



## Artículo

# **Pretratamiento de residuos de plátano (*Musa paradisiaca* (L.) AAB) y arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) para la obtención de azúcares fermentables**

Pretreatment of residues from plantain (*Musa paradisiaca* (L.) AAB) and arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) for obtaining fermentable sugars

Darwin **Carranza Saavedra\***, Jorge Andrés **Alvarado Núñez**, Daniel Alexander **Méndez Reyes**,  
Claudia Patricia **Valenzuela Real**, José Fernando **Solanilla Duque**

Universidad del Tolima, Facultad de Ingeniería Agronómica. Barrio Santa Elena, parte alta,  
Ibagué, Tolima, Colombia.

\* Autor para correspondencia: [adarwin05@gmail.com](mailto:adarwin05@gmail.com) C. P. 730006299. Tel.: 0057-3202754036.

Aceptado 23-Agosto-2015

## **Resumen**

El raquis de plátano *Musa paradisiaca* L. (AAB) y el tallo cilíndrico corto (cepa) que posee la arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) son los principales residuos generados durante el manejo poscosecha en la región del Tolima (Colombia). Muestras secas fueron sometidas a hidrólisis térmica a presiones de 0,1034 MPa (100,55 °C); 0,2068 MPa (121,28 °C) y 0,4137 MPa (144,83 °C) de vapor saturado; a hidrólisis con ácido sulfúrico en concentraciones de 0,25; 0,50 y 1,00 M con calentamiento durante 1 y 2 horas; y por último se sacarificó con empleo de enzimas celulasas (Celluclast® 1.5 L) a concentraciones de 7,5; 15,0 y 30,0 FPU/g. Los mejores rendimientos de carbohidratos reductores se obtuvieron al tratar el raquis y la cepa con ácido sulfúrico a concentración de 1,00 M por 1 hora de tiempo residencia. La torta resultante del proceso de filtración se hidrolizó enzimáticamente arrojando altas cantidades de obtención de azúcares fermentables en todo el proceso de 0,7734 g/g a partir del raquis (30 FPU/g) y 0,7679 g/g a partir de la cepa (15 FPU/g). Los residuos agrícolas de plátano y arracacha pueden ser utilizados en la generación de azúcares fermentables.

**Palabras claves:** *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft, carbohidratos reductores, cepa, hidrólisis, *Musa paradisiaca* L., raquis, residuos poscosecha.

### Abstract

Rachis of plantain *Musa paradisiaca* L. (AAB) and short cylindrical stem (cepa) of arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.) were chosen for being a significant waste generated during postharvest in Tolima's region (Colombia). The dried samples were subjected to thermal hydrolysis with pressures at 0.1034 MPa (100.55 °C), 0.2068 MPa (121.28 °C) and 0.4137 MPa (144.83 °C) applying saturated steam; hydrolysis with sulfuric acid in concentrations at 0.25, 0.50 and 1.00 M for one and two hours, and finally, the samples were saccharified utilizing cellulases enzymes (Celluclast® 1.5 L) with concentrations at 7.5, 15.0 and 30.0 FPU/g. The best treatment to obtain reduced carbohydrates was sulfuric acid at 1.00 M with one hour of residence time, showing the highest yields in rachis and cepa. Resulting cake of filtration process, was enzymatically hydrolyzed, showing high amounts of fermentable sugars in the whole process with yield values of 0.7734 g/g and 0.7679 g/g for rachis (30 FPU/g) and cepa (15 FPU/g), respectively. The agricultural residues from plantain and arracacha could be employed as resource to obtain fermentable sugars.

**Keywords:** *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft, reducing carbohydrates, hydrolysis, *Musa paradisiaca* L., post-harvest wastes, rachis, rootstock.

### INTRODUCCIÓN

Colombia es considerada por su actividad económica un país predominantemente agropecuario que ofrece altos volúmenes de producto fresco, entre los que se encuentra el plátano (*Musa paradisiaca* L. grupo AAB) y la arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft), los cuales han mostrado cantidades significativamente altas de producción; para el año 2013 de 3.177.789 y 73.124 toneladas para plátano y arracacha, respectivamente (MinAgricultura, 2014). Uno de los principales problemas que genera el manejo, comercialización y agroindustrialización de estos productos agrícolas a nivel nacional y local son los altos volúmenes de producto de rechazo y residuos sólidos que se generan durante las diversas etapas que hacen parte de la actividad productiva durante los períodos de precosecha y cosecha, utilizados principalmente como compostaje en el cultivo; por otra parte, la falta de maduración de los residuos genera compuestos fenólicos, de amonio y ácidos orgánicos de bajo peso molecular que inhiben

la germinación de las semillas en el cultivo proporcionando bajos rendimientos de producción (Wu *et al.*, 2000; Rawat y Suthar, 2014; Paredes *et al.*, 2015), y al mismo tiempo problemas ambientales resultantes de las emisiones de óxido nitroso, monóxido de carbono, entre otros compuestos que contribuyen al efecto invernadero (Lou y Nair, 2009).

A nivel mundial, los materiales orgánicos provenientes de los procesos de cosecha y poscosecha son considerados como una fuente alternativa para la producción de productos naturales como el bioetanol, que para su generación a partir de residuos orgánicos, es llevado a cabo un conjunto de reacciones químicas para la transformación de carbohidratos fermentables a moléculas de etanol. En este orden de ideas, el raquis de plátano como residuo agrícola puede ser materia prima con potencial para la producción de bioetanol a partir de esta, principalmente por tener material lignocelulósico y composiciones químicas con considerables proporciones de fibras y carbohidratos (Oliveira *et al.*, 2007; Mazzeo-Meneses *et al.*, 2010), que pueden ser

pretratados para incrementar la producción de azúcares fermentables en procesos de fabricación de bioetanol (Velásquez-Arredondo *et al.*, 2010). Lo anterior aplicaría para la cepa de arracacha.

La conversión de material orgánico con altos porcentajes de hemicelulosa y celulosa a azúcares simples, requiere de pretratamientos con el fin de romper las cadenas largas de glucosa, lo que optimiza las etapas posteriores de sacarificación en la producción de carbohidratos reductores para el adecuado proceso de fermentación (Badger, 2002). Por consiguiente, las diversas maneras de convertir estas grandes moléculas de carbohidratos a azúcares simples, incluyen en primera instancia el secado del material acompañado de un tratamiento mecánico para reducir el tamaño de partícula (10,0 - 0,2 mm) y a su vez la cristalinidad del material celulósico, lo que mejora la digestibilidad de la biomasa en los pasos posteriores de tratamiento (Millett *et al.*, 1976); asimismo, el uso del vapor con catalizadores ácidos o básicos (dióxido de azufre, dióxido de carbono o amoníaco), es conocido por facilitar el fraccionamiento del material y conversión en compuestos arabinosilados de más del 50 % (Pezoa-Conte, 2010). La explosión de vapor, es uno de los métodos más usados para tratar materiales lignocelulósicos, donde el cambio súbito de las condiciones termodinámicas incrementa la degradación de la hemicelulosa y lignina (Kaar *et al.*, 1998), que es igualmente influenciada por otros factores en la hidrólisis, como el tiempo de residencia y contenido de humedad (Duff y Murray, 1996). Negro *et al.* (2003) y Chen *et al.* (2011) trataron, respectivamente, madera de pino y pajas de arroz, y concluyeron que es necesario un pretratamiento como la hidrólisis enzimática para obtener alta efectividad. Uno de los pretratamientos más económicos es tratar la muestra con agua caliente, ya que no requieren procesos posteriores de neutralización de pH por procesos de hidrólisis ácidos; así, la fibra

resultante carece de almidón y la celulosa es totalmente digerible en 24 h con cargas de enzima de 20 FPU/g; una de sus dificultades es que requiere de presiones muy altas para lograr rendimientos de azúcar de hasta 96 %, además, este proceso a partir de la hemicelulosa resulta en bajas concentraciones de azúcares (0,6-5,8 g/L) (Mosier *et al.*, 2005). En la mayoría de los procesos con pretratamiento químico se ha utilizado ácidos (hidrólisis ácida), siendo uno de los más representativos para el tratamiento de material celulósico. El ácido puede usarse concentrado o diluido, los más utilizados para tratar materiales lignocelulósicos son ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y ácido clorhídrico (HCl). Aunque son poderosos agentes de hidrólisis de la celulosa, los ácidos concentrados son tóxicos, corrosivos y peligrosos, obligando a las industrias procesadoras tener condiciones y materiales que resistan la corrosión; por otro lado, no todos los materiales lignocelulósicos se hidrolizan fácilmente, se requiere además de hidrólisis alcalina; asimismo, algunas bases también se pueden utilizar para el tratamiento previo de materiales lignocelulósicos siendo eficaces sobre el contenido de lignina en la biomasa (Sun y Cheng, 2002), debido principalmente a que los hidróxidos en una solución causan el rompimiento de enlaces entre la lignina, hemicelulosa y celulosa, disminuyendo el grado de polimerización y cristalinidad, lo que provoca la interrupción y ruptura de la estructura de la lignina (Taherzadeh y Karimi, 2008).

