

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES  
DE MONTERREY  
CAMPUS MONTERREY

DIVISIÓN DE BIOTECNOLOGÍA Y ALIMENTOS  
PROGRAMA DE GRADUADOS EN BIOTECNOLOGÍA



**TECNOLÓGICO  
DE MONTERREY®**

“EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DEL JUGO DE CINCO VARIEDADES DE SORGOS DULCES Y FORRAJEROS (*Sorghum bicolor* (L) Moench)”

**TESIS**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

POR

FRANCISCO JONATHAN DÁVILA GÓMEZ

MONTERREY, N.L.

DICIEMBRE DE 2009

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES  
DE MONTERREY  
CAMPUS MONTERREY

DIVISIÓN DE BIOTECNOLOGÍA Y ALIMENTOS  
PROGRAMA DE GRADUADOS EN BIOTECNOLOGÍA

Los miembros del comité de tesis recomendamos que el presente proyecto de tesis presentado por el Ing. Francisco Jonathan Dávila Gómez sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado académico de:

Maestría en Ciencias con Especialidad en Biotecnología

Comité de tesis:

---

Dr. Sergio Román Othon Serna Saldívar  
Asesor

---

Dra. Esther Pérez Carrillo  
Co-Asesora

---

Dr. Jorge Alejandro Benavides Lozano  
Sinodal

Aprobado por:

---

Dr. Mario Moisés Álvarez  
Director de Posgrado de la División de Biotecnología y Alimentos

Diciembre del 2009

“Todos los triunfos nacen  
cuando nos atrevemos a comenzar.”

- Eugene Ware

## DEDICATORIA

A mis padres, Rogelio y María Elena, quienes han sido los mejores maestros que Dios me pudo haber dado. Su amor, paciencia, dedicación y esfuerzo me han traído al lugar donde estoy ahora. Los amo a los dos.

A mi hermano, Rafael, quien me ha enseñado que la mayor felicidad se obtiene al hacer lo que uno realmente ama.

A mi novia, Marcela, que con gran ternura me ha mostrado que el compromiso y el amor son las claves para superar las grandes tormentas. Gracias por ser el motivo para convertirme en el hombre que siempre soñé ser.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por haber trazado este maravilloso destino en mi vida y por haberme permitido darme cuenta que al final de cada reflexión se encuentra Él.

Al Dr. Sergio Serna por haber creído en mí y por su apoyo incondicional en cada etapa del desarrollo de esta tesis. Gracias por darme la libertad de aprender y de hacer ciencia bajo su dirección.

A la Dra. Esther Pérez por haberme guiado con paciencia estos dos años y por haber representado un pilar fundamental para mi desarrollo como investigador. Muchas gracias Esther por haber sido mi modelo de perseverancia y paciencia.

Al Dr. Jorge Benavides por su tiempo y experiencia los cuales permitieron el perfeccionamiento de este trabajo.

Al Dr. Mario Álvarez por sembrar en mí la semilla del interés en el quehacer biotecnológico y por mostrarme el potencial de la ciencia bien aplicada.

A María Luisa, Cristina y Jesica, mis compañeras de proyecto desde el principio, quienes me brindaron su amistad y ayuda incondicional y con quienes compartí este proceso de crecimiento tanto profesional como personal.

A los nuevos integrantes del proyecto Bioetanol (Mayeli, Edna y Erick) por permitirme transmitir el conocimiento que he adquirido a lo largo de estos años y convertirse así en los continuadores de este trabajo.

A los asistentes de licenciatura (Mario, Gina, Mariano, Jorge) por la paciente ayuda que me brindaron en la parte experimental de este proyecto. ¡Sin ustedes este trabajo hubiera sido imposible!

A Ale, Rafa, Cecy y Marisela, quienes siempre me daban ánimos en los momentos difíciles y que nunca me dejaron solo en este camino. Gracias amigos por todos los momentos que compartimos.

A mis amigos (Héctor, María, Isra, Caro, Esmeralda, Dianalu, Lily) del laboratorio, por haber llenado de alegría la convivencia diaria en el Centro de Biotecnología.

A toda la gente talentosa que conocí en PRAmúsica (Elena, chicos del coro, músicos) por enseñarme que el verdadero profesionalismo se mide en la entrega que pones en todo lo que haces.

Al personal administrativo y de laboratorio (Ana Pérez, Myriam Robledo, Don Lupe, Alicia Ramírez, Irasema Romo, Yuriana Oropeza) por las atenciones que tuvieron conmigo y que llevaron al buen término de este ciclo.

Al Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, por el apoyo otorgado para cursar mi maestría y para realizar mi trabajo de tesis.

A mi familia por ser el viento que llena las velas de este barco.

A todas las personas que de una u otra manera ayudaron para que este proyecto se convirtiera en una feliz realidad.

**¡Gracias!**

# ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria .....	i
Agradecimientos .....	ii
Índice General.....	iv
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tablas.....	ix
Abreviaturas .....	x
Resumen.....	xiii
CAPÍTULO 1: Introducción.....	1
1.1. Panorama Energético: La Crisis de los Combustibles Fósiles .....	1
1.2. Fuentes Alternativas de Energía.....	4
1.3. Bioenergía .....	6
1.3.1. Nichos en el Uso de Bioetanol .....	7
1.4. Energía y Medio Ambiente .....	9
1.5. Contribución de la Investigación .....	12
CAPÍTULO 2: Objetivos.....	13
2.1. Objetivo General .....	13
2.2. Objetivos Específicos .....	13
CAPÍTULO 3: Marco Teórico.....	15
3.1. Bioetanol como Combustible.....	15
3.2. Industria del Etanol: Producción a partir De Cereales.....	17
3.2.1. Conversión de Almidón a Etanol: Generalidades .....	18
3.2.2. Perspectivas y Retos: El Aprovechamiento de la Fibra.....	20
3.3. Bioquímica de la Fermentación.....	21
3.3.1. Asimilación de los Nutrientes del Mosto .....	21

3.3.1.1. Asimilación de Azúcares .....	22
3.3.1.2. Asimilación de Compuestos Nitrogenados .....	24
3.3.2. Metabolismo de Azúcares en <i>S. cerevisiae</i> .....	26
3.3.3. Alcoholes Superiores .....	28
3.4. Características del Sorgo Dulce.....	30
3.4.1. Producción de Bioetanol a Partir de Sorgo Dulce .....	32
3.4.2. Retos en la Producción de Bioetanol a partir de Sorgo Dulce.....	33
CAPÍTULO 4: Materiales y Métodos .....	36
4.1. Diseño Experimental Agronómico .....	36
4.2. Obtención y Caracterización en Campo del Material Vegetal.....	37
4.3. Acondicionamiento y Caracterización Química de los Caldos Dulces .....	38
4.3.1. Grados Brix.....	38
4.3.2. Azúcares Reductores .....	39
4.3.3. Perfil de Carbohidratos por HPLC .....	39
4.3.4. Alfa Amino Nitrógeno Libre .....	40
4.3.5. Fenólicos Totales .....	41
4.4. Pruebas de Fermentación de Caldos de 5 Variedades de Sorgos Dulces y Forrajeros .....	42
4.4.1. Preparación del Inóculo de Trabajo .....	42
4.4.2. Proceso de Fermentación.....	43
4.4.3. Perfil de Etanol y Alcoholes Superiores.....	45
4.4.4. Analisis Cinético de los Perfiles de Generación de Productos .....	46
4.5. Efecto de la Adición de Amiloglucosidasa (AMG) .....	47
4.5.1. Determinación de Glucosa Libre .....	48
4.6. Prueba De Fermentación Con Dos Fuentes Nitrogenadas .....	48
CAPÍTULO 5 .....	51
5.1. Caracterización Agronómica de los Caldos Dulces .....	51
5.2. Caracterización Química de los Caldos Dulces.....	54



5.3. Pruebas de Fermentación para las Cinco Variedades de Sorgos Dulces y Forrajeros .....	59
5.3.1. Evolución de los Perfiles de Analitos a lo largo de la Fermentación.....	61
5.4. Efecto de la Adición de Amiloglucosidasa .....	65
5.5. Prueba de Fermentación con 2 Fuentes Nitrogenadas .....	67
5.5.1. Evolución de los Perfiles de Analitos a lo largo de la Fermentación.....	68
CAPÍTULO 6: Conclusiones y Recomendaciones .....	73
CAPÍTULO 7: Bibliografía Citada .....	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Evolución de 1971 a 2006 de la cantidad total de energía primaria producida a nivel mundial dividida por tipo de combustible (Mtoe) .....	2
Figura 1.2: Proporción de la energía producida a nivel mundial según el tipo de combustible en 1973 y 2006 .....	2
Figura 1.3: Evolución de 1971 a 2006 de la cantidad de energía total consumida a nivel mundial dividida por tipo de combustible (Mtoe).....	3
Figura 1. 4: Proporción de la energía consumida a nivel mundial según el tipo de combustible en 1973 y 2006 .....	4
Figura 1.5: Esquematación de los tratamientos previos a la fermentación alcohólica .....	8
Figura 1.6: Evolución de 1971 a 2006 de las emisiones mundiales de CO <sub>2</sub> (Mt de CO <sub>2</sub> ) de acuerdo a la fuente energética de procedencia. ....	9
Figura 1. 7: Aumento en la temperatura media global para el período 1992-2010 medido como fluctuaciones de la temperatura promedio global .....	10
Figura 3.1: Diagrama simplificado de la ruta metabólica de Embden-Meyerhoff para el metabolismo de glucosa y fructosa.....	27
Figura 3.2: Rutas de biosíntesis de algunos alcoholes superiores a partir de piruvato y aminoácidos en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	29
Figura 3.3: Diagrama de bloques para el proceso de obtención de etanol a partir de sorgo dulce.....	33
Figura 3.4: Balance de masa para la producción de bioetanol a partir de sorgo dulce .....	35
Figura 4.1: Esquema del diseño experimental agronómico RCBD propuesto para estudiar las diferencias entre 5 variedades de sorgo dulce. Cada celda representa una unidad experimental.....	37
Figura 4.2: Fotografía de la cámara de Neubauer y cuadrantes utilizados para el conteo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 24858 .....	43

Figura 4.3: Diseño de los reactores usados para el seguimiento de la cinética de fermentación de los caldos de sorgos dulces y forrajeros con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	44
Figura 5.1 Relación entre la el volumen de caldo obtenido en molienda y la concentración de azúcar para los caldos del 3°, 4° y 5° corte de 5 variedades de sorgos dulces y forrajeros .....	52
Figura 5.2 Comparación de la concentración relativa de carbohidratos ( $\text{g L}^{-1}$ ) en los caldos de 5 variedades de sorgos dulces y forrajeros al 4° corte. Las barras verticales representan el error estándar .....	57
Figura 5.3 Perfil de consumo promedio de AANL ( $\text{mg L}^{-1}$ ) durante la fermentación de caldos de 5 variedades de sorgos dulces y forrajeros al 4° corte.....	62
Figura 5.4 Perfil de consumo promedio de fructosa ( $\text{g L}^{-1}$ ) durante la fermentación de caldos de 5 variedades de sorgos dulces y forrajeros al 4° corte.....	63
Figura 5.5 Perfil de consumo de glucosa ( $\text{g L}^{-1}$ ) durante la fermentación de caldos de 5 variedades de sorgos dulces y forrajeros al 4° corte .....	64
Figura 5.6 Perfil de producción de etanol ( $\text{mL L}^{-1}$ ) durante la fermentación de caldos de 5 variedades de sorgos dulces y forrajeros al 4° corte .....	65
Figura 5.7 Perfil de producción de alcoholes superiores (ppm) durante la fermentación de caldos de 5 variedades de sorgo dulce .....	66
Figura 5.8 Perfil de pH durante la fermentación de mezclas compuestas de caldos de sorgos dulces y forrajeros enriquecidas con fuentes nitrogenadas .....	69
Figura 5.9 Perfil de consumo de AANL ( $\text{mg L}^{-1}$ ) durante la fermentación de mezclas compuestas de caldos de sorgos dulces y forrajeros enriquecidas con fuentes nitrogenadas.....	70
Figura 5.10 Perfil de consumo de azúcares ( $\text{g L}^{-1}$ ) durante la fermentación de mezclas compuestas de caldos de sorgos dulces y forrajeros enriquecidas con fuentes nitrogenadas.....	71
Figura 5.11 Perfil de producción de etanol ( $\text{mL L}^{-1}$ ) durante la fermentación de mezclas compuestas de caldos de sorgos dulces y forrajeros enriquecidas con fuentes nitrogenadas.....	72

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1: Energías alternativas clasificadas por tipo de fuente .....	5
Tabla 3.1: Emisiones relativas (% comparado con respecto a 100% gasolina) en función de la concentración de etanol) .....	16
Tabla 3.2: Balance de masa y energía para la conversión de glucosa a etanol.....	19
Tabla 3.3: Clasificación de los aminoácidos del mosto por orden de asimilación durante la fermentación .....	25
Tabla 3.4: Clasificación de los aminoácidos del mosto basada en el efecto sobre el rendimiento de la fermentación .....	26
Tabla 3.5: Comparación de caña de azúcar, remolacha y sorgo dulce respecto a cualidades agronómicas para producción de bioetanol .....	32
Tabla 4.1: Identificación de las 5 variedades de sorgos dulces y forrajeros .....	36
Tabla 4.2: Programa de temperaturas para el horno utilizado en la determinaci ...	46
Tabla 5.1 Parámetros de caracterización agronómica de los caldos de 5 variedades de sorgos dulces y forrajeros a lo largo de 5 cortes semanales consecutivos.....	53
Tabla 5.2 Parámetros de caracterización química para los caldos de 5 variedades de sorgos dulces y forrajeros al 4° corte <sup>1</sup> .....	54
Tabla 5.3 Parámetros termodinámicos y cinéticos promedio que describen el comportamiento de las fermentaciones de caldos de 5 variedades de sorgos dulces y forrajeros al 4° corte <sup>1</sup> .....	60
Tabla 5.4 Parámetros termodinámicos y cinéticos promedio que describen el comportamiento de las fermentaciones de mezclas compuestas de caldos de sorgos dulces y forrajeros enriquecidas con fuentes nitrogenadas <sup>1</sup> .....	68

## ABREVIATURAS

°	Grados
®	Marca registrada
<	Menor que
>	Mayor que
%	Porcentaje
3P	3-fosfato
6P	6-fosfato
AANL	Alfa amino nitrógeno libre
AG	Ácido gálico
AMG	Amiloglucosidasa
AOAC	Association of Official Analytical Chemists (Asociación de Químicos Analistas Oficiales)
ATCC	American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo)
°C	Grado Celsius
CEE	Comunidad Económica Europea
CG	Cromatografía de gases
cm	Centímetro
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
E10	Mezcla etanol-gasolina (10:90 v/v)
E15	Mezcla etanol-gasolina (15:85 v/v)
E85	Mezcla etanol-gasolina (85:150 v/v)
E95	Mezcla etanol-gasolina (95:5 v/v)
EC #	Enzyme Comision Number (Número de la Comisión de Enzimas)
eq	equivalente
FID	Flame ionization detector (detector de ionización de flama)
g	Gramo

GAP	General Aminoacid Permease (Permeasa General de Aminoácidos)
GC-FID	Gas Chromatography with Flame Ionization Detector (Cromatografía de Gases con Detector de Ionización de Flama)
h	Hora
ha	Hectárea
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución)
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change (Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático)
kg	kilogramo
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Fosfato de Potasio Monobásico
$\text{KIO}_3$	Yodato de Potasio
kJ	Kilojoule
L	Litro
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
M	Molar
Mt	Megatonelada
MTBE	Metil-terbutil-éter
Mtoe	Mega tonne of oil equivalent (mega tonelada equivalente de crudo)
N	Normal
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado
$\text{NAD}^+$	Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Dinucleótido de Nicotinamida Adenina)
NaOH	Hidróxido de Sodio
nm	Nanómetro

OPEP	Organización de Países Exportadores de Petróleo
pH	Potencial hidrógeno
ppm	Partes por millón
p/v	Peso:volumen
RCDB	Randomized Complete Block Design (diseño en bloques completamente aleatorizado)
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
ton	Tonelada
U	Unidades de actividad enzimática
UNFCCC	United Nations Framework Convention on Climate Change (Convención Marco de las Naciones Unidas sobre Cambio Climático)
v/v	Volumen:volumen
μm	Micrómetro
μM	Micromolar
μL	Microlitro

## RESUMEN

El interés reciente en proyectos que involucren el desarrollo tecnológico de fuentes alternativas de energía, entre ellos los biocombustibles, responde a dos factores principales: el agotamiento de las fuentes de energías de origen fósil, y la necesidad de reducir las emisiones de CO<sub>2</sub> que contribuyen al calentamiento global. El uso de etanol como combustible para el sector transporte ha resultado una estrategia atractiva para lograr el remplazo gradual de los combustibles fósiles.

La producción de bioetanol a partir de caldos azucarados de sorgo dulce (*Sorghum bicolor* L. Moench) presenta ventajas como materia prima con respecto a los materiales almidonosos y lignocelulósicos: no necesita pretratamiento para que los azúcares estén disponibles para la fermentación por levadura lo cual involucra un menor gasto energético en el proceso y se puede adaptar a producir grandes volúmenes de biomasa en zonas marginadas y escasas de agua de irrigación o lluvias.

En este estudio se evaluó la factibilidad técnica de producir etanol a partir de caldos de 5 variedades de sorgos dulces y forrajeros.

Se concluyó que las variedades que rindieron más etanol en un proceso estándar de producción a partir de caldos azucarados fueron Río, M18 y Della. La variedad que resultó sobresaliente fue Della con un rendimiento de 3150 L ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> considerando 3 ciclos de producción por año y realizando el corte 4 semanas después de la floración. Dicho rendimiento podría verse aumentado en un 10% si se realizara el corte 5 semanas después de la floración.

Se determinó que la adición de amiloglucosidasa y fuentes externas de nitrógeno no modifica los rendimientos de fermentación de caldos de sorgos dulces y forrajeros, aunque estos resultados son dependientes de la variedad de sorgo que se esté utilizando.



# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

### 1.1. PANORAMA ENERGÉTICO: LA CRISIS DE LOS COMBUSTIBLES FÓSILES

Todas las actividades que realizamos en nuestra vida cotidiana requieren energía; desde la construcción de grandes estructuras hasta la producción de nuestros alimentos demandan una cierta cantidad de esta energía para poder transformar los elementos que encontramos en la naturaleza hasta productos o servicios que puedan ser aprovechados por el ser humano. La primer ley de la termodinámica enuncia que la energía no se puede crear ni destruir solo transformarse, lo que nos lleva a pensar: ¿De donde viene la energía que mueve a nuestro mundo?

Nuestras economías actuales se mueven indudablemente sobre la base de energías fósiles. Lo anterior se ve reflejado en las estadísticas ilustradas en las Figuras 1.1 y 1.2 donde se presenta la cantidad y tipo de energía producida a nivel mundial; las unidades utilizadas son el Mtoe (mega toneladas equivalentes de crudo) que representa la energía liberada por la combustión de un millón de toneladas de crudo.

La Figura 1.1 muestra como la producción energética global se ha incrementado en un 92% con respecto a la década de los 70's. Sin embargo, la aportación de cada fuente de energía ha sido diferente en la evolución del rompecabezas global.

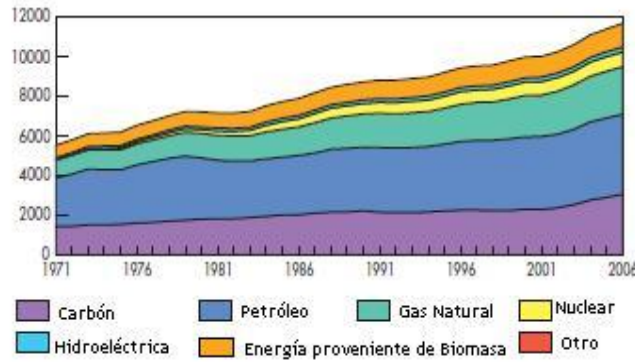


Figura 1.1: Evolución de 1971 a 2006 de la cantidad total de energía primaria producida a nivel mundial dividida por tipo de combustible (Mtoe).

Fuente: International Energy Agency (2008)

Analizando la Figura 1.2 se puede observar como en el período 1973-2006 la proporción de energía que proviene de fuentes fósiles (petróleo, gas y carbón) se ha reducido alrededor de 6%. Lo anterior indica que ha habido un cambio significativo en la oferta global de energía con tendencias al desplazamiento de las fuentes fósiles por energías tales como la nuclear o aquella que proviene de la biomasa.

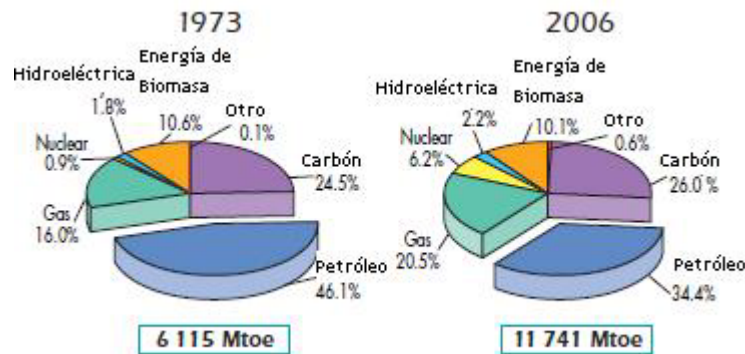


Figura 1.2: Proporción de la energía producida a nivel mundial según el tipo de combustible en 1973 y 2006.

Fuente: International Energy Agency (2008)

No solo es importante saber cuanta energía producimos, sino también conocer las tendencias en consumo de energía. La Figura 1.3 indica que el consumo energético global ha aumentado en un 66% en el período 1973-2006, lo cual pondría en

evidencia que la cantidad de energía que se ha producido en el mundo ha aumentado a un ritmo más acelerado comparado con la velocidad de consumo.

Sin embargo, si se toman en cuenta las tasas de crecimiento a una escala menor se puede observar donde radica realmente el problema de la oferta y la demanda de energéticos. Para el período 1986-1997 hubo una producción promedio de 180 Mtoe año<sup>-1</sup>, manteniéndose relativamente estable este valor para el período 1997-2004 (200 Mtoe año<sup>-1</sup>). Por el lado del consumo observado para el período de 1987-1998 hubo un consumo promedio de 80 Mtoe año<sup>-1</sup>, mientras que en el período de 1999-2004 esta razón de consumo aumentó hasta 200 Mtoe año<sup>-1</sup>.

Lo anterior nos indica que las tasas de consumo están rebasando las tasas de producción de energía lo cual generaría una eventual ralentización del crecimiento por saturación de la capacidad de producción instalada.

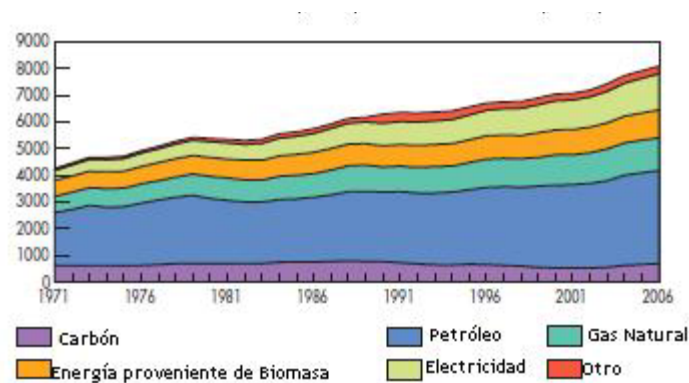


Figura 1.3: Evolución de 1971 a 2006 de la cantidad de energía total consumida a nivel mundial dividida por tipo de combustible (Mtoe).

