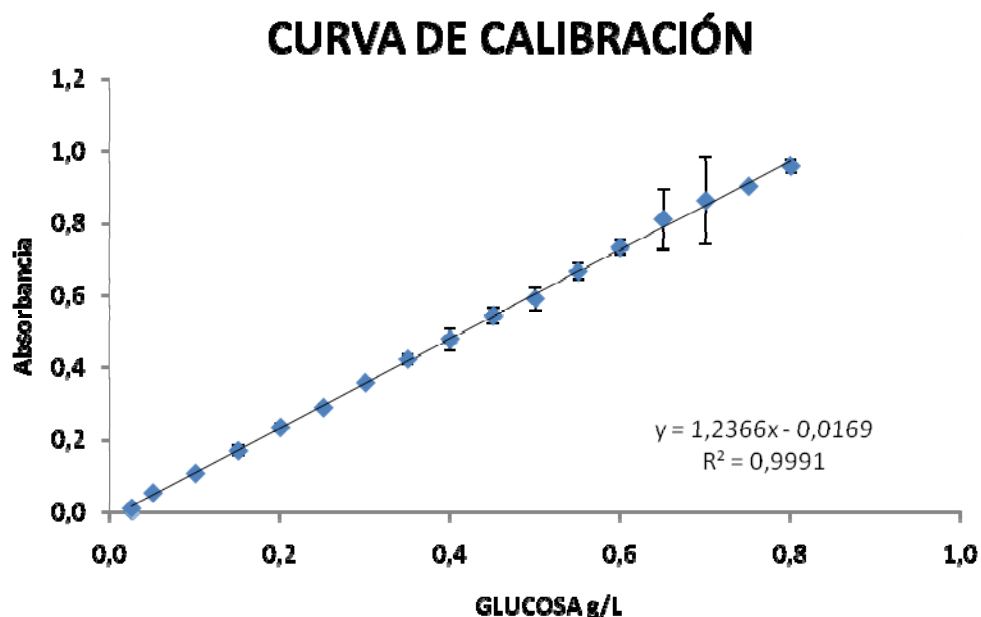


Figura 19. Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores por el método Dinitro salicílico (DNS).

## ANEXO VI

### DETERMINACION DE ACIDOS GRASOS VOLATILES (AGV).

**Objetivos:** Determinar la cantidad de ácidos grasos volátiles (AGV) presentes en la fermentación anaerobia.

#### MATERIALES

- Vaso de precipitado
- Probeta
- Centrifuga
- Peachimetro
- Agitador magnético
- Balón de digestión
- Condensador

- Plancha de calentamiento
- Buretas
- Soportes con pinza
- Solución de NaOH al 0.1 N
- Solución de HCl al 0.1 N

## PROCEDIMIENTO

1. Centrifugar la muestra por 15 minutos en 10000 gravedades a 4°C.
2. Al sobrenadante se le mide pH, seguidamente se le toman 5ml de muestra y se afora hasta 25ml con agua destilada en una probeta junto con su réplica.
3. Llevar a un vaso de precipitado para realizar la titulación.
4. Titular con HCl al 0.1 N hasta alcanzar un pH de 4.5 y registrar volumen (A<sub>1</sub>).
5. Continuar titulado con HCl 0.1N hasta alcanzar un pH de 3 registrar volumen (A<sub>2</sub>).
6. Llevar la muestra a un balón de digestión con condensador, agregando un agitador magnético.
7. Calentar hasta ebullición y mantener por 2 minutos.
8. Medir el nuevo pH (en caliente) y titular con NAOH al 0.1N hasta alcanzar un pH de 6.5, registrar el volumen (B).

## CÁLCULOS

$$\text{Alcalinidad} = (A_1 \text{ ml} * N_{\text{HCl}} * 50000)/50 \text{ [mg/l]}$$

$$\text{AGV} = (B * N_{\text{NaOH}} * 60000)/50 \text{ [g/l]}$$

A<sub>1</sub> = Primera titulación (ml) con HCl 0.1N hasta alcanzar pH de 4.5

A<sub>2</sub> = Segunda titulación (ml) con HCl 0.1N hasta alcanzar pH de 3.0

B = Titulación (ml) con NaOH 0.1N hasta alcanzar un pH de 6.5

## ANEXO VII.

### REALIZACION DEL MONTAJE EXPERIMENTAL PARA LA FERMENTACIÓN.

**Objetivo:** Dar inicio a la experimentación para analizar la incidencia de las saponinas en la producción de biogás.

#### MATERIALES

- botellas serológicas de 50 ml debidamente etiquetadas.
- Tapones de caucho, agrafes y agrafadora.
- Manguera de 30 cm con adaptación a venoclicept
- Gasa y guantes de látex
- 1 frasco plástico de 2500g
- Vaso precipitado de 50ml
- Embudo de vidrio
- Probeta
- Papel kraft
- Vidrio de reloj

