

**EVALUACIÓN A ESCALA DE LABORATORIO DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE  
BIOETANOL A PARTIR DE SORGO DULCE**

**SANDRA MARITZA CEPEDA QUINTANA  
DANIEL RICARDO JARAMILLO AMADOR**



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍA FÍSICOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2009**

**EVALUACIÓN A ESCALA DE LABORATORIO DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE  
BIOETANOL A PARTIR DE SORGO DULCE**

**SANDRA MARITZA CEPEDA QUINTANA  
DANIEL RICARDO JARAMILLO AMADOR**

**Trabajo De Grado  
Presentado como requisito parcial para optar al título de  
Ingeniero Químico**

**Director  
RAMIRO MARTÍNEZ REY  
Ingeniero Químico Ph. D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍA FISCOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2009**

## **AGRADECIMIENTOS**

- **A los Ingenieros Jaime Bernal, Rubi Rodríguez y Jorge Guzmán de CORPOICA.**
- **Al Doctor Ramiro Martínez Rey, director de este trabajo.**
- **Viviana Bayona, Microbióloga del CIMPA.**
- **Eduardo Carreño y Wilson Carreño, técnicos del laboratorio de operaciones unitarias y procesos. Alejandro Niño encargado del laboratorio de química.**
- **A nuestros padres y hermanos.**
- **Hernán y Familia Rincón Almeyda.**
- **Nicolás, Erwincito, Andrés, Chori, Williams, Carlitos, Gelber, Alejo y todos los demás amiguitos.**

*A Dios, siempre has sido y serás mi benefactor, mi guía y mi protector.  
A mis padres, gracias por brindarnos todos los días lo mejor de ustedes. Siempre serán  
mi ejemplo a seguir y mi orgullo. Los amo.  
A mi hermano, todo es más divertido contigo a mi lado. Te quiero mucho.  
A mi amorcito. Hernán eres mi fortaleza y un gran apoyo para mí. Te amo.  
Nicolás y Andrés, la amistad de ustedes es una de las grandes bendiciones que me dejó  
esta etapa.  
A Daniel, gracias por la paciencia y esfuerzo para lograr culminar este proyecto.  
A todos mis amiguitos, esta experiencia fue más alegre gracias a su compañía.*

*Sandra M. Cepeda Q.*

*A pa, ma y hermanito  
por su amor y apoyo incondicional.*

*Daniel Ricardo*

## TABLA DE CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1. CONCEPTOS TEÓRICOS</b>	<b>2</b>
<b>1.1 ETANOL</b>	2
<b>1.2 SORGO DULCE</b>	3
<b>1.3 AZÚCAR</b>	5
<b>1.4 LEVADURA</b>	5
<b>1.5 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA</b>	6
<b>1.6 PARÁMETROS Y CONDICIONES EN LA FERMENTACIÓN</b>	7
1.6.1 pH	7
1.6.2 Temperatura	7
1.6.3 Concentración de azúcar	7
1.6.4 Tolerancia a altas concentraciones de alcohol	8
1.6.5 Requerimientos de oxígeno	8
<b>1.7 VINAZAS</b>	8
<b>1.8 ANTECEDENTES DE LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE SORGO DULCE</b>	8
<b>2. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	<b>10</b>
<b>2.1 EXTRACCIÓN, FILTRACIÓN Y ESTERILIZACIÓN DEL JUGO DE SORGO DULCE</b>	11
<b>2.2 CULTIVO Y AISLAMIENTO DE LA CEPA DE LEVADURA NATIVA</b>	12
<b>2.3 FERMENTACIÓN</b>	13
<b>2.4 DESTILACIÓN</b>	15
<b>3. RESULTADOS Y ANÁLISIS</b>	<b>17</b>
<b>3.1 RESULTADOS DE EXTRACCIÓN DEL JUGO</b>	17
<b>3.2 RESULTADOS DE FERMENTACIÓN</b>	17
<b>3.3 CURVAS CINÉTICAS DE LOS ENSAYOS DE FERMENTACIÓN CON <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NATIVA</b>	20
<b>4. CONCLUSIONES</b>	<b>23</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>24</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>26</b>

## LISTA DE FIGURAS

	PAG
<b>Figura 1.</b> Cadena productiva de bioetanol	2
<b>Figura 2.</b> Diagrama de bloques del desarrollo experimental.	11
<b>Figura 3.</b> Molienda de los tallos	12
<b>Figura 4.</b> Inóculos de 100 ml.	13
<b>Figura 5.</b> Montaje de las fermentaciones anaerobias	14
<b>Figura 6.</b> Montaje de destilación.	16
<b>Figura 7.</b> %V/V de alcohol en el fermentado (500 ml)	19
<b>Figura 8.</b> Curva cinética de ensayos 1 a 4, concentración inicial 18 grados RIX con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nativa.	21
<b>Figura 9.</b> Curvas cinéticas de ensayos 5 a 8, concentración inicial 25 grados BRIX con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nativa.	21
<b>Figura 10.</b> Curva de crecimiento para la especie <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nativa.	22
<b>Figura 11.</b> Forma de la siembra en la caja petri.	27
<b>Figura 12.</b> Contaminación por diatreas.	30

## LISTA DE TABLAS

	PAG
<b>Tabla 1.</b> Propiedades Bromatológicas del tallo del Sorgo Dulce	4
<b>Tabla 2.</b> Sorgo Dulce frente a la Caña de Azúcar.	4
<b>Tabla 3.</b> Análisis de azúcares del Jugo de Sorgo Dulce mediante el método de análisis volumétrico	10
<b>Tabla 4.</b> Valores iniciales de las variables del proceso de fermentación	14
<b>Tabla 5.</b> Combinaciones de los ocho ensayos trabajados	15
<b>Tabla 6.</b> Condiciones iniciales para los ensayos 9,10 y 11 a $T_i = 27^\circ\text{C}$ y $\text{pH}_i = 4.5$	15
<b>Tabla 7.</b> Condiciones iniciales para los ensayos 12 y 13 a $T_i = 27^\circ\text{C}$ y $\text{pH}_i = 4.5$	16
<b>Tabla 8.</b> Resultados de la fermentación	17
<b>Tabla 9.</b> Datos de la curva de crecimiento de la levadura nativa	29

## LISTA DE ANEXOS

	PAG
<b>ANEXO 1</b>	
Preparación agar YGC	26
Método para realizar los repiques	26
Curva de crecimiento	27
<b>ANEXO 2</b>	
Diarrea	30

