

**PRE-TRATAMIENTOS FÍSICO Y QUÍMICO APLICADOS AL BAGAZO DE
FIQUE PARA MEJORAR LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS**

**ARIANNA YURIE CASADIEGO CÁCERES
LEIDY KATHERINE RODRÍGUEZ CÁCERES**

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

2012

**PRE-TRATAMIENTOS FÍSICO Y QUÍMICO APLICADOS AL BAGAZO DE
FIQUE PARA MEJORAR LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS**

**ARIANNA YURIE CASADIEGO CÁCERES
LEIDY KATHERINE RODRÍGUEZ CÁCERES**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Ingeniero Químico**

Director

**Humberto Escalante Hernández
Ing. Químico Ph. D.**

Co-director

**Liliana del Pilar Castro Molano
Ing. Química Ph. D**

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

2012

DEDICATORIA

A Dios, que me permitió la luz para prepararme y cumplir la misión que me encomendó.

A mi madre Fabiola, ya que gracias a ella soy quien soy, de ella siempre recibí amor y apoyo incondicional.

A mi prima Laura.

A Camilo, por su amor y apoyo, quien fue mi motor en cada etapa del camino.

A mi familia, por su adorable compañía en mi afán por alcanzar mi sueño.

Arianna Yurie Casadiego Cáceres

DEDICATORIA

En primer lugar, agradezco a Dios quien fue mi luz y fortaleza a lo largo de mi carrera profesional, y quien día a día me guarda, me sostiene y me llena de su amor. Gracias a Él, hoy termino con gran satisfacción este proyecto.

A mi madre, por su amor, apoyo y compañía en todo momento, por compartir conmigo tantas experiencias bonitas durante estos cinco años. Gracias por tu ánimo y empuje en los momentos difíciles, por corregirme e instarme siempre a dar lo mejor de mí y por tu ejemplo de perseverancia y determinación.

A mi padre, quien ha sido siempre mi ejemplo de compromiso y excelencia, por su comprensión e inagotable amor. Gracias por tus consejos, valores y por indicarme siempre el camino correcto.

A mis tíos y primos por su apoyo y confianza en esta etapa del camino.

A Julián, por su amor y cariño, por ser mi apoyo y compañía en cada paso de este camino, y mi alegría en aquellos momentos de tristeza.

A mis líderes y amigos, por su ejemplo y enseñanzas.

A mis compañeros y amigos de la universidad, por tantas experiencias vividas, por aquellos días de clase y aquellos de viajes y diversión.

A Jeje y Angel, por sus palabras de consejo, por su compañía a lo largo de esta carrera, por ser esa chispa de alegría en mi vida y por seguir presentes aún cuando este ciclo ya termina.

Leidy Katherine Rodríguez Cáceres

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colciencias y al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por el apoyo económico recibido a través de este proyecto.

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

Al Dr. Humberto Escalante, director de este proyecto, por su confianza y apoyo.

A la Dra. Liliana del Pilar Castro, quien con su apoyo y dedicación nos acompañó en cada paso de éste proyecto. Agradecemos su experiencia, tiempo y confianza.

Al bacteriólogo Alex Velásquez por su colaboración en el proceso de adaptación al laboratorio y por sus conocimientos y enseñanzas.

A la Dra. Carolina por su apoyo y buenas sugerencias.

A los técnicos del Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Escuela de Ingeniería Química; Eduardo Carreño y Wilson Carreño por su colaboración incondicional y cooperación con los equipos.

Al Laboratorio de Rayos X de la Escuela de Química y el Laboratorio de Biomateriales de la Escuela de Ingeniería Metalúrgica por los análisis realizados.

A los compañeros del laboratorio que con su compañía y apoyo, hicieron de este proyecto una experiencia amena y enriquecedora.

TABLA DE CONTENIDO

| | pág. |
|--|-------------|
| INTRODUCCIÓN | 18 |
| 1. MARCO TEÓRICO | 20 |
| 1.1 ESTRUCTURA INTERNA DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA | 20 |
| 1.2 DIGESTIÓN ANAEROBIA | 21 |
| 1.3 PRE-TRATAMIENTOS APLICADOS A LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA | 22 |
| 1.3.1 Pre-tratamiento mecánico | 22 |
| 1.3.2 Pre-tratamiento oxidativo | 23 |
| 1.3.2.1 Acción del peróxido de hidrógeno alcalinizado sobre la lignina | 24 |
| 2. METODOLOGÍA | 26 |
| 2.1 SUSTRATO | 26 |
| 2.2 PRE-TRATAMIENTOS | 28 |
| 2.2.1 Pre-tratamiento oxidativo | 28 |
| 2.2.2 Pre-tratamiento mecánico | 29 |
| 2.2.3 Determinación de lignina, celulosa y hemicelulosa | 29 |
| 2.2.4 Análisis de difracción rayos X del BF | 29 |
| 2.2.5 Análisis micrográfico del BF | 30 |
| 2.2.6 Evaluación de actividad hidrolítica (AH) | 30 |
| 2.3 DETERMINACIÓN DEL PBM | 31 |
| 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS | 33 |
| 3.1 PRE-TRATAMIENTOS | 33 |

| | |
|---|----|
| 3.1.1 Determinación de la AH empleando BF tratado | 33 |
| 3.2 EFECTO DE LOS PRE-TRATAMIENTOS SOBRE LA ESTRUCTURA LIGNOCELULÓSICA DEL BF | 35 |
| 3.3 EFECTO DE LOS PTs SOBRE LA CRISTALINIDAD DEL BF | 36 |
| 3.4 ANÁLISIS DE LAS MICROGRAFÍAS DEL BF | 37 |
| 3.5 EFECTO DE LOS PTs SOBRE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA DEL BF | 38 |
| 3.5.1 Efecto de los PTs sobre la etapa hidrolítica-acidogénica | 38 |
| 3.5.2 Efecto de los PTs sobre la etapa metanogénica | 39 |
| CONCLUSIONES | 42 |
| BIBLIOGRAFÍA | 43 |
| ANEXOS | 47 |

LISTA DE TABLAS

| | pág. |
|---|-------------|
| Tabla 1. Composición físico-química del bagazo de fique | 27 |
| Tabla 2. Variables del diseño de experimento | 28 |
| Tabla 3. Condiciones de operación para determinación de AH en BF pre tratado | 30 |
| Tabla 4. Actividad hidrolítica de cada experimentos de los dos pre tratamientos | 33 |
| Tabla 5. Composición porcentual de la estructura lignocelulósica del BF | 36 |
| Tabla 6. Índice de cristalinidad (CrI) del BFS tratado y sin tratar | 37 |
| Tabla 7. PBM y porcentaje de cambio de los tratamientos respecto al control | 40 |

LISTA DE FIGURAS

| | pág. |
|--|-------------|
| Figura 1. Acción de los pre tratamientos en los materiales lignocelulósicos | 23 |
| Figura 2. Diagrama del proceso para pre-tratamiento al BF | 26 |
| Figura 3. Diagrama de Pareto estandarizada para AH | 34 |
| Figura 4. Cambio en el pH de la reacción durante el PT oxidativo | 35 |
| Figura 5. Micrografías del BF. A: PT químico; B: PT mecánico; C: BF sin tratar | 37 |
| Figura 6. Efecto de los PTs sobre las cinéticas de consumo de ART | 38 |
| Figura 7. Producción de metano | 40 |
| Figura 8. Diagrama de significancia de diferencias de medias | 41 |

LISTA DE ANEXOS

| | pág. |
|---|-------------|
| ANEXO A. Determinación de lignina, hemicelulosa y celulosa | 47 |
| ANEXO B. Difractograma rayos X del BF | 48 |
| ANEXO C. Determinación de la concentración de azúcares reductores | 49 |
| ANEXO D. Determinación de ácidos grasos volátiles y alcalinidad | 51 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------|---------------------------------|
| AH | Actividad hidrolítica |
| AGVT | Ácidos grasos volátiles totales |
| ART | Azúcares reductores totales |
| BF | Bagazo de fique |
| DA | Digestión anaerobia |
| DNS | Dinitrosalisílico |
| DQO | Demanda química de oxígeno |
| LEC | Lodo estiércol de cerdo |
| LR | Líquido ruminal |
| PBM | Potencial de biometanización |
| PT | Pre-tratamiento |
| PTs | Pre-tratamientos |
| RIS | Relación inóculo sustrato |
| SSV | Sólidos suspendidos volátiles |
| SV | Sólidos volátiles |
| T | Temperatura |
| t | Tiempo |

RESUMEN

TÍTULO: PRE-TRATAMIENTOS FÍSICO Y QUÍMICO APLICADOS AL BAGAZO DE FIQUE PARA MEJORAR LA PRODUCCIÓN DE BIOGÁS*

AUTORES: Casadiego Cáceres, Arianna Yurie.

Rodríguez Cáceres, Leidy Katherine.**

PALABRAS CLAVES: Residuo lignocelulósico, bagazo de fique, reducción de tamaño, peróxido de hidrógeno, tratamiento químico, potencial de biometanización, digestión anaerobia, actividad hidrolítica.