Fuente: International Energy Agency (2008)

Al igual que en el caso de la producción energética, el consumo presenta un cambio notorio en las proporciones de utilización de cada una de las fuentes energéticas. En la Figura 1.4 se puede observar como ha habido una reducción del 9% en la proporción del consumo de energía proveniente de fuentes fósiles para optar por fuentes tales la electricidad producida por plantas hidroeléctricas y nucleares.

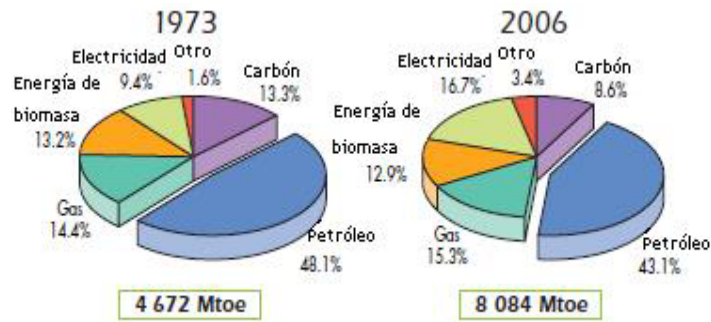


Figura 1. 4: Proporción de la energía consumida a nivel mundial según el tipo de combustible en 1973 y 2006.

Fuente: International Energy Agency (2008)

Los combustibles fósiles generados por la naturaleza a lo largo de millones de años están siendo consumidos con tal intensidad que, con las estimaciones más optimistas (sin crecimiento del consumo en los próximos años), se agotarán en 90 años para el petróleo, 125 años para el gas natural y 615 años para el carbón. Puede parecer que el período es largo debido a la velocidad actual del desarrollo tecnológico, pero la problemática de la combustión del carbón es mayor debido a la gran contaminación que produce. Su alto contenido en azufre provoca la generación de óxidos causantes de la lluvia ácida. La lluvia ácida ha causado el deterioro de muchos bosques del centro y norte de Europa y la lixiviación de minerales asociados a los suelos de alta calidad. Los programas de la Comunidad Económica Europea incentivan el uso de tecnologías limpias de combustión que funcionen emitiendo menos contaminantes a la atmósfera. No obstante el dióxido de carbono es inevitable y el uso de técnicas de retención de los óxidos de nitrógeno y azufre redundan en el precio de la energía que se seguirá produciendo (Ortega, 2002).

## 1.2. FUENTES ALTERNATIVAS DE ENERGIA

Las energías renovables se pueden definir como aquéllas que son inagotables desde el punto de referencia del período de existencia de la humanidad, tengan o no su origen en el sol. Las fuentes de energías renovables son la radiación solar, la atracción gravitacional de la luna y el sol, y el calor interno de la tierra (Ortega,

2002). La energía renovable, llamada también energía alternativa o blanda, abarca una serie de fuentes energéticas que se regeneran de manera natural (Tabla 1.1).

*Tabla 1.1: Energías alternativas clasificadas por tipo de fuente.*

Fuente	Efecto	Producto	Tecnología energética	Fin		
RADIACIÓN SOLAR	Evaporación	Lluvia	Energía hidráulica	TRABAJO REALIZADO + CALOR DISIPADO		
	Viento				Energía eólica	
		Olas			Energía de las olas	
	Fotosíntesis		Biomasa vegetal		Combustión	
			Carbón, gas, petróleo		Combustión	
			Biocombustibles: aceites, hidrocarburos, etc.		Combustión	
			Residuos orgánicos de biomasa animal y vegetal		Biogás por digestión anaerobia	
			Biomasa vegetal con alto contenido en azúcares		Etanol por fermentación alcohólica	
		Residuos sólidos agrícolas y urbanos				Gasificación
						Pirólisis
						Combustión
					Energía solar térmica	
					Energía solar fotovoltaica	
	Atracción solar y lunar	Mareas			Energía mareomotriz	
Calor interno terrestre	Aguas termales	Vapor en superficie	Energía geotérmica de alta entalpía			
			Energía geotérmica de baja entalpía			

Fuente: Ortega (2002)

Las energías renovables constituyen una fuente de energía limpia y segura que puede aportar un porcentaje importante a la demanda de energía mundial. Sin embargo, no pueden competir actualmente con las fuentes convencionales de energía por lo que precisan de un apoyo sustancial de los gobiernos. La energía eólica es la que experimenta una expansión más rápida, y sus costos son cada vez más bajos, de modo que se prevé que en los próximos 10 años pueda igualar los precios de los combustibles fósiles, aunque todavía tendrá el inconveniente de ser

una energía intermitente. La energía hidroeléctrica es competitiva pero ha llegado ya a la saturación en las centrales de gran tamaño (Ortega, 2002).

El papel que juegan las energías renovables puede medirse en función del ahorro en CO<sub>2</sub> que proporcionan, la disminución del efecto invernadero y la diversificación de la energía. La combinación de las diversas políticas de incentivación de los gobiernos hacia las energías renovables acelerará el crecimiento de este mercado, al ir avanzando las tecnologías con la consiguiente disminución de sus costes y una penetración creciente en el mercado (Ortega, 2002).

### **1.3. BIOENERGÍA**

Según Jiménez (1991) el término biomasa comprende a las materias hidrocarbonadas, no fósiles, en las que mediante el proceso básico de la fotosíntesis, se ha producido la reducción y fijación del CO<sub>2</sub>. La biomasa útil para su aprovechamiento energético puede provenir de cultivos destinados a tal fin (cultivos energéticos) o de residuos orgánicos de procedencia ganadera, agrícola, forestal, urbana, o industrial.

Se entiende por biocombustible aquel combustible de origen biológico que no se ha fosilizado (Marcos, 2001). Los biocombustibles son líquidos combustibles producidos a partir de carga de biomasa mediante una serie de procesos químicos. Los biocombustibles más importantes son el biodiesel (éster metílico producido a partir de un aceite vegetal o animal de calidad similar al gasóleo) y el bioetanol (Creus, 2004).

Para considerar que una energía de biomasa sea renovable se requiere que no se consuma más energía de la que se regenera ni más de la necesaria para mantener las condiciones de la vida, que su aprovechamiento por combustión no produzca daños al medio ambiente, y que se apliquen preferentemente los conceptos de

reducción, reciclaje y reutilización. Dentro de estas fuentes de energía renovables aparece, en los primeros lugares, el alcohol (Ortega, 2002).

### **1.3.1. NICHOS EN EL USO DE BIOETANOL**

La obtención de este alcohol empieza mediante la selección de vegetales ricos en azúcares fermentables con su posterior fermentación. Hay tres principales caminos para producir alcohol etílico a partir de materiales biológicos; todos ellos incluyen una primera fase de fermentación por levaduras, seguida de una posterior destilación mediante la aplicación de calor. La duración de cada sistema es distinta, así como la producción de alcohol y su costo, dependiendo del elemento inicial, que puede ser un producto azucarado, almidón o material celulósico (Camps y Marcos, 2008).

Las plantas de mayor interés alcoholígeno son las ricas en carbohidratos. De modo que los residuos y productos agrícolas fermentables son de tres tipos, en función de su composición en lo que se refiere al tipo de hidratos de carbono (Ortega, 2002):

- Azucaradas: con alto contenido en monosacáridos y disacáridos.
- Amiláceas: con alto contenido en el polisacárido almidón.
- Lignocelulósicas: con alto contenido en celulosa y hemicelulosa.

Las plantas azucaradas y las amiláceas requieren solamente un tratamiento mecánico para liberar los monosacáridos y polisacáridos fermentables de las envolturas de celulosa, hemicelulosa y lignocelulosa que los rodean; el residuo de este tratamiento mecánico es el bagazo. Los azúcares obtenidos así son directamente fermentables, sin embargo, el almidón requiere la hidrólisis previa para su descomposición en moléculas de glucosa, esta hidrólisis se lleva a cabo mediante la adición de amilasas y amiloglucosidasas obtenidas a partir de microorganismos. Si se quiere aprovechar el potencial energético de la lignocelulosa

es necesario realizar pretratamientos químicos de hidrólisis ácida o básica para romper la estructura polimérica de la lignina (Ortega, 2002).

El método más sencillo es el que usa un producto azucarado, como puede ser caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) o sorgo dulce (*Sorghum bicolor*). Como el rendimiento del cultivo es alto, es también el que produce mayor cantidad de alcohol por unidad de superficie, aunque esto no es completamente cierto en el caso de la caña, pues habría que tener en cuenta que este cultivo utiliza el suelo los doce meses del año (Camps y Marcos, 2008). Esquemáticamente el proceso de obtención de monosacáridos fermentables sería el reflejado en la Figura 1.5.

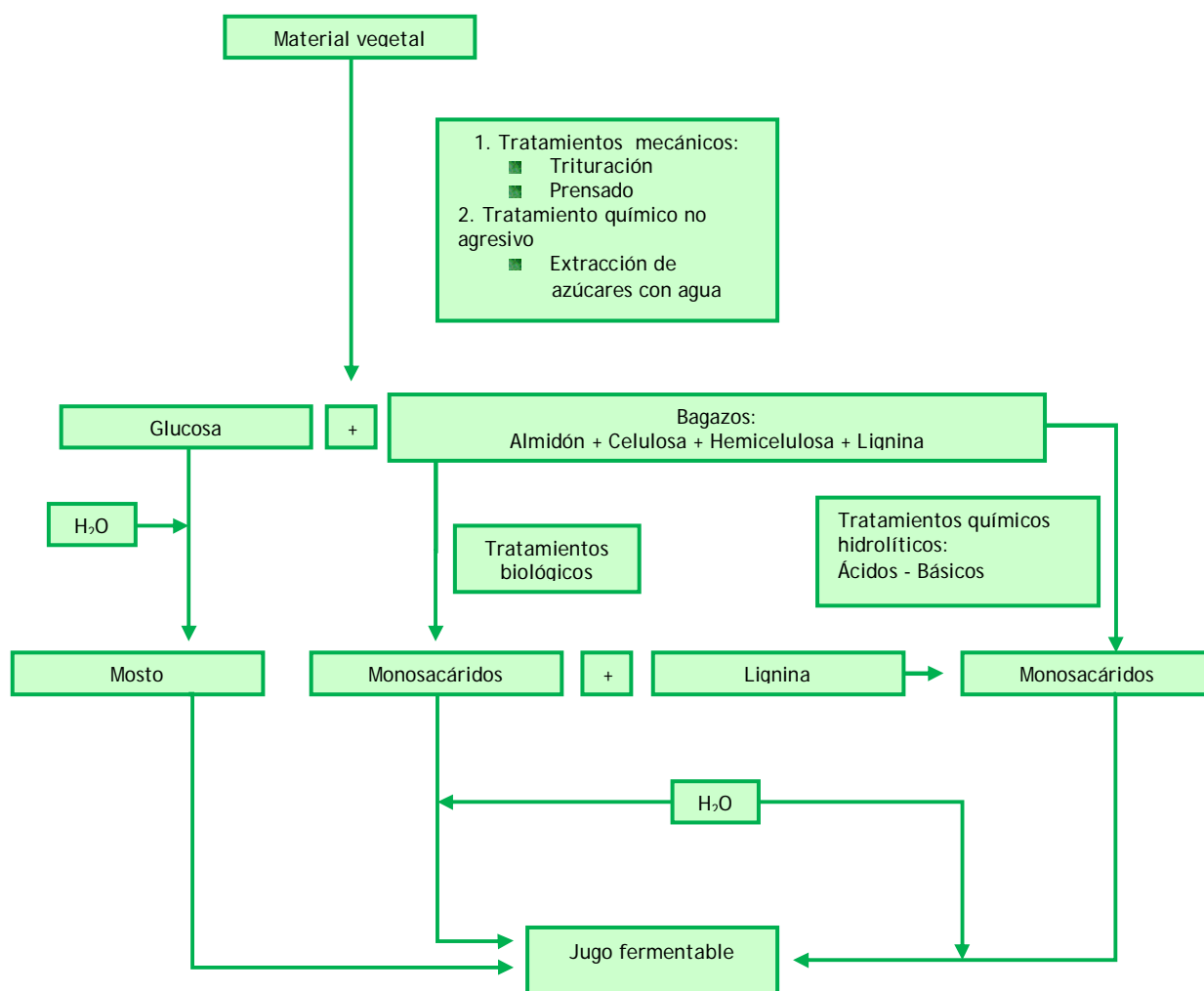


Figura 1.5: Esquemización de los tratamientos previos a la fermentación alcohólica.

Fuente: Ortega (2002)



## 1.4. ENERGÍA Y MEDIO AMBIENTE

En los años recientes se ha incrementado la preocupación de la comunidad internacional en los temas ambientales, notablemente en el cambio climático. Lo anterior se ve reflejado en la creación de tratados tales como la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (UNFCCC por sus siglas en inglés) la cual fue firmada por la mayoría de los países miembros de las Naciones Unidas para considerar las acciones que pueden ser llevadas a cabo para reducir el calentamiento global.

Dentro del marco de referencia de las actividades humanas que contribuyen al efecto invernadero, la principal es la combustión de energéticos fósiles cuyos productos principales son el CO<sub>2</sub> y agua. Lo anterior nos lleva a pensar que la cantidad de energía que proviene de fuentes fósiles (Figura 1.1) estará asociada a una cantidad proporcional de CO<sub>2</sub> emitido a la atmósfera. En la Figura 1.6 se puede observar la situación de las emisiones de CO<sub>2</sub> a nivel mundial en cuanto a cantidad y origen.

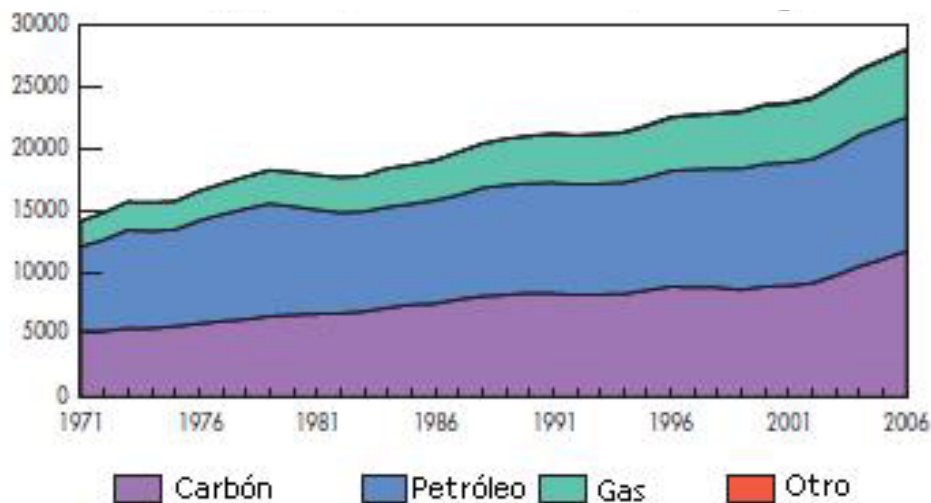


Figura 1.6: Evolución de 1971 a 2006 de las emisiones mundiales de CO<sub>2</sub> (Mt de CO<sub>2</sub>) de acuerdo a la fuente energética de procedencia.

Fuente: International Energy Agency (2008)

La Figura 1.6 muestra como las emisiones de CO<sub>2</sub> (expresadas como megatoneladas) han ido en franco aumento en los últimos 30 años para pasar de 15640 Mt en 1973 a 28003 Mt en 2006, lo que representa un incremento de aproximadamente 80%. Lo anterior pudiera parecer contradictorio con la información presentada por las Figuras 1.2 y 1.4 según las cuales la proporción de combustibles fósiles, producida y consumida, se ha visto reducida con respecto a los años 70's. Sin embargo, la evolución en la producción y consumo de éstos combustibles fósiles ha seguido una tendencia creciente (Figuras 1.1 y 1.3) lo cual da como resultado global que la cantidad de emisiones aumente.

Según los estudios realizados en 2001 por el Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC por sus siglas en inglés), existe una relación entre la cantidad de emisiones antropogénicas de CO<sub>2</sub> y el aumento de la temperatura media global observada durante los últimos años. En la Figura 1.7 se muestra el aumento de la temperatura promedio global durante el período 1992-2010.

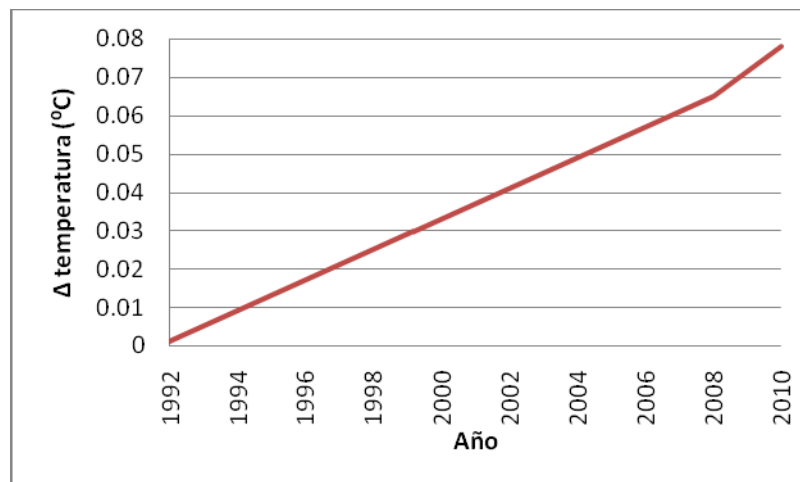


Figura 1. 7: Aumento en la temperatura media global para el período 1992-2010 medido como fluctuaciones de la temperatura promedio global.

Fuente: Intergovernmental Panel on Climate Change (2001)

Debido a los resultados de los estudios publicados por la IPCC, se realizó una adición importante a la UNFCCC: la firma del llamado "*Protocolo de Kioto*" en la ciudad de Kioto, Japón el 11 de Diciembre de 1997. Dicho protocolo tiene como meta reducir

un 5.2 % de las emisiones globales de gases de efecto invernadero con respecto a los niveles de 1990 para el período 2008-2012. Para ello contiene objetivos legalmente obligatorios para que los países que suscribieron dicho acuerdo reduzcan las emisiones de los 6 gases de efecto invernadero de origen humano como el dióxido de carbono, metano, óxido nitroso, hidrofluorocarbonos, perfluorocarbonos, y hexafluoruro de azufre.

## 1.5. CONTRIBUCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Como se mostró anteriormente, ha habido una tendencia decreciente en la utilización de combustibles fósiles tales como el petróleo crudo y un aumento en la utilización de fuentes renovables de energía, sin embargo lo anterior no ha sido suficientes para reducir las emisiones de CO<sub>2</sub> tal y como se ha estipulado en el protocolo de Kioto.

Lo anterior lleva a buscar nuevas esquemas energéticos que puedan seguir cubriendo las demandas de la población y al mismo tiempo reducir las emisiones de CO<sub>2</sub>. La utilización de las energías renovables tales como la energía eólica, solar o bien, la energía que proviene de la biomasa que puede ser transformada mediante procesos que permitan su utilización como combustible, tal es el caso del bioetanol, del biodiesel y del gas de síntesis.

Dentro del contexto de la realización de este trabajo se pretenderá el desarrollo de conocimiento y tecnología para el aprovechamiento de energías renovables específicamente en el área de bioetanol.

Debido a las razones expuestas en los apartados anteriores se deduce que la puesta en marcha de proyectos que favorezcan el desarrollo de las energías renovables, tales como el bioetanol, tiene incentivos tales como:

- La reducción en la dependencia energética de combustibles fósiles.
- La reducción de emisiones debidas a combustibles fósiles con lo que se ayuda al cumplimiento de los objetivos fijados en el protocolo de Kioto.
- La activación de sectores económicos que típicamente no están involucrados en economías basadas en energéticos fósiles.

## CAPÍTULO 2

### OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

#### 2.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo de investigación fue el de comparar el desempeño, tanto agronómico como tecnológico, de 3 variedades de sorgo dulce y 2 de sorgo forrajero en un proceso estándar de producción de bioetanol a partir de caldos azucarados.

#### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar el rendimiento agronómico, expresado como litros de jugo por hectárea y °Brix en el jugo, de las variedades de sorgos dulces y forrajeros.
- Realizar la caracterización química de los caldos de los sorgos dulces y forrajeros y correlacionar los parámetros de caracterización con los resultados finales de proceso.
- Comparar el rendimiento y eficiencia de producción de etanol a partir de caldos de 5 variedades de sorgos dulces y forrajeros por fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24858.
- Comparar los distintos perfiles de consumo de azúcares y alfa amino nitrógeno libre (AANL), producción de etanol y alcoholes superiores para la fermentación de las variedades de sorgos dulces y forrajeros.
- Evaluar el efecto de la adición de amiloglucosidasa (AMG) sobre la composición de los caldos de sorgo dulce, especialmente en términos de azúcares fermentables.
- Evaluar el efecto que tiene la adición de fuentes externas de nitrógeno sobre el rendimiento y cantidad de etanol de producido por fermentación de

mezclas compuestas de caldos de sorgos dulces y forrajeros con *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24858.

## CAPÍTULO 3

### MARCO TEÓRICO

#### 3.1. BIOETANOL COMO COMBUSTIBLE

El uso del etanol en motores de combustión interna fue investigado por primera vez en 1897 (Rothman, 1983). Henry Ford diseñó el modelo T para funcionar con etanol en 1908 pero el incremento en los impuestos al producto limitó su uso. El concepto de emplear etanol como combustible fue reintroducido durante la escasez de combustibles durante las dos Guerras Mundiales (Mahy, 2003). En 1973, la OPEP cuadruplicó en costo de compra del petróleo crudo (Tahezadeh, 1999), lo que desató la promoción del etanol como combustible alternativo para motores de combustión. Sin embargo, el etanol, como combustible alternativo, no se ha posicionado en el mercado de los combustibles de la misma manera en que lo han hecho las mezclas de etanol/gasolina.

Durante los últimos 30 años, el etanol ha sido utilizado ampliamente para mezclarlo con gasolina en países como Estados Unidos y Brasil. En Estados Unidos, el etanol es generalmente mezclado en una proporción de 1:10 con gasolina. Al principio esta mezcla se conocía como gasohol, pero ahora es comúnmente conocida como E10. El propósito de mezclar una pequeña cantidad de etanol en la gasolina es oxigenar el combustible para obtener combustiones que más limpias, es decir que produzcan menos cantidad de monóxido de carbono e hidrocarburos (Browner, 2000).

El aditivo oxigenado para gasolina más común es el metil tert-butil éter (MTBE), pero éste resulta ser un compuesto extremadamente tóxico que se ha encontrado como contaminante de mantos acuíferos. Si el etanol remplazara al MTBE como aditivo, se generaría un mercado de 45 millones de  $\text{m}^3\text{año}^{-1}$  tan solo en los Estados

Unidos (Mahy, 2003), que sobrepasa por mucho a la capacidad de producción instalada en dicho país.

Para que la gasolina sea considerada como oxigenada debe contener al menos 2.7% de oxígeno en peso. Lo anterior puede ser logrado mezclando 15% en volumen de MTBE o bien 7.5% en volumen de etanol; sin embargo, se logran resultados muy diferentes en cuestión de emisiones como se muestra en la Tabla 3.1 (Mahy, 2003).

