



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Energía Renovable

ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE AZÚCARES EN
CUATRO VARIEDADES DE SORGO DULCE PARA
LA PRODUCCIÓN DE ETANOL

Tesis que presenta

IBQ SANTIAGO FRANCO BRITO

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE

Mérida, Yucatán. Diciembre 2011

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de Materiales y Métodos Experimentales, y de Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó, para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades de Energía Renovable y Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. y que dicha información le pertenece en términos de la Ley de la Propiedad Industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.

Mérida, Yucatán. México

Diciembre, 2011.

IBQ Santiago Franco Brito

Este trabajo se realizó en los laboratorios de las Unidades de Energía Renovable y Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en los terrenos Santa Cruz (Enerall) y Gavilanes (Igor Peniche) bajo la dirección del Dr. Luis Felipe Barahona Pérez y del Dr. Javier Orlando Mijangos Cortés.

Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela
Director Académico
Centro de Investigación Científica de Yucatán AC

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi asesor, el Dr. Luis Felipe Barahona Pérez, por brindarme todo su apoyo y confianza durante la elaboración y desarrollo del proyecto. Su conocimiento, experiencia, consejos y paciencia, han sido invaluable para mí. Muchísimas gracias por darme esta oportunidad.

A mi coasesor el Dr. Javier Orlando Mijangos Cortez por sus aportes importantes, críticas, comentarios, sugerencias y apoyo para la realización del trabajo de investigación, gracias.

A mi Comité Tutorial, Dra. Blondy Beatriz Canto Canché, Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez, y a los revisores Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez y M. en C. José Francisco Rodríguez Paredes por sus importantes y valiosos comentarios, por su tiempo, disposición y comprensión.

A la Dra. Liliana Álzate Gaviria, coordinadora del posgrado de Energía Renovable por darme la oportunidad de realizar este posgrado

A los técnicos Tanit Toledano, Mirbella Cáceres y Jorge Domínguez, por su apoyo en el laboratorio y asesoría en el manejo de los equipos.

A la unidad de Energía Renovable y unidad de Biotecnología y al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., por las instalaciones y apoyos prestados para la realización de este trabajo.

A la empresa ENERALL por los recursos que amablemente proporcionaron

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada No. 236014.

A mi compañero Igor Peniche, por el apoyo y facilidades para la realización de la parte de campo del proyecto.

A mis compañeros y amigos Alberto Zumárraga, Roberto Us, Pablo Villegas, Limberg Gómez, Diana Herrera, Ángela Ku y Melissa Casáis por su amistad, consejos y buenos momentos que recordaré siempre.

A mis demás compañeros de posgrado por su compañía y comprensión durante este lapso de tiempo que tuve la dicha de compartir que nos deja buenas amistades y muchos recuerdos, gracias.

A mi familia; mi padre José Santiago Franco Flores y a mi madre María de los Ángeles Brito y Salas, a mi hermana Rosángela Franco Brito. Por su gran apoyo y ánimo que me brindaron para salir adelante.

INDICE

RESUMEN.....	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUCCION	1
CAPÍTULO I.	4
ANTECEDENTES	4
1.1 Etanol como combustible	4
1.2 Materias primas para la producción de etanol	7
1.3 Fuente de producción de azúcares	7
1.4 Fermentación.....	9
1.5 Fermentación alcohólica.....	10
1.6 Microorganismos responsables de la fermentación alcohólica.....	11
1.7 Sorgo dulce como materia prima.....	13
1.8 La estadística mundial del sorgo dulce	16
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
CAPÍTULO II	20
MATERIALES Y MÉTODOS.	20
2.1 Estrategia Experimental.....	20
2.2 Materia prima	21
2.3. Muestreo de las plantas de sorgo dulce	22
2.4. Determinación de peso fresco	22
2.5 Extracción del jugo.....	22
2.6 Concentración de sólidos solubles.....	22
2.7 Determinación de azúcares	23
2.7.1 Determinación de azúcares totales	23

2.7.2 Determinación de azúcares por HPLC.....	23
2.8 Levadura utilizada para la fermentación	23
2.8.1 Preparación del inóculo	24
2.8.2 Curvas de crecimiento	24
2.9 Fermentación alcohólica.....	24
2.10 Destilación	25
2.11 Determinación de la producción de etanol	25
2.12 Análisis estadístico.....	26
CAPÍTULO III	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
3.1 Ciclo de crecimiento de las variedades de sorgo dulce	27
3.1.1 Peso fresco de los tallos.....	27
3.2 Volumen del jugo.....	29
3.3 Concentración de sólidos solubles.....	31
3.4 Azúcares totales.....	33
3.5 Producción de azúcar por tallo	34
3.6 Curva de crecimiento de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
3.7 Fermentación del jugo de sorgo dulce.	38
3.8 Análisis de azúcares por HPLC	39
3.9 Producción de etanol por hectárea	42
CONCLUSIONES	43
PERSPECTIVAS.....	44
BIBLIOGRAFIA	45
ANEXO A	52
ANEXO B	55

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparativa de diferentes cultivos, ciclos de producción y rendimientos de etanol.....	8
Tabla 2. Microorganismos utilizados en las fermentaciones alcohólicas.....	12
Tabla 3. Tiempos de duplicación y velocidad de crecimiento de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en jugos de sorgo dulce durante las primeras seis horas de cultivo.	37
Tabla 4. Consumo de azúcares y rendimiento de etanol de las fermentaciones de jugo de la variedad Keller cultivada en el lote Gavilanes.	39
Tabla 5. Datos de los análisis estadísticos del lote Santa Cruz.	55
Tabla 6. Datos de los análisis estadísticos del lote Gavilanes.	55
Tabla 7. Datos de los análisis estadísticos entre lotes (Santa Cruz y Gavilanes)	56

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de sorgo dulce	14
Figura 2. Procesamiento del sorgo dulce para obtención de diferentes productos.	16
Figura 3. Diagrama general de la estrategia experimental	20
Figura 4. Extracción (a) y colecta (b) del jugo de los tallos de sorgo dulce.....	22
Figura 5. Células de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> vistas al microscopio (40X)	23
Figura 6. Fermentación de los jugos de sorgo dulce.	25
Figura 7. Sistema de destilación integral.....	25
Figura 8. Peso de los tallos de las cuatro variedades de sorgo dulce cultivadas en el lote Santa Cruz (los valores son el promedio obtenido de 4 tallos por variedad).	27
Figura 9. Peso de los tallos de las cuatro variedades de sorgo dulce cultivadas en el lote Gavilanes (los valores son el promedio obtenido de 4 tallos por variedad).	28
Figura 10. Volúmenes de los jugos de las cuatro variedades de sorgo dulce cultivadas en el lote Santa Cruz.	29
Figura 11. Volúmenes de los jugos de las cuatro variedades de sorgo dulce cultivadas en el lote Gavilanes.	30
Figura 12. Concentración de sólidos solubles (°Brix) de los jugos de las cuatro variedades de sorgo dulce cultivadas en el lote Santa Cruz.....	31
Figura 13. Concentración de sólidos solubles de los jugos (°Brix) de las cuatro variedades de sorgo dulce cultivados en el lote Gavilanes.....	32
Figura 14. Concentración de azúcares totales en los jugos de las cuatro variedades de sorgo dulce cultivadas en el lote Santa Cruz.	33

Figura 15. Concentración de azúcares totales en los jugos de las cuatro variedades de sorgo dulce cultivadas en el lote Gavilanes.	34
Figura 16. Producción de azúcares de las variedades de sorgo dulce cultivadas en el lote Santa Cruz.....	35
Figura 17. Producción de azúcares de las variedades de sorgo dulce cultivadas en el lote Gavilanes.....	35
Figura 18. Curva de crecimiento del inóculo de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en jugo de las cuatro variedades de sorgo dulce cultivadas en el lote Gavilanes y medio Gelpa como referencia.....	36
Figura 19. Curva de consumo de azúcares totales en las fermentaciones.	38
Figura 20. Curva de consumo de los azúcares fructosa, glucosa y sacarosa determinados por HPLC durante los tres días de fermentación de jugo de la variedad Keller.	40
Figura 21. Comparación entre las curvas del consumo de azúcares determinados por HPLC y azúcares totales por el método del fenol-sulfúrico.	41

RESUMEN

El potencial global de la bioenergía está representado por los cultivos energéticos y los residuos lignocelulósicos. La conversión de estas materias primas en biocombustibles es una importante elección para la explotación de las fuentes de energías renovables y la reducción de emisiones de gases contaminantes.

Para la producción de etanol han sido utilizadas diferentes fuentes de carbono como materia prima entre las que se encuentran los jugos azucarados, los almidones y los materiales lignocelulósicos.

En este trabajo se monitoreó el aumento de la concentración de azúcares al final del ciclo de crecimiento vegetativo de cuatro variedades de sorgo dulce (Keller, M81E, SD61 y SD62) cultivadas en dos lotes: Santa Cruz (Propiedad de Enerall, S.A. de C.V.) y Gavilanes (Propiedad del Lic. Igor Peniche) ubicados en los municipios de Tizimín y Buctzotz respectivamente. Estos lotes presentan diferentes tipos de suelo y riego.

Para el desarrollo de este trabajo experimental, primero se realizó la siembra de las cuatro variedades de sorgo dulce y se dejaron crecer por 75 días. Posteriormente se realizaron cortes de los tallos de las variedades a intervalos de 15 días, durante dos meses. Las variables que se midieron fueron: el peso de los tallos, el volumen de jugo por tallo, la concentración de sólidos solubles y la concentración de azúcares totales.

Se encontró que no hay diferencia significativa en la producción de azúcar entre las variedades en un mismo lote. Sin embargo, sí existe diferencia significativa entre lotes. Los rendimientos de azúcar fueron de 1.623 y 3.258 ton·ha⁻¹ para los lotes de Santa Cruz y Gavilanes, respectivamente. El análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución indicó que al final de su ciclo de crecimiento, los azúcares presentes en el jugo de la variedad Keller son: glucosa (49 g·L⁻¹); fructosa (37 g·L⁻¹) y sacarosa (10.5 g·L⁻¹).

El jugo de la variedad Keller del lote Gavilanes se fermentó durante tres días, obteniendo un rendimiento de etanol del 94.5% del teórico. Se calculó que se puede obtener un rendimiento de etanol de 2,253.28 L·ha⁻¹.

ABSTRACT

The global potential of bioenergy is represented by energetic crops and lignocellulosic residues. The conversion of these raw materials into biofuels is an important choice on the exploitation of renewable energy sources and the reduction of contaminant gas emissions. For ethanol production, different carbon sources like such as sugar, starch or lignocellulosic materials have been used as feedstock.

In this work, the increase in sugar concentration at the end of the vegetative growth cycle of four varieties of sweet sorghum (Keller, M81E, SD61 and SD62) was monitored. These varieties were cultivated in two terrains: Santa Cruz (property of Enerall SA de CV) and Gavilanes (property of Lic. Igor Peniche) located at Tizimín and Buctzotz municipalities, respectively. These terrains have different soil type and irrigation regime.

For the development of the experimental work, seeds of four varieties of sweet sorghum were first sowed and let grow for 75 days. Then, the stalks were cut every 15 days for two months. The variables measured were: stalk weight, stalk juice volume, soluble solids concentration and total sugars concentration.

The statistical analysis indicated no significant differences between the four varieties grown in the same terrain in terms of sugar production, but differences were found in corps of different terrains. Sugar yields obtained were 1.623 y 3.258 ton·ha⁻¹, for Santa Cruz and Gavilanes, respectively. The analysis by high performance liquid chromatography showed that at the end of its growth cycle, sugars in the juice of Keller variety were: glucose (49 g·L⁻¹); fructose (37 g·L⁻¹) and sucrose (10.5 g·L⁻¹).

The juice of the Keller variety cultivated at Gavilanes was fermented for three days to get an ethanol yield of 94.5% of theoretical.

Based on our data, it can be estimated an ethanol yield of 2,253.28 L·ha⁻¹.

INTRODUCCION

El mundo requiere grandes cantidades de energía y la demanda aumenta día a día debido al incremento de habitantes, al crecimiento industrial y tecnológico y a la urbanización de cada vez más secciones poblacionales.

Por otra parte el calentamiento global y las condiciones que el hombre ha impuesto sobre los ecosistemas están produciendo efectos climáticos catastróficos alrededor del mundo, y la responsabilidad humana sobre estas circunstancias ya ha sido reconocida científicamente. La revolución industrial y otros avances tecnológicos han tenido su efecto inmediato en las emisiones de gases de efecto invernadero y el consecuente deterioro atmosférico [1].

El consumo intensivo de los combustibles fósiles ha llevado al aumento en la generación de gases contaminantes a la atmósfera, que han causado cambios en el clima mundial. La solución a esta problemática depende de cómo el desarrollo y la aplicación de tecnologías basadas en fuentes alternativas de energía se llevarán a cabo. Mediante el uso de recursos energéticos renovables, la humanidad puede encontrar parte de la solución a los requerimientos de energía de una manera amigable con el ambiente.

El potencial global de los biocombustibles está representado por los cultivos energéticos y los residuos lignocelulósicos, entre otras fuentes (estudios recientes indican que las microalgas pueden ser una opción para la generación de biocombustibles debido a su alta tasa fotosintética). La conversión de estas materias primas en biocombustibles es una importante elección para la explotación de las fuentes de energía alternativas y la reducción de gases contaminantes. Además, la utilización de los biocombustibles tiene importantes efectos económicos y sociales. Por ejemplo, más fuentes de trabajo e ingresos, beneficiando a la economía e impulsando al sector agrícola mediante el desarrollo de los cultivos energéticos para la producción sustentable de biocombustibles [2].

Por otra parte, la accesibilidad a combustibles de origen biológico es a menudo difícil y, por ello, se utilizan los combustibles tradicionales. La generación de energía mediante el aprovechamiento de productos naturales o residuos de origen agrícola, es una de las

industrias del futuro. Ésta es una fuente de energía renovable y limpia que además contribuye a la conservación del medio ambiente gracias al reciclado de productos de desecho como los que originan diversas industrias. No obstante, su explotación comercial se encuentra aún en una fase incipiente, a excepción del etanol, aunque son varios los proyectos que se han puesto en marcha con el fin de acrecentar la contribución de la biomasa para cubrir el consumo global energético [3].

Uno de los combustibles que se obtiene a partir de biomasa vegetal es el bioetanol. Este se produce por la fermentación de los azúcares contenidos en la materia orgánica de las plantas. En este proceso se obtiene un alcohol hidratado, con un contenido aproximado del 4-5% de agua.