DESCRIPCIÓN:

En el presente trabajo de investigación se aplicaron dos pre-tratamientos al bagazo de fique (BF), uno, mecánico y otro oxidativo, con el objeto de aumentar la producción de biogás mediante digestión anaerobia, empleando como inóculo líquido ruminal y lodo estiércol de cerdo. Aunque ambos pre-tratamientos afectaron de manera diferente la estructura interna de la biomasa lignocelulósica, el beneficio fue el mismo, el aumento de la actividad hidrolítica, que se tradujo en un incremento del potencial de biometanización de 20% respecto al bagazo de fique sin tratar, sin encontrarse ninguna diferencia estadísticamente significativa para los dos pre-tratamientos.

Con el tratamiento mecánico se redujo el tamaño de partícula del residuo con un molino de cuchillas permitiendo un mayor acceso de los consorcios microbianos a la celulosa. Los tamaños utilizados fueron 0,85 y 2,36 mm, alcanzando así un aumento en la actividad hidrolítica del 35% y una reducción de la cristalinidad del 4%.

Para el tratamiento oxidativo se empleó una solución de H_2O_2 alcalinizado con NaOH. Como resultado, para el mejor experimento (2% H_2O_2 , 2,5 ml H_2O_2 / g sv BF, t=2 horas) se obtuvo una deslignificación de la biomasa del 56%, se redujo la cristalinidad en un 6,4% y se aumentó la actividad hidrolítica en un 6% respecto al bagazo de fique sin tratar, aumentando la digestibilidad de la celulosa.

* Trabajo de Grado.

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Humberto Escalante Hernández. Codirector: Liliana del Pilar Castro Molano.

ABSTRACT

TITLE: PRE-TREATMENTS PHYSICAL AND CHEMICAL APPLIED TO FIQUE BAGASSE TO ENHANCE BIOGAS PRODUCTION*

AUTHORS: Casadiego Cáceres, Arianna Yurie.

Rodríguez Cáceres, Leidy Katherine.**

KEYWORDS: Lignocellulosic residue, fique bagasse, size reduction, hydrogen peroxide, chemical treatment, biomethane potential, anaerobic digestion, hydrolytic activity.

DESCRIPTION:

In this current job two pre-treatments, one chemical and other mechanical were applied to the fique bagasse in order to increase the biogas production, using as inoculum rumen fluid and pig slurry. Although both pre-treatments affected the biomass in a different way, the benefit was the same, an increased hydrolytic activity, which resulted in a raised methane potential by 20% compared to untreated fique bagasse, without finding any statistically significant difference for the two pre-treatments.

With the mechanical pre-treatment the particle size of the lignocellulosic bagasse was reduced, allowing the access of the microbial consortia to the cellulose. The utilized sizes were 0,85 and 2,36 mm, achieving an increased hydrolytic activity by 35% and a cristalinity reduction by 4%.

For the chemical pretreatment a H₂O₂ alcalinized (NaOH) solution was used. As a result, for the best experiment (% H₂O₂, 2.5 ml H₂O₂ / g sv BF, t= 2 hours), was obtained a delignified biomass by 56%, a cristalinity reduction by 6,4% and an increased hydrolytic activity by 6% compared to untreated fique bagasse, increasing the cellulose digestibility.

* Work Degree.

** Faculty of Physicochemical Engineering. Department of Chemical Engineering. Director: Humberto Escalante Hernández. Co director: Liliana del Pilar Castro Molano.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de fique en Colombia ha sido utilizado principalmente para la producción de fibra natural que corresponde al 4% del peso de la hoja. El 96% restante está conformado por residuos de jugo y bagazo que son descartados al medio generando graves problemas de contaminación por acumulación en los suelos y vertimiento en las corrientes de agua (Barrera, *et al.*, 2009; CADEFIQUE, 2006).

El bagazo de fique (BF) está compuesto por polímeros complejos como celulosa, hemicelulosa y lignina. La celulosa formada por subunidades de D-glucosa acopladas por enlaces β -1,4 glucosídicos conforma una estructura tanto cristalina como amorfa que proporciona resistencia mecánica y química a la planta (Hendriks & Zeeman, 2009). La lignina es un heteropolímero amorfo consistente de tres diferentes unidades fenilpropano cuyo principal propósito es dar a la planta el soporte estructural, impermeabilidad y resistencia contra el ataque microbial y estrés oxidativo. La hemicelulosa, sirve como conexión entre la celulosa y la lignina formando una matriz compacta y compleja. (Harmsen, *et al.*, 2010; Hendriks & Zeeman, 2009).

En Colombia se generan 5 toneladas/ha-año de BF y se ha demostrado que este residuo lignocelulósico puede ser utilizado como sustrato durante el proceso de digestión anaerobia; alcanzando un potencial de biometanización de $0.30 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{kg SV}$ adicionado empleando como inóculo una mezcla de líquido ruminal (LR) y lodo estiércol de cerdo (LEC) (Quintero *et al.*, 2011). Sin embargo, existen varios limitantes en la digestibilidad del BF tales como el contenido de lignina, del orden del 15%, la cristalinidad de la celulosa y el tamaño de partícula que actúan como una barrera física dificultando el fácil acceso de los microorganismos a la celulosa y hemicelulosa. (Bruni-B *et al.*, 2010; Mata-Alvarez *et al.*, 2000).

Una alternativa para mejorar la digestibilidad de la biomasa lignocelulósica es someterla a un pre-tratamiento (PT) que permita el rompimiento de las barreras físicas de modo que las enzimas hidrolíticas puedan penetrar e hidrolizar con mayor facilidad el sustrato. Un PT óptimo es aquel que logra incrementar el área superficial y porosidad del material, modificar o eliminar la estructura de la lignina y reducir la cristalinidad de la celulosa (Bruni, *et al.*, 2010; Harmsen, *et al.*, 2010; Mosier, *et al.*, 2004).

Las tecnologías de PT para materiales lignocelulósicos se clasifican en cuatro tipos: (i) tratamientos físicos mediante los cuales se somete la biomasa a una reducción del tamaño de partícula, (ii) tratamientos químicos sometiendo la biomasa a la acción de H_2SO_4 , NaOH y H_2O_2 , con el fin de alterar la estructura del material, (iii) biológicos, mediante los cuales un cultivo de microorganismos produce enzimas requeridas para hidrolizar el material y (iv) la combinación de dos o más tratamientos de los antes mencionados (Galbe, *et al.*, 2007; Harmsen, *et al.*, 2010; Hendriks & Zeeman, 2009).

Mientras que los PTs han sido ampliamente estudiados para facilitar la hidrólisis enzimática y consecuentemente la producción de etanol a partir de materiales lignocelulósicos (Sun & Cheng, 2002), el efecto de los pre-tratamientos sobre el potencial de biometanización (PBM) de residuos lignocelulósicos no ha sido suficientemente investigado.

En consecuencia, el objetivo de este trabajo de investigación es modificar la estructura del bagazo de fique, mediante la aplicación de dos tipos de pre-tratamiento: uno, mecánico y otro oxidativo, con el fin de liberar la celulosa e incrementar el potencial de biometanización mediante una digestión anaerobia.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 ESTRUCTURA INTERNA DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

La biomasa lignocelulósica está compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina, las cuales forman una matriz polimérica que proveen soporte estructural a la pared celular (Hendriks & Zeeman, 2009). Adicionalmente, los sustratos lignocelulósicos pueden contener carbohidratos no estructurales (glucosa, fructosa y sucrosa), proteínas, lípidos, extractivos y pectinas (Sun & Cheng, 2002).

La principal fracción polimérica del BF y que se encuentra en mayor proporción es la celulosa; éste polisacárido estructuralmente consta de una parte cristalina (organizada), y otra amorfa (Hendriks & Zeeman, 2009). La parte cristalina confiere protección a la célula y constituye un impedimento estérico al ataque de reactivos; mientras que la celulosa amorfa es más susceptible de ser atacada.

Las hemicelulosas son carbohidratos que forman una estructura polimérica ramificada, en su mayoría amorfa, que consiste en la unión de diferentes unidades de azúcares: pentosas, hexosas y ácidos de estos azúcares (Hendriks & Zeeman, 2009). La principal función de la hemicelulosa es servir como conexión entre las fibras de lignina y celulosa con el fin de brindar mayor rigidez a la estructura celulosa-hemicelulosa-lignina (Saha, 2003).

La lignina, es un polímero ramificado, amorfo y heterogéneo constituido por unidades de fenilpropano (p-cumarílico, coniferílico y alcohol sinapílico) unidos por diferentes clases de enlaces. Este heteropolímero es insoluble en agua y soluble en álcalis fuertes, ópticamente inactiva, extremadamente resistente a la acción de microorganismos y a la penetración de las enzimas destructivas en la pared

celular; lo anterior, hace difícil su degradación (Prasad *et al.*, 2009; Hendriks & Zeeman, 2009).

