

**ESTUDIO DEL EFECTO DE TAMAÑO DE PARTÍCULA DE BAGAZO DE
FIQUE EN LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS**

**CAROL VIVIANA VARGAS LEGUIZAMÓN
CARLOS MAURICIO ZAMBRANO GARCÍA**

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

2010

**ESTUDIO DEL EFECTO DE TAMAÑO DE PARTÍCULA DE BAGAZO DE
FIQUE EN LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS**

**CAROL VIVIANA VARGAS LEGUIZAMÓN
CARLOS MAURICIO ZAMBRANO GARCÍA**

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

Director

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

Co director (a)

**Liliana del Pilar Castro Molano
Ingeniera Química**

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

2010

DEDICATORIA

*“A Dios, que me permitió la luz para prepararme y cumplir la misión que me encomendó.
A mis amados padres Erasmo y Yolanda, ya que gracias a ellos soy quien soy hoy, de ellos siempre recibí amor y apoyo incondicional.
A mis hermanas Laura y Natalia, quienes han estado a mi lado siempre, compartiendo secretos y aventuras que solo se viven con hermanos, por su lealtad y ternura que dan a mi vida.
A mi sobrinita Luciana, mi frijolito que ha alegrado mi corazón.
A mi novio Oscar, por su amor y apoyo, quien fue mi motor en cada etapa del camino.
A mis tías y tíos, por su adorable compañía en mi afán por alcanzar mi sueño.”*

Carol Vargas.

*A Dios por darme la sabiduría, fortaleza y perseverancia para alcanzar mis logros.
A mis padres y hermanos por su apoyo y confianza a lo largo de mi vida.*

Carlos Zambrano

AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo se permiten agradecer a:

Ph D. Humberto Escalante, director de este proyecto, por su confianza y apoyo.

Ing. Qca. Liliana del Pilar Castro, Ph D. Carolina Guzman, y Bac. Mabel Quintero por su apoyo y colaboración.

Laboratorio de Biotecnología y su personal por su apoyo institucional y financiero.

Técnicos del laboratorio de Operaciones Unitarias de la Escuela de Ingeniería Química; Eduardo Carreño y Wilson Carreño por su colaboración incondicional.

Todas las personas que de alguna forma estuvieron vinculadas con este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	15
1.1 Biogás, fuente potencial de energía.	18
1.2 Digestión anaerobia, una vía viable para la bioconversión de materia orgánica.	19
1.3 Parámetros de control en la digestión anaerobia.	20
1.4 Inoculación en el proceso de digestión anaerobia.	21
1.5 Resistencia de la estructura lignocelulósica a la degradación de materia orgánica.	23
1.6 Importancia de un pretratamiento físico sobre residuos lignocelulósicos.	25
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	26
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	28
4. CONCLUSIONES	36
BIBLIOGRAFÍA	37
ANEXOS	44

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Composición del biogás derivado de diversas fuentes	19
Tabla 2. Diferentes fuentes de inóculos para reactores anaerobios.	22
Tabla 3. Caracterización Fisicoquímica del bagazo sin cortar, 2.36mm, 0.85mm y del inóculo.	28

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Variación de la concentración de Azúcares Reductores durante el tiempo de digestión a 25°C.	30
Figura 2. Variación de la concentración de Azúcares Reductores durante el tiempo de digestión a 39°	30
Figura 3. Variación de la concentración de Azúcares Reductores durante el tiempo de digestión a 39°	31
Figura 4. Variación de la concentración de Ácidos grasos volátiles durante el tiempo de digestión a 39°C.	32
Figura 5. Variación del pH durante el tiempo de digestión a 25°C.	32
Figura 6. Variación del pH durante el tiempo de digestión a 39°C.	33
Figura 7. Variación del porcentaje de metano durante el tiempo de digestión a 25°C.	34
Figura 8. Variación del porcentaje de metano durante el tiempo de digestión a 39°C.	34
Figura 9. Medias de la producción de metano para los tres tamaños de partícula a 25°C	36
Figura 10. Medias de la producción de metano para los tres tamaños de partícula a 39°C	36

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Muestreo	44
ANEXO B. Determinación de la concentración de azúcares reductores.	45
ANEXO C. Determinación de ácidos grasos volátiles y alcalinidad.	46
ANEXO D. Prueba de Fisher	48
ANEXO E. Registro fotográfico	50

RESUMEN

TITULO

ESTUDIO DEL EFECTO DE TAMAÑO DE PARTÍCULA DE BAGAZO DE FIQUE EN LA PRODUCCION DE BIOGÁS *

AUTORES

VARGAS LEGUIZAMÓN, Carol Viviana; ZAMBRANO GARCÍA, Carlos Mauricio **

PALABRAS CLAVE

Bagazo de fique, residuos lignocelulósicos, digestión anaerobia, biogas, tratamiento mecánico.

Este trabajo de investigación tuvo como fin evaluar el efecto del tamaño de partícula del bagazo de fique en la producción de biogás, a partir de la co-digestión de estiércol de cerdo y líquido ruminal bovino como inoculos. Se determino la concentración de azúcares reductores, ácidos grasos volátiles y la producción de metano para tres diámetros de partícula establecidos 5 mm (bagazo de fique en su forma natural), 2,36mm y 0,8mm.

Los resultados de este estudio demostraron que la reducción del tamaño de partícula afecta la estructura lignocelulósica del BF, aumenta la superficie de contacto y mejora la transferencia de masa sustrato/inóculo. Después de llevado acabo el proceso de bioconversión, se comprobó que la concentración de azúcares reductores es inversamente proporcional al tamaño de partícula y la velocidad de la etapa hidrolítica aumenta favoreciendo la producción de los AGV e incrementando la producción de metano en un 19% con respecto al bagazo sin tratar.

Adicionalmente se evidencia que el consorcio microbiano proporcionado por la mezcla de estiércol de cerdo y líquido ruminal bovino, es capaz de adaptarse y operar en un amplio rango de temperatura, trabajando eficientemente en la conversión de los productos de cada una de las etapas de la digestión.

* Proyecto de grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas, Escuela de Ing. Química, Director: Ph.D. Humberto Escalante Hernández, Codirector: Ing. Liliana del Pilar Castro Molano. Universidad Industrial de Santander.

ABSTRACT

TITLE

STUDY OF THE EFFECT OF PARTICLE SIZE IN SISAL FIBRE WASTE PRODUCTION OF BIOGAS *

AUTHORS

VARGAS LEGUIZAMÓN, Carol Viviana; ZAMBRANO GARCÍA, Carlos Mauricio **

KEYWORDS

Sisal fibre waste, lignocellulosic residues, anaerobic digestion, biogas, mechanical treatment.

This research Project evaluated the effect of the sisal fibre waste particle size in the production of biogas, from the co-digestion of pig manure and cow rumen fluid as inoculums. It was determined the concentration of the reducing sugars, volatile fatty acids and the production of metan for three diameters of particle established 5 mm (sisal fibre waste in its natural form), 2,36 mm and 0,8 mm.

The study results shown that the reduction of the particle size affects the lignocellulosic structure of sisal fibre waste, increase the contact surface and improve the transferency of substrate/inoculums mass. After the bioconversion process, it was proved that the concentration of reducing sugars is inversily proportional to the particle size and the speed of the hydrolytic stage increase improving the VFA production and increase the metan production to a 19% compared to the fibre waste without any treatment.

* Graduation project

** Faculty of Engineering physicochemical, School of Chemical Engineering, Director: Ph.D. Humberto Escalante Hernández, Co-director: Eng. Liliana del Pilar Castro Molano. University Industrial of Santander.

Additionally it is evident that the microbial consortium proportioned for the pig manure mixture and the cow rumen fluid, is capable of adapting and operating in an ample range of temperature, working efficiently in the conversion of products in each of the digestion stages.

INTRODUCCIÓN

El fique (*Furcraea Macrophylla*) es una planta originaria de la América Tropical se cultiva en Colombia, Venezuela y Ecuador. En Santander se destacan como principales municipios productores de fique Mogotes y San Joaquín [1]. En Colombia el proceso de beneficio del fique genera por cada 1000 kg de hoja 40 kg de fibra y 960 kg de residuos compuestos de bagazo y jugo. Parte de estos residuos se emplean en la producción de abonos orgánicos y otros productos industriales. Sin embargo los grandes volúmenes de bagazo y jugo son desechados directamente al medio, generando problemas ambientales [2]. El bagazo de fique (BF) por sus características fisicoquímicas (41.81% en celulosa y 22.17% en Hemicelulosa) se clasifica como una biomasa lignocelulósica; la cual puede ser utilizada para la producción de biogás [3-4].