El etanol puede ser usado de varias maneras, sin embargo su principal uso hoy en día es como aditivo oxigenante del combustible [4]. Con la gasolina produce una mezcla de alto poder energético con una importante reducción de las emisiones contaminantes en los motores tradicionales de combustión. El etanol se usa en mezclas con la gasolina en concentraciones de 5 o 10%, nombrados E5 y E10 respectivamente, que no requieren modificaciones en los motores actuales [5].

Los cultivos energéticos están integrados por especies de plantas cuya cosecha (biomasa), a diferencia de los cultivos agrícolas tradicionales, se dedica a la producción de energía. Como en el caso de los cultivos agrícolas, los energéticos pueden ser de tipo herbáceo o leñoso. En la actualidad existen algunos cultivos agrícolas que se están dedicando indistintamente a la producción de alimento o de energía, como algunas oleaginosas (girasol, soja, colza, palma, etc.), los cereales, la caña de azúcar y la remolacha. Especies forestales utilizadas tradicionalmente como madera también pueden ser empleadas como cultivos energéticos como el chopo, el sauce o el eucalipto, entre otras [6].

En este trabajo se monitoreó el comportamiento de la concentración de azúcares durante el ciclo de crecimiento de cuatro variedades de sorgo dulce: M81E, Keller, SD61 y SD62 en dos lotes: Santa Cruz y Gavilanes, localizados en los municipios de Tizimín y Buctzotz en el Estado de Yucatán, respectivamente. El jugo de la variedad Keller del lote

Gavilanes fue fermentado con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* obteniéndose rendimientos similares a los reportados en la literatura.

CAPÍTULO I.

ANTECEDENTES

1.1 Etanol como combustible

El empleo de etanol como combustible se remonta al desarrollo de las primeras máquinas de combustión interna; tomando mayor relevancia en la década de los años 70, a raíz del aumento de los precios del petróleo. Es por ello que aparece como un combustible de transición desde una época dominada por los combustibles fósiles a otra potencialmente abierta a la utilización generalizada de la biomasa, apuntando a la búsqueda de nuevas energías renovables y mejoras medioambientales [7]. Lo que permite al etanol poder ser utilizado como un sustituto de la gasolina, es su alto octanaje, funcionando en su mezcla como un oxigenante o suplemento del combustible, útil en vehículos de gasolina estándares.

El principal atractivo del uso del etanol como combustible complementario o sustituto, estriba en la importante reducción de las emisiones de bióxido de carbono, que emiten los combustibles fósiles [8]; esto es porque el CO_2 liberado durante su combustión es el mismo que previamente se asimiló durante el crecimiento de la planta. Sin embargo, dependiendo del método de producción, los altos gastos de energía y la generación de N_2O de los fertilizantes pueden reducir esta ventaja. En los Estados Unidos, por ejemplo, se usa más energía para producir etanol que la energía producida durante su combustión. Su importancia en el uso de tecnologías de reducción de emisiones, estriba en que al estar libre de azufre, conlleva a muy bajas emisiones de SO_2 [9].

El etanol se puede obtener de los cultivos energéticos productores de almidón y azúcares simples en grandes cantidades y de la biomasa lignocelulósica. La complejidad del proceso de producción depende de la materia prima. De esta manera el espectro de tecnologías diseñadas e implementadas va desde la simple conversión de azúcares mediante la fermentación al proceso multi-etapas de conversión de biomasa lignocelulósica en etanol [2].

El surgimiento de los primeros mercados actuales de biocombustibles en el mundo sucedió a raíz de la primera crisis petrolera ocurrida en 1973, cuando el petróleo se encareció enormemente. Esta crisis afectó a todos los países del mundo, principalmente a aquellos países sin reservas petrolíferas o producción suficiente del recurso. Entre estos últimos estaban Brasil y Estados Unidos.

En 1975 el gobierno brasileño creó programas de incentivos para la producción de etanol a partir de caña de azúcar, con el fin de reducir la dependencia del petróleo. Fue así como se empezó a realizar mezclas de etanol en las gasolinas (E22). Pero después de la segunda crisis petrolera en 1979 la producción de etanol llegó a ser más extensa utilizándose puro en los vehículos (E100).

Actualmente, en Brasil se producen 612 millones de toneladas de caña de azúcar, la mitad se usa para obtener sacarosa y el resto se destina para la producción de etanol siendo ésta de 25 millones de litros por temporada de cultivo. Las superficies sembradas crecieron un 12% en 2007 respecto al año anterior, y es el mismo nivel de crecimiento que se espera para las próximas décadas.

El uso de biocombustibles no es nuevo, éstos comenzaron a ser utilizados en Estados Unidos a finales del siglo XIX, aunque a nivel experimental. El primer automóvil que construyó Henry Ford en 1896, llamado "Quadricycle", utilizaba etanol como combustible. [10].

Con la crisis petrolera, el uso de etanol como combustible se convirtió en una alternativa y en 1988 en Estados Unidos se empezaron a desarrollar leyes que permitían utilizar etanol en mezcla al 85% con las gasolinas (E85).

Esto llevó a que diversas compañías automotrices empezaran a introducir tecnología en los automotores para el uso de etanol como biocombustible a partir de 1992.

Estados Unidos destinó el 25% de los cultivos de maíz para producir 26,500 millones de litros de etanol en 2010. Actualmente cuenta con 97 plantas productoras. Los altos precios del petróleo, aunados a los subsidios del maíz, han hecho rentable en Estados Unidos el uso de etanol como aditivo en combustibles. De hecho, uno de los factores que ha influido en la escasez del maíz para uso alimenticio, se debe a la creciente aplicación

que se está haciendo de este grano, respondiendo así a la actual coyuntura de precios elevados del petróleo: elaborando sus propios biocombustibles [11].

Una de las razones por las que en México no se utiliza el maíz para la producción de biocombustibles se debe a que es considerado la base de la alimentación de los mexicanos, por ello la cantidad de maíz producida en el país no sería suficiente y esto causaría un aumento en los precios de este alimento [12].

México se puede beneficiar con la introducción del etanol como combustible de muchas formas, como la creación de empleo, desarrollo de la economía rural, ampliación de las infraestructuras sociales en zonas rurales, mejora de la seguridad energética, conservación de los recursos petrolíferos, mejor gestión del agua, expansión de la agricultura a tierras más secas cosechando cultivos anuales múltiples (por ejemplo el sorgo dulce, *Sorghum bicolor*), ahorro en los intercambios exteriores, motivación de la comunidad científica y tecnológica, incentivos a la industria de bienes de producción, mejora del medio ambiente local y global [13].

Entre las ventajas de usar el bioetanol como combustible se pueden mencionar las siguientes:

- Mejora del índice de octano
- Mayor calor de vaporización
- Menor temperatura de llama, consiguiéndose una menor pérdida de calor por radiación.
- Mayor velocidad de llama, esto se traduce en un desarrollo más eficiente del motor.
- Reduce el número de compuestos aromáticos en la gasolina, y por lo tanto, reduce las emisiones de benceno a la atmósfera [4].
- Sustituir al actual oxigenante: Metil terbutil éter (MTBE)

1.2 Materias primas para la producción de etanol

Para la producción de etanol han sido utilizadas diferentes fuentes de carbono como materia prima. Su uso práctico está determinado por el rendimiento en alcohol, por su costo y por el tipo de microorganismo utilizado. Algunos autores, coinciden en definir tres tipos de materias primas para la producción de etanol:

- a. Materiales con carbohidratos como fuente de azúcares solubles (sorgo dulce, remolacha azucarera, caña de azúcar, etc.)
- b. Almidones (maíz, sorgo de grano, trigo, cebada)
- c. Lignocelulósicos, (madera, residuos agrícolas, cultivos lignocelulósicos, etc.)

En todos los casos el alcohol se produce por fermentación de los azúcares con levaduras. La materia prima de la primera clase fermenta directamente, mientras que las otras dos constan de hidratos de carbono más complejos, como el almidón y la celulosa, que primero se deben convertir en azúcares fermentables mediante la acción de enzimas [14].

1.3 Fuente de producción de azúcares

Los materiales vegetales se pueden emplear para la producción de etanol y se agrupan en dos grupos, desde el punto de vista de la fermentación: las directamente fermentables que son aquellas que no requieren un pre tratamiento o transformación como sucede con la sacarosa, la glucosa y la fructosa obtenida de jugos azucarados. Las indirectamente fermentables por el contrario, requieren la transformación previa a azúcares simples para ser fermentados y aprovechados por las levaduras, esto son los casos del almidón y la celulosa [15].

El etanol es producido generalmente de materia vegetal de la que se puede obtener azúcares fermentables de manera directa, por ejemplo de los jugos de la caña de azúcar, pulpas de frutas, la remolacha azucarera, y el sorgo dulce, entre otros [2] y por otra parte de materiales que tienen almidón, donde la conversión del almidón a etanol incluye un

paso de licuefacción para hacerlo soluble y una fase de hidrólisis para obtener glucosa [16]. En la Tabla 1 se mencionan algunos cultivos que son utilizados para la producción de etanol.

Tabla 1. Comparativa de diferentes cultivos, ciclos de producción y rendimientos de etanol

Cultivo	Ciclo productivo (meses)	Rendimiento de etanol (L/ha)	Referencia
Caña de azúcar	12 a 13	3,000 a 5,000	Almodares <i>et al.</i> , 2009 [17]
Remolacha	5 a 6	5,000 a 6,000	Almodares <i>et al.</i> , 2009[17]
Sorgo dulce	3.5	3,000	Almodares <i>et al.</i> , 2009[17]
Papa	4 a 5	2,250	Contreras., 2010 [18]
Yuca	6	3,162	Zúñiga., 2011 [19]
Maíz	4	2,901	Miguez., 2009 [20]

En el caso de la conversión de los materiales lignocelulósicos a etanol hay varias opciones, como por ejemplo tratar la materia prima con ácido sulfúrico con el fin de degradarla y facilitar la liberación de los azúcares fermentables. Otra técnica utilizada es la explosión con vapor en la que la materia prima es tratada con vapor saturado a temperaturas entre 160 y 260°C para abrir la matriz lignocelulósica y facilitar la sacarificación posterior. Otro método es por tratamientos biológicos por medio de enzimas de microorganismos (bacterias y hongos) capaces de degradar la materia lignocelulósica [21].

Independientemente del proceso que se elija, se debe de evaluar determinadas características para poder mejorar la fermentación del hidrolizado, como es determinar la mezcla de azúcares presentes (hexosas y pentosas, principalmente), así como de compuestos que pueden inhibir la fermentación.

También es deseable dar un uso a la lignina, compuesto que da la rigidez a los tallos de las plantas. Puede ser usada para obtener calor o utilizar microorganismos que tengan la capacidad de fermentarla y obtener otros compuestos que sean de interés comercial [16].

1.4 Fermentación

Los procesos de fermentación se asocian al empleo de microorganismos para llevar a cabo transformaciones de la materia orgánica catalizadas por enzimas. Estas transformaciones se han realizado en forma artesanal y casera desde tiempos inmemoriales.

La fermentación es la conversión de una sustancia orgánica en otra utilizable, producida mediante un proceso metabólico de ciertos microorganismos o por enzimas que provocan reacciones de oxidación-reducción, de las cuales el organismo productor deriva la energía suficiente para su metabolismo. Las fermentaciones pueden ser anaeróbicas, si se producen sin oxígeno, o aeróbicas, las cuales tienen lugar sólo en presencia de oxígeno [22].

Las técnicas de la fermentación se han ido modernizando como consecuencia de la aparición de los cultivos puros de células animales, vegetales y de microorganismos. La fermentación se ha industrializado dando lugar a empresas tales como las alimenticias, donde se usa la fermentación en la panificación y en la elaboración de bebidas alcohólicas. La fermentación también se usa en el campo de la farmacéutica en la producción de vacunas y medicamentos, y en la industria química para la elaboración de ácidos, aldehídos etc.

En un proceso de fermentación se puede obtener alcoholes, butanol, acetona, ácido láctico entre otros. También se usa para la producción de vinagre, ácido cítrico, enzimas etc. Todos estos compuestos resultan de los procesos microbianos y se les llama productos de fermentación [23].

1.5 Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica es un proceso biológico anaerobio originado por la actividad de las levaduras y algunas clases de bacterias en ausencia de aire. Estos microorganismos procesan los hidratos de carbono (por regla general azúcares: como por ejemplo la glucosa, la fructosa, la sacarosa, etc.) para obtener como productos finales: etanol (cuya fórmula química es: $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$), dióxido de carbono (CO_2) en forma de gas y moléculas de ATP que consumen ellos mismos en su metabolismo celular energético.

El oxígeno es el desencadenante inicial de la fermentación, ya que las levaduras lo necesitan en su fase de crecimiento. Sin embargo al final de la fermentación conviene que la presencia de oxígeno sea baja para evitar la pérdida de etanol y la aparición en su lugar de ácido acético.

La temperatura es uno de los parámetros más importantes para el desarrollo de la fermentación alcohólica ya que puede afectar a la cinética del proceso en términos de duración y por tanto la producción de etanol [24].

La fermentación alcohólica es un proceso exotérmico, es decir, se desprende energía en forma de calor. Es necesario controlar este aumento de temperatura ya que si ésta asciende a más de 30°C las levaduras comenzarían a morir deteniéndose el proceso fermentativo.

A lo largo de todo el proceso de fermentación, y en función de las condiciones de la cantidad de azúcar disponible, temperatura, oxígeno, etc. puede cambiar tanto la predominancia de cierto tipo de levadura (si no es un cultivo puro) como la fisiología de las mismas. Se pueden distinguir varias fases en la fermentación:

1ª fase. Sucede durante las primeras 24 horas, predominan levaduras no esporogéneas (formadoras de ascosporas), que resisten un grado alcohólico de 4-5º G.L. Son sensibles al anhídrido sulfuroso formado en la fermentación.

2ª fase. Entre 24 y 48 horas, predomina la *Saccharomyces cerevisiae* que resiste hasta un grado de alcohol entre 8 y 16 °G.L. En esta fase es cuando se da la máxima capacidad fermentativa.

Otras sustancias generadas en la fermentación son:

- Ácido acético
- Ácido láctico
- Ácido pirúvico y acetaldehído
- Ácido succínico
- Acetoína, diacetilo y 2,3-butanodiol (butilenglicol)
- Alcoholes superiores, ésteres y acetatos
- Fenoles de vinilo y fenoles de etilo [25].

1.6 Microorganismos responsables de la fermentación alcohólica

Las levaduras han sido conocidas por los seres humanos durante miles de años, y son utilizadas en múltiples procesos biotecnológicos: producción de vitaminas, proteínas, enzimas, agentes aromatizantes, etcétera (Tabla 2). Una de las más conocidas es la *Saccharomyces cerevisiae* utilizada en la panificación y producción de bebidas [26].