En la sacarificación posterior a los pretratamientos, se suele usar hongos o enzimas. Los organismos fúngicos tienen por objetivo destruir toda la pared de la lignina y hemicelulosa dejando libre la celulosa para tratarla posteriormente con enzimas; entre los hongos que hidrolizan la madera están los de pudrición marrón, blanca y blanda (Tomme *et al.*, 1995). En la hidrólisis enzimática se usan proteínas extraídas de diversos organismos como hongos u órganos de animales, con función específica según los enlaces a

hidrolizar. La celulosa se hidroliza con la enzima celulasa que rompe los enlaces de glucosa  $\beta$ -1,4 liberando azúcares monoméricos que pueden ser usados en la fermentación, del mismo modo el almidón se hidroliza con la enzima  $\alpha$ -amilasa que rompen los enlaces  $\alpha$ -1,4 pero no alcanza a romper los enlaces  $\alpha$ -1,6 de glucosa del almidón dejando disacáridos no fermentables, requiriéndose una hidrólisis posterior sea con glucoamilasa o un pretratamiento fisicoquímico (Pérez *et al.*, 2002; Castro *et al.*, 2011).

El objetivo de este trabajo de investigación fue estudiar la obtención de carbohidratos reductores a partir de raquis de plátano (*Musa paradisiaca* L.) y cepa de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft), a fin de establecer su viabilidad en la producción de productos naturales como el etanol.

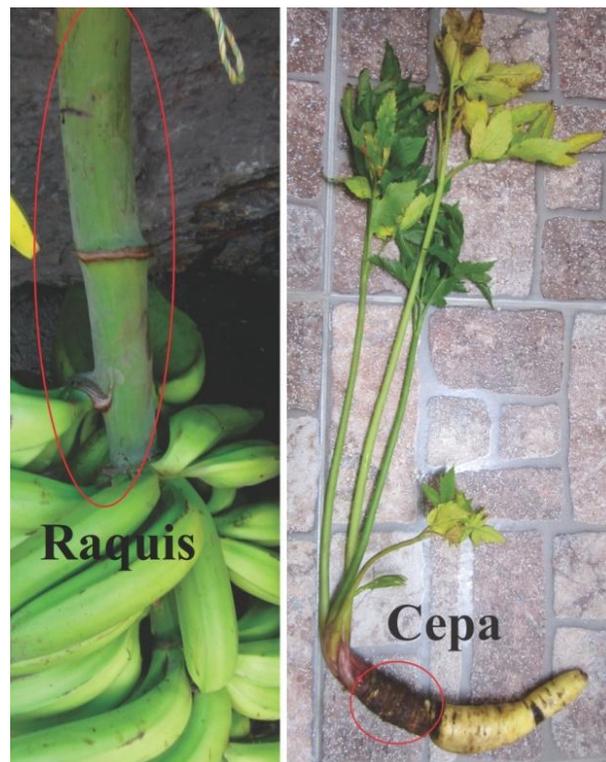
## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección de muestras y criterios de selección

Residuos agrícolas de plátano (*Musa paradisiaca* (L.) AAB) (raquis) y el tallo cilíndrico corto (cepa) de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) (Fig. 1) fueron obtenidos de los Municipios de Líbano y Cajamarca, respectivamente, del Departamento del Tolima (Colombia), secados en un horno eléctrico DiEs, modelo Thermolab (Diseños Electrónicos Especiales, Itagüí, Antioquia, Colombia), con recirculación forzada de aire a 60 °C durante 72 h hasta obtener una humedad promedio de 20 % (base húmeda), el material finalmente fue sometido a molienda en un molino de impacto IKA®, modelo MF 10 básico (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Alemania) para obtener un diámetro de partícula hasta 1 mm en el mismo equipo.

### Caracterización química y análisis de componentes estructurales

A cada residuo se le determinó mediante



**Figura 1.-** Residuos de raquis de plátano y cepa de arracacha.

metodología oficial (AOAC, 2000) el contenido de: humedad (método 925.10), proteína bruta (método 955.04), extracto etéreo (método 963.15), fibra cruda (método 962.09) y cenizas (método 941.12). Adicionalmente, se cuantificó: fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA), celulosa, hemicelulosa, lignina, sílice y contenido celular conforme a las metodologías de Van Soest (Van Soest, 1963; Van Soest y Wine, 1967; 1968; Van Soest y Jones, 1968; Van Soest *et al.*, 1991).

### Cuantificación de carbohidratos

Para valoración de carbohidratos totales y reductores se realizó una extracción con etanol absoluto en dilución 1:3 (p/v), filtrado en papel cuantitativo y conservado en refrigeración hasta su uso. La cuantificación de carbohidratos totales y azúcares reductores en

toda la fase experimental se realizó mediante los métodos espectrofotométricos de Antrona (Leyva *et al.*, 2008) y DNS (Sengupta *et al.*, 2000), respectivamente. Estas cuantificaciones de carbohidratos de alto y bajo peso molecular se realizaron empleando un espectrofotómetro UV-Vis Helios Gamma (Thermo Electron Corporation/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a 620 nm y 540 nm, respectivamente.

### **Hidrólisis**

Las muestras después de ser tratadas fueron filtradas y el sobrenadante fue neutralizado con hidróxido de sodio 5 M hasta pH 6,5-7,5 para evitar errores en la cuantificación de carbohidratos. El líquido resultante fue aforado con el fin de facilitar las diluciones propuestas en las metodologías antes mencionadas para cuantificación de carbohidratos totales y azúcares reductores.

### **Hidrólisis térmica y ácida**

La muestra de raquis y de cepa fueron diluidas en relación 1:15 con agua destilada, sometidas a vapor saturado a presiones de 0,1034 MPa (100,55 °C), 0,2068 MPa (121,28 °C) y 0,4137 MPa (144,83 °C) durante 1 h (Mejía-Giraldo *et al.*, 2007). El vapor saturado se suministró a partir de una caldera pirotubular vertical de 2 pulgadas con capacidad de 2 BHP (Equipos y Calderas Industriales E U, Bogotá). El pretratamiento químico se realizó en dilución 1:15 con ácido sulfúrico en concentraciones de 0,25; 0,50 y 1,00 M. Las muestras fueron sometidas a proceso de hidrólisis a temperatura de 90 °C en reflujo a presión atmosférica (Ibagué, Tolima) por una 1 h.

### **Tiempo de residencia**

Los residuos pretratados a altas temperaturas y diferentes concentraciones de ácido sulfúrico tuvieron un tiempo de

residencia de 1 h en cada tratamiento. Las muestras en las cuales se evidenció una cuantificación mayor de carbohidratos totales y reductores se les aumentó el tiempo a 2 horas para comparar el efecto sobre la hidrólisis de carbohidratos.