## RESUMEN

**TITULO:** EVALUACION A ESCALA DE LABORATORIO DEL PROCESO DE OBTENCION DE BIOETANOL A PARTIR DE SORGO DULCE.\*

**AUTOR:** CEPEDA QUINTANA, Sandra Maritza.  
JARAMILLO AMADOR, Daniel Ricardo.\*\*

**PALABRAS CLAVES:** Sorgo dulce – Fermentación alcohólica – *Saccharomyces cerevisiae* – vinazas – etanol

Se realizó una fermentación anaerobia de los jugos de sorgo dulce con una cepa nativa de *Saccharomyces cerevisiae* aislada de jugos azucarados. Esta cepa fue cultivada en jugos azucarados, aislada en cajas petri con agar YGC, identificada en un laboratorio microbiológico y después se realizó una fermentación del jugo de sorgo dulce con esta levadura para determinar su velocidad de crecimiento. Posteriormente se utilizó destilación simple para separar el alcohol producido en la fermentación, de esta etapa resultó alcohol diluido y vinazas. Se observó que se trabaja mejor las fermentaciones de jugos de sorgo dulce iniciando el proceso con pH de 5 y concentración inicial de sustrato de 25 grados BRIX, aunque esta concentración afecta la eficiencia y productividad del proceso. Los rendimientos que se obtuvieron para la obtención de alcohol a partir de sorgo dulce fueron de 40 litros de etanol por tonelada de caña de sorgo hasta 50 litros de etanol por tonelada de caña de sorgo con eficiencias que no superaron el 60 %. De igual manera se verificó que es posible realizar fermentaciones de vinazas diluidas con jugo de sorgo dulce en concentraciones hasta un 15% v/v sin que se presente inhibición de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se presenta al sorgo dulce como una materia prima alternativa la cual apoya la demanda de recursos para la producción de bioetanol.

---

\* Proyecto de Grado.

\*\* Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Ramiro Martínez Rey.

## SUMMARY

**TITLE:** EVALUATION SCALE OF LABORATORY OF THE PROCESS OF OBTAINING BIOETHANOL FROM SWEET SORGHUM.

**AUTHOR:** CEPEDA QUINTANA, Sandra Maritza.  
JARAMILLO AMADOR, Daniel Ricardo.

**KEY WORDS:** Sweet sorghum - alcoholic Fermentation - *Saccharomyces cerevisiae*- vinazas - ethanol

It's was carried out an anaerobic fermentation of the juices of sweet sorghum with a native stump of *Saccharomyces cerevisiae* isolated of sugary juices. This stump was cultivated in sugary juices, isolated in boxes petri with agar YGC, identified in a laboratory microbiologic and later one carries out a fermentation of the juice of sweet sorghum with this yeast to determinate speed of growth. Later on simple distillation was used to separate the alcohol taken place in the fermentation, of this stage come out diluted alcohol and vinazas. It was observed that one works the fermentations of juices of sweet sorghum better beginning the process with pH of 5 and initial concentration of sustrato of 25 grades BRIX, although this concentration affects the efficiency and productivity of the process. The yields that were obtained for the obtaining of alcohol starting from sweet sorghum were of 40 liters of ethanol for ton of sorghum cane up to 50 liters of ethanol for ton of sorghum cane with efficiencies that didn't overcome 60%. In a same way it was verified that it is possible to carry out vinazas fermentations diluted with juice of sweet sorghum in concentrations until 15% v/v without inhibition of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is presented. It is presented to the sweet sorghum as a matter alternative it prevails which supports the demand of resources for the bioetanol production.

## INTRODUCCIÓN

El bioetanol se obtiene comúnmente a partir de un proceso de fermentación de azúcares provenientes de diferentes biomásas donde la materia prima por excelencia ha sido la caña de azúcar. Sin embargo también se utiliza el sorgo dulce, remolacha azucarera, el maíz y la yuca, entre otras.

Este trabajo consta de un capítulo donde se encuentran algunos conceptos básicos que fueron relevantes en la etapa de investigación. De igual forma, se describe el desarrollo de la metodología trabajada en el laboratorio donde se realizaron las pruebas pertinentes a este proyecto. Por último, se presentan los resultados, su respectivo análisis, conclusiones, referencias y anexos.

Con el propósito de obtener un mejor rendimiento en la fermentación se trabajó con una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* nativa cultivada en medio carbonado y aislada posteriormente. Para este proceso se tomaron diferentes medidas iniciales de tres variables: grados BRIX, pH y Temperatura, con el interés de observar los distintos comportamientos de los microorganismos ante estas condiciones y determinar las más adecuadas.

Además, de estos ensayos se realizaron dos pruebas en las cuales se trabajó el proceso de fermentación con la levadura ethanol red. Estas experimentaciones permiten ser usadas como testigo y brindan la oportunidad de comparar los rendimientos obtenidos en la fermentación con la cepa *Saccharomyces cerevisiae* nativa y los obtenidos en la fermentación con la levadura ethanol red.