Saccharomyces cerevisiae es sin duda la levadura más utilizada para la obtención de etanol. Convierte las hexosas en etanol en condiciones anaeróbicas, generando dos moles de ATP por mol de hexosa consumida, además de dos moles de etanol. Este microorganismo también tiene la capacidad de convertir las hexosas en CO₂ aeróbicamente, por lo que, dependiendo de las concentraciones de O₂ en el medio de cultivo y de la fuente de carbono, se puede favorecer uno de los dos procesos. Esta levadura tiene la ventaja adicional de tolerar concentraciones relativamente altas de etanol, hasta 150 g·L⁻¹ [27].

Saccharomyces cerevisiae puede crecer muy bien a pH relativamente bajo lo que impide la contaminación por otras bacterias, aunque es incapaz de utilizar la xilosa para su crecimiento o la fermentación [7].

Se han reportado que algunas cepas de levaduras pueden fermentar la xilosa a etanol, pero la tasa y el rendimiento de producción son muy bajos [25].

Algunos microorganismos capaces de fermentar la xilosa son los hongos y bacterias como *Pichia stipitis*, *Tannophilus pachysolen* y *Shehatae candida* [28].

Tabla 2. Microorganismos utilizados en las fermentaciones alcohólicas

Microorganismo	Referencia
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Beltrán <i>et al.</i> , 2002 [24]
<i>Zymomonas mobilis</i>	Beltrán <i>et al.</i> , 2002 [24]
<i>Kloeckera apiculata</i>	Zohre <i>et al.</i> , 2002 [29]
<i>Candida pulcherrima</i>	Zohre <i>et al.</i> , 2002 [29]
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Moreira <i>et al.</i> , 2011 [30]
<i>Candida stellata</i>	Beltrán <i>et al.</i> , 2002 [24]
<i>Rhodotorula</i> sp.	Querol <i>et al.</i> , 2003 [31]
<i>Metschnikowia</i> sp.	Cianí <i>et al.</i> , 2006 [32]
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Cianí <i>et al.</i> , 2006 [32]
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	Cianí <i>et al.</i> , 2006 [32]
<i>Saccharomyces bayanus</i> var. <i>Uvarum</i>	Naumova <i>et al.</i> , 2000 [33]
<i>Williopsis saturnus</i>	Lee <i>et al.</i> , 2010 [34]

Las levaduras durante la fermentación son afectadas por una gran cantidad de condiciones de estrés como el estrés osmótico, el contenido de nitrógeno y la producción de etanol. La supervivencia bajo estas condiciones es esencial para poder tener una buena conversión de azúcares a etanol. En los últimos años, grandes esfuerzos han permitido una mejor comprensión de la respuesta de la levadura a las condiciones de estrés.

Estudios de transcriptoma indican que durante la fermentación alcohólica, algunos genes de las levaduras muestran cambios en su expresión por lo que es necesario estudiarlos con más detalle (regulación, funciones, etc.). Se han identificado los genes que codifican a las proteínas citoplasmáticas implicadas en las respuestas al estrés, por lo que podrían ser sobre expresados con el fin de obtener mejor resistencia a las diversas

condiciones de estrés y mejorar el comportamiento fermentativo. Para ello se usan diferentes estrategias como la sobreexpresión del gen en plásmidos episomales usando los promotores de los mismos genes o la sustitución de estos promotores por otros [35].

1.7 Sorgo dulce como materia prima

El sorgo dulce (*Sorghum bicolor* (L.) Moench, Figura 1), es nativo de África, y muchas variedades de hoy son originarias de ese continente. También fue producido en la India antes de que la historia lo registrara y en Asiria desde 700 antes de Cristo. Fue introducido a los Estados Unidos de América (EUA) cerca del siglo XVII. No creció extensivamente en este país hasta 1850, año en que el ámbar del negro de la variedad del sorgo forrajero, también llamado caña de azúcar china fue introducido de Francia [36].

La clasificación taxonómica del sorgo dulce es como sigue:

Familia: *Gramineae*

Subfamilia: *Panicoide*

Tribu: *Andropogoneae*

Género: *Sorghum*

Especie: *Sorghum bicolor* (L.) Moench



Figura 1. Planta de sorgo dulce

Sorghum bicolor comprende un gran número de variedades, que se han incluido en varios grupos entre los que se encuentran: Kafir, el cual se utiliza para grano y forraje en África; el Durra diferenciado del anterior por tener semillas de un color blanco o amarillo, utilizado para grano y forraje en la India, y el Shallu, cuya característica es el color de los tallos amarillentos durante la maduración, siendo el que por tener tallos jugosos es utilizado para la producción de etanol, además de ser usado para la obtención de grano, forraje y ensilaje [17].

Sorghum bicolor también se puede clasificar en cuatro grupos principales:

1. El sorgo grano: cultivado para la producción de grano. Se cultiva extensivamente en distintos países de África, ciertas regiones de la India y en EUA. En África y en la India los granos se utilizan para consumo humano, mientras que en EUA se utiliza para alimentación animal.

2. El sorgo de escoba: se caracteriza por tener unas inflorescencias (panículas) muy anchas y provistas de largas y flexibles ramificaciones, que se emplean para la confección de escobas.

3. El sorgo del Sudán: también llamado forrajero destinado para consumo animal.

4. El sorgo dulce: por sus tallos dulces se utiliza para la producción de jarabes.

Entre las características importantes del sorgo dulce se puede mencionar su resistencia a la sequía, tolerancia a la salinidad y tener una alta eficiencia fotosintética por ser un cultivo C4 [37].

De la biomasa que es capaz de producir el sorgo dulce, entre 70 y 80% corresponde al tallo, que es la parte de la planta que tiene el mayor contenido de jugo, entre 40 y 50% del peso del mismo [38].

Los grados Brix reportados varían entre 14.32 y 22.85%; además de tener un rápido crecimiento y acumulación de azúcares, tiene un buen potencial para producción de biomasa y amplia capacidad de adaptación, tanto en las zonas subtropicales como en las templadas [17].

Hay un interés en la naturaleza de la composición del jugo del sorgo dulce ya que contiene un 60% de sacarosa, 33% de glucosa y 7% de fructosa, aunque estas proporciones se modifican de acuerdo a la variedad y la madurez de la planta [21].

El sorgo dulce produce casi ocho unidades de energía por cada unidad energética utilizada en su elaboración. La proporción es similar en el caso de la caña de azúcar. Las características del sorgo como cultivo energético son muy interesantes. Considerando las tecnologías disponibles, el costo de producción del etanol está cerca de 250 euros/t así que es casi competitivo comparado a la producción del etanol de la caña de azúcar, que es de 220 euros/t en Brasil. Se puede aprovechar también la posibilidad de explotar el resto de la cosecha como el fruto y el bagazo para alimento animal, producir calor y electricidad. Considerando la gran variedad de productos que pueden ser obtenidas del

sorgo dulce (Figura 2), complejos integrados pueden ser desarrollados y optimizados para fijar la producción que se necesite [39].

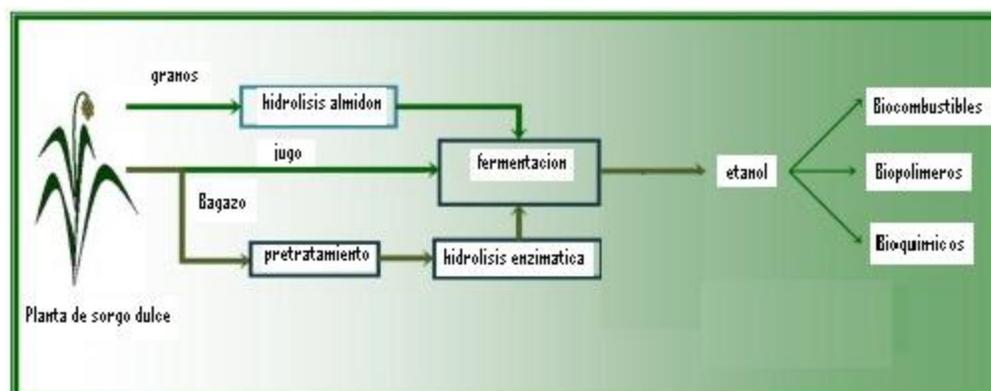


Figura 2. Procesamiento del sorgo dulce para obtención de diferentes productos [40].

1.8 La estadística mundial del sorgo dulce

En los últimos 50 años, el área plantada de sorgo de grano por todo el mundo ha aumentado el 60% y el rendimiento en 244%. El área plantada es actualmente de 41 millones de hectáreas con una productividad que aumentó a $1,5 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ proyectada antes de 2010 y una producción de 63 millones de toneladas. Estudios recientes sugieren que el cambio tecnológico más importante del cultivo del sorgo dulce desde los años 50 ha sido el desarrollo y el uso de la semilla híbrida [41].

La India, aunque todavía es el país con el área más grande cultivada de sorgo dulce, cuenta actualmente con 10.5 millones de hectáreas comparadas con 16 millones en 1989. Más del 50% del área está sembrada con híbridos, pero los rendimientos son solamente el 54% del promedio del mundo. El área y la producción del sorgo dulce en China ha disminuido mientras que el rendimiento ha aumentado a partir de $2.72 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ en 1989 a $4.09 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ en 1999, un aumento de aproximadamente el 50 %. Con el incremento de su uso en la alimentación, las importaciones del cereal son una oportunidad probable. El continente africano produjo el 27% del total de lo cultivado mundialmente en el período 1992-1994 con 21.8 millones de hectáreas. A partir de 1980-1997, el índice de crecimiento anual del área del sorgo dulce era de 3.7%, y de aumentos de la producción de 2.9% y del rendimiento de un 0.8%.

En el hemisferio occidental, Argentina y los Estados Unidos continúan teniendo rendimientos medios en exceso de $4 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$. En 2010, Argentina tuvo una tendencia más positiva alcanzando $5 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$. Mientras que el área plantada ha estado declinando en estos dos países. Brasil y México presentan una historia positiva del aumento del área y la utilización del sorgo dulce. Los informes sugieren que el sorgo dulce se puede acercar a un millón de hectáreas en Brasil con las mayores plantaciones en la región central del oeste brasileño. México, es el cuarto productor más importante con 6.5 millones de toneladas aunque es también el importador más grande con 4.5 millones de toneladas [42].

Se ha reportado que el sorgo dulce tiene un rendimiento de $4056\text{-}4732 \text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}$ de etanol por lo que claramente muestra un excelente potencial para la producción de biocombustibles [7].

JUSTIFICACIÓN

Los sorgos dulces son un grupo de material genético que presenta en el tallo de la planta un alto contenido de azúcares solubles fácilmente fermentables. El principal carbohidrato presente en el jugo es la sacarosa (60%) seguida de azúcares simples como glucosa (33%) y fructosa (7%). Estos azúcares pueden ser usados para la producción de jarabe, alcohol y azúcar cristalizado.

El interés en la producción de bioetanol a partir de sorgos dulces se debe a la facilidad de acceso a los azúcares fermentables que contiene, combinado con un alto rendimiento de biomasa.

El potencial del sorgo dulce como cultivo para obtener energía estriba en que se pueden producir hasta 7000 litros de alcohol etílico por hectárea [39], por lo que países como China se interesan por este cultivo, ya que está previsto el agotamiento de las reservas económicamente recuperables de petróleo de este país para 2016.

Por otro lado, las plantas de etanol diseñadas para procesar caña de azúcar pueden usar fácilmente el sorgo dulce como materia prima, ya que los azúcares extraídos del jugo son fermentados por levaduras en un proceso similar al de la caña de azúcar y no se necesita una gran inversión para explotar el cultivo.

Debido a que el sorgo dulce crece en zonas áridas no crea el mismo problema de deforestación para la producción de biocombustibles como los basados en aceite de palma, o los biocombustibles a base de caña además de que el sorgo dulce no se utiliza para la alimentación humana como en el caso del maíz y la caña de azúcar. Por lo tanto su producción no representa un problema alimenticio ni social, ya que no impacta en los precios de los alimentos debido a casos de especulación.

Se ha reportado que la planta de sorgo dulce requiere poca agua para su desarrollo, resiste el calor y la sequía [43], por lo que las condiciones climáticas y de suelo de la península de Yucatán hacen posible su cultivo para la producción de etanol, actividad que ya se está realizando. Esto hace necesaria una evaluación para explorar su factibilidad técnica y comercial en la región.

HIPÓTESIS

La acumulación de azúcares en las plantas es afectada por la edad y las condiciones de cultivo. Es posible que al cultivar diferentes variedades de sorgo dulce en diferentes terrenos se obtengan concentraciones de azúcares diferentes al momento de su cosecha.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la producción de azúcares de cuatro variedades de sorgo dulce cultivadas en dos localidades diferentes, durante la fase de crecimiento vegetativo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la concentración de azúcares en el jugo de cuatro variedades de sorgo dulce a lo largo de su crecimiento vegetativo.
- Realizar un análisis estadístico para seleccionar la variedad con mayor producción de azúcares al final de su crecimiento vegetativo.
- Determinar el tiempo de incubación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en los jugos de las cuatro variedades, que servirá como inóculo para las fermentaciones.
- Determinar por HPLC el consumo de los azúcares durante la fermentación del jugo de la variedad seleccionada.
- Determinar los rendimientos de etanol con la variedad seleccionada.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 Estrategia Experimental

Se determinó la cantidad de azúcares de los tallos de sorgo durante su ciclo de crecimiento (cuatro meses) [44], extrayendo los azúcares cada 15 días durante el desarrollo de la planta. A continuación se fermentó el jugo de la variedad que presentó mayor concentración de azúcares en el tallo con el fin de determinar la cantidad de etanol que es posible obtener.

El proceso que se siguió para la realización del trabajo experimental se muestra en la Figura 3.