Los residuos lignocelulósicos se pueden tratar mediante digestión anaerobia para producir un biogás que posee un elevado contenido de metano, dióxido de carbono e hidrogeno. Estos bioprocesos se llevan a cabo en ausencia de oxígeno y mediante la acción combinada de diferentes poblaciones

bacterianas, produciendo el combustible de valor y un efluente que puede aplicarse como fertilizante o acondicionador del suelo. [5]

La lignina es un polímero tridimensional que proporciona rigidez estructural y permite mantener juntas las fibras de los polisacáridos en las estructuras vegetales [6]. Sin embargo este hecho representa un gran impedimento a la accesibilidad de la celulosa para llevar a cabo un proceso de bioconversión. Por consiguiente la presencia de lignina en las biomásas residuales dificulta y limita su aprovechamiento industrial para la obtención de metano [2]. En el caso del BF (15.56% de lignina) es necesario aplicar un pre-tratamiento que disminuya el efecto de la lignina y permita una efectiva degradación anaerobia de determinados sustratos [7].

La producción de biogás a partir de residuos lignocelulósicos ha sido tema de estudio para diferentes investigadores. La degradación de la fibra de sisal y su potencial de producción de biogás se incrementan significativamente mediante un pretratamiento de reducción de tamaño de partícula. La producción de metano es inversamente proporcional al tamaño de la partícula del residuo; alcanzando incrementos del $0.18 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{Kg SV}$ al $0.22 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{Kg SV}$ [8]. Por otra parte la hidrólisis de la biomasa depende también del tamaño del residuo, debido fundamentalmente a la disponibilidad de superficie para la adsorción de las enzimas hidrolíticas. En el caso que la etapa limitante de un proceso anaerobio sea la hidrolisis, la reducción del tamaño de partícula del residuo supone un beneficio para el proceso general, produciendo menores tiempos de retención y tamaños de reactor menores [9].

En un bioproceso la reducción de tamaño de partícula incrementa la accesibilidad de los microorganismos hacia el sustrato, debido a que complejas estructuras poliméricas como proteínas, lípidos, polisacáridos y la misma lignina presente en desechos vegetales se rompen para formar cadenas más cortas y de mas fácil acceso al consorcio microbiano, facilitando el proceso de transferencia de masa, mejorando la velocidad de hidrólisis e incrementando el rendimiento del proceso global. Por ejemplo, la producción de metano a partir

de madera se favorece en la medida que esta biomasa es reducida de tamaño [10].

Estudios similares fueron llevados a cabo analizando cinco tamaños específicos de partícula y empleando diferentes residuos vegetales, se encontró que las máximas cantidades de biogás se produjeron a partir de materias primas de menor tamaño de partícula, estos fueron 0.088 mm y 0.40 mm [11].

Investigaciones efectuadas empleando como sustrato residuos de tomate, con variación del tamaño de partícula en un rango entre 1.3 mm y 20 mm, señalaron que la producción de metano es inversamente proporcional a este parámetro [12]. Otros estudios, a favor de reducir el tamaño de las partículas del inóculo, reportaron incrementos del 20% en la producción de metano utilizando Biofibras de estiércol macerado con tamaño de partícula de 0.35 mm comparados con los obtenidos en fibras de 2 mm y 5 mm, sin embargo no reportan diferencias significativas para tamaños de fibra mayores de 5 mm [13]. Por otra parte se ha evaluado el efecto del tamaño de partícula sobre la cinética hidrolítica, empleando residuos de maíz como sustrato y se determinó una hidrólisis máxima del 95% para el menor tamaño de partícula correspondiente a 0.354 mm, comparada con un 92% y un 88% para fibras de 1.68 mm y fibras sin cortar respectivamente [14].

Adicional a esto, el tamaño de partícula realmente interviene en la tasa de digestión anaerobia, ya que afecta la disponibilidad del sustrato en relación al área de contacto presente durante la hidrólisis enzimática, principalmente en fibras vegetales [15], aspecto que se ve respaldado por estudios que demostraron que partículas más pequeñas proporcionan áreas de contacto más grandes para la adsorción del sustrato lo que implica un incremento en la actividad microbiana y de la misma forma un aumento en la producción de metano, debido al más fácil acceso de los microorganismos al sustrato generando a su vez un aumento en la velocidad y rendimientos de la etapa hidrolítica [16], especialmente en la hidrólisis de la celulosa [17].

En consideración a lo expuesto anteriormente, el desarrollo de esta investigación pretende mediante un pretratamiento mecánico evaluar el efecto del tamaño de partícula sobre la etapa hidrolítica de la digestión anaerobia en el proceso de bioconversión del BF, así como su incidencia en la producción de metano, teniendo en cuenta la resistencia que ejercen las estructuras lignocelulósicas a la transferencia de masa a través del área de contacto existente entre el sustrato y el consorcio microbiano empleado. Los resultados obtenidos se cuantifican en tres variables de salida principales que describen el comportamiento del proceso en su totalidad; la concentración de azúcares reductores, la concentración de ácidos grasos volátiles y finalmente el porcentaje de metano generado.

1.1 Biogás, fuente potencial de energía.

El biogás resultante está compuesto por cerca de 60% de metano y 40% de dióxido de carbono, contiene mínimas cantidades de otros gases, entre ellos 1% de ácido sulfhídrico, es un poco más liviano que el aire, posee una temperatura de inflamación de 700° C y su llama alcanza una temperatura de 870° C [18]. Su producción se da a partir de diversos procesos tales como biodigestores agrícolas, tratamiento de aguas residuales y vertederos y su composición en metano permite que este pueda usarse como reemplazo del gas natural o como cualquier otro combustible, tanto para la cohesión de alimentos, como para la generación de electricidad y calor.

Es importante aclarar que este gas puede usarse como combustible sólo cuando el metano se encuentra en concentraciones mayores o iguales a 50%. Además de su ventaja económica tiene un beneficio ecológico, ya que elimina la emisión de metano, gas de efecto invernadero en la atmósfera. Como resultado, el biogás que de otra forma se perdería se transforma en un producto derivado útil con un valor agregado [18].

El cuadro siguiente resume la composición promedio del biogás

Tabla 1. Composición del biogás derivado de diversas fuentes

Fuente: CARRILLO, L. *Energía de biomasa.* (2004). 1° ed. p.33.

Gases	Desechos agrícolas	Lodos cloacales	Desechos industriales	Rellenos sanitarios	Propiedades
Metano	50 – 80%	50 – 80%	50 – 70%	45 – 65%	Combustible
CO ₂	30 – 50 %	20 – 50%	30 – 50%	34 – 55%	Acido, asfixiante
Vapor agua	Saturación	Saturación	Saturación	Saturación	Corrosivo
Hidrógeno	0 – 2%	0 – 5%	0 – 2%	0 – 1%	Combustible
H ₂ S	100 – 7000ppm	0 – 1%	0 – 8%	0,5 – 100ppm	Corrosivo, olor, tóxico
Amoniaco	Trazas	Trazas	Trazas	Trazas	Corrosivo
CO	0 – 1%	0 – 1%	0 – 1%	Trazas	Tóxico
Nitrógeno	0 – 1%	0 – 3%	0 – 1%	0 – 20%	Inerte
Oxígeno	0 – 1%	0 – 1%	0 – 1%	0 – 5%	Corrosivo
Orgánicos	Trazas	Trazas	Trazas	5ppm	Corrosivos, olores

El hidrógeno presente en el sustrato actúa como intermediario en el proceso de digestión anaerobia y algunas bacterias pueden producir trazas de CO. La presencia de nitrógeno y/u oxígeno puede indicar una entrada accidental de aire y esto implicaría graves consecuencias debido al riesgo de explosiones. El oxígeno es consumido por los microorganismos facultativos dejando el nitrógeno residual [19]. Tanto el azufre orgánico, presente por ejemplo en algunos aminoácidos, y el inorgánico pueden ser reducidos a H₂S, un gas muy tóxico y altamente reactivo con los metales tales como hierro y cobre, originando la corrosión.

1.2 Digestión anaerobia, una vía viable para la bioconversión de materia orgánica.

La digestión anaerobia es el proceso que permite la conversión de materia orgánica a metano, dióxido de carbono e hidrógeno, en un ambiente libre de oxígeno mediante la acción combinada de diferentes consorcios microbianos. La producción de metano coincide con la última fase del proceso de digestión en la cual los compuestos orgánicos son degradados completamente a través de una serie de reacciones, muchas de las cuales ocurren simultáneamente sin una separación clara de fases.