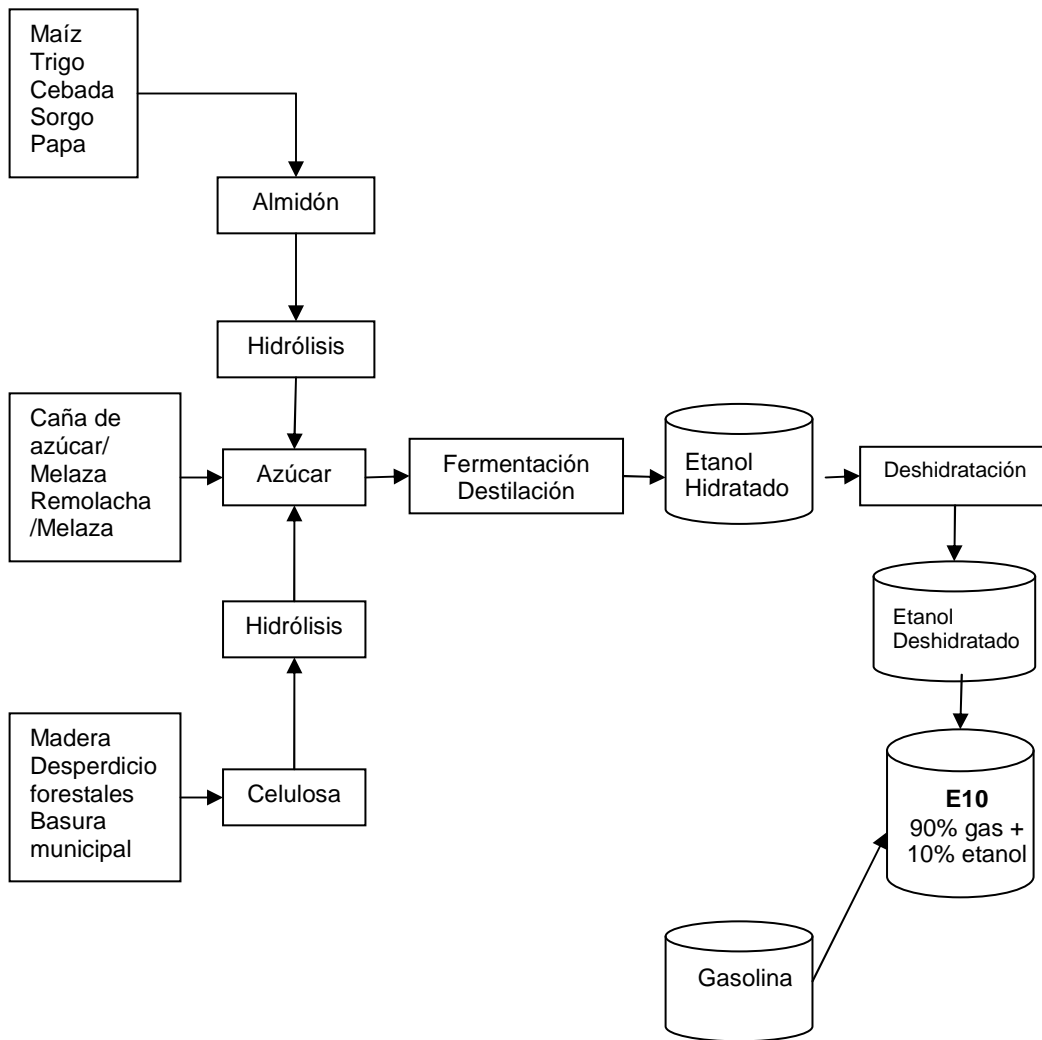
Después de la fermentación el proceso continúa con una destilación simple del fermentado para obtener el bioetanol producido en la reacción. En esta parte del proceso, además del destilado, se obtuvo un residuo o subproducto denominado vinazas. Con el fin de disminuir en parte este residuo se vislumbró la oportunidad de recircular parte de las vinazas obtenidas de la etapa de destilación a la etapa de fermentación. Estas pruebas se hicieron con el fin de observar si es posible realizar la fermentación de los jugos con carga de vinazas de tal forma que los microorganismos no se inhiban.

Al final del proceso se obtuvo rendimientos para la obtención de bioetanol a partir de sorgo dulce de 40 a 50 litros de etanol por tonelada de caña de sorgo. También se constató que es posible realizar la fermentación del sustrato con contenido de vinazas recirculadas sin inhibición de la levadura. Todos los resultados sirven de soporte para postular al sorgo dulce como una alternativa energética renovable para el ecosistema y la sociedad.

# 1. CONCEPTOS TEÓRICOS

## 1.1. ETANOL

La cadena productiva del etanol carburante muestra que existe una gran variedad de materias primas cuyo procesamiento conduce al etanol. En la Figura 1 se dividen las distintas fuentes de materias primas para la producción del etanol en tres grandes grupos según el proceso que conduce a la obtención de los azúcares.



**Figura 1.** Cadena productiva de bioetanol.

**Fuente.** Cadena Agroindustrial – Etanol. ICCA.

En el primer grupo tenemos a los granos básicos: maíz, trigo, cebada, sorgo y otros productos agrícolas como papa y yuca. De estos productos se consigue el almidón que a partir de un proceso de hidrólisis se convierte en azúcares. En el segundo grupo tenemos a la caña de azúcar, el jugo de sorgo dulce y la remolacha que son transformadas en melaza y luego se inicia

el proceso para la obtención del etanol. En un tercer grupo se han clasificado la madera, los desechos municipales y los desperdicios forestales, a partir de los cuales se obtienen las celulosas que siguen un proceso de hidrólisis para convertirse en azúcar.

A partir de un proceso de fermentación y destilación de los azúcares se obtiene el etanol hidratado. Para llegar al etanol carburante se hace un proceso de deshidratación. Después de este proceso, el alcohol deshidratado está listo para ser mezclado con la gasolina, se puede hacer mezclas del 5% hasta 25% según las normas de uso de cada país (ICCA, 2004). Para Colombia la proporción de agua en el alcohol no debe superar el 0.7%, además el porcentaje de etanol en la mezcla con gasolina básica será del 10% (Minagricultura, 2006).

## **1.2 SORGO DULCE**

El sorgo dulce es un cultivo de crecimiento rápido en clima cálido (3 meses). Estas plantas se adaptan mejor al calor y suelos fértiles. En climas fríos y suelos muy húmedos se limita su crecimiento. La planta tolera sequía relativamente bien aunque en suelos fértiles y húmedos responde con un crecimiento más rápido. También tolera períodos cortos de inundación del terreno mejor que el maíz. El cultivo parará el crecimiento en ausencia del agua adecuada pero no se marchitará; comenzará a crecer otra vez cuando mejoren las condiciones (De la Cruz, 2007).

En Colombia este cultivo lleva aproximadamente dos años y medio. En un principio se cultivó en el departamento del Meta en la sede La Libertad de CORPOICA. Allí se han hecho estudios básicos sobre su cultivo, las condiciones de crecimiento y desarrollo, el comportamiento de esta especie ante las condiciones ambientales del sitio y se han realizado extracciones del tallo para obtener jugo y así medir los sólidos solubles (grados BRIX) contenidos en el mismo. Posteriormente fue cultivado en El Espinal - Tolima en la sede de Nataima; también de CORPOICA, donde se realizaron estudios similares y estudios básicos sobre obtención de etanol a partir de esta especie.

Gracias al interés que despierta este cultivo en el país hace aproximadamente un año se cultiva sorgo dulce en el departamento de Córdoba, en el Centro de Investigación de Turipaná de CORPOICA, donde se tiene como objetivo generar variedades mejoradas de sorgo dulce y tecnologías de manejo agronómico para la producción de bioetanol en el Valle del Sinú, Valle Cálido del Magdalena y Piedemonte Llanero. Con estos estudios se pretende apoyar la descentralización de la producción del etanol anhidro ya que este se produce en su gran mayoría en el Valle del Cauca, sin entrar a competir con los ingenios que ya están establecidos sino lograr

que sea un complemento como materia prima en las épocas en las cuales no se cosecha la caña de azúcar. En la tabla 1 se encuentra un análisis bromatológico del sorgo dulce.