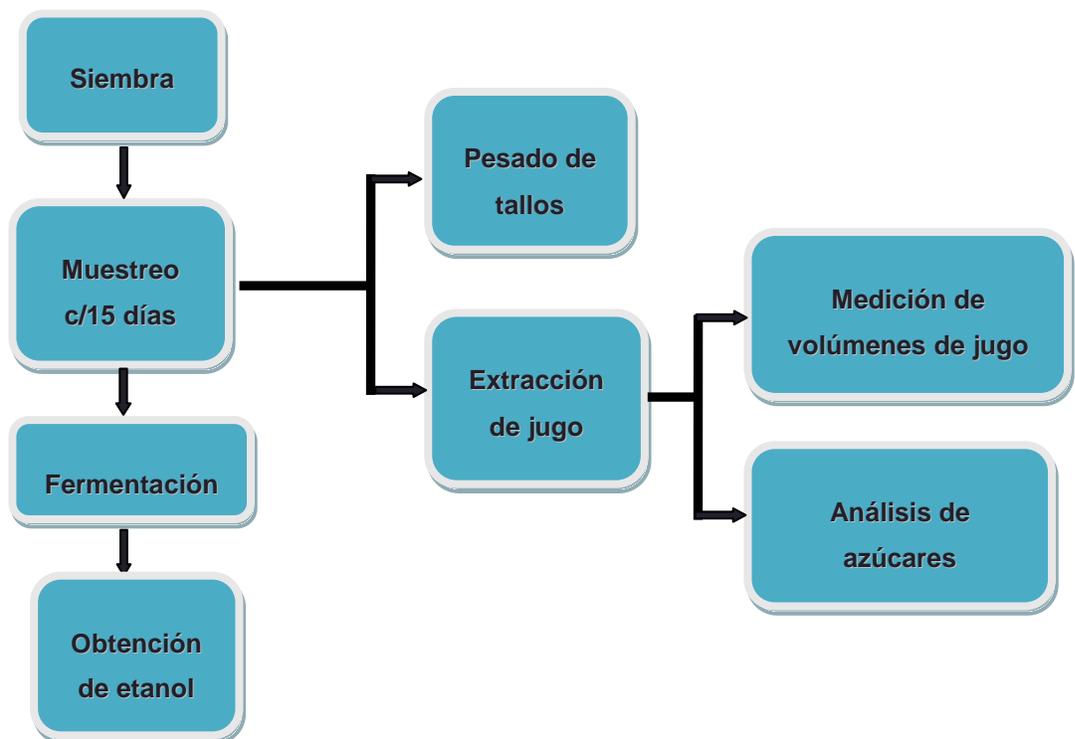


Figura 3. Diagrama general de la estrategia experimental

2.2 Materia prima

Se utilizaron dos sitios de evaluación. Uno fue el lote Santa Cruz, propiedad de Enerall, S.A. de C.V. ubicado en el municipio de Tizimín, en el km 38 de la carretera estatal Tizimín-Colonia Yucatán, del estado de Yucatán, con coordenadas 21° 09' 02.7" N y 87° 47' 45.7" W. El otro sitio fue el lote Gavilanes ubicado en el municipio de Buctzotz, en el km 119 de la carretera federal número 176 del estado de Yucatán, con coordenadas 21° 11' 45.3" N y 88° 33' 24.6" W.

Se sembraron semillas de 4 variedades de sorgo dulce (Keller, M81E, SD61 y SD62) el 26 de marzo de 2010 y se cosecharon las muestras cada 15 días, entre el 9 de junio y el 24 de julio de 2010.

En el lote Santa Cruz, para la preparación de la siembra la tierra fue removida y liberada de malezas por lo que directamente se empleó la técnica manual de golpe con una vara de madera. El riego se realizó por medio de cañones aspersores una vez cada diez días.

En el lote Gavilanes, para la preparación de la siembra se realizó un barbecho químico con la aplicación de glifosfato ($4 \text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}$) para eliminar la maleza. Posteriormente se realizó la siembra de las semillas por la técnica manual de golpe con una vara de madera. El riego se realizó por medio de cintilla (goteo por superficie) a cada una de las plantas dos veces por semana.

En ambos lotes, el diseño de siembra consistió en 500 plantas distribuidas en 10 surcos de 10 metros de largo y una separación de 80 centímetros entre surco y 20 centímetros entre plantas.

Para los cálculos de producción por hectárea, se tomó una densidad de siembra de 70,000 plantas por hectárea.

2.3. Muestreo de las plantas de sorgo dulce

Después de 75 días de crecimiento, se iniciaron los muestreos de las plantas. Cada 15 días, por cada lote, se colectaron 4 tallos de cada variedad. El corte se realizó a 10 cm del suelo. Los tallos fueron transportados al laboratorio para su procesamiento.

2.4. Determinación de peso fresco

Se pesó el tallo de la planta, sin hojas ni panoja, para determinar su peso fresco. Posteriormente, se pesó el bagazo obtenido después de la extracción del jugo (peso fresco de bagazo).

2.5 Extracción del jugo

A cada tallo se le cortó las hojas y las panojas, posteriormente se pasaron por un trapiche (molino de rodillos) para la extracción del jugo (Figura 4a). Una vez extraído el jugo, fue filtrado para la eliminación de sólidos y medido. Por cada variedad se colectó y midió el volumen de jugo extraído de cuatro tallos (Figura 4b).



Figura 4. Extracción (a) y colecta (b) del jugo de los tallos de sorgo dulce.

2.6 Concentración de sólidos solubles.

El contenido de sólidos solubles (°Brix) se midió utilizando un refractómetro marca Pocked Atago.

2.7 Determinación de azúcares

Se realizaron análisis de los azúcares totales del jugo obtenido de los tallos colectados periódicamente de las cuatro diferentes variedades así como durante la fermentación del jugo.

Además, se analizaron las muestras de jugo por HPLC para determinar la dinámica del consumo de los azúcares durante la fermentación.

2.7.1 Determinación de azúcares totales

El contenido de azúcares totales de las muestras fue analizado por el método del fenol-ácido sulfúrico (Anexo A) [45].

2.7.2 Determinación de azúcares por HPLC

Las muestras de la fermentación alcohólica fueron analizadas con un HPLC marca Perkin Elmer modelo Flexar equipado con un detector de índice de refracción y una columna Zorbax Carbohydrate de 4.6 × 150 mm (marca Agilent). La fase móvil fue una disolución al 80% de acetonitrilo y 20% de agua con un flujo de 1.4 mL·min⁻¹. La temperatura de la columna fue de 23·°C y se inyectó un volumen de 20 µL de muestra.

2.8 Levadura utilizada para la fermentación

La levadura que se utilizó en la fermentación de los jugos para la producción de etanol es una cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 5) marca Safoeno (Safmex S.A. de C.V, México).

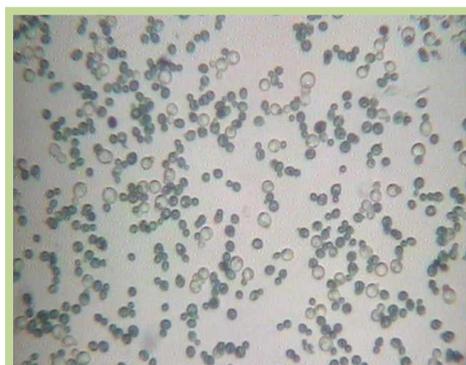


Figura 5. Células de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* vistas al microscopio (40X)

2.8.1 Preparación del inóculo

El volumen de inóculo utilizado fue el 10% del volumen total a fermentar. Como sustrato se emplearon 20 mL de jugo de sorgo diluido con agua a 6 °Brix y adicionado con sulfato de amonio ($1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) como fuente de nitrógeno. El inóculo se incubó a 30°C en agitación (150 rpm) por 12 h.

2.8.2 Curvas de crecimiento

Se realizaron curvas de crecimiento de la levadura *S. cerevisiae* en los jugos de sorgo de las cuatro variedades del lote Gavilanes. En un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de jugo teniendo una concentración de sólidos solubles de 6°Brix, se inoculó una suspensión de levadura para tener una concentración de $3 \times 10^7 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$. Seguidamente se agregó sulfato de amonio ($1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) como fuente de nitrógeno. El inóculo se incubó a una temperatura de 30°C con una agitación de 150 rpm.

Se tomaron muestras cada seis horas durante tres días. Los experimentos se realizaron por triplicado.

2.9 Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica fue realizada en volúmenes de 200 mL de jugo de sorgo de la variedad Keller del lote Gavilanes. El jugo resultó con una concentración de sólidos solubles de 19.6 °Brix y se usó concentrado. El volumen de inóculo de la levadura *S. cerevisiae* fue del 10% del volumen total a fermentar. Se añadió sulfato de amonio ($1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y se fermentó durante tres días a una temperatura de 30°C en oscuridad y sin agitación (Figura 6). Los experimentos se realizaron por triplicado.



Figura 6. Fermentación de los jugos de sorgo dulce.

2.10 Destilación

Se realizó la destilación utilizando un sistema de destilación integral como se muestra en la Figura 7. A 25 mL de mosto fermentado se añadieron 25 mL de agua destilada y la mezcla se destiló hasta coleccionar un volumen de 25 mL.



Figura 7. Sistema de destilación integral.

2.11 Determinación de la producción de etanol

El contenido de etanol de las muestras fue determinado usando el método del dicromato [46] utilizando etanol como estándar para la preparación de la curva de calibración (Anexo A).

2.12 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza por bloques al azar con el software SAS System v8.1 (SAS Institute Inc., Cary NC. USA.)

Para el análisis se tomaron en cuenta tres bloques en dos sitios de evaluación siendo las unidades experimentales cuatro plantas de cada una de las cuatro variedades de sorgo dulce. Las variables analizadas fueron: peso de los tallos, volumen de jugo, concentración de sólidos solubles, concentración de azúcares totales y rendimiento de azúcar por tallo. En todos los casos se aplicó la prueba de comparación de medias de Tuckey y se manejó un valor $P = 0.05$.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Ciclo de crecimiento de las variedades de sorgo dulce

Después de 75 días de realizada la siembra, se iniciaron los muestreos de las plantas a intervalos de 15 días hasta los 120 días de cultivo. Se tomó este tiempo como final debido a que las plantas ya presentaban la aparición de las panojas y los azúcares empiezan a concentrarse en este órgano de la planta.

3.1.1 Peso fresco de los tallos

El peso de los tallos puede ser usado como medida indirecta del crecimiento de la planta y de la cantidad de biomasa generada. Los pesos de los tallos de las cuatro variedades de sorgo dulce crecidas en los lotes de Santa Cruz y Gavilanes se presentan en las Figuras 8 y 9 respectivamente.

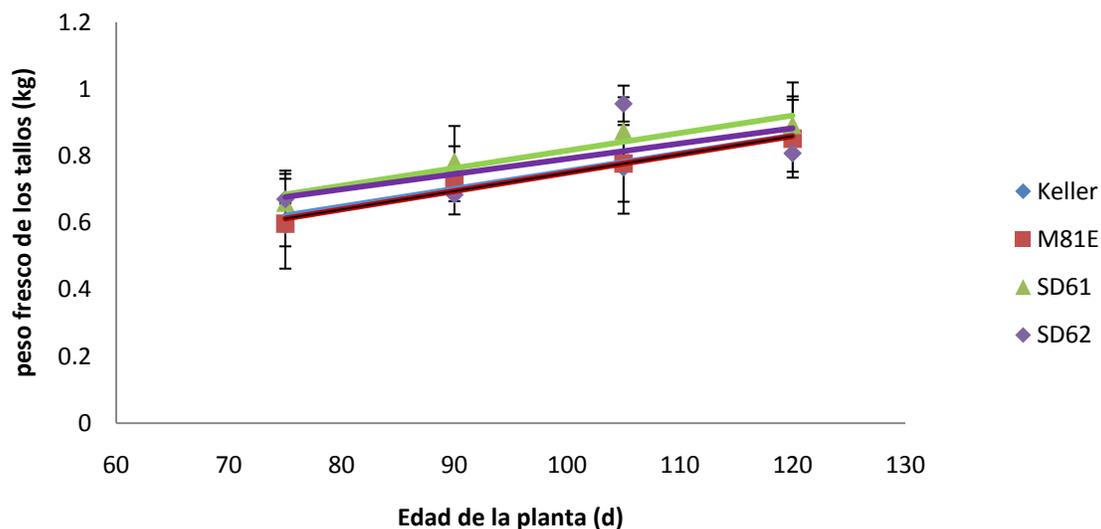


Figura 8. Peso de los tallos de las cuatro variedades de sorgo dulce cultivadas en el lote Santa Cruz (los valores son el promedio obtenido de 4 tallos por variedad).

El análisis estadístico mostró que no hay una diferencia significativa entre las medias de las variedades cultivadas en el lote Santa Cruz, a los 120 días. Obteniéndose en promedio un valor de $59.57 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$.

Además, se observó una tendencia al aumento de la biomasa a lo largo del muestreo (entre los 75 y 120 días) de 26%.

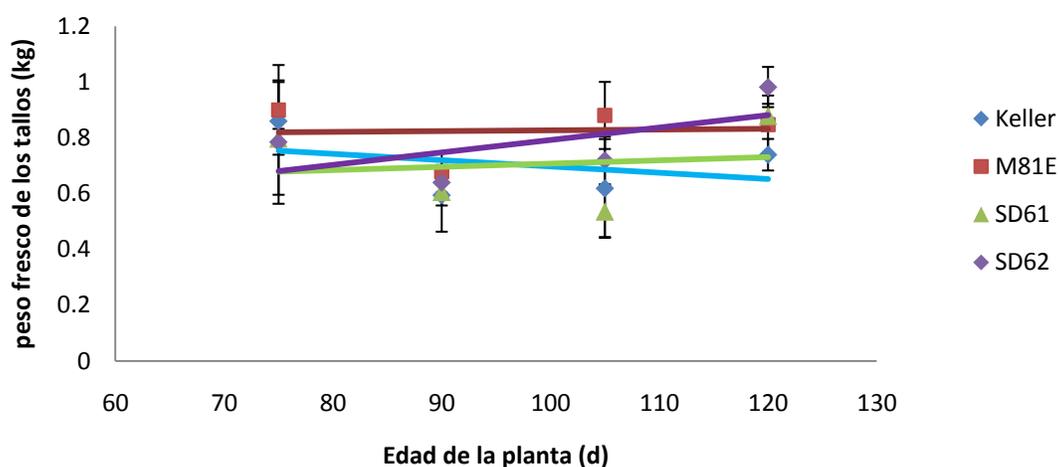


Figura 9. Peso de los tallos de las cuatro variedades de sorgo dulce cultivadas en el lote Gavilanes (los valores son el promedio obtenido de 4 tallos por variedad).

En el caso del lote Gavilanes, el análisis estadístico indicó que hay diferencia significativa entre las medias de las variedades, siendo SD62 y SD61 las que presentaron mayor peso ($65.1 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$).

Ganesh y col [47] mencionan que la etapa fenológica en la que se obtienen los rendimientos máximos de tallo fresco es en la etapa de grano masoso, que se presenta entre 10-15 días después de que el 50% más un individuo están en floración. Del análisis de 19 genotipos, reportan un promedio de $45 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$. Este valor es más bajo que los obtenidos en el presente trabajo para la misma etapa fisiológica (madurez o reproductiva) ya que en el caso de Santa Cruz y Gavilanes, se obtuvieron 14.6 y $20.1 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ más del valor reportado, respectivamente.