**Tabla 3.1:** Emisiones relativas (% comparado con respecto a 100% gasolina) en función de la concentración de etanol

% Etanol en el combustible	% Monóxido de Carbono en emisiones	% Hidrocarburo en emisiones	% Óxidos de Nitrógeno en emisiones
100	29	71	86
95	36	79	86
24	50	87	120
12	81	96	92

Fuente: Faiz *et al.* (1996)

Es importante notar que las emisiones de monóxido de carbono, hidrocarburos y óxidos de nitrógeno disminuyen conforme aumenta la concentración de etanol. En Tailandia se ha demostrado que las emisiones de benceno, tolueno y xileno se ven reducidas en los automóviles impulsados por E10 o E15 (Leong, 2002). El aumento de estas emisiones es un problema de salud pública importante debido a los efectos provocados (incluyendo leucemia) por inhalación a largo plazo de estos compuestos (U.S. EPA, 1993).

Es importante también considerar que el E10 es considerado como un combustible oxigenado y no un combustible alternativo. El E85, E95 y el biodiesel contienen proporciones lo suficientemente grandes de biocombustible como para ser



considerados como combustibles alternativos. Lo anterior no sucede con el E10 (EIA, 1998).

Así, el etanol es un combustible con el que es fácil trabajar ya que es líquido a temperatura ambiente (25 °C), puede ser almacenado en tanques para combustible convencional, es menos tóxico que muchos otros combustibles y es fácil de mezclar con gasolina en cualquier etapa del proceso de producción/distribución.

### 3.2. INDUSTRIA DEL ETANOL: PRODUCCIÓN A PARTIR DE CEREALES

En el 2006, se produjeron 31 millones de m<sup>3</sup> de etanol en todo el mundo (Berg, 2001). La mayor parte de la producción viene de Brasil y de Estados Unidos. En el 2006, 14 millones de m<sup>3</sup> de etanol se produjeron en Estados Unidos (Mahy, 2003).

Esto significa que ni toda la capacidad de producción de etanol de este país es suficiente para que se formulen gasolinas E10.

Se prevé que esta insuficiencia en la oferta de etanol se incremente conforme el MTBE se vaya sacando del mercado y conforme haya más demanda de etanol como aditivo oxigenante. Lo anterior requerirá un aumento dramático en la capacidad de producción de etanol y más aún la eficientización de los procesos actuales de producción (Minteer, 2004).

La relación eficiencia/costo en la producción de etanol es una función de la localización de la planta, la materia prima, la escala de producción y el uso final. La elección de la materia prima depende del país. Brasil ha utilizado caña de azúcar como materia prima. Francia ha intentado utilizar alcachofas, remolacha azucarera y trigo como materias primas potenciales. Suecia usa su excedente de trigo para producir la gasolina al 6% de etanol. En Estados Unidos se ha determinado que el maíz es una de las mejores materias primas (Shapouri, 2002).

**Comment [ue1]:** Checar estadísticas nuevas de producción de etanol de fuentes confiables

El punto que comparten todas las materias primas mencionadas anteriormente es la presencia de algún o algunos tipos de azúcares en su composición los cuales pueden ser transformados a etanol mediante procesos fermentativos.

### 3.2.1. CONVERSIÓN DE ALMIDÓN A ETANOL: GENERALIDADES

De manera general existen dos procesos que comparten la misma base biológica para la conversión de almidón en etanol, la molienda seca o la molienda húmeda. En ambos casos el almidón es convertido, por la acción de la temperatura y de enzimas, a glucosa la cual es posteriormente fermentada por levaduras a etanol. El almidón es una mezcla de dos polímeros de glucosa: amilosa, una molécula lineal con enlaces  $\alpha$ 1-4, y amilopectina, una molécula ramificada con los mismos enlaces  $\alpha$ 1-4 pero adicionalmente contiene enlaces  $\alpha$ 1-6 (Boyer, 2003).

El almidón forma gránulos cristalinos dentro de la semilla. Los gránulos son insolubles en agua y poseen interiores hidrofóbicos. Al calentar una suspensión acuosa de almidón se debilitan los puentes de hidrógeno dentro y entre las moléculas de almidón, causando un incremento de volumen en los gránulos debido a la absorción de agua. Este proceso irreversible donde se pierde la cristalinidad interna es conocido como gelatinización (Kelsall, 2003).

El almidón gelatinizado es convertido a glucosa por dos enzimas,  $\alpha$ -amilasa y amiloglucosidasa (AMG). Primero, el polímero de almidón es hidrolizado por la  $\alpha$ -amilasa para formar cadenas más pequeñas llamadas dextrinas en un proceso que se conoce como licuefacción debido a que el rompimiento del polímero causa un adelgazamiento de la solución gelatinizada. Finalmente, las dextrinas son degradadas a glucosa por la acción de la amiloglucosidasa. Esta biocatálisis que libera azúcares simples se denomina sacarificación (Power, 2003).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un organismo especializado en fermentación con aproximadamente un 45% de sus proteínas celulares dedicadas a

los procesos de glucólisis y fermentación de etanol (Futcher, 1999). La glucosa y la maltosa son fermentadas a etanol por *Saccharomyces cerevisiae* utilizando la misma ruta que se sigue para producir bebidas alcohólicas (Russel, 2003).

Por cada unidad de glucosa fermentada se obtienen dos moléculas de etanol y dos moléculas de CO<sub>2</sub>. Como se muestra en la Tabla 3.2 el rendimiento teórico de esta reacción es de 0.51 g de etanol por cada gramo de glucosa que se fermenta. El rendimiento real es del 90 al 95% con respecto al rendimiento teórico debido a que una pequeña parte de la glucosa es integrada como masa celular y se utiliza en la síntesis de otros subproductos como glicerol, intermediarios del ciclo del ácido cítrico y otros alcoholes de alto peso molecular (Nichols *et al.* 2004).

**Tabla 3.2:** Balance de masa y energía para la conversión de glucosa a etanol

Reacción 1Glucosa → 2Etanol + 2CO <sub>2</sub>	Masa (g)	Entalpía de Combustión (KJ/mol)
-1 Glucosa	180	2807
+2 Etanol	2(46)	2(1369)
+2 CO <sub>2</sub>	2(44)	0
Suma	0	-69
Rendimiento (etanol/glucosa)	0.51 g/g	0.975 KJ/KJ

Fuente: Roels (1983)

Desde un punto de vista energético se comparan los calores de combustión de reactivos y productos (Tabla 3.2). La conversión de glucosa a etanol tiene un rendimiento teórico que alcanza un 98% lo que significa que la fermentación es un proceso energéticamente favorable para la levadura. En otras palabras, la conversión de glucosa a etanol es un excelente proceso para la generación de combustible, ya que casi toda la energía de la glucosa es retenida en el producto de fermentación (Nichols *et al.* 2004).

### 3.2.2. PERSPECTIVAS Y RETOS: EL APROVECHAMIENTO DE LA FIBRA

Las perspectivas y los retos que se están enfrentando en la industria de producción de bioetanol se centran principalmente en la manera en que se puede optimizar la utilización del material azucarado y la parte no fermentable del grano.

En el proceso de molienda húmeda se busca desarrollar nuevos productos de alto valor agregado a partir del almidón así como darle un mejor uso a la fibra. En el caso de la molienda seca se busca fraccionar el grano antes de entrar al proceso para obtener las mismas ventajas que en molienda húmeda, además de modificar las condiciones del proceso para reducir el gasto energético (Dien y Belcher, 2005).

En la industria de la molienda húmeda se busca convertir el residuo de menor valor (el germen a la cual se le ha extraído el aceite y fibras asociadas al pericarpio) en etanol. Esto representa un área de oportunidad para la investigación ya que permitiría incrementar el valor de las fibras al convertirlas en etanol en lugar de utilizarlas como alimento para ganado. Las fibras están compuestas de 11-23% (porcentaje en peso, base seca) de almidón residual del proceso de molienda húmeda, 12-18% de celulosa, 18-28% de xilanos, y 11-19% de arabinanos. Las levaduras tradicionales no realizan fermentación de xilosa y arabinosa (Dien y Jeffries, 2004). Un esquema en el cual se aprovecharan las fibras para la producción de etanol, aumentaría el rendimiento del mismo en un 10% además que generaría coproductos con un mayor valor proteico (Gulati, 1997).

El remplazo gradual de la gasolina por el etanol en vehículos automotores requerirá que se desarrollen procesos a más bajo costo. Las estrategias actuales se basan en la utilización de materias primas más abundantes que permitan reducir dichos costos, en específico, la utilización de material lignocelulósico. Como se mencionó anteriormente, la fibra del grano es una fuente posible de material celulósico que puede ser llevado a fermentación; sin embargo, existen una serie de residuos de la industria alimentaria que pueden ser aprovechados como la paja de arroz y de trigo

así como bagazo de caña de azúcar. Otros cultivos energéticos tales como pasto aguja, papel reciclado, y otros materiales maderosos pueden también ser utilizados en el proceso (Nichols *et al.* 2004).

Ahora, en este proceso de fermentación celulósica nos enfrentamos a ciertas limitaciones tecnológicas. La biomasa lignocelulósica puede ser pretratada e hidrolizada enzimáticamente para dar una mezcla de azúcares, incluyendo glucosa, galactosa, arabinosa y xilosa (Grohmann, 1997). Sin embargo, el sistema enzimático que lleva cabo esta hidrólisis resulta ineficiente y caro. Es necesario desarrollar nuevos sistemas enzimáticos que permitan pretratar efectivamente la mezcla de polímeros, así como microorganismos que puedan convertir eficientemente mezclas de múltiples azúcares a etanol (Wallace, 2004).

Un último punto importante a tratar es que, al utilizar el grano como fuente de almidón, se están dejando de lado el resto de los componentes de la planta tales como, tallos, hojas, etc., los cuales contienen una cantidad apreciable de material celulósico y almidonoso que puede igualmente ser utilizado como sustrato para la fermentación. En el caso de la planta del maíz, la parte del tallo y la mazorca contiene un 58% en peso de carbohidratos lo cual se podría fermentar y que en la mayoría de los casos se desperdicia (Wyman, 2003).

### 3.3. BIOQUÍMICA DE LA FERMENTACIÓN

#### 3.3.1. ASIMILACIÓN DE LOS NUTRIENTES DEL MOSTO

Las levaduras son organismos heterótrofos capaces de utilizar una amplia variedad de nutrientes para su crecimiento y para generar energía. Una propiedad de tales microorganismos es su capacidad de la asimilación selectiva de nutrientes. Así, la asimilación de nutrientes individuales del mosto se hace compleja al ser una respuesta de la levadura a la mezcla de los compuestos presentes. Como en todas las células, en las levaduras existen sistemas específicos que rigen la asimilación de

nutrientes individuales o de clases de nutrientes relacionados. La asimilación de carbohidratos y compuestos nitrogenados, de particular importancia a las fermentaciones, son procesos altamente regulados (Boulton y Quain, 2001).

Cuando las levaduras están presentes en ambientes en las cuales pueden elegir sus nutrientes ellas tienden a utilizar primero aquellos que se metabolizan más fácilmente. Por otra parte, la presencia de algunos nutrientes inhiben la utilización de otros. En consecuencia la asimilación de carbohidratos y las diferentes fuentes de nitrógeno presentes en el mosto son procesos ordenados (Boulton y Quain, 2001).

### 3.3.1.1. ASIMILACIÓN DE AZÚCARES

Las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* pueden utilizar una amplia variedad de carbohidratos, sin embargo existen diferencias entre cepas. Las cepas *ale* de *Saccharomyces cerevisiae* son capaces de fermentar glucosa, sacarosa, fructosa, maltosa, galactosa, rafinosa, maltotriosa y ocasionalmente trehalosa. Las cepas *lager* de *S. cerevisiae* se caracterizan por su habilidad de fermentar el disacárido melibiosa. *S. cerevisiae* variedad *diastaticus* también es capaz de utilizar dextrinas. La sacarosa se utiliza primero y la hidrólisis resultante causa un incremento temporal en la concentración de fructosa. La fructosa y la glucosa se asimilan simultáneamente, desapareciendo del mosto después de 24 horas de fermentación (Boulton y Quain, 2001).

La asimilación secuencial de los azúcares del mosto refleja el genotipo de la levadura y la manera en que éste es expresado por represión, inducción e desactivación por catabolitos de carbono. Existen acarreadores específicos para azúcares individuales; la actividad de dichos acarreadores está modulada por el espectro y la concentración de azúcares presentes en el mosto. La glucosa aparece como el sustrato preferente y cuando está presente en el medio desactiva o reprime los acarreadores para los otros azúcares (Lagunas, 1993).

Al menos dos sistemas de absorción de glucosa han sido reconocidos: los de baja afinidad y los de alta afinidad, los cuales aparentemente operan por difusión facilitada (Bisson y Fraenkel, 1983). El sistema de baja afinidad es constitutivo mientras que el transportador de alta afinidad es reprimido en presencia de altas concentraciones de glucosa (Bisson y Fraenkel 1984). Se tiene entonces que el papel del sistema de alta afinidad es proveer un mecanismo de recolección eficiente en caso de competencia por bajas concentraciones de glucosa. La represión del sistema de alta afinidad está asociado con el fenómeno general de represión por catabolito (Does y Bisson, 1989). Los acarreadores de glucosa están influenciados por diferentes componentes del medio además de la glucosa misma. Así se reporta que el agotamiento de fuentes de nitrógeno durante fermentaciones por lote causa una desactivación irreversible de los transportadores de glucosa y de otros azúcares (Lagunas *et al.*, 1982). Esta desactivación se debe aparentemente a la proteólisis de las moléculas acarreadoras (Busturia y Lagunas, 1986).

Maurico y Salmon (1992) concluyeron que los diferentes patrones de pérdida de transportadores de glucosa debido a agotamiento de nitrógeno forman la base de las diferencias en productividad de etanol en dos cepas enológicas de *S. cerevisiae*. Así la cepa que era capaz de producir una mayor cantidad de etanol tenía un segundo transportador de hexosa putativo de baja afinidad que no estaba sujeto a desactivación por agotamiento de nitrógeno. Presuntamente este fenómeno pudiera ser de importancia en la fermentación dependiendo de cuál componente del mosto límite realmente el crecimiento de la levadura.

La sacarosa es asimilada mediante una invertasa que es secretada en el periplasma celular. En *S. cerevisiae* esta enzima es codificada por el gen SUC2 e hidroliza tanto la sacarosa como la rafinosa (Carlson y Botstein, 1982). Una vez hidrolizada la fructosa y la glucosa liberadas son absorbidas vía los transportadores de glucosa. En presencia de altas concentraciones de glucosa, la invertasa es reprimida por la unión de un componente Mig1p al promotor del gen SUC2 (Neigeborn y Carlson, 1994). El mismo grupo de investigación ha sugerido que bajos niveles de glucosa

(0.1% p/v) son requeridos para la transcripción máxima del gen SUC2 (Ozcan *et al.*, 1997).

### 3.3.1.2. ASIMILACIÓN DE COMPUESTOS NITROGENADOS

La absorción de los aminoácidos en el mosto utiliza un número de permeasas, algunas específicas para aminoácidos individuales y una permeasa para aminoácidos en general (GAP por sus siglas en inglés) con una amplia especificidad de sustratos. Horak (1986) identificó 16 diferentes sistemas de transporte de aminoácidos en la levadura. De esos 12 son constitutivos y los 4 restantes están sujetos a regulación por las fuentes de nitrógeno presentes en el medio de cultivo, un fenómeno llamado represión por catabolito de nitrógeno (Grenson, 1992). En otras palabras, la presencia de una fuente exógena de ciertos nutrientes nitrogenados no permite la utilización de otros reprimiendo las enzimas responsables de su asimilación.

La permeasa GAP es de alta afinidad por lo que está sujeta a represión por catabolitos de nitrógeno. Así la máxima actividad de este acarreador solamente se tiene cuando la disponibilidad de nitrógeno se ve limitada. Olivera *et al.* (1993) concluyeron que era más probable que las permeasas específicas se vieran involucradas en la absorción de aminoácidos para rutas anabólicas sobre todo para síntesis de proteínas, mientras que la permeasa GAP, que está sujeta a represión por catabolitos de nitrógeno, tiene funciones catabólicas. Esto provee una explicación de por qué algunos aminoácidos son usados preferentemente con respecto al ión amonio (ver Tabla 3.3). Así aunque el amonio es una fuente de nitrógeno preferida para reacciones catabólicas, ciertos aminoácidos pueden ser usados primero para su directa incorporación a proteínas (Boulton y Quain, 2001).



**Tabla 3.3:** Clasificación de los aminoácidos del mosto por orden de asimilación durante la fermentación

Clase A	Clase B	Clase C	Clase D
Arginina	Histidina	Alanina	Prolina
Asparagina	Isoleucina	Glicina	
Aspartato	Leucina	Fenilalanina	
Glutamato	Metionina	Tirosina	
Glutamina	Valina	Triptófano	
Lisina		Amonio	
Serina			
Treonina			

Fuente: Pierce (1987)

Pierce (1987) clasificó los aminoácidos del mosto con base en los patrones de asimilación durante la fermentación (Tabla 3.3). Aquellos en la clase A son asimilados inmediatamente después de que la levadura entra en contacto con el mosto. Aquellos en la clase B son asimilados más lentamente, mientras que aquellos en la clase C no son utilizados sino hasta que los aminoácidos de la clase A han desaparecido del mosto. La prolina es el único miembro de la clase D y su metabolismo requiere la presencia de una oxidasa mitocondrial que no está presente durante las condiciones anaerobias de la fermentación (Wang y Brandriss, 1987).

Pierce (1987) realizó una clasificación adicional de los aminoácidos del mosto con base en su importancia como reguladores en el desarrollo de metabolitos secundarios en la fermentación (Tabla 3.4). En este caso la importancia de la concentración de aminoácidos individuales se basó en si podían ser sintetizados a partir de los carbohidratos del mosto o si la asimilación de los aminoácidos preformados en el mosto era crítica para la formación de metabolitos secundarios activos. En este respecto la concentración inicial en el mosto de los aminoácidos de la clase 1 es considerada relativamente sin importancia debido a que pueden ser

asimilados desde el mosto o bien sintetizados por catabolismo de azúcar y por reacciones de transaminación. Las deficiencias en aminoácidos de las clases 2 y 3 son de mayor relevancia. Por ejemplo, se ha demostrado la relación entre la disponibilidad de valina y la disposición de diacetilo así como la utilización de varios aminoácidos y la producción de alcoholes superiores (Inoue y Kashiara, 1995).

**Tabla 3.4:** Clasificación de los aminoácidos del mosto basada en el efecto sobre el rendimiento de la fermentación

Clase 1	Clase 2	Clase 3
Asparagina	Isoleucina	Lisina
Aspartato	Valina	Histidina
Glutamato	Fenilalanina	Arginina
Treonina	Glicina	Leucina
Serina	Tirosina	
Metionina		
Prolina		

Fuente: Pierce (1987)

### 3.3.2. METABOLISMO DE AZÚCARES EN *S. CEREVISIAE*

Todas las levaduras utilizan predominantemente la ruta glucolítica de Embden-Meyerhoff (Figura 3.1) para la generación de ATP vía fosforilación sucesiva de sustrato. Una parte del carbono proveniente de la glucosa o de otros azúcares es metabolizada vía la ruta de las hexosas monofosfato. Esta ruta es importante para la generación de NADPH utilizado en metabolismo anabólico tal como la síntesis de lípidos. Ruinenberg *et al.* (1983) calcularon que al menos el 2% de la glucosa era metabolizada vía la ruta de las hexosas monofosfato, donde el ión amonio es la fuente de nitrógeno preferida para satisfacer los requerimientos anabólicos. Para otras fuentes de carbono tales como las pentosas este porcentaje es mucho mayor.

El producto de la glucólisis, el piruvato, ocupa un punto de divergencia importante en el metabolismo. Con respecto al catabolismo de azúcares el flujo de carbono

puede ser dirigido hacia acetyl-Co A y subsecuente oxidación vía el ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa o hacia etanol vía acetaldehído. Lagunas (1986) estimó que las levaduras del género *Saccharomyces*, la mayor parte del carbono era metabolizado vía la ruta glucolítica para generar ATP y luego etanol vía la ruta fermentativa. Así este autor presentó datos que indican que las proporciones de glucosa, maltosa y galactosa utilizadas para la producción de ATP son 73%, 69% y 53% respectivamente. De estos solo el 3%, 4% y 14% respectivamente son metabolizados vía la ruta oxidativa. Lo más significativo en el caso de la glucosa y la maltosa es que la fracción del flujo de carbono metabolizada vía la ruta fermentativa u oxidativa es independiente de la presencia de oxígeno.

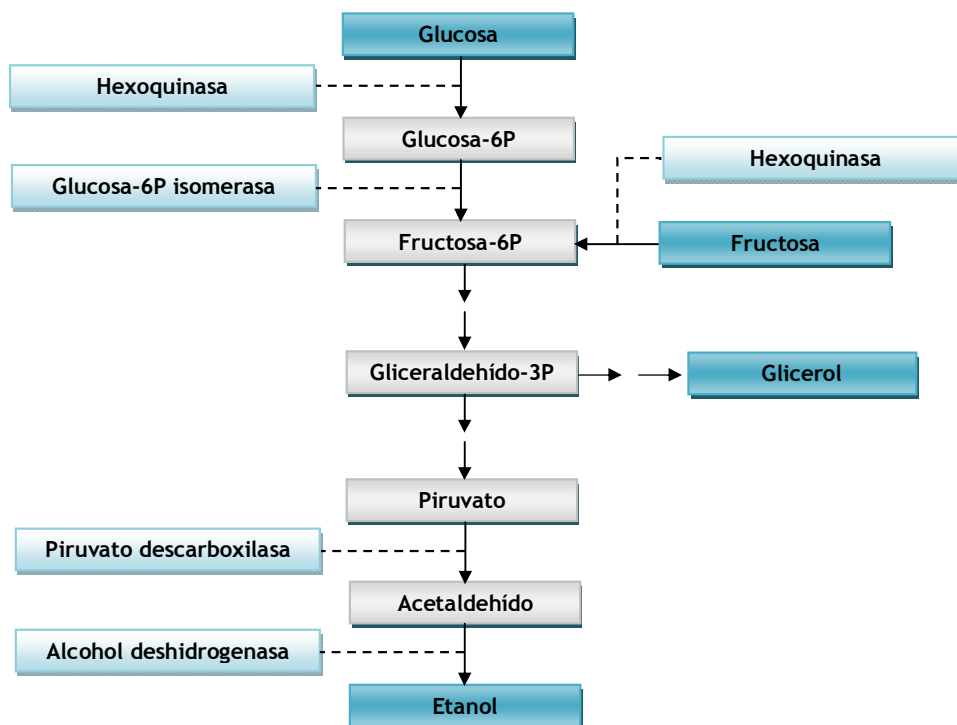


Figura 3.1: Diagrama simplificado de la ruta metabólica de Embden-Meyerhoff para el metabolismo de glucosa y fructosa.

Fuente: Adaptado de Stark (1954)

De lo anterior se puede concluir que la naturaleza y la concentración de los azúcares en el mosto ejercen efectos importantes en el metabolismo de la levadura. *Saccharomyces cerevisiae*, en común con otros géneros de levaduras, es descrita frecuentemente como anaerobias facultativas. Esto significa que es capaz, bajo las condiciones adecuadas, de metabolizar completamente por vía oxidativa los azúcares a CO<sub>2</sub> y agua y generar el ATP vía fosforilación oxidativa. De manera alternativa el metabolismo se puede realizar de manera fermentativa donde los productos del metabolismo del piruvato son etanol y CO<sub>2</sub> predominantemente y la energía es transducida vía fosforilación sucesiva de sustrato (Boulton y Quain, 2001).