COMPONENTES	TALLO SORGO DULCE (%)
Humedad	66.2
Grasa	0.4
Fibra Cruda	11.8
Proteína	0.9
Ceniza	1.1
Carbohidratos	19.6
Kilocalorías En 100 g	85

**Tabla 1.** Propiedades Bromatológicas del tallo del Sorgo Dulce.

**Fuente.** CRUZ BARRERA, Mauricio. 2007.

En la tabla 2 se comparan algunos parámetros (ciclo de cosecha, requerimiento de agua, azúcar fermentable en el tallo, productividad de alcohol por ciclo, entre otros) para la caña de azúcar y el sorgo dulce.

PARÁMETRO	CAÑA DE AZÚCAR	SORGO DULCE
Tipo de siembra	Por plantilla	Por semilla
Ciclo de cosecha	De 10 a 12 meses	3 meses
Requerimiento de agua	100%	35 a 45%
Requerimiento de fertilizante	100%	35 a 40%
Azúcar fermentable en el tallo %	11 a 13	9 a 11
Bagazo	Con 50% de humedad, 30% en caña de 7.8 a 9.6 t	Con 50% de humedad, 25% en tallo de 5 a 7 t
Follaje verde	No disponible en caña	Con 2 ciclos por año se pueden alcanzar de 8.4 a 11,15% en biomasa
Productividad de alcohol por ciclo	1500 a 2300 litros	800 a 1300 litros con 2 ciclos al año de 1600 a 2600 litros
Superficie de tierra	Puede ser cultivada una vez al año	Se puede cultivar varias veces al año

**Tabla 2.** Sorgo Dulce frente a la Caña de Azúcar.

**Fuente.** Ethanol production from sweet Sorghum PRAJ industries, oct, 2003

### 1.3 AZÚCAR

Este término se aplica a compuestos químicos del grupo de los hidratos de carbono que se disuelven en agua con facilidad; son incoloros, inodoros y normalmente cristalizables, todos tienen un sabor dulce. Estos compuestos abarcan sustancias muy conocidas y al mismo tiempo diferentes: azúcar común, papel, madera, algodón, son carbohidratos o están presentes en ellos en gran proporción. Estos a su vez se clasifican en monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Un monosacárido es una unidad que no se subdivide más por hidrólisis ácida o enzimática, por ejemplo, glucosa, fructosa o galactosa. Los oligosacáridos están constituidos de dos a diez unidades de monosacáridos (sacarosa). Los polisacáridos son macromoléculas que contienen una gran cantidad de monosacáridos unidos formando cadenas y que por hidrólisis pueden ser separados (almidón). Aquellos azúcares que poseen su grupo carbonilo intacto y que a través del mismo pueden reaccionar con otras especies son llamados azúcares reductores totales (Fajardo, 2007).

### 1.4 LEVADURA

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es uno de los microorganismos eucarióticos más estudiados ya que su uso a nivel industrial es muy variado, no sólo a nivel de producción de etanol y CO<sub>2</sub> sino de otros compuestos volátiles y no volátiles. Pertenece al reino Fungi y es de tipo unicelular, es una levadura facultativa, es decir, su componente enzimático y rutas metabólicas utilizadas le permiten habitar tanto en ambientes aerobios como anaerobios (Calderón, 2007).

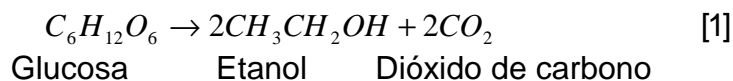
Para el desarrollo de este trabajo es necesario contar con un microorganismo que sea capaz de metabolizar el jugo de sorgo dulce, en especial, porque su contenido de azúcares reductores es mayor al contenido que poseen los jugos de caña de azúcar (99% de sacarosa y 1% de glucosa, aproximadamente). Los contenidos de glucosa y fructosa en el jugo de sorgo son alrededor de 8.5%, por esta razón, es de especial cuidado lograr que el microorganismo fermentador se acostumbre a estos jugos ya que los existentes están acostumbrados a metabolizar en medios con bajos contenidos de monosacáridos (jugos de caña de azúcar). Es conocido que las levaduras asimilan las moléculas de glucosa, esto da inicio para suponer que los jugos de sorgo dulce son un buen sustrato para esta especie. Otros motivos que condicionan la escogencia de un organismo fermentador adecuado son: velocidades de crecimiento y de producción de etanol

elevado, máxima eficiencia en la conversión del jugo y mayor tolerancia a altas concentraciones de alcohol (Fajardo, 2007).

## 1.5 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

Podemos definir la fermentación alcohólica como un proceso biológico en el cual un azúcar fermentable es transformado en etanol mediante la intervención de ciertos microbios llamados levaduras o productos enzimáticos elaborados por estas.

El microorganismo más usado es la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que convierte las hexosas en etanol en condiciones anaeróbicas, generando 2 moles de adenosín trifosfato (ATP) por cada mol de hexosa consumida además de 2 moles de etanol. Este microorganismo también tiene la capacidad de convertir las hexosas en CO<sub>2</sub>. Esta conversión se da en medio aeróbico y según la dependencia de concentraciones de O<sub>2</sub> en el medio de cultivo y la fuente de carbono se puede favorecer o desfavorecer uno de los dos procesos (Garassini, 1967). Este proceso se sintetiza en la reacción [1]:



En la cual una molécula de glucosa se transforma en dos moléculas de alcohol y dos de dióxido de carbono con producción de 28 calorías, lo cual demuestra, según el balance de esta ecuación, que la descomposición de la glucosa da 50% de alcohol y 50% de gas carbónico, aproximadamente (Garassini, 1967). Esta fermentación [1] se produce en ausencia de aire, es decir, en medio anaeróbico.

En 1905 se demostró que la fermentación alcohólica se produce en presencia de sales fosfatadas y compuestos nitrogenados; sin la presencia de estas, la fermentación no es posible (Garassini, 1967). De igual forma, se sabe que las condiciones recomendadas para la fermentación de mostos azucarados, ejemplo los jugos de caña de azúcar, son las siguientes: Concentración de sustrato (grados BRIX) al inicio de la fermentación: 15-25% (p/v). El pH se ajusta a un valor de 4-5 adicionando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, las levaduras se desarrollan en medios ácidos (Garassini, 1967). El proceso se lleva a cabo a 30-35 °C.