Un factor importante que podría afectar al peso de los tallos de la planta es la salinidad presente en los suelos, ya que se ha reportado que las plantas de sorgo dulce no incrementan los rendimientos de sus tallos en concentraciones de salinidad de 12 dS·m⁻¹. Las investigaciones realizadas con la variedad Keller [48] muestran que en concentraciones de salinidad entre 2 y 12 dS·m⁻¹ ésta mantuvo los rendimientos de los pesos de sus tallos entre 67.4 y 66.9 t·ha⁻¹, respectivamente, a lo largo de su ciclo de crecimiento. La salinidad reportada para los suelos de Yucatán es de aproximadamente 2 dS·m⁻¹ [49]. Sería recomendable medir la salinidad de los suelos de los terrenos experimentales para realizar una mejor comparación entre las variedades.

Las variedades fueron sembradas y cultivadas sin la aplicación de fertilizantes por lo que el ciclo transcurrió con la fertilidad original de cada uno de los suelos (no se realizaron análisis de fertilidad de suelo).

3.2 Volumen del jugo

Los volúmenes de jugo obtenidos de los tallos de las cuatro variedades se muestran en las Figuras 10 (para el lote Santa Cruz) y 11 (para el lote Gavilanes).

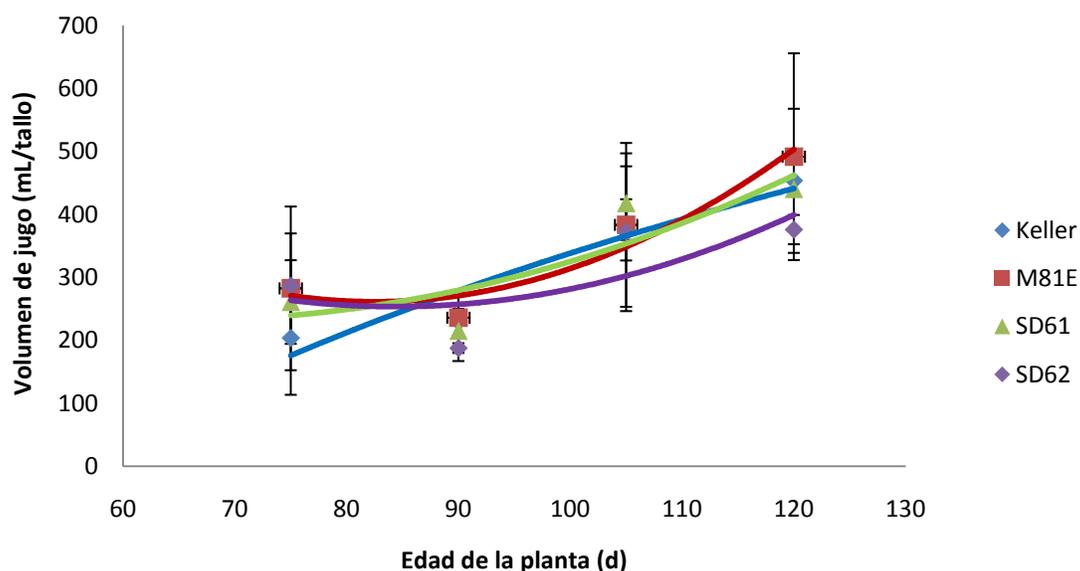


Figura 10. Volúmenes de los jugos de las cuatro variedades de sorgo dulce cultivadas en el lote Santa Cruz.

En la Figura 10 se puede observar un aumento gradual de los volúmenes de jugo con el paso del tiempo. El aumento de jugo en el período estudiado fue de 41%.

El análisis estadístico demostró que no hay una diferencia significativa entre las medias de las variedades al día 120 de cosecha.

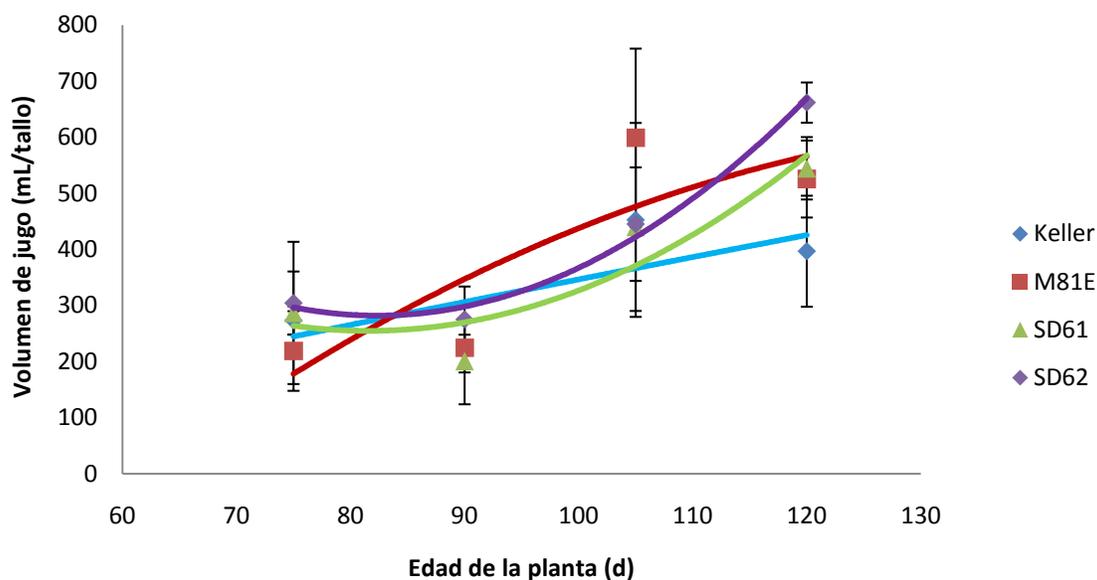


Figura 11. Volúmenes de los jugos de las cuatro variedades de sorgo dulce cultivadas en el lote Gavilanes.

Se pudo observar que entre los 90 y 105 días es cuando se presenta un aumento en la cantidad de jugo contenido en los tallos. En este período, el aumento de volumen de jugo fue del 49%. Entre los 105 y los 120 días, en las variedades SD61 y SD62 se observó un aumento en la cantidad de jugo mientras que en las variedades Keller y M81E se observó una disminución. No obstante la diferencia de estos comportamientos, de acuerdo al análisis estadístico, no hay una diferencia significativa entre las medias de las cuatro variedades al día 120, que fue el tiempo de la última cosecha.

Es importante notar que hay diferencias de volúmenes de jugo obtenido por tallo de sorgo entre los lotes evaluados, ya que la cantidad de jugo por tallo en las variedades cultivadas en Santa Cruz fue menor comparada con la de los tallos del lote Gavilanes. Estadísticamente existe diferencia significativa entre lotes (Anexo 2). Esto puede deberse a que en el lote Gavilanes el riego fue asistido por método de goteo de superficie y

vigilado, mientras que en el lote Santa Cruz, el riego fue con aspersores una vez por semana y por lo tanto los tallos fueron menos jugosos.

De acuerdo con el trabajo de Sakellariou y col. [50] el método de superficie de goteo es el más adecuado ya que se obtienen buenos rendimientos de biomasa fresca.

En general, se pudo observar que aunque hubo un aumento en el volumen de jugo de los tallos, el peso de los mismos no aumentó de manera proporcional en el lote Santa Cruz y se mantuvo constante en el lote Gavilanes. Esto puede deberse a que en la planta hay una especialización de tejidos conforme avanza la etapa fenológica de maduración, incrementándose la capacidad de retención de agua de las células por lo que los volúmenes de jugo, en su conjunto, aumentan sin que el peso lo haga [51].

3.3 Concentración de sólidos solubles.

La concentración de sólidos solubles puede ser una medida indirecta pero rápida de la concentración de azúcares en una muestra. En el caso de los jugos de sorgo dulce se obtuvieron los siguientes resultados para Santa Cruz (Figura 12) y Gavilanes (Figura 13).

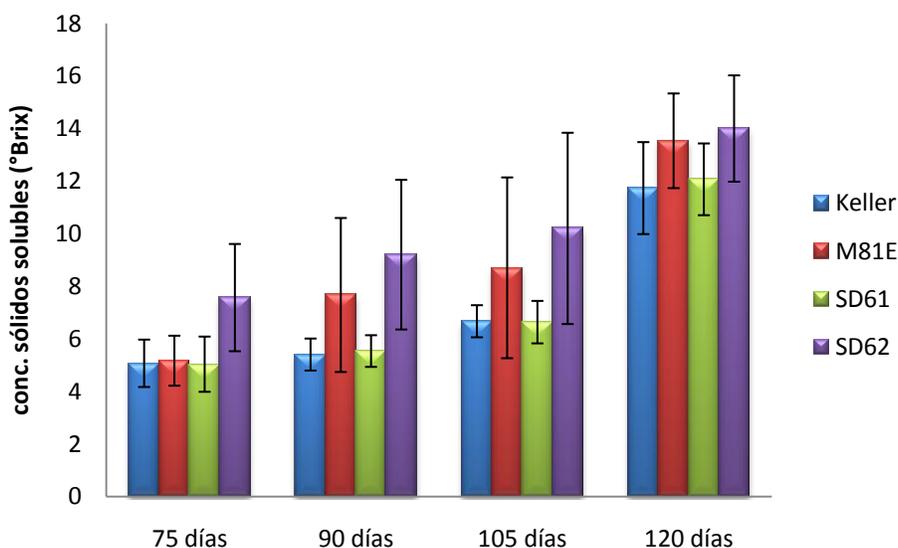


Figura 12. Concentración de sólidos solubles (°Brix) de los jugos de las cuatro variedades de sorgo dulce cultivadas en el lote Santa Cruz.

Se puede observar que la concentración de sólidos solubles presenta una tendencia a aumentar con el paso del tiempo. El análisis estadístico indicó que no hay diferencia significativa entre las medias de las variedades a los 120 días.

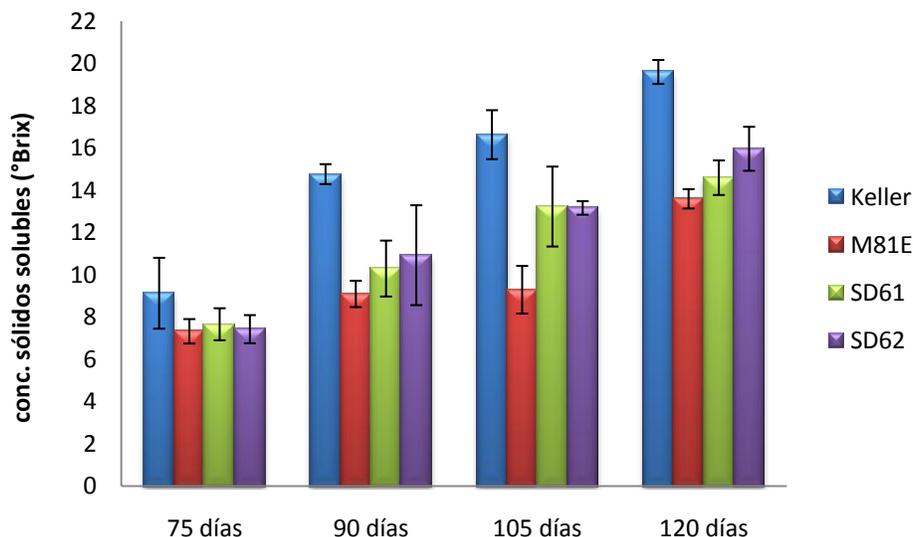


Figura 13. Concentración de sólidos solubles de los jugos (°Brix) de las cuatro variedades de sorgo dulce cultivados en el lote Gavilanes.

De la misma manera que en el lote Santa Cruz, se puede observar que en Gavilanes la concentración de sólidos solubles presenta la misma tendencia aunque a los 120 días sí se puede observar que hay diferencias entre las variedades. Con la variedad Keller se obtuvo el jugo más concentrado al final del cultivo.

La concentración de sólidos solubles puede ser afectada por factores como la salinidad del suelo, la cantidad de agua suministrada por riego y la variedad de sorgo cultivada [52].

Se han reportado valores de concentración de sólidos solubles entre 18 y 21 °Brix para la variedad Keller según los estudios realizados por Laopaiboon y col. [53], mientras que para la variedad M81E se han reportado valores de 16 °Brix [16]. En este trabajo, en el caso de la variedad Keller, se observó un valor similar en el lote Gavilanes (19.6 ± 0.56 °Brix) y en el lote Santa Cruz el jugo obtenido fue más diluido (11.7 ± 1.75 °Brix) que lo reportado. En el caso de la variedad M81E, en el lote Santa Cruz el jugo presentó una concentración de sólidos solubles de 13.5 ± 1.8 °Brix, mientras que en el lote Gavilanes,

el jugo de la misma variedad alcanzó una concentración de sólidos solubles de 13.6 ± 0.45 °Brix. En ambos lotes, los jugos fueron más diluidos.

3.4 Azúcares totales

El análisis de los azúcares totales de los jugos de las variedades de sorgo dulce en el lote Santa Cruz se muestra en la siguiente Figura 14:

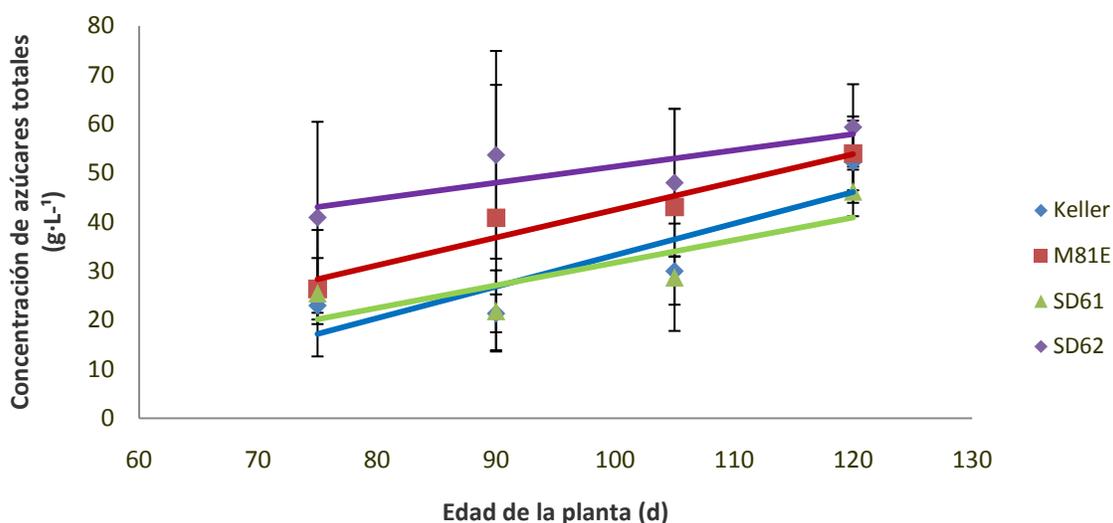


Figura 14. Concentración de azúcares totales en los jugos de las cuatro variedades de sorgo dulce cultivadas en el lote Santa Cruz.