La digestión anaeróbica se realiza en cuatro etapas: a) etapa hidrolítica, b) etapa acidogénica, c) etapa acetogénica y d) etapa metanogénica. En la hidrólisis, partículas y moléculas complejas son hidrolizadas por enzimas extracelulares producidas por los microorganismos fermentativos presentes en el inóculo; como resultado se producen compuestos solubles que son metabolizados por las bacterias anaerobias en el interior de las células. En la segunda fase, la acidogénica, los compuestos solubles, básicamente diferentes tipos de oligosacáridos y azúcares, alcoholes, aminoácidos y ácidos grasos, son fermentados por los microorganismos acidogénicos que producen, principalmente, ácidos grasos de cadena corta, alcoholes, dióxido de carbono e hidrógeno. En la tercera fase, acetogénica, los ácidos grasos de cadena corta son transformados en acético, hidrógeno y CO₂, mediante la acción de los microorganismos acetogénicos. Finalmente ocurre la metanogénesis, en donde se genera metano principalmente a partir de acético, H₂ y CO₂ [9].

1.3 Parámetros de control en la digestión anaerobia.

La velocidad de reacción de los procesos biológicos depende de la velocidad de crecimiento de los microorganismos responsables, que a su vez es dependiente de la temperatura [20]. Una alta temperatura proporciona mayor solubilidad de la materia orgánica, haciéndola más asequible a los microorganismos. La temperatura más adecuada en el proceso de digestión anaerobia de materia orgánica se encuentra dentro del rango mesofílico, es decir, alrededor de 35-37°C [9].

En este rango la degradación del material orgánico aumentará proporcionalmente al tiempo de digestión, sin embargo la producción volumétrica de metano disminuye una vez superado el óptimo [9]. En el caso de residuos ganaderos es usual manejar tiempos de digestión en un periodo de 10 a 30 días [21], que combinados con una adecuada agitación logran principalmente poner en contacto el sustrato fresco con la población bacteriana, proporcionando una densidad y temperatura uniforme [22].

Finalmente para que el proceso se desarrolle de forma satisfactoria, el pH debe estar en torno a la neutralidad, presentando problemas graves si el pH baja por debajo de 6 o sube por encima de 8,3 [23]. Las sobrecargas orgánicas o la presencia de un inhibidor de la etapa metanogénica, pueden provocar desequilibrios entre la producción y el consumo de ácidos grasos volátiles, produciendo la acumulación de éstos y el consiguiente descenso del pH, generando la acidificación del reactor, no obstante las altas alcalinidades presentes en residuos ganaderos logran estabilizar descensos importantes de pH [9].

El ajuste adecuado de cada uno de los anteriores parámetros permite llevar a cabo un efectivo proceso de bioconversión, a la vez que proporciona las características necesarias que debe tener no solo el sustrato, sino también, el inóculo para efectuar un mejor fenómeno de transferencia de masa entre las partículas y los microorganismos presentes.

1.4 Inoculación en el proceso de digestión anaerobia.

La digestión anaerobia de materia lignocelulósica es llevada a cabo por un consorcio microbiano que realiza funciones de hidrólisis, degradación de los componentes hidrolizados a productos de fermentación tales como ácidos, y la utilización de ellos para la posterior producción de metano y dióxido de carbono [24].

Generalmente, la mayoría de residuos orgánicos pueden ser degradados por inóculos viables de cualquier ambiente en el que se produce la degradación

anaerobia de forma natural. Tales ambientes incluyen por ejemplo, digestores de lodos de depuración de aguas, sedimentos anaerobios de lagos y heces animales entre otros [25].

La codigestión de residuos ganaderos y residuos orgánicos en sistemas de mezcla completa es una metodología exitosa tanto en régimen termofílico como en el mesofílico [26]. La principal ventaja de la codigestión es aprovechar la sinergia de las mezclas, y compensar carencias de cada uno de los sustratos por separado [27]. En la tabla 2 se reportan las posibles fuentes de inóculo de los reactores, así como los valores de actividad metanogénica y el contenido de sólidos suspendidos volátiles (SSV) [28].

Tabla 2. Diferentes fuentes de inóculos para reactores anaerobios.

Tipo de inóculo	Actividad metanogénica específica gCH₄-DQO/g SSV.d	Concentración típica de SSV en el lodo g/l
Lodo granular	0,5-1,5	70-120
Biopelícula	0,4-1,2	ND
Lodos domésticos digeridos	0,02-0,2	15-40
Estiércol digerido	0,02-0,08	20-80
Lodo de fosa séptica	0,01-0,07	10-50
Laguna anaerobia	0,03	30
Estiércol fresco	0,001-0,002	30-140
Sedimento laguna	0,002-0,005	20-50

Fuente: Field, 1987

Los residuos ganaderos, y en concreto el estiércol de cerdo (EC) puede ser un excelente inóculo base para la codigestión porque generalmente presenta un contenido de agua más alto que la mayoría de residuos industriales, una mayor capacidad tampón y aportan una amplia variedad de nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos anaerobios [29]. Por otro lado el líquido ruminal bovino (LR) posee una importante población microbiana debido a su alta actividad celulolítica que al combinarse con inóculos metanogénicos incrementa en gran proporción la producción de biogás [30].

La codigestión entre EC y LR por tanto dan como resultado un importante consorcio microbiano capaz de degradar y transformar materia orgánica de naturaleza lignocelulósica, como el BF. Sin embargo, la presencia de lignina en este tipo de residuos obstaculiza el completo acceso de los microorganismos a la fuente de carbono, impidiendo un mayor aprovechamiento del potencial para la producción de biogás.

1.5 Resistencia de la estructura lignocelulósica a la degradación de materia orgánica.

Uno de los principales componentes de la materia orgánica, sobre todo en residuos agrícolas, son los materiales lignocelulósicos, compuestos en su mayor proporción por Lignina y polisacáridos de alto, peso molecular, principalmente Celulosa y Hemicelulosa. [31-32].

La celulosa es un polímero lineal de D-glucosa, con un alto peso molecular y principal componente de los residuos agrícolas, forestales y de la industria conservera. En forma de fibra es el material de soporte de los tejidos vegetales. Sin embargo, se mantiene el interés por su utilización como fuente renovable de energía y de materias primas [2]. La hemicelulosa está compuesta por cadenas cortas de polisacáridos y su función principal es proporcionar una unión entre la celulosa y la lignina [2]. La lignina es un polímero tridimensional de fenilpropano con unidades de fenilpropano que se mantienen unidas por enlaces éter y carbón-carbón. La lignina tiene un alto peso molecular y es amorfa en la naturaleza. La red de la lignina está concentrada en las capas

exteriores de las fibras y proporciona la rigidez estructural por endurecimiento y por mantener juntas las fibras de polisacáridos. [6-2]

La estructura de la pared celular en los materiales lignocelulósicos se asemeja a una columna de hormigón armado, siendo las fibras de celulosa las varillas metálicas y la lignina el cemento [2]. La lignina presenta características altamente refractarias a la degradación anaerobia, afectando la biodegradabilidad de la Celulosa, de la Hemicelulosa y de otros polímeros, y convirtiendo su degradación en el proceso limitante de la velocidad de hidrólisis [32-33].

Por lo anterior, la biodegradación de biomasa lignocelulósica es muy lenta y con bajos rendimientos [2], pues la protección que proporciona la lignina representa un gran impedimento a la accesibilidad de la celulosa para desarrollar el respectivo proceso de bioconversión. Por consiguiente es favorable aplicar pretratamiento a la biomasa lignocelulósica, que disminuya su efecto protector, cuando se desea utilizar como sustrato productor de biogás. Es innecesario eliminar o alterar toda la lignina presente para aumentar de forma significativa la susceptibilidad del material a la degradación enzimática, dependiendo del tipo de biomasa, es suficiente eliminar del 20 al 60% de la lignina [7] [2].

El BF presenta la composición y las características estructurales propias de los materiales lignocelulósicos en su pared celular. La aplicación de un pretratamiento al BF tiene como objetivo: i) modificar su estructura compleja, ii) disminuir el grado de polimerización, iii) debilitar los enlaces de la lignina con los carbohidratos e iv) incrementar el área superficial de contacto de las partículas que constituyen el residuo, permitiendo el adecuado proceso de transferencia de masa entre sustrato e inóculo [34-24]. Dentro de los pretratamientos más utilizados en los residuos lignocelulósicos se destacan [2]:

- a) Pretratamientos físicos: molienda, vaporización a presión, irradiación y pirólisis.

- b) Pretratamientos químicos: mediante álcalis, ácidos, gases, agentes oxidantes, disolventes de la celulosa, extracción de la lignina.
- c) Pretratamientos biológicos: utilizando microorganismos capaces de degradar la lignina.

Los pretratamiento físicos representan una alternativa interesante para tratar materiales lignocelulósicos, ya que existe una relación inversa entre el tamaño de partícula del sustrato y la producción de metano [11].

1.6 Importancia de un pretratamiento físico sobre residuos lignocelulósicos.

Los pretratamientos físicos, cuyo principal efecto es la reducción del tamaño de las partículas, producen un aumento en la tasa de hidrólisis, y si esta fase es la limitante del proceso anaerobio, supone un beneficio para el proceso general, produciendo menores tiempos de retención y tamaños de reactor menores [9].