1.2 DIGESTIÓN ANAEROBIA

La biomasa lignocelulósica, una fuente de energía renovable, se ha convertido en una alternativa viable para la obtención de biogás mediante procesos de bioconversión anaerobia y ha sido evaluada como una de las maneras más eficiente energética y ambientalmente para la producción de biocombustible (Chynoweth, *et al.*, 2001; Frigon, *et al.*, 2010; Lehtomäki, 2006; Mshandete, *et al.*, 2006).

En el proceso de digestión anaerobia (DA) la materia orgánica es convertida en metano, dióxido de carbono e hidrógeno, en ausencia de oxígeno y a causa de la acción combinada de diferentes poblaciones bacterianas (Díaz, *et al.*, 2002). La DA se desarrolla en tres etapas fundamentales y en cada una interviene un grupo de bacterias características encargadas de realizar una función específica.

La DA se inicia con la etapa de hidrólisis de polisacáridos, lípidos y proteínas rompiendo sus largas cadenas carbonadas en otras más cortas y simples (azúcares, aminoácidos, ácidos grasos y alcoholes), que posteriormente son fermentadas, liberando hidrógeno y dióxido de carbono. La hidrólisis es la etapa limitante del proceso de DA dada la dificultad que presentan los microorganismos para descomponer la matriz polimérica en compuestos solubles.

La segunda fase de la DA es, la acidificación, en la cual intervienen las bacterias acetogénicas que convierten los productos de la etapa anterior a acetato, hidrógeno y dióxido de carbono.

Finalmente en la fase metanogénica, se lleva a cabo la conversión del acetato a metano y dióxido de carbono, o también la reducción del dióxido de carbono a metano. (Chynoweth, *et al.*, 2001; Díaz, *et al.*, 2002).

El metano, comparado con los combustibles fósiles, genera pocos contaminantes atmosféricos y menos dióxido de carbono por unidad de energía, convirtiéndose en una alternativa para uso en vehículos, aplicaciones industriales y generación de energía (Chynoweth, *et al.*, 2001).

1.3 PRE-TRATAMIENTOS APLICADOS A LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

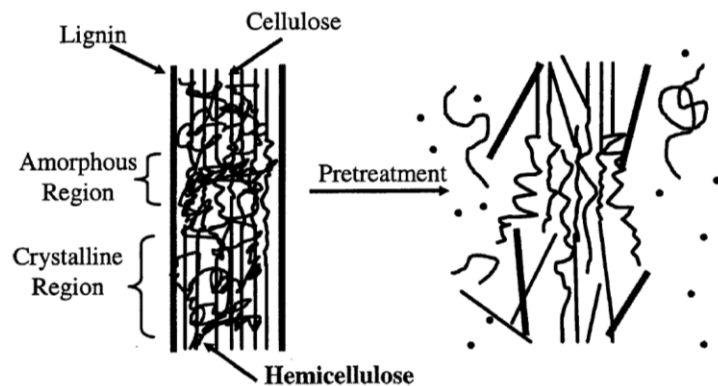
1.3.1 Pre-tratamiento mecánico. Cada PT ofrece un efecto específico y particular sobre la biomasa. Dentro de los PT físicos se encuentra el mecánico que es utilizado para reducir el tamaño de partícula y la cristalinidad del material lignocelulósico con el fin de aumentar el área superficial específica y reducir el grado de polimerización. La reducción del tamaño se puede llevar a cabo por astillado, trituración o molienda dependiendo del tamaño final de partícula del material. El pre-tratamiento mecánico permite aumentar el rendimiento de la etapa hidrolítica en un 5 a 25%, dependiendo del tipo de biomasa, tipo de molienda y duración (Hendriks & Zeeman, 2009). Sin embargo, los pre tratamientos son de alto costo y no eliminan la lignina ni la hemicelulosa (Abdullah, 2006; Alvira, *et al.*, 2010).

El rendimiento en la producción de metano, se incrementa a medida que se reduce el tamaño de partícula del residuo, sin embargo a tamaños de partícula muy pequeños no se encuentra gran diferencia en el rendimiento del proceso. Por consiguiente, para tamaños de partícula comprendidos en un rango pequeño (milímetros) probablemente no representa un cambio significativo en el área superficial disponible. La fibra de sisal presenta en su estado natural un tamaño de

partícula promedio de 3 cm. Al reducir el residuo hasta un tamaño de 2 mm, sólo se alcanza un incremento del PBM de 0,202 a 0,216 m³ CH₄ kg⁻¹ VS adicionado, respectivamente. Sin embargo, para el pasto se presenta un incremento más alto del PBM de 0,27 a 0,32 m³ CH₄ kg⁻¹ VS adicionado, para una reducción de tamaño de 2 cm a 5 mm respectivamente (Lehtomäki, 2006).

1.3.2 Pre-tratamiento oxidativo. El tratamiento químico puede remover la lignina y parte de la hemicelulosa sin degradar la celulosa. Mediante un agente oxidante como el peróxido de hidrógeno, ozono, oxígeno o aire, se puede lograr la deslignificación de la biomasa lignocelulósica atacando directamente a la lignina, la cual es la principal barrera física que encuentran las bacterias hidrolíticas durante la DA (Harmsen, *et al.*, 2010). La eficacia en la deslignificación se puede atribuir a la alta reactividad de los oxidantes químicos con el anillo aromático (Figura 1).

Figura 1. Acción de los pre-tratamientos en los materiales lignocelulósicos.



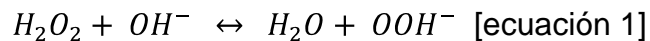
Fuente: Mosier, *et al.*, 2005.

Investigaciones demuestran un mejoramiento en la hidrólisis enzimática del bagazo de caña al ser sometido a un tratamiento químico con H₂O₂ al 2%, T=30°C y t=8 horas. Cerca del 50% de la lignina fue solubilizada y se alcanzó un 95% de eficiencia de producción de glucosa en la posterior etapa de sacarificación (Sun &

Cheng, 2002). Otros estudios comprueban una disolución del 83,7% de la hemicelulosa original y 92,7% de la lignina original contenida en paja de arroz al ser sometida a un tratamiento con H₂O₂ al 2%, T=45°C, t=12 horas y pH= 11,5 y con un tratamiento alcalino previo con 1% en concentración de NaOH (Sun, *et al.*, 2000).

1.3.2.1 Acción del peróxido de hidrógeno alcalinizado sobre la lignina. La degradación de la lignina por agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) es muy efectiva debido a la reacción directa del peróxido con la lignina bajo ciertas condiciones, por lo cual ha sido ampliamente utilizado durante varios años como un blanqueador de pulpa de madera para la producción de papel (Cândida, *et al.*, 2007; Teschke, *et al.*, 2001). El efecto blanqueador del H₂O₂ se atribuye a la habilidad que tiene para reaccionar con varias estructuras presentes en la lignina como quinonas y estructuras cinnamaldehídos (De la Marroca; *et al.*, 2004; Montero, *et al.*, 1999).

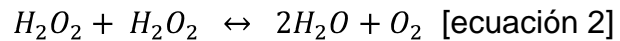
Para que el peróxido sea un agente eficaz en la deslignificación y la solubilización de hemicelulosa es necesario adicionar una base como el hidróxido de sodio, con el objeto de garantizar un medio alcalino en el cual el H₂O₂ se disocia a ión perhidroxilo (De la Marroca, 2004). El desempeño del H₂O₂ se expresa mediante la siguiente reacción:



Donde OOH⁻ es el ión perhidroxilo el que actúa como agente oxidante de blanqueo sobre los grupos cromóforos presentes en la lignina.

La descomposición del H₂O₂ depende del pH de la reacción. Se ha observado que para valores de pH menores de 10,5, menos de un 10% del H₂O₂ está presente como ión perhidroxilo, lo que indica que se desfavorece la reacción representada

en la ecuación 1. Así mismo, se observó que a medida que el pH aumentaba por encima de 11,5, se iba favoreciendo la reacción de auto descomposición del H_2O_2 en agua y oxígeno, representada en la ecuación 2. (De la Marroca, 2004).