Se puede observar que hay un aumento de los azúcares durante el período de los cortes. De acuerdo al análisis estadístico, no hay diferencia significativa entre las medias de las cuatro variedades a los 120 días. El aumento de la concentración de azúcares totales en el lote Santa Cruz fue de 45%.

En la Figura 15 se muestran los resultados de concentración de azúcares totales de las variedades sembradas en el lote Gavilanes. No se encontraron diferencias significativas entre las medias de las cuatro variedades a los 120 días de cultivo. Durante el tiempo de muestreo se registró un aumento de azúcares totales del 60%.

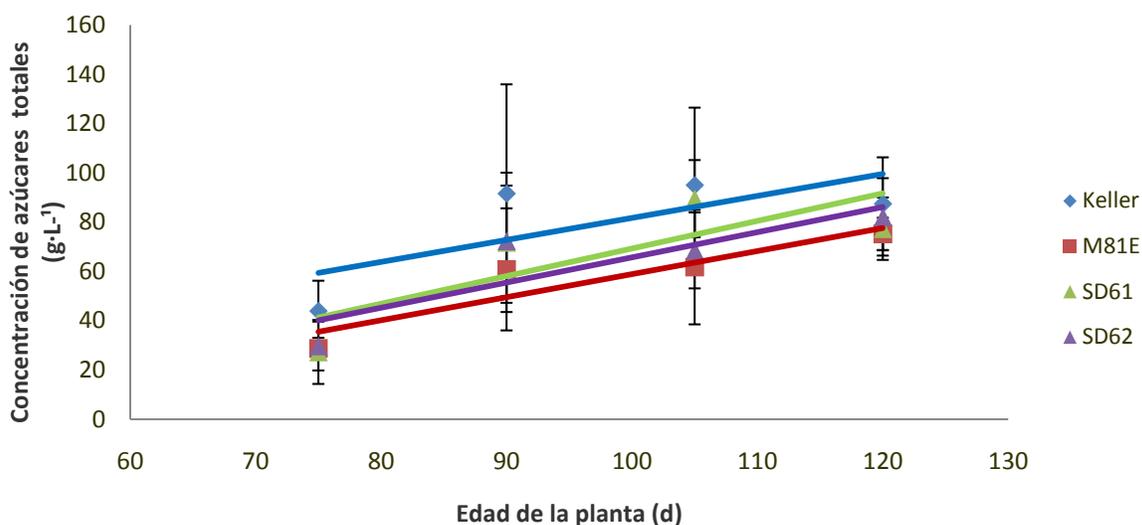


Figura 15. Concentración de azúcares totales en los jugos de las cuatro variedades de sorgo dulce cultivadas en el lote Gavilanes.

El análisis estadístico indicó que hay diferencia significativa entre ambos sitios, siendo Gavilanes el sitio en el que se obtiene la mayor concentración de azúcares totales.

En el trabajo publicado por Krishnaveni y col. [54] se menciona que la planta de sorgo dulce aumenta su contenido de azúcares totales entre la fase de materia suave (10 días después de la polinización, la cual ocurre 70 días después de la emergencia de la planta) y la maduración (a los 130 días después de la emergencia, dependiendo de la variedad). Los muestreos realizados en este trabajo se encuentran dentro de los tiempos antes mencionados.

3.5 Producción de azúcar por tallo

Para fines de explotación comercial, el factor principal es la producción de azúcar, la cual se puede calcular a partir de la concentración de azúcares totales y del volumen de jugo producido.

Los resultados obtenidos de producción de azúcares por tallo en ambos lotes (Santa Cruz y Gavilanes) se muestran en las Figuras 16 y 17.

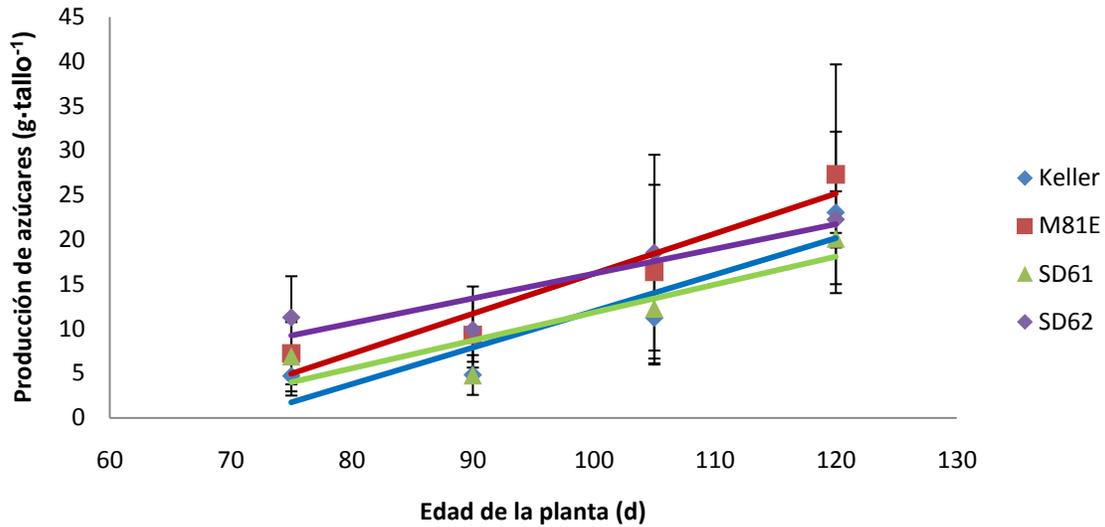


Figura 16. Producción de azúcares de las variedades de sorgo dulce cultivadas en el lote Santa Cruz.

En la gráfica se observa la tendencia al aumento de los gramos de azúcares totales a lo largo del ciclo de cultivo. El análisis estadístico de la producción de azúcar por tallo indicó que no existe una diferencia significativa entre las variedades. Entre los 75 y 120 días de cultivo, se obtuvo un 67% de aumento en los gramos de azúcares por tallo de las variedades.

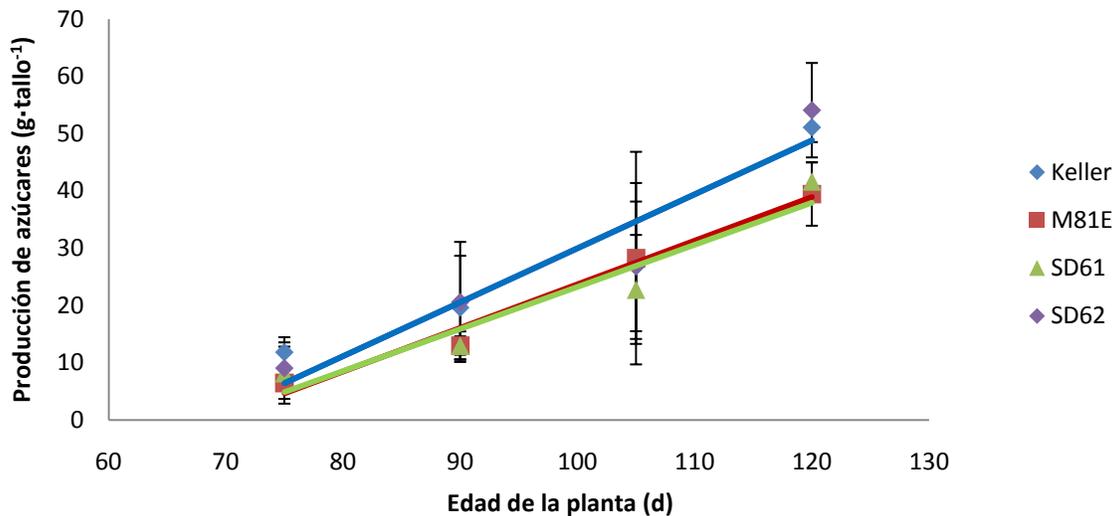


Figura 17. Producción de azúcares de las variedades de sorgo dulce cultivadas en el lote Gavilanes.

El análisis estadístico muestra que existe una diferencia significativa entre las variedades M81E y SD62 así como entre SD62 y SD61. También se puede observar en la Figura 17, que las variedades SD62 y Keller son las que presentan mayor cantidad de gramos de azúcares totales por tallo. Entre los 75 y 120 días de cultivo, se obtuvo un aumento de la cantidad de gramos de azúcares por tallo del 80%.

El análisis estadístico de la producción de azúcar, muestra que sí hay diferencias significativas entre ambos lotes.

3.6 Curva de crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Las curvas de crecimiento de la levadura en los jugos de las 4 variedades se muestran en la Figura 18.

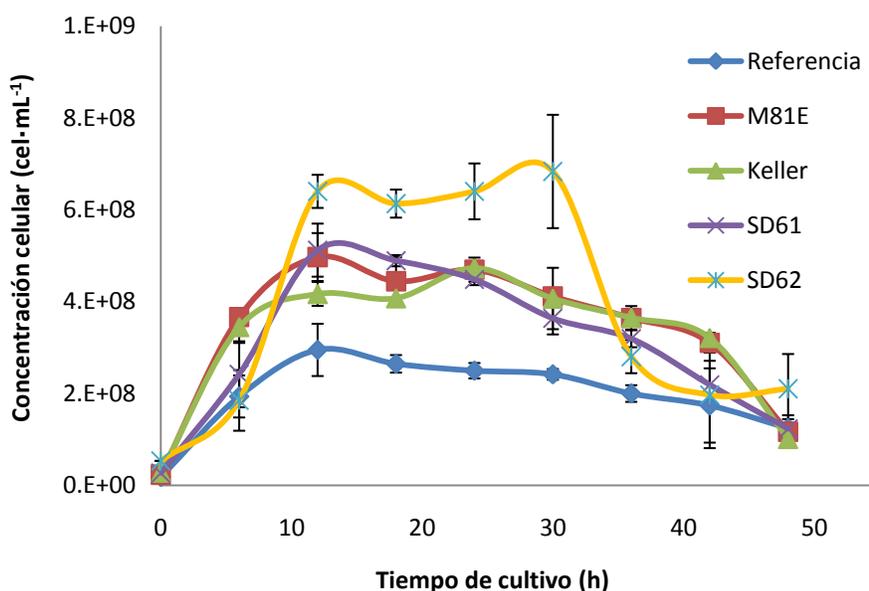


Figura 18. Curva de crecimiento del inóculo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en jugo de las cuatro variedades de sorgo dulce cultivadas en el lote Gavilanes y medio Gelpa como referencia.

Se puede observar un mayor crecimiento de las células de levadura en los jugos que en la referencia (medio Gelpa). Esto puede deberse a que la concentración de azúcar en la referencia es de $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y es menor comparada con la de los jugos de las cuatro variedades que presentaron entre 27 y $34 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de azúcares totales al ser diluidos a 6°Brix . Al ser mayor la cantidad de azúcares en el medio, hay mayor disponibilidad de carbono para la producción de biomasa celular.

El cálculo del tiempo de duplicación (t_d) de la biomasa puede servir para comparar el crecimiento del microorganismo a diferentes condiciones de cultivo (medio, temperatura, etc.). En la Tabla 3 se muestran las velocidades específicas de crecimiento (μ) utilizadas para calcular los tiempos de duplicación (t_d) de la levadura en los jugos de las cuatro variedades durante las primeras seis horas de cultivo. Se puede observar que los tiempos de duplicación son similares con excepción del caso en que se utilizó jugo de la variedad SD62 en el cual la levadura presentó una fase de adaptación antes de iniciar el crecimiento exponencial. Ariyajarearnwong y col. [55] realizaron estudios de cinética de crecimiento de la levadura *S. cerevisiae* NP 01 en jugos de sorgo dulce adicionados con glucosa (20 y $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y obtuvieron valores de μ de 0.37 h^{-1} en ambos casos.

Tabla 3. Tiempos de duplicación y velocidad de crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en jugos de sorgo dulce durante las primeras seis horas de cultivo.

Variedad	Velocidad de crecimiento, μ (h^{-1})	Tiempo de duplicación (h)
Medio Gelpa	0.39	1.7
M81E	0.46	1.5
Keller	0.42	1.6
SD61	0.36	1.8
SD62	0.20	3.3

En la Figura 18 se puede observar que tanto en los jugos como en la referencia, es aproximadamente a partir de las 12 horas cuando la levadura alcanza el inicio de la fase estacionaria. Este tiempo se estableció como el adecuado para crecer los inóculos de las fermentaciones ya que la levadura está cambiando su metabolismo hacia la producción de metabolitos y al ser agregada al mosto para fermentar, los azúcares serán consumidos preferentemente para la producción de etanol y no para la multiplicación. Se han reportado en la literatura tiempos de incubación del inóculo de 15 horas [55, 56, 57].

3.7 Fermentación del jugo de sorgo dulce.

Se realizó la fermentación de jugo de sorgo dulce de la variedad Keller cultivada en el lote de Gavilanes, porque es la que presentó mayor producción de azúcares por tallo.

Se realizaron fermentaciones con una duración de 2 y 3 días. Los resultados del consumo de azúcares se muestran en la Figura 19.

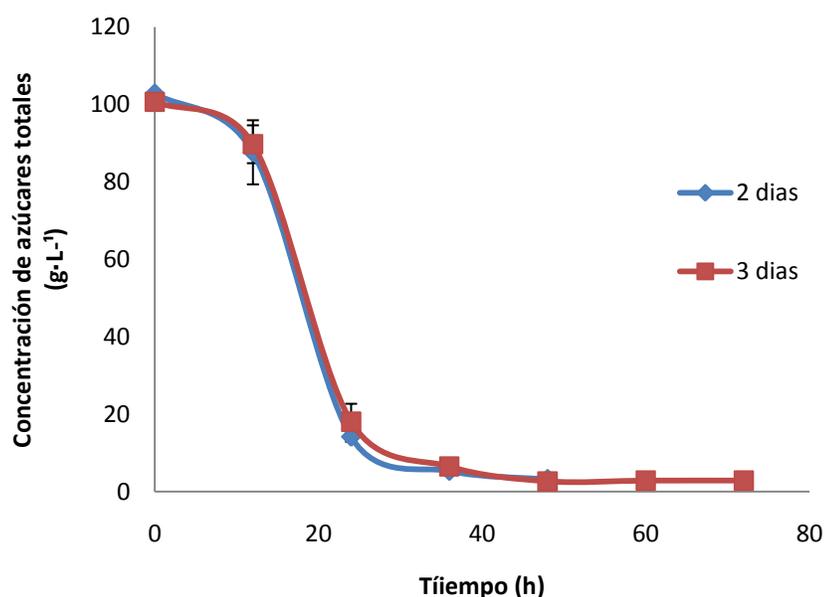


Figura 19. Curva de consumo de azúcares totales en las fermentaciones.

