

**ESTUDIO PRELIMINAR DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA CON PRETRATAMIENTO
ÁCIDO DE RESIDUOS ORGÁNICOS MUNICIPALES PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES
FERMENTABLES**

Adriana Camelo Alba

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CIVIL Y AMBIENTAL
BOGOTA
2007**

**ESTUDIO PRELIMINAR DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA CON PRETRATAMIENTO
ÁCIDO DE RESIDUOS ORGÁNICOS MUNICIPALES PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES
FERMENTABLES**

Adriana Camelo Alba

Trabajo para optar por el título de Magíster en Ingeniería Civil

Asesor

Manuel S. Rodríguez S.

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CIVIL Y AMBIENTAL
BOGOTA
2007**

AGRADECIMIENTOS

Tengo tanto que agradecer que no terminaría nunca, pero puedo empezar por las personas que más cerca estuvieron en este proceso. Si los nombrara a todos la lista sería larguísima, desde lo más sincero de mi corazón les agradezco el apoyo, los regaños, las risas, la ausencia y presencia que me brindaron en el desarrollo de esta tesis.

Para los que estuvieron, mis infinitos agradecimientos, para los que la leen espero les aporte algo a su crecimiento intelectual. A mi, me cultivó no solo como profesional, sino como persona. Ahora y de aquí en adelante llegó el momento de recoger la cosecha.

Adriana Camelo Alba

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	i
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. OBJETIVOS.....	7
2.1 Objetivo General	7
2.2 Objetivos Específicos	7
3. METODOLOGÍA	8
3.1 Diseño experimental	8
3.2 Desarrollo Metodológico.....	10
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
4.1 Caracterización de la muestra	14
4.2 Pretratamiento.....	16
4.3 Hidrólisis enzimática	19
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	23
REFERENCIAS.....	26
ANEXOS.....	28
Anexo 1. Procedimiento para determinar la concentración de azúcares reductores.....	28
Anexo 2. Determinación de pared celular	32
Anexo 3. Procedimiento para extraer azúcares de la fase sólida	40
Anexo 4. Procedimiento para determinar la concentración de aldohexosas	42
Anexo 5. Procedimiento para determinar la concentración de aldopentosas	46
Anexo 6. Resumen de las condiciones de operación de varios ensayos de hidrólisis ácida diluida	50
Anexo 7. Resumen de las condiciones de operación de varios ensayos de hidrólisis enzimática con pretratamiento ácido	51

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de la muestra de residuos sólidos domésticos.....	11
Tabla 2. Composición inicial de la biomasa	14
Tabla 3. Condiciones de operación del pretratamiento y producción de azúcares reductores	16
Tabla 4. Composición de la biomasa después del pretratamiento	19
Tabla 5. Variables de la etapa enzimática y producción de azúcares reductores.....	19
Tabla 6. Contenido lignocelulósico después del pretratamiento y de la etapa enzimática	21

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Comportamiento de la concentración de azúcares reductores en el hidrolizado Vs. la concentración de ácido.....	17
Gráfica 2. Comportamiento de la concentración de azúcares reductores en el hidrolizado Vs. la temperatura	17
Gráfica 3. Comportamiento de la concentración de azúcares reductores en el hidrolizado.....	18
Gráfica 4. Comportamiento de la concentración de azúcares reductores en la etapa enzimática.....	20
Gráfica 5. Comportamiento de la concentración de azúcares reductores Vs. la cantidad de enzimas	21

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fracción orgánica de los residuos utilizados.....	11
Figura 2. Esquema general del proceso.....	13

RESUMEN

La valorización y posterior aprovechamiento de residuos sólidos orgánicos para obtener azúcares fermentables a través de procesos de hidrólisis, está enmarcado dentro del interés por contribuir a desarrollar alternativas tecnológicas de manejo, tratamiento, valorización y aprovechamiento de residuos, cuyos productos sean de utilidad a la sociedad y disminuyan la carga sobre el medio ambiente, como fuente de materias primas y sumidero de material residual.

En el desarrollo de la presente investigación se evaluaron las condiciones de operación de un sistema experimental para producción de azúcares fermentables a partir de la hidrólisis enzimática, con pretratamiento ácido, de la fracción orgánica de una muestra de residuos sólidos típicos de la ciudad de Bogotá.

En el diseño experimental se planteó en primera instancia el pretratamiento ácido de los residuos a tratar; en esta etapa se utilizaron como variables de control de proceso: la concentración de ácido, la temperatura y el tiempo de reacción y se realizaron ensayos bajo tres condiciones de proceso diferentes para cada variable. Una vez los residuos fueron pretratados, se procedió a la etapa enzimática, en la cual se emplearon enzimas provenientes de *Aspergillus niger* y se determinaron como condiciones de operación el tiempo de reacción y la cantidad de enzimas adicionada.

Como se dijo anteriormente, el producto principal del proceso de hidrólisis enzimática con pretratamiento ácido de la fracción orgánica de residuos sólidos típicos de la ciudad de Bogotá, son azúcares fermentables, por lo tanto fue necesario establecer su cantidad usando el método de determinación de azúcares reductores a partir de ácido 3,5-dinitrosalicílico de Miller (1959). Cada determinación se realizó por triplicado. Además se determinaron las cantidades de celulosa, hemicelulosa y lignina de la muestra, antes y después del tratamiento, con el fin de identificar las condiciones de operación bajo las cuales el proceso de producción de azúcares a nivel de escala banco alcanzaba su óptimo de producción. En este sentido, y después de varios ensayos, se encontró que las mejores condiciones a nivel experimental, que mayor producción generaron en el hidrolizado del pretratamiento fueron 1,84% de H₂SO₄ a una temperatura de 170°C y con un

tiempo de reacción de 5 minutos. En tanto, que para la etapa enzimática fueron: 1% p/p de enzimas, con un tiempo de reacción de 0,5 días a una temperatura de $50\pm 2^{\circ}\text{C}$ y un pH de $4,9\pm 0,1$.

1. INTRODUCCIÓN

Estudios recientes muestran que el nivel actual de disposición final de Residuos Sólidos Urbanos – RSU-, lodos de aguas residuales y otros desechos orgánicos combustibles no son una opción sostenible¹. A pesar que las técnicas y procedimientos en el diseño, implementación, operación y cierre de rellenos sanitarios han mejorado sustancialmente, no debe ser la única opción para manejar y disponer los RSU.

Con el incremento de la población en los centros urbanos, la generación de RSU incrementa la presión sobre el ecosistema donde se implementan los sitios de disposición final. En consecuencia es una necesidad latente para todo conglomerado urbano reducir en lo posible la cantidad de material a disponer en rellenos sanitarios, de tal forma que la valorización, recuperación y aprovechamiento de materiales y energía se considere no sólo en términos de reducción del impacto ambiental adverso de los residuos sobre el ecosistema, sino también como un factor clave en el sostenimiento de las necesidades de la sociedad.

Un modelo básico de Gestión Integral de Residuos Sólidos a la luz del análisis del ciclo de vida de materiales, evidencia que cualquier sistema de gestión debe considerar todas las opciones tecnológicas disponibles en el mercado, lo que significa identificar, cuantificar y discriminar cada uno de los componentes presentes en la combinación de sustancias y materiales. Se requiere por lo tanto, un cambio en los juicios de valor en relación con los residuos sólidos, pues su creciente e inevitable existencia, merece una evaluación de las formas para gestionar su uso, valorización y aprovechamiento.

El interés de desarrollar energías alternativas en un principio fue promovido por la crisis del petróleo en los años 70, fue liderado por países industrializados como Estados Unidos y Brasil quienes buscaban disminuir su dependencia de los combustibles fósiles y vieron en el bioetanol a partir de biomasa la oportunidad de hacerlo. A esto le sumaron ventajas en el desarrollo económico

¹ BIFFAWARD PROGRAMME ON SUSTAINABLE RESOURCE USE. *Thermal methods of municipal waste treatment*. Disponible en: http://www.hm-treasury.gov.uk/media/C43/44/Thermal_Methods_mass_balance.pdf. 11 de Abril de 2007 21:01 p.m.

del país, ya que con ello promovían la diversificación del sector agroindustrial generando empleo en las zonas rurales. El no desarrollo de las energías renovables, se traduce en la no diversificación de la matriz de energía primaria, la seguridad energética, la promoción del acceso universal a la energía y la preservación del medio ambiente².

Los biocombustibles han surgido como una alternativa viable, emergente y sustitutiva de los combustibles convencionales obtenidos por refinación de materiales fósiles. Ante la disminución gradual y dramática de las reservas internacionales de petróleo y carbón, y el consecuente desabastecimiento de energía que soporte la seguridad energética del aparato productivo de la economía mundial y sumado a esto, los problemas ambientales de gran escala como el calentamiento global, la reducción de la capa de ozono y la escasez de fuentes y sumideros de CO₂, conllevan a pensar que la diversificación de la matriz energética de fuentes de energía primaria debe enfocarse a energías renovables con reservas de materiales en plena capacidad productiva y que hasta el momento han sido poco utilizados, como por ejemplo la biomasa.

A partir del interés en producir bioetanol, en el mundo se han hecho estudios que muestran la viabilidad de usar una amplia gama de materias primas en el proceso. Se han estudiado diferentes tipos de biomasa cuya composición posibilite la extracción de los monosacáridos y posterior fermentación para obtener bioetanol. A pesar de este análisis las materias primas más usadas son la caña de azúcar en Brasil y el maíz en Estados Unidos.

Colombia en respuesta a la oportunidad de mercado y a su visión de sostenibilidad ambiental, ha adelantado la formulación de proyectos relacionados con sistemas energéticos cuyo insumo son fuentes de energía primaria renovable; en la actualidad se cuenta con 31 proyectos en distintas etapas de formulación, 14 de ellos corresponden (totalmente o en parte) a la categoría de suministro de energía eléctrica con fuentes renovables, cinco a la de instalación de equipos y sistemas de consumo eficiente de energía eléctrica, uno a la de aumento de la eficiencia de equipos y sistemas existentes y uno más, a la cogeneración³. Colombia viene aprovechando las

² Declaración de Margarita. Construyendo la integración energética del sur. República Bolivariana de Venezuela, 2007. Página 2.

³ MAVDT-OCMCC-UPME. Plan de trabajo para el MDL. Bogotá D.C., Octubre 2002. Página 4.

oportunidades que los biocombustibles le abren a la agricultura. Con más de un millón de litros diarios, Colombia es el segundo productor de etanol en Latinoamérica, después de Brasil⁴.

La utilización de los recursos naturales se fundamenta, en todos los casos, en el uso de la ciencia y la tecnología como expresión de las decisiones, métodos y técnicas acerca de la apropiación, velocidad y forma de uso o abuso de dichos recursos⁵, tanto por productores como por consumidores; esto, sumado a la imposibilidad de los procesos antrópicos y naturales, de llevarse a cabo con la máxima eficiencia posible, hace que cualquier proceso, genere residuos independientemente de su naturaleza y fuentes primarias de materia y energía. La posibilidad de utilizar residuos orgánicos para obtener etanol, permite darle a estos una alternativa de tratamiento diferente a la tradicional disposición en rellenos sanitarios. Paralelo a la disminución en las cantidades de desechos que se disponen en ellos, se aprovechan las características que presentan para darles un valor agregado e involucrarlos en el ciclo productivo. Convirtiendo de esta manera algo que se considera inservible, en materia prima para un proceso, alargando así su ciclo de vida. Este proyecto tiene como propósito ampliar el conocimiento en el tema de producción de etanol a partir de biomasa, partiendo del proceso de hidrólisis que favorece la disponibilidad de azúcares fermentables, enmarcado en las ventajas que esto representa para un país como Colombia y poder utilizar los resultados de esta investigación en estudios posteriores.

La utilización de los residuos orgánicos en la obtención de etanol, está sujeta a dos etapas: requiere una etapa de hidrólisis y otra de fermentación. En la literatura se ha identificado que la hidrólisis es una etapa crucial en el proceso anterior a la fermentación cuando se utiliza biomasa lignocelulósica, debido a que este tipo de materia prima tiene un alto contenido de monosacáridos acomplexados en polisacáridos en el componente lignocelulósico de los residuos, que no está disponible para los microorganismos involucrados en la fermentación. Por lo tanto mediante la hidrólisis se favorece la liberación de estos azúcares simples.

La hidrólisis puede ser química, enzimática, térmica, entre otras. Cada una presenta ventajas y desventajas en su operación, que las hacen adecuadas bajo diferentes condiciones. En el caso de producir etanol a partir de biomasa lignocelulósica, la hidrólisis enzimática presenta una buena

⁴ ARIAS, Andrés. Contenido virtual. En: BIOCMBUSTIBLES EN COLOMBIA. [Contenido]. Disponible en <<http://www.minagricultura.gov.co/media/55803826.pdf>> 11 de Abril de 2007 21:01 p.m.

⁵ GONZÁLEZ, Francisco. Reflexiones acerca de la relación entre los conceptos: ecosistema, cultura y desarrollo. Serie ensayos ambiente y desarrollo. Segunda Edición. IDEADE, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, 1999.

recuperación principalmente de glucosa lo cual no se logra con la hidrólisis ácida. Es importante resaltar que para que lo anterior se produzca la hidrólisis enzimática requiere un pretratamiento, para facilitar el acceso de las enzimas a la celulosa. En la literatura se encontró el pretratamiento ácido como una opción adecuada, ya que produce azúcares de la hemicelulosa y favoreciendo la producción de glucosa en la siguiente etapa.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Realizar un estudio preliminar a nivel de laboratorio de la producción de azúcares reductores por medio de hidrólisis enzimática, con pretratamiento ácido, de la fracción orgánica de una muestra de residuos sólidos típicos de la ciudad de Bogotá.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Caracterizar el contenido lignocelulósico de la muestra de los residuos sólidos domésticos estudiados.