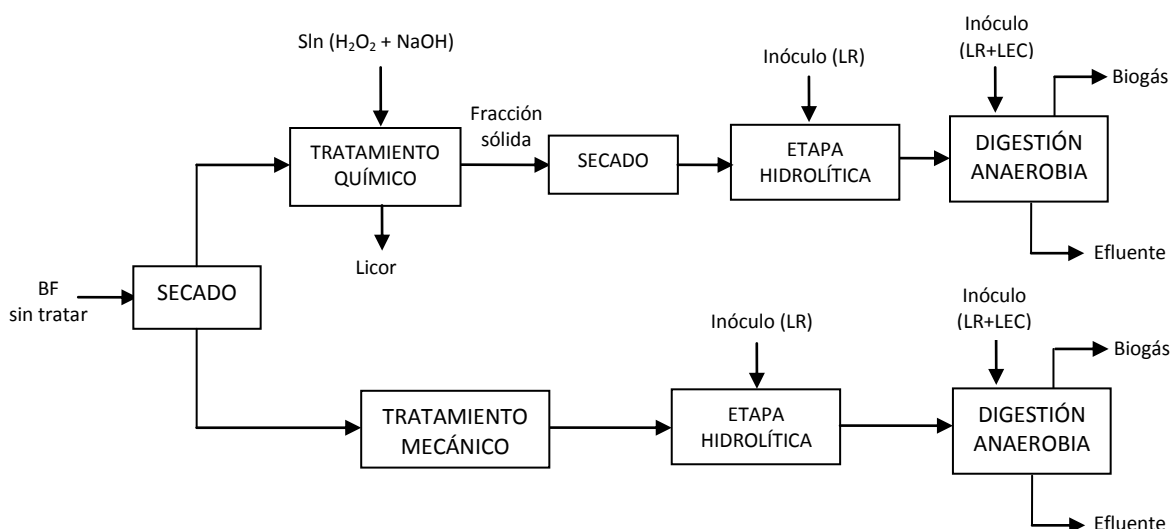
Se debe fijar por lo tanto, un intervalo de pH entre 10 y 11,5 que asegure la efectividad del H_2O_2 como agente deslignificante (De la Marroca; *et al.*, 2004)

Gran variedad de compuestos como aromáticos, poliaromáticos, fenólicos y aldehídos pueden ser liberados del fraccionamiento de la lignina. Durante el pre tratamiento con peróxido, la formación de compuestos fenólicos, furfural y HMF deben ser evitadas, por consiguiente se debe mantener la temperatura y el tiempo de residencia lo más bajo y corto posible (Harmsen, *et al.*, 2010).

2. METODOLOGÍA

El desarrollo experimental se llevó a cabo en dos etapas. La primera consistió en aplicar dos PT al BF, uno oxidativo y otro mecánico. En la segunda etapa se realizó el proceso de digestión anaerobia empleando como sustrato el bagazo pre tratado de la etapa anterior. En la Figura 2 se presenta el diagrama para la aplicación de los pre-tratamiento al BF.

Figura 2. Diagrama del proceso para pre-tratamiento al BF.



2.1 SUSTRATO

El BF se recolectó en una planta de beneficio ubicada en el municipio de Mogotes, Santander. Las muestras de BF se conservaron refrigeradas y fueron trasladadas al Laboratorio de Biotecnología de la UIS para su posterior caracterización (Tabla 1).

Teniendo en cuenta la composición elemental de C, H, O, N (en porcentaje) del BF, se obtuvo como fórmula empírica para el BF $C_{32.9}H_{66.9}O_{32.9}N_{1.0}$.

Tabla 1. Composición físico-química del bagazo de fique.

| Parámetro | Unidades | Valor |
|--------------------------|--------------------------------------|----------|
| pH | | 4 |
| ST | gST kg ⁻¹ | 195 |
| SV | gSV kg ⁻¹ | 163 |
| DQO | g O ₂ kg ⁻¹ ST | 1230 |
| Alcalinidad Total | mgCaCO ₃ /l | 3300 |
| AGVT | g AGV kg ⁻¹ ST | 48,1 |
| Proteínas | g kg ⁻¹ ST | 43,8 |
| Lípidos | g kg ⁻¹ ST | 41,3 |
| Holocelulosa | g kg ⁻¹ ST | 639,8 |
| Carbohidratos | g kg ⁻¹ ST | 69,4 |
| Lignina | g kg ⁻¹ ST | 157,6 |
| C | % p/p | 35,58 |
| H | % p/p | 6,02 |
| O | % p/p | 47,44 |
| N | % p/p | 1,32 |
| C/N | % p/p | 26,9 |
| Sulfuros | % p/p | 0,006 |
| Poder calorífico | kJ kg ⁻¹ | 13799,16 |
| Fórmula empírica | $C_{33}H_{67}O_{33}N_1$ | |

El BF húmedo se sometió a un proceso de secado a 60°C durante 24 horas. A estas condiciones se garantiza que se retira la humedad de tal forma que la biomasa llega a peso constante y no se oxida.

2.2 PRE-TRATAMIENTOS

2.2.1 Pre-tratamiento oxidativo. El PT se llevó a cabo utilizando una solución de peróxido de hidrógeno alcalinizado. Esta solución fue alcalinizada con NaOH hasta un pH de 11,5, con el fin de incrementar el rendimiento de carbohidratos disponibles obtenidos durante el tratamiento (De la Marroca, 2004; De la Marroca, *et al.*, 2004; Gould, 1985).

Con el objeto de determinar las mejores condiciones de operación del pre-tratamiento se realizó un diseño de experimentos 2^3 (Tabla 2).

Tabla 2. Variables del diseño de experimento.

| Variables de entrada | Niveles | | Unidades |
|--|---------|---|---|
| | 0 | 1 | |
| Tiempo de pre-tratamiento | 3 | 8 | horas |
| Concentración de peróxido alcalinizado | 0,5 | 2 | % |
| Relación líquido/sólido | 2,5 | 4 | ml H ₂ O ₂ /g SV BF |

Para cada experimento se preparó una solución de 0.1 l de H₂O₂ alcalinizado, la cual se adicionó a la masa de BF previamente cargada a un reactor *batch* MLW de 500 ml. Para el control de la temperatura (50°C) se utilizó un baño termostatado MLW. El BF se trató durante un tiempo determinado a agitación constante de 150 rpm. Después de cada pre-tratamiento, el BF se lavó en un tamiz plástico de tamaño de malla de 0,5 mm cubierto con un lienzo, para eliminar el contenido de

la solución de peróxido y regular el pH dentro de un rango de 7,0 a 7,5 (Cândida, *et al.*, 2007).

2.2.2 Pre-tratamiento mecánico. Se aplicó una reducción de tamaño de partícula al BF, mediante un molino de cuchillas *Wiley Mill (USA) Standard Model No. 3* acondicionado con dos tamices metálicos de 0,85 mm y 2,36 mm. Estos tamaños de partícula se escogieron con base en experimentos preliminares (Vargas y Zambrano, 2010).

2.2.3 Determinación de lignina, celulosa y hemicelulosa. La lignina, celulosa y hemicelulosa se cuantificaron en las muestras de BF tratadas, a partir de la fibra detergente ácida, la fibra detergente neutra y la fibra de Kurschner (Ver Anexo A) (Goering, *et al.*, 1970).

2.2.4 Análisis de difracción rayos X del BF. El índice de cristalinidad se determinó como medida de accesibilidad de los microorganismos sobre el BF tratado y sin tratar, usando un difractómetro *SIEMENS* modelo D500. Las muestras de BF se maceraron en un mortero de ágata y el espécimen seleccionado de la muestra fue montado en un portamuestra de aluminio mediante la técnica de llenado frontal. El análisis se realizó a 40 kW, con una corriente de 30 mA, rendija de divergencia de longitud 0,15 mm, provisto de una fuente de Cu ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$). Las muestras se corrieron en un rango de 2– 70° (2 θ) a 2°/min. Los resultados se compararon a través del cálculo del índice de cristalinidad de la muestra que se expresa en la ecuación 3 (Yang *et al.*, 2009).

$$CrI = 100 * \left(\frac{I_{002} - I_{amorfa}}{I_{002}} \right) \text{ [ecuación 3]}$$

En donde:

I_{002} =Intensidad del pico en el máximo de 2θ entre 22° y 23° .

I_{amorfa} = Intensidad del pico en el mínimo de 2θ entre 18° y 19° .

2.2.5 Análisis micrográfico del BF. Las micrografías del BF tratado y sin tratar fueron realizadas utilizando un video microscopio *HIROX KH 7700* con un aumento de 50 x.

2.2.6 Evaluación de actividad hidrolítica (AH). Se seleccionó la actividad hidrolítica (capacidad que tiene un consorcio microbiano para degradar fuentes de carbono) como variable de respuesta de los pre-tratamientos evaluados, dado que el objetivo de los pre-tratamientos es modificar la estructura del sustrato haciéndolo más accesible y disponible a los microorganismos encargados de realizar la etapa hidrolítica de la digestión anaerobia.

Los ensayos de AH se llevaron a cabo utilizando líquido ruminal (LR) como inóculo debido a su alta actividad hidrolítica (Quintero *et al.*, 2011). Se incluyó un experimento control (BF sin tratar). La Tabla 3 indica las condiciones de operación del proceso.

Tabla 3. Condiciones de operación para determinación de AH en BF pre-tratado.

| Parámetros | Valor | Unidades |
|------------------------|--------------------------|----------------------|
| Vol. reactor | 0,05 | l |
| Vol. Operación | 0,031 | l |
| Temperatura | 39 | $^\circ\text{C}$ |
| Sustrato | BF sin tratar/BF tratado | g/g |
| Inóculo | Líquido ruminal | l |
| RIS | 2 | g sv inóculo/g sv BF |
| Agitación | 0 | rpm |
| Tiempo de fermentación | 24 | horas |

El consumo de ART durante la hidrólisis del BF fue determinado utilizando un espectrofotómetro GENESYS 20 *Thermo Spectronics* a 540 nm de acuerdo con el método del ácido dinitrosalicílico DNS (Miller, 1959). La AH fue determinada usando el máximo consumo de ART y definida como g DQO glucosa/ g SSV*día. El desarrollo del método DNS se describe en el Anexo C.