Se puede observar en la Figura 19 que durante las primeras 12 horas, el consumo de azúcares totales es lento, lo que nos indica una fase de adaptación de la levadura al nuevo sustrato. Este mismo comportamiento fue reportado por Imam y col. [58] quienes encontraron que la composición del sustrato (proporciones de los diferentes azúcares)

depende de la variedad de sorgo dulce utilizada y puede influir en la cinética de la fermentación.

A partir de las 12 horas y hasta las 24 horas la velocidad de consumo de azúcares se incrementó, consumiéndose el 86.3% de los azúcares presentes en el jugo. En la Tabla 4 se muestran los valores de consumo de azúcares y producción de etanol al final de las fermentaciones que se realizaron durante dos y tres días.

Tabla 4. Consumo de azúcares y rendimiento de etanol de las fermentaciones de jugo de la variedad Keller cultivada en el lote Gavilanes.

Tiempo de fermentación (d)	Consumo de azúcares (%)	Concentración de etanol (g·L ⁻¹)	Rendimiento de etanol (% del teórico)
2	96.9	43.56± 3.88	86.16% ± 7.52
3	97.2	47.74± 3.89	95.66 % ± 5

Estadísticamente no hay diferencias significativas entre los rendimientos de las dos fermentaciones. Este dato es relevante ya que tiene implicaciones de tipo económico y energético en el caso de una explotación a nivel comercial. Al reducir el proceso en 24 horas, se ahorra en costos de energía (control de la temperatura de los fermentadores y operación de los equipos periféricos por 24 horas menos) y otros costos de operación. Laopaiboon y col. [53] encontraron que entre las 48 y 72 horas de fermentación se consume el 97% de los azúcares del jugo, tanto en un proceso *batch* como en *fedbatch*.

Por otro lado, en la literatura se han encontrado rendimientos de alcohol entre 76 y 100% del teórico [53, 56, 59], los resultados obtenidos en este trabajo se encuentran en este intervalo.

3.8 Análisis de azúcares por HPLC

Se realizó el análisis por HPLC de la concentración de los azúcares durante la fermentación del jugo de la variedad Keller, con una duración de tres días. Los azúcares

identificados en el jugo de esta variedad fueron glucosa, fructosa y sacarosa. Los perfiles de consumo de estos azúcares durante la fermentación se muestran en la Figura 20.

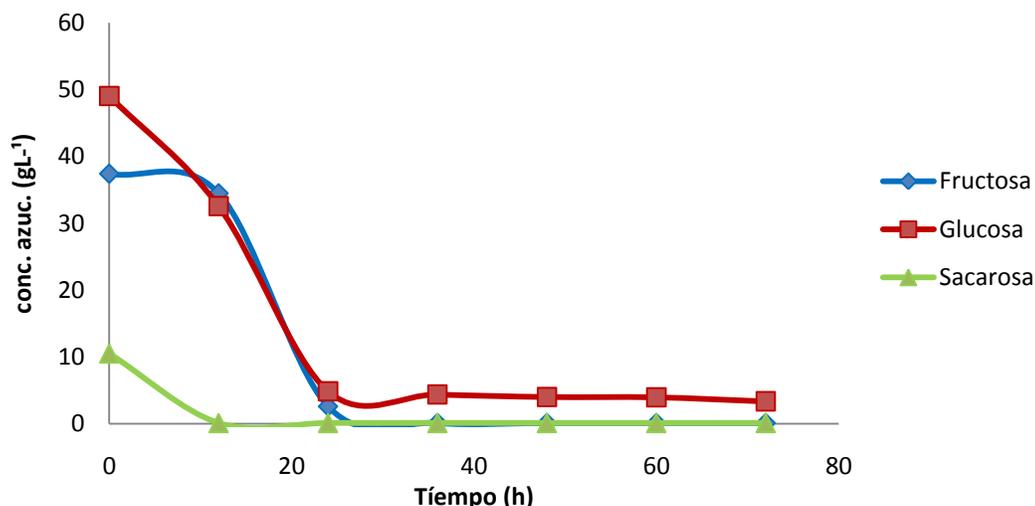


Figura 20. Curva de consumo de los azúcares fructosa, glucosa y sacarosa determinados por HPLC durante los tres días de fermentación de jugo de la variedad Keller.

Un estudio reportado sobre el análisis por HPLC de azúcares en el jugo de sorgo dulce [60] para la variedad M81E muestra una composición de 70, 20 y 10% de sacarosa, glucosa y fructosa, respectivamente. En los trabajos publicados por Dávila y col. [61] se reporta el análisis realizado por HPLC de los jugos frescos de cinco variedades de sorgo dulce, con valores promedio de fructosa, glucosa y sacarosa de 41, 54 y 7 g·L⁻¹, respectivamente. La distribución de estos azúcares es similar a la encontrada en el presente estudio. Dávila y col. [61] explican que la baja concentración de sacarosa en el jugo puede deberse a la inversión de la misma debido al pH ligeramente ácido, que es característico del jugo de sorgo dulce y a la variedad utilizada.

Se observó que desde el inicio hasta las 12 horas de la fermentación, se hidroliza toda la sacarosa presente. Después de este tiempo no se observó la presencia de este disacárido en el jugo fermentado.

El consumo de glucosa se observó desde el inicio de la fermentación, durante las primeras 12 horas se consumió tanto la glucosa presente en el jugo como la liberada por la hidrólisis de la sacarosa, entre las 12 y las 24 horas ocurrió la mayor velocidad de consumo de este azúcar.

Durante las primeras nueve horas la concentración de fructosa se mantiene constante. Esto sugiere que solamente la fructosa liberada por la hidrólisis de la sacarosa es la que está siendo consumida por la levadura, y a partir de las 12 horas es cuando se observa un aumento en la velocidad de consumo de la fructosa presente en el jugo, ya que la sacarosa ha sido hidrolizada completamente y ya no puede ser fuente de fructosa.

Adicionalmente, se realizó una comparación (Figura 21) entre los valores de las concentraciones de los azúcares calculados a partir de los datos obtenidos por las técnicas de HPLC y fenol sulfúrico (azúcares totales).

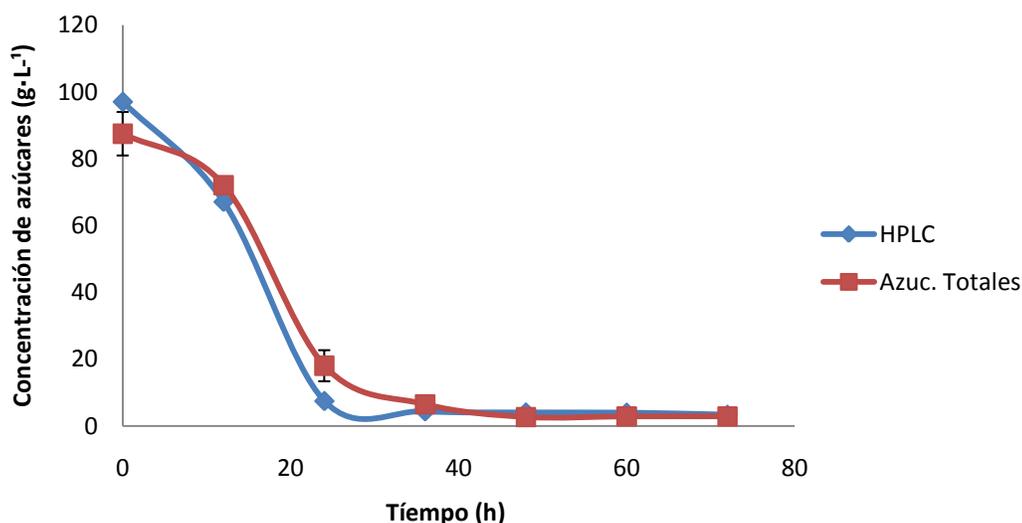


Figura 21. Comparación entre las curvas del consumo de azúcares determinados por HPLC y azúcares totales por el método del fenol-sulfúrico.

En la Figura 21 se observa que los datos obtenidos por ambas técnicas son similares. La ventaja de la técnica de HPLC es la separación de los azúcares presentes en la muestra y con ello se puede observar el comportamiento individual de los mismos. En el caso de la fermentación del jugo de sorgo dulce, los azúcares se consumen al mismo

tiempo, por lo que su determinación por la técnica de fenol-sulfúrico es suficiente para análisis rutinarios.

3.9 Producción de etanol por hectárea

Haciendo un cálculo con los resultados obtenidos en este trabajo de los rendimientos de etanol de la fermentación del jugo de la variedad Keller cultivada en el lote Gavilanes, se obtendría un rendimiento de azúcar de $3.64 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ y una producción de etanol de $2,253.28 \text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}$.

Los trabajos publicados por Wortmann y col. [62] con la misma variedad, cultivada en Nebraska, presentan rendimientos de azúcar de $3.33 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ y una producción de etanol de $2,212 \text{ L}\cdot\text{ha}^{-1}$. Podemos ver que los niveles de producción son similares, a pesar de la diferencias de suelos (arcilloso-limoso) y de temperaturas ambientales, que fueron menores a 10°C en los cultivos reportados en Nebraska y de 30°C en los terrenos experimentales en los que se llevó a cabo este trabajo.

CONCLUSIONES

- Se puede cultivar cualquiera de las variedades estudiadas y obtener la misma producción de azúcares dentro de un mismo lote.
- Las mayores concentraciones de azúcares totales y cantidad de azúcar por tallo se encontraron en las variedades de sorgo dulce cultivadas en el sitio de Gavilanes.
- La levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada en este estudio, se adaptó bien a los jugos de sorgo dulce, alcanzando el final de su fase exponencial a las 12 horas, obteniéndose una concentración celular promedio de 5×10^8 cel·mL⁻¹.
- No hay diferencias estadísticas significativas en los resultados de la duración de la fermentación, por lo que en términos de eficiencia, es recomendable la fermentación de dos días.
- Se obtuvo una concentración de etanol de 43.56 g·L⁻¹ en la fermentación realizada por dos días, obteniéndose un rendimiento de 86.16% del teórico.
- El análisis por HPLC del jugo de la variedad Keller, cultivada en el lote Gavilanes, mostró que de los azúcares presentes, la glucosa fue la de mayor concentración, con 49 g·L⁻¹, le sigue la fructosa con 37.4 g·L⁻¹ y finalmente la sacarosa con 10.5 g·L⁻¹. No se encontró otro tipo de azúcar en el jugo.
- El cálculo de la producción de etanol por hectárea a partir del cultivo de sorgo de la variedad Keller en el lote Gavilanes nos da rendimientos similares a los reportados en la literatura.

PERSPECTIVAS

- Es necesario realizar una segunda siembra, con las mismas condiciones de cultivo, para verificar la reproducibilidad de todo el proceso.
- Es necesario extender el estudio de los parámetros analizados en este trabajo a todas las etapas fenológicas de las variedades (desde la emergencia de la planta hasta la madurez post-fisiológica).
- Se recomienda realizar el mismo estudio con otras variedades de sorgo dulce que sean más productoras de azúcares o que estén más adaptadas a las condiciones de cultivo de la región para obtener mejores rendimientos de etanol.
- Para continuar con la optimización de la fermentación, se recomienda estudiar la utilización de otras levaduras, como por ejemplo, aislar levaduras autóctonas del jugo de sorgo dulce.
- Realizar un análisis de sustentabilidad para determinar la viabilidad económica, social y ambiental de la producción de etanol en terrenos del Estado de Yucatán.

BIBLIOGRAFIA

1. H Cárdenas D. La Sustentabilidad en el Uso de Biocombustibles. Un Reto de Análisis, Decisiones y Equilibrio; A Blueprint for Green Energy in the Americas, Strategic Analysis of Opportunities for Brazil and the Hemisphere, Featuring: The Global Biofuels. (2007)
2. O J. Sánchez, C A. Cardona. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour Technol* 99:5270–5295 (2007)
3. I. F. Chavarro Rojas. Biofuels, renewable energy for the future and damage of fossil fuels on the environment. Department of Physical Sciences. University of Caldas Colombia (2007).
4. M. Galbe; G. Zacchi; A review of the production of ethanol from softwood; *Appl Microbiol Biotechnol* 59:618–628 (2002).
5. Ingeniería civil y Medio ambiente, *Rev Miliarium* 13(8):933-934 Madrid España. (2004)
6. <http://www.oncultivos.es/concepto.html>
7. G. Siri Prieto. Cultivos energéticos para la producción de etanol en el Uruguay. *Rev. Fac de Agronomía. Universidad de la Republica Oriental del Uruguay.* (2008)
8. M Viornerly-Mendoza. Etanol ¿combustible del futuro? *Memorias 3er Congreso Iberoamericano de Innovación y Tecnología México* (2007)
9. C Belpaire, M O Rivera Arismendi. *Estado ambiental de Bolivia Ed. PIEB. Vol 5. Bolivia.* 643 p. (2008)
10. C. Alvarez-Maciel. Biocombustibles: desarrollo histórico y tecnológico. *Revista Mercados Actuales y Comercio Internacional.* Num 359. UNAM, México. (2009)