### 3.3.3. ALCOHOLES SUPERIORES

Los alcoholes superiores pueden ser sintetizados por dos rutas metabólicas. La primera es por síntesis *de novo* de los carbohidratos del mosto vía piruvato o ruta anabólica; la segunda, como coproductos de la asimilación de aminoácidos o ruta catabólica (Ayrappa, 1968). En ambos casos los precursores son los  $\alpha$ -ceto ácidos. Estos son descarboxilados para formar un aldehído y posteriormente reducidos para formar el alcohol correspondiente. En la ruta anabólica, los  $\alpha$ -ceto ácidos derivan del piruvato como parte de las rutas biosintéticas de aminoácidos. En la ruta catabólica, los  $\alpha$ -ceto ácidos son formados por transaminación de un aminoácido. Las rutas biosintéticas que relacionan a todas las especies anteriores se presentan en la Figura 3.2.

La contribución relativa que hacen las rutas anabólica y catabólica para la síntesis de alcoholes superiores está influenciada por varios factores. En el caso del n-propanol la única ruta posible es la anabólica, ya que no existe el aminoácido correspondiente.

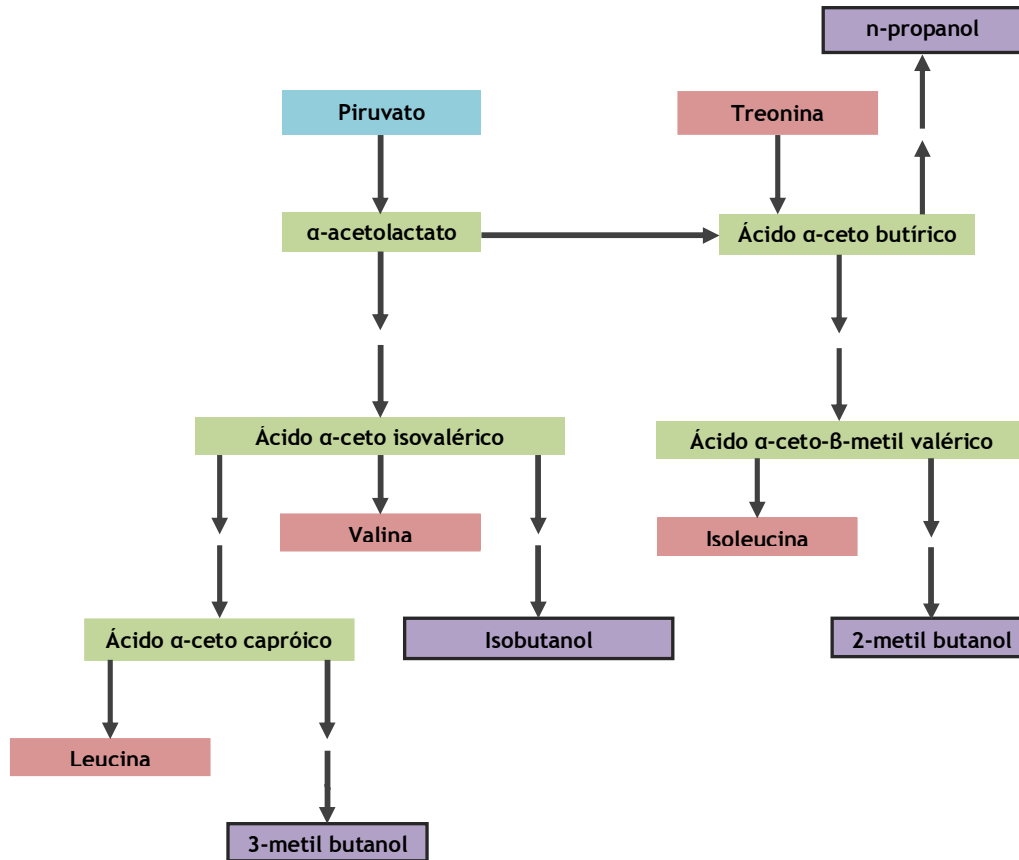


Figura 3.2: Rutas de biosíntesis de algunos alcoholes superiores a partir de piruvato y aminoácidos en *Saccharomyces cerevisiae*

Fuente: Adaptado de Boulton y Quain (2001)

Chen (1978) reportó que para la síntesis de alcoholes superiores de mayor longitud de cadena se utiliza la ruta catabólica. La concentración de aminoácidos del mosto es importante. Así, cuando hay niveles bajos de amino nitrógeno libre disponible la ruta anabólica es predominante. Al contrario, altas concentraciones de AANL en el mosto favorecen la ruta catabólica debido a la inhibición de las rutas de síntesis de aminoácidos. La ruta catabólica es de mayor importancia durante las fases iniciales de la fermentación cuando los aminoácidos del mosto son abundantes, mientras que

la ruta anabólica es utilizada cuando los aminoácidos del mosto son asimilados (Inoue, 1975). Se ha propuesto que la síntesis de alcoholes superiores ayuda a mantener el equilibrio redox dentro de la levadura, aunque se acepta que la ruta de la piruvato deshidrogenasa mantiene el equilibrio redox mediante la formación de  $\text{NAD}^+$ , Quain y Duffield (1985) sugirieron que la formación de alcoholes superiores podría representar un mecanismo de ajuste fino para la regeneración de  $\text{NAD}^+$ . La evidencia experimental que proveyeron fue la observación de que las levaduras generaban 3-metil butanol a partir de isovaleraldehído en medios desprovistos de nitrógeno. Este fenómeno, asociado a la nula formación de glicerol, indicó que la formación de alcoholes superiores libera los requerimientos de balance redox que se lograba mediante la síntesis del glicerol. La composición del mosto ejerce una gran influencia en la formación de alcoholes superiores, en particular el contenido de AANL. Como regla general, cualquier cambio en las condiciones de fermentación que incremente la velocidad de crecimiento de la levadura produce un incremento concomitante en la concentración de alcoholes superiores. De esta manera concentraciones excesivas AANL en el mosto tienden a elevar la concentración de alcoholes superiores (Szlavko, 1974). No obstante muy bajas concentraciones de AANL también tienden a elevar las concentraciones de alcoholes superiores. En este caso conjetura que la falta de nitrógeno promoverá la síntesis de aminoácidos y así la ruta anabólica de síntesis de alcoholes superiores.

#### 3.4. CARACTERÍSTICAS DEL SORGO DULCE

El sorgo dulce [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] es un cultivo análogo a la caña de azúcar respecto a la acumulación de sacarosa. Lo anterior, aunado a la naturaleza rica en jugos del tallo, representa una excelente alternativa como materia prima comparada con otros cultivos ricos en azúcares como la remolacha. El sorgo dulce tiene muchas características como adaptabilidad al suelo, tolerancia a estrés abiótico tal como sequía, anegamiento, salinidad, y alcalinidad, capacidad para crecer rápidamente y para acumular azúcar en los tallos. Todas estas

características deseables agronómica y bioquímicamente hacen del sorgo dulce una materia prima atractiva para la producción de etanol.

Adicionalmente, el sorgo dulce tiene una característica única de alta asimilación de carbono ( $50\text{g m}^{-2}\text{ día}^{-1}$ ) y una habilidad especial de acumular altos niveles de azúcares extraíbles en el tallo. Su rápida velocidad de crecimiento y habilidad para alcanzar madurez en 3-5 meses, junto con la ausencia de fotoperiodicidad favorecen su producción como cultivo secundario en tierras donde se produce caña de azúcar por ejemplo.

El sorgo dulce posee mayor eficiencia en el uso de agua comparado con el maíz o remolacha y requiere solamente el 36% del fertilizante nitrogenado requerido por el maíz. Los requerimientos de agua para la caña de azúcar son de  $36,000\text{ m}^3\text{ha}^{-1}$ , lo cual representa el doble de lo que necesita la remolacha, mientras que el sorgo dulce necesita solo  $8000\text{ m}^3\text{ha}^{-1}$ , debido a su extenso sistema de raíces y a su corto período de crecimiento.

La Tabla 3.5 compara las características de tres cultivos importantes para la producción de bioetanol a partir de caldos azucarados.

**Tabla 3.5:** Comparación de caña de azúcar, remolacha y sorgo dulce respecto a cualidades agronómicas para producción de bioetanol

	Caña de Azúcar	Remolacha	Sorgo Dulce
Duración de crecimiento del cultivo	12-13 meses	5-6 meses	Aprox. 3.5 meses
Estación de Crecimiento	Solo una	Todo el año	Todas las estaciones
Manejo de Agua	Requiere agua todo el año	40-60% comparado con caña de azúcar	Menor requerimiento, puede ser cultivo de temporal
Contenido de azúcar (%p/p)	8-12	15-18	8-10
Rendimiento de azúcar (ton/ha)	6-12	11-18	5-7
Producción de etanol a partir del jugo (L/ha)	4200-6700	6900-10100	2700-4000

Fuente: Prasad *et al.* (2007)

### 3.4.1. PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE SORGO DULCE

A diferencia de la composición de los cereales que se usan en la producción clásica de etanol, las cuales presentan un alto contenido de almidón, Prasad *et al.* (2007) reportan que la composición típica del jugo del tallo del sorgo dulce se compone de 60 % sacarosa, 33 % glucosa y 7 % fructosa lo que le da potencial para la producción directa de etanol.



Mamma *et al.* (1996) realizaron fermentaciones de jugo de sorgo dulce utilizando un cultivo microbiano mixto (*Saccharomyces cerevisiae*/*Fusarium oxysporum*) para la producción de bioetanol.

El proceso consistió en la remoción de tallos, hojas y granos de los tallos de sorgo dulce. Se expresó el jugo mediante molino de rodillos y se congeló para evitar cambios significativos en la composición del jugo. Se ajustó el pH del mosto a 5, se esterilizó y se inoculó con el cultivo mixto de *S. cerevisiae* y *F. oxysporum*. La reacción se llevó a cabo en un reactor tubular a 33 °C. El etanol se separó por destilación fraccionada.

Se puede observar que el proceso de producción de etanol a partir de sorgo dulce presenta menos etapas comparado con los procesos a partir de cereales tal y como se muestra en la Figura 3.3.



Figura 3.3: Diagrama de bloques para el proceso de obtención de etanol a partir de sorgo dulce

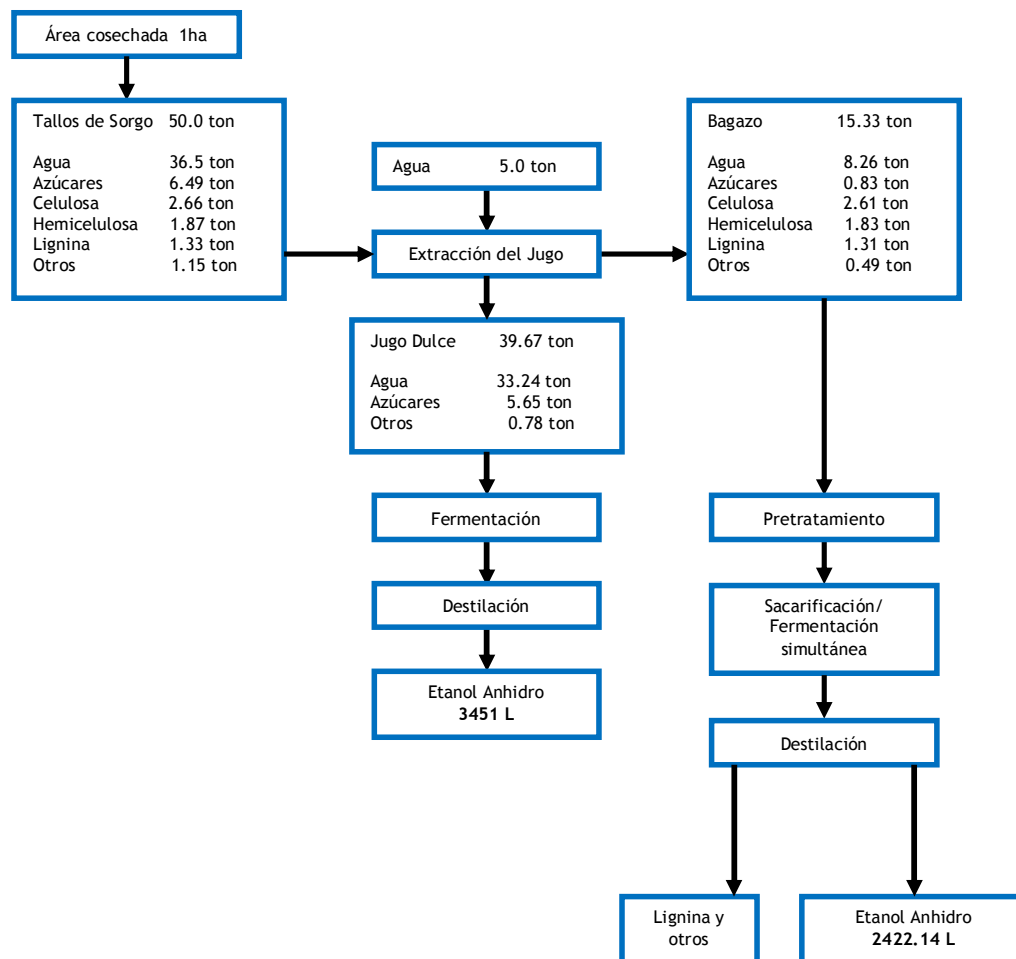
### 3.4.2. RETOS EN LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE SORGO DULCE

De acuerdo con Prasad *et al.* (2007), el determinar la madurez y el período de cosecha de los tallos de sorgo dulce es el aspecto más crítico para obtener un jarabe con una mayor concentración de azúcares fermentables. Conforme el cultivo va madurando, los cambios en la composición del jugo y la solidez de los tallos influyen la calidad y la cantidad del jarabe que se produce debido a que el contenido de azúcar generalmente se incrementa conforme madura la planta, el mejor tiempo para cosechar será antes de que las plantas maduren totalmente. Ahora bien, el período que tardará en madurar la cosecha depende de la variedad que se trata así como las condiciones climáticas y del año de cosecha. El cultivo

debe ser cosechado cuando el contenido de azúcar se encuentre aproximadamente en el rango de 15.5-16.5° Brix.

Otro parámetro que se desea mejorar en la producción de etanol, es la integración total del cultivo en el proceso de producción. Tal como presenta Mamma *et al.* (1996) si se utiliza el material celulósico resultante de la extracción del jugo de sorgo dulce, el rendimiento teórico global del proceso aumenta en un 20.7%. Lo anterior muestra la importancia de la utilización integral de cultivos “energéticos” para la producción de etanol.

En la Figura 3.4 se muestra el impacto que tiene la integración del material lignocelulósico, proveniente del bagazo del sorgo dulce, en el rendimiento global del proceso de obtención de etanol.



**Figura 3.4:** Balance de masa para la producción de bioetanol a partir de sorgo dulce

Fuente: Gnansounou *et al.* (2005)

## CAPÍTULO 4

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL AGRONÓMICO

Para poder sacar conclusiones estadísticamente significativas acerca de las diferencias entre las variedades de sorgos dulces y forrajeros, fue necesario contar con un diseño en campo que permitiera la minimización del impacto de las variables no controladas y del error experimental por el posicionamiento de las parcelas en el campo.

Lo anterior se logró adoptando un diseño en bloques completamente aleatorizado (RCBD, por sus siglas en inglés) el cual permitió reducir el error experimental al homogenizar las unidades experimentales dentro del bloque. Lo anterior reduce los grados de libertad del error y por consiguiente existe una menor posibilidad de cometer un error tipo II (Montgomery, 2006).

Se trabajó con 3 variedades de sorgo dulce generosamente donadas por el Programa de Fitomejoramiento del Dr. William L. Rooney de la Universidad de Texas A&M y con 2 testigos locales de sorgo forrajero. La identificación de las variedades se presenta en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1: Identificación de las 5 variedades de sorgos dulces y forrajeros

Variedad	Procedencia	Identificador	Tipo de Sorgo
1	Texas A&M	Río	Dulce
2	Texas A&M	M18	Dulce
3	Texas A&M	Della	Dulce
4	Testigo Local	Tato	Forrajero
5	Testigo Local	Thor	Forrajero

Los tratamientos que se utilizaron fueron los cinco diferentes tipos de sorgo los cuales se sembraron en parcelas de 2 x 2 m<sup>2</sup>. El sorgo sembrado en cada parcela representó una unidad experimental. Se sembraron 8 bloques que contenían a los 5 tratamientos estudiados (5 variedades de sorgo) y la posición relativa del tratamiento dentro del bloque se realizó de manera completamente aleatoria (Figura 4.1).

Cabe aclarar que el hecho de que la variedad 5 de sorgo no haya sido aleatorizada dentro del bloque fue totalmente intencional y se hizo para efectos de protección en campo de las 4 variedades restantes. No obstante, se siguió tomando el diseño RCBD para el análisis estadístico de los datos.

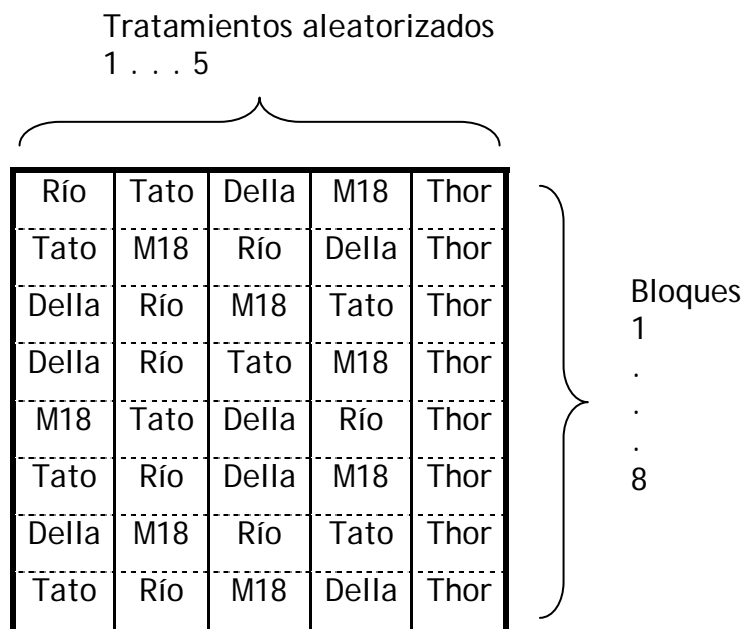


Figura 4.1: Esquema del diseño experimental agronómico RCBD propuesto para estudiar las diferencias entre 5 variedades de sorgo dulce. Cada celda representa una unidad experimental.

#### 4.2. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN EN CAMPO DEL MATERIAL VEGETAL

Las 5 variedades fueron plantadas en el campo experimental del ITESM ubicado en Hualauises, Nuevo León. Se realizaron 5 cortes semanales una vez que se alcanzó la

floración de la planta la cual sucedió 90 días después de la siembra. En cada corte se realizó la expresión *in situ* del jugo mediante un molino de rodillos y se midió el volumen del jugo recolectado y los°Brix, utilizando un refractómetro óptico (ATAGO HSR 500, Bellevue WA, USA).

#### 4.3. ACONDICIONAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS CALDOS DULCES

Inmediatamente después de la expresión y caracterización en campo del caldo de sorgo dulce, las muestras se envasaron en contenedores de 1 galón y se embarcaron hacia el Centro de Biotecnología del ITESM Campus Monterrey donde se realizó un tamizado de las muestras por malla US 60 para retirar material de gran tamaño tal como hojas, tallos, y granos que pudieran haber quedado después de la expresión del jugo.

Posteriormente, cada una de las 40 unidades experimentales se dividió en 2 lotes: 200 mL para análisis de materia prima el cual se mantuvo refrigerado a 4°C (Lote A) y 800 mL para análisis de fermentación el cual se mantuvo congelado a -20°C (Lote B).

Se realizó la caracterización química de la materia prima mediante las siguientes determinaciones:

##### 4.3.1. GRADOS BRIX

Se tomaron 80 µL de muestra bruta y se colocaron en un refractómetro digital ATAGO Palette PR-32α (ATAGO USA Inc, Bellevue WA, USA) en el cual el cero había sido previamente fijado con respecto al agua destilada.

### 4.3.2. AZÚCARES REDUCTORES

La cuantificación de azúcares reductores en los caldos de sorgo dulce se practicó de acuerdo a la metodología de Miller (1959). Se realizó la medición de la cantidad de azúcares reductores (con carbonilo libre) presentes en la muestra debido a que éstos son los que pueden ser fermentados. En presencia de un agente reductor, como la glucosa, el ácido dinitrosalicílico (DNS) reduce uno de sus grupos nitro a amino. El producto de esta reducción se midió a 540 nm.

Para la elaboración del *reactivo DNS* se mezclaron 50 mL de una solución al 10% p/v de DNS en NaOH 4M con 300 mL de una solución al 50% p/v de tartrato de sodio y potasio y se aforó la mezcla a 500 mL.

Previo a la medición se realizó la curva de calibración correspondiente usando soluciones patrón de glucosa (Sigma Aldrich, San Luis MO, USA) en el intervalo que en el cual la absorbancia mostró linealidad con la concentración (<2mM). Para hacer las mediciones, tanto de los puntos de la curva de calibración como de las muestras previamente diluidas (1:1000), se realizó lo siguiente: se tomaron 1.5 mL de muestra a la cual se añadieron 4.5 mL de reactivo DNS. La mezcla se llevó a ebullición durante 5 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se midió la densidad óptica de la muestra a 540 nm y la concentración de azúcares reductores, expresada en gramos equivalentes de glucosa, se calculó contra la curva de calibración respectiva (Arasaratnam et al. 1998; Okolo et al. 2000; Aggarwal, 2001).

### 4.3.3. PERFIL DE CARBOHIDRATOS POR HPLC

La cuantificación de carbohidratos presentes en los mostos se realizó utilizando un sistema HPLC isocrático Waters 1515 equipado con detector de índice de refracción Waters 2414 (Waters Co, Milford MA, USA). El sistema de separación específico consistió en una columna Restek Ultra Amino (Restek US, Bellefonte PA, USA) utilizando una mezcla acetonitrilo:agua 90:10 v/v (Honeywell International Inc,

Morristown NJ, USA) como fase móvil a un flujo de 0.3 mL/min. Se prepararon estándares de mezclas de fructosa, glucosa y sacarosa en un rango de 1 - 80 g/L partiendo de azúcares puros (Sigma Aldrich, San Luis Mo, USA) disueltos en agua HPLC (Honeywell International Inc, Morristown NJ, USA). Los estándares anteriores se utilizaron para construir un sistema de calibración por estándar externo.

Previo a su análisis por HPLC, las muestras se centrifugaron por 10 min a 4500 rpm (Centrífuga Centra MP4R International Equipment Company, Needham Heights MA, USA) seguido de filtrado por membranas Whatman® de fluoruro de polivinilideno de 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Se utilizó un volumen de inyección de 2 $\mu\text{L}$  tanto para el análisis de muestras como para los estándares.

#### 4.3.4. ALFA AMINO NITRÓGENO LIBRE

La determinación de alfa amino nitrógeno libre (AANL) se llevo a cabo de acuerdo al método 945.30 de la AOAC (1980). Se realizó la medición de la cantidad de nitrógeno libre para metabolismo por la levadura en la fermentación mediante la técnica de identificación con ninhidrina. Esta técnica involucra la desaminación oxidativa del grupo alfa amino de los aminoácidos, por acción de la ninhidrina, lo cual conduce a la formación del aldehído correspondiente y la liberación de amoníaco y  $\text{CO}_2$ . La ninhidrina reducida, en presencia de otra molécula de ninhidrina, condensa a través del amoníaco produciendo una estructura denominada hidrindrantina de color rojizo/púrpura la cual presenta un máximo de absorbancia a 570 nm.