2.2.2 Determinar las mejores condiciones de temperatura, concentración de ácido sulfúrico y tiempo de reacción a nivel experimental del pretratamiento ácido de una muestra de residuos sólidos de Bogotá, para las cuales se produzcan más azúcares reductores.

2.2.3 Determinar las mejores condiciones de tiempo de reacción y la cantidad de enzimas a nivel experimental de la hidrólisis de una muestra de residuos sólidos de Bogotá, para las cuales se produzcan más azúcares reductores.

3. METODOLOGÍA

Es necesario aclarar que el marco referencial para el desarrollo de esta tesis se encuentra desarrollado en "*Estado del arte sobre la obtención de azúcares simples a partir de biomasa para la producción de biocombustibles líquidos*", revisión bibliográfica que fue realizada como proyecto de grado para optar al título de ingeniería ambiental. Por lo tanto en este documento no se incluye el marco teórico.

3.1 Diseño experimental

3.1.1 Pretratamiento ácido

En la revisión bibliográfica se encontró que las variables que más se tienen en cuenta para controlar las condiciones del pretratamiento con ácido diluido son la temperatura (T), la concentración del ácido (c.á) y el tiempo de reacción (t). Ellas interactúan en el proceso y determinan la producción de monosacáridos provenientes principalmente de la hemicelulosa: xilosa, arabinosa, galactosa y manosa, aunque también algo de glucosa. El catalizador utilizado fue ácido sulfúrico. En la tabla 3 se encuentran registradas las condiciones de operación de cada ensayo.

De esta manera en los ensayos 1 a 3 se mantuvieron constantes la temperatura y el tiempo de reacción, para determinar que concentración de ácido sulfúrico producía más azúcares. De acuerdo a los resultados obtenidos, se fijó la concentración de ácido con la que más azúcares reductores se produjeron y se varió la temperatura de acuerdo a la tabla 3, dejando constante también el tiempo de reacción (ensayos 4 y 5). Por último se varió el tiempo de reacción (ensayos 6 y 7), utilizando la concentración de ácido y la temperatura que más azúcares produjeron.

3.1.2 Hidrólisis enzimática

En la revisión bibliográfica se encontró que la eficiencia de esta etapa se controla principalmente con el tiempo de retención y la cantidad de enzimas. Aunque también influyen variables como el pH, la temperatura, entre otras, para las cuales se han establecido valores en general más aceptados y que dependen en mayor medida del tipo de enzima que se utilice. Estos valores se mantuvieron constantes en los ensayos.

La hidrólisis enzimática se llevó a cabo en un reactor cilíndrico de vidrio con capacidad de 1 L, se utilizaron enzimas comerciales provenientes del hongo *Aspergillus niger*, con una actividad enzimática estimada de 1,02 U/mg⁶. Se variaron el tiempo de reacción y la cantidad de enzimas como se muestra en la tabla 5. La temperatura, el pH y la agitación permanecieron constantes en 50±2°C, 4,9±0,1 y aproximadamente 150 rpm. La temperatura del reactor se controló con un manto de calentamiento y se midió con un termómetro de mercurio.

3.1.3 Métodos de análisis

Para determinar la concentración de azúcares en el hidrolizado obtenido se utilizó el método colorimétrico para la determinación de azúcares reductores (AR) de Miller (1959). En este método se utiliza el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para desarrollar el color. El grupo aldehído se oxida al grupo carboxilo, mientras el DNS se reduce a ácido 3-amino, 5-nitrosalicílico bajo condiciones alcalinas. Se utilizó glucosa como patrón. La implementación de este método se encuentra detallada en el anexo 1. La producción de azúcares se normalizó con respecto a la biomasa inicial en base seca.

Para determinar el contenido inicial de azúcares reductores se utilizó un procedimiento de extracción de la fase sólida utilizado por Roncero y colaboradores (2005). La adaptación de este procedimiento se encuentra en el anexo 2. Después de la extracción se utilizó el método de Miller para determinar la concentración de AR en el extracto.

También se determinó el contenido lignocelulósico (hemicelulosa, celulosa, lignina y sílice) de la muestra inicial y de las muestras que mayor producción de azúcares obtuvieron. Para esto se implementaron los métodos de Fibra en Detergente Neutro (FDN), Fibra en Detergente Ácido y

⁶ 1 U corresponde a la cantidad de enzimas que liberan 1 μmol de glucosa a partir de carboximetilcelulosa por minuto a pH 5 y 37°C.

Lignina-Celulosa y Sílice de Van Soest (1967, 1963 y 1968), similares a los que utilizan en Corpoica. Estos métodos son gravimétricos. La determinación de hemicelulosa se hace por diferencia entre FDN y FDA. El contenido de lignina se determina a partir del residuo de FDA utilizando una solución con permanganato de potasio. El contenido de celulosa se determina por incineración del residuo de lignina y el contenido de sílice a partir del residuo de celulosa. El procedimiento de estos métodos se encuentra en el anexo 3.

Adicionalmente se implementaron dos métodos colorimétricos para determinar aldohexosas y aldopentosas. Sin embargo estos métodos no fueron utilizados en el desarrollo experimental. Son un aporte para la continuación de esta línea de investigación y se encuentran detallados en los anexos 4 y 5.

3.2 Desarrollo Metodológico

3.2.1 Acondicionamiento de la muestra de Residuos Sólidos Domésticos

Se recolectaron los residuos sólidos producidos durante 3 días en 10 casas de familia en la ciudad de Bogotá. Los residuos fueron clasificados desde la fuente en residuos orgánicos, papel y cartón, madera y textiles (figura 1). A partir de los residuos recopilados se verificó la clasificación hecha por los usuarios, se desecharon los residuos que no hacían parte de la muestra de interés, como plásticos, vidrio, latas. Se pesaron por separado las diferentes fracciones de los residuos y se compuso la muestra conservando las proporciones que presentan las fracciones de los residuos sólidos domésticos de Bogotá que son de interés para este estudio, y que en adelante serán denominadas RSD. La composición típica de los residuos de Bogotá y la composición corregida para este estudio se presentan en la tabla 1.

La composición específica de la fracción de papel y cartón se determinó a partir del estudio de caracterización y cuantificación de los materiales potencialmente reciclables presentes en los residuos sólidos municipales generados en Bogotá D.C. que hizo Uniandes en unión con la Unidad Ejecutiva de Servicios Públicos-UESP (2005). En este estudio se cuantificaron los residuos por estratos. Por lo tanto para determinar la composición típica de la ciudad se tuvo en cuenta la distribución de la población por estratos que se reporta en ese mismo estudio.

Tabla 1. Composición de la muestra de residuos sólidos domésticos

Composición	% peso ¹ Bogotá	% peso corregido
Residuos orgánicos	70,94	86,2
Papel y catón	9,48	11,5
Tetrapak	2,5	0,29
Plegadizo	14,7	1,69
Archivo	44,9	5,17
Kraft	0,5	0,06
Cartón	11,1	1,27
Periódico y directorio	21,6	2,49
Cajas de huevos	4,7	0,55
Madera	0,19	0,2
Textiles	1,69	2,1

¹ Fuente: Uniandes, 2005 y PMIRS de Bogotá, 2004

Los RSD se secaron en un horno a 60°C aproximadamente durante 3 días, posteriormente se homogenizó la muestra. Fue necesario disminuir el tamaño de las partículas, para lo cual los RSD primero se trituraron en un molino picador (Cremasco DP-1) y después en un molino mecánico (Corona). En esta etapa también se homogenizó la muestra. Se utilizaron los RSD cuyo tamaño de partícula pasaba el tamiz de 1mm. Los RSD fueron almacenados en bolsas con cierres herméticos y bajo condiciones de humedad controlada.



a)



b)

Figura 1. Fracción orgánica de los residuos utilizados.

a) Residuos como fueron recopilados. b) Residuos en proceso de secado.

3.2.2 Pretratamiento ácido

El pretratamiento de los RSD consistió en preparar una suspensión en ácido en una proporción de 10% p/v que fue sometida a las condiciones establecidas. Para obtener las temperaturas determinadas, el pretratamiento se realizó en un horno microondas (Mars Xpress, CEM), con una

potencia de 1600 W al 80% y con agitación para todos los ensayos. Se introducían 20 ml de la suspensión a los viales de teflón que eran tapados y llevados al horno microondas. Para establecer el tiempo de calentamiento adecuado, fue necesario realizar pruebas preliminares para cada condición de temperatura. En general el tiempo de calentamiento para alcanzar la temperatura deseada estuvo entre 5 y 15 minutos dependiendo de la temperatura. La rampa de enfriamiento se estableció en una hora.

Después del pretratamiento la muestra fue filtrada al vacío a través de un filtro de fibra de vidrio de poro 1.0 μm (Whatman GF/B). Se determinaron los azúcares reductores por triplicado en la fase líquida por el método de Miller y el contenido lignocelulósico en la fase sólida de la muestra con la mayor concentración de AR.

3.2.3 Hidrólisis enzimática

En la etapa enzimática se realizó el pretratamiento bajo las condiciones que más azúcares reductores produjeron. Se utilizó la fracción sólida recuperada después de la filtración para preparar una suspensión del 10% p/p en 500 ml de solución buffer de acetato de sodio 0.1M, la muestra se estabilizó a un pH de 4,9. El pH se controló a través del proceso con ácido fosfórico (H_3PO_4) y con carbonato de calcio (CaCO_3), según fuera necesario. La mezcla continua fue de 150 rpm aproximadamente, y se calentó hasta alcanzar los 50°C. Se adicionaron las enzimas, disueltas previamente en aproximadamente 20 ml de agua destilada. A partir de ese momento se contabilizó el tiempo de reacción. Se tomaron las muestras en los tiempos indicados en la tabla 2.

Las muestras fueron filtradas; a las fracciones líquidas se les analizó el contenido de azúcares reductores. La fracción sólida se secó a 65°C para determinar el contenido lignocelulósico de ser necesario. De acuerdo a los resultados de variar el tiempo de retención se escogió el que mayor cantidad de azúcares produjo y se estableció como el tiempo de reacción para los ensayos de variación de la carga de enzimas. Para esto se siguió el mismo procedimiento que se usó al variar el tiempo de retención. Finalmente se determinó la carga de enzimas que produjo más azúcares y el contenido lignocelulósico de esa muestra.

En la figura 2 se ilustra en forma general el procedimiento realizado en el desarrollo experimental.

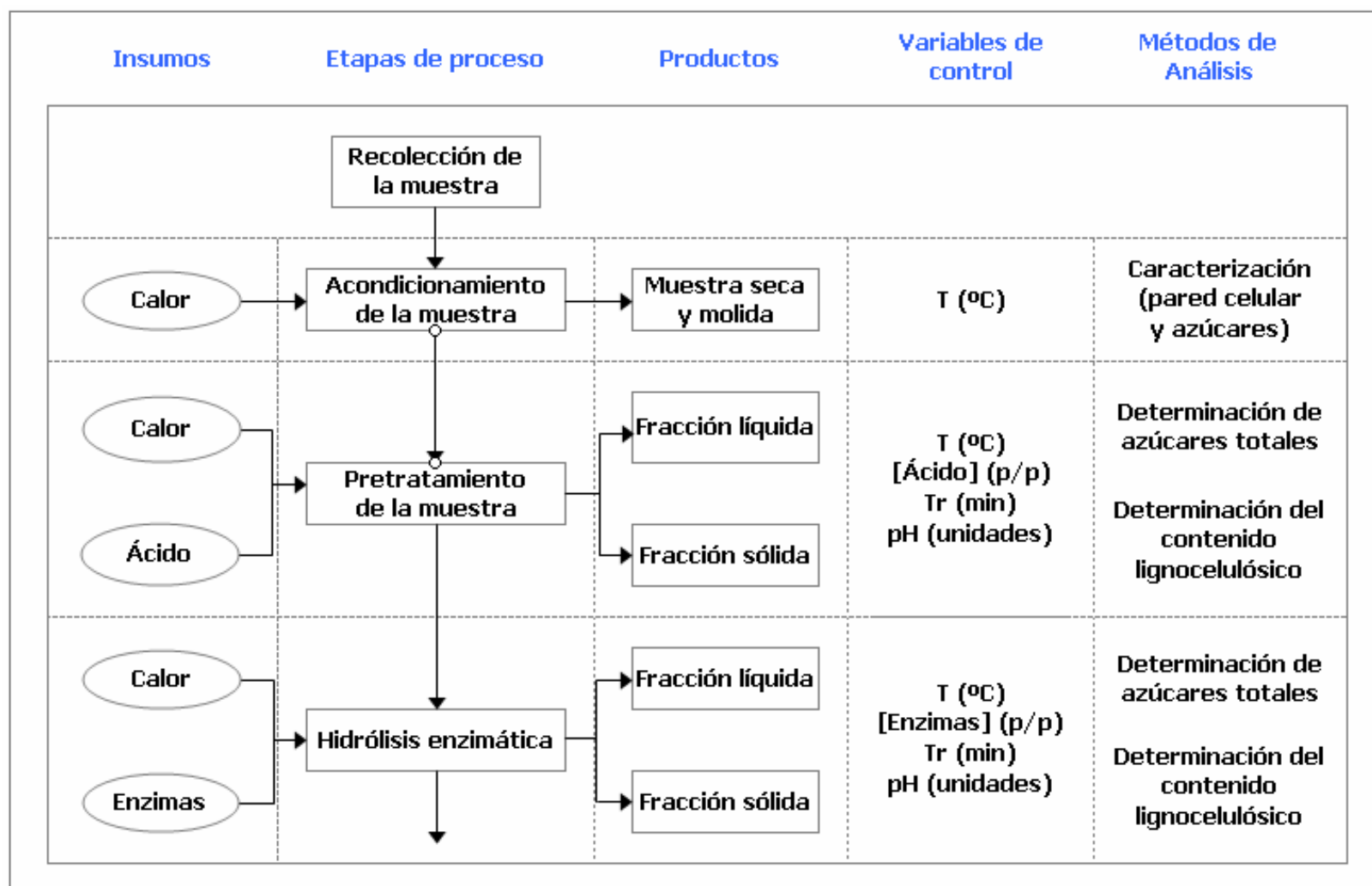


Figura 2. Esquema general del proceso

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización de la muestra

Los resultados de la composición inicial respecto al contenido de hemicelulosa, celulosa y lignina de la muestra utilizada en el desarrollo metodológico y también algunos valores de composición reportados en la literatura para otros tipos de biomasa se presentan en la tabla 2. La suma de los componentes no es 100% debido a que no se está reportando el contenido no celular que corresponde a la fracción que se extrae de la muestra en la determinación de FDN y tampoco el contenido de cenizas como sílice.