2.3 DETERMINACIÓN DEL PBM

Para la determinación del PBM se llevaron a cabo fermentaciones empleando como sustrato BF pre-tratado y como inóculo la mezcla de LR y lodo estiércol de cerdo (LEC) en proporción de 1:1 (v/v). El LR se recolectó en el frigorífico el Vijagual (Rionegro - Santander). El LEC fue recolectado de la Porcícola Portoferrayo (Mesa de los Santos - Santander). El proceso se realizó en bioreactores de 50 ml, con un volumen de operación de 30 ml. Se utilizó una relación inóculo/sustrato (RIS) de 2 gsv/gsv. El periodo de operación fue de 42 días a una temperatura de 39°C.

Como variables de respuesta del proceso se cuantificó la concentración de ART, AGVT y volumen acumulado de metano. Los parámetros de estabilización tenidos en cuenta fueron pH y la relación AGVT/AT. Las cuantificaciones de ART y AGVT se hicieron por duplicado, la medición de metano fue hecha por triplicado.

La configuración de digestores consistió en 20 botellas para cada tratamiento: 9 utilizados para cuantificar ART, AGV, alcalinidad total y pH, 3 para medir el volumen acumulado de metano, 1 empleado como blanco (solo inóculo) y 20 digestores utilizados como experimento control (BF sin tratar).

Los ART se cuantificaron mediante el método colorimétrico DNS utilizando un espectrofotómetro marca GENESYS 20 *Thermo Spectronics*, a una longitud de onda de 540 nm.

Los AGVs fueron cuantificados mediante el método de titulación del *STANDARD METHODS*. En el Anexo D se describe el procedimiento de dicho método.

El volumen de biogás se midió mediante el método de desplazamiento alcalino. El volumen de metano se normalizó de acuerdo a la ecuación 4. El porcentaje de metano se determinó con un detector de gases infrarrojo modelo PGD3-IR marca *Status Scientific Controls*. El pH del proceso fue medido a lo largo del periodo de digestión con un pH-metro marca *SCHOTT* portátil.

$$V_0 = V \frac{(P_L - P_v) * T_0}{P_0 * T} \quad [\text{ecuación 4}]$$

Donde:

V_0 : Volumen de gas en condiciones normales.

V : Volumen de gas generado.

P_L : Presión atmosférica en la medición.

P_v : Presión de vapor a la presión y temperatura de medida.

P_0 : Presión de metano en condiciones normales.

T_0 : Temperatura del metano en condiciones normales.

T : Temperatura ambiental en el momento de la medida.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 PRE-TRATAMIENTOS

3.1.1 Determinación de la AH empleando BF tratado. En la Tabla 4 se muestra la AH alcanzada para cada uno de los experimentos evaluados mediante el PT oxidativo y el PT mecánico.

Tabla 4. Actividad hidrolítica de cada experimentos de los dos pre-tratamientos.

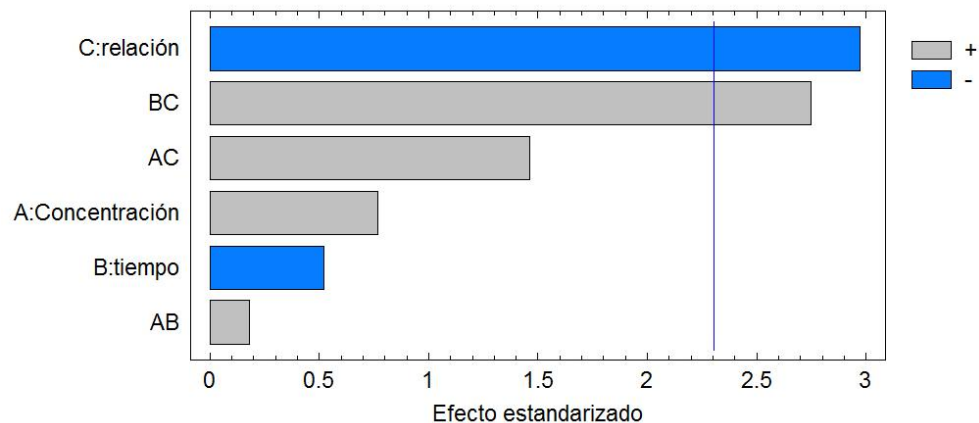
| | Experimento | Relación líquido/sólido (ml H ₂ O ₂ /g sv BF) | Tiempo (horas) | Concentración H ₂ O ₂ (%) | Actividad Hidrolítica (g D.Q.O glucosa/g ssv*día) |
|-----------|--------------------------|---|----------------|---|---|
| OXIDATIVO | 1 | 4 | 3 | 2 | -0,1602 |
| | 2 | 4 | 3 | 0,5 | -0,1741 |
| | 3 | 4 | 8 | 2 | -0,0418 |
| | 4 | 4 | 8 | 0,5 | -0,1640 |
| | 5 | 2,5 | 3 | 0,5 | -0,0070 |
| | 6 | 2,5 | 3 | 2 | 0,0139 |
| | 7 | 2,5 | 8 | 0,5 | -0,0766 |
| | 8 | 2,5 | 8 | 2 | -0,1254 |
| MECÁNICO | Tamaño de partícula (mm) | | | | |
| | 9 | 2,36 | | | 0,1045 |
| | 10 | 0,85 | | | -0,1045 |

Los experimentos que contienen valores negativos indican que su AH no superó la actividad endógena de los microorganismos contenidos en el líquido ruminal. Lo anterior indica que las reacciones de deslignificación se favorecen a las condiciones que fueron llevadas en el experimento 6.

En cuanto al tratamiento mecánico se puede sugerir que una reducción del tamaño de partícula favorece las reacciones extracelulares de los microorganismos mediante el aumento del área superficial. Los experimentos 6 y 9 alcanzaron un incremento del 6% y del 35% respectivamente comparado con el experimento control.

A partir del análisis estadístico se encontró que los efectos C: relación (ml H₂O₂/g SV BF), e interacción BC: tiempo-relación, tienen un valor $-p$ de $0,017 < 0,05$ y $0,025 < 0,05$ respectivamente, indicando que los efectos presentan significancia estadística con un nivel de confianza del 95%. Las interacciones de cada variable y sus efectos se muestran en el diagrama de Pareto (Figura 3). Los resultados estadísticos se correlacionan con los obtenidos para la actividad hidrolítica, donde la relación (ml H₂O₂/g SV BF) y el tiempo de pre-tratamiento corresponden a los niveles bajos en el experimento 6.

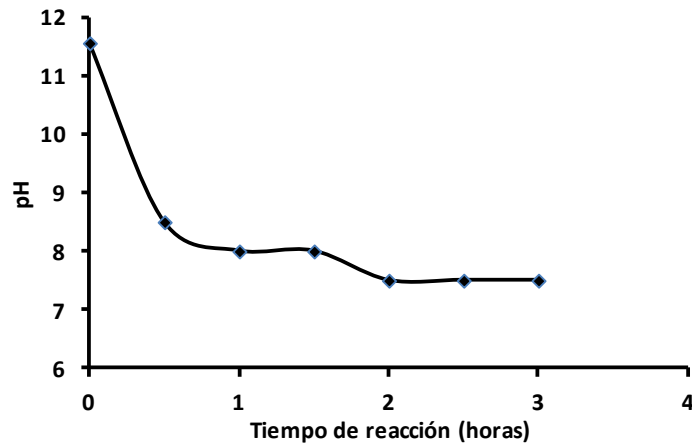
Figura 3. Diagrama de Pareto estandarizada para AH.



Dado que la reacción de oxidación entre el H₂O₂ y la lignina en el pre-tratamiento oxidativo es fuertemente dependiente del pH, un valor menor a 11,5 indica que la lignina se ha solubilizado. Este efecto se observa en la Figura 4 para el

experimento 6 (relación ml H₂O₂/g SV: 2.5; tiempo de pre-tratamiento: 3 horas; concentración de peróxido: 2%).

Figura 4. Cambio en el pH de la reacción durante el PT oxidativo.



Durante la primera hora de pre-tratamiento se observó una reducción de pH del 26%, indicando la solubilización de la lignina contenida en el BF. Posteriormente, el pH se mantiene constante, por lo cual se infiere que las reacciones de oxidación alcanzan el equilibrio. Estos resultados son similares a los obtenidos durante el pre-tratamiento oxidativo de la paja de trigo, donde la deslignificación ocurrió a las 6 horas de tratamiento (Gould, 1989).

3.2 EFECTO DE LOS PRE-TRATAMIENTOS SOBRE LA ESTRUCTURA LIGNOCELULÓSICA DEL BF

Los cambios en la composición porcentual de la estructura lignocelulósica del bagazo de fique se observan en la Tabla 5.