El reactivo de ninhidrina en solución, se preparó mezclando 10 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 6 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g hidrato de tricetohidrindeno (ninhidrina), y 0.3 g de fructosa aforados a 100 mL de agua destilada.

Se centrifugó la muestra por 10 min a 4500 rpm (Centrífuga Centra MP4R International Equipment Company, Needham Heights MA, USA). Se realizó la



dilución de la muestra en agua destilada en un factor 1:50, se tomó una alícuota de 1 mL de la dilución y se añadieron 500  $\mu$ L de reactivo de ninhidrina. La reacción se llevó hasta ebullición durante 20 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 16 minutos. Pasado el tiempo de enfriamiento se añadieron 2.5 mL de una solución 0.2% p/v de  $\text{KIO}_3$  en etanol al 40% y se midió la absorbancia a 570 nm. La concentración en miligramos equivalentes de AANL se calculó con respecto a la absorbancia de una solución patrón de glicina 1.072 g/L en dilución 1:100 utilizando la ecuación 4.1.

$$\frac{\text{mg AANL}}{\text{L}} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra} \times 2 \times \text{Factor de dilución}}{\text{Promedio de Absorbancia de Patrón de Glicina}}$$

(Ecuación 4.1)

#### 4.3.5. FENÓLICOS TOTALES

La determinación de los fenólicos totales se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Vinson et al. (2001). La reacción de Folin-Ciocalteu para la determinación de fenólicos totales involucra la reacción de iones fenolato con iones complejos poliméricos de los ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico. Los iones fenolato son oxidados por los heteropoliácidos mientras que el complejo molidbeno-tungsteno es reducido de valencia +6 a +5 creando un complejo azulado que se puede cuantificar a 750 nm.

Para la cuantificación de los fenólicos totales se practicó la medición espectrofotométrica en microplato de 96 pozos. La cantidad de compuestos fenólicos se expresó en gramos equivalentes de ácido gálico para lo cual se preparó una curva de calibración con dicho ácido desde 100  $\mu$ M hasta 2000  $\mu$ M. Los estándares, junto con las muestras a medir previamente diluidas (1:10), se colocaron en el microplato por triplicado. Se añadieron 20  $\mu$ L de muestra/estándar al pozo del microplato junto con 200  $\mu$ L del reactivo de Folin-Ciocalteu 2N (Sigma Aldrich, San Luis MO, USA) diluido 1:9 en agua destilada. Se dejó que se llevara a

cabo la reacción durante 20 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se realizó la lectura a 750 nm en un lector de microplatos (Synergy HT BioTek Instruments, Winooski VT, USA).

#### 4.4. PRUEBAS DE FERMENTACIÓN DE CALDOS DE 5 VARIEDADES DE SORGOS DULCES Y FORRAJEROS

##### 4.4.1. PREPARACIÓN DEL INÓCULO DE TRABAJO

La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* ATTC 24858 que se utilizó par las pruebas de fermentación está reportada como alta productora de etanol (Ismail y Ali, 1971). Se mantuvo en agar YM Difco BD® (Franklin Lakes, NJ, USA) hasta su utilización en los experimentos de fermentación. Se aislaron y seleccionaron colonias y se crecieron en cultivos de 250 mL de caldo YM Difco durante 12 horas o hasta obtener concentraciones de  $1.6 \times 10^8$  células mL<sup>-1</sup>. Las poblaciones celulares se cuantificaron con una cámara de Neubauer Marienfield Laborglas® (Lauda-Königshofen, Alemania). Se eligieron 4 cuadrantes de 1 mm<sup>2</sup> y se realizó el conteo en un microscopio bifocal invertido Carl-Zeiss Axiovert 200 (Thornwod NY, USA) utilizando un objetivo 32x.

La fotografía de la cámara de Neubauer, y uno de los cuatro cuadrantes seleccionados para realizar el conteo, se muestran en la Figura 4.2.

Debido a que la cámara tenía una profundidad de 0.1 mm, el conteo promedio de levaduras en 1 mm<sup>2</sup> se multiplicó por el factor de dilución utilizado y se multiplicó por  $1 \times 10^4$  (factor de volumen) para así obtener un resultado expresado en número de células por mililitro de cultivo.

Se utilizó una tasa de inoculación de  $1.4 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup> para todos los mostos buscando homogenizar el comportamiento de las fermentaciones.

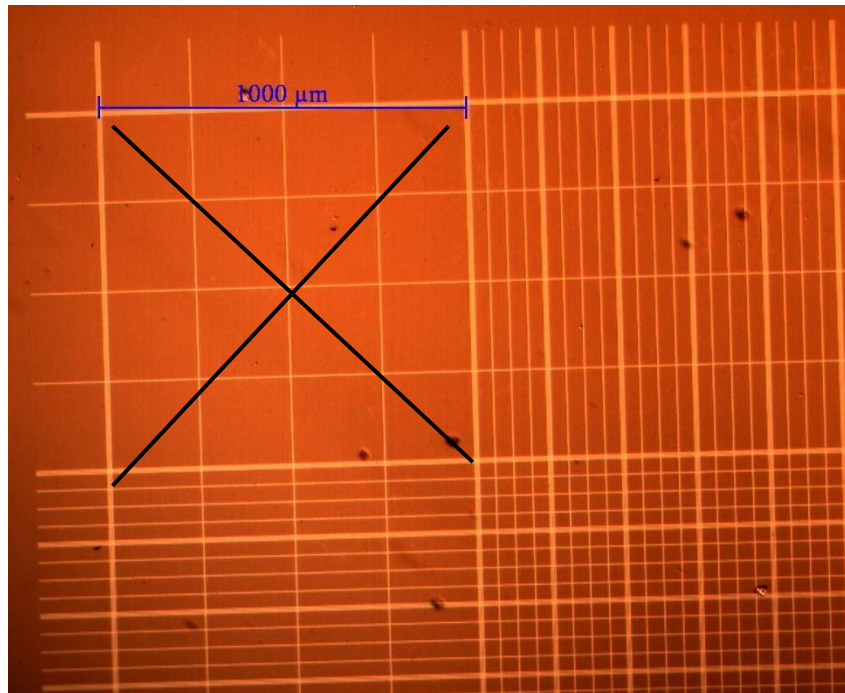


Figura 4.2: Fotografía de la cámara de Neubauer y cuadrantes utilizados para el conteo de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24858.

#### 4.4.2. PROCESO DE FERMENTACIÓN

Se midieron 400 mL de cada una de las unidades experimentales y se calentaron hasta 75°C en un baño termostático durante 45 min. Luego se realizó un choque térmico en un baño con hielo y se dejó enfriando el mosto hasta que alcanzó la temperatura ambiente.

Posteriormente se introdujeron los mostos a una campana de flujo laminar (Labconco Modelo 36212, Kansas City MI, USA) para realizar el armado de los fermentadores y alimentar el mosto previamente pasteurizado bajo condiciones asépticas. El diseño de los fermentadores se muestra en la Figura 4.3.

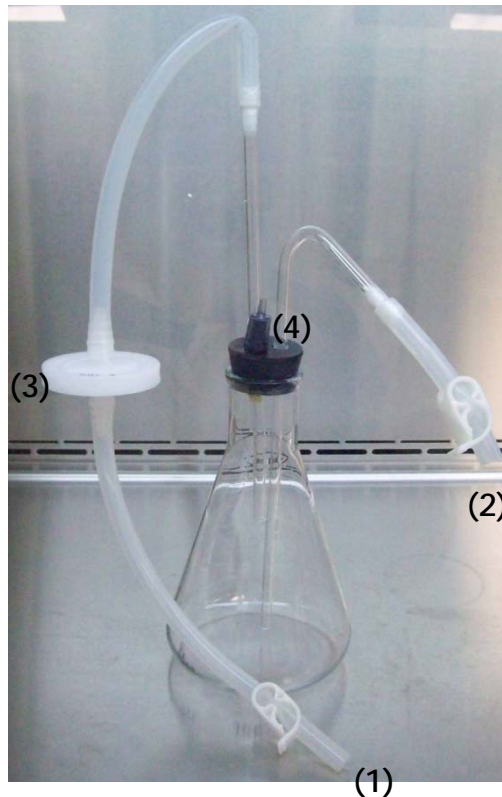


Figura 4.3: Diseño de los reactores usados para el seguimiento de la cinética de fermentación de los caldos de sorgos dulces y forrajeros con *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24858

Se utilizaron dos puertos en el reactor. El puerto (1) se utilizó para la introducción de CO<sub>2</sub>, previamente filtrado por membrana (3) de 0.2 μm (PALL Co, Port Washington NY, USA), que generó una presión positiva en el reactor. Lo anterior causó que la muestra del mosto saliera por el puerto (2) sin necesidad de abrir los reactores y romper las condiciones de anaerobiosis. Las entradas y salidas al reactor estaban cerradas con pinzas que mantenían la hermeticidad del sistema. Se colocó una válvula *check* (4) para permitir la salida del CO<sub>2</sub> generado durante la fermentación.

Se inocularon los fermentadores con los cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24858 previamente cuantificados. Se añadieron 35 mL del inóculo de trabajo y se dejó correr la fermentación en una incubadora con agitación (Lab-Line Modelo 3526) a 30°C y 125 RPM durante 48 horas siguiendo las condiciones propuestas por Perez-Carrillo et al (2008).

Para el seguimiento de la cinética de fermentación, se tomaron muestras del mosto a lo largo del proceso para caracterizar el consumo de sustrato y formación de productos. Estas muestras se tomaron al tiempo cero así como a las 2, 4, 6, 10, 14, 18, 24, 36, y 48 horas de fermentación.

A las muestras que se tomaron de las cinéticas de fermentación se les midió alfa amino nitrógeno y perfil de azúcares por HPLC como se describe en las secciones 4.3.3 y 4.3.4, respectivamente.

Adicionalmente se realizó la cuantificación de etanol y alcoholes superiores por cromatografía de gases con detector de ionización de flama (GC-FID, por sus siglas en inglés).

#### 4.4.3. PERFIL DE ETANOL Y ALCOHOLES SUPERIORES

La determinación de etanol y alcoholes superiores se realizó por GC-FID de acuerdo a las metodologías propuestas por Barredo-Moguel, 2001b y Barredo-Moguel, 2001a respectivamente. En esta metodología se cuantifican como alcoholes superiores el 1-propanol, 2-metil-1-propanol (isobutanol), 2-metil-1-butanol (amílico activo) y 3-metil-1-butanol (isoamílico). Los dos alcoholes amílicos fueron identificados y cuantificados en forma conjunta debido a que coeluyeron en este sistema en particular.

Se utilizó un cromatógrafo de gases (Agilent Modelo 6850, Santa Clara CA, USA) equipado con un detector de ionización de flama. La columna utilizada fue una HP-Innowax entrecruzada con polietilenglicol ( $1\mu\text{m}$  = espesor de filme,  $0.53\text{ mm}$  = diámetro interno y  $30\text{ m}$  de largo). Se utilizó Helio como gas acarreador a un flujo de  $1.5\text{ mL/min}$ . Se trabajó con un volumen de inyección de  $1\mu\text{L}$  usando una relación de *split* de 1:10. La temperatura del inyector y del detector fue fijada en  $220^{\circ}\text{C}$  y  $280^{\circ}\text{C}$  respectivamente. El programa de temperaturas del horno se detalla en la Tabla 4.2.

**Tabla 4.2:** Programa de temperaturas para el horno utilizado en la determinación de etanol y alcoholes superiores

Etapa	Rampa (°C/min)	Temperatura Final (°C)	Tiempo de espera (min)
Inicial	---	45	0
1	5	150	0
2	20	220	5
Post-Corrida	---	230	5

La cuantificación de etanol y los alcoholes superiores se realizó mediante el método de calibración por estándar externo, usando como estándares mezclas de alcoholes (Supelco Inc, Bellefonte PA, USA) en un rango de 0 - 70 mL/L para el caso del etanol, 0 - 20 ppm para el caso del propanol y del isobutanol, y 0 - 150 ppm para los alcoholes amílicos.

#### 4.4.4. ANALISIS CINÉTICO DE LOS PERFILES DE GENERACIÓN DE PRODUCTOS

Se analizaron los perfiles de producción de etanol y de alcoholes superiores para determinar las velocidades a las cuales se producen durante los procesos de fermentación. Para lo anterior se utilizó la metodología de análisis propuesta por El-Mansi y Ward (2007) que consiste en tomar los datos experimentales correspondientes a la fase logarítmica de cada cinética de producción de alcohol y linearizar los datos utilizando la ecuación 4.2. Se graficó entonces en las ordenadas el término  $\ln(C/C_0)$  y en las abscisas el tiempo de fermentación. La pendiente de la recta de obtenida de esta manera representa la constante de velocidad de formación de producto para una reacción de primer orden.

$$\ln \left( \frac{C}{C_0} \right) = -kt$$

(Ecuación 4.2)

Donde: C = Concentración de analito de interés en un tiempo "t"

$C_0$  = Concentración inicial del analito de interés

$k$  = constante de velocidad de formación de producto ( $h^{-1}$ )

$t$  = tiempo de fermentación (h)

Para que dicho análisis sea válido se tomó solo la parte de los perfiles donde la concentración del analito variaba linealmente con el tiempo (fase logarítmica). Se identificaron los constantes de velocidad de producción de etanol y alcoholes superiores como  $k_e$  y  $k_f$ , respectivamente.

#### 4.5. EFECTO DE LA ADICIÓN DE AMILOGLUCOSIDASA (AMG)

Se realizó una prueba sobre una mezcla compuesta de caldos de sorgo dulce para determinar el efecto que tenía la enzima amiloglucosidasa (EC # 3.2.1.3) sobre la composición de la materia prima.

Se mezclaron 5 mL de cada unidad experimental para obtener 200 mL de caldo compuesto de todas las variedades. Se prepararon de esta forma dos lotes: uno que sirvió como tratamiento y uno que fungió como control (sin adición de AMG).

Se añadieron 200 mg de AMG sólida (Sigma Aldrich, San Luis MO, USA) obtenida de *Rhizopus sp.* La enzima contaba con una actividad de 20300 U/g donde 1 U libera 1 mg de glucosa a partir de almidón soluble a pH = 5.5 y a 50°C. Tanto al tratamiento como al control se les ajustó el pH a 5.5 usando NaOH 2M y se dejó incubando a 50°C y 150 RPM durante 4 horas en un baño termostatado (Bellco Glass Inc, Vineland NJ, USA)

Para construir la cinética, se muestreó 1 mL de la cinética cada 10 minutos por 2 horas y posteriormente cada 15 minutos hasta alcanzar 4 horas; cada muestra que se tomó fue llevada a ebullición para inactivar al enzima. Finalizada la cinética se realizó el ensayo de glucosa libre en cada muestra, previa dilución 1:100.

#### **4.5.1. DETERMINACIÓN DE GLUCOSA LIBRE**

La determinación de la glucosa libre en el caldo de sorgo dulce sea llevó a cabo mediante un kit enzimático comercial (K-Gluc D-Glucose®) de la empresa Megazyme (Wicklow, Irlanda). Dicho kit se basa en la metodología propuesta por Trinder (1969) para la medición de glucosa en sangre utilizando glucosa oxidasa. La glucosa oxidasa cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno (fenol-ampirona) el cual en presencia de peroxidasa produce una quinona que absorbe a 510 nm. La intensidad de color producida es directamente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.

Se preparó una curva de calibración a partir de glucosa pura (Sigma Aldrich, San Luis MO, USA) en un rango de concentración de 0 a 1 g/L el cual estaba reportado como el rango de linealidad para el kit que se utilizó. Se llevó a cabo el siguiente ensayo tanto en los puntos de la curva de calibración como las muestras a medir. Se tomaron 100  $\mu$ L de la muestra/estándar y se añadieron 3 mL del reactivo de glucosa oxidasa. Se incubó la reacción durante 20 minutos a 45°C y se realizó la lectura a 510 nm en un espectrofotómetro (Beckman Coulter DU800, Brea CA, USA). El cálculo de la concentración de glucosa en la muestra se hizo con respecto a la curva de calibración respectiva.

#### **4.6. PRUEBA DE FERMENTACIÓN CON DOS FUENTES NITROGENADAS**

Se deseaba estudiar el efecto que tenía el enriquecimiento de los mostos con fuentes externas de nitrógeno en el rendimiento de etanol de las fermentaciones de caldos de sorgo dulce. Se planeó utilizar dos tratamientos diferentes (urea y extracto de levadura) y un control negativo (sin adición de fuentes nitrogenadas) para realizar el análisis.



Se optó por una estrategia similar de mezclas compuestas tal y como se hizo en el caso de la prueba con AMG. Para preparar la mezcla compuesta se tomaron 10 mL de cada unidad experimental para formar 400 mL de mezcla compuesta; se prepararon 3 lotes, uno para probar con urea, uno para probar con extracto de levadura y otro que fungió como control.

Se caracterizó la mezcla compuesta al igual que se hizo para las variedades individuales. Además se midió el pH utilizando un potenciómetro (Lauka Mexicana) calibrado con soluciones amortiguadoras estándares de pH 4.0 y 7.0. Se registraron los valores de los parámetros medidos y se ajustó el pH, ° Brix, y AANL a 5.5, 13, y 150 mg/L, respectivamente.

El ajuste del pH se realizó mediante la adición de NaOH 2M. No hubo necesidad de ajustar los °Brix ya que todas las mezclas compuestas tuvieron valores menores a 13 °Brix. El ajuste de la cantidad de AANL se realizó mediante adición de las fuentes nitrogenadas en forma sólida.

Para el cálculo de las cantidades de fuente nitrogenada a añadir a los mostos se procedió de diferente manera para el caso del extracto de levadura y la urea. Se preparó una solución 3 g/L de extracto de levadura (Yeastex® PROBAMEX, Naucalpan Edo de México, México) y se realizó la medición de AANL dando una concentración promedio de 169 mg AANL/L. Se calculó así el factor correspondiente a 0.056 mg AANL/mg extracto de levadura.

Para el caso de la urea el cálculo del factor se hizo a partir de datos teóricos ya que la prueba de AANL no es capaz de medir nitrógeno en forma de urea. De esta manera, se tomó en cuenta un factor de 46% p/p de nitrógeno/urea y un factor de 6.25 proteína/nitrógeno obteniendo así un factor 2.91 mg AANL/mg urea. Este factor es bastante mayor al factor obtenido para el extracto de levadura ya que se tomó en cuenta que todo el nitrógeno en la urea (en peso) estaría disponible para la levadura.

Una vez ajustados los parámetros de la mezcla compuesta se procedió a la pasteurización e inoculación de los mostos como se describe en la sección 4.4.2.

Se tomaron muestras de los fermentadores a las 0, 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 18, 20, 24, 30, 36, 48 y 72 horas de iniciado el proceso de fermentación. Dichas muestras fueron caracterizadas en pH, AANL, perfil de azúcares por HPLC y etanol por GC-FID.

## CAPÍTULO 5

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.1. CARACTERIZACIÓN AGRONÓMICA DE LOS CALDOS DULCES

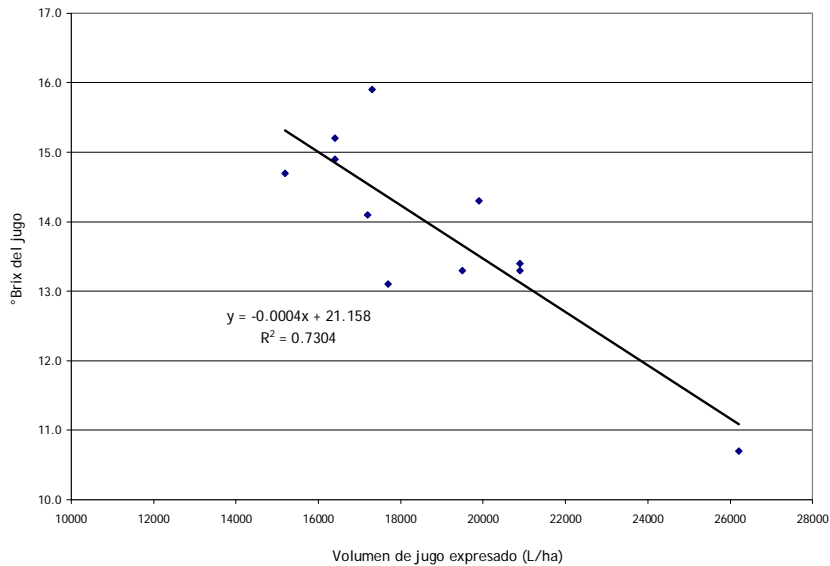
Un parámetro importante en el proceso de caracterización agronómica es el volumen de caldo dulce obtenido después de la molienda (Coble *et al.*, 1984).

En la Figura 5.1 se observa la relación que existe entre el volumen de jugo expresado en molino y la concentración de azúcar de los caldos reportado en °Brix. La ecuación que describe dicha relación es  $y = -0.0004x + 21.158$ ; el coeficiente de correlación  $R = 0.855$ . Los datos experimentales indican que existió una relación inversa (indicada por el signo negativo de la pendiente) entre ambos parámetros de caracterización agronómica. Lo anterior está en concordancia con lo reportado por Krishnaveni *et al.* (1984) quien investigó este tipo de relación para 17 variedades de sorgo dulce de la Universidad Agrícola de Tamil Nadu.

En la Tabla 5.1 se presentan los resultados de la cantidad de jugo obtenido en el molino como una función del estado de madurez de la planta de sorgo. Se observa como la variedad M18 la cual expresó una cantidad significativamente mayor de caldo dulce ( $\alpha=0.05$ ) fue la que presentó una cantidad menor de azúcares a lo largo del proceso de maduración. Los niveles de jugo expresado fueron inferiores a los reportados por Gnansounou *et al.* (2005) quienes, para un sorgo modificado con alta productividad de biomasa, indican que se puede llegar a obtener  $37,000 \text{ L ha}^{-1}$  de caldo de sorgo dulce.

Otro parámetro importante que influye directamente en el rendimiento global del proceso de conversión a etanol es el contenido de azúcar; entre mayor sea la concentración de azúcar en el caldo, mayor será la concentración de azúcares en los reactores haciendo el proceso más efectivo. El contenido de azúcar de los tallos

varió en función del estado de maduración de la planta, así como de las condiciones agroecológicas como la intensidad de luz, temperatura, disponibilidad de agua, etc. (Coleman 1975).



**Figura 5.1:** *Relación entre el volumen de caldo obtenido en molienda y la concentración de azúcar para los caldos del 3°, 4° y 5° corte de 5 variedades de sorgos dulces y forrajeros.*

En la Tabla 5.1 se muestra el perfil de los °Brix en el caldo de sorgo dulce a lo largo de los cortes consecutivos. Se observa que a partir del tercer corte deja de haber incrementos significativos en los °Brix de los caldos a excepción de las variedades M18 y Della, las cuales siguieron madurando a lo largo de toda la ventana de experimentación.

Coleman (1975) clasifica como tardías a las variedades que florecen más tarde y en las cuales la cantidad de azúcar en los tallos aumenta lentamente. Este autor indica que la sacarosa es el azúcar que se acumula más lentamente en las variedades tardías lo que resulta en un aumento más lento de los °Brix del jugo con respecto a las variedades tempranas.