La reducción del tamaño de partícula mediante un pretratamiento mecánico ocasiona el aumento de la superficie disponible mejorando el proceso de transferencia de masa y de igual forma el proceso biológico en dos sentidos. La reducción de tamaño en un sustrato con alto contenido en fibras y baja biodegradabilidad incrementa el rendimiento en la producción de biogás y reduce el tiempo de digestión de los sustratos [24]. Sin embargo el pretratamiento mecánico puede llevar en algunos casos no solo a la disminución del tamaño de los sólidos presentes en el residuo, sino también a la destrucción de la matriz tridimensional de las partículas que facilitan la permanencia de los microorganismos celulíticos, comprometiendo su actividad degradativa [35]. Por consiguiente es indispensable una adecuada técnica de reducción de tamaño que permita incrementar la accesibilidad de los microorganismos a las partículas del residuo con el rompimiento de grandes estructuras en cadenas más cortas, y que proporcione mejoras en la velocidad y en el rendimiento de la hidrólisis [24] y a la vez en el proceso anaerobio global.

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Sustrato

Como sustrato se empleó BF que se adquirió en una planta de beneficio del municipio de mogotes (Santander). Las muestras de bagazo se conservaron en recipientes refrigerados, evitando su degradación por microorganismos presentes en el ambiente, y luego se trasladaron al laboratorio para su posterior análisis.

Inóculo

Como inóculo se utilizó la co-digestión en proporción 1:1 (v/v) de LR y EC. El EC se obtuvo de los pozos sépticos de la granja porcícola "Portoferrayo", ubicada en el municipio de los santos (Santander) y el LR se recolectó directamente de la planta de sacrificio Vijagual ubicada en Rionegro (Santander).

Adecuación preliminar del sustrato: Pretratamiento mecánico

El BF fue secado al sol durante 36 horas; El residuo seco se trituró, en un molino de cuchillas *Willey-Mil*, hasta obtener porciones de tres tamaños: 5, 0.85 y de 2.36 mm.

A las muestras de BF de cada tamaño de partícula se les determinó pH, concentración de Sólidos Totales (ST), concentración de Sólidos Volátiles (SV), alcalinidad, concentración de Ácidos Grasos Volátiles (AGV), celulosa,

hemicelulosa, lignina y Fibra Detergente Ácida (FDA), de acuerdo a los mecanismos señalados por Van Soest y los Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (University; APHA 1998).

Proceso de digestión anaeróbica del BF

Con el fin de evaluar la incidencia del tamaño de partícula del BF en la etapa hidrolítica y sobre la producción de biogás se desarrollaron experimentos de fermentación utilizando BF en estado natural (5 mm) y BF (0,8 mm y 2,36 mm). Se emplearon reactores de 500 ml con un volumen de operación de 350 ml, de los cuales 337 ml correspondieron a la mezcla LR-EC que fueron adicionados a los bioreactores previamente cargados con 10 gr de BF. La fermentación se realizó a 25°C y a 39°C. El proceso de digestión se llevó a 9 días. La Concentración de azúcares reductores, Concentración de Ácidos Grasos Volátiles (AGV) y porcentaje de metano fueron las tres variables de respuesta determinadas. La concentración de azúcares reductores se estableció de acuerdo con el método colorimétrico del Ácido Dinitrosalicílico – DNS, utilizando un espectrofotómetro GENESYS 20 Thermo Spectronics, a una longitud de onda de 540 nm [37]. (Ver anexo B). La concentración de AGV se cuantificó de acuerdo al procedimiento de titulación descrito por Anderson y Yang (1992) [38]. (Ver anexo C). Finalmente el porcentaje de metano obtenido se midió con un detector de gases infrarrojo modelo PGD-IR marca Status Scientific Controls.

Los resultados obtenidos experimentalmente se analizaron, utilizando el software (StatGraphics plus 5.1, StatPoint Inc., Virginia, EE.UU) y la prueba de Fisher (F) se empleó para comprobar las diferencias estadísticamente significativas entre los resultados [39] mediante la determinación del valor P.

El valor P es una probabilidad que define el menor nivel de significación al que se puede rechazar una hipótesis nula de independencia entre las variables analizadas [42]. (Ver anexo D)

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Efecto del tratamiento mecánico sobre la estructura lignocelulósica del BF y características fisicoquímicas del inóculo (LR-EC).

El pH del BF permanece invariable con la reducción del tamaño de partícula mientras que el PH del inóculo proporciona un valor adecuado para el inicio de la digestión, pues permite compensar la acidez del sustrato y mantener el proceso en condiciones estables.

Tabla 3. Caracterización Fisicoquímica del bagazo sin cortar, 2.36mm, 0.85mm y del inóculo.

Parámetro	Unidades	Tamaño de partícula del Bagazo de Fique (BF)			LR-EC
		5mm	2,36mm	0,85mm	
pH		4	4	4	8
ST	%	93,1	92	92,79	43.770

SV	%	89,2	88,60	88,65	23.640
Alcalinidad	mgCaCO3/l	ND	ND	ND	3.100
AGV	mgCaCO3/l	ND	ND	ND	7.200
Celulosa	%	41,81	18,71	23,45	ND
Hemicelulosa	%	22,17	24,80	27,13	ND
Lignina	%	16,69	15,56	6,81	ND
FDA	%	64,66	44,80	44,70	ND

FDA : Fibra Detergente Acida.

ND : No determinado.

La tabla 3 permite apreciar que la concentración de ST y SV no presentan diferencias significativas al reducir el tamaño de partícula, como sí sucede con la concentración de hemicelulosa, que aunque es baja, esta aumenta a medida que se disminuye la cristalinidad de la celulosa mediante el cortado. La reducción del tamaño de partícula de igual manera mejora la digestibilidad del BF, como lo indica la disminución de la FDA. En cuanto al contenido de lignina es evidente la disminución que presenta conforme se reduce el tamaño de partícula, lo cual demuestra una modificación de la estructura lignocelulósica del BF que aumenta el área de contacto y mejora la transferencia de masa entre sustrato e inóculo.

Efecto del pretratamiento mecánico y de la temperatura sobre la etapa Hidrolítica.

La concentración de azúcares reductores permite determinar el rendimiento de la etapa hidrolítica en el proceso de digestión anaerobia del BF. Este rendimiento se mejora cuando se efectúa una disminución del tamaño de partícula, debido a la reducción de la resistencia a la transferencia de masa entre sustrato e inóculo; lo cual va a generar incrementos en la concentración

de azúcares reductores, que posteriormente mejora la producción de metano[40].

Figura 1. Variación de la concentración de Azúcares Reductores durante el tiempo de digestión a 25°C.

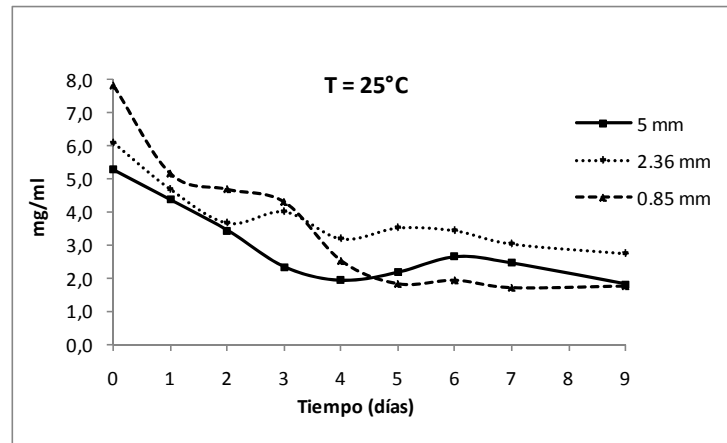
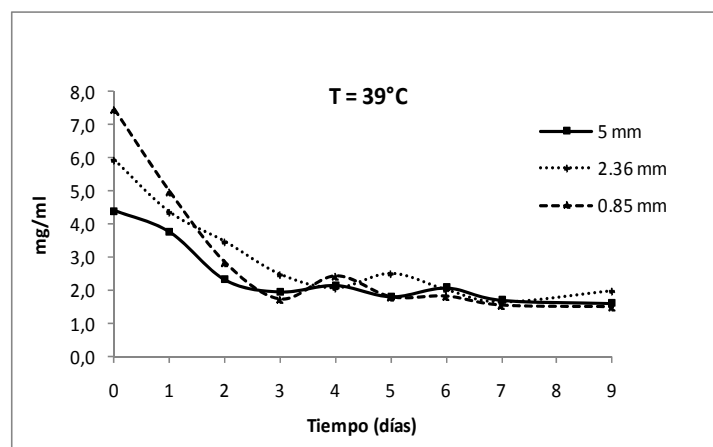


Figura 2. Variación de la concentración de Azúcares Reductores durante el tiempo de digestión a 39°C.