Los resultados muestran que el PT oxidativo produjo una solubilización de la lignina del 56,2% respecto al BF sin tratar. Esto indica que a las condiciones

aplicadas, el peróxido alcalinizado es un fuerte agente de deslignificación, siendo altamente reactivo con los anillos aromáticos del polímero. En consecuencia, una reducción del porcentaje de lignina puede aumentar los rendimientos en la etapa hidrolítica durante la producción de biogás, ya que se remueve gran parte de la barrera polimérica que impide el paso de las enzimas hidrolíticas. Adicionalmente se alcanzó una reducción de celulosa del 43,8% respecto al control. Este resultado indica que el pre tratamiento alteró la estructura cristalina del BF, permitiendo una mayor disponibilidad de los azúcares para la posterior hidrólisis.

El tratamiento mecánico no generó cambios significativos en la estructura lignocelulósica del BF.

Tabla 5. Composición porcentual de la estructura lignocelulósica del BF.

| Pre-tratamientos | Lignina (%) | Celulosa (%) | Hemicelulosa (%) |
|--------------------------------|-------------|--------------|------------------|
| Oxidativo | 6,81 | 23,51 | 21,09 |
| Mecánico (2,36 mm) | 15,56 | 41 | 22 |
| Control (BF sin tratar) | 15,56 | 41,81 | 22,17 |

3.3 EFECTO DE LOS PTs SOBRE LA CRISTALINIDAD DEL BF

En la Tabla 6 se puede observar el índice de cristalinidad del BF tratado y sin tratar. Después de aplicar el PT químico y mecánico la cristalinidad del BF disminuyó 6,4%, y 4,0 %, respectivamente. Esto indica que la aplicación de los pre-tratamientos dio lugar a transformaciones estructurales de la celulosa. Al observar los resultados de los índices de cristalinidad, se puede inferir que los PTs lograron romper parte de la matriz lignocelulósica del BF generando un mayor número de regiones amorfas, lo cual favorece el desarrollo de la etapa hidrolítica de la digestión anaerobia.

Según la literatura, el PT mecánico es uno de los más efectivos para la reducción de la cristalinidad de la celulosa, sin embargo, los resultados de este estudio mostraron el menor efecto sobre la estructura cristalina de la celulosa. En el Anexo B se muestra el difractograma para los dos PT y el control.

Tabla 6. Índice de cristalinidad (CrI) del BF tratado y sin tratar.

| Pre-tratamientos | Oxidativo | Mecánico (2,36 mm) | Control (BF sin tratar) |
|------------------|-----------|-----------------------|-------------------------|
| CrI | 0,46 | 0,47 | 0,49 |

3.4 ANÁLISIS DE LAS MICROGRAFÍAS DEL BF

La Figura 5.A representa la micrografía del BF sin tratar. Haciendo una comparación con la Figura 5.B (BF tratado con H₂O₂ alcalinizado) se puede observar que el bagazo sufre un blanqueamiento debido a la reacción del ión perhidroxilo con los grupos cromóforos presentes en la lignina. Esto nuevamente indica, que el H₂O₂ alcalinizado tuvo un efecto deslignificante positivo.

Respecto al BF tratado mecánicamente (Figura 5.C) se observa únicamente la reducción del tamaño de partícula comparado con el BF sin tratar.

Figura 5. Micrografías del BF. A: BF sin tratar; B: PT químico; C: PT mecánico.

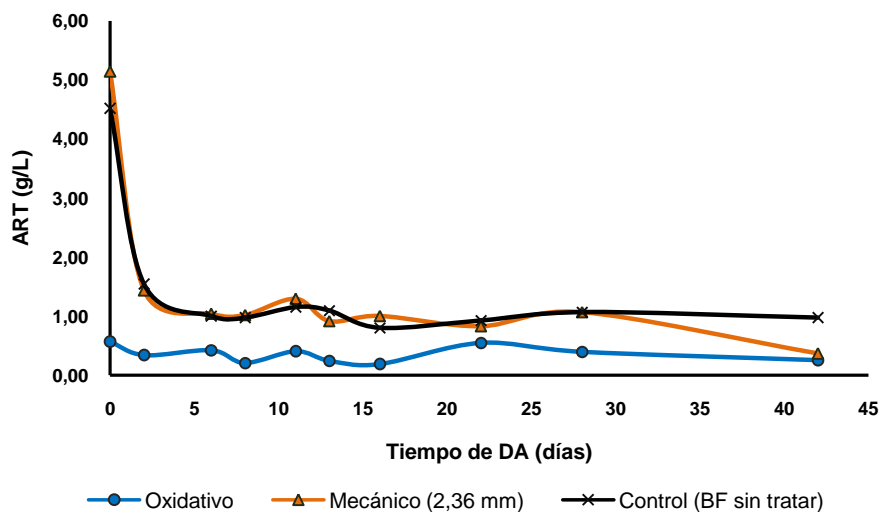


3.5 EFECTO DE LOS PTs SOBRE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA DEL BF

3.5.1 Efecto de los PTs sobre la etapa hidrolítica-acidogénica. El rendimiento de la etapa hidrolítica de la DA se puede expresar en función de los azúcares Reductores Totales (ART). Las cinéticas de ART correspondientes a cada PT se muestran en la Figura 6. Para el BF tratado con peróxido se observa que la hidrólisis arranca con una mínima concentración de azúcares debido a que el previo ataque químico disuelve los azúcares disponibles los cuales quedan incorporados en el licor resultante del PT. Sin embargo, la cantidad de azúcares presentes en el bagazo tratado garantizó el arranque y estabilización de la etapa hidrolítica del proceso sin afectar el consumo de AGVT.

En el tratamiento mecánico al igual que el BF sin tratar, el proceso inicia con una alta concentración de azúcares y se estabiliza al sexto día de digestión. Debido a que inicialmente hay una cantidad considerable de azúcares libres disponibles para el consumo, estos son hidrolizados por el consorcio presente en el LR+LEC, y como se observa en la Figura 6, la concentración disminuye drásticamente.

Figura 6. Efecto de los PTs sobre las cinéticas de consumo de ART.



Las oscilaciones presentes en estas curvas indican que al consumirse los azúcares disponibles, las bacterias se ven obligadas a hidrolizar la celulosa presente en la estructura, por lo cual hay un aumento en la concentración de azúcares, que serán consumidos posteriormente.

Con respecto a la etapa acidogénica se alcanzaron conversiones del 93%, 92% y 90% para los experimentos 6 (oxidativo), 9 (mecánico) y el control respectivamente. Estos valores indican que la etapa acidogénica se desarrolló eficientemente, a pesar de la baja concentración de azúcares para el arranque del proceso en el caso del PT oxidativo. Lo anterior sugiere que los pre-tratamientos mejoran la disponibilidad y accesibilidad al sustrato.

Durante el tiempo de digestión el pH se mantuvo en un intervalo entre 6,8 y 7,8 para el bagazo tratado y sin tratar, de igual forma el ratio de AGVT/AT varió entre 0,7 y 0,1 para los dos tipos de bagazo pre-tratado. Estos valores indican que los consorcios microbianos se encuentran en condiciones adecuadas para su crecimiento y metabolismo, evidenciando la estabilidad del proceso sin riesgo de inhibición.

3.5.2 Efecto de los PTs sobre la etapa metanogénica. En la Figura 7 se describen las producciones de metano a condiciones estándar para el BF tratado y sin tratar y para el ensayo blanco (solo inóculo).

De acuerdo con la Figura 7 se alcanza la estabilidad del proceso a los veinte días de operación, obteniendo un volumen de metano de 761 ml para el tratamiento oxidativo y el tratamiento mecánico, superando al control en un 8%. Con los resultados de la producción de metano se cuantificó el PBM para el BF tratado y sin tratar para un periodo de digestión de 30 días (Tabla 7).

Figura 7. Producción de metano.