## 1.6 PARÁMETROS Y CONDICIONES EN LA FERMENTACIÓN

Los principales parámetros a controlar en una fermentación alcohólica son en esencia pH, temperatura, concentración de azúcar, tolerancia a concentraciones de alcohol producido y constituyentes del medio de cultivo, así como durante la propagación es esencial la inyección de aire que permita el crecimiento del microorganismo fermentador (Calderón, 2007).

### 1.6.1 pH

Estudios realizados encontraron que la máxima producción de alcohol se obtiene a pH 4.25 y la menor a pH 3.7, probablemente porque este último es demasiado bajo para lograr una activación eficiente de las enzimas necesarias para la fermentación y el intercambio iónico al interior de la célula sufre un descontrol tal que esta concentra su energía en regular su sistema y no en fermentar el azúcar presente en el sustrato (Calderón, 2007). Así mismo, la inversión de la sacarosa a sus componentes monoméricos presente en el sustrato, aumenta a medida que el pH disminuye incidiendo en el tiempo de fermentación. De igual forma pH cercanos al neutro facilitan el desarrollo de flora microbiana contaminante del proceso y por ende la formación de subproductos indeseables (Calderón, 2007).

### 1.6.2 Temperatura

La fermentación alcohólica incrementa cuando la temperatura se encuentra en un rango de 30 – 35 °C con una óptima de 32 °C, dependiendo de la cepa de levadura utilizada. El metabolismo aumenta su actividad paralelamente al aumento de la temperatura pero puede llegar a inhibir la levadura (a >37 °C). El incremento de temperatura amplifica la probabilidad de desarrollo de microorganismos contaminantes que perjudican la fermentación (Calderón, 2007).

### 1.6.3 Concentración de azúcar

Pramanik en el año 2003 obtuvo en una fermentación por lotes usando una cepa de *Saccharomyces* aislada de un sustrato azucarado que la concentración de etanol se incrementa cuando se eleva la concentración de sustrato pero dicho aumento repercute en el tiempo que toma la fermentación afectando la productividad; demostrando así que la concentración de sustrato, la producción de alcohol y el tiempo de fermentación son directamente proporcionales y dependen de los requerimientos y capacidad de la industria (Calderón, 2007).

#### **1.6.4 Tolerancia a altas concentraciones de alcohol**

En cuanto al efecto inhibitorio del etanol la mayoría de cepas utilizadas para dicho proceso soportan en promedio 9.5% v/v de alcohol en el vino, sin embargo esta concentración a nivel de planta sólo se obtiene cuando el sustrato es puro, se suministran concentraciones de azúcar controladas, no existe contaminación bacteriana y el proceso está estandarizado, de manera que con sustratos de baja pureza difícilmente se alcanzan estas concentraciones de alcohol, adicional a esto las cepas comercialmente utilizadas son tolerantes, no tienden a sufrir estrés o inhibición por metabolito, en este caso por etanol (Calderón, 2007).

#### **1.6.5 Requerimientos de oxígeno**

El oxígeno como elemento es requerido por la levadura para la síntesis de esteroides y ácidos grasos insaturados, componentes esenciales de sus membranas celulares, que le permiten en algunos casos soportar factores de estrés como temperatura, concentraciones de alcohol, sales, ácidos, azúcares, etc. La *Saccharomyces cerevisiae* logra propagarse más eficientemente en condiciones aeróbicas. Cuando el medio se encuentra en ausencia de oxígeno y rico en niveles de glucosa se produce etanol. (Calderón, 2007).

### **1.7 VINAZAS**

La vinaza es un residuo industrial del proceso de destilación alcohólica, se producen en una proporción de 12 a 15 litros por cada litro de alcohol destilado. Debido a su alto contenido de materia orgánica, este residuo presenta una elevada Demanda Química de Oxígeno (DQO), además posee un pH muy bajo (4 – 4,5) y una temperatura muy elevada (80 – 95 °C), lo que la convierte en un agente muy contaminante del medio ambiente, que si es descargado directamente a cuerpos de agua causaría una alteración irreversible de los ecosistemas acuáticos (Cobos y Ortiz, 2007).

### **1.8 ANTECEDENTES DE LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE SORGO DULCE**

En el Instituto de la investigación agrícola (NARI) en la India se abrió el trabajo de estudio de sorgo dulce (tallo) en Maharashtra, India a mediados de 1970, por lo que en este lugar se tiene un alto conocimiento sobre la especie y sobre la utilización de esta para la producción de etanol (Rajvanshi, 1989). En China se han realizado estudios sobre los cultivos de sorgo dulce en

aquellos suelos que son desfavorables y poseen poca cantidad de agua para el cultivo de caña de azúcar en 20 provincias de los valles de los ríos amarillo y yangtzé (FAO, 2002). En Latinoamérica el sorgo esta siendo estudiado en países como Brasil, Nicaragua, Uruguay entre otros. En Argentina en la Universidad Nacional del Nordeste Argentina se ha estudiado la sacarificación y fermentación en lo que respecta el microorganismo a utilizar y el sistema mas adecuado para este proceso, todo a nivel de laboratorio. (Fernández, 2005).

En agosto del 2007 en la Universidad Nacional de Colombia se realizó un trabajo de grado titulado "La caracterización del sorgo dulce (*Sorghum Bicolor*) para la producción de alcohol etílico". Se trabajaron aspectos tales como: Caracterización del jugo de sorgo dulce de varias especies cultivadas en la sede La Libertad de CORPOICA, caracterización preliminar desde la etapa de floración, pesaje de planta, porcentaje peso de hojas, tallos, panojas, longitud y diámetro de tallos entre otros. También realizaron estudios preliminares de fermentación sumergida. (Cruz, 2007). En el año 2008 se realizo una caracterización de varias especies de sorgo dulce cultivadas en la sede Nataima de CORPOICA. En el trabajo se presenta un diseño de obtención de etanol a partir de sorgo dulce a nivel laboratorio y un análisis de costos de este proceso.

En este documento se planteó una serie de experimentos donde se fermentó el jugo de sorgo dulce con una levadura nativa (*Saccharomyces cerevisiae*) aislada de un medio azucarado y una levadura híper productora de etanol (ethanol red) como testigo para comparar los resultados obtenidos en la fermentación.

## 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Se trabajó un proceso cuya transformación de los jugos azucarados provenientes de los tallos de sorgo dulce sea efectiva, para esto se decidió trabajar sobre la fermentación de los mismos y sobre el microorganismo a utilizar para este fin.