Como se aprecia en la figura 1 y 2, durante los primeros 3 días de digestión, tanto a 39°C como a 25°C, se observan importantes disminuciones de la concentración de azúcares reductores, especialmente para el tamaño de partícula menor; esto sugiere que las bacterias hidrolíticas aumentan su actividad enzimática a medida que incrementa la disponibilidad de partículas mas pequeñas y de mas fácil asimilación. Sin embargo después del cuarto día

la actividad hidrolítica de los microorganismos logran estabilizarse, debido al agotamiento de la fuente de carbono como factor limitante.

Al comparar las gráficas de los experimentos a 25°C y 39°C se observa una mayor rapidez en el consumo del material orgánico y mayor velocidad de la etapa hidrolítica en los experimentos a mayor temperatura. Sin embargo, en terminos generales se puede concluir que la variable temperatura no influye significativamente en el arranque y estabilización de esta etapa.

Efecto del pretratamiento mecánico y de la temperatura sobre la etapa Acidogénica

Figura 3. Variación de la concentración de Azúcares Reductores durante el tiempo de digestión a 39°

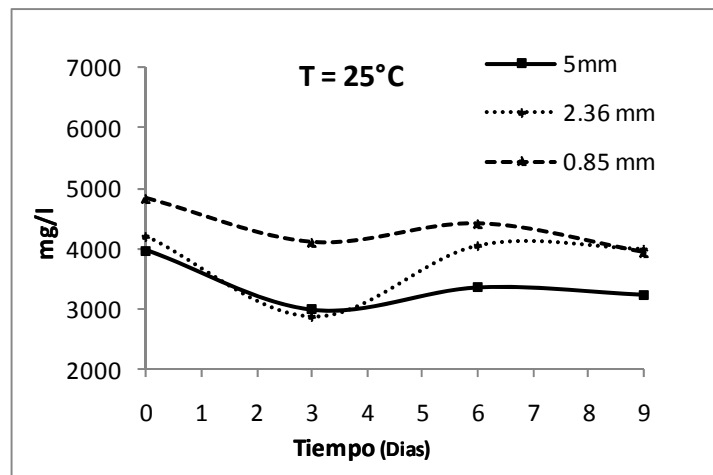
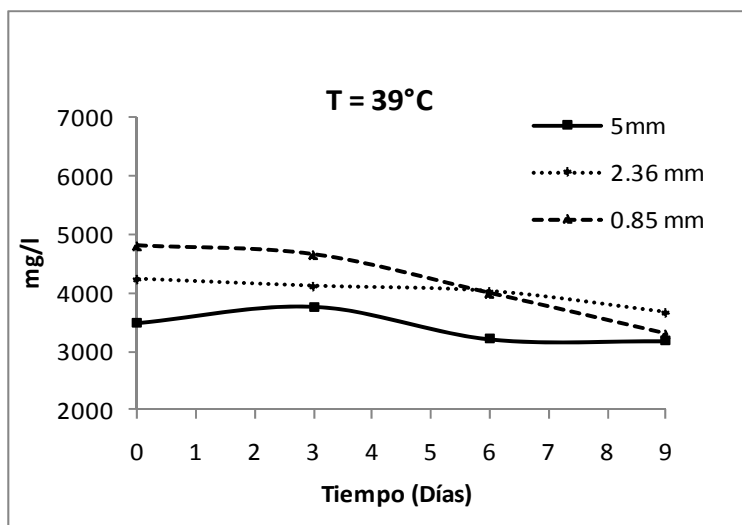


Figura 4. Variación de la concentración de Ácidos grasos volátiles durante el tiempo de digestión a 39°C.



Las graficas 3 y 4 permiten ver que para las dos temperaturas analizadas la concentración de AGV se mantuvo estable y desde el arranque del proceso fue mayor para el tamaño de partícula más pequeño, debido a que la reducción del tamaño de partícula aumentó la concentración de azúcares reductores lo que sugiere mayor disponibilidad de materia orgánica en las etapas posteriores de conversión.

Figura 5. Variación del pH durante el tiempo de digestión a 25°C.

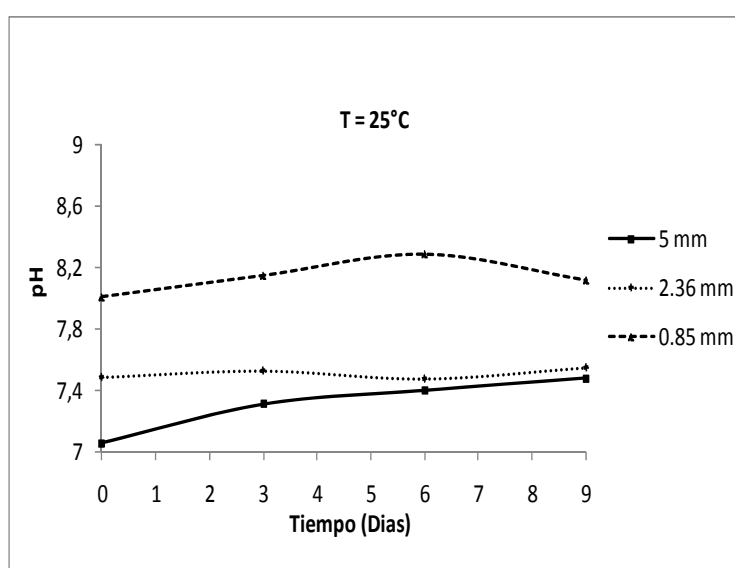
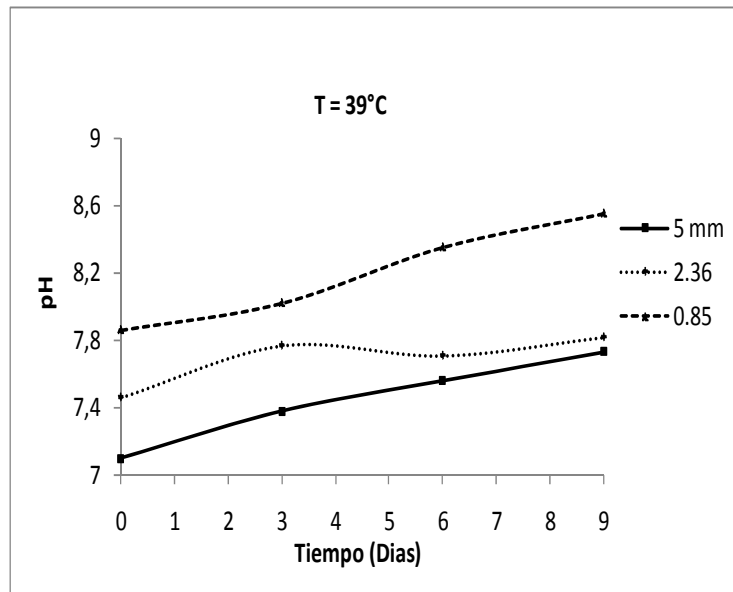


Figura 6. Variación del pH durante el tiempo de digestión a 39°C.



Por otro lado, al analizar las figura 5 y 6 es posible deducir que la temperatura en el proceso no tuvo gran influencia, pues tanto el pH como la concentración de ácidos grasos volátiles a 25 y 39°C se mantuvieron en los rangos adecuados, favoreciendo el proceso biológico en general. Después del tercer día de digestión se observó estabilidad de la etapa acidogénica para cada uno de los tamaños de partícula del sustrato.

Efecto del pretratamiento mecánico y de la temperatura sobre la etapa Metanogénica.

La digestión de los tres tamaños de BF posee un arranque favorable para la producción de metano a 25° y 39°C, como se aprecia en la figura 7 y 8.

Figura 7. Variación del porcentaje de metano durante el tiempo de digestión a 25°C.