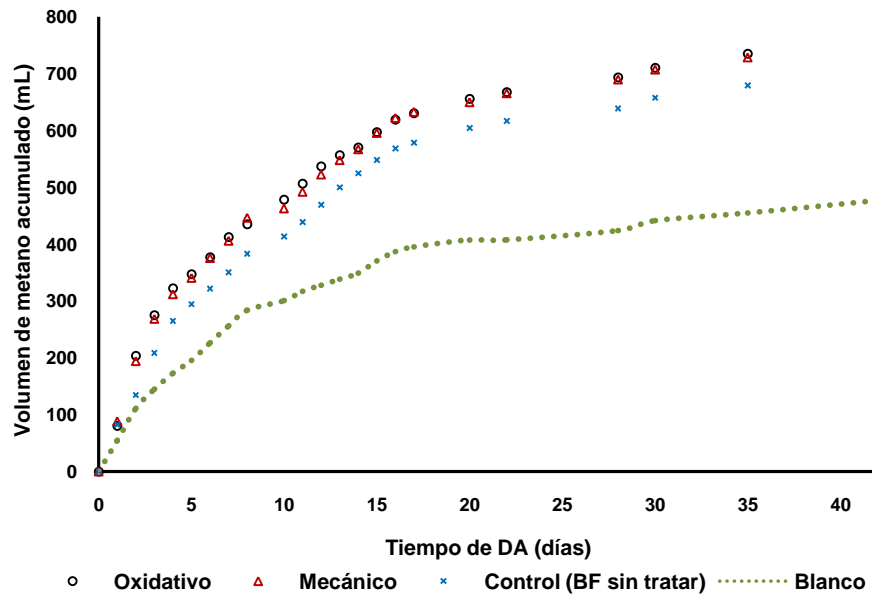
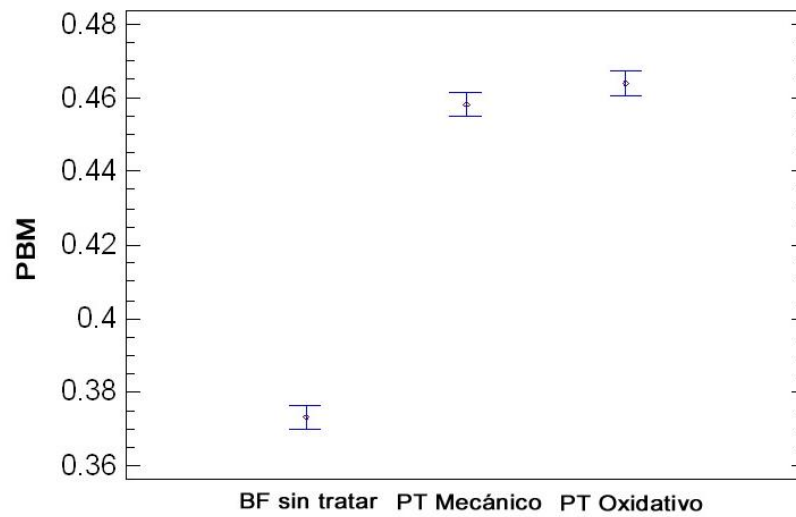


Tabla 7. PBM y porcentaje de cambio de los tratamientos respecto al control.

| Tratamiento | PBM [LCH ₄ /g SV] | % Cambio |
|-------------|------------------------------|----------|
| Oxidativo | 0,46 | 20 |
| Mecánico | 0,46 | 20 |
| Control | | 0,37 |

Según el diagrama representado en la Figura 8, se puede inferir que existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los valores del PBM correspondientes a cada pre-tratamiento y el BF sin tratar a un nivel de confianza del 95%. El procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher muestra que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los valores de PBM correspondiente a los pre-tratamientos oxidativo y mecánico debido a que la diferencia de las medias es menor al límite encontrado por el procedimiento ($0.00545 < 0.00658$).

Figura 8. Diagrama de significancia de diferencias de medias.



Dado que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos pre-tratamientos aplicados al BF; la selección de uno u otro dependerá de criterios económicos y ambientales.

CONCLUSIONES

Con el pre-tratamiento oxidativo se alcanzó una deslignificación del 56% respecto al BF sin tratar bajo las condiciones de operación de 2% de H_2O_2 , $t= 3$ horas y relación ml H_2O_2/g SV de 2,5, lo cual indica que el peróxido es un fuerte agente de deslignificación.

Al aplicar una reducción de tamaño de partícula de 2,56 mm sobre el bagazo de fique sin tratar se aumentó la disponibilidad de los azúcares permitiendo un mejoramiento en la etapa hidrolítica de la DA.

Se demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas al aplicar un tratamiento químico (oxidativo) o físico (reducción de tamaño) al bagazo de fique alcanzando un potencial de biometanización de 0,46 con un porcentaje de cambio respecto al BF sin tratar de 20%.

BIBLIOGRAFÍA

ABDULLAH, A. The Treatment of Sugar Cane Bagasse for Subsequent use as Substrate for Cellulase Production by *Aspergillus Terreus Suk-1*. Thesis for the award of the degree of bachelor of chemical engineering. Malaysia.: Kolej Universiti Kejuruteraan dan Teknologi, Faculty of Chemical and Natural Resources Engineering, 2006. 26 p.

ALVIRA, P., TOMÁS-PEJÓ, BALLESTEROS, E., NEGRO, M. M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. En: Bioresour. Technol. Julio, 2010. vol. 101. no. 13., p. 4851–4861.

BARRERA, Y.P., SALAS, M.X., CASTRO L., ORTIZ, C., ESCALANTE, H. Estudio preliminar de la bioproducción de metano a partir de los residuos del proceso del beneficio del fique. En. Revista ION. Junio, 2009, vol. 22, no. 1., p. 21-25.

BRUNI, E; JENSEN, A,P; ANGELIDAKI, I. Comparative study of mechanical, hydrothermal, chemical and enzymatic treatments of digested biofibers to improve biogas production. En: Bioresour. Technol. Noviembre, 2010. vol. 101. no. 22., p. 8713–8717.

CÂNDIDA, S., C DA COSTA, A., M FILHO, R. Avaliação de Desempenho do Pré-Tratamento com Peróxido de Hidrogênio Alcalino para a Hidrólise Enzimática de Bagaço de Cana-De-Açúcar. Trabajo de grado Master en Ingeniería Química. Campinas, Sao Paulo. Universidade Estadual de Campinas, 2007., p. 150.

CHYNOWETH, D; OWENS, J,M; LEGRAND, R. Renewable methane from anaerobic digestion of biomass. En: Renewable Energy. Enero-marzo 2001. vol. 22. no. 1-3. p. 1-8

COLOMBIA. Comités Técnico y Directivo Nacionales y Regionales de Cadefique. Guía Ambiental para el Subsector Fique. 2 ed. Bogotá D. C.: Panamericana Formas e Impresos S.A., 2006. p. 112. ISBN 958-97785-3-4.

CONGRESO IBEROAMERICANO DE INVESTIGACIÓN EN CELULOSA Y PAPEL. (1: 18-20, octubre, 2000: Pto. Iguazú, Argentina). Proceso “APMP” en

madera de "*E. globulus*". Centro de Industrias Forestales CIFOR-INIA. Lab. de Pasta y Papel. Madrid, España. 2000.

DE LA MARROCA, C. Tratamiento de impregnación con álcali y peróxido de hidrógeno para reducir el consumo energético en la producción de pastas mecánicas: Modificaciones estructurales de la molécula de lignina. Trabajo de grado Doctor en Ing. Química. Madrid, España.: Universidad Complutense de Madrid. Facultad de ciencias químicas. Departamento de Ingeniería Química. 2004. 307 p.

DE LA MACORRA, C; BRIZARD, A; RINCÓN, P.; NIEVES, R. Estudio cinético de la descomposición del peróxido de hidrógeno en condiciones de extrema alcalinidad. En: Tecnología y Desarrollo., 2004. vol 2.

DÍAZ, M. C., ESPITIA, S. E.,MOLINA, F. Digestión Anaerobia. Una aproximación a la tecnología. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Junio, 2002. 167 p.

FRIGON, J. C. y GUIOT, S. R.,Biomethane production from starch and lignocellulosic crops: a comparative review. En:Biofuels, Bioprod. Bioref. Febrero, 2010, vol.4,.p. 447–458.

GALBE y M; ZACCHI, G. Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production. En: Adv. Biochem. Eng./Biotechnol. Julio, 2007. vol. 108. p. 41-65.

GOERING, H.K; VAN, S; P.J. Forage Fibre Analyses (Apparatus, Reagents, Procedures and some Applications). Agricultural Handbook No. 379, ARS-USDA, Estados Unidos, 1970.

GOULD J. Alkaline peroxide treatment of agricultural by products. Patente No. 4.806.475. Estados Unidos, 1989.

GOULD, J. Enhanced polysaccharide recovery from agricultural residues and perennial grasses treated with alkaline hydrogen peroxide. En: Biotechnol Bioeng., 1985, XXVII, p. 893-896.

HARMSSEN, P.F.H., HUIJGEN, W.J.J., BERMÚDEZI, L.M., BAKKER, R.R.C. Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass. WUR-FBR, NL., ECN, NL., ABNT, ES, 2010. 49 p.

HENDRIKS, A.T.W.M. y ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. En: Bioresour. Technol. Julio 2009, vol. 100., p. 10-18.

LEHTOMÄKI, A. Biogas Production from Energy Crops and Crop Residues. Jyväskylä, Finlandia. Departamento de ciencias biológicas y ambientales. Universidad de Jyväskylä, 2006. 94 p. ISBN 951-39-2559-5.

MATA-ALVAREZ J; MACÉ S; LLABRÉS P. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. En: Bioresource Technol., 2000, vol. 74, p. 3-16.

MILLER, G. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. En: Anal. Chem., vol. 31, 1959, p. 426-428.

MONTERO, L. y ZAROR, C. Estudio cinético de la reacción entre peróxido de hidrógeno y lignina Klason. Dpto. Ing. Química, Universidad de Concepción. Chile. 1999 10 p.

MOSIER, N., WYMAN, C., DALE, B., ELANDER, R., LEE, Y., HOLTZAPPLE, M., LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. En: Bioresour. Technol. Junio, 2004. vol. no.96, p.673–686.