### **Hidrólisis enzimática**

La hidrólisis enzimática se realizó con el fin de aumentar los carbohidratos reductores obtenidos en los pretratamientos previos (sacarificación). Al determinar el pretratamiento que mostró el mayor rendimiento de obtención de carbohidratos totales y azúcares reductores se procedió a la sacarificación de la torta resultante del proceso de filtración de los residuos de plátano y arracacha pretratados empleando la preparación enzimática Celluclast® 1.5 L (Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca) a razón de 7,5; 15,0 y 30,0 FPU/g ('filter paper units') (Ghose, 1987). Se usó como regulador de pH una solución buffer de citrato de sodio en concentración 0,05 M (pH 4,8), se mantuvo la temperatura a 50 °C durante 48 h, con agitación (150 rpm), y posteriormente se determinó el contenido de carbohidratos reductores cada 12 h acorde a las metodologías de González-Rentería *et al.* (2011) y Wei *et al.* (2010). La inactivación enzimática se realizó en cada cuantificación a 80 °C durante 5 min, luego se centrifugaron las muestras a 5000 rpm por 10 min para obtener el líquido sobrenadante para su valoración.

### **Análisis estadístico**

Se utilizó el paquete estadístico Statgraphics® Centurion XV (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA) para el análisis de varianzas (ANOVA) y comparación de medias, a través del cual se estableció la influencia de las presiones, concentraciones de ácido y de enzimas sobre los subproductos de plátano y arracacha mediante un diseño de bloques completos al

azar, con ayuda de la prueba de mínima diferencia significativa (LSD, 'Least Significant Difference') con un nivel de confianza de 95,0 % para cada uno, con el fin de definir el mejor pretratamiento para la conversión de carbohidratos de alto peso molecular en azúcares fermentables.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Composición química

El contenido de humedad de los residuos frescos superó el 70 % (Cuadro 1), por lo cual un secado promedio hasta 20 % fue esencial para minimizar la posibilidad de infestación por mohos y bacterias considerados de alto riesgo por la reducción de carbohidratos fermentables y generación de diversidad de compuestos en algunos casos considerados fitotóxicos e inhibidores de procesos de fermentación (Lindgren y Dobrogosz, 1990). El valor de humedad en raquis de plátano documentado por Chinae *et al.* (1999), para *Musa acuminata* Colla, subgrupo Cavendish, fue de 87,8 %, y para cepas de arracacha 72,0 y 72,6 % (Rodríguez-Borray *et al.*, 2000); menores a los obtenidos.

El contenido de proteína presente en las muestras fue mayor en cepa de arracacha (10,1 %), siendo significativo ( $p < 0,05$ ) en cuanto al raquis (Cuadro 1), y a su vez más elevado que el contenido de muchos frutos (Wilson y Downs, 2012), lo cual, sumado al contenido de carbohidratos totales (Cuadro 2) representa una cantidad no despreciable de calorías que en parte soportan la conversión de los animales que en campo son alimentados con estos residuos. El valor de proteína obtenido para raquis de plátano (5,7 %) fue similar al presentado por Torres-Conde *et al.* (2013) de 5,3 % y menor al obtenido por Chinae *et al.* (1999) de 7,98 % y en harina de raquis (12,8 %) por Mazzeo-Meneses *et al.* (2010). Para cepa de arracacha han sido informados valores (base húmeda) de 0,9 y 1,0 % (Rodríguez-Borray *et*

*al.*, 2000).

En lo referente al extracto etéreo se pudo evidenciar que la muestra de cepa de arracacha posee porcentaje bajo en relación al residuo proveniente del plátano (Cuadro 1), por no superar el 5 % de compuestos lipídicos; por ello, se consideró que los subproductos de arracacha no presentarían inconvenientes de almacenamiento por tener bajo porcentaje graso (2,1 %) en comparación al raquis de plátano (8,3 %) que podría presentar mayor susceptibilidad a la oxidación. En contraposición, Paredes-Medina *et al.* (2010) para raquis de *Musa cavendish* determinaron 1,5 % de extracto etéreo, y Chinae *et al.* (1999) 1,03 %; menores al obtenido. En cepas de arracacha amarilla y morada, Rodríguez-Borray *et al.* (2000) documentaron valores de grasa de 0,1 % (base húmeda).

En cuanto al contenido de fibra cruda, el análisis estadístico indicó diferencias significativas entre medias ( $p < 0,05$ ). El raquis (11,7 %) representó mayor fuente que la cepa (Cuadro 1). Cabe resaltar que estos residuos se asemejan a los forrajes como lo indica Brøkner *et al.* (2012) con posibilidades de ser un subproducto con moléculas de carbohidratos considerables para elaboración de productos de origen natural. Se ha encontrado en la harina de raquis de plátano Dominico-Hartón (*Musa* AAB Simonds) contenidos de fibra cruda de 23,0 % (Mazzeo-Meneses *et al.*, 2010). En raquis de plátano ha sido documentado un valor (base seca) de fibra bruta de 36,6 % (Chinae *et al.*, 1999) y en cepa de arracacha valores (base húmeda) de 1,1 y 0,9 (Rodríguez-Borray *et al.*, 2000).

Los contenidos de cenizas en raquis (9,6 %) y cepa (7,1 %) (Cuadro 1), permiten suponer que estos minerales podrían ser utilizados en suplementos alimenticios para animales y fertilización del suelo. Estos representan una fuente importante de minerales, si se compara con los contenidos en otros materiales lignocelulósicos como raquis de palma (*Phoenix dactylifera* L.) (3,0 %) (Ammar *et al.*, 2012).

**Cuadro 1.-** Composición química de residuos de plátano y arracacha.\*

Componente (%)	Raquis de plátano	Cepa de arracacha
Humedad	91,3 ± 0,0	86,4 ± 4,1
Proteína cruda	5,7 ± 0,1 <sup>b</sup>	10,1 ± 0,7 <sup>a</sup>
Extracto etéreo	8,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	2,1 ± 1,1 <sup>b</sup>
Fibra cruda	11,7 ± 0,0 <sup>a</sup>	7,5 ± 0,4 <sup>b</sup>
Cenizas	9,6 ± 1,0	7,1 ± 2,1

$n = 3$ . Los resultados son la media de 3 determinaciones  $\pm$  la desviación estándar, expresados en base seca (% p/p).

\* Letras diferentes en superíndices en una misma fila indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### Componentes estructurales y cuantificación de carbohidratos iniciales

Para la generación futura de productos naturales y procesos de hidrólisis de estos materiales es importante conocer la composición de la pared celular de cada uno de los residuos caracterizados, por ello, el Cuadro 2 condensa información relacionada con los contenidos de carbohidratos de alto y bajo peso molecular presentes en cada uno de estos subproductos agrícolas.

En raquis de plátano, el contenido de FDN resultó menor al compararse con el publicado por China *et al.* (1999) de 50,15 % y el de FDA fue similar (41,75 %). Torres-Conde *et al.* (2013) determinaron en raquis de plátano, valores porcentuales de 40,35; 23,96 y 20,36 para celulosa, hemicelulosa y lignina, respectivamente, los cuales fueron menores a los mostrados en el Cuadro 2. Estos resultados indican que la cepa de arracacha contiene menor cantidad de celulosa respecto al raquis de plátano. Cordeiro *et al.* (2004) estudiaron la

composición química en pseudotallo del plátano (*Musa acuminata* Colla) y manifestaron que posee gran cantidad de polisacáridos y poca cantidad de lignina; asimismo, Oliveira *et al.* (2007) estudiaron componentes macromoleculares analizados mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en estado sólido, espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier-reflectancia total atenuada (ATR-FTIR, ‘attenuated total reflectance Fourier transform infrared’) y evaluaron la estructura y composición química de los componentes de diferentes partes morfológicas de la planta de banano (Cavendish Enano); estos autores determinaron que hubo presencia de lignina en toda la planta y en menor cantidad en el raquis (10,5 %), lo que justificó la cantidad de carbohidratos de tipo celulósico en el raquis a desdoblar a través de pretratamientos físicos, químicos o biológicos.