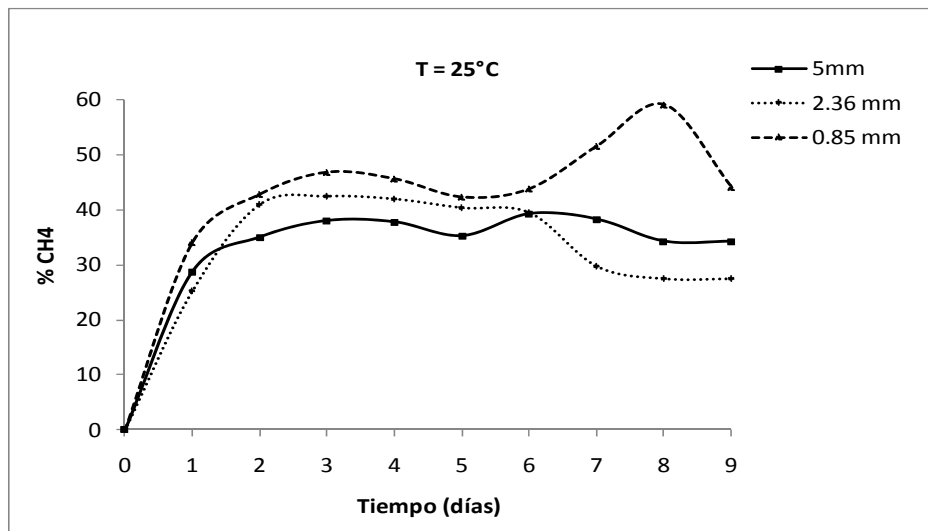
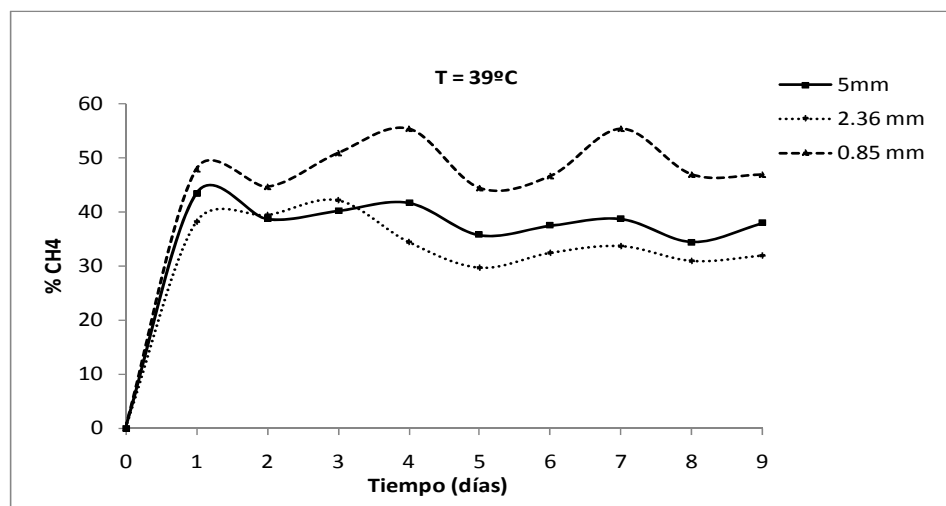


Figura 8. Variación del porcentaje de metano durante el tiempo de digestión a 39°C.



Sin embargo los resultados obtenidos para el tamaño de partícula menor demuestran la efectividad de la aplicación de un pretratamiento mecánico al sustrato, debido a que la reducción del tamaño de partícula proporciona un incremento en la superficie de contacto entre sustrato e inóculo, generando mayor accesibilidad a la fuente de carbono por parte de los microorganismos lo cual redundaría en el crecimiento del consorcio. Estudios llevados a cabo por otros autores respaldan los resultados obtenidos en esta investigación, demostrando que el proceso de digestión anaerobia se ve beneficiado por la reducción del tamaño de partícula, al proporcionar incrementos en el área de contacto disponible para la degradación por el consorcio microbiano [41].

Con respecto a la influencia de la temperatura los resultados sugieren que a 39°C se logra desde el inicio del proceso una mayor estabilidad de la etapa metanogénica; lo anterior se debe a que las bacterias metanogénicas son mesófilas [42] y la energía calorífica influye sobre la velocidad de las reacciones bioquímicas que ellas realizan. Sin embargo, después de unos días de operación el consorcio consigue superar el efecto térmico, llegando a alcanzar una producción de metano bastante similar en los dos procesos. Este último aspecto es importante a tener en cuenta, cuando a futuro se estime la viabilidad de escalar el proceso a nivel industrial.

Análisis estadístico de los resultados

El valor de la función de probabilidad (P) del test de *Fisher* es 0,0046 y 0,0004 para la producción de metano a 39°C y a 25°C respectivamente como lo determinan las figuras 9 y 10; este parámetro dio menor de 0,05 lo cual asegura que existen diferencias significativas entre cada experimento y se demuestra la dependencia existente entre la dos variables de entrada analizadas (Temperatura y tamaño de partícula), con un intervalo de confianza del 95%.

Figura 9. Medias de la producción de metano para los tres tamaños de partícula a 25°C

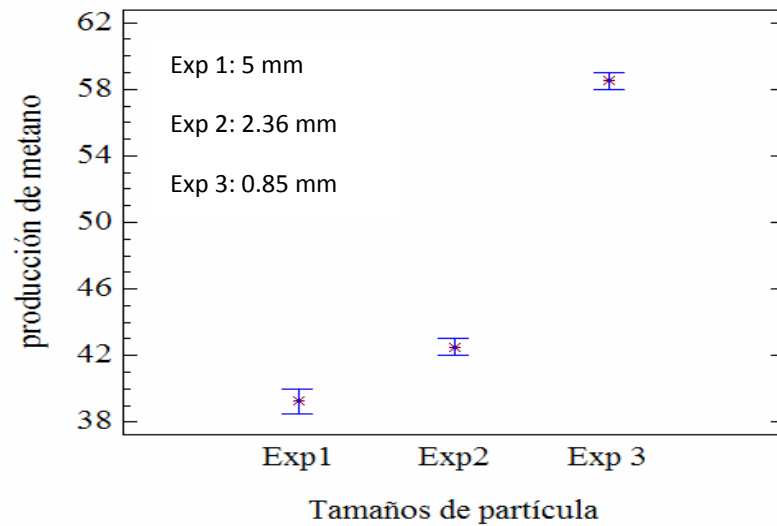
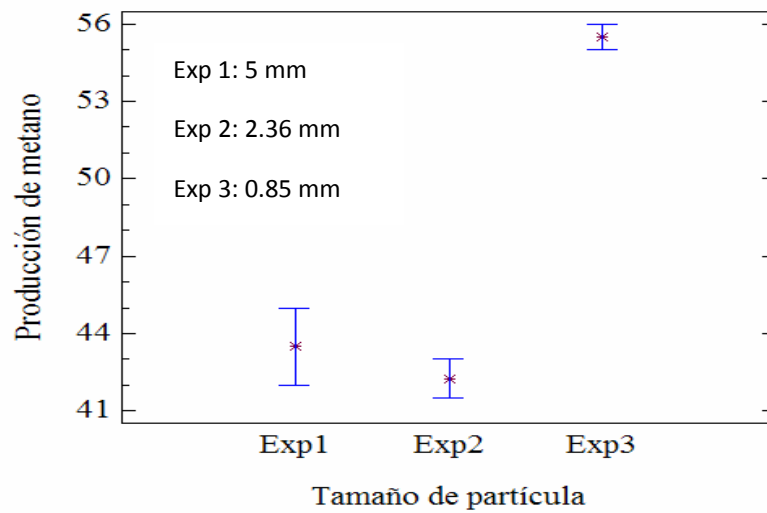


Figura 10. Medias de la producción de metano para los tres tamaños de partícula a 39°C



4. CONCLUSIONES

Se comprobó que disminuir el tamaño de partícula del bagazo de fique influye en el rendimiento del proceso de producción de biogás. En comparación con un bagazo de fique, cuyo tamaño de partícula es de 5 mm, la producción de metano se incrementó en un 19% cuando se redujo el tamaño de partícula a 0.85 mm.

Durante la digestión anaerobia, para la producción de metano, reducir el tamaño de partícula de un sustrato lignocelulósico como el bagazo de fique, influye favorablemente en las etapas hidrolítica y acidogénica. Un menor tamaño de partícula genera una mayor concentración de azúcares reductores e incrementa la velocidad de hidrólisis, aumentando la producción de ácidos grasos volátiles y a su vez la generación de metano.

La producción de metano a partir de bagazo de fique, utilizando un consorcio microbiano de líquido ruminal bovino y estiércol de cerdo, no se ve afectada significativamente por la temperatura. Es viable realizar el proceso a temperatura ambiente con buenos rendimientos en la producción de biogás; ya que el consorcio posee un amplio espectro de temperaturas (10 – 45°C) en las cuales se puede desarrollar de una manera óptima.