Tabla 5.1: Parámetros de caracterización agronómica de los caldos de 5 variedades de sorgos dulces y forrajeros a lo largo de 5 cortes semanales consecutivos.

Corte	Rendimiento jugo(L/ha)					°Brix					Rendimiento azúcar (kg/ha)				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Variedad															
Río	15300	19400	15200	16400	16400	7.9	10.3	14.7	14.9	15.2	1208.7	1998.2	2234.4	2443.6	2492.8
M18	22900	27800	26200	28300	27800	5.5	6.6	10.7	12.3	14.9	1259.5	1834.8	2803.4	3480.9	4142.2
Della	14900	17800	17200	19900	17300	7.7	9.9	14.1	14.3	15.9	1147.3	1762.2	2425.2	2845.7	2750.7
Tato	18600	23200	19500	20900	20900	7.0	9.0	13.3	13.3	13.4	1302.0	2088.0	2593.5	2779.7	2800.6
Thor	14900	15300	17700	15000	15000	7.4	9.5	13.1	13.6	13.8	1102.6	1453.5	2318.7	2040.0	2070.0

En la Tabla 5.1 se observa como en el caso de todas las variedades el mayor incremento en los °Brix se da en la tercera semana después de la floración de la planta. Sin embargo, en el caso de las variedades tardías, se observaron incrementos en los °Brix a lo largo de las 5 semanas de experimentación. En el caso de las variedades tardías una semana más de maduración representó un aumento de aproximadamente 15% en los °Brix.

Krishnaveni *et al.* (1984) reportan que existe un aumento de 30% de los azúcares totales presentes en los caldos de sorgo dulce desde la floración hasta la etapa de madurez, mientras que los azúcares reductores solo aumentan un 5%. Lo anterior es consistente con las variedades tardías de sorgo dulce que acumulan azúcares simples (fructosa y glucosa) a una mayor tasa que sacarosa (azúcar no reductor). En el caso de los caldos de sorgos dulces y forrajeros utilizados en este estudio hubo un aumento de 100% en la cantidad de azúcares totales desde la etapa de floración hasta el estadio de madurez.

Como se pensó que los °Brix no se incrementarían en la 5° semana después de la floración y para eliminar variabilidad en rendimiento de jugo expresado por tipo de variedad (temprana o tardía) se decidió realizar el estudio de producción de etanol con el caldo dulce obtenido al 4° corte.

El rendimiento de azúcar por hectárea se calculó al multiplicar la cantidad de jugo obtenido por hectárea por la concentración de azúcares en el jugo (°Brix). Los

Comment [ue1]: Checar esta aseveración

rendimientos de azúcar obtenidos al 5° corte son congruentes con los reportados por Prasad *et al.* (2007) al menos para la variedad M18. Estos autores reportan rendimientos de 4000 kg ha<sup>-1</sup> de azúcares fermentables para caldos de sorgo dulce por período de 4 meses.

En este caso pueden esperarse rendimientos de etanol al menos 15% menores a los reportados en literatura por no haber esperado una semana más para alcanzar el estado óptimo de madurez y acumulación de azúcar en el caso de las variedades tardías.

## 5.2. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS CALDOS DULCES

Además de la caracterización agronómica de los caldos de sorgo dulce, fue necesario realizar la caracterización química ya que la información que nos revela es importante para poder realizar estimaciones acerca del rendimiento global del proceso y eventualmente explicar diferencias encontradas.

En la Tabla 5.2 se presenta la comparación de los 5 parámetros que se cuantificaron en las 5 variedades de sorgos dulces y forrajeros.

Tabla 5.2: *Parámetros de caracterización química para los caldos de 5 variedades de sorgos dulces y forrajeros al 4° corte<sup>1</sup>.*

Variedad	° Brix	Error Estándar	Azúcares Reductores (g eq glucosa L <sup>-1</sup> )	Error Estándar	Azúcares Totales HPLC (g L <sup>-1</sup> )	Error Estándar
Río	13.2 <sup>a</sup>	0.9	69.48 <sup>a</sup>	6.32	112.82 <sup>a</sup>	5.13
M18	10.3 <sup>b</sup>	0.7	30.53 <sup>c</sup>	4.10	88.22 <sup>b</sup>	4.50
Della	11.2 <sup>a,b</sup>	0.9	48.88 <sup>b</sup>	3.57	125.39 <sup>a</sup>	4.96
Tato	10.1 <sup>b</sup>	0.8	33.78 <sup>c</sup>	6.23	88.83 <sup>b</sup>	5.05
Thor	10.6 <sup>b</sup>	0.9	41.22 <sup>b,c</sup>	5.52	92.66 <sup>b</sup>	5.83

Variedad	Alfa Amino Nitrogeno Libre (mg AANL L <sup>-1</sup> )	Error Estándar	Fenólicos Totales (g eq. ácido gálico L <sup>-1</sup> )	Error Estándar		
Río	35 <sup>a,b</sup>	1	0.227 <sup>a</sup>	0.024		
M18	19 <sup>c</sup>	6	0.204 <sup>a</sup>	0.022		
Della	33 <sup>a</sup>	6	0.184 <sup>a</sup>	0.021		
Tato	23 <sup>b</sup>	6	0.180 <sup>a</sup>	0.022		
Thor	36 <sup>a</sup>	7	0.239 <sup>a</sup>	0.034		

<sup>1</sup>Valores con diferente superíndice dentro de la misma columna son estadísticamente diferentes ( $\alpha=0.05$ )

Los °Brix están fuertemente relacionados con la cantidad de sólidos solubles que posee un líquido mediante el cambio en el índice de refracción. En el caso del análisis de alimentos se relaciona los °Brix con el contenido de azúcar que éste contiene ya que la característica distintiva de los carbohidratos en agua es el de modificar significativamente el índice de refracción de la luz de la solución. Así la medición de los °Brix, en un refractómetro calibrado, se convierte en una medición confiable de la cantidad de azúcar que contiene la muestra (Murtagh, 1995).

Los °Brix medidos en la etapa de caracterización disminuyeron un 20% con respecto a los °Brix medidos en campo. Lo anterior se debió a la falta de refrigeración a la cual fue sometida la materia prima durante su traslado al laboratorio. Daeschel *et al.* (1981) reportan que las poblaciones de microorganismos como *Leuconostoc mesenteroides* aumentan su población en un orden de magnitud en 4 horas a temperatura ambiente en caldos de sorgo dulce. Estos autores reportaron que si el jugo no se refrigera a 4°C en menos de 4 horas el pH del mosto desciende hasta 4 lo cual indica el franco progreso de la fermentación por este tipo de bacteria. Lo anterior pudo haber sido la causa del drástico descenso de los °Brix en los caldos de sorgos dulces y forrajeros.

Por otro lado los azúcares reductores indicaron la concentración de carbohidratos fermentables y disponibles para la levadura ya que los azúcares con carbonilo libre son los que son susceptibles de entrar a la vía glucolítica ya que su grupo aldehído

libre es susceptible de fosforilarse. Es importante mencionar que la sacarosa que llegase a estar presente en los caldos dulces no puede ser cuantificada vía esta metodología ya que el carbonilo libre presente tanto en la fructosa y glucosa es el que sufre condensación al formarse la sacarosa.

La manera más exacta de poder determinar los rendimientos en fermentaciones de sustratos mixtos es conocer el perfil exacto de los sustratos que se estarán utilizando. La aplicación de la cromatografía de líquidos en esta área se revela particularmente útil ya que con un sistema adecuado es posible, no solo separar, sino también cuantificar los diferentes sustratos presentes en un mosto en particular.

Se esperaba obtener relaciones directas entre los tres tipos de sistemas de cuantificación de azúcares de manera que al utilizar principios sencillos, como es la refractometría, se puedan obtener estimaciones buenas de las concentraciones exactas de los azúcares totales contenidos en un caldo dulce.

El perfil de sustratos en los caldos de sorgo dulce, presentado en la Figura 5.2, nos permitió calcular los rendimientos globales de proceso si se toma en cuenta que por cada gramos de glucosa/fructosa fermentados se producen teóricamente 0.51 g de etanol y 0.54 g de etanol por g de sacarosa fermentada (Hodge y Hildebrandt, 1954). La diferencia entre los factores de rendimiento se debe a la adición del agua en la hidrólisis extracelular de la sacarosa por parte de *Saccharomyces cerevisiae*.

Se presentó una baja concentración de sacarosa en los caldos de sorgos dulces y forrajeros con respecto a glucosa y fructosa (Figura 5.2) contrariamente a lo reportado por Prasad *et al.* (2007), Phowchinda *et al.* (1997) y Krishnaveni *et al.* (1984). Lo anterior pudo deberse a la inversión de sacarosa la cual es catalizada a pH ligeramente ácido característico de los caldos de sorgo dulce (Whistler y BeMiller, 1999). Coleman (1975) reporta que existen variedades de sorgo dulce especializadas para producir azúcar cristalizada y que presentan bajos niveles de



inversión de sacarosa. Por otra parte, menciona que las variedades especializadas para producción de jarabes invertidos pueden presentar pérdidas de hasta 8% diario de la concentración inicial de sacarosa debido a los altos niveles de invertasas endógenas presentes en el jugo.

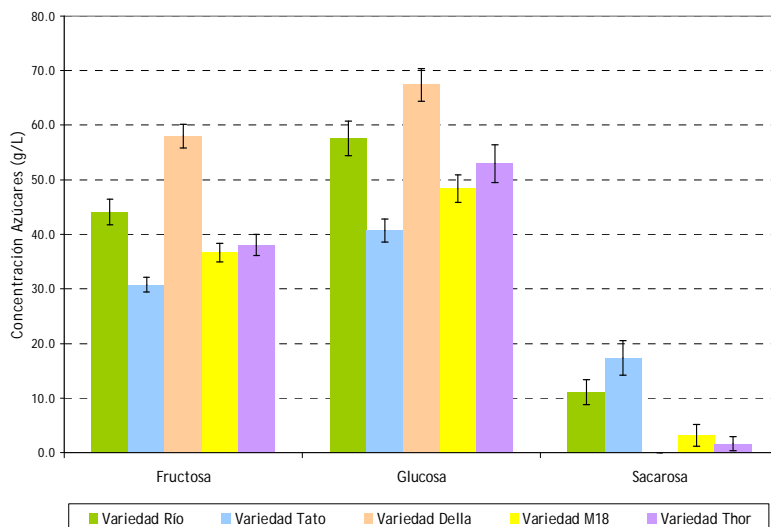


Figura 5.2: Comparación de la concentración relativa de carbohidratos ( $g L^{-1}$ ) en los caldos de 5 variedades de sorgos dulces y forrajeros al 4° corte. Las barras verticales representan el error estándar.

Los niveles de AANL óptimos para que se lleve a cabo una fermentación alcohólica se encuentran alrededor de  $150 mg L^{-1}$  (Ingledew, 1995). De esta forma, los caldos de sorgo dulce en sí resultan deficientes en compuestos nitrogenados necesarios para la fermentación.

Los compuestos fenólicos que se encuentran presentes en la planta del sorgo dulce son mayoritariamente ácido p-coumárico y ácido ferúlico presentes en la corteza y médula, respectivamente (Billa *et al.*, 1997); actúan como agentes de entrecruzamiento entre las fibras de lignina y hemicelulosa al formar los enlaces

éster y éter entre estos dos componentes de las paredes celulares vegetales (Billa y Monties, 1995).

Estos ácidos fenólicos resultan detrimentales en el rendimiento de la fermentación al reducir la cantidad de nutrientes disponibles para la levadura mediante la acomplejamiento de varias enzimas (proteasas/glucosidasas) necesarias para los procesos de hidrólisis (Salunke *et al.*, 1982). Al ser ligandos polidentados, los polifenoles reducen las propiedades nutrimentales al tener la capacidad de acomplejar los residuos amino presentes en las proteínas de los mostos y así reducir la biodisponibilidad de estos compuestos (Mullins y NeSmith, 1986).

Mullins y Lee (1991) reportan que la concentración crítica de compuestos fenólicos para precipitar más del 70% de la proteína presente en mostos de sorgo es de 3g/L. Lo anterior causa una reducción significativa de las tasas de producción de etanol en mostos producidos a partir de sorgo alto en taninos.

En el caso de las variedades de sorgos dulces y forrajeros se observa que las cantidades presentes de compuestos fenólicos oscilan alrededor de 0.2 g/L lo cual representa menos del 10% de la concentración crítica de compuestos fenólicos necesarios para reducir las tasas de fermentación. Al no existir diferencias significativas en el contenido de esos compuestos entre las 5 variedades de sorgo se descarta este factor para explicar diferencias en rendimiento o eficiencia de producción de etanol.

Se reporta que la concentración de compuestos fenólicos para jugos clarificados de caña de azúcar es de 0.8 gramos equivalentes de ácido gálico/L (Payet *et al.*, 2006), lo cual representa 4 veces la concentración promedio obtenida para los caldos de las variedades de sorgos dulces y forrajeros. Lo anterior representa una ventaja competitiva contra la caña de azúcar en la industria de producción de bioetanol, ya que se desea contar con una materia prima con baja concentración de inhibidores y compuestos antinutrientales.

### 5.3. PRUEBAS DE FERMENTACIÓN PARA LAS CINCO VARIEDADES DE SORGOS DULCES Y FORRAJEROS

En el caso de las pruebas de fermentación de los caldos de 5 variedades de sorgo dulce, no se realizaron ajustes iniciales de la fermentación (pH, AANL) ya que se quería observar las diferencias en los rendimientos de fermentación tal y como se había expresado el jugo.

Los rendimientos de etanol en fermentación se calcularon con respecto a la cantidad de etanol máxima que se podría generar por unidad de azúcar inicial de acuerdo a la ecuación 5.1

$$\% \text{Rendimiento} = \frac{\text{Cantidad media de etanol por CG (mL L}^{-1}\text{)}}{\text{Cantidad máxima de etanol a partir de azúcares fermentables (mL L}^{-1}\text{)}} \times 100$$

(Ecuación 5.1)

Las cantidades de azúcares iniciales cuantificados por HPLC difirieron significativamente respecto a la cuantificación hecha post-recepción debido a la pasteurización que se hizo previo a la fermentación de los caldos de sorgos dulces y forrajeros. Las temperaturas que se alcanzaron durante el proceso de pasteurización (70°C) catalizaron la reacción de Maillard, la cual es altamente endergónica (Whistler y BeMiller, 1999). En esta reacción, el grupo aldehído de los azúcares reductores condensa, con el grupo amino de los aminoácidos para formar compuestos coloreados importantes en la industria alimentaria. En el contexto de las fermentaciones industriales, la reacción de Maillard tiene una connotación negativa ya que reduce la disponibilidad de aminoácidos en el mosto al mismo tiempo que genera inhibidores de fermentación tales como el hidroximetilfurfural (Tauer *et al.*, 2004).

Las cantidades de etanol obtenidas al final de la fermentación presentan diferencias significativas las cuales son congruentes con las diferencias encontradas entre las cantidades de azúcares iniciales para cada variedad (Tabla 5.3).

En el caso de los rendimientos de conversión no se encontraron diferencias significativas lo cual sugiere que el proceso de fermentación entre variedades fue homogéneo. Aún así, si existen diferencias significativas entre los rendimientos de etanol por hectárea lo cual se explica tomando en cuenta las diferencias entre los litros de jugo expresado por hectárea (Tabla 5.1).

**Tabla 5.3:** *Parámetros termodinámicos y cinéticos promedio que describen el comportamiento de las fermentaciones de caldos de 5 variedades de sorgos dulces y forrajeros al 4° corte<sup>1</sup>*

Variedad	Azúcares Iniciales (g L <sup>-1</sup> )	Error Estándar	Etanol Teórico (mL L <sup>-1</sup> )	Error Estándar	Etanol Práctico (mL L <sup>-1</sup> )	Error Estándar	Rendimiento Etanol (%)	Error Estándar
Río	112.96 <sup>a</sup>	7.34	73.19 <sup>a</sup>	7.34	56.36 <sup>a</sup>	3.09	79.99 <sup>a</sup>	1.13
M18	70.34 <sup>c</sup>	4.16	45.58 <sup>c</sup>	4.16	35.78 <sup>c</sup>	2.54	85.71 <sup>a</sup>	2.33
Della	102.00 <sup>a,b</sup>	5.28	66.09 <sup>a,b</sup>	5.28	52.84 <sup>a,b</sup>	2.24	86.09 <sup>a</sup>	2.03
Tato	75.72 <sup>c</sup>	4.16	49.06 <sup>c</sup>	4.16	38.90 <sup>c</sup>	3.02	89.75 <sup>a</sup>	2.98
Thor	92.24 <sup>b</sup>	5.26	59.77 <sup>b</sup>	5.26	48.01 <sup>b</sup>	2.59	84.64 <sup>a</sup>	3.41
Variedad	Rendimiento Etanol (L/ha)	Error Estándar	Alcoholes superiores (ppm)	Error Estándar	K <sub>c</sub> (h <sup>-1</sup> )	Error Estándar	K <sub>f</sub> (h <sup>-1</sup> )	Error Estándar
Río	924.34 <sup>a,b</sup>	50.65	252.46 <sup>a</sup>	21.39	0.2507 <sup>a</sup>	0.0264	0.1699 <sup>a</sup>	0.0074
M18	1012.57 <sup>a</sup>	71.80	143.57 <sup>b</sup>	18.97	0.2403 <sup>a</sup>	0.0253	0.1515 <sup>a</sup>	0.0044
Della	1051.53 <sup>a</sup>	44.59	201.94 <sup>a</sup>	19.36	0.2552 <sup>a</sup>	0.0276	0.1602 <sup>a</sup>	0.0097
Tato	813.21 <sup>b</sup>	63.22	152.05 <sup>b</sup>	17.99	0.2860 <sup>a</sup>	0.0414	0.1821 <sup>a</sup>	0.0268
Thor	720.26 <sup>b</sup>	38.84	196.19 <sup>a,b</sup>	14.16	0.2517 <sup>a</sup>	0.0269	0.1635 <sup>a</sup>	0.0084

<sup>1</sup>Valores con diferente superíndice dentro de la misma columna son estadísticamente diferentes ( $\alpha=0.05$ )

La variedad que rindió mas en jugo fue M18 sin embargo contuvo una baja concentración de azúcares. Por otro lado, la variedad Río, aunque presentó un mayor contenido de azúcares fermentables, no rindió tanto en campo. La variedad

Della, la cual obtuvo un buen rendimiento tanto en acumulación de azúcares como en producción de jugo, se posicionó como la variedad de sorgo dulce con mayor potencial para la producción de bioetanol.

Tomando en cuenta que se pueden realizar tres ciclos al año para el caso del sorgo dulce (realizando el corte 5 semanas después de la floración) se podría obtener de la variedad Della  $3,150 \text{ L ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ . Dichos resultados concuerdan con lo publicado por Prasad (2007) y Brown (2006). Estos rendimientos son comparables con los obtenidos para la producción de bioetanol a partir de maíz; Brown (2006) reporta que se obtienen  $3300 \text{ L ha}^{-1}$  de etanol para el caso de Estados Unidos. En el caso de México la utilización de maíz como materia prima para producir bioetanol enfrenta muchos retos de orden político-económico, lo cual posiciona al sorgo dulce como una alternativa bastante atractiva tomando en cuenta que se obtienen rendimientos iguales que con el maíz.

De acuerdo con el estudio "Potenciales y viabilidad del uso de bioetanol y biodiesel para el transporte en México" (SENER, 2007) se necesitan 123 millones de litros por año de etanol para oxigenar al 10% la gasolina consumida en el área metropolitana de Monterrey. Tomando en cuenta el rendimiento de producción de etanol obtenido en este estudio ( $3,150 \text{ L ha}^{-1}$ ) se necesitarían 40,000 ha dedicadas al cultivo de sorgo dulce para satisfacer esta demanda.

### 5.3.1. EVOLUCIÓN DE LOS PERFILES DE ANALITOS A LO LARGO DE LA FERMENTACIÓN

En general todos los mostos (a excepción de la variedad Tato) presentaron niveles iniciales adecuados de AANL (Figura 5.3) para fermentar aunque en la caracterización de la materia prima resultó que ninguno de ellos contenía dichos niveles. El drástico aumento en los niveles iniciales de AANL se debe a la adición del inóculo de trabajo el cual fue generado en caldo YM Difco® que contenía  $3 \text{ g L}^{-1}$  de extracto de malta y  $3 \text{ g L}^{-1}$  de extracto de levadura. Esto concuerda con lo

observado por Barredo *et al.* (2001a) quienes reportaron que mostos de sorgo inoculados con cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* en medio malta-extracto de levadura presentaron niveles de AANL mayores que mostos control.

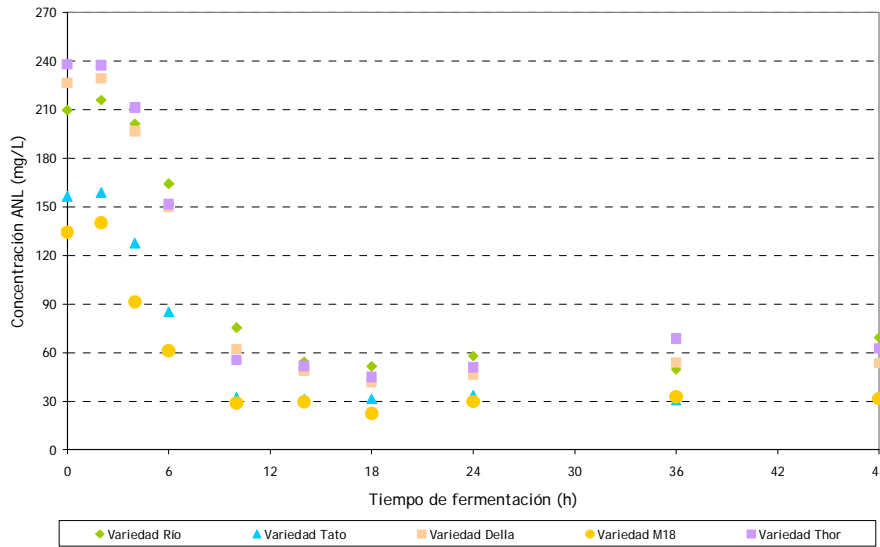


Figura 5.3: Perfil de consumo promedio de AANL (mg L<sup>-1</sup>) durante la fermentación de caldos de 5 variedades de sorgos dulces y forrajeros al 4° corte.

El perfil de consumo de azúcares se presenta en las Figuras 5.4 y 5.5. En el caso del consumo de glucosa, se obtuvieron concentraciones residuales alrededor de 5 g L<sup>-1</sup> hacia las 18 horas de fermentación, lo que indica que esa puede ser la concentración que se obtiene al verse limitado el crecimiento celular al alcanzarse un mínimo de concentración aceptable de AANL (el cual en este caso se encuentra alrededor de los 50 mg L<sup>-1</sup>).

Mullins y NeSmith (1986) reportan que al suplementar mostos de sorgo alto en taninos con fuentes externas de nitrógeno (0.3 g L<sup>-1</sup>), desaparecen las diferencias en las velocidades relativas de producción de etanol y consumo de azúcares.