MSHANDETE, A; BJORNSSON, L; KIVAISI, A; RUBINDAMAYUGI, M.S.T. Effect of particle size on biogas yield from sisal fibre waste. En: Renewable Energy. Noviembre, 2006. vol. 31. no. 14. p. 2385-2392.

PRASAD, K; SERRANO, M; THOMSEN, A; KONGJAN, P; ANGELIDAKI I. Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept. Bioresource Technol., 2009, 100, 2562–2568.

QUINTERO, M; CASTRO, L; ORTIZ, C; GÚZMAN, C; ESCALANTE, H. Enhancement of starting up anaerobic digestion of lignocellulosic substrate: fique's bagasse as an example. En: Bioresource Technol., 2011, vol. 108, p. 8-13.

SAHA, B. Hemicellulose bioconversion. En: J Ind Microbiol Biot., 2003. vol no. 30 p. 279-291.

SUN, R.C; TOMKINSON, J; MA, P.L; LIANG, S.F. Comparative study of hemicelluloses from rice straw by alkali and hydrogen peroxide treatments. En: Carbohydrate Polymers. Junio 2000. vol no. 42, p. 111-122.

SUN, Y; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. En: Bioresour. Technol. Mayo, 2002. vol. 83. no. 1. p. 1-11.

TESCHKE, K; DEMERS, P. Industria del papel y de la pasta del papel. En: Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. 2001. Cap 72.

VARGAS, Carol Viviana y ZAMBRANO, Carlos Mauricio. Estudio del efecto de tamaño de partícula de bagazo de fique en la producción de biogás. Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Químico. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. 2010. 50 p.

YANG, S; LI, J; ZHENG, Z; MENG, Z. Lignocellulosic structural changes of *Spartina alterniflora* after anaerobic mono and co-digestion. En: Int Biodeter Biodegr., 2009, 63, 569-575.

ANEXOS

ANEXO A

DETERMINACIÓN DE LIGNINA, HEMICELULOSA Y CELULOSA

Para calcular el porcentaje de lignina, hemicelulosa y celulosa se emplearon las siguientes ecuaciones:

$$\text{Lignina} = ([\text{Fibra Detergente Acida}] - 0.8*[\text{Proteína Cruda}] - 0.4*[\text{Extracto Etéreo}]) - [\text{FDK}]$$

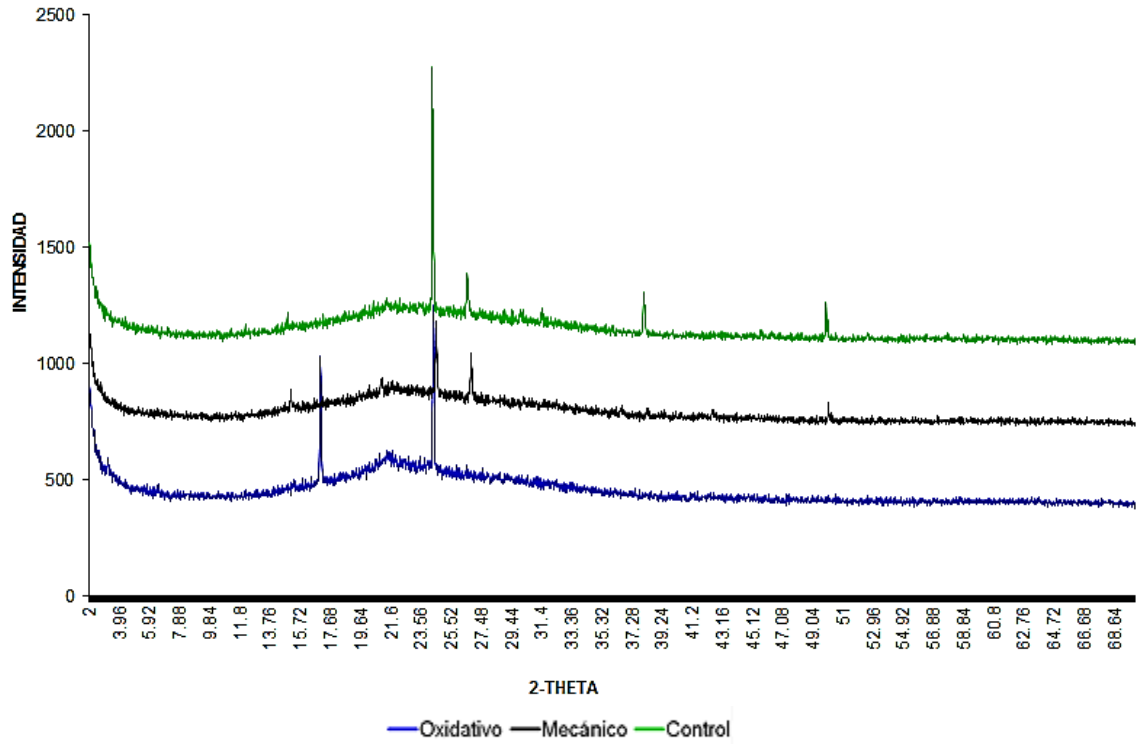
$$\text{Hemicelulosa} = [\text{Fibra Detergente Neutra}] - [\text{Fibra Detergente Ácida}] - 0.4*([\text{Cenizas}] - [\text{Sílice}]) - 0.4*([\text{Extracto Etéreo}]) - 0.1*[\text{Proteína Cruda}]$$

$$\text{Celulosa} = [\text{FDK}] - [\text{Sílice}] - 0.2*([\text{Cenizas}] - [\text{Sílice}])$$

ANEXO B

DIFRACTOGRAMA RAYOS X DEL BF

Figura B1. Difractograma rayos X del BF tratado y sin tratar.



ANEXO C

DETERMINACION DE LA CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

Esta prueba se realiza con el objeto de determinar la presencia de azúcares reductores producidos por la degradación de la celulosa, durante los procesos de fermentación.

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

REACTIVO DNS

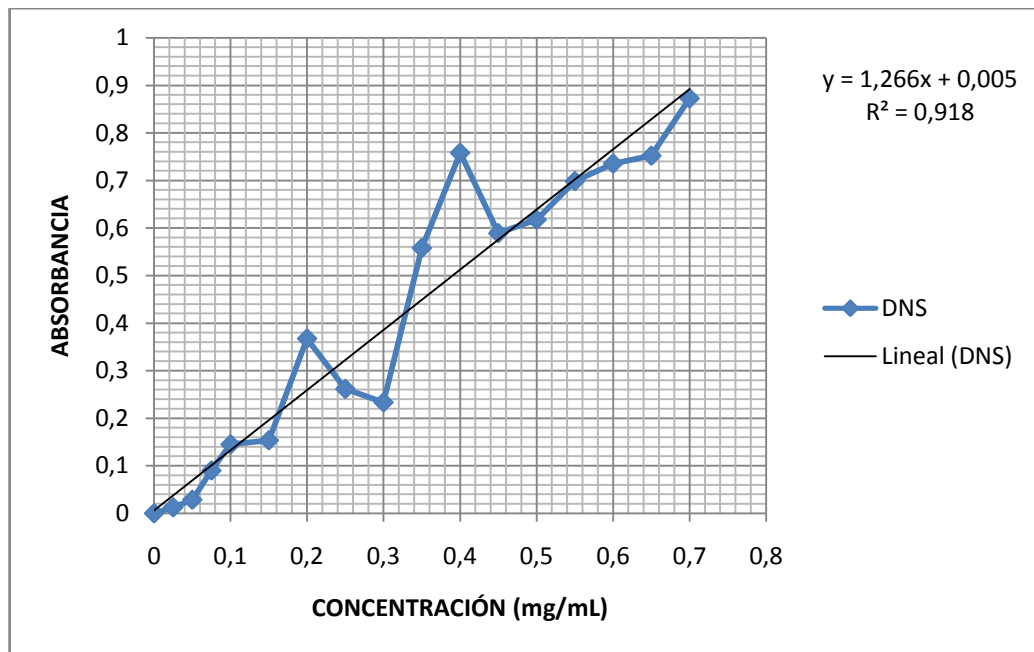
- Mezclar y disolver en 250 ml de agua destilada 8 g de NaOH y 150 g de tartrato de sodio y potasio.
- Posteriormente agregar 5 g de ácido dinitrosalicílico (marca Merck únicamente).
- Aforar a 500 ml con agua destilada.
- Almacenar a temperatura ambiente y proteger de la luz.

PROCEDIMIENTO

- Agregar 1 ml de reactivo a 1 ml de muestra usando tubos tapa rosca.
- Dejar en baño con agua en ebullición durante 5 minutos.
- Detener la reacción en un baño de hielo.
- Agregar 10 ml de agua destilada, y dejar reposando durante 15 minutos.
- Leer densidad óptica a 540 nm contra un blanco obtenido con el procedimiento anterior, pero agregando agua destilada en vez de muestra.

CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR DE GLUCOSA

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



ANEXO D

DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES Y ACALINIDAD

La alcalinidad es la capacidad ácido neutralizante 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 50 ml.
2. Centrifugar las muestras por 15 min a 10000 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

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

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