BIBLIOGRAFÍA

1. MOJICA, A., PAREDES J. El cultivo del fique en el departamento de Santander. Centro Regional de Estudios Económicos. Bucaramanga, Colombia. 2004
2. LAZARO, L., ARAUZO, J. Aprovechamiento de residuos de la industria de conservas vegetales. Hidrólisis enzimática. Zubía, España. 1994.
3. RODRÍGUEZ, R., VILLANUEVA, G., RIOS, E. "Sugarcane Bagasse pith dry pretreatment for single cell protein production". Bioresource Technology. 1992. 39 p.
4. CASTRO, L., ESCALANTE, H. Producción de biogás a partir del bagazo generado durante el beneficio de fique. Armenia, Colombia.: Universidad del Quindío.
5. DIAZ, C., ESPITIA, S., MOLINA, F. Digestión anaerobia, una aproximación a la tecnología. Bogotá, DC.: Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Biotecnología 2002
6. COWLING, E., KIRK, T. Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion processes. Biotechnology. Bioeng. Symp. (6). 1976.
7. FAN, L., GHARPURAY, M., LEE, Y. Evaluation of pretreatments for enzymic conversion of agricultural residues. Biotechnol. Bioeng. Symp. (11) 1981.
8. MSHANDETE, A., BJÖRNSSONA, L., KIVAISI, A., RUBINDAMAYUGI, M., MATTIASSON, B. Effect of particle size on biogas yield from sisal fibre waste. Renewable Energy. 2006.
9. CAMPOS A. Optimización de la digestión anaerobia de purines de cerdo mediante codigestión con residuos orgánicos de la industria agroalimentaria.

Tesis doctoral. Lleida.: Universitat de Lleida. Escola tècnica superior d'Enginyeria Agrària., Departament de Medi Ambient i Ciències del Sòl., Laboratori d'Enginyeria Ambiental. 2001.

10. JERGER, D., DOLENC, D., CHYNOWETH, D. Biogasification of woody biomass following physical and chemical pre treatment. Proceeding of 7th Symposium on Energy Biomass and wasters. Orlando, Fla. 1983.

11. SHARMA, S., MISHRA, I. et al. "Effect of particle size on biogas generation from biomass residues." *Biomass y Bioenergy* 17(4): 1988.

12. HILLS, D., NAKANO, K. Effects of particle size on anaerobic digestion of tomato solid wastes. *Agricultural Wastes*. Vol. 10. 1984.

13. ANGELIDAKI, I., AHRING, B. Methods for increasing the biogas potential from the recalcitrant organic matter contained in manure. *Water Science and Technology* 41. 2000.

14. SALDES, L., CHAMY, R, et al. "Estudio de la etapa hidrolítica de la degradación anaerobia de almidón en residuos de maíz.". Valparaíso, Chile.: Universidad Técnica Federico Santa María. Departamento de Procesos Químicos, Biotecnológicos y Ambientales. 2005.

15. WARD, A., HOBBS, P., HOLLIMAN, P., JONES, D. Optimization of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Renewable Energy* 31: 2395-2392. University of Wales. *Bioresource Technology* 99. 2008.

16. YADVIKA., SANTOSH., SREEKRISHNAN, T., KOHLI S., RANA V. Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques. Centre for Rural Development & Technology, I.I.T., Delhi 1100016, India. 2004.

17. HU HU, Z., QING YU, H., FA ZHU, R. Influence of particle size and pH on anaerobic degradation of cellulose by ruminal microbes. Hefei, Anhui 230026.:

The University of Science and Technology of China. Department of Applied Chemistry. Laboratory of Environmental Biotechnology, School of Chemistry. 2005.

18. URBAEZ, C., CARBALLO, L., ARTEAGA, Y., MARQUEZ, F. Biomasa: alternativa sustentable para la producción de Biogás. Cuba.: Universidad de Pinar del Río. Facultad de Forestal y Agronomía. Departamento de Química. 2007.

19. WHEATLEY, A., editor. Anaerobic Digestion: A Waste Treatment Technology. Elsevier Science Publishers Ltd, Barking, Essex, 1990. cap. 1, 5.

20. VAN LIER, J. "Temperature optima of thermophilic methanogenic sludge: implications for reactor start-up and operation", en Thermophilic anaerobic wastewater treatment; temperature aspects and process stability. Tesis doctoral. Países bajos.: Universidad de Wageningen. 1995.

21. HOBSON, P. "The treatment of agricultural wastes", in Anaerobic digestion: a waste treatment technology. Editado por Wheatley, A. Critical reports on applied chemistry. Elsevier applied science LTD. 1990. Vol 31.

22. NOONE, G. "The treatment of domestic wastes", en Anaerobic digestion: a waste treatment technology. Editado por Wheatley, A. Critical reports on applied chemistry. 1990. Vol 31.

23. LAY, J., LI, Y., NOIKE, T. Influences of pH and moisture content on the methane production in high-solids sludge digestion. Water Research. 1997. Vol. 31 (10),

24. FERNANDEZ, L. Caracterización cinética de la degradación anaerobia termofílica seca de la FORSU. Efecto de diferentes pretratamientos sobre la

biodegradabilidad del residuo. Tesis doctoral. *Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente. Universidad de Cádiz. España.* (2008).

25. CHYNOWETH, D., ISAACSON, R. Anaerobic digestion of biomass. Elsevier Applied Science. 1987.

26. BRINKMAN, J. Anaerobic digestion of mixed waste slurries from kitchens, slaughterhouses and meat processing industries. Proceedings of the II International symposium on Anaerobic Digestion of Solid Waste. Barcelona. 1999.

27. GARCIA, K. Codigestión anaeróbica de estiércol y lodos de depuradora para producción de biogás. España, Cádiz. 2009.

28. RAMIREZ, F., MOLINA, F., ROJAS, O y ALAZARD, D. Evaluación de potenciales semillas para la inoculación de reactores anaerobios. Memorias IV seminario taller Iberoamericano sobre tratamiento de aguas residuales. Bucaramanga, Colombia. 1996.

29. ANGELIDAKI, I., AHRING, B. Anaerobic digestion in Denmark. Past, present and future. III curso de Ingeniería Ambiental. Lleida. 1997.

30. MSHANDETE, A., BJORNSSON, L, et al. Enhancement of anaerobic batch digestion of sisal pulp waste by mesophilic aerobic pre-treatment. Water Research 39. 2005.

31. PAVLOSTATHIS, S., GIRALDO, E. Kinetics of anaerobic treatment: a critical review. Critical reviews in environmental control. 1991.Vol 21 (5,6).

32. SLEAT, R., MAH, R. Hydrolytic bacteria, in Anaerobic digestion of biomass. Editado por Chynoweth, D. Y e Isaacson, R. Elsevier applied science LTD. 1987.
33. VEEKEN, A., HAMELERS, B. Effect of temperature on hydrolysis rates of selectes biowaste components. Bioresource technology. 1999. Vol 29.
34. RODRÍGUEZ, R., VILLANUEVA, G Y RIOS, E. Sugarcane Bagasse pith dry pretreatment for single cell protein production. Bioresource Technology, 39, 1992.
35. CZERKAWSKI, J. Control of digestion and metabolism in ruminants. Editado por MILLIGAN, L., GROVUM L and DOBSON, A. Reston Publishing. 1986.
36. STAMS, A. Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. Antonie van Leeuwenhoek. 1994. Vol 66.
37. MILLER, G. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar. En Analytical Chemistry. 1959. Vol 31. N° 3.
38. ANDERSON, G., YANG, G. Determination of bicarbonate and total volatile acid concentration in anaerobic digesters using a simple titration. Water Environment Research 64. 1992.
39. PULIDO, H., SALAZAR R. Análisis y diseño de experimentos. México.:Mc Graw Hill. 2008.
40. V.A, V., F. B., et al. "Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material. 2008.

41. M., P. L. and M. J. A. Anaerobic degradation of organic materials - significance of the substrate surface area. Water Science and Technology 47(12). 2003.

42. KHANAL S. Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production. Principles and Applications. First Edition. Blackwell Publishing.; 301. 2008.

43. SÁNCHEZ, C., CORTIÑAS, P., TEJERA I. La prueba de hipótesis: las tendencias de fisher y neyman –pearson. Senda del Rey. UNED. Madrid.
csanchez@cee.uned.es, pcortinas@cee.uned.es, itejera@cee.uned.es

43. PÉRTEGA, S., PITA, S. Asociación de variables cualitativas: El test exacto de Fisher y el test de Mcnemar. 2007.
www.fisterra.com/mbe/investiga/fisher/fisher.asp

ANEXOS

ANEXO A. Muestreo

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
- Bolsa plástica con cierre
- Cinta de enmascarar
- Marcadores permanentes

Procedimiento

1. Escoger hojas de fique en las que no se observen daños ocasionados por alguna clase de microorganismo o éste lacerada.
2. Limpiar la máquina desfibradora 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

ANEXO B. Determinación de la concentración de azúcares reductores.