#### PROCEDIMIENTO

1. Se pesan 0.8g de fique seco en el vidrio de reloj para cada experimento.
2. Se prepara el líquido ruminal escurriendo y filtrando con una gasa en un frasco de plástico.
3. Se prepara el consorcio microbiano mezclando LR y LC.
4. Se mezcla el fique con 30ml de inoculo en cada reactor y se agitan uniformemente.
5. Cada reactor se gasea por espacio de 20 segundos y se agrafan.

6. Los tapones de las botellas de DNS se perforan para introducir las mangueras y sus venoclicepts para poder tomar la primera muestra de DNS en  $t=0$ .
7. Todos los experimentos son llevados a la incubadora para que se inicie la fermentación.

## **ANEXO VIII. FERMENTACION Y MEDICION**

**Objetivo:** Comenzar con la transformación realizada por microorganismos fermentativos al sustrato.

### **MATERIALES**

- Incubadora
- Silicona líquida
- Equipo PGD-IR3
- Agujas

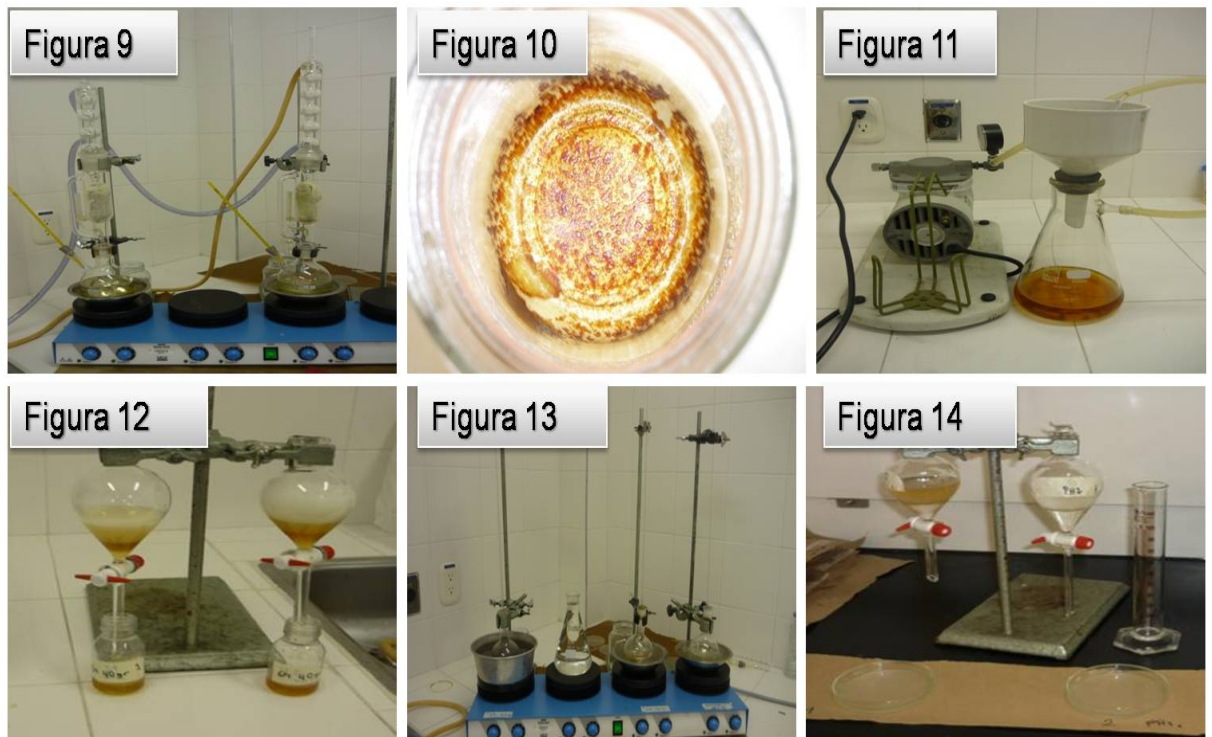
### **PROCEDIMIENTO**

1. Todos los experimentos son sacados de la incubadora para hacerles medición.
2. Después de ser agitada cada botella se perfora con la aguja para medir la producción de metano y  $CO_2$ .
3. Se debe llevar un registro diario de todas las mediciones para efectuar el análisis de resultados.
4. Una vez registrada la medición las botellas selladas con silicona líquida y son llevadas nuevamente a incubación para seguir con la fermentación.