Se evidenció en raquis 10,28 % de carbohidratos totales y 6,34 % de carbohidratos reductores, y para cepa 13,32 % y 1,70 %, respectivamente; una considerable cantidad poniendo en manifiesto que se podrían obtener azúcares fermentables mediante pretratamientos que ayuden a hidrolizar estas cadenas de glucosa que se encuentran en gran proporción en el material vegetal (Balat, 2011). En relación al contenido de carbohidratos reductores el análisis no mostró cantidades significativas (Cuadro 2), por lo que se requiere de la aplicación de pretratamientos físicos, químicos o enzimáticos que permitan desdoblar carbohidratos estructurales a azúcares reductores si se quieren proyectar estos materiales para la obtención de bioetanol, como lo manifestaron Sánchez-Riaño *et al.* (2010) para residuos de lima Tahití (*Citrus latifolia*) y cachaza de caña. Los resultados iniciales de carbohidratos se usaron como control a través de todo el estudio realizado para la verificación del rendimiento en obtención de azúcares fermentables de estos materiales.

**Cuadro 2.-** Componentes estructurales y contenido de carbohidratos en residuos de plátano y arracacha.

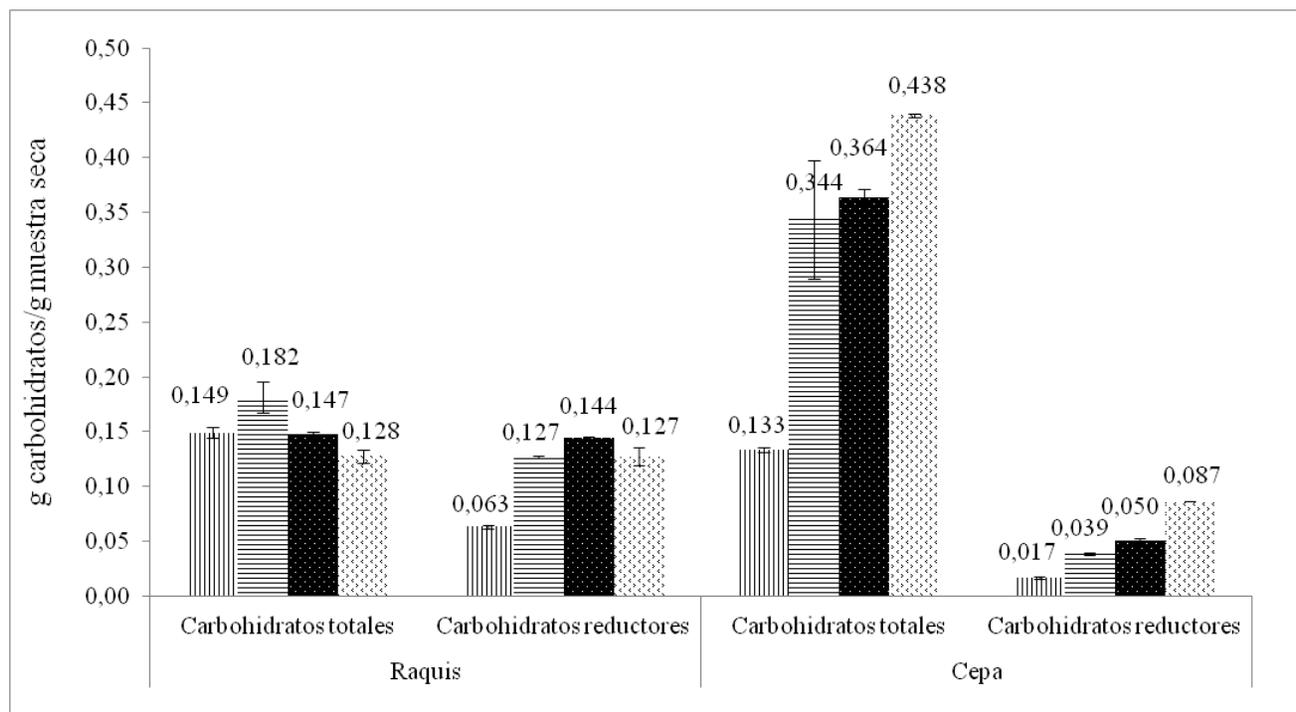
Componente (%)	Raquis de plátano	Cepa de arracacha
FDN	5,6 ± 2,3	3,6 ± 5,0
FDA	39,4 ± 1,5	13,4 ± 1,0
Celulosa	33,8 ± 0,8	10,7 ± 1,7
Hemicelulosa	10,5 ± 0,5	8,0 ± 4,0
Lignina	5,2 ± 1,1	0,0
Sílice	0,4 ± 0,2	0,0
Contenido celular	52,2 ± 2,3	81,4 ± 5,0
Carbohidratos totales disponibles	10,28 ± 1,8	13,32 ± 2,0
Carbohidratos reductores	6,34 ± 0,3	1,70 ± 0,2
Pentosas	0,04 ± 0,0	0,04 ± 0,0
Hexosas	12,66 ± 0,0	3,36 ± 0,0

$n = 3$ . Los resultados son la media de 3 determinaciones  $\pm$  la desviación estándar, expresados en base seca (% p/p). FDN: fibra detergente neutra. FDA: fibra detergente ácida.

### Hidrólisis térmica

Los residuos se hidrolizaron bajo parámetros de presión de 0,1034 MPa, 0,2068 MPa y 0,4137 MPa. El ANOVA sobre el contenido de carbohidratos totales de los residuos de plátano demostró que ninguno de los factores (presión, subproductos), tuvo un efecto estadísticamente significativo ( $p > 0,05$ ) sobre el rendimiento de obtención de carbohidratos totales por gramo de material vegetal seco (g/g) con un 95,0 % de nivel de confianza, por otro lado, en cuanto a los carbohidratos reductores si hubo diferencia estadística ( $p < 0,05$ ). En la Fig. 2 se muestra el comportamiento de la hidrólisis de los polímeros de raquis. Después de un pretratamiento con presión a 0,1034 MPa el raquis cuantificó 0,182 g/g en contenido de carbohidratos totales que en comparación con la cantidad de azúcares que posee el control solo

aumentó un 21,72 %; sin embargo, a medida que la presión aumentó los carbohidratos disminuyeron, y a 0,4137 MPa se obtuvo un valor de menor al control (0,128 g/g). En este sentido, es posible que el raquis se vea afectado por la presión, generando el desdoble de polímeros que conlleva a mayor cantidad de azúcares monoméricos. Por otro lado, hubo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en el contenido de azúcares reductores en raquis respecto al control, mostrando un incremento a diferentes presiones con respecto al control, no obstante, a presión de 0,4137 MPa se observó una disminución con un valor de 0,127 g/g para azúcares reductores, por lo que al ser un material sensible a altas presiones de vapor los azúcares también comienzan a degradarse, sin embargo, de acuerdo a los resultados a presión de 0,2068 MPa su estructura es estable y las moléculas de glucosa no se alteran con el agua.



(|||||) Control. (≡) Hidrolizado a 0,1034 MPa. (■) Hidrolizado a 0,2068 MPa. (⊗) Hidrolizado a 0,4137 MPa.

**Figura 2.-** Incidencia del vapor saturado en el rendimiento de carbohidratos totales y reductores aplicado a raquis de plátano y cepa de arracacha en dilución (1:15) con agua destilada.