Tabla 2. Composición inicial de la biomasa

Materia prima	Composición (% masa seca)			Autor
	Lignina	Celulosa	Hemicelulosa	
Estiércol animal		12,00	22,00	Liao et al. 2004
		35,67	14,88	
		11,24	26,59	11,27
Madera dura	20,00	45,00	30,00	Iranmahboob et al. 2002
Madera blanda	28,30	42,00	27,00	
Jiao He peat (Turba)	23,11	4,78	28,45	Yan et al. 1996
<i>Eucalyptus grandis</i>	25,77	44,65	15,33	Emmel et al. 2003
Cartón corrugado	14,2	59,7	13,8	Yañez et al. 2004
Cascarilla de arroz		37,2	26,1	Vlasenko et al. 1997
Paja de trigo	8,17	48,57	27,7	Saha et al. 2005
RSD-Bogotá*	7,8	28,5	16,9	Camelo, 2007

* Muestra utilizada en este estudio

Como se puede observar en la tabla anterior, las muestras de madera presentan los mayores contenidos de polisacáridos (celulosa y hemicelulosa) y por lo tanto mayor potencial de obtención de monosacáridos vía hidrólisis; estos mismos parámetros evaluados en la muestra estudiada son menores debido a la naturaleza heterogénea de los RSD. Sin embargo, como se dijo anteriormente la fracción orgánica representa el 70% del total de residuos generados en la ciudad de Bogotá, de este 70% aproximadamente el 45% es material aprovechable para la producción de azúcares fermentables. En consecuencia, el contenido lignocelulósico y las cantidades que se generan de

este tipo de biomasa diariamente en la ciudad⁷, permiten considerar el proceso de hidrólisis como una alternativa viable para la producción de bioetanol.

De la misma forma las muestras de madera tienen un contenido de lignina mucho mayor que los RSD-Bogotá. Como se reporta en la literatura, altos contenidos de polisacáridos y bajos contenidos de lignina favorecen la producción de monosacáridos y por ende mayor potencial para la obtención de biocombustibles. Esto se debe principalmente a la rigidez que proporciona la lignina a la pared celular.

En otros estudios en los que utilizan residuos municipales, el contenido de celulosa está entre el 19 y 67% de acuerdo al residuo específico que corresponda (Li et al., 2007). Estos autores hacen el estudio para cáscaras de zanahoria, papa, pasto, papel periódico y de archivo por separado y mezclas de estos. Es interesante el resultado, ya que pueden determinar que fracciones de los residuos favorecen o perjudican el proceso de producción de monosacáridos.

Sin embargo, el propósito de utilizar la fracción orgánica de los RSD siempre va a tener esa variabilidad que es inherente a la heterogeneidad de los residuos y en últimas se busca desarrollar tecnologías de aprovechamiento y valorización a los residuos municipales aplicables a la vida real, sin tener que escoger tan minuciosamente las fracciones que más potencial de producción de monosacáridos presentan. Eso haría que se caiga en la misma estrategia de utilizar los residuos agrícolas de ciertos tipos de cultivos como se hace actualmente. Y Por otro lado dificulta el proceso de separación el la fuente de los residuos domésticos.

También se hizo la caracterización inicial de AR con el procedimiento que se describe en la sección 3.1.3. Pero el contenido de azúcares resultó ser menor que los contenidos de AR obtenidos en después de la hidrólisis, por lo tanto no se pudieron realizar cálculos de eficiencia de producción de los azúcares reductores. El método utilizado para analizar el contenido inicial de AR debe ser revisado en mayor profundidad en futuras investigaciones.

⁷ En Bogotá se producen aproximadamente 6000 ton/d. Fuente: PMIRS, 2004. UESP. RESOLUCIÓN UESP No. 132. 1/septiembre/04

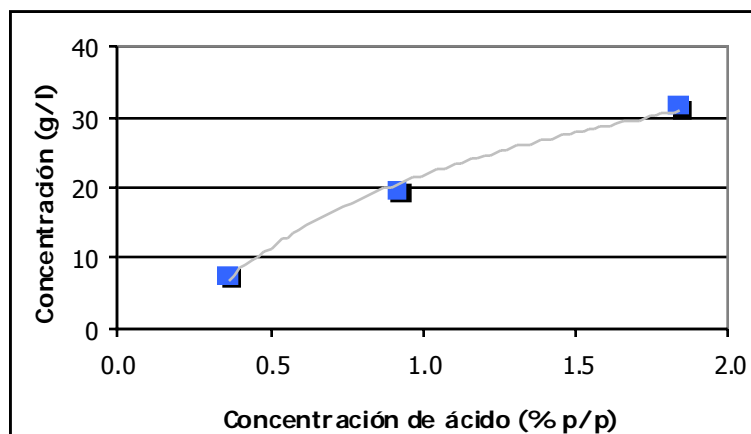
4.2 Pretratamiento

Las condiciones de operación bajo las cuales se obtuvo la mayor producción de azúcares en la etapa de pretratamiento fueron 1,8%, 170 °C y 5 min para la concentración de H₂SO₄, la temperatura y el tiempo de reacción respectivamente. La concentración de ácido y la temperatura escogidas para el pretratamiento fueron las condiciones más severas (ver tabla 3). Sin embargo, a partir de los ensayos realizados no se puede establecer que esas sean las condiciones óptimas, pues existe la posibilidad de que a mayores valores se obtenga mejor producción de azúcares reductores.

Tabla 3. Condiciones de operación del pretratamiento y producción de azúcares reductores

Ensayo	Concentración de ácido (% p/p)	Temperatura (°C)	Tiempo de reacción (min)	Producción (g-AR/g-RSD)
1	0,4	120	5	0,0334
2	0,9	120	5	0,0876
3	1,8	120	5	0,1418
4	1,8	140	5	0,2480
5	1,8	170	5	0,3052
6	1,8	170	3	0,2270
7	1,8	170	15	0,2734

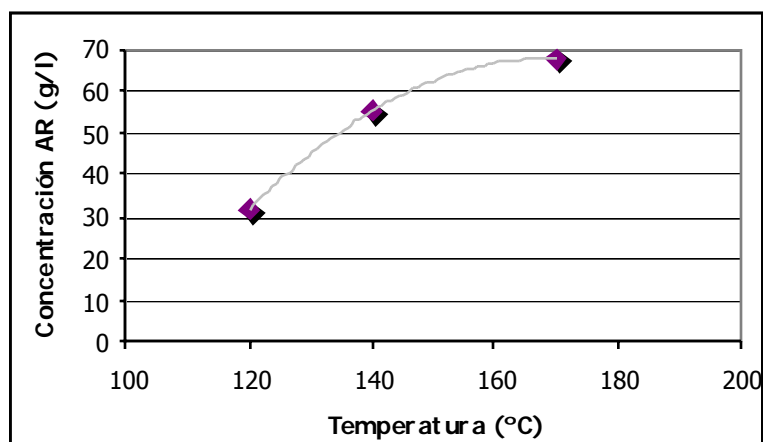
En las gráficas 1 y 2 se puede observar el comportamiento de la concentración de azúcares reductores en el hidrolizado de los ensayos para las variaciones de la concentración de H₂SO₄ y la temperatura respectivamente. Es evidente la tendencia creciente, sin haber llegado a una concentración de ácido y una temperatura a partir de la cual la cantidad de azúcares reductores disminuya. Es necesario conocer el comportamiento de la producción bajo el número de condiciones suficientes para poder establecer las condiciones óptimas del pretratamiento. Por lo tanto, es necesario que en futuras investigaciones continúe la exploración del comportamiento de estas variables; se amplíe el rango y el número de variaciones, para poder analizar su sensibilidad frente al proceso.



Gráfica 1. Comportamiento de la concentración de azúcares reductores en el hidrolizado Vs. la concentración de ácido

La temperatura establecida en este estudio como la que mejor producción de azúcares reductores produjo, es un poco mayor a la reportada en la literatura como valor típico, sin embargo el tiempo de reacción determinado en este estudio fue menor. Este es el comportamiento que se observa en el resumen de condiciones del anexo 6. Si la temperatura es alta, el tiempo de reacción es bajo y viceversa.

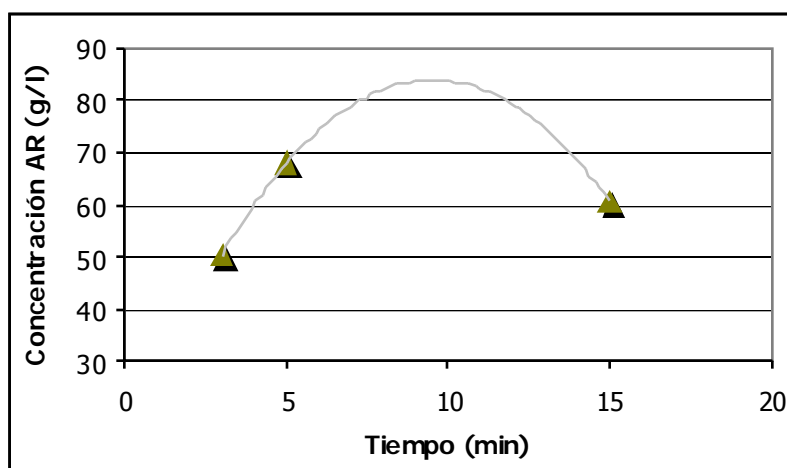
También se debe tener en cuenta que al tener la posibilidad de aumentar más la temperatura para obtener más azúcares se debe considerar que entre más severas son las condiciones, se favorece más la formación de compuestos de degradación, para los cuales sería necesario determinar su concentración. Sin embargo, esta determinación no estaba dentro del alcance de este estudio. Igualmente, se debe evaluar que tan adecuado es el uso de esas condiciones para las posteriores etapas enzimática y fermentativa.



Gráfica 2. Comportamiento de la concentración de azúcares reductores en el hidrolizado Vs. la temperatura

A nivel experimental se encontró que aproximadamente a los 5 minutos de transcurrida la reacción, a las condiciones de temperatura y concentración de ácido correspondientes, la cantidad de azúcares reductores fue la máxima obtenida durante los ensayos (ver gráfica 3). Para tiempos superiores, la cantidad de azúcares reductores se vio disminuida posiblemente por reacciones de degradación de los monosacáridos en compuestos más simples.

Se esperaban tiempos de reacción mayores, pero resultaron ser tiempos cortos, posiblemente por la acción de las microondas a las que se vieron sometidas las muestras. Se acelera el ataque a la estructura recalcitrante del material lignocelulósico, debido a la eficiencia que tiene este tipo de calentamiento. Hu y Wen (2007) pretrataron un tipo de pasto comparando el calentamiento convencional y el asistido por microondas, los resultados mostraron que el tratamiento con microondas mejoraba la producción de monosacáridos de la hemicelulosa en el pretratamiento y una mejor digestibilidad del pasto y mayor producción de glucosa en la etapa enzimática.



Gráfica 3. Comportamiento de la concentración de azúcares reductores en el hidrolizado

La tabla 4 muestra que la muestra de RSD (este estudio) después del pretratamiento quedó con un 55% de celulosa y un 2,8% de hemicelulosa. Comparando estos valores con el contenido inicial, se aprecia que efectivamente el contenido de hemicelulosa disminuyó como consecuencia del pretratamiento, se removió el 83,5% y por consiguiente el contenido de celulosa incrementó su proporción en la composición, sin que esto signifique que la muestra tiene más celulosa que antes del pretratamiento.

Tabla 4. Composición de la biomasa después del pretratamiento

Materia prima	Composición (% masa seca)			Remoción (%)	Azúcares (g/l)	Autor
	Lignina	Celulosa	Hemicelulosa			
Cascarilla de arroz		43,2	3,4	87,0	17,1	Vlasenko et al. 1997
Cartón corrugado	20,4	75,1	4,7	65,9	19,9	Yañez et al. 2004
Estiércol animal	32,12	42,67	~0	~100	16	Liao et al. 2004
	30,11	42,56	~0	~100	7,01	Wen et al. 2004
RSD	12,64	54,9	2,8	83,5	67,8	Camelo 2007

En comparación con los resultados presentados por otros autores, la remoción de hemicelulosa obtenida en el presente estudio es similar. Teniendo en cuenta que los RSD son bastante heterogéneos la remoción es considerada alta y se demuestra de esta manera la preparación que el pretratamiento realizó a la matriz de RSD para la posterior etapa enzimática.