## ANEXO IX

### FOTOGRAFIAS D EL PROCESO

#### EXTRACCIÓN SOXHLET



**Figura 9.** Extracción Soxhlet. **Figura 10.** Secado del extracto. **Figura 11.** Filtrado. **Figura 12.** Desengrase. **Figura 13.** Hidrólisis. **Figura 14.** Extracción con cloroformo.

## DIGESTION ANAEROBIA



**Figura 15.** Preparación del inóculo. **Figura 16.** Reactores Etiquetados. **Figura 17.** Reactores para toma de muestra de DNS. **Figura 18.** Reactores en la incubadora.

## ANEXO X

### DATOS DE EXPERIMENTACIÓN DURANTE EL PROCESO DE EXTRACCIÓN SOXHLET

Cantidad de saponina (g)	Tiempo de extracción (h)	%Saponina
30	2	0,184
	4	0,219
	6	0,375
	8	0,347
40	2	0,114
	4	0,252
	6	0,366
	8	0,282
50	2	0,123
	4	0,295
	6	0,296
	8	0,189

**Tabla 4 Extracción Soxhlet**

### DATOS DE EXPERIMENTACIÓN DE LA FERMENTACIÓN

EXPERIMENTOS UTILIZADOS				
Exp 1 CH <sub>4</sub>	Exp 2 CH <sub>4</sub>	Exp 3 CH <sub>4</sub>	Exp 4 CH <sub>4</sub>	Control1 CH <sub>4</sub>
Exp 1' CH <sub>4</sub>	Exp 2' CH <sub>4</sub>	Exp 3' CH <sub>4</sub>	Exp 4' CH <sub>4</sub>	Control2 CH <sub>4</sub>
Exp 1 DNS	Exp 2 DNS	Exp 3 DNS	Exp 4 DNS	Control1 DNS
Exp 1' DNS	Exp 2' DNS	Exp 3' DNS	Exp 4' DNS	Control1' DNS
Exp 1'' DNS	Exp 2'' DNS	Exp 3'' DNS	Exp 4'' DNS	Control1'' DNS
Exp 1 t=0	Exp 2 t=0	Exp 3 t=0	Exp 4 t=0	Control t=0
Exp 1 t=4	Exp 2 t=4	Exp 3 t=4	Exp 4 t=4	Control t=4
Exp1 t=8	Exp 2 t=8	Exp3 t=8	Exp 4 t=8	Control t=8
Exp 1 t=12	Exp2 t=12	Exp3 t=12	Exp 4 t=12	Control t=12

**Tabla .5 Experimentos utilizados durante el montaje para producción de biogás.**

<b>Tiempo (días)</b>	<b>% CH4</b>	<b>%BIOGAS</b>	<b>Experimentos</b>
<b>1</b>	13.78	25.8	1
	6.3	11.2	2
	13.8	25.96	3
	14.6	27.4	4
	8.1	14.57	Control
	7.5	13.43	Blanco
<b>2</b>	11.38	21.09	1
	14	26	2
	15.25	28.82	3
	16.5	31.34	4
	14.9	28.16	Control
	7.25	12.87	Blanco
<b>3</b>	11	20.39	1
	13.12	24.6	2
	15	18.92	3
	15.17	28.49	4
	12.13	22.58	Control
	6.5	11.36	Blanco
<b>4</b>	8.33	14.95	1
	6	10.9	2
	15.67	29.65	3
	15.17	28.64	4
	8.75	15.86	Control
	4	6.435	Blanco
<b>5</b>	7.5	13.43	1

	6	10.5	2
	14.5	27.35	3
	14.17	26.63	4
	6	10.42	Control
	3.75	5.9	Blanco
6	7.75	13.91	1
	6.8	12.1	2
	12.14	23.01	3
	14	26.31	4
	6.5	11.41	Control
	4	6.43	Blanco
7	6.25	10.89	1
	5	8.4	2
	11.75	21.78	3
	12	22.64	4
	5	8.5	Control
	2.5	3.49	Blanco
8	7	12.3	1
	6.8	11.9	2
	13	24.4	3
	14	26.36	4
	2.25	3.13	Control
	0	0	Blanco

**Tabla 6 corresponden a los porcentajes de medición diaria de CH<sub>4</sub> y Biogas**