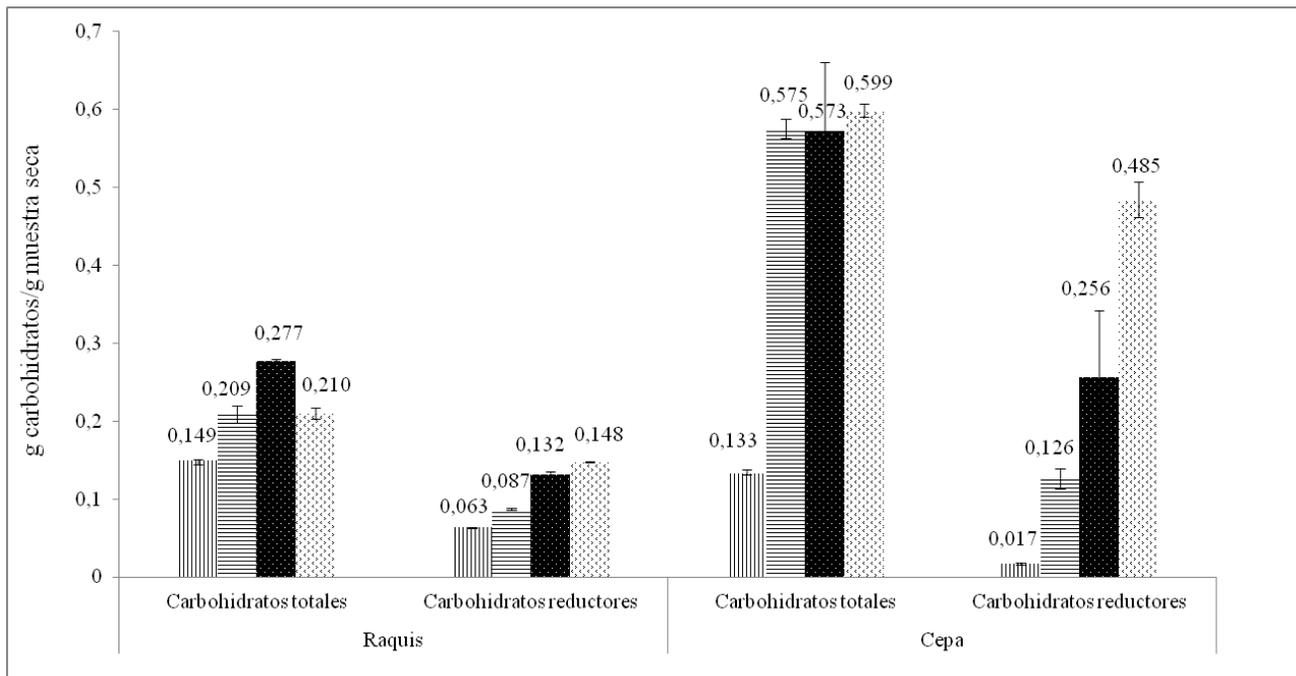
Como se muestra en la Fig. 2, el valor cuantificado para la hidrólisis de carbohidratos (totales) en la cepa fue de 0,438 g/g a 0,4137 MPa, con diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al control ( $p < 0,05$ ). El valor fue considerablemente mayor a los valores obtenidos para raquis de plátano. En cuanto a los carbohidratos reductores desprendidos de la ruptura de almidón y de sus polisacáridos presentes (celulosa y hemicelulosa): 0,039 g/g (0,1034 MPa); 0,050 g/g (0,2068 MPa) y 0,087 g/g (0,4137 MPa) existió diferencia significativa entre las muestras tratadas ( $p < 0,05$ ), aunque los valores fueron menores a los de residuos de plátano estudiados; por tal razón, es necesario la aplicación de un pretratamiento posterior (sacarificación) que permita liberar azúcares por rompimiento de almidón y celulosa los cuales se encuentran fuertemente enlazados

(Paredes-Medina *et al.*, 2010).

A partir de raquis de plátano se obtuvo 0,144 g/g de carbohidratos reductores expresados como glucosa por g de material seco, un valor menor al obtenido por Pérez *et al.* (2008) de 43,6 % de azúcares derivados de la hemicelulosa a partir de paja de trigo, similar al mayor obtenido en cepa de arracacha (0,438 g/g), y que podrían incidir directamente en los rendimientos y balances energéticos resultantes de la producción de etanol a partir de estos materiales lignocelulósicos.

### Hidrólisis ácida

Los carbohidratos totales en el raquis de plátano alcanzaron un valor de 0,277 g/g a concentración de 0,50 M (Fig. 3), y al hidrolizar a 1,00 M se obtuvo un valor significativamente más bajo. En cuanto a los



(||||) Control. (≡) Hidrolizado a 0,25 M. (■) Hidrolizado a 0,50 M. (⊘) Hidrolizado a 1,00 M.

**Figura 3.-** Incidencia de la hidrólisis con ácido sulfúrico en el rendimiento de carbohidratos totales y reductores aplicado a raquis de plátano y cepa de arracacha en dilución (1:15) con agua destilada.

carbohidratos reductores hubo diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ) y el mayor valor se alcanzó a concentración 1,00 M de  $H_2SO_4$  con 0,148 g/g.

De acuerdo a la Fig. 3 con un efecto estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ), los contenidos de azúcares (totales y reductores) en la cepa de arracacha sometidos a hidrólisis química presentaron un comportamiento proporcional al incremento en la concentración del ácido durante el pretratamiento. Los carbohidratos totales llegan a su punto máximo de hidrólisis a concentración 1,0 M (0,599 g/g), mientras los azúcares fermentables de la cepa con valor máximo de 0,485 g/g a 1,0 M de concentración de ácido sulfúrico se incrementaron considerablemente ( $p < 0,05$ ) más que el control (0,017 g/g).

### Comparación de rendimientos entre hidrólisis térmica y ácida

En el Cuadro 3 se comparan los resultados de obtención de carbohidratos con los mejores rendimientos por tratamiento a altas presiones y concentraciones de ácido sulfúrico, mostrando que en los residuos de raquis y cepa tratados a altas presiones para el aumento de azúcares fermentables no se obtuvieron rendimientos considerables. No obstante, en cuanto a la obtención de monómeros por hidrólisis ácida se aprecia que se pueden obtener mejores rendimientos en carbohidratos (totales y reductores). Estos resultados ponen en manifiesto que el ácido sulfúrico es el más efectivo y por tanto más usado, como lo informaron Kahar *et al.* (2010), quienes con el tratamiento con ácido sulfúrico diluido al 0,5 % v/v obtuvieron un material alterado con

**Cuadro 3.-** Comparación de los mejores rendimientos de carbohidratos por tratamiento.

Muestras	Carbohidratos totales (g/g)	Carbohidratos reductores (g/g)
Raquis (control)	0,149	0,063
Raquis (0,2068 MPa)	0,147	0,144
Raquis (1,0 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0,210	0,148
Cepa (control)	0,133	0,017
Cepa (0,4137 MPa)	0,438	0,087
Cepa (1,0 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0,599	0,485

microfibrillas de celulosa más accesible para las enzimas celulasas y como resultado un rendimiento de 80 % de azúcares fermentables al final del proceso. Resultado similar fue publicado por Mathew *et al.* (2011), quienes hidrolizaron residuos de paja (*Brassica napus*) con ácido sulfúrico diluido obteniendo mejores rendimiento de azúcares monoméricos con tiempos no superiores a 60 min.