4.3 Hidrólisis enzimática

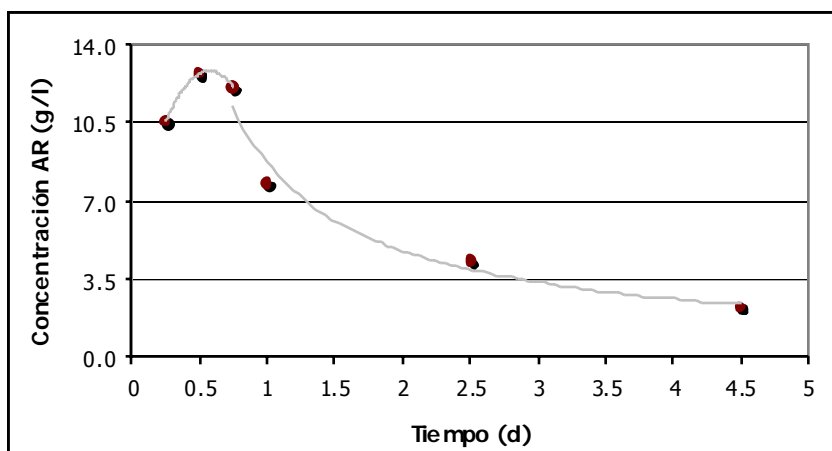
En la literatura se encuentra que el tiempo de reacción óptimo para la etapa enzimática se presenta entre los 2 y los 4 días (Ver anexo 7). En el presente estudio la mayor producción de azúcares reductores se presentó a los 0,5 días, ver tabla 5. La cinética de la reacción muestra que después de los cinco días de transcurrido el proceso de hidrólisis enzimática la producción disminuyó, debido posiblemente a consumo de los azúcares producidos por parte de microorganismos que se desarrollaron en estas condiciones.

Tabla 5. Variables de la etapa enzimática y producción de azúcares reductores

Ensayo	Tiempo de reacción (d)	Cantidad de enzimas (%p/p-RSD)	Producción (g-AR/g-RSD)
8	0,25	1	0,06
9	0,5	1	0,072
10	0,75	1	0,069
11	1	1	0,044
12	2,5	1	0,024
13	4,5	1	0,013
14	0,5	2	0,072
15	0,5	5	0,052

En la gráfica 4 se puede observar el comportamiento que tuvo la concentración de azúcares, esta es una gráfica típica del consumo de sustrato por parte de microorganismos. En los ensayos realizados no se tuvieron precauciones con la esterilidad de las muestras, por lo cual, en las

condiciones en que se desarrollaron los ensayos de hidrólisis enzimática se pudieron desarrollar microorganismos fácilmente. Sin embargo no se hicieron análisis microbiológicos para determinar que tipos de colonias crecieron en el medio.



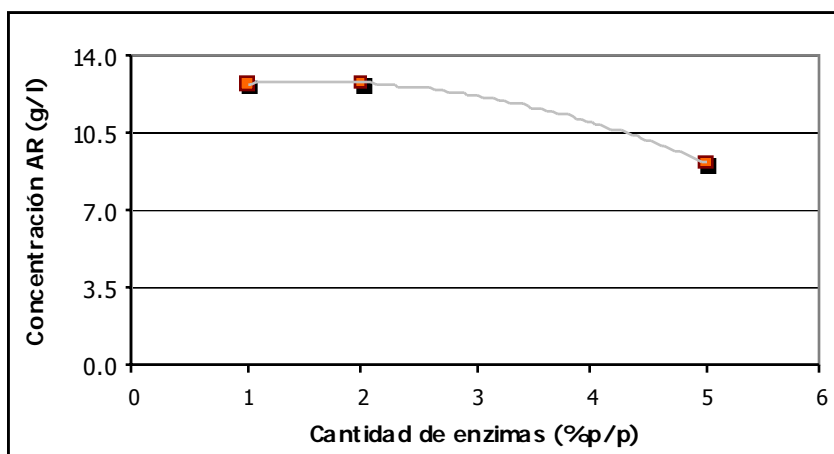
Gráfica 4. Comportamiento de la concentración de azúcares reductores en la etapa enzimática

La producción de AR también se puede ver afectada por efectos de inhibición. En el proceso de hidrólisis de la celulosa, intervienen varios tipos de enzimas que actúan en diferentes enlaces de la estructura molecular. La enzima utilizada, proveniente de *A. niger*, tenía principalmente endoglucanasas las cuales hidrolizan los enlaces 1,4- β -D-glucosídicos del complejo celulósico; y debilidad en el contenido de enzimas β -glucosidasas, las cuales hidrolizan la celobiosa. Si la celobiosa llega a altas concentraciones se convierte en un compuesto inhibitorio en la producción enzimática de glucosa.

Por esto mismo es posible que solo se produjeran los azúcares que estaban disponibles antes de la inhibición. Estos pudieron ser provenientes en una pequeña proporción de glucosa de la celulosa y de la hemicelulosa remanente, puesto que la enzima utilizada también hidroliza enlaces de complejos de xilosa, y se evidenció una disminución de hemicelulosa en el análisis a la fracción sólida después de la etapa enzimática (ver tabla 6).

También es posible que las condiciones de pH y temperatura, 5 y 50°C respectivamente no sean los adecuados para la enzima. Por lo cual, estas variables pueden ser variadas en futuros estudios y determinar los mejores valores para maximizar la producción de AR.

La producción es menor a la reportada en la literatura para este proceso. Sun y Cheng (2005), alcanzan una producción de 0,20 y 0,23 g-AR/g-biomasa para dos biomasa diferentes. Si se aseguran condiciones de esterilidad en el medio, se mejora el complejo enzimático utilizado y se encuentran pH y temperaturas óptimas para la enzima específica que se utiliza, se puede pensar que los niveles de producción aumentan, elevando el aprovechamiento de este tipo de biomasa.



Gráfica 5. Comportamiento de la concentración de azúcares reductores Vs. la cantidad de enzimas

En la gráfica 5 se puede observar que la concentración de AR fue muy similar cuando se hidrolizó con 1% y 2% de enzimas. Sin embargo, es atípico que al tener un 5% de enzimas la concentración de AR en el hidrolizado disminuya, por lo general este tipo de curvas tienen un comportamiento creciente y tienden a estabilizarse (Wen et al., 2004; Lloyd et al., 2005; Chen et al., 2007). No contar con valores menores para la cantidad de enzima hace proponer que se explore más con esta variable del proceso, ya que puede ser que con 1% de enzimas ya se haya llegado a la estabilización de la producción que se mencionó anteriormente.

Es necesario someter los residuos de otros pretratamientos a la etapa enzimática, debido a que no necesariamente las condiciones que mayores cantidades de azúcares producen en el pretratamiento, son las que van a producir más azúcares en la etapa enzimática (Lloyd et al. 2005).

Tabla 6. Contenido lignocelulósico después del pretratamiento y de la etapa enzimática

Muestra	Composición (% peso)				
	Otros	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Sílice
E9	28,8	61,3	0,3	7,9	0,43
E14	27,7	62,2	0,2	8,2	0,14

Como ya se mencionó anteriormente el complejo enzimático utilizado no tiene todas las enzimas necesarias para la completa hidrólisis de la celulosa a glucosa, entonces, se puede comprender porque en la tabla 6 se observa que el contenido de celulosa es importante en el residuo remanente después de la etapa enzimática para los ensayos con los que se obtuvo mayor producción de AR. Sin embargo, también se debe tener en cuenta que esta composición es relativa y no está normalizada con respecto al contenido inicial, por lo tanto como el contenido de hemicelulosa, al igual que en el pretratamiento, en esta etapa disminuyó, el contenido relativo de celulosa aumenta sin que esto signifique que no se haya degradado nada de celulosa. El contenido de celulosa al final es mayor, debido a que el método utilizado para su determinación no evidencia la disminución de peso de la muestra a través del proceso.

En este estudio se evidencia la debilidad que tienen las celulasas comerciales utilizadas para hidrolizar la celobiosa, esto también está ampliamente documentado en la literatura y se han probado con mejor éxito combinaciones de celulasas que tengan complementos específicos de β -glucosidasas. De la misma forma se evidencia la necesidad de tener un estricto control en la esterilidad del medio y asegurar la ausencia de microorganismos que consuman los azúcares producidos.

La degradación de la celobiosa resulta ser un factor determinante y se convierte en ruta crítica para la producción de bioetanol, ya que está documentado que no solo inhiben la producción de glucosa en la hidrólisis, sino que también pueden perjudicar la fermentación. Debido a que las levaduras no fermentan bien la celobiosa (Vallander & Ericsson, 1985 citados en Szczodrak & Fiedurek, 1996).

En el proceso combinado (pretratamiento-hidrólisis) se logró una alta remoción de la hemicelulosa, alcanzando el 98%. Los datos realizados no permiten decir cuanto se removió de la celulosa, pero por la baja producción de azúcares en la etapa enzimática se deduce que la celulosa no se vio muy afectada. En cuanto a la producción de azúcares reductores se obtuvieron 0,38g/g que corresponden 0,31g/g en el pretratamiento y 0,07 g/g en la hidrólisis enzimática.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Como parte de la línea de investigación de aprovechamiento y valorización de residuos se inició con el estudio de la obtención de monosacáridos para la producción de bioetanol a partir de residuos sólidos municipales. Este estudio comprendió el acercamiento a algunas variables que controlan el proceso de hidrólisis enzimática con pretratamiento ácido.

El estudio de tecnologías como esta para aprovechar los residuos es de gran importancia para una ciudad como Bogotá, en la que se producen grandes cantidades de residuos que deben ser dispuestos diariamente. Se abre una opción y todo un campo de estudio. Es importante resaltar que la viabilidad de la producción de bioetanol a partir de los RSD de Bogotá se ve favorecida por las políticas de manejo de residuos que tiene la ciudad. Tecnologías como esta necesitan solo una fracción de los residuos y la ciudad ya tiene los lineamientos para la separación desde la fuente, y su posterior aprovechamiento.

A partir de este estudio se puede establecer la viabilidad técnica para utilizar la fracción orgánica de los RSD de Bogotá para la producción de monosacáridos por medio de hidrólisis enzimática con pretratamiento ácido, pensando en la posterior producción de bioetanol. Los RSD utilizados comprendieron restos de comida, papel, cartón, textiles y madera. Presentaron contenidos de Lignina, celulosa y hemicelulosa de 8%, 28% y 17% respectivamente, valores que resultan similares a los reportados por otros autores para diferentes biomásas utilizadas para el mismo proceso.

Los resultados obtenidos en la presente investigación son preliminares y en ningún momento pretenden establecer las condiciones óptimas del proceso, se encontraron las mejores condiciones dentro de los rangos establecidos en el diseño experimental. Se pudo observar el comportamiento de la producción de azúcares reductores con respecto a variaciones de temperatura, concentración de ácido y tiempo de reacción en la etapa de pretratamiento de los RSD; y variaciones de tiempo de reacción y cantidad de enzima en la etapa enzimática.

En el pretratamiento se obtuvieron 0,38 g-AR/g-RSD utilizando 1,8%, 170 °C y 5 min para la concentración de H₂SO₄, temperatura y tiempo de reacción respectivamente. Se hace necesario seguir experimentando con la temperatura y la concentración de ácido ya que los resultados obtenidos no permiten asegurar que esas sean las condiciones de operación óptimas para la producción de monosacáridos. Contrario a lo que pasa con el tiempo de reacción, después de 5 minutos de reacción después de alcanzar la temperatura deseada se vio disminuida la producción de azúcares reductores.

Las mejores condiciones de operación del pretratamiento obtenidas fueron efectivas en la remoción de hemicelulosa, preparando adecuadamente la muestra para la hidrólisis enzimática. Se obtuvo una remoción de hemicelulosa del 83,5% en el pretratamiento.

Anteriormente se mencionó la necesidad de ampliar los ensayos del pretratamiento, incluyendo más variaciones de las condiciones de operación. La concentración de ácido puede ser aumentada, siempre y cuando se mantengan condiciones de ácido diluido. En cuanto a la temperatura se encontró que puede aumentar más. Adicionalmente se puede empezar a explorar el efecto de las microondas en el pretratamiento y la posterior etapa enzimática.

La hidrólisis enzimática produjo 0,07 g-AR/g-RSD con un tiempo de reacción de 0,5 días y una carga de enzimas de 1% p/p. Esta producción se vio afectada posiblemente por el consumo de los azúcares por parte de microorganismos. Es necesario que en futuras investigaciones se asegure la esterilidad del medio en el que se realiza la hidrólisis enzimática para descartar el crecimiento de microorganismos que consuman los azúcares producidos en el proceso. Se encontró que en la etapa enzimática la hemicelulosa siguió disminuyendo, por lo que se puede decir que las células de *A. niger* contribuyeron en la degradación de la hemicelulosa, completando una hidrólisis del 98% de la hemicelulosa inicial.

El complejo enzimático utilizado, puede ser combinado con otras enzimas que presenten mayor actividad frente a la celobiosa. Para esto, se considera adecuado implementar los métodos necesarios para determinar la actividad enzimática en el laboratorio, ya que en la actualidad no se encuentran implementados tales procedimientos. También se pueden variar las condiciones de pH y temperatura a las que opera la enzima.

La enzima utilizada pudo haber limitado la producción de monosacáridos provenientes de la celulosa en caso de haber sufrido inhibición. Sin embargo es necesario que en los estudios que continuarán con el tema se determine la presencia de compuestos como la celobiosa para establecer con certeza si se produce inhibición por este motivo.