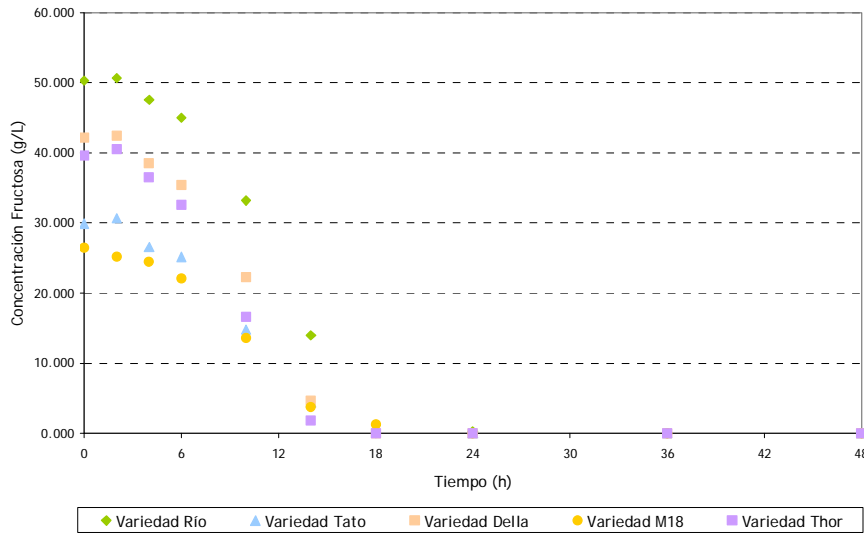


Figura 5.4: Perfil de consumo promedio de fructosa ( $g L^{-1}$ ) durante la fermentación de caldos de 5 variedades de sorgos dulces y forrajeros al 4° corte.

En la Figura 5.4 se presenta el perfil de consumo de fructosa el cual presentó diferencias significativas con respecto al perfil de consumo de glucosa (Figura 5.5). Los dos azúcares se consumieron a la misma velocidad pero en el caso de la glucosa quedó una cantidad residual correspondiente al 4% de los azúcares fermentables presentes en el mosto. Debido a que se los niveles intracelulares de azúcares fermentables en *Saccharomyces cerevisiae* son siempre despreciables, se ha propuesto que el mecanismo que regula realmente la tasa metabólica de consumo de azúcares es el transporte facilitado a través de la membrana (Gancedo y Serrano, 1989).

Debido a que la concentración de glucosa en el mosto fue significativamente mayor que la concentración de fructosa y a que ambos azúcares se transportan a la misma velocidad por el mismo mecanismo, la levadura no realizó más el transporte de glucosa al interior de la célula al verse en condiciones de nitrógeno limitante.

Este explicaría los bajos rendimientos obtenidos (comparados con el teórico) en fermentaciones de sorgo dulce presentes en los estudios de Liu y Shen (2008) y Mei *et al.* (2008) donde los rendimientos promedio de etanol oscilaron alrededor del 88%.

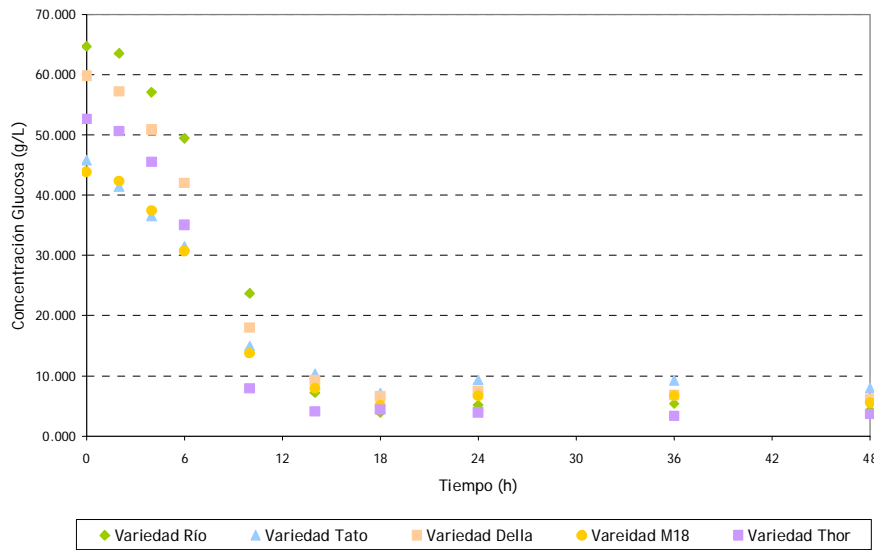


Figura 5.5: Perfil de consumo de glucosa ( $g L^{-1}$ ) durante la fermentación de caldos de 5 variedades de sorgos dulces y forrajeros al 4° corte.

Las cantidades de alcoholes fueron diferentes entre variedades como se observa en la Figura 5.6 para el etanol y 5.7 para los alcoholes superiores. Cabe señalar que las diferencias en las concentraciones finales de alcoholes superiores tuvo una correlación positiva con la cantidad de AANL presente en el mosto al inicio de la fermentación. Esto concuerda con lo propuesto por Barredo *et al.* (2001a) quienes reportan que la cantidad de AANL presentes en mostos de sorgo tenía una correlación positiva con la cantidad de alcoholes superiores presentes al final de la fermentación.



El perfil de producción de alcoholes superiores siguió una forma hiperbólica de acuerdo a lo reportado por VanGheluwe *et al.* (1975) y las cantidades finales producidas (150-250 ppm) concuerdan por lo reportado por Ingledew (1995).

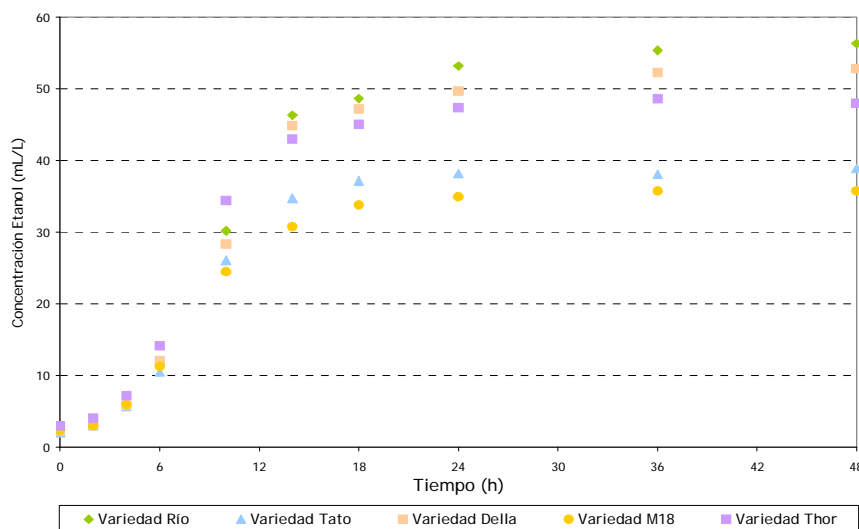


Figura 5.6: Perfil de producción de etanol (mL L<sup>-1</sup>) durante la fermentación de caldos de 5 variedades de sorgos dulces y forrajeros al 4° corte.

#### 5.4. EFECTO DE LA ADICIÓN DE AMILOGLUCOSIDASA

A lo largo del proceso de maduración de la planta de sorgo dulce ocurren cambios en los perfiles de azúcares presentes en los tallos. Conforme madura la planta hay una acumulación de dextrinas en preparación a la producción de grano (Wall y Blessin, 1975). Este fenómeno no es tan marcado en las variedades de sorgo dulce comparado con el sorgo granífero. Por lo tanto, es posible que existieran dextrinas en los tallos de la planta de sorgo dulce cortadas más tardíamente.

Lo anterior generó la necesidad de probar si existían cantidades significativas de dextrinas en los caldos de sorgos dulces y forrajeros estudiados. La amiloglucosidasa (EC # 3.2.1.3) es una enzima que cataliza la hidrólisis al azar de los enlaces  $\alpha$ -1,4 y

$\alpha$ -1,6 presentes en las dextrinas generando glucosa libre (Robertson *et al.*, 2006). Así, al medir la evolución de la cantidad de glucosa presente en los caldos de sorgo dulce añadidos con amiloglucosidasa se podría observar si las cantidades de dextrinas eran significativas.

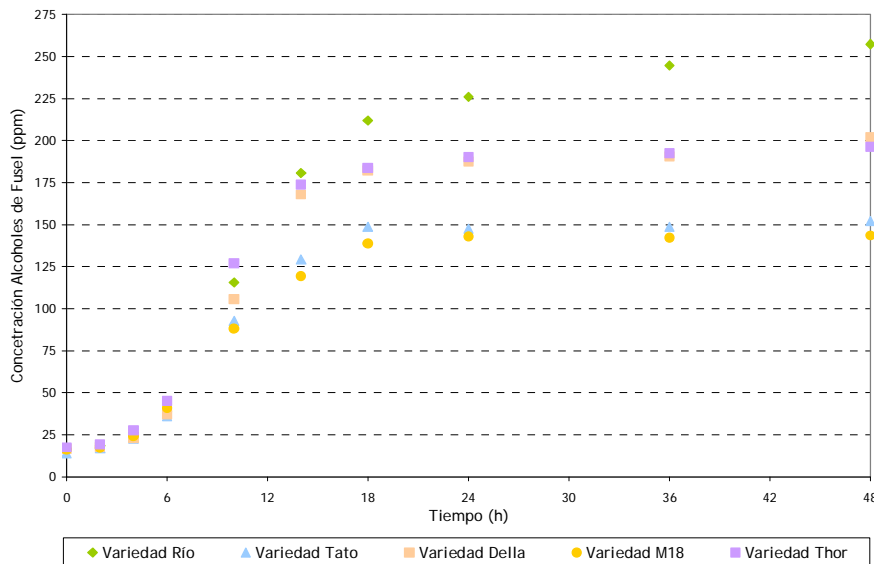


Figura 5.7: Perfil de producción de alcoholes superiores (ppm) durante la fermentación de caldos de 5 variedades de sorgo dulce

Se observó como la concentración de glucosa libre permaneció en un valor constante de  $37.05 \pm 0.58 \text{ g L}^{-1}$  para el control y  $35.99 \pm 0.91 \text{ g L}^{-1}$  para el tratamiento con AMG a lo largo de la cinética enzimática; esto indicó que la cantidad de dextrinas no fue significativa en la composición de los caldos. De esta manera se decidió no recomendar la adición de la enzima en procesos de producción de bioetanol a partir de caldos dulces.

Cabe mencionar que aunque la prueba enzimática resultó negativa, Wall y Blessin (1975) mencionan que la tasa de acumulación de dextrinas (o eventualmente almidón) en los tallos de la planta de sorgo dulce varía de variedad a variedad por

lo que no se descartaría evaluar este mismo proceso en otras variedades cortadas en diferentes estados de madurez.

### 5.5. PRUEBA DE FERMENTACIÓN CON 2 FUENTES NITROGENADAS

De acuerdo a lo expuesto en la sección 5.2, los caldos de sorgo dulce utilizados en este estudio resultaron deficientes en AANL lo que podría generar fermentaciones lentas de acuerdo a Ingledew (1995). Se llevó a cabo una prueba para determinar el efecto que tenía el enriquecimiento con dos fuentes nitrogenadas de una mezcla compuesta de caldos de sorgo dulce sobre el rendimiento y la velocidad de fermentación alcohólica.

De acuerdo a la Tabla 5.4 existieron diferencias significativas para las cantidades de etanol generadas para los tres tratamientos; sin embargo, lo anterior se debe a las cantidades iniciales de azúcar diferentes presentes en el mosto (Figura 5.10).

Tabla 5.4: *Parámetros termodinámicos y cinéticos promedio que describen el comportamiento de las fermentaciones de mezclas compuestas de caldos de sorgos dulces y forrajeros enriquecidas con fuentes nitrogenadas<sup>1</sup>*

Tratamiento	Etanol Real (mL L <sup>-1</sup> )	Error Estándar	Rendimiento Etanol (%)	Error Estándar	K <sub>e</sub> (h <sup>-1</sup> )	Error Estándar
Control	40.16 <sup>a</sup>	0.59	90.44 <sup>a</sup>	1.03	0.2831 <sup>a</sup>	0.0193
Urea	36.24 <sup>b</sup>	0.17	79.16 <sup>b</sup>	1.08	0.2789 <sup>a</sup>	0.0619
Extracto de Levadura	33.77 <sup>c</sup>	0.44	85.91 <sup>a</sup>	4.16	0.2133 <sup>a</sup>	0.0212

<sup>1</sup>Valores con diferente superíndice dentro de la misma columna son estadísticamente diferentes ( $\alpha=0.05$ )

Cabe mencionar que en el caso de la fermentación enriquecida con urea se obtuvo un rendimiento significativamente más bajo con respecto a los otros dos tratamientos. En presencia de múltiples fuentes de nitrógeno la levadura tendrá preferencia por aminoácidos en vez de urea lo cual puede llevar eventualmente a

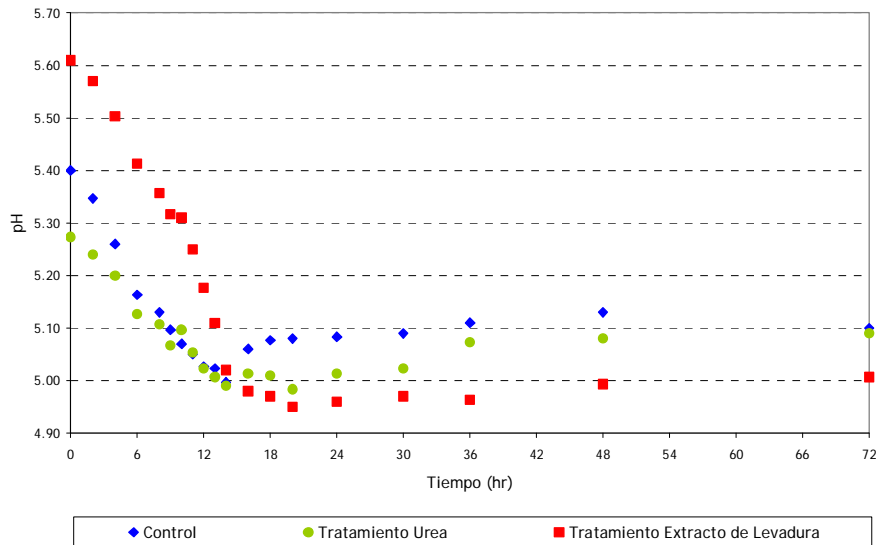
una nula utilización de la última (Shinohara y Yanagida, 1999). An y Ough (1993) reportan que en presencia de concentraciones adecuadas de arginina las cantidades asimiladas de urea no fueron significativas.

Además cabe resaltar que un mosto con una baja cantidad de AANL (como en el caso del control y el tratamiento con urea) puede llegar a tener un rendimiento comparable con un mosto con niveles adecuados de AANL ( $150 \text{ mg L}^{-1}$ ) si éste contiene el perfil adecuado de aminoácidos (Thomas e Ingledew, 1990).

#### 5.5.1. EVOLUCIÓN DE LOS PERFILES DE ANALITOS A LO LARGO DE LA FERMENTACIÓN

El pH a lo largo de la fermentación fue disminuyendo (Figura 5.8) debido a la producción gradual de ácidos orgánicos y consumo de compuestos básicos tales como amino ácidos básicos y fosfatos en concordancia con Coote y Kirsop (1976). El monitoreo de este parámetro es muy importante, ya que el crecimiento de la levadura (y por ende la producción de etanol) se detiene a  $\text{pH} < 3$ . Este puede ser el caso en fermentaciones contaminadas con *Lactobacillus sp.* (Barnett, 1977).

En el caso de la fermentación con extracto de levadura se registró un pH inicial superior a los otros dos tratamientos debido a los múltiples residuos amino encontrados en los perfiles de aminoácidos en los lisados de levadura o puede deberse a los métodos de autólisis utilizados para la producción del extracto de levadura (Tangler y Erten, 2008)



**Figura 5.8:** Perfil de pH durante la fermentación de mezclas compuestas de caldos de sorgos dulces y forrajeros enriquecidos con fuentes nitrogenadas.

En el caso del perfil de consumo de AANL (Figura 5.9), se aprecia que los tres tratamientos llegaron hasta un mismo nivel final de nitrógeno disponible en el mosto. Aún así, al principio de la fermentación se presentaron niveles más altos de AANL en el mosto enriquecido con extracto de levadura con respecto al control de acuerdo a lo esperado. Se presentaron niveles iniciales y perfiles de consumo idénticos para el control negativo y el tratamiento con urea debido a que la técnica de identificación con ninhidrina no puede cuantificar los grupos amino presentes en la urea (Filipe-Ribeiro y Mendes-Faia, 2007).

En este caso resultaría útil realizar la cuantificación del nitrógeno no proteico (Grindley y Eckstein, 1916) con algunas de las optimizaciones para remoción de proteína propuestas por Windeler y Shannon (1966).

En el caso de las fermentación control y enriquecida con urea se aprecia un ligero incremento inicial en los niveles de AANL, esto puede deberse a la lisis de

acarreadores de azúcares que se da en mostos con bajos niveles de AANL (Boulton y Quain, 2001).

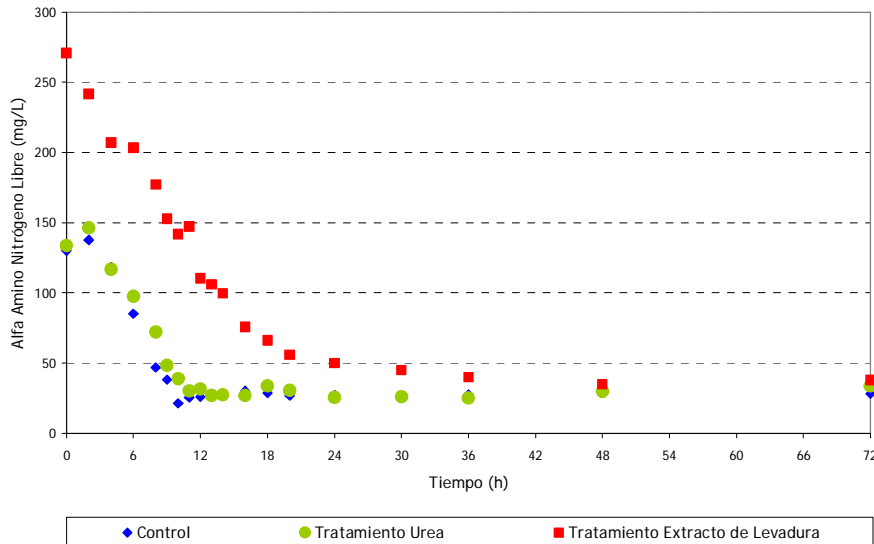


Figura 5.9: Perfil de consumo de AANL ( $mg L^{-1}$ ) durante la fermentación de mezclas compuestas de caldos de sorgos dulces y forrajeros enriquecidas con fuentes nitrogenadas

El consumo de azúcares durante la fermentación (Figuras 5.10) siguió un patrón similar al consumo del AANL, alcanzando un mínimo a las 18 horas de iniciado el proceso. En el caso de la glucosa no se alcanzó un consumo completo sino que se presentó un comportamiento asintótico de la concentración de la misma alrededor de los  $5 g L^{-1}$  (lo cual representa un 6% de la concentración de azúcares totales iniciales en el mosto). Lo anterior podría explicarse si consideramos que a bajas concentraciones de AANL, las cuales ocurren hacia el final de la fermentación, los transportadores de azúcares empiezan a sufrir degradación lo que causa, que la asimilación de azúcares se detenga o bien se vea ralentizada, además de un ligero incremento en los niveles de AANL en el mosto como respuesta del microorganismo a la deficiencia de nutrientes del medio (Boulton y Quain, 2001).

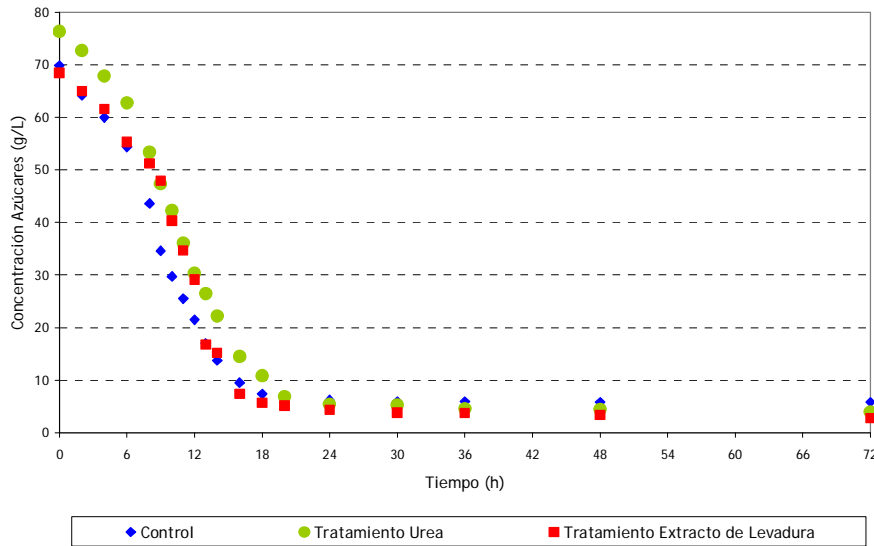


Figura 5.10: Perfil de consumo de azúcares ( $g L^{-1}$ ) durante la fermentación de mezclas compuestas de caldos de sorgos dulces y forrajeros enriquecidas con fuentes nitrogenadas.

Los perfiles de producción de etanol presentan en la Figura 5.11 donde se aprecian diferencias entre los tratamientos probados. Dichas diferencias, más que deberse a efectos de los tratamientos en sí, se deben a diferencias en las concentraciones iniciales de azúcares en los mostos. Estas diferencias, aunque pequeñas, fueron suficientes para ser detectadas en los análisis de varianza correspondientes.

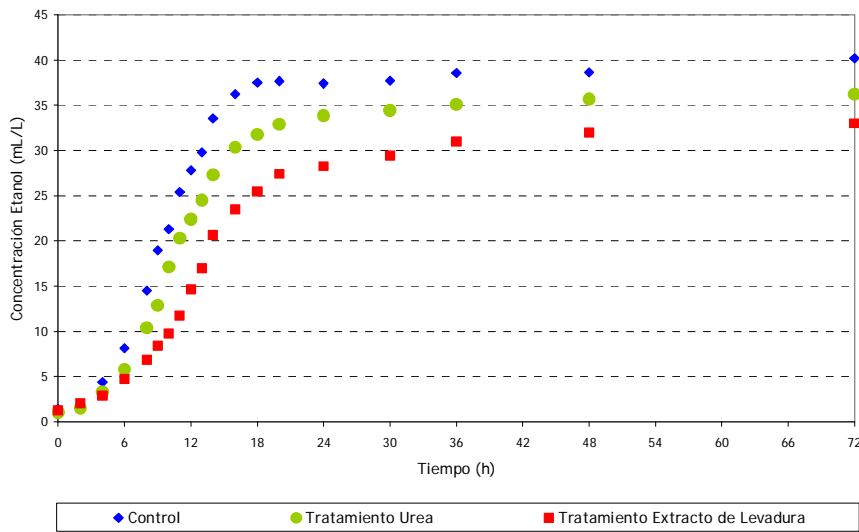


Figura 5.11: Perfil de producción de etanol ( $\text{mL L}^{-1}$ ) durante la fermentación de mezclas compuestas de caldos de sorgos dulces y forrajeros enriquecidas con fuentes nitrogenadas.



## CAPÍTULO 6

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se realizó el estudio agronómico de las 5 variedades de sorgos dulces y forrajeros. Se concluyó que existe una relación lineal inversa entre la cantidad de jugo expresado en la molienda de los tallos y la concentración de azúcares en el jugo. Se calcularon los rendimientos de azúcares obtenidos por hectárea los cuales presentaron diferencias significativas entre las variedades tempranas (Río, Tato y Thor) y las variedades tardías (M18 y Della). En el caso de las variedades tardías, se produjeron incrementos de un 10% en la concentración de azúcares, medidos como °Brix, por dejar madurar el cultivo de la 4° a la 5° semana posterior a la floración o post-antesis.