Para conseguir las condiciones de operación en la fermentación que se acomoden a las exigencias del proceso, se trabajó con un diseño de experimentos, en el cual, se tenía tres variables, (grados BRIX, pH y Temperatura) para las cuales se manejaron dos medidas iniciales distintas para cada una y durante el proceso se llevó un seguimiento de la variable de grados BRIX para obtener datos que proporcionarían información acerca de la cinética del proceso.

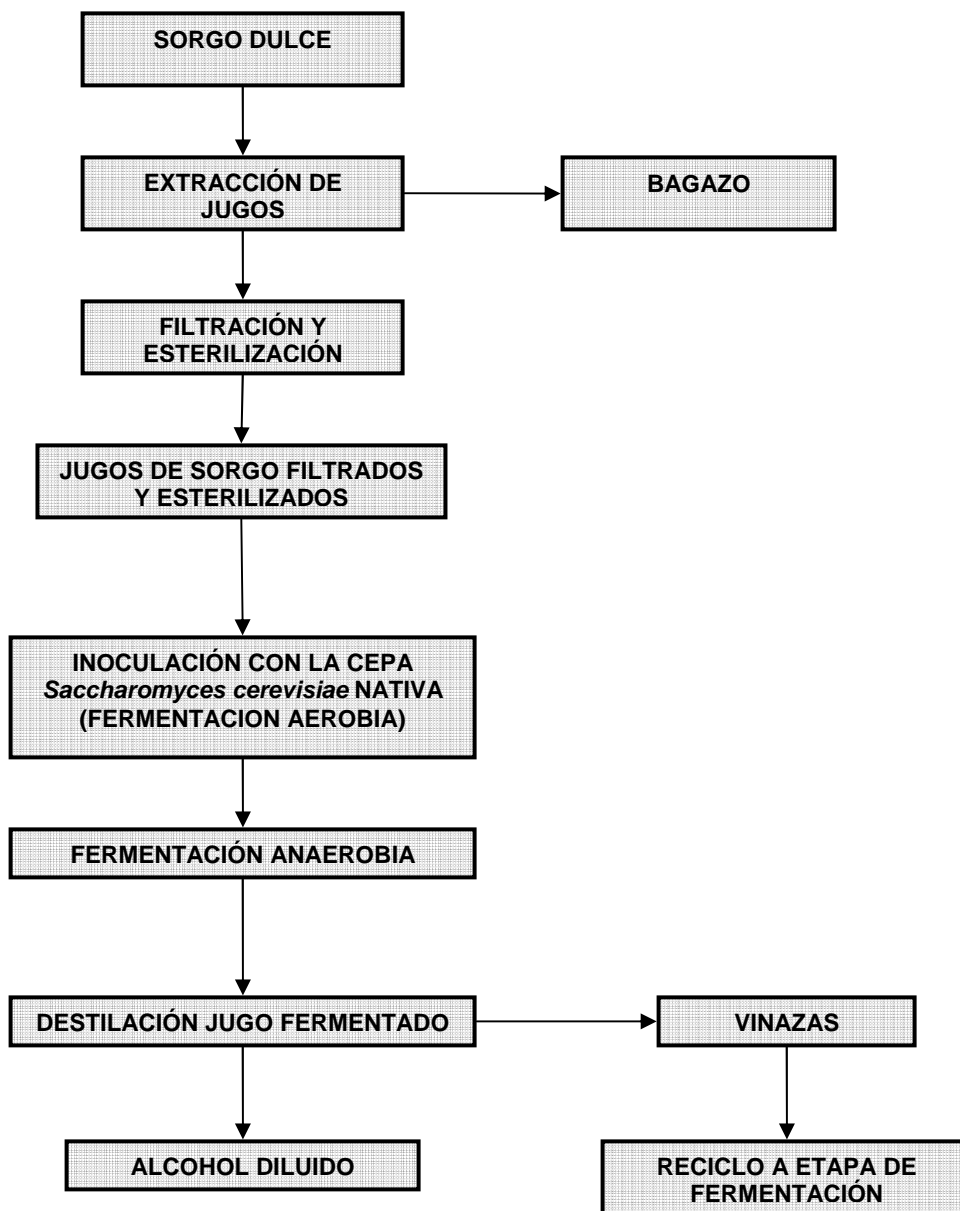
Un problema importante sobre el cual presentar alternativas de tratamiento son las vinazas obtenidas en la etapa de destilación, para esto se optó por recircular parte de las vinazas en una solución diluida con jugo de sorgo dulce. Se realizaron dos ensayos a distinta concentración de vinazas de tal forma que la concentración de este sustrato no inhibiera el microorganismo y se fermento la solución con la cepa de levadura *saccharomyces cerevisiae* nativa.

Es importante destacar que para partir de datos y generar resultados confiables fue necesario realizar una prueba para conocer el contenido de azúcares reductores totales (ART) en el jugo de sorgo dulce. Esta prueba fue realizada en el Laboratorio de Alimentos (CICTA), sede Guatiguará de la Universidad Industrial de Santander. Los resultados se muestran en la tabla 3.

PARÁMETROS	UNIDAD	RESULTADO MUESTRA
Azúcares Reductores	%	8.48
Azúcares Totales	%	17.09

**Tabla 3.** Análisis de azúcares del Jugo de Sorgo Dulce mediante el método de análisis volumétrico

El desarrollo experimental de este trabajo se realizó en el Laboratorio de Operaciones Unitarias y Procesos de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad Industrial de Santander. En la figura 2 se presenta un diagrama de bloques del proceso desarrollado en este proyecto:



**Figura 2.** Diagrama de bloques del desarrollo experimental.

## 2.1 EXTRACCIÓN, FILTRACIÓN Y ESTERILIZACIÓN DEL JUGO DE SORGO DULCE

Los tallos de sorgo dulce son generados en la sede Nataima en el Espinal-Tolima de CORPOICA. La extracción del jugo se hizo moliendo el tallo entre pesados rodillos o masas en un molino. El jugo recogido se midió en probetas, se midió la densidad con un densímetro y grados BRIX con un refractómetro. En la figura 3 se muestra el molino de masas marca BERSTORFF donde se realizó la extracción.