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

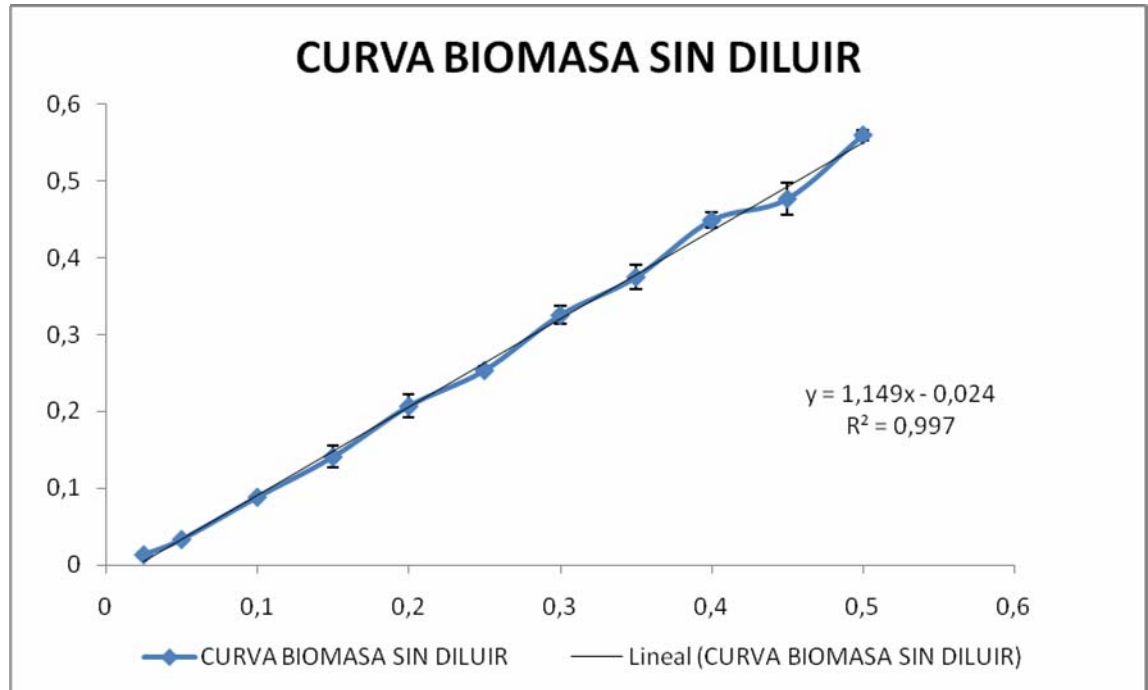
Materiales y Reactivos:

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

Procedimiento:

1. Agregar 250 μ L de reactivo a 250 μ L de agua destilada y 500 μ L de reactivo (DNS) con su respectiva replica usando tubos tapa rosca.
2. Se lleva la solución resultante a baño maría por 5 minutos y durante 5 minutos más permanece en un recipiente con hielo; después de efectuado este choque térmico.
3. La solución se diluye con 5 ml de agua destilada.
4. Ubicar los tubos en una gravilla para facilitar su manipulación.
5. Leer la concentración de azúcares a 540 nm contra un blanco obtenido con el procedimiento anterior, pero agregando agua destilada en vez de muestra.

6. Finalmente esta solución diluida se paso por el espectrofotómetro GENESYS 20 Thermo Spectronics y se registro la absorbancia para los posteriores cálculos.



ANEXO C. Determinación de ácidos grasos volátiles y alcalinidad.

La alcalinidad es la capacidad acidoneutralizante de una sustancia química en la solución acuosa. Esta alcalinidad de una sustancia se expresa en equivalentes de base por litro. Esta se puede hallar gracias a diferentes equipos entre los cuales el más importante es el pH-metro.

Materiales:

- Vaso de precipitado de 100 ml
- Probeta de 25 ml
- Centrífuga refrigerada
- pH-metro
- Agitador magnético

- 2 Balones esmerilados de fondo redondo o plano
- Condensador
- Plancha de calentamiento
- 2 Buretas
- Soporte de plancha
- Soporte universal
- Pinzas con nuez
- Solución de NaOH al 0.1 N
- Solución de HCl al 0.1 N

Procedimiento:

1. Tomar una muestra aproximadamente de 40 ml diaria o día de por medio durante el proceso de digestión, en tubos falcom de 50ml.
2. Centrifugar las muestras por 15 min a 10 000 gravedades.
3. Llevar el sobrenadante a frascos plásticos, medir pH y registrar el valor.
4. Medir 5 ml del sobrenadante y llevarlo a un vaso de precipitado de 100 ml.
5. Medir en una probeta 25 ml de agua destilada y agregarla a los 5 ml de sobrenadante medido anteriormente.
6. Titular con una solución previamente preparada de HCL 0.1 N hasta alcanzar un pH de 4.5 y registrar volumen (V1), manteniendo agitación continúa.
7. Continuar titulado con la solución de HCL sin dejar de agitar hasta alcanzar un pH de 3, registrar volumen (V2).

8. Llevar la muestra a un balón esmerilado, adaptarlo al condensador.
9. Calentar hasta ebullición y mantener por 2 minutos.
10. Titular con una solución previamente preparada de NaOH 0.1 N hasta alcanzar un pH de 6.5, registrar el volumen (V3).

Cálculos:

$$\text{Alcalinidad} = \frac{A1 * N_{HCl} * 50000}{50} \left[\frac{mg}{L} \right]$$

$$AGV = \frac{B * N_{NaOH} * 60}{50} \left[\frac{g}{L} \right]$$

ANEXO D. Prueba de Fisher

El modelo propuesto por Fisher establece una única hipótesis estadística, la hipótesis nula- H_0 , y no acepta la idea de dos hipótesis estadísticas contrapuestas. Fisher ideó una manera de medir el grado de incompatibilidad de un conjunto de datos con la hipótesis nula establecida, la evaluará con el valor de “p”, y será conocido como los valores “p-value”. El término significación se usaba para indicar que la probabilidad es suficientemente pequeña como para rechazar la hipótesis planteada. De esta manera si el valor de “p” es pequeño existen dos alternativas, o que la realización observada de la estadística de prueba constituye un evento raro o que la hipótesis nula planteada es invalida [42].

El test de Fisher permite analizar si dos variables dicotómicas están asociadas cuando la muestra a estudiar es demasiado pequeña.

Una forma de plantear los resultados es disponerlos en una tabla de contingencia de dos vías. Si las dos variables que se están considerando son dicotómicas, la tabla a emplear puede ser como la mostrada a continuación.

Tabla de contingencia general para la comparación de dos variables dicotómicas en el caso de grupos independientes.

	Característica A		
Característica B	Presente	Ausente	Total
Presente	a	b	a + b
Ausente	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	n

El test de Fisher se basa en evaluar la probabilidad asociada a cada una de las tablas 2 x 2 que se pueden formar manteniendo los mismos totales de filas y columnas que los de la tabla observada. Cada una de estas probabilidades se obtiene bajo la hipótesis nula de independencia de las dos variables que se están considerando.

La probabilidad exacta de observar un conjunto concreto de frecuencias a, b, c y d en una tabla 2 x 2 cuando se asume independencia y los totales de filas y columnas se consideran fijas, viene dada por la distribución hipergeométrica:

$$p = \frac{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}{n! a! b! c! d!}$$

Esta fórmula se obtiene calculando todas las posibles formas en las que podemos disponer n sujetos en una tabla 2 x 2 de modo que los totales de filas y columnas sean siempre los mismos, (a+b), (c+d), (a+c) y (b+d).

La probabilidad anterior deberá calcularse para todas las tablas de contingencia que puedan formarse con los mismos totales marginales que la tabla observada. Posteriormente, estas probabilidades se usan para calcular valor de la p asociado al test exacto de Fisher. Este valor de p indicará la probabilidad de obtener una diferencia entre los grupos mayor o igual a la observada, bajo la hipótesis nula de independencia. Si esta probabilidad es pequeña ($p < 0.05$) se deberá rechazar la hipótesis de partida y deberemos asumir que las dos variables no son independientes, sino que están asociadas. En caso contrario, se dirá que no existe evidencia estadística de asociación entre ambas variables.

ANEXO E. Registro fotográfico

BF en estado natural



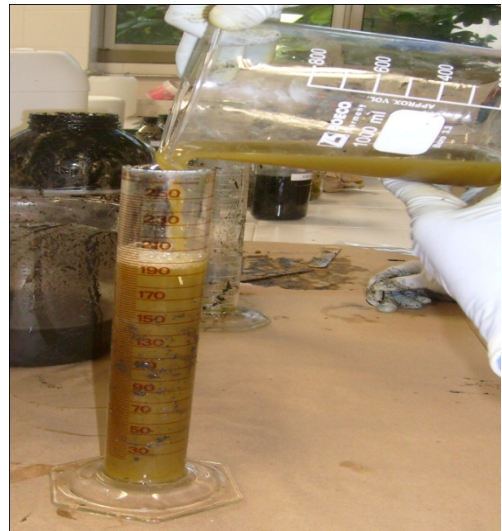
BF con tamaño de partícula de 2,36 mm



BF con tamaño de partícula de 0,85 mm



Codigestión del inóculo.



Inoculación del bioreactor con BF



Toma de muestra para la determinación de azúcares reductores