### Tiempo de residencia

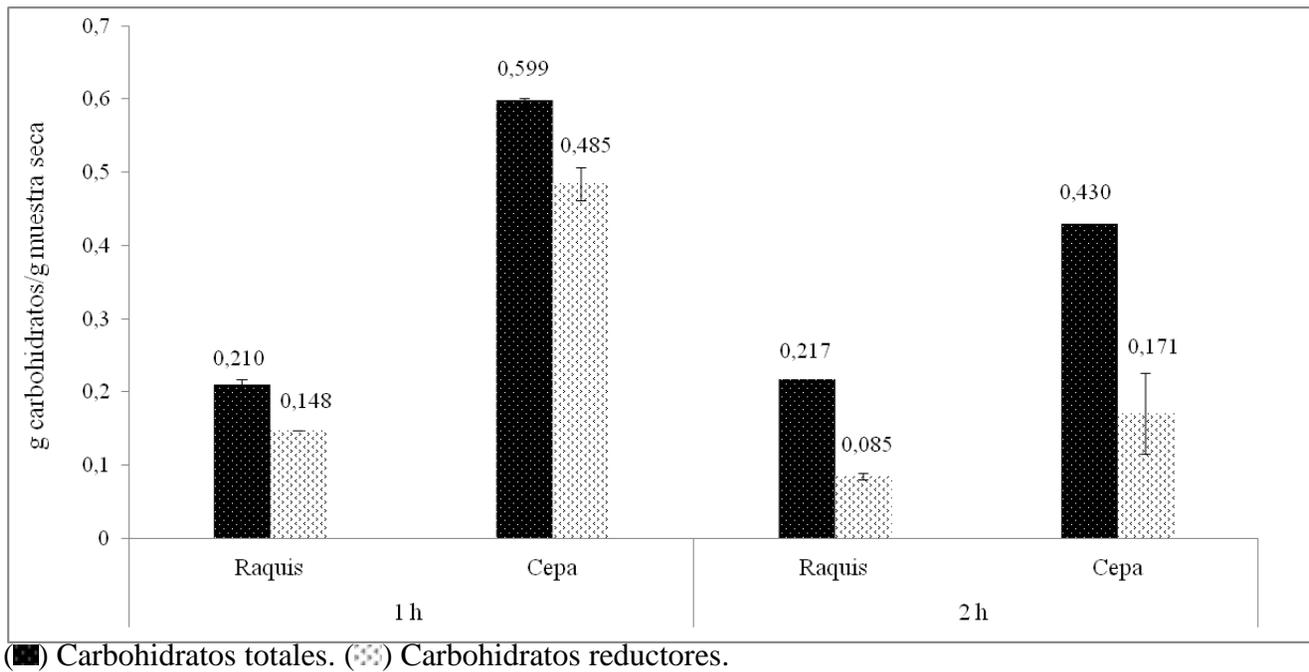
Al comparar los resultados del Cuadro 3 donde se muestra la cuantificación de carbohidratos en los pretratamientos térmico y químico, se evidenció que el pretratamiento químico fue el método más efectivo en los residuos de plátano y arracacha para obtener carbohidratos reductores. El ácido sulfúrico ha sido exitoso en la obtención de azúcares simples a concentraciones bajas y tiempos de 5 a 20 minutos en materiales con alto contenido celulósico (Lu *et al.*, 2009).

Consecuentemente, la necesidad de evaluar el tiempo de residencia a 2 horas para observar el comportamiento de las concentraciones se muestra en la Fig. 4. Los resultados obtenidos al aumentar el tiempo de residencia a 2 horas, fueron negativos con el aumento del tiempo de pretratamiento, mostrando una disminución de los

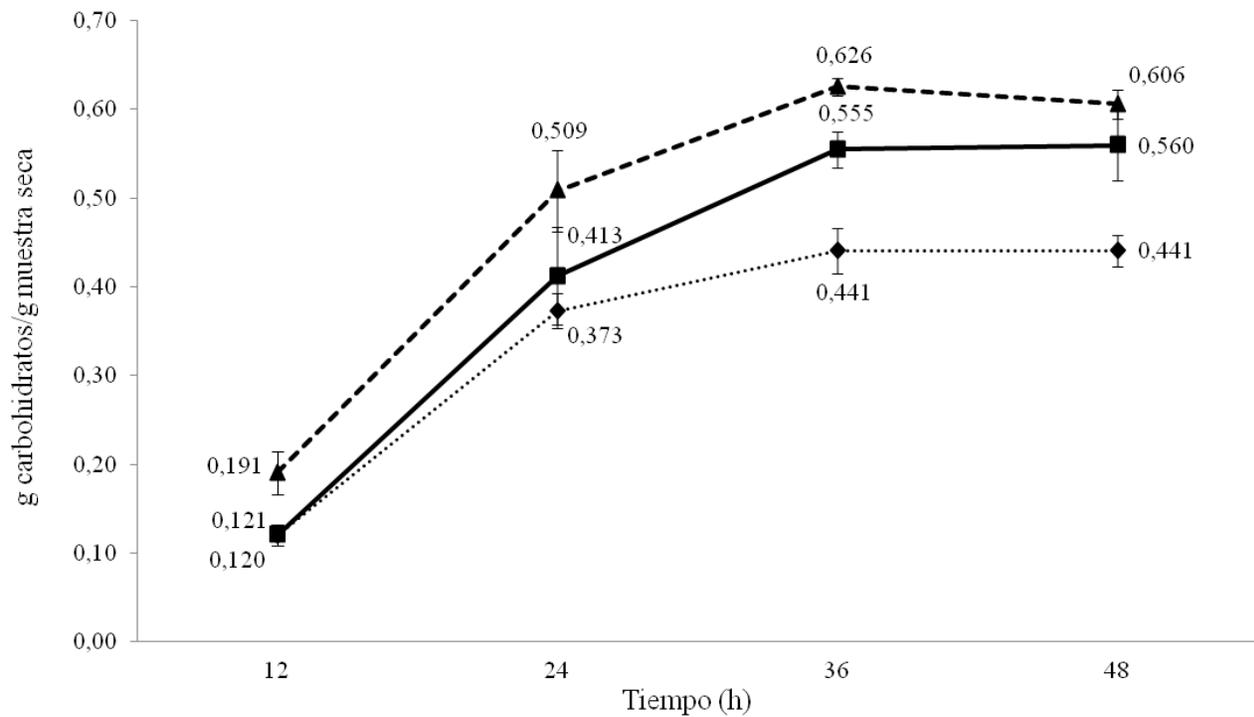
carbohidratos totales y reductores a tiempos de exposición prolongados lo que induce a que los residuos comienzan a degradarse, transformándose en compuestos no deseados para la fermentación (fenoles y furfuralos) (Chandler *et al.*, 2012; Avcı *et al.*, 2013).

### Hidrólisis enzimática

La torta resultante del raquis de plátano donde se obtuvieron rendimientos máximos de azúcares reductores (0,148 g/g) con condiciones de ácido sulfúrico a 1,0 M por 1 h, se sometió a hidrólisis biológica con la preparación enzimática Celluclast® 1.5 L. La Fig. 5 muestra la cinética enzimática con el sustrato, generando la liberación de moléculas de D-glucosa por el rompimiento de los enlaces  $\alpha$ -1,4 glucosídicos (Mathew *et al.*, 2011). Su punto máximo de conversión (sustrato-producto) ocurrió a las 36 h, en razón a esto, al observarse diferencia mínima significativa con la concentración de 15 FPU/g y 7,5 FPU/g ( $p < 0,05$ ), con la adición de 30 FPU/g de la preparación enzimática se obtienen azúcares simples hasta 0,626 g/g; por lo que fue la concentración de enzima más adecuada para la hidrólisis; de este modo, como resultado de todo el proceso (ácido + enzimático) para la obtención de azúcares fermentables de raquis de plátano se obtuvo en rendimiento 0,7734 g por gramo de muestra seca.



**Figura 4.-** Incidencia de la hidrólisis (1,0 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a través del tiempo en carbohidratos de los residuos de plátano y arracacha.



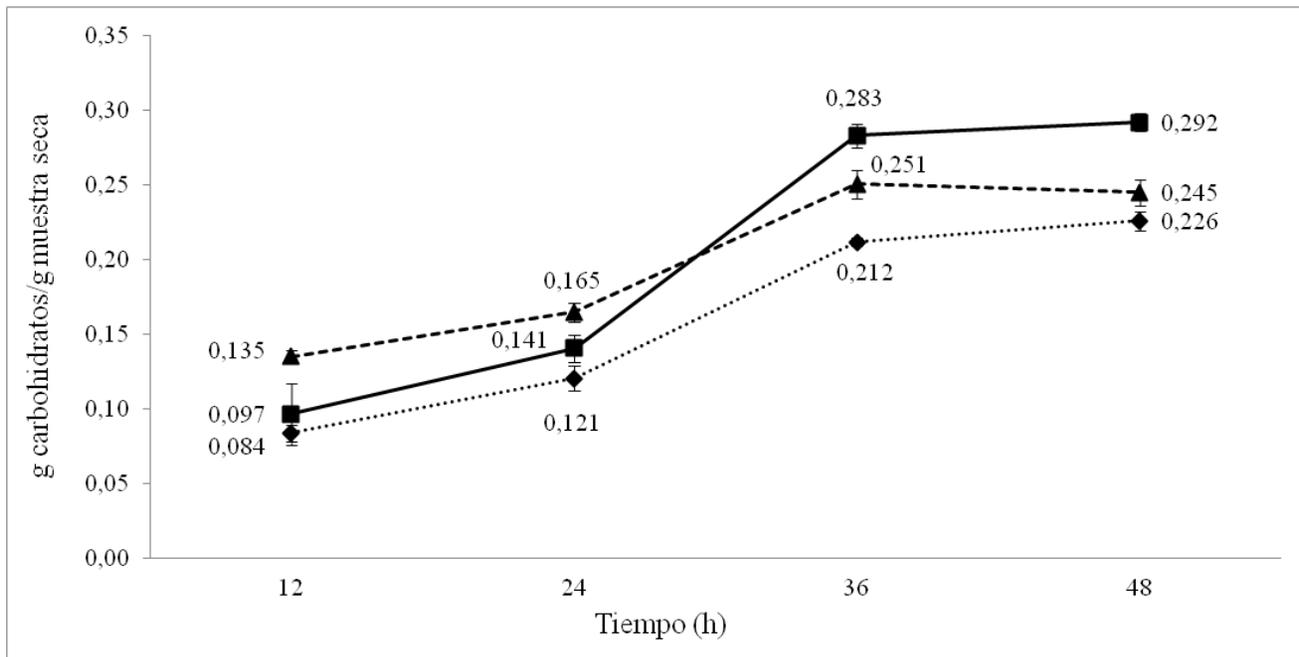
(◻) 7,5 FPU/g. (■) 15 FPU/g. (▲) 30 FPU/g.