El método analítico utilizado para determinar la concentración de azúcares reductores permitió obtener un resultado general, con el cual se cumplieron los objetivos propuestos. Sin embargo es necesario determinar en futuras investigaciones la composición de los monosacáridos para determinar con certeza que tipos de azúcares se están produciendo en cada etapa del proceso y determinar con mayor certeza las enzimas adecuadas para la producción de azúcares en la etapa enzimática. De la misma forma, la caracterización de los azúcares, contribuye en la escogencia de los microorganismos adecuados para el proceso de fermentación de los hidrolizados obtenidos.

En este sentido, ya se tienen algunos avances con la implementación de los métodos para determinar aldohexosas y aldopentosas. Sin embargo, la determinación de monosacáridos debe encaminarse a métodos precisos como cromatografía líquida en la medida que los recursos económicos y técnicos así lo permitan.

El espectro de acción en esta línea de investigación se amplía si se consideran otros tipos de residuos sólidos que también son susceptibles para la producción de bioetanol. Los residuos de las plazas de mercado son otro tipo de biomasa que por su naturaleza y nivel de producción sería interesante estudiar para la implementación de sistemas de aprovechamiento por hidrólisis enzimática.

También se plantea la inquietud sobre el destino de la fracción sólida remanente del proceso de hidrólisis. Continuando con el marco referencial del aprovechamiento de residuos, surge la duda con respecto a las posibilidades que el residuo final sea incorporado en otra tecnología de valorización y aprovechamiento. En este sentido, sería necesario determinar las posibilidades: tecnologías de valorización y aprovechamiento con fines energéticos vía conversión biológica y química, así como también tratamientos térmicos avanzados entre otras y determinar si el residuo presenta las características necesarias para los requerimientos del proceso.

REFERENCIAS

- Arias, Andrés. Contenido virtual. Biocombustibles en Colombia. Disponible en línea: <http://www.minagricultura.gov.co/media/55803826.pdf> 11 de Abril de 2007.
- Biffaward programme on sustainable resource use. Thermal methods of municipal waste treatment. Disponible en línea: http://www.hm-treasury.gov.uk/media/C43/44/Thermal_Methods_mass_balance.pdf. 11 de Abril de 2007.
- Chen, M. et al. 2007. Enzymatic hydrolysis of maize straw polysaccharides. Carbohydrate Polymers article in press.
- Declaración de Margarita. Construyendo la integración energética del sur. República Bolivariana de Venezuela, 2007. Página 2.
- Emmel, A., Mathias, A.L., Wypych, F. y Ramos, L.P. 2003. Fractionation of Eucalyptus grandis chips by dilute acid-catalyzed steam explosion. Bioresource Technology. 86: 105-115.
- González, Francisco. Reflexiones acerca de la relación entre los conceptos: ecosistema, cultura y desarrollo. Serie ensayos ambiente y desarrollo. Segunda EDICIÓN. IDEADE, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, 1999.
- Hu, Z. and Wen, Z. 2007. Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment, Biochem. Eng. Article in press
- Iranmahboob, J., Nadim, F., Monemi, S. 2002. Optimizing acid-hydrolysis: a critical step for production of ethanol from mixed wood chips. Biomass and Bioenergy. 22: 401-404.
- Li, C., Yoshimoto, M., Tsukuda, N., Fukunaga, K. y Nakao, K. 2004. A kinetic study on enzymatic hydrolysis of a variety of pulps for its enhancement with continuous ultrasonic irradiation. Biochemical Engineering Journal. 19 : 155–164
- Liao, W., Liu Y., Liu C. y Chen, S. 2004. Optimizing dilute acid hydrolysis of hemicellulose in a nitrogen-rich cellulosic material – Dairy manure. Bioresource Technology. 94: 33-41.
- Lloyd, T.A. y Wyman, C. E. 2005. Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. Bioresource Technology. 96: 1967-1977.
- Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 1959. 426-428.
- MAVDT-OCMCC-UPME. Plan de trabajo para el MDL. Bogotá D.C., Octubre 2002. Página 4.
- Ogier, J.C., Ballerina, D., Leygue, J.P., Rigal, L. y Pourquié, J. 1999. Production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique. Oil & Gas Science and Technology. 54 (1): 67-94.
- Palmarola-Adrados, B., Chotěborská, P., Galbe, M., Zacchi, G. 2005. Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. Bioresource Technology. 96:843-850.
- Percival Zhang, Y.H., Himmel, M.E and Mielenz, J.R 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. Review. Biotechnology Advances 2 : 452–481
- PMIRS de Bogotá, 2004. Unidad Ejecutiva de Servicios públicos.
- Roncero, M. Blanca, Torres, Antonio L., Colom, Jose F. y Vidal Teresa. 2005. The effect of xylanase on ignocellulosic components during the bleaching of wood pulp. Bioresource Technology. 96 : 21–30
- Saha, B. C., Iten, L.B., Cotta M. A., Wu, Y. V. 2005. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. Process Biochemistry. 40 : 3693–3700
- Sun, Y. y Cheng, J. 2005. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. Bioresource Technology. 96 (14): 1599-1606.
- Szczodrak, J. y Fiedurek, J. 1996. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. Biomass and Bioenergy. 10 (5-6): 367-375.
- Uniandes, 2005. Estudio de caracterización y cuantificación de los materiales potencialmente reciclables presentes en los residuos sólidos municipales generados en Bogotá D.C.
- Van Soest, P.J. 1963 use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II a rapid method of fiber and lignin. J. Assoc. Official Anal Chem. 46 (5): 829

- Van Soest, P.J. and R.H. Wine 1967 use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV the determination of plant cell wall constituents. J. Assoc. Official Anal Chem. 50: 50
- Van Soest, P.J. and R.H. Wine 1968. Determination of lignin and cellulose in acid-detergent fiber with permanganate. J. Assoc. Official Anal Chem. 51: 780
- Vlasenko, E.Y., Ding, H., Labavitch, J.M. y Shoemaker, S.P. 1997. Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw. Bioresource Technology. 59: 109-119.
- Wen, Z., Liao, W. y Chen, S. 2004. Hydrolysis of animal manure lignocellulosics for reducing sugar production. Bioresource Technology. 91: 31-39.
- Yan, Y., Li, T., Ren, Z. y Li, G. 1996. A study on catalytic hydrolysis of peat. Bioresource Technology. 57: 269-273.
- Yáñez, R., Alonso, J.L. y Parajó, J.C. 2004. Production of hemicellulosic sugars and glucose from residual corrugated cardboard. Process Biochemistry. 39: 1543-1551.

ANEXOS

Anexo 1. Procedimiento para determinar la concentración de azúcares reductores

1. Aplicabilidad

El método del ácido dinitrosalicílico permite determinar la concentración de azúcares reductores en una muestra líquida.

2. Descripción general del método

Es un método colorimétrico en el que la muestra se pone en reacción con una solución de ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS). El grupo aldehído se oxida al grupo carboxilo, mientras el ADNS se reduce a ácido 3-amino, 5-nitrosalicílico bajo condiciones alcalinas.

3. Rango

El límite de detección establecido para este procedimiento es 25 ppm de azúcares reductores como glucosa. Este límite inferior se estableció a partir de ensayos en el laboratorio para diferentes concentraciones a partir de las cuales ya no se encontró diferencia con la lectura de absorbancia de la concentración mayor inmediatamente siguiente.

El límite superior se estableció en 250 ppm a partir de ensayos a diferentes concentraciones para los cuales la lectura de la absorbancia fuera menor a 1. Sin embargo se pueden determinar concentraciones mayores a partir de diluciones que permitan que la concentración de la muestra esté dentro del rango establecido.

4. Interferencias

El oxígeno disuelto puede interferir con la oxidación de la glucosa, por lo tanto se debe adicionar sulfito (el cual no es necesario *per se* para la reacción de color) al reactivo para que absorba el oxígeno disuelto.

La equivalencia entre ácido amino-nitrosalicílico producido y azúcares no es exacta y diferentes azúcares producen diferentes intensidades de color. Esto sugiere que la química del proceso es más complicada y que se debe calibrar para cada azúcar.

Esto puede estar asociado a reacciones de descomposición de los azúcares en soluciones alcalinas. Si esto es cierto, la reacción del grupo aldehído de los azúcares con el ácido dinitrosalicílico compete con reacciones simultáneas que involucran la descomposición del azúcar.

La lectura de las muestras también se puede ver afectada por el color original de la muestra a analizar.

Cuando se desconoce el efecto de compuestos extraños, se puede incluir un estándar interno, primero desarrollando completamente el color de la muestra desconocida y luego adicionando una cantidad conocida de azúcar a la muestra. El incremento en la absorbancia en el desarrollo del color de la segunda muestra es equivalente a la cantidad de azúcar adicionada.

5. Equipos y materiales

- 5.1. Baño maría a 90°C.
- 5.2. Espectrofotómetro y celda de vidrio de 1 cm.
- 5.3. Material de vidrio como pipetas, balones volumétricos, frascos ámbar.
- 5.4. Balanza de precisión.

6. Reactivos

En la Tabla 1 se presenta la lista de reactivos a utilizar en todo el procedimiento, con sus respectivas fórmulas químicas y concentraciones en la solución.

Tabla 1. Lista de reactivos

Compuesto o elemento	Fórmula Química	Concentración
Fenol	C_6H_5OH	0.2 %
Ácido dinitrosalicílico	$C_7H_4N_2O_7$	1 %
Hidróxido de Sodio	NaOH	1 %
Sulfito de sodio	Na_2SO_3	0.05 %
Tartrato de Sodio y Potasio	$C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$	40%
Glucosa	$C_6H_{12}O_6$	Patrones

6.1. Sal de Rochelle: Mezclar el tartrato de sodio y potasio al 40% en agua desionizada en un balón volumétrico apropiado para la cantidad de solución necesaria.

6.2. Reactivo de color: Para preparar el reactivo de color mezclar todos los componentes sólidos simultáneamente con agua desionizada en el volumen necesario de la solución. No se agrega la sal rochelle. Almacenar en un frasco ámbar.

La cantidad mínima adecuada para preparar del reactivo de color es de 25 ml, alcanza para 8 muestras.

7. Estabilidad del reactivo de color

Para almacenar el reactivo es mejor prepararlo sin el sulfito de sodio y este adicionarlo en la cantidad necesaria solo en el momento de usar el reactivo.

Se hizo una prueba de estabilidad del reactivo de color en la que se determinó que la solución de ADNS dura aproximadamente 10 días si se prepara sin adicionar el sulfito de sodio y se almacena en frasco ámbar a 4 ó 5°C.

8. Manejo y almacenamiento de las muestras

El tiempo de estabilidad y condiciones de preservación de las muestras no se ha determinado, por lo que se considera que deben ser analizadas lo antes posible.

9. Proceso de la curva de calibración

Para realizar la curva de calibración se preparan patrones de glucosa entre 25 y 250 ppm:

9.1. Preparar una solución de glucosa de 1000 ppm. Para esto pesar 25 mg de glucosa y diluirlos en un balón de 25 ml.

9.2. Adicionar los volúmenes indicados en la tabla 2 a balones de 10 ml. Estos volúmenes se determinan a partir de la ecuación 1:

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2 \quad (1)$$

Donde V_1 , es el volumen a adicionar de la solución de glucosa concentrada para cada patrón; C_1 , es la concentración de esa solución; V_2 , es el volumen que se quiere preparar de cada patrón y C_2 , es la concentración a la que se quiere llegar de cada patrón.

Tabla 2. Volúmenes para la preparación de los patrones

Concentración (ppm)	Volumen de glucosa de 1000 ppm (ml)
50	0.500
100	1.000
150	1.500
200	2.000
250	2.500

9.3. Llevar los balones a su volumen total con agua desionizada.

9.4. Agite los balones para mezclar.

9.5. Realizar el procedimiento por triplicado.

9.6. Correr simultáneamente un blanco que contenga agua desionizada en lugar de azúcares reductores.

9.7 Determinar la ecuación de la calibración por el método de mínimos cuadrados a partir de los datos de absorbancia obtenidos. La variable independiente es la concentración de la solución y la variable dependiente es la absorbancia.

10. Procedimiento

10.1. Si la muestra contiene sólidos suspendidos, filtre a través de filtros de fibra de vidrio.

10.2. Desarrollo del color

- Adicionar 3 ml de reactivo a 3 ml de solución en un tubo de ensayo.
- Tapar y mezclar bien.
- Calentar por 15 min en un baño maría previamente graduado a 90°C.
- Después de desarrollar el color, adicionar 1 ml de sal rochelle al 40%.
- Tapar de nuevo y enfriar con agua hasta alcanzar temperatura ambiente.
- Leer en el espectrofotómetro a 555 nm⁸.

11. Cálculos

Ecuación de calibración:

Mediante el método de mínimos cuadrados se determina la pendiente de calibración, el intercepto y el coeficiente de correlación. Se calcula la ecuación de calibración, la cual tiene la forma de la Ecuación 2:

$$a = \frac{m}{F} \cdot AR + b \quad (2)$$

En donde: AR, es la concentración de azúcares reductores [ppm]; a, es la absorbancia; b, es el intercepto del eje y [unidades de absorbancia], F es el factor de dilución y m, es la pendiente de la recta [unidades de absorbancia/ppm].