Se llevaron a cabo las fermentaciones de los caldos de sorgos dulces y forrajeros y se determinaron las eficiencias de conversión a etanol por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 24858. Se demostró que las variedades mejoradas provistas por la universidad de Texas A&M (Della, M18, Río) rindieron más etanol por hectárea con respecto a los testigos locales (Tato y Thor).

Las características agronómicas que causaron las diferencias en el rendimiento fueron, en el caso de la variedad Río, la alta acumulación de azúcares; en el caso de la variedad M18 se debe a la alta cantidad de jugo exprimido por hectárea y para Della es una combinación de los factores anteriores. Esto provocó que esta variedad rindiera un 3% más que la variedad M18 y un 11% más que la variedad Río.

Si se utilizara la variedad Della en un contexto de producción de etanol dados los rendimientos obtenidos en el presente estudio ( $3,150 \text{ L etanol ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ) para satisfacer la demanda de oxigenantes E10 de la zona metropolitana de Monterrey sería necesario contar con un área cultivada de aproximadamente 40,000 hectáreas.

Se estudió la influencia de varios factores en el rendimiento de producción de etanol a partir de sorgo dulce para lo cual se determinó el efecto de la enzima amiloglicosidasa como posible degradadora de dextrinas contenidas en el jugo y diferentes fuentes nitrogenadas las cuales pudieran impartir vigor a las fermentaciones. Se concluyó que ninguno de los dos tratamientos (enzima o fuente nitrogenada) afectó el rendimiento o velocidad de producción de alcoholes aunque no se descarta la utilización de dichos tratamientos en procesos de producción de etanol a partir de caldos de otras variedades de sorgos dulces y forrajeros.

Se recomienda para estudios posteriores mejorar el manejo de las muestras de sorgo dulce desde la obtención del jugo hasta su utilización en procesos de obtención de etanol ya que se demostró que la concentración de azúcares puede disminuir hasta un 20% por contaminación microbiana.

Aunque está reportado que es necesario pasteurizar los mostos antes de realizar las fermentaciones, se recomienda omitir este paso ya que la presencia de reacciones de Maillard en caldos de sorgo dulce puede disminuir hasta un 10% de la cantidad de azúcares fermentables. La utilización de tasas de inoculación aumentadas permitiría el establecimiento exitoso de *Saccharomyces cerevisiae* como el cultivo predominante en el mosto y así asegurar velocidades adecuadas de producción de etanol.

## **CAPÍTULO 7**

### **BIBLIOGRAFÍA CITADA**

Aggarwal, N.K., Yavad, S.K., Dhamija, S.S. y Yavad, B.S. 2001. Optimization of enzymatic hydrolysis of pearl millet for glucose production. *Starch*. 53:330-335.

An, D. y Ough, C.S. 1993. Urea excretion and uptake by wine yeasts as affected by various factors. *American Journal of Enology and Viticulture*. 44(1):35-40.

AOAC. 1980. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. AOAC. Washington DC, USA.

Arasaratnam, V., Thayanathan, K. y Balasubramaniam, K. 1998. Sugar syrup (DE 50-70) from corn flour. *Starch*. 50:95-98.

Ayrapaa, T. 1968. Formation of higher alcohols by various yeasts. *Journal of the Institute of Brewing*. 74:169-78.

Barnet, J.A. 1977. The nutritional test in yeasts systematics. *Journal of General Microbiology*. 99:183-190.

Barredo-Moguel, L.H., Rojas-de-Gante, C. y Serna-Saldívar, S.O. 2001a. Alpha amino nitrogen and fusel alcohols of sorghum worts fermented into lager beer. *Journal of the Institute of Brewing*. 107(6):367-372.

Barredo-Moguel, L.H., Rojas-de-Gante, C. y Serna-Saldívar, S.O. 2001b. Comparisons between a commercial wort and a waxy sorghum wort fermented into a lager beer, with emphasis on yeast growth and ethanol production. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 59(1):24-27.

Billa, E., Koullas, D.P., Monties, B. y Koukios, E.G. 1997. Structure and composition of sweet sorghum stalk components. *Industrial Crops and Products*. 6:297-302

Billa, E. y Monties, B. 1995. Molecular variability of lignin fractions isolated from wheat straw. *Research on Chemical Intermediates*. 21(3-5):303-311

Belcher, A. 2005. The world looks to higher-tech to advance fuel ethanol production into the 21st century. *International Sugar Journal*. 107:196-199.

Berg, C. 2001. World ethanol production.

[http://www.distill.com/world\\_ethanol\\_production.htm](http://www.distill.com/world_ethanol_production.htm) (Accesado en diciembre de 2009)

Bisson, L.F. y Fraenkel, D.G. 1983. Involvement of kinases in glucose and fructose uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 80:1730-1734.

Bisson, L.F. y Fraenkel, D.G. 1984. Expression of kinases dependent glucose uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*. 159:1013-1017.

Boulton, C. y Quain, D. 2001. Biochemistry of fermentation. Capítulo 3 en *Brewing yeast and fermentation*. Blackwell Science. Londres, Reino Unido.

Brown, L. 2006. Plan B 2.0 Rescuing a planet under stress and a civilization in trouble. Earth Policy Institute. Washington DC, USA.

Browner, C. 2000. Remarks as prepared for delivery to press conference on March 20, 2000. <http://www.epa.gov/otaq/consumer/fuels/mtbe/press34b.pdf> (Accesado en diciembre de 2009).

Boyer, C.D. y Shannon, J.C. 2003. Carbohydrates of the kernel. en Corn chemistry and technology, 2da Edición. White, P.J. y Johnson, L.A. (Eds.). St Paul MN, USA.

Busturia, A. y Lagunas, R. 1986. Catabolite inactivation of the glucose transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of General Microbiology. 132:379-385.

Camps, M. y Marcos, F. 2008. Alcoholes. Capítulo 10 en Los biocombustibles. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.

Carlson, M. y Botstein, D. 1982. Two differentially regulated mRNAs with different 5 prime ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. Cell. 28:145-154.

Chen, E.C.-H. 1978. Relative contribution of Ehrlich and biosynthetic pathways to the formation of fusel alcohols. Journal of the American Society of Brewing Chemists. 38:3943.

Coble, C.G., Egg, R.P. y Shmulevich, I. 1984. Processing techniques for ethanol production from sweet sorghum. Biomass. 6:111-117.

Coleman, O.H. 1975. Jarabe y azúcar de sorgo dulce. Capítulo 11 en Producción y usos del sorgo. Wall, J.S. y Ross, W.M. (Eds.). Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina.

Coote, N., y Kirsop, B.H. 1976. Factors responsible for the decrease in pH during beer fermentations. Journal of the Institute of Brewing & Distilling. 82:149-153.

Creus, A. 2004. Biomasa. Capítulo 2 en Energías renovables. Pina, C. (Eds.). Ediciones Ceysa. Barcelona, España.

Daeschel, M.A, Mündt, J.O. y McCarty, I.E. 1981. Microbial changes in sweet sorghum (*Sorghum bicolor*) juices. *Applied and Environmental Microbiology*. 42(2):381-382.

Davis, G.W. 2006. Using E85 in vehicles. Capítulo 8 en *Alcoholic fuels*. Minteer, S.D. (Eds). CRC/Taylor and Francis Group, LCC. Boca Raton FL, USA.

Dien, B.S., Bothast, R.J., Nichols, N.N. y Cotta, M.A. 2002. The U.S. corn ethanol industry: An overview of current technology and future prospects. *International Sugar Journal*. 104:204-211.

Dien, B.S., Cotta, M.A. y Jeffries, T.W. 2003. Bacteria engineered for fuel ethanol production: Current status. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 63:258-266.

Does, A.L. y Bisson, L.F. 1989. Comparison of glucose uptake kinetics in different yeast. *Journal of Bacteriology*. 171:1303-1308.

El-Mansi, E.M.T. y Ward, F.B. 2007. *Microbiology of industrial fermentation*. Capítulo 2 en *Fermentation microbiology and biotechnology*. El-Mansi, E.M.T., Bryce, C.F.A., Demain, A.L. y Allman, A.R. (Eds.). CRC/Taylor and Francis Group, LCC. Boca Raton FL, USA.

Energy Information Administration. 1998. *Alternative to traditional transportation fuels 1996*. U.S. Department of Energy. DOE/EIA-0484(98).

Ezeji, T.C., Qureshi, N., Karcher, P. y Blaschek H. 2006. Production of butanol from corn. Capítulo 6 en *Alcoholic fuels*. Minteer, S.D. (Eds.). CRC/Taylor and Francis Group, LCC. Boca Raton FL, USA.

Faiz, A., Weaver, C.S. y Walsh, P. 1996. *Air pollution from motor vehicles, standards and technologies for controlling emission*. The World Bank.

Filipe-Ribeiro, L. y Mendes-Faia, A. 2007. Validation and comparison of analytical methods used to evaluate the nitrogen status of grape juice. *Food Chemistry*. 100:1272-1277.

Futcher, B., Latter, G.I., Monardo, P., McLaughlin, C.S. y Garrels, J.I. 1999. A sampling of the yeast proteome. *Molecular and Cellular Biology*. 19:7357-7368.

Gancedo, C. y Serrano, R. 1989. Energy-yielding metabolism. Capítulo en *The yeasts*. Volume 3. Metabolism and physiology of yeasts. Rose, A.H. y Harrison, J.S. (Eds.). London, Reino Unido.

Gnansounou, E., Dauriat, A. y Wyman, C.E. 2005. Refining sweet sorghum to ethanol and sugar: economic trade-offs in the context of North China. *Bioresource Technology*. 96:985-1002

Grenson, M. 1992. Amino acid transporters in yeast: structure, function and regulation en *Molecular aspects of transport proteins*. 1era Edición. DePont, J.(Eds.). Londres, Reino Unido.

Grindley, H.S. y Eckstein, H.C. 1916. The nonprotein nitrogenous constituents of feedingstuffs. *Journal of the American Chemical Society*. 38(7):1425-1431.

Grohmann, K. y Bothast, R.J. 1997. Saccharification of corn fibre by combined treatment with dilute sulphuric acid and enzymes. *Process Biochemistry*. 32:405-415.

Gulati, M., Kohlmann, K., Ladisch, M.R., Hespell, R.B. y Bothast, R.J. 1997. Assessment of ethanol production options for corn products. *Bioresource Tech*. 58:253-264.

Hamelinck, C.N. y Faaij, A.P.C. 2006. Production of methanol from biomass. Capítulo 2 en Alcoholic fuels. Minteer, S.D. (Eds.). CRC/Taylor and Francis Group, LCC. Boca Raton FL, USA.

Hodge, H.M. y Hildebrandt, F.M. 1954. Alcoholic fermentation of molasses. Capítulo 3 en Industrial fermentations. Underkofler, L.A. y Hickey, R.J. (Eds.). Chemical Publishing Co. Nueva York NY, USA.

Horak, J. 1986. Amino acid transport in eukaryotic microorganisms. *Biochimica Biophysica Acta*. 864:223-256.

Ingledeu, W.M. 1995. The biochemistry of alcohol production. Capítulo 7 en The alcohol textbook. Lyons, T.P., Kelsall, D.R. y Murtagh, J.E (Eds). 1era Edición. Nottingham University Press. Nottingham, Reino Unido.

Inoue, T. 1975. Mechanism of higher alcohol formation during wort fermentation by brewer's yeast. *Reports of the Research Laboratory of the Kirin Brewery Company*. 18:13-16.

Inoue, T. y Kashihara, T. 1995. The importance of indices relating to nitrogen metabolism in fermentation control. *Technical Quarterly of the Master Brewers Association of the Americas*. 32:109-113.

Intergovernmental Panel on Climate Change. 2001. *Climate change 2001: Synthesis report*.

International Energy Agency. 2008. *Key World Energy Statistics*.

Krishnaveni, S., Balasubramanian, T. y Sadasivam, S. 1984. Sugar distribution in sweet stalk sorghum. *Food Chemistry*. 15:229-232.



Ismail, A.A. y Ali, A.M. 1971. Selection of high ethanol-yielding *Saccharomyces*. Ethanol tolerance and the effect of training in *Saccharomyces cerevisiae* Hansen. *Folia Microbiologica*. 16(5):346-349.

Jeffries, T.W. y Jin, Y.-S. 2004. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 63:495-509.

Jiménez S. 1991. Los residuos de origen vital. 1era Edición. Real Academia de Farmacia. Madrid, España.

Kelsall, D.R. y Lyons, T.P. 2003. Grain dry milling and cooking procedures: Extracting sugars in preparation for fermentation. Capítulo 2 en *The alcohol textbook*. Jacques, K.A., Lyons, T.P. y Kelsall, D.R. (Eds.). Nottingham University Press. Nottingham, Reino Unido.

Lagunas, R. 1986. Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2:221-228.

Lagunas, R. 1993. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*. 104:229-242.

Lagunas, R., Dominguez, C., Busturia, A. y Saez, M.J. 1982. Mechanisms of appearance of the Pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*: inactivation of sugar transport systems. *Journal of Bacteriology*. 152:19-25.

Leong, S.T., Muttamara, S. y Laortanakul, P. 2002. Applicability of gasoline containing ethanol as Thailand's alternative fuel to curb toxic VOC pollutants from automobile emission. *Atmospheric Environment*. 36(21):3495-3503.

Liu, R. y Shen, F. 2008. Impacts of main factors on bioethanol fermentation from stalk juice of sweet sorghum by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* (CICC 1308). *Bioresource Technology*. 99:847-854.

Mahy, H., Szabo, C. y Woods, L. 2003. 200 Proof transportation: The potential for ethanol as an alternative fuel. University of Washington, Global Commercialization of Environmental Technologies. Washington DC, USA.

Mamma, D., Koullas, D., Fountoukidis, G., Kekos, D., Macris, B.J. y Koukios, E. 1996. Bioethanol from sweet sorghum: simultaneous saccharification and fermentation of carbohydrates by a mixed microbial culture. *Process Biochemistry*. 31:377-381.

Marcos F. 2001. Biocombustibles sólidos de origen forestal. 1era Edición. AENOR. Madrid, España.

Martin, J.H. 1975. Historia y clasificación de los sorgos. Capítulo 1 en Producción y usos del sorgo. Wall, J.S. y Ross, W.M. (Eds.). Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina.

Maurico, J.C. y Salmon, J.M. 1992. Apparent loss of sugar transport activity in *Saccharomyces cerevisiae* may mainly account for maximum ethanol production during alcoholic fermentation. *Biotechnology Letters*. 14:577-582.

Mei, X., Liu, R., Shen, F. y Wu H. 2008. Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from stalk juice of sweet sorghum by immobilized yeast using response surface methodology. *Energy and Fuels*. 23(1):487-491.

Minteer, S.D. 2006. Alcoholic fuels: An overview. Capítulo 1 en Alcoholic fuels. Minteer, S.D. (Eds.). CRC/Taylor and Francis Group, LCC. Boca Raton FL, USA.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid (DNS) reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*. 31:426-428.

Montgomery, D. 2006. *Diseño y análisis de experimentos*. 2da Edición. Limusa Wiley. México. Pp 126-131.

Mullins, J.T. y Lee, J.H. 1991. Interactions of tannins with enzymes: a potential role in the reduced rate of ethanol fermentation from high-tannin biomass. *Biomass and Bioenergy*. 1(6):355-361.

Mullins, J.T. y NeSmith, C. 1986. Ethanol production from bird-resistant and non-bird-resistant grain sorghum en *Biomass Energy Development*. Smith, W.H. (Eds). Plenum Publishing Co. Nueva York NY, USA.

Murtagh, J.E. 1995. Molasses as a feedstock for alcohol production. Capítulo 3 en *The alcohol textbook*. Lyons, T.P., Kelsall, D.R. y Murtagh, J.E (Eds.). 1era Edición. Nottingham University Press. Nottingham, Reino Unido.

Neigeborn, L. y Carlson, M. 1994. Genes affecting the regulation of SUC2 gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 108:845-58.

Nichols, N.N., Dien, B.S., Bothast, R.J. y Cotta, M.A. 2004. The corn ethanol industry. Capítulo 4 en *Alcoholic fuels*. Minter, S.D. (Eds). CRC/Taylor and Francis Group, LCC. Boca Raton FL, USA.

Okolo, B.N., Ire, F.S., Ezeogu, L.I., Anyanwu, C.U. y Odibo, F.J.C. 2000. Purification and some properties of a novel raw starch-digesting amylase from *Aspergillus carbinarius*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81:329-336.

Olivera, H., Gonzalez, A. y Pena, A. 1993. Regulation of the amino acid permeases in nitrogen limited continuous cultures of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 9:1065-1078.

Ortega, M. 2002. Las energías renovables. Capítulo1 en Energías renovables. Paraninfo. Madrid, España.

Ortega, M. 2002. Energía de la biomasa. Capítulo 6 en Energías renovables. Paraninfo. Madrid, España.

Ozcan, S., Vallier, L.G., Flick, J.S., Carlson, M. y Johnston, M. 1997. Expression of the SUC2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is induced by low levels of glucose. Yeast. 13:127-137.

Payer, B., Shum Cheong Sing, A. y Smajda, J. 2006. Comparison of the concentration of phenolic constituents in cane sugar manufacturing products with their antioxidant activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54(19):7270-7276.

Perez-Carrillo, E., Serna-Saldívar, S.O., Álvarez, M.M. y Cortés-Callejas, M.L. 2008. Effect of sorghum decortication and use of protease before liquefaction with thermoresistant  $\alpha$ -amylase on efficiency of bioethanol production. Cereal Chemistry. 85(6):792-798.

Phowchinda, O., Delia-Dupuy M.L. y Strehaiano P. 1997. Alcoholic fermentation from sweet sorghum: some operating problems. 9<sup>th</sup> Annual Meeting of The Thai Society for biotechnology. Bangkok, Tailandia.

Pierce, J.S. 1987. The role of nitrogen in brewing. Journal of the Institute of Brewing. 93:378-381.

Power, R.F. 2003. Enzymatic conversion of starch to fermentable sugars. Capítulo 8 en *The alcohol textbook*. Jacques, K.A., Lyons, T.P. y Kelsall, D.R. (Eds.). Nottingham University Press. Nottingham, Reino Unido.

Prakash, C. 1998. Motor vehicle emissions and fuels consultant, use of higher than 10 volume percent ethanol/gasoline blends in gasoline powered vehicles. Transportation Systems Branch Air Pollution Prevention Directorate Environment Canada. Toronto, Canadá.

Prasad, S., Singh, A., Jain, N. y Joshi, H.C. 2007. Ethanol production from sweet sorghum syrup as automotive fuel in India. *Energy & fuels*. 21:2415-2420.

Quain, D.E. y Duffield, M.L. 1985. A metabolic function for higher alcohol production by yeast. *Proceedings of the 20th Congress of the European Brewery Convention*. Helsinki, Finlandia. Pp: 307-314.

Robertson, G.H., Wong, D.W.S., Lee, C.C., Wagcshal, K., Smith, M.R. y Orts, W.J. 2006. Native or raw starch digestion: a key step in energy efficient biorefining of grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(2):353-365.

Roels, J.A. 1983. Macroscopic theory and microbial growth and product formation. Capítulo 3 en *Energetic and kinetics in biotechnology*. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam, Países Bajos.

Rothman, H., Greenshields, R. y Calle F.R. 1983. *The alcohol economy: Fuel ethanol and the brazilian experience*. Calle Frances Pinter. Londres, Reino Unido.

Russell, I. 2003. Understanding yeast fundamentals. Capítulo 7 en *The alcohol textbook*. Jacques, K.A., Lyons, T.P. y Kelsall, D.R. (Eds.). Nottingham University Press. Nottingham, Reino Unido.

Salunke, D.K., Jadhav, S.J., Kadam, S.S. y Chavan, J.K. 1982. Chemical, biochemical and biological significance of polyphenols in cereals and legumes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 17:277-305.

Secretaría de Energía. 2007. Potenciales y viabilidad del uso de bioetanol y biodiesel para el transporte en México. SENER-BID-GTZ. México.

Shapouri, D., James A. y Wang, M. 2002. The energy balance of corn ethanol: An update. *Agricultural Economic Report 814*. U.S. Department of Agriculture.

Shinohara, T. y Yanagida, F. 1999. Urea and ammonium utilization by wine yeasts under various fermentation conditions. *Journal of Brewing Society of Japan*. 94(7):593-603.

Stark, W.H. 1954. Alcoholic fermentation of grain. Capítulo 2 en *Industrial fermentations*. Underkofler, L.A. y Hickey, R.J. (Eds.). Chemical Publishing Co. Nueva York NY, USA.

Szlavko, C.M. 1974. The influence of wort glucose levels on the formation of aromatic higher alcohols. *Journal of the Institute of Brewing*. 80:534-539.

Taherzadeh, M.J. 1999. Ethanol from lignocellulose: Physiological effects of inhibitors and fermentation strategies. Chalmers University of Technology, Department of Chemical Engineering. Goteborg, Suecia.

Tangler, H. y Erten, H. 2008. Utilization of spent brewer's yeast for yeast extract production by autolysis: the effect of temperature. *Food and Bioproducts Processing*. 86(4):317-321.

Tauer, A., Elss, S., Frischmann, M., Tellez, P. y Pischetsrieder, M. 2004. Influence of thermally processed carbohydrate/amino acid mixtures on the fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. 52(7):2042-2046.

Thomas, K.C. e Ingledew, W.M. 1990. Fuel alcohol production: effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mashes. Applied and Environmental Microbiology. 56(7):2046-2050.

Trinder, P. 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. Annals of Clinical Biochemistry. 6:24-25.

U.S. Environmental Protection Agency. 1993. Motor vehicle-related air toxic study. U.S. EPA Report (EPA 420-R-93-005).

VanGheluwe, G., Chen, E. y Valyi, Z. 1975. Factors affecting the formation of fusel alcohols during fermentation. MBAA Technical Quarterly. 12:169.

Vinson, J.A., Proch, J. y Bose, P. 2001. Determination of quantity and quality of polyphenol antioxidants in foods and beverages. Methods in Enzimology. 335:103-114.

Wall, J.S. y Blessin, C.W. 1975. Composición de la planta y del grano de sorgo. Capítulo 4 en Producción y usos del sorgo. Wall, J.S. y Ross, W.M. (Eds.). Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina.

Wallace, R., Ibsen, K., McAloon, A. y Yee, W. 2004. Feasibility study for co-locating and integrating ethanol production plants from starch and lignocellulosic feedstock. S. Department of Agriculture and U.S. Department of Energy, National Renewable Energy Laboratory Technical Report.

Wang, S.-S. y Brandriss, M.C., 1987. Proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. Sequence regulation and mitochondrial localization of the PUT1 gene product. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 7:4431-4440.

Windeler, A.S. y Shannon, I.L. 1966. The precipitation of protein from parotid fluid. *Journal of Dental Research*. 45(6):1784-1787.

Whistler, R.L. y BeMiller, J.N. 1999. *Carbohydrate chemistry for food scientists*. 1era Edición. Eagan. St. Paul MN, USA. Pp: 37-53.

Wyman, C.E. 2003. Application of corn stover and fiber. En: *Corn chemistry and technology*. 2da Edición. White, P.J. y Johnson L.A. (Eds.). American Association of Cereal Chemists, St Paul MN, USA.