11. M Scott, M Aillery, and M Weinberg. Unites States Department of Agriculture. Economic Research Report No. (ERR-86) 64 p. (USDA 2010).
12. www.biodisol.com
13. N. Rodríguez-Martínez y col. Potenciales y Viabilidad del Uso de Bioetanol y Biodiesel para el Transporte en México. Banco Interamericano de Desarrollo México, (2006)
14. M T Hernández-N. Tendencias actuales en la producción de bioetanol. Conferencia dictada en la Facultad de Ingeniería, Universidad Rafael Landívar. Guatemala, (2007)
15. M.Chávez. La caña de azúcar como materia prima para la producción de alcohol carburante. Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales, San José, Costa Rica. (2004)
16. B. Hahn-Hägerdal, M. Galbe, M.F. Gorwa-Grauslund, G. Lidén and G. Zacchi. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. Trends Biotechnol. 24(12) 549-556, (2006)
17. A. Almodares and M. R. Hadi Production of bioethanol from sweet sorghum. Afr J Agric Res 4(9): 772 - 780, (2009).
18. A. Contreras. Variedades de papa para la producción de etanol. Instituto de Producción y Sanidad Vegetal. Memorias de la Universidad Austral de Chile, (2010)
19. V. Zúñiga-Cerón, L. López-Velasco, M. Flores-Pardo. Evaluación Ambiental de la Producción de Yuca (*Manihot esculenta* Crantz), variedad M-THAI 8. Revista El Hombre y la Máquina No. 36. Universidad Autónoma de Occidente, Cali. (2011).
20. F.E. Miguez, F. H Miguez. Biocombustibles. Revista Facultad de Ciencias Agrarias. Argentina. (2008)
21. L. Cuervo, J L. Folch, R E. Quiroz, Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares Para la Producción de Etanol, BioTecnología, 13(3):11-25 (2009)

22. P. Sahlin, Fermentation as a Method of Food Processing. PhD Thesis. Division of Applied Nutrition and Food Chemistry Center for Chemistry and Chemical Engineering. Institute of Technology, Lund University, Sweden (1999).
23. H. Palacio Llanes, Fabricación de alcohol. Primera Edición, Salvat Editores, Barcelona, España, (1997)
24. G. Beltrán, M.J Torrija, M. Novo, N. Ferrer, M. Poblet, J. M. Guillamón, N. Rozès. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year follow-up study. System. Appl. Microbiol. 25, 287–293, (2002).
25. H.J. Vázquez. Fermentación alcohólica: Una Opción para la Producción de Energía Renovable a Partir de Desechos Agrícolas, Ingeniería, Investigación y Tecnología 8(4): 249-259 (2007)
26. F Badotti, M G Dario, S L Alves , M LA Cordioli, L C Miletti, P S de Araujo and B U Stambuk. Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. Microbial Cell Factories 7(4) doi: 10.1186/1475-2859-7-4 (2008)
27. M. Peña Poma. Optimización de las condiciones de cultivo de las cepas *Pichia stipitis* CBS 5770, 5773 Y 6054 para la producción de bioetanol a partir del hidrolizado de aserrín de curupau como residuo lignocelulósico. Universidad Mayor de San Andrés. Bolivia. (2008)
28. A. Matsushika, H. Inoue, S. Sawayama, T. Kodaki y S. Sawayama. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol 84:37–53 (2009)
29. D.E. Zohre, H. Erten. The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation. Process Biochem 38: 319-324, (2002)
30. N. Moreira, C. Pina, F. Mendes, J.A. Couto, T. Hogg, I. Vasconcelos. Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. Food Control 22: 662-667 (2011).

31. A. Querola, M. T. Fernández-Espinara, M. Olmos, E. Barrio. Adaptive evolution of wine yeast. *Int J Food Microbiol* 86:3–10 (2003).
32. M. Ciani, L. Beco, F. Comitini. Fermentation behavior and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *Int J Food Microbiol* 108:239–245 (2006).
33. Naumova I. Masneuf, E. S. Naumovaa, M. Aiglec, D. Dubourdieu Association of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* with some French wines: genetic analysis of yeast populations *Res. Microbiol.* 151:683–691 (2000)
34. P. R. Lee, Y. L. Ong, B. Yub, P. Curran, S. Q. Liu. Profile of volatile compounds during papaya juice fermentation by a mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Williopsis saturnus* *Food Microbiol* 27:853-861 (2010).
35. E. Jiménez-Martí, A. Zuzuarregui, I. Ridaura, N. Lozano, M. del Olmo. Genetic manipulation of HSP26 and YHR087W stress genes may improve fermentative behavior in wine yeasts under vinification conditions. *Int J Food Microbiol* 130:122–130 (2009)
36. C. Oumar Kangama y X. Rumei. Introduction of sorghum (*Sorghum bicolor*) into China. *Afr J Biotechnol* 4(7):575-579 (2005)
37. M.J.Negro. M. L. Solano. J. Carrasco. P.Ciria. Cultivo de Sorgo Dulce. Efecto de la Aplicación de Composteo. Departamento de Energías Renovables. España (1998) 29 pag.
38. U.D. Chavan, J.V. Patil, M, S, Shinde. An assessment of sweet sorghum cultivars for ethanol production. *Sugar Tech* 11(4): 319-323 (2009)
39. <http://www.fao.org/ag/esp/revista/0202sp2.htm>
40. www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669011001282
41. <http://www.inifap.gob.mx/potencialproductivo/sorgo.html>
42. Leandro O. Abdelhadi. A. Chessa, R. Garay. B. Maunder. F.J. Santini. Sorgo. *Agromercado* 71:1-31 (2002)

43. M. Alvarez., E Perez.,Carrillo., S Saldivar. Effect of decortication and protease treatment on the kinetics of liquefaction, saccharification, and ethanol production from sorghum.: *J Chem Technol Biotechnol* DOI 10.1002/jctb.2408 (2010)
44. W. Bell, Caraballo. Utilización de Sorgo Dulce (*Sorghum saccharatum*) Como Forraje Diferido en la Alimentación de Cerdas Gestantes. Tesis. Universidad de la Republica. Uruguay. 2010.
45. M. DuBois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, Fred. Smith, Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Anal. Chem.*, 28(3): 350–356, (1956)
46. Williams, M. B. and R, Darwin, Colorimetric determination of ethyl alcohol, *Anal. Chem.*, 22:1556-1561, (1950).
47. C. Ganesh • F. Afroze • P. Srinivasa Rao • V..Belum S. Reddy • A. Rathore • . R Nageswar Rao • S. Khalid • A. Ashok Kumar •A. Kamal. Characterization of Improved Sweet Sorghum Genotypes for Biochemical Parameters, Sugar Yield and Its Attributes at Different Phenological Stages. *Sugar Tech* 12(3–4):322–328 (2011)
48. A. Almodares, M. R. Hadi and H. Ahmadpour Sorghum stem yield and soluble carbohydrates under different salinity levels. *Afr J Biotechnol* 7(22):4051-4055 (2008)
49. Ma. C. Delgado. Zonificación Agroecológica del estado de Yucatán con Base en Indices Agroclimáticos y Calidad Agrícola del agua Subterránea. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México (2010)
50. M. Sakellariou Makrantonaki, D. Papalexis, N. Nakos, I.K. Kalavrouziotis. Effect of Modern Irrigation Methods on Growth and Energy Production of Sweet Sorghum (var. Keller) on a dry year in Central Greece. *Agr Water Manage* 90:181–189 (2007)
51. E. Solórzano-Vega. Compendio de guías fenológicas. Temas didácticos No. 8. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, Edo. de México, 162 p (2001)

52. I. Vasilakoglou, K. Dhimab, N. Karagiannidis, T. Gatsis. Sweet sorghum productivity for biofuels under increased soil salinity and reduced irrigation. *Field Crop Res* 120:38-46 (2011)
53. L. Laopaiboon, P. Thanonkeo, P. Jaisil, P. Laopaiboon. Ethanol production from sweet sorghum juice in batch and fed-batch fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microbiol Biotechnol* 23:1497–1501(2007).
54. S. Krishnaveni, Theymoli Balasubramanian, S. Sadasivam. Sugar Distribution in Sweet Stalk Sorghum. *Food Chem* 15. 229-232(1984)
55. P. Ariyajarearnwong., L. Laopaiboon., P. Jaisil., P. Laopaiboon. Repeated-batch ethanol fermentation from sweet sorghum juice by free cells of *Saccharomyces cerevisiae* NP 01. *Afr J Biotechnol* Vol. 10(63), pp. 13909-13918, (2011)
56. S. Nuanpeng L. Laopaiboon., P. Srinophakun., P. Klanrit., P Jaisil., P Laopaiboon. Ethanol production from sweet sorghum juice under very high gravity conditions: Batch, repeated-batch and scale up fermentation. *Electron J Biotechnol* ISSN:0717-3458 (2011)
57. O Phowchinda., D.-Dupuy., M.L., P Strehaiano. Alcoholic Fermentation from Sweet Sorghum: Some Operating Problems. *Laboratoire de Genie Chimique, UMR-CNRS 5503 ENSIGC-INP* (1977)
58. T Imam, S Capareda. Ethanol Fermentation from Sweet Sorghum Juice. *ASABE Annual International Meeting*. Pittsburgh, USA. (2010)
59. F. Shen, R. Liu, T. Wang. Effects of Temperature, pH, Agitation and Particles Stuffing Rate on Fermentation of Sorghum Stalk Juice to Ethanol. *Taylor & Francis* 31:8, 646-656 (2011)
60. X. Wua, S. Staggenborg, J. L. Prohether, W. L. Rooney, J. Yub, D. Wang. Features of sweet sorghum juice and their performance in ethanol fermentation. *Ind Crop Prod* 31:164–170 (2010).

61. F.J. Dávila,-Gómez, C. Chuck-Hernández, E. Pérez-Carrillo, W.L. Rooney, S.O. Serna-Saldívar. Evaluation of bioethanol production from five different varieties of sweet and forage sorghums (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Ind Crop Prod* 33:611–616 (2011)
62. C. S. Wortmann, A. J. Liska, R. B. Ferguson, D. J. Lyon, R. N. Klein, and I. Dweikat. Dry land Performance of Sweet Sorghum and Grain Crops for Biofuel in Nebraska. *Agron J* 102:319-326 (2010)

ANEXO A

TECNICAS ANALITICAS

METODO DE AZUCARES TOTALES

Reactivos:

- Ácido sulfúrico concentrado 97.5%
- Fenol al 5%

Procedimiento.

A 1 mL de la disolución problema se adiciona 1 mL de la disolución de fenol al 5%, enseguida se agregan 5 mL de ácido sulfúrico concentrado en forma brusca, para homogenizar bien la muestra y que la hidrólisis sea más uniforme.

Se deja enfriar por 10 minutos, se agita y se coloca en un baño de agua fría durante 10 minutos. Se lee en el espectrofotómetro a 490nm.

Curva de Calibración.

Se utiliza una disolución patrón de sacarosa de $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para preparar una curva de calibración con un rango de concentración de 0.01 a $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS POR HPLC

Se utilizó un equipo HPLC Perkin Elmer modelo Flexar con un detector de índice de refracción, una columna de carbohidratos marca Agilent: ZORBAX Carbohydrate de tamaño 4.6×150 -mm.

Las condiciones de inyección fueron las siguientes:

- ❖ Fase móvil 80% acetonitrilo y 20% de agua
- ❖ Velocidad de flujo 1.4 mL/min
- ❖ Inyección 20 μ L, temperatura de 23°C

Se usaron disoluciones de las muestras de jugo de sorgo dulce con agua/acetonitrilo en proporción 50:50. Cada muestra se sonicó y centrifugó por 10 min. Luego se filtraron con filtros de 0.2 μ m y se inyectaron al equipo.

Se realizó una curva de calibración con disoluciones estándares de glucosa, fructosa y sacarosa en concentraciones de 11.9, 9.94, 7.98 y 5.88 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

METODO DE DICROMATO DE POTASIO

Reactivos:

- Dicromato de Potasio 33.76 gL^{-1}
- Ácido Sulfúrico 325 mL

Preparación de la disolución:

Se diluye el ácido sulfúrico en aproximadamente 400 mL de agua destilada, se deja enfriar y se agrega el dicromato diluido en aproximadamente 200 mL de agua destilada, por último se afora a un litro con agua destilada.

Procedimiento.

A 1 mL de la muestra se agrega 2 mL de la disolución de dicromato de potasio y se agita, se deja reposar durante 10 minutos y posteriormente se agregan 5 mL de agua destilada para finalmente agitar y leer en el espectrofotómetro a 585 nm.

Curva de Calibración.

Se utiliza una disolución patrón de etanol de $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. El rango de concentración para preparar la curva es de 2 a $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

ANEXO B

ANÁLISIS ESTADÍSTICO CON EL PROGRAMA SAS SYSTEM V 8.1

Se analizaron las 4 variedades de sorgo dulce de acuerdo a cinco variables (peso de tallo, volumen de jugo, concentración de sólidos solubles, concentración de azúcares totales y Gramos de azúcares por tallo).

A continuación se muestran las tablas de los análisis de varianza de los últimos cortes realizados a los 120 días en los 2 lotes de siembra.

Tabla 5. Datos de los análisis estadísticos del lote Santa Cruz.

Variedad	Peso de tallo (kg)	Vol. Jugo (mL)	Conc. sólidos solubles (°Brix)	Azúcares. Totales (g·L⁻¹)	Azúcares totales por tallo (g)
Keller	0.8 (A)	453.3 (A)	11.7 (A)	52.2 (A)	23.0 (A)
M81E	0.8 (A)	491.6 (A)	13.5 (A)	53.9 (A)	27.3 (A)
SD61	0.8 (A)	440.4 (A)	12.0 (A)	46.2 (A)	20.1 (A)
SD62	0.8 (A)	375.8 (A)	14 (A)	59.3 (A)	22.2 (A)

De la tabla anterior, se puede observar que no hay diferencia significativa entre las unidades experimentales en ninguno de los 5 variables que se evaluaron.

Tabla 6. Datos de los análisis estadísticos del lote Gavilanes.

Variedad	Peso de tallo (kg)	Vol. Jugo (mL)	Conc. sólidos solubles (°Brix)	Azúcares. Totales (g·L⁻¹)	Azúcares. Totales. por tallo (g)
Keller	0.9 (B)	59 (A)	19.6(A)	87.4 (A)	51.0 (A)
M81E	1.0 (B)	525.4 (A)	13.6 (B)	75.2 (A)	39.4 (A)
SD61	1.2 (AB)	544.6 (A)	14.6 (B)	77.3 (A)	41.6 (A)
SD62	1.4 (A)	661.6 (A)	15.9 (AB)	82.1 (A)	54.0 (A)

Para el caso del lote Gavilanes, el análisis estadístico muestra que se encontraron diferencias entre las variedades.

Tabla 7. Datos de los análisis estadísticos entre lotes (Santa Cruz y Gavilanes)

Lote	Peso de tallo (kg)	Vol. jugo (mL)	Sólidos solubles (°Brix)	Azúcares totales (g·L⁻¹)	Azúcares totales por tallo (g)
Santa Cruz	0.87 (B)	440.31 (B)	12.83(B)	52.94 (B)	23.19(B)
Gavilanes	1.2 (A)	580.46 (A)	15.60 (A)	79.88 (A)	46.14(A)