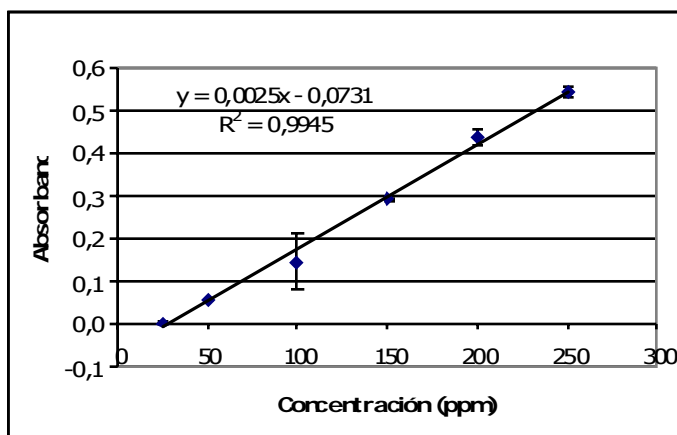


Figura 1. Curva de calibración de Azúcares Reductores

13. Bibliografía

Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 1959. 426-428.

⁸ El método original establece que la lectura en el espectrofotómetro se haga a 575 nm, durante la implementación de esta técnica se hizo la prueba de encontrar la longitud de onda para la cual se obtuviera la mayor absorbancia.

Anexo 2. Determinación de pared celular

Determinación fibra en detergente neutro (FDN)

VAN SOEST, P.J. AND R.H. WINE 1967 USE OF DETERGENTS IN THE ANALYSIS OF FIBROUS FEEDS. IV THE DETERMINATION OF PLANT CELL WALL CONSTITUTENTS. J. ASSOC. OFFICIAL ANAL CHEM. 50: 50

Los métodos desarrollados por Van Soest para cuantificar fibra utilizan detergentes en soluciones neutra y ácida. En solución neutra la muestra es tratada con sulfato lauril sódico en amortiguador de pH neutro y al residuo lo llamó fibra detergente neutro (FDN) o paredes celulares. El pH neutro disminuye particularmente las pérdidas de hemicelulosa y lignina con respecto a pH alto o bajo.

La FDN representa la matriz insoluble de la pared celular, compuestos covalentes unidos o íntimamente asociados a través de puentes de hidrógeno, cristalinidad u otra asociación intramolecular que los hace resistentes a soluciones de concentraciones fisiológicas. El reactivo DN no hidroliza la mayor parte de esas uniones. Las pectinas son eliminadas por el DN, por lo que el FDN no representa totalmente las paredes celulares de la planta, aunque sí representa un residuo de significado nutricional, ya que retiene la matriz lignificada y las estructuras físicamente insolubles que tienen efectos en el rumen y el tracto gastrointestinal de los rumiantes.

El procedimiento del detergente neutro para determinar los componentes de la pared celular es un método rápido para fibra total en alimentos fibrosos vegetales; separa los constituyentes nutricionales solubles y accesibles de aquellos que no son totalmente aprovechables o que dependen de la fermentación microbiana para su aprovechamiento. Este método no debe aplicarse a los alimentos que tienen alto contenido de proteína y bajo contenido de fibra.

Equipos y Materiales

Digestor de reflujo; utilice cualquier aparato convencional que sea adecuado para la determinación de fibra cruda.

Vasos de Berzelius de 600 mL

Crisoles de filtro de vidrio; de tipo alto y porosidad gruesa con boca de 40 mm de diámetro y capacidad de 40 a 50 mL

Molino con criba de 1 mm

Balanza analítica

Bomba de vacío

Estufa a 105°C

Desecador

Sistema de filtrado. Se puede usar un matraz Kitasato con una manguera para acomodar los crisoles y filtrar de uno en uno.

Reactivos

Reactivo	F M	Cantidad
Sulfato Lauril Sódico	$C_{12}H_{25}O_4SNa$ (PM 288.4)	30 g
EDTA: Etilenodiamino tetra acetato disódico dihidrogenado dihidratado (Titriplex III Merck 8418)	$C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2$ $2H_2O$ (PM 372.2)	18.61 g

Tetraborato de sodio decahidratado	Na ₂ B ₄ O ₇ 10H ₂ O (PM 381.4)	6.81 g
Fosfato disódico hidrogenado anhidro	Na ₂ HPO ₄	4.56 g
Hidróxido de sodio	NaOH	4.0g
Etilenglicol monoetiléter (2-etoxi etanol)		10 mL
Aqua destilada	H ₂ O	1 L
Sulfito de sodio	Na ₂ SO ₃	G.R
Etanol o Acetona libre de color y que no deje residuo al evaporarse	CH ₃ CH ₂ OH CH ₃ COCH ₃	

Reactivos solo para determinación de FDN en alimentos amiláceos		
Alfa amilasa (Sigma A 1278)		50 mL
Solución de Urea 8M	CH ₄ N ₂ O (PM 60.1)	Pesar 180.8 g, disolver en 1 litro de agua

Preparación del FDN reactivos por litro de solución:

- Agregue EDTA y el tetraborato de sodio en aproximadamente 150 mL de agua.
- En otro vaso disuelva el fosfato disódico en 20 mL de agua caliente.
- Ponga las soluciones en un frasco mayor de 1 Litro, mezcle las soluciones mientras estén calientes.
- Disuelva el Sulfato laurel sódico en 200 mL de agua y agregue por un embudo de tallo largo.
- Agregue el etilenglicol monoetiléter para evitar la espuma y el agua restante hasta 1 litro y mezcle bien.
- Deje en reposo y al día siguiente mida el pH de la solución, debe estar entre 6.9 y 7.1 si no, ajuste con NaOH o HCl
- Si la solución se almacena a temperatura inferior a 20°C se puede precipitar, pero redisolverá al someterla a calentamiento.
- Si no se tiene Titriplex III se puede sustituir por el equivalente molar del ácido etilendiaminotetraacético (14.61 g) e hidróxido de sodio (4.0 g) mezclados previamente en 15 mL de agua.

Procedimiento

- Pese 0.5 g de muestra secada a 65°C y molida a través de una criba de 1 mm, en un vaso de Berzelius.
- Agregue 100 mL de solución de detergente neutro.
- Ponga a calentar en el digestor a temperatura alta hasta que la solución hierva durante 5 a 6 minutos.
- Reduzca la temperatura para que la solución mantenga ebullición constante.
- Mantenga en reflujo durante 60 min, desde el momento en que se inicia la ebullición.
- Filtre en un crisol con filtro de vidrio de peso conocido, colóquelo en el equipo de succión al vacío, decante toda la muestra en el crisol, lave la muestra cuatro veces con 50 mL de agua caliente cada vez.
- Seguidamente lave la muestra con etanol o acetona dos veces y succione con la bomba de vacío.
- Seque los crisoles en la estufa a 105°C durante 12 h aproximadamente, enfríe en un desecador y pese.

Cálculos

Paredes celulares (%) en base parcialmente seca o tal como ofrecido:

$$\% \text{Paredes celulares} = \frac{\text{Peso del crisol} + \text{paredes celulares} - \text{peso del crisol}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

Ajuste a base seca

$$A \quad \frac{\% \text{ Paredes celulares} \times 100}{\% \text{ Materia seca tal como ofrecido}}$$

$$B \quad \frac{\% \text{ Paredes celulares en muestra parcialmente seca} \times 100}{\% \text{ Materia seca de muestra parcialmente seca}}$$

$$\% \text{ Contenido celular} = 100 - \% \text{ FDN}$$

Nota

- Use sulfito de sodio cuando el contenido de taninos es alto, coadyuva a la disolución de proteínas al atacar puentes de sulfuro, cuando se hace análisis secuencial no se debe usar, porque genera pérdidas de lignina; sin embargo, la presencia de pelo (queratinas resistentes) en muestras de heces, hace de la adición de sulfito la alternativa más adecuada.
- Lípidos: Si la muestra contiene más del 10% de lípidos necesitan ser extraídos con éteres antes de la determinación de FDN, evite el secado previo a la extracción porque se forman complejos tipo Maillard, que interfieren en la determinación posterior de FDN.
- Hay que tener precaución con los diferentes factores que intervienen como el filtrado, tamaño de partícula de la muestra, molidos muy finos o contenidos muy altos de almidón o gomas, la muestra se debe filtrar en caliente para evitar gelatinización.
- Muestras viscosas. Algunas muestras pueden contener altos niveles de pectina, mucilagos y gomas, cuando son sometidas a reflujo en presencia de DN forman geles infiltrables. Si el contenido de pectina es alto (alto calcio), se puede aumentar la concentración de EDTA en la solución DN o adicionar 2 mL de EDTA 2M monoetanolamina (pH 7.0)

Determinación fibra en detergente ácido (FDA)

VAN SOEST, P.J. 1963 USE OF DETERGENTS IN THE ANALYSIS OF FIBROUS FEEDS. II A RAPID METHOD OF FIBER AND LIGNIN. J. ASSOC. OFFICIAL ANAL. CHEM. 46 (5): 829

El método de la fibra detergente ácida determina el complejo ligno-celuloso y sílico, mediante la digestión de la muestra seca con un detergente (bromuro de cetil trimetilamonio) en un amortiguador ácido. La diferencia entre las paredes celulares (FDN) y la fibra detergente ácida (FDA) es una estimación del contenido de hemicelulosa.

El detergente elimina la proteína y otro material ácido soluble que interfiere en la determinación de lignina, pero precipita las pectinas por su pH ácido; muestras con alto contenido de pectina pueden tener valores más altos de FDA que FDN.

El residuo de FDA está conformado por celulosa, lignina, cutina y cenizas insolubles (principalmente silicio). La FDA se correlaciona con la digestibilidad de un forraje. El método de fibra detergente ácida también se emplea como paso preliminar en la determinación de la lignina.

Equipos y Materiales

El mismo para la determinación de las paredes celulares.

Reactivos

Solución ácido detergente: reactivos para un litro de solución

Reactivo	Fórmula Molecular	Cantidad
Bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB), grado técnico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Br}$ M.W. 364.46	20 g
Ácido Sulfúrico 1 N R.A (0.5 M)	49.04 g de H_2SO_4 por litro de agua ($d=1.84 \text{ g/mL}$)	27.7 mL
Agua destilada	H_2O	
Acetona		

Preparación de la solución detergente ácida

Adicione 20 gramos de CTAB en una solución de ácido sulfúrico 1N por litro de solución, agite para facilitar la disolución.

Procedimiento

- Pese 0.5 gramos de muestra molida y pasada por tamiz de 1 mm, deposítela en el vaso Berzelius.
- Agregue 100 mL de solución detergente ácido (DA) a temperatura ambiente.
- Caliente la solución para que hierva por 5-6 minutos, cuando inicie ebullición reduzca el calor para evitar la formación de espuma y mantenga el reflujo por 60 minutos contados a partir del inicio de la ebullición. La ebullición debe ser lenta durante todo el procedimiento.
- Filtre la solución a través de un crisol con filtro de vidrio, previamente tarado, utilice poca succión. Con una varilla de vidrio afloje la capa de muestra que se compacta en el fondo del crisol.
- Lave con agua hirviendo 2 veces, repita el lavado con etanol o acetona dos veces hasta que desaparezca completamente el color. Mantenga la muestra bajo succión hasta que se libere el alcohol.
- Seque a 105°C durante 12 horas, enfríe en desecador y pese.

Cálculos

Porcentaje de fibra detergente ácida en base parcialmente seca o como es ofrecido:

$$\% \text{ FDA} = \frac{(\text{Peso del crisol mas fibra}) - (\text{peso del crisol})}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

Ajuste a base seca:

$$\text{A} \quad \frac{\% \text{ FDA en la muestra tal como es ofrecido}}{\% \text{ MS en la muestra tal como es ofrecido}} \times 100$$

$$\text{B} \quad \frac{\% \text{ FDA en la muestra parcialmente seca}}{\% \text{ MS en la muestra parcialmente seca}} \times 100$$

Determinación de lignina celulosa y sílice

Se describen dos métodos para determinar lignina, en ambos casos se utiliza el residuo de la FDA. El primero es una determinación indirecta de la lignina por medio de permanganato de potasio (Van Soest & Wine 1968), este método permite la determinación de celulosa y silicio y el segundo utiliza ácido sulfúrico para la digestión (Van Soest 1963)

Determinación de lignina por medio de Permanganato de Potasio

VAN SOEST, P.J. AND R.H. WINE 1968. DETERMINATION OF LIGNINA AND CELULOSE IN ACID-DETERGENT FIBER WITH PERMANGANATE. J. ASSOC. OFFICIAL ANAL CHEM. 51: 780

Equipos y Material

Molino con criba de 1mm
 Tamiz 1mm
 Digestor de reflujo
 Vasos de Berzelius de 600 mL
 Crisoles de filtro de vidrio; de tipo alto y porosidad gruesa con paca de 40 mm de diámetro y capacidad de 40 a 50 mL
 Molino con criba de 1 mm
 Balanza analítica
 Bomba de vacío
 Estufa a 105°C
 Desecador
 Embudo
 Bandeja
 Mufla a 500°C
 Varilla de vidrio

Reactivos

SOLUCIÓN A. Permanganato de potasio

Reactivos	Fórmula	Cantidad
Permanganato de potasio	KMnO ₄	10 g
Agua destilada	H ₂ O D-D	200 mL

SOLUCIÓN B. Buffer de lignina

Reactivos	Fórmula	Cantidad
Nitrato férrico nonahidratado	Fe(NO ₃) ₃ 9 H ₂ O	12.0 g
Nitrato de plata	AgNO ₃	0.30 g
Aqua destilada	H ₂ O D-D	200 mL

SOLUCIÓN I. Solución de Permanganato combinada.

Antes de ser usada, combine y mezcle la solución de permanganato saturada (SOLUCIÓN A) con la solución amortiguadora de lignina (SOLUCIÓN B) en relación de 2:1 v/v.

SOLUCIÓN II.