**Figura 3.** Molienda de los tallos.

Para determinar el porcentaje de extracción de este proceso se calcula el valor porcentual que resulta de dividir el peso del jugo extraído y el peso de los tallos molidos.

$$\frac{\text{masa jugo extraído}}{\text{masa tallos}} * 100 \quad [2]$$

**Fuente [2].** Manual de caña de azúcar para la producción de panela. CORPOICA.

La filtración se llevó a cabo al vacío para eliminar las impurezas del jugo. El equipo para la filtración consta de un erlenmeyer de 1000 ml, un embudo de filtración y una bomba de vacío de diafragma de 1 etapa. El medio filtrante fue una capa de algodón de aproximadamente 2 cm de grosor. Luego se elevó la temperatura del jugo extraído de los tallos de sorgo dulce hasta aproximadamente 80 °C, se almacenó y se enfrió rápidamente. Posteriormente fue guardado en el congelador para evitar la fermentación del jugo, hasta el momento de ser utilizado en el proceso. Esta etapa es de gran importancia debido a que evita la presencia de bacterias u hongos ajenos al proceso que puedan inhibir el crecimiento de las levaduras.

## **2.2 CULTIVO Y AISLAMIENTO DE LA CEPA DE LEVADURA NATIVA**

El cultivo de la cepa se hizo en un medio rico en sustancias carbonadas (azúcar), con suministro de aire (medio aerobio) y a temperatura ambiente. De esta forma se obtuvo la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* nativa y posteriormente se aisló a un cultivo puro en el laboratorio; para esto fue cultivada por medio de repique en cajas Petri cuyo medio de cultivo fue agar YGC. En el anexo 1 se encuentra el método para preparar el agar, repicar la cepa y la curva de crecimiento de la levadura.

## 2.3 FERMENTACIÓN

Para la fermentación del jugo se realizó con la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* nativa aislada. Antes de iniciar la fermentación se hizo un inóculo. Esta etapa se realizó con el objeto de lograr la propagación de la levadura en el medio y se debe realizar en condiciones aeróbicas. Para realizar esto se tomó en un tubo de ensayo una pequeña cantidad de jugo de sorgo filtrado y esterilizado y a temperatura ambiente (aproximadamente 10 ml de jugo de sorgo dulce). A este recipiente se le adicionó una pequeña cantidad de levadura *Saccharomyces cerevisiae* nativa tomada de la caja petri con ayuda de un asa curva y se dejó en medio aeróbico durante 24 horas. Pasado el tiempo necesario se traspasó este volumen a un erlenmeyer de 200 ml con jugo de sorgo dulce hasta completar 100 ml de solución. El inóculo estuvo durante 24 horas aproximadamente en medio aeróbico y suministrando aire con ayuda de una bomba de acuario marca Resun AC-2000 (110 V - 60 Hz – 5 W, presión: 0.014 MPa, capacidad: 3 L/min.), tal como se muestra en la figura 4.



**Figura 4.** Inóculos de 100 ml.

Luego de las 24 horas estos inóculos se pasaron a una mayor cantidad de jugo (500 ml), se le incorporaron los nutrientes pues se sabe que el medio a fermentar debe contener nitrógeno N, potasio K, azufre S y fósforo P. Para suministrar estos compuestos se adicionó nitrato de potasio ( $KNO_3$ ) y fosfato de amonio ( $(NH_4)_2PO_4$ ) en una concentración de 100 ppm y 150 ppm respectivamente. Se escogieron estas concentraciones basados en las relaciones usadas en la planta piloto de bioetanol de CORPOICA en Barbosa, Santander. De igual manera se adicionó ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) hasta obtener un pH entre 4 y 5. Por último se ajustaron las condiciones iniciales de grados BRIX y temperatura.

La fermentación anaerobia (500 ml) se llevó a cabo en un reactor por lotes, para lograr esto se adecuó un erlenmeyer de 1000 ml con tapón. En el tapón se hicieron dos orificios, uno para la manguera que se dirige a otro erlenmeyer que contiene agua destilada (trampa de agua). Este conducto permite la salida del dióxido de carbono  $CO_2$  producto de la reacción de fermentación, y

de igual forma evita el ingreso de aire al medio anaeróbico. El segundo orificio es para una manguera que posee una jeringa en uno de sus extremos y el otro extremo se encuentra dentro del erlenmeyer en contacto con el fermentado. Este conducto facilita la extracción de pequeñas muestras (aproximadamente 1 ml) para realizar el seguimiento de los grados BRIX durante la fermentación.

El erlenmeyer que contiene el fermentado se ubicó con ayuda de un soporte con pinza de nuez sobre una placa de agitación magnética (la placa de agitación magnética evita la sedimentación de las levaduras) a una distancia de aproximadamente 0.5 cm. Sobre la placa de agitación se colocó una lámina de asbesto la cual se usó como aislante para evitar el calentamiento del fermentado por convección entre la placa y el erlenmeyer. Este montaje se puede apreciar en la figura 5.



**Figura 5.** Montaje de las fermentaciones anaerobias.

En el laboratorio se trabajó teniendo en cuenta las condiciones teóricas y se realizaron distintos experimentos tomando distintas medidas iniciales para las variables (grados BRIX, pH y temperatura). Se tomaron dos valores iniciales distintos para cada variable y se combinaron estos parámetros resultando ocho ensayos en total. Para variar el nivel inicial de grados BRIX se concentró el jugo por medio de evaporación hasta alcanzar los 25 grados BRIX.

De igual forma se hizo seguimiento a la variable grados BRIX durante el proceso de fermentación en periodos de tiempo adecuados. Los intervalos de tiempo para la fermentación de los jugos de las ocho pruebas fue el mismo (24 horas). En la tabla 4 se presentan los niveles de las variables grados BRIX, pH y Temperatura:

ENSAYO	1	2
Grados BRIX	18	25
Temperatura inicial (°C)	27	35
pH	4	5

**Tabla 4.** Valores iniciales de las variables del proceso de fermentación

Realizando las combinaciones donde C representa la concentración de grados BRIX, T representa la temperatura y pH las variaciones de pH se obtiene un total de 8 ensayos. Estos se muestran en la tabla 5.