**Figura 5.-** Cinética de desdoblamiento de carbohidratos reductores en raquis de plátano con empleo de la preparación enzimática Celluclast® 1.5 L.

La hidrólisis enzimática de la cepa de arracacha con la preparación enzimática Celluclast® 1.5 L, adquirió un comportamiento proporcional con el tiempo de residencia (Fig. 6), mostrando al cabo de 36 horas la velocidad máxima de reacción. Con la concentración de enzimas a 7,5 FPU/g (0,212 g/g) la hidrólisis resultó ser inferior a las demás concentraciones, donde la concentración de enzimas con mejor resultado fue de 15 FPU/g cuantificándose 0,283 g/g; que en comparación con el raquis que fue elevada, pudo ser por la poca presencia de celulosa (Cuadro 2).

El aumento de azúcares monoméricos por la reacción química que ejercen las enzimas sobre el sustrato entró en un equilibrio de

reacción (sustrato - producto) a partir de las 36 h. A medida que aumenta el tiempo aún se muestra un incremento de dextrosas que liberan las enzimas por rompimientos de la cadena lineal de celulosa y las ramificadas de la hemicelulosa (Felix y Tilley, 2009) en la cepa de arracacha. Con 30 FPU/g la enzima celulasa está en un punto de saturación donde no es tan eficiente como a 15 FPU/g, probablemente podría llegar a la misma cantidad de azúcares que las demás concentraciones pero con un mayor tiempo de residencia, algo que sería poco productivo por el gasto energético. La cuantificación total de azúcares fermentables en todo el proceso (ácido + enzimático) fue de 0,7679 g por gramo de muestra seca.



(◆) 7,5 FPU/g, (■) 15 FPU/g, (▲) 30 FPU/g.

**Figura 6.-** Cinética de desdoblamiento de carbohidratos reductores en cepa de arracacha con empleo de la preparación enzimática Celluclast® 1.5 L.

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIÓN

Los mejores rendimientos de carbohidratos reductores se obtuvieron al tratar

el raquis de plátano y la cepa de arracacha con ácido sulfúrico a concentración 1,0 M por 1 h de residencia.

La torta resultante del proceso de

filtración se hidrolizó enzimáticamente a 30 y 15 FPU/g dando como resultados, respectivamente, una conversión entre las 2 fases de hidrólisis de 0,7734 g/g para raquis de plátano y 0,7679 g/g para cepa de arracacha, lo que indicó que los residuos agrícolas de plátano y arracacha puede ser empleados como materias primas para la elaboración de productos naturales donde se requiera en sus procesos la fermentación.

Se deben emplear los microorganismos (levaduras) necesarios e indicados para fermentar eficientemente los azúcares obtenidos del hidrolizado lignocelulósico que contiene no solo la glucosa, sino también diversos monosacáridos y oligosacáridos, con previas detoxificaciones de fenoles y furfurales como inhibidores de la fermentación con miras a garantizar una futura producción industrial de bioetanol.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores de este estudio están agradecidos por el apoyo financiero de la Universidad del Tolima, por el apoyo técnico a los grupos de investigación CEDAGRITOL (Centro de Desarrollo Agroindustrial del Tolima) y GIPRONUT (Grupo de Investigación en Productos Naturales), así como con LASEREX (Laboratorio de Servicios de Extensión en Análisis Químico).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ammar, H.; Abid, M. and Abid, S. 2012. Cellulose fibers obtained by organosolv process from date palm rachis (*Phoenix dactylifera* L.). IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. 28:012002. 5 p.
- AOAC. 2000. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. (17ma. ed.). Gaithersburg, USA.
- Avci, Ayse; Saha, Badal C.; Kennedy, Gregory J. and Cotta, Michael A. 2013. Dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover for enzymatic hydrolysis and efficient ethanol production by recombinant *Escherichia coli* FBR5 without detoxification. *Bioresource Technology*. 142:312-319.
- Badger, P.C. 2002. Ethanol from cellulose: a general review. In *Trends in new crops and new uses*. (pp. 17-21). Alexandria, VA: ASHS (American Society for Horticultural Science) Press.
- Balat, Mustafa. 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy Conversion and Management*. 52(2):858-875.
- Brøkner, C.; Bach-Knudsen, K.E.; Karaman, I.; Eybye, K.L. and Tauson, A.H. 2012. Chemical and physicochemical characterisation of various horse feed ingredients. *Animal Feed Science and Technology*. 177(1-2):86-97.
- Castro, Aline M.; Castilho, Leda R. and Freire, Denise M.G. 2011. An overview on advances of amylases production and their use in the production of bioethanol by conventional and non-conventional processes. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 1(4):245-255.
- Chandler, Cintia; Villalobos, Nercy; González, Eduardo; Arenas, Elsy; Mármol, Zulay; Ríos, Josybel y Aiello-Mazzarri, Cateryna. 2012. Hidrólisis ácida diluida en dos etapas de bagazo de caña de azúcar para la producción de azúcares fermentables. *Multiciencias*. 12(3):245-253.
- Chen, W.H.; Pen, B.L.; Yu, C.T. and Hwang, W.S. 2011. Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw by an integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 102(3):2916-2924.
- China, E.; Martín, P.; Afonso, C.; Hita, P. y Hernández, E. 1999. Estudio del ensilado del raquis de banana (*Musa acuminata*