Reactivos	Fórmula	Cantidad
Ácido acético glacial	C ₂ H ₄ O ₂ d= 1.02 g/mL	1000 mL

Acetato de potasio	$KC_2H_3O_2$ 1L = 0.78 Kg	10 g
Alcohol T-butílico	$(CH_3)_3COH$ M= 74.12 g/mol	800 mL

Combine y mezcle la solución I y II. La porción no utilizada de esta mezcla puede mantenerse por una semana en refrigeración en ausencia de luz. Puede utilizarse si mantiene el color morado y está libre de precipitados.

Solución desmineralizadora

Reactivos	Fórmula	Cantidad
Ácido oxálico anhidro ó ácido oxálico dihidratado	$C_2H_2O_4H_2O$ ($C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$)	50g 66.98 g
Etanol del 95%	CH_3CH_2OH	700 mL
Ácido clorhídrico concentrado	HCl	50 mL
Aqua destilada	H_2O D-D	250 mL

Preparación

Para cada litro de solución, disuelva los 50 gramos de ácido oxálico anhidro en 700 mL del alcohol etílico del 95%. Agregue 50 mL de HCl concentrado y 250 mL de agua destilada, mezcle.

Etanol del 80%

Ácido bromhídrico

Acetona

Determinaciones:

De lignina

- Utilice el residuo de la determinación de fibra detergente ácido (FDA) aplicando el peso original de la muestra.
- Prepare la fibra detergente ácido por uno de los procedimientos descritos.
- Coloque los crisoles que contienen la fibra detergente ácido en una bandeja de vidrio o peltre de poca profundidad que contenga una capa de 2-3 cm de altura de agua fría. La fibra dentro de los crisoles no debe mojarse.
- Agregue a los crisoles aproximadamente 25 mL de la solución combinada de permanganato de potasio sin llenarlos demasiado. Ajuste el nivel de agua en la bandeja a manera de reducir la corriente de paso de la solución a través de los crisoles.
- Coloque una varilla de vidrio, corta, en cada crisol para mezclar su contenido; deshaga los grumos y bañe con la solución de permanganato todas las partículas que se adhieren a las paredes internas del crisol.
- Deje los crisoles 90 ± 10 minutos a temperatura de 20 a $25^\circ C$ agregando, si fuera necesario una cantidad adicional de la solución combinada de permanganato. El color morado se debe conservar constantemente.
- Lleve los crisoles al matraz de filtración. Espere a que se decanten las partículas grandes y haga el vacío.
- Coloque los crisoles en bandejas de vidrio o porcelana limpias, llénelos hasta la mitad con la solución desmineralizadora, transcurridos 5 minutos filtre la porción líquida remanente y llene de nuevo hasta la mitad con la misma solución. Evite el derrame por la producción de espuma. Repita la adición de solución desmineralizadora por tercera vez si nota que el filtrado es color café oscuro.
- Lave las paredes internas de los crisoles con una corriente fina de solución desmineralizadora, hasta que el color de la fibra sea blanco, el tiempo en este paso es de 20-30 minutos.
- Llene y lave el contenido de los crisoles con alcohol etílico del 80%, filtre y repita por dos veces más.
- Lave y filtre la muestra con acetona.
- Seque los crisoles durante 12 horas a $105^\circ C$, deje enfriar en un desecador y pese. El contenido de lignina se calcula sobre la base de la pérdida en peso original de la fibra obtenido por el método FDA.

Cálculos

$$\% \text{Lignina} = \frac{\text{Residuo FDA} - \text{residuo permanganato}}{\text{peso de la muestra}} \times 100$$

De celulosa

Incinere en crisoles a 500°C durante 3 horas, la muestra procedente de la determinación de lignina, enfríe en un desecador y pese.

Cálculos

$$\% \text{celulosa} = \frac{\text{Residuo permanganato} - \text{residuo incineración}}{\text{peso de la muestra}} \times 100$$

De Sílice

Lave las cenizas residuales del análisis de celulosa con ácido bromhídrico concentrado hasta que desaparezca todo el color, lave con acetona y filtre. Incinere a 500°C por 3 horas, enfríe en desecador y pese.

$$\% \text{ sílice} = \frac{(\text{peso crisol} + \text{residuo incineración}) - \text{peso del crisol}}{\text{peso de la muestra}} \times 100$$

Anexo 3. Procedimiento para extraer azúcares de la fase sólida

1. Aplicabilidad

El método de hidrólisis con ácido sulfúrico permite extraer los azúcares de la matriz sólida.

2. Descripción general del método

Es un método de hidrólisis con ácido sulfúrico a diferentes concentraciones que actúan sobre la matriz sólida y liberan los azúcares para su posterior determinación por otro procedimiento (v.g espectrofotometría, HPLC).

3. Equipos y materiales

- 3.1. Equipo Soxhlet
- 3.2. Plancha de calentamiento con agitación
- 3.3. Material de vidrio como tubos de ensayo, probetas, pipetas, balones volumétricos, embudo pequeño, tubos cónicos, frascos ámbar
- 3.4. Hielo
- 3.5. Termómetro
- 3.6. Papel filtro de fibra de vidrio
- 3.7. Ultrasonido
- 3.8. Centrífuga
- 3.9. Balanza de precisión

4. Reactivos

En la Tabla 1 se presenta la lista de reactivos a utilizar en todo el procedimiento, con sus respectivas fórmulas químicas y concentraciones en la solución.

Tabla 1. Lista de reactivos

Compuesto o elemento	Fórmula Química	Cantidad
Alcohol Etilico	C_2H_5OH	50 ml
Benceno	C_6H_6	100 ml
Ácido Sulfúrico concentrado	H_2SO_4	0,5 ml
Carbonato de Sodio	Na_2CO_3	2 ml
Nitrógeno	N_2	
Metanol	CH_3OH	1 ml
Aqua destilada	H_2O	6,8 ml

5. Preparación de las muestras

Secar la muestra a 65°C. Moler la muestra para obtener tamaño de partículas de 1mm (criba Nº 30).

6. Procedimiento

6.1. Extracción en Alcohol-Benceno. Se realiza una extracción de la muestra con una mezcla de alcohol etílico-benceno para eliminar los extractivos presentes (ceras, grasas, resinas, aceites, colorantes orgánicos –clorofila-, taninos y gomas).

- a. En un dedal de extracción adicionar 2 g de muestra.
- b. En el matraz del extractor adicionar 150 ml de mezcla alcohol etílico-benceno (1:2).
- c. Realizar el montaje del equipo de extracción soxhlet y dejar la muestra por 5 horas.
- d. Poner a secar la muestra. Se filtró al vacío y se dejó pasar N₂ para acelerar el secado. Después se metió al horno durante 30 min.

6.2. Prehidrólisis con ácido sulfúrico concentrado

- a. Introducir aproximadamente 50 mg de muestra problema en un tubo de ensayo.
- b. Impregnar la muestra totalmente con 0,5ml de ácido sulfúrico al 72%.
- c. Colocar en agitación suave durante cuatro horas a temperatura ambiente.

6.3. Hidrólisis final con ácido sulfúrico diluido

- a. Adicionar 6,8 ml de agua destilada al tubo de ensayo para obtener una solución de H₂SO₄ al 0,5M. Realizar la adición en un baño de hielo con agitación continua para minimizar el choque térmico.
- b. Llevar a digestión a 105-110°C durante 4 horas en un baño de aceite.
- c. Filtrar con un papel de fibra de vidrio para eliminar la lignina insoluble en ácido sulfúrico.
- d. Recupera el filtrado y llevarlo a un volumen conocido con agua destilada (balón aforado de 10 ml).

6.4. Neutralización de la muestra

- a. Recuperar una alícuota de 0,5ml de la muestra filtrada en un tubo cónico.
- b. Adicionar en pequeñas cantidades carbonato sódico (Na₂CO₃) hasta que cese el burbujeo. La muestra cambia de color.
- c. Evaporar todo el líquido con Nitrógeno (N₂).
- d. Disolver con 1 ml de metanol y colocar en el ultrasonido por 5 min.
- e. Separar el sobrenadante en un tubo cónico de plástico.
- f. Centrifugar la muestra por 10 min.
- g. Separar el sobrenadante en un tubo cónico de vidrio.
- h. Evaporar el líquido con Nitrógeno (N₂).
- i. Redisolver con agua destilada y llevar a un volumen conocido. (balón de 10ml).

7. Bibliografía

Roncero, M. Blanca, Torres, Antonio L., Colom, Jose F. y Vidal Teresa. 2005. The effect of xylanase on lignocellulosic components during the bleaching of wood pulp. *Bioresource Technology*. 96 : 21–30

Anexo 4. Procedimiento para determinar la concentración de aldohexosas

1. Aplicabilidad

El método del o-aminodifenilo permite determinar la concentración de aldohexosas en una muestra líquida.

2. Descripción general del método

En la determinación de aldohexosas se usa el o-aminodifenilo para formar una mezcla en equilibrio de una glucosamina y la correspondiente base Schiff, con lo cual se evita la interferencia de cetohehexosas en forma libre o fosforilada.

3. Rango

El límite de detección establecido para este procedimiento es 25 ppm de aldohexosas como glucosa. Este límite inferior se estableció a partir de ensayos en el laboratorio para diferentes concentraciones a partir de la estimación con el estadístico t de student como recomienda el Standard Methods.

El límite superior se estableció en 500 ppm a partir de la recomendación del procedimiento original. Sin embargo se pueden determinar concentraciones mayores a partir de diluciones que permitan que la concentración de la muestra esté dentro del rango establecido.

4. Interferencias

La lectura de las aldohexosas también se puede ver afectada por el color original de la muestra a analizar.

5. Equipos y materiales

- 5.1. Baño de agua hirviendo fuertemente.
- 5.2. Espectrofotómetro y su celda de 1 cm de cuarzo.
- 5.3. Material de vidrio como pipetas, balones volumétricos, frascos ámbar
- 5.4. Balanza de precisión.

6. Reactivos

En la Tabla 1 se presenta la lista de reactivos a utilizar en todo el procedimiento, con sus respectivas fórmulas químicas y concentraciones en la solución.

Tabla 1. Lista de reactivos

Compuesto o elemento	Fórmula Química	Concentración
<i>o</i> -aminodifenilo	HCl	4 %
Ácido acético glacial	C ₂ H ₄ O ₂	Necesario
Glucosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	Patrón

6.1. Reactivo de color:

a. Preparar la solución de *o*-aminodifenilo al 4% en ácido acético glacial justo antes de realizar en ensayo, ya que la solución no es estable.

7. Estabilidad del reactivo de color

El reactivo de color es inestable, por lo que se debe preparar cada día antes de su uso.

8. Manejo y almacenamiento de las muestras

El tiempo de estabilidad y condiciones de preservación de las muestras no se ha determinado, por lo que se considera que deben ser analizadas lo antes posible.

9. Proceso de la curva de calibración

Para realizar la curva de calibración por triplicado se preparan patrones de una aldohexosa (puede ser glucosa) entre 10 y 500 ppm:

9.1. Preparar una solución de glucosa de 100 ppm. Para esto pesar 25 mg de glucosa y diluirlo en un balón de 25 ml.

9.2. Adicionar los volúmenes indicados en la tabla 2 a balones de 10 ml. Estos volúmenes se determinan a partir de la ecuación 1:

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2 \quad (1)$$

Donde V_1 , es el volumen a adicionar de la solución de glucosa concentrada para cada patrón; C_1 , es la concentración de esa solución; V_2 , es el volumen que se quiere preparar de cada patrón y C_2 , es la concentración a la que se quiere llegar de cada patrón.

Tabla 2. Volúmenes para la preparación de los patrones

Concentración (ppm)	Volumen de glucosa de 100 ppm (ml)
10	0.10
108	1.08
206	2.06
304	3.04
402	4.02
500	5.00

- 9.3. Llevar los balones a su volumen total con agua desionizada.
- 9.4. Agite los balones para mezclar.
- 9.5. Realizar el procedimiento por triplicado.
- 9.6. Correr simultáneamente un blanco que contenga agua desionizada en lugar de hexosas.
- 9.7 Determinar la ecuación de la calibración por el método de mínimos cuadrados a partir de los datos de absorbancia obtenidos. La variable independiente es la concentración de la solución y la variable dependiente es la absorbancia.

10. Procedimiento

- 10.1. Si la muestra contiene sólidos suspendidos, filtre a través de filtros de fibra de vidrio.
- 10.2. Desarrollo del color
 - a. Se adicionan 5 ml de reactivo a 1 ml de solución en un tubo de ensayo.
 - b. Se lleva a un baño de agua hirviendo, después de 1 minuto se tapa.
 - c. Se continúa calentando por 45 min en un baño de agua hirviendo vigorosa- mente.
 - d. Después de desarrollar el color, enfriar con agua hasta alcanzar temperatura ambiente.
 - f. Determinar la densidad óptica de las muestras a 380 nm inmediatamente después de alcanzar la temperatura ambiente.

11. Cálculos

Ecuación de calibración:

Mediante el método de mínimos cuadrados se determina la pendiente de calibración, el intercepto y el coeficiente de correlación. Se calcula la ecuación de calibración, la cual tiene la forma de la Ecuación 2:

$$AP = (a - b) \cdot \frac{F}{m} \quad (2)$$

En donde: AP, es la concentración de Aldohexosas como glucosa [ppm]; a, es la absorbancia; b, es el intercepto del eje y [unidades de absorbancia], F es el factor de dilución y m, es la pendiente de la recta [unidades de absorbancia/ppm]; y.

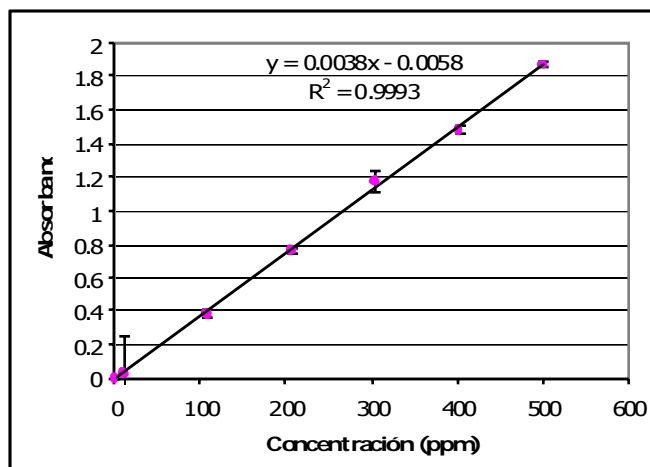


Figura 1. Curva de calibración de aldohexosas

12. Observaciones

Para este procedimiento se utilizó como referencia a Ashwell (1966), en su artículo menciona que el o-aminodifenilo necesita ser recristalizado dos veces y luego ser pasado por carbón activado para retirar impurezas de color. Pero no especifica como se hizo el procedimiento de recristalización. Debido a la limitada disponibilidad de este químico en el proyecto, no se pudieron hacer las suficientes pruebas de la recristalización. En las dos que se hicieron, el o-aminodifenilo se disolvía a temperatura ambiente en el etanol y cuando se sometió a calentamiento el compuesto no se pudo recuperar como cristales, ya que quedó pegado al envase. Por lo anterior, no se hizo recristalización del químico antes de usarlo y tampoco se pasó por carbón activado. Debido a que el químico utilizado tiene un alto grado de pureza se considera que el procedimiento es adecuado.

En cuanto a la prueba de transmitancia que plantea Ashwell, los resultados obtenidos son menores al límite que se sugiere en la referencia como óptimo, pero ante la ausencia en el procedimiento original sobre qué pasos seguir en este caso, el reactivo se utilizó así y la curva de calibración, como se puede ver en el anexo presenta una linealidad adecuada. La curva de calibración se obtuvo a partir de un ensayo por duplicado.

13. Bibliografía

Ashwell, G. Determination of Aldohexoses. *Methods Enzymol.* 1966. 87-88.

Anexo 5. Procedimiento para determinar la concentración de aldopentosas

1. Aplicabilidad

El método del floroglucinol permite determinar la concentración de aldopentosas en una muestra líquida.

2. Descripción general del método

Es un método colorimétrico para determinar aldopentosas a partir de la reacción de floroglucinol, la cual no se ve afectada por cetopentosas, hexosas y heptosas.

3. Rango

El límite de detección establecido para este procedimiento es 7 ppm de aldopentosas como arabinosa. Este límite inferior se estableció a partir de ensayos en el laboratorio para diferentes concentraciones a partir de la estimación con el estadístico t de student como recomienda Standard Methods.

El límite superior se estableció en 100 ppm a partir de la recomendación del procedimiento original. Sin embargo se pueden determinar concentraciones mayores a partir de diluciones que permitan que la concentración de la muestra esté dentro del rango establecido.

4. Interferencias

Se debe adicionar glucosa en el reactivo para estabilizar color y minimizar reacciones de interferencia

Cuando se tienen muestras complejas es recomendable incluir un estándar interno para compensar posibles disminuciones en la producción del color.

La lectura de las aldopentosas también se puede ver afectada por el color original de la muestra a analizar.

5. Equipos y materiales

- 5.1. Baño de agua hirviendo fuertemente.
- 5.2. Espectrofotómetro y su celda de 1 cm de vidrio.
- 5.3. Material de vidrio como pipetas, balones volumétricos, frascos ámbar.
- 5.4. Balanza de precisión.

6. Reactivos

En la Tabla 1 se presenta la lista de reactivos a utilizar en todo el procedimiento, con sus respectivas fórmulas químicas y concentraciones en la solución.

Tabla 1. Lista de reactivos

Compuesto o elemento	Fórmula Química	Cantidad
Ácido acético glacial	$C_2H_4O_2$	110 ml
Ácido clorhídrico concentrado	HCl	2 ml
Glucosa al 0,8%	$C_6H_{12}O_6$	1 ml
Floroglucinol al 5% en etanol	$C_6H_6O_6$	5 ml
Arabinosa	$C_5H_{10}O_5$	Patrón

6.1. Preparar la solución de glucosa al 0,8% p/v.

6.2. Reactivo de color:

- Adicionar los reactivos en el orden de la tabla 1, a excepción de la arabinosa.
- Preparar la solución floroglucinol en etanol de últimas y adicionar a la mezcla anterior.

7. Estabilidad del reactivo de color

El reactivo de color es inestable, por lo que se debe preparar cada día antes de su uso.

8. Manejo y almacenamiento de las muestras

El tiempo de estabilidad y condiciones de preservación de las muestras no se ha determinado, por lo que se considera que deben ser analizadas lo antes posible.

9. Proceso de la curva de calibración

Para realizar la curva de calibración por triplicado se preparan patrones de una aldopentosa (puede ser arabinosa) entre 10 y 100 ppm:

9.1. Preparar una solución de arabinosa de 200 ppm. Para esto pesar 1 mg de arabinosa y diluirlo en un balón de 5 ml.

9.2. Adicionar los volúmenes indicados en la tabla 2 a balones de 1 ml. Estos volúmenes se determinan a partir de la ecuación 1:

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2 \quad (1)$$

Donde V_1 , es el volumen a adicionar de la solución de arabinosa concentrada para cada patrón; C_1 , es la concentración de esa solución; V_2 , es el volumen que se quiere preparar de cada patrón y C_2 , es la concentración a la que se quiere llegar de cada patrón.

Tabla 2. Volúmenes para la preparación de los patrones

Concentración (ppm)	Volumen de arabinosa de 200 ppm (ml)
10	0,050
28	0,140
46	0,230
64	0,320
82	0,410
100	0,500

- 9.3. Llevar los balones a su volumen total con agua desionizada.
 9.4. Agite los balones para mezclar.
 9.5. Realizar el procedimiento por triplicado.
 9.6. Correr simultáneamente un blanco que contenga agua desionizada en lugar de pentosas.
 9.7. Determinar la ecuación de la calibración por el método de mínimos cuadrados a partir de los datos de absorbancia obtenidos. La variable independiente es la concentración de la solución y la variable dependiente es la absorbancia.

10. Procedimiento

- 10.1. Si la muestra contiene sólidos suspendidos, filtre a través de filtros de fibra de vidrio.
 10.2. Desarrollo del color
 a. Adicionar 5 ml de reactivo a 0,4 ml de solución en un tubo de ensayo.
 b. Tapar y agitar bien.
 c. Calentar por 15 min en un baño de agua hirviendo vigorosamente.
 d. Después de desarrollar el color, enfriar con agua hasta alcanzar temperatura ambiente.
 f. Determinar la densidad óptica de las muestras a 552 y 510 nm inmediatamente después de alcanzar la temperatura ambiente.
 g. La diferencia de $D_{552} - D_{510}$ es proporcional a la concentración dentro del rango de la curva de calibración.

11. Cálculos

Ecuación de calibración:

Mediante el método de mínimos cuadrados se determina la pendiente de calibración, el intercepto y el coeficiente de correlación. Se calcula la ecuación de calibración, la cual tiene la forma de la Ecuación 2:

$$AP = (a - b) \cdot \frac{F}{m} \quad (2)$$

En donde: AP, es la concentración de Aldopentosas como arabinosa [ppm]; a, es la absorbancia; b, es el intercepto del eje y [unidades de absorbancia], F es el factor de dilución y m, es la pendiente de la recta [unidades de absorbancia/ppm]; y.

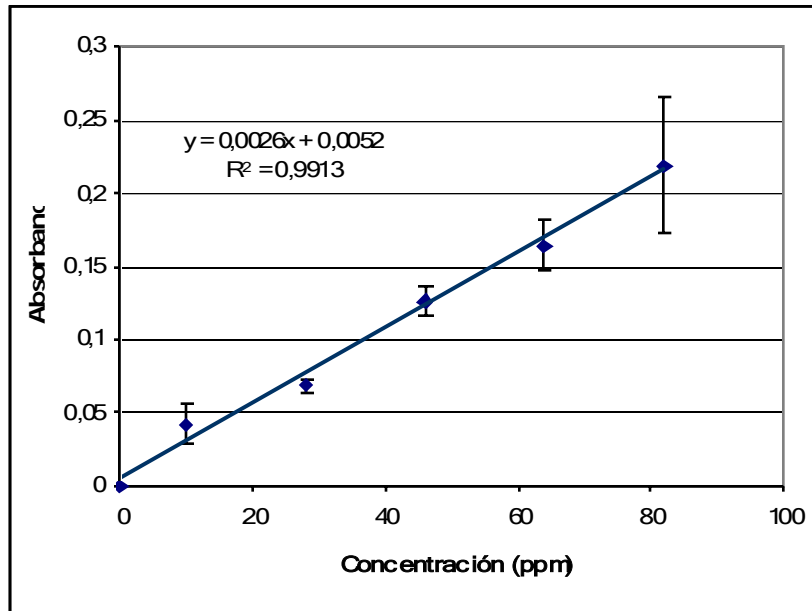


Figura 1. Curva de Calibración de aldopentosas

13. Bibliografía

Ashwell, G. Determination of Aldopentoses. Methods Enzymol. 1966. 86- 87.

Anexo 6. Resumen de las condiciones de operación de varios ensayos de hidrólisis ácida diluida

Materia prima	Etapa	Rango del experimento			Condiciones óptimas			Producción máxima (g/l)			Subproductos		Autor
		T (°C)	t (min)	Conc H ₂ SO ₄ (%p/p)	T (°C)	t (min)	Conc H ₂ SO ₄ (%p/p)	Xilosa	Arabinosa	Glucosa	Furfural	HMF	
Paja brava	1	170-230	3-10	0.5-2	190	5	0.5p/p agua	1,3	1,3	1,1	0.02 g/g	ND	Sanchez et al. 2004
	2	230	10	0,5	230	10	0.5p/p agua	2,2	0,4	6,1	0.07 g/g	0.007 g/g	
Corteza árbol	1	185;190	120-240	1,1	190	150	1,1			3,2			Kim et al. 2005
	2	210		2,5	210	115	2,5	2,8		13,6			
Res. Panadería	1	122-132	10-140	2, 4, 6	132	40	2	ND		72,8			Choi et al. 1996 ¹
Wood chips								26,61		2,59			
Res. Panadería	2	122	10-120	5-15	132	70	15	ND		6,56			
Wood chips		132	30-240					6,57		9,92			
Salvado de trigo		110-180	10-50	1-4	130; 120	10; 20	2	31	17	2	6.27 ² g/l	0.2 ² g/l	Chotěborská et al. 2004
					130	40	1						
Estiércol animal		105; 120; 135	30-180	1-5	135	1200	1	70% ³	10% ³		ND	ND	Liao et al. 2004
Salvado de trigo		110-180	10-50	1-4	130	40	1	31,3	17	1,8	<0.1g/l	<0.1g/l	Palmarola et al. 2005
Paja de centeno y pasto		121	30-90	0.6 - 1.5	121	>60	>1.2			46-81%			Sun y Cheng 2005
Abeto ⁴		150-240	1-30	0.5-2.4	180	1	4,4	10,2	2,6	11,9	3.75g/l ⁵	6g/l ⁵	Larsson et al. 1999
					210	1	4,4	3,8		35,9			

¹ Las producciones máximas están en unidades de g/100g muestra.

² La mayor concentración que obtienen a 180°C, 10 min y 2% de ácido.

³ Es el porcentaje con respecto a los azúcares totales en solución.

⁴ se obtiene una cantidad importante de manosa, 22.4 g/l.

⁵ La mayor concentración que obtienen a 180°C por 30 min con H₂SO₄ al 2.4% y a 210°C por 20 min con H₂SO₄ al 0.5%.

Fuente: Camelo, 2006

Anexo 7. Resumen de las condiciones de operación de varios ensayos de hidrólisis enzimática con pretratamiento ácido

Enzimas	Actividad	Carga sustrato	pH	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Mezcla (rpm)	Biomasa	Producción de glucosa	Referencia
Celluclast 1.5L	80 FPU/ml	5%	5,0	50	72	S.I	Salvado de trigo	80% ³	Palmarola-Adrados et al. 2004
E.C. 3.2.1.4*	1.08 FPU/mg	5%	4,8	50	48	100	Paja de centeno	81%	Sun & Cheng, 2005
Novozyme 188	321 CBU/ml						Pasto	52%	
Celluclast*	S.I	30g líq. /g sól	4,85	48,5	48	150	Cartón corrugado	63,6%	Yáñez et al. 2004
Novozym ^{ns}	S.I								
Celluclast 1.5L	650 FPU/ l celulasa	50 g m.s./l	4,8	46	96	175	Estiércol animal	40%	Wen et al. 2004
Novozyme 188	250 IU/l β-gluc ⁿ								
Spezyme CP	60 FPU/ g de glucan	1g m.s /100 ml	4,8	50	72	150	Rastrojo de maíz	93%	Lloyd et al. 2005
Novozyme 188	120 CBU/g de glucan								
Celullase 100L	6.7 FPU/g	50 g m.s./l	5,0	50	72	S.I	Cascarilla de arroz	56,5%	Vlasenko et al. 1997
Novozyme 188	6.7 CBU/g								

³Producción de azúcares totales

S.I: Sin información

* Celulasa de *T. reesei*

^{ns}β-glucosidasa de *A. niger*

ⁿIU: Unidades Internacionales, por sus siglas en inglés. 1 IU corresponde a 1 μmol de enlaces β-1,4 glucosídicos hidrolizados en 1 min

Fuente: Camelo, 2006