- Colla, subgrupo Cavendish) para la alimentación del ganado caprino en las Islas Canarias (España). *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*. 16(3):291-305.
- Cordeiro, N.; Belgacem, M.N.; Torres, I.C. and Moura, J.C.V.P. 2004. Chemical composition and pulping of banana pseudo-stems. *Industrial Crops and Products*. 19(2):147-154.
- Duff, Sheldon J.B. and Murray, William D. 1996. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*. 55(1):1-33.
- Felix, Erika and Tilley, David R. 2009. Integrated energy, environmental and financial analysis of ethanol production from cellulosic switchgrass. *Energy*. 34(4):410-436.
- Ghose, T.K. 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*. 59(2):257-268.
- González-Rentería, S.M.; Soto-Cruz, N.O.; Rutiaga-Quiñones, O.M.; Medrano-Roldán, H.; Rutiaga-Quinones, J.G. y López-Miranda, J. 2011. Optimización del proceso de hidrólisis enzimática de una mezcla de pajas de frijol cuatro variedades (Pinto villa, Pinto saltillo, Pinto mestizo y Flor de mayo). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 10(1):17-28.
- Kaar, W.E.; Gutierrez, C.V. and Kinoshita, C.M. 1998. Steam explosion of sugarcane bagasse as a pretreatment for conversion to ethanol. *Biomass and Bioenergy*. 14(3):277-287.
- Kahar, Prihardi; Taku, Kazuo and Tanaka, Shuzo. 2010. Enzymatic digestion of corn cobs pretreated with low strength of sulfuric acid for bioethanol production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 110(4):453-458.
- Leyva, Alberto; Quintana, Anelis; Sánchez, Meily; Rodríguez, Elias N.; Cremata, José and Sánchez, Julio C. 2008. Rapid and sensitive anthrone-sulfuric acid assay in microplate format to quantify carbohydrate in biopharmaceutical products: method development and validation. *Biologicals*. 36(2):134-141.
- Lindgren, Sven E. and Dobrogosz, Walter J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Letters*. 87(1-2):149-163.
- Lou, X.F. and Nair, J. 2009. The impact of landfilling and composting on greenhouse gas emissions—a review. *Bioresource Technology*. 100(16):3792-3798.
- Lu, Xuebin; Zhang, Yimin and Angelidaki, Irini. 2009. Optimization of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-catalyzed hydrothermal pretreatment of rapeseed straw for bioconversion to ethanol: focusing on pretreatment at high solids content. *Bioresource Technology*. 100(12):3048-3053.
- Mathew, Anil Kuruvilla; Chaney, Keith; Crook, Mitch and Humphries, Andrea Claire. 2011. Dilute acid pre-treatment of oilseed rape straw for bioethanol production. *Renewable Energy*. 36(9):2424-2432.
- Mazzeo-Meneses, Miguel; León-Agatón, Libardo; Mejía-Gutiérrez, Luis Fernando; Guerrero-Mendieta, Luz Enith y Botero-López, Juan Diego. 2010. Aprovechamiento industrial de residuos de cosecha y poscosecha del plátano en el Departamento de Caldas. *Revista Educación en Ingeniería*. 5(9):128-139.
- Mejía-Giraldo, L.F.; Martínez-Correa, H.A.; Betancourt-Gutiérrez, J.E. y Castrillón-Castaño, C.E. 2007. Aprovechamiento del residuo agroindustrial del mango común (*Mangifera indica* L.) en la obtención de azúcares fermentables. *Ingeniería y Ciencia*. 3(6):41-62.
- Millett, M.A.; Baker, A.J. and Satter, L.D. 1976. Physical and chemical pretreatments for enhancing cellulose saccharification. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*. 6:125-153.

- MinAgricultura. 2014. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Anuario estadístico del sector agropecuario 2013. Resultados Evaluaciones Agropecuarias Municipales. Bogotá, D. C., Colombia: Oficina Asesora de Planeación y Prospectiva - Grupo de Información y Estadísticas Sectoriales.
- Mosier, Nathan; Wyman, Charles; Dale, Bruce; Elander, Richard; Lee, Y.Y.; Holtzapple, Mark and Ladisch, Michael. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 96(6):673-686.
- Negro, M.J.; Manzanares, P.; Oliva, J.M.; Ballesteros, I. and Ballesteros, M. 2003. Changes in various physical/chemical parameters of *Pinus pinaster* wood after steam explosion pretreatment. *Biomass and Bioenergy*. 25(3):301-308.
- Oliveira, L.; Cordeiro, N.; Evtuguin, D.V.; Torres, I.C. and Silvestre, A.J.D. 2007. Chemical composition of different morphological parts from 'Dwarf Cavendish' banana plant and their potential as a non-wood renewable source of natural products. *Industrial Crops and Products*. 26(2):163-172.
- Paredes, Concepción; Pérez-Murcia, María Dolores; Pérez-Espinosa, Aurelia; Bustamante, M. Ángeles and Moreno-Caselles, Joaquín. 2015. Recycling of two-phase olive-mill cake "Alperujo" by co-composting with animal Manures. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 46(Suppl.1):238-247.
- Paredes-Medina, D.; Álvarez-Núñez, M. y Silva-Ordoñez, M. 2010. Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo de banano. *Revista Tecnológica ESPOL*. 23(1):81-88.
- Pérez, J.A.; Ballesteros, I.; Ballesteros, M.; Sáez, F.; Negro, M.J. and Manzanares, P. 2008. Optimizing liquid hot water pretreatment conditions to enhance sugar recovery from wheat straw for fuel-ethanol production. *Fuel*. 87(17-18): 3640-3647.
- Pérez, J.; Muñoz-Dorado, J.; de la Rubia, T. and Martínez, J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*. 5(2):53-63.
- Pezoa-Conte, Ricardo Miguel. 2010. Estudio de pretratamiento con ácido diluido y líquidos iónicos en residuos agrícolas para la producción de bioetanol de segunda generación. Tesis de Maestría. Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile.
- Rawat, Indrayani and Suthar, Surendra. 2014. Composting of tropical toxic weed *Lantana camera* L. biomass and its suitability for agronomic applications. *Compost Science & Utilization*. 22(3):105-115.
- Rodríguez-Borray, Gonzalo A.; García-Bernal, Hugo R.; Camacho-Tamayo, Jesús H.; Arias-Guerrero, Freddy L.; Rivera-Varón, Juan José y de la Torre-Duque, Felipe. 2000. La harina de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*). Manual técnico para su elaboración. Colombia: Programa Nacional de Procesos Agroindustriales, Subdirección de Investigación e Innovación Tecnológica, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA).
- Sánchez-Riaño, Andrea Milena; Rivera-Barrero, Carlos Antonio y Murillo-Perea, Elizabeth. 2010. Perspectivas de uso de subproductos agroindustriales para la producción de bioetanol. *Scientia et Technica*. XVII(46):232-235.
- Sengupta, S.; Jana, M.L.; Sengupta, D. and Naskar, A.K. 2000. A note on the estimation of microbial glycosidase activities by dinitrosalicylic acid reagent.

- Applied Microbiology and Biotechnology. 53(6):732-735.
- Sun, Ye and Cheng, Jiayang. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. 83(1):1-11.
- Taherzadeh, Mohammad J. and Karimi, Keikhosro. 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International Journal of Molecular Sciences*. 9(9):1621-1651.
- Tomme, P.; Warren, R.A.J. and Gilkes, N.R. 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. In *Advances in Microbial Physiology*. Volume 37. (pp. 1-81). London: Academic Press Limited.
- Torres-Conde, Andrés; Cruz, Kevin; Cano, Natalia; Franco, Maribel; Castillo-Monroy, Eva; Acero, Julia Raquel y Garzón-Fuentes, Laura Liliana. 2013. Optimization of dilute acid and liquid hot water pretreatments of plantain rachis for monomeric sugar production. In *Proceedings (Oral presentation) of the International Congress of Energy (ICE)-Annual Meeting AIChE (American Institute of Chemical Engineers)*. November 3-8. San Francisco, CA, USA.
- Van Soest, P.J. 1963. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists*. 46(5):829-835.
- Van Soest, P.J. and Jones, L.H.P. 1968. Effect of silica in forages upon digestibility. *Journal of Dairy Science*. 51(10):1644-1648.
- Van Soest, P.J. and Wine, R.H. 1968. Determination of lignin and cellulose in acid-detergent fiber with permanganate. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 51(4):780-785.
- Van Soest, P.J. and Wine, R.H. 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists*. 50(1):50-55.
- Van Soest, P.J.; Robertson, J.B. and Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74(10):3583-3597.
- Velásquez-Arredondo, H.I.; Ruiz-Colorado, A.A. and De Oliveira-junior, S. 2010. Ethanol production process from banana fruit and its lignocellulosic residues: energy analysis. *Energy*. 35(7):3081-3087.
- Wei, Gong Yuan; Lee, You Jung; Kim, Yi Joon; Jin, Il Hyuck; Lee, Jai Heon; Chung, Chung Han and Lee, Jin Woo. 2010. Kinetic study on the pretreatment and enzymatic saccharification of rice hull for the production of fermentable sugars. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 162(5):1471-1482.
- Wilson, A.L. and Downs, C.T. 2012. Fruit nutritional composition and non-nutritive traits of indigenous South African tree species. *South African Journal of Botany*. 78:30-36.
- Wu, L.; Ma, L.Q and Martinez, G.A. 2000. Comparison of methods for evaluating stability and maturity of biosolids compost. *Journal of Environmental Quality*. 29(2):424-429.