ENSAYO	C <sub>1</sub>	ENSAYO	C <sub>2</sub>
1	C <sub>1</sub> T <sub>1</sub> pH <sub>1</sub>	5	C <sub>2</sub> T <sub>1</sub> pH <sub>1</sub>
2	C <sub>1</sub> T <sub>2</sub> pH <sub>1</sub>	6	C <sub>2</sub> T <sub>2</sub> pH <sub>1</sub>
3	C <sub>1</sub> T <sub>1</sub> pH <sub>2</sub>	7	C <sub>2</sub> T <sub>1</sub> pH <sub>2</sub>
4	C <sub>1</sub> T <sub>2</sub> pH <sub>2</sub>	8	C <sub>2</sub> T <sub>2</sub> pH <sub>2</sub>

**Tabla 5.** Combinaciones de los ocho ensayos trabajados.

Para tener unos resultados con los cuales comparar los obtenidos al realizar el proceso con la cepa de levadura nativa se realizaron dos ensayos (9 y 10) de fermentación anaerobia utilizando la levadura ethanol red proporcionada por la Planta piloto de bioetanol, CIMPA sede de CORPOICA en Barbosa – Santander. Se trabajó con iguales condiciones iniciales de pH y Temperatura, mientras que para los grados BRIX se optó por dos medidas iniciales distintas y el tiempo de fermentación para estos dos ensayos fue de 24 horas. También se hizo un tercer ensayo con Ethanol red (11) pero durante mayor tiempo de fermentación (67 horas). El volumen fermentado para los 3 experimentos fue 500 ml. En la tabla 6 se observa las condiciones iniciales para los ensayos 9, 10 y 11:

ENSAYO	9	10	11
<b>Grados BRIX</b>	18	25	18
<b>Tiempo fermentación (h)</b>	24	24	67

**Tabla 6.** Condiciones iniciales para los ensayos 9,10 y 11 a T<sub>i</sub> = 27 °C y pH i = 4.5

## 2.4 DESTILACIÓN

Se realizó una destilación simple de los jugos fermentados con el fin de determinar de manera volumétrica la cantidad de alcohol producido. Se utilizó un equipo de destilación de laboratorio que contiene una manta de calentamiento, balón de fondo redondo de 1000 ml, condensador, termómetro de 150 °C, codos y erlenmeyer de 500 ml para recoger el destilado. Este montaje se aprecia en la figura 6. De este proceso se obtuvo alcohol diluido y vinazas. Se recogió un volumen de destilado que superará el 60% del volumen del fermentado para garantizar que todo

el alcohol presente en la solución fuera separado. Para conocer el porcentaje de alcohol en el destilado se utilizó un alcoholímetro y una probeta de 100 ml.



**Figura 6.** Montaje de destilación.

Se tomó una cantidad de vinazas para diluirlas con jugo de sorgo dulce hasta completar 500 ml y se realizaron dos ensayos de fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* nativa (12 y 13) a distintas concentraciones de vinazas, 10% v/v y 15% v/v respectivamente.

Para realizar estos ensayos (12 y 13) se procede de igual forma como se describe en la sección 2.3 variando las condiciones iniciales del medio a fermentar. Estas condiciones se muestran en la tabla 7:

ENSAYOS	12	13
% v/v Vinazas	10	15
Grados BRIX	21	21

**Tabla 7.** Condiciones iniciales para los ensayos 12 y 13 a  $T_i = 27^\circ\text{C}$  y  $\text{pH}_i = 4.5$

### 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

#### 3.1 RESULTADOS DE EXTRACCIÓN DEL JUGO

A partir de 20000 g de tallos se obtuvieron 5755.8 g de jugo en una sola molienda, por lo tanto el porcentaje de extracción fue 28.78%. Este porcentaje de extracción se obtuvo al realizar la molienda en un molino que no es el adecuado para este tipo de cañas. El porcentaje de extracción es bajo según el manual de caña de azúcar para la producción de panela de CORPOICA, ya que se considera un porcentaje de extracción satisfactorio en el intervalo entre 58% a 63% (CORPOICA, 1998). De igual manera el tiempo que pasó luego del corte de los tallos fue superior a 24 horas lo que puede ocasionar una reducción en la humedad y por consiguiente mayor dificultad en la extracción de los azúcares. También algunos tallos se encontraban contaminados de diatrea (anexo 2), lo que ocasionó reducción en azúcares del tallo.

#### 3.2 RESULTADOS DE FERMENTACIÓN

En la tabla 8 se observan los resultados obtenidos en los trece ensayos de fermentación.

Ensayo		Alcohol producido (ml)	Rendimiento (%)	Eficiencia (%)	Productividad*	
1	Saccharomyces cerevisiae nativa	18 grados BRIX	33.3	51.09	50	2.19
2			33.35	51.17	50.08	2.19
3			36.8	56.47	55.25	2.42
4			33.9	58.52	50.89	2.23
5		25 grados BRIX	32.6	40.04	34.47	2.14
6			48	49.89	50.75	3.16
7			41.04	61.60	43.39	2.69
8			42.38	63.62	44.81	2.79
9	Levadura ethanol red	46.2	63.79	69.36	3.04	
10		47.6	64.31	50.33	1.98	
11		48.75	56.10	73.19	1.15	
12	Vinazas 10% v/v	32.8	56.06	41.78	2.16	
13	Vinazas 15% v/v	35.4	68.80	44.87	2.33	

**Tabla 8.** Resultados de la fermentación.

\* Unidades: [masa de producto(g)/(volumen fermentado(L)\*Tiempo de fermentación(h))]

El rendimiento, la eficiencia y la productividad se determinaron a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Producto generado (g)}}{\text{Sustrato consumido (g)}} \times 100 \quad [3]$$

$$\text{Eficiencia} = \frac{\text{Alcohol producido (g)}}{\text{Alcohol teórico (g)}} \times 100 \quad [4]$$

El alcohol producido en gramos se obtuvo de la medición volumétrica del destilado y la densidad del alcohol. El alcohol teórico está determinado estequiométricamente a partir del sustrato (sacarosa) alimentado al proceso.

$$\text{Productividad} = \frac{\text{masa de alcohol producido (g)}}{\text{volumen total (L)} \times \text{tiempo fermentación (h)}} \quad [5]$$

**Fuente [3] [4] [5].** CALDERÓN PÉREZ. 2007. Pág. 71.

La eficiencia promedio de las fermentaciones 1 a 8 fue de 47.45%, donde los ensayos 5, 7 y 8 se encontraron por debajo de este promedio. La eficiencia se ve afectada ya que a mayor concentración de sustrato mayor es la pérdida del mismo, debido a que el porcentaje de conversión es independiente, en este caso, de la cantidad de azúcar presente.

En la tabla 8 se puede observar que el ensayo 6 fue el de mayor producción de alcohol (48 ml) utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* nativa, pero de igual manera su rendimiento fue uno de los más bajos debido a contaminación por oxígeno en el erlenmeyer al realizar la fermentación anaerobia. Posibles entradas de aire afectan el medio anaerobio y repercute en la formación de biomasa más que en la formación de bioetanol.

Los ensayos 9,10 y 11 se fermentaron con la levadura comercial ethanol red la cual es hiper productora de etanol, la producción de etanol para estos tres ensayos fue mayor que para la *Saccharomyces cerevisiae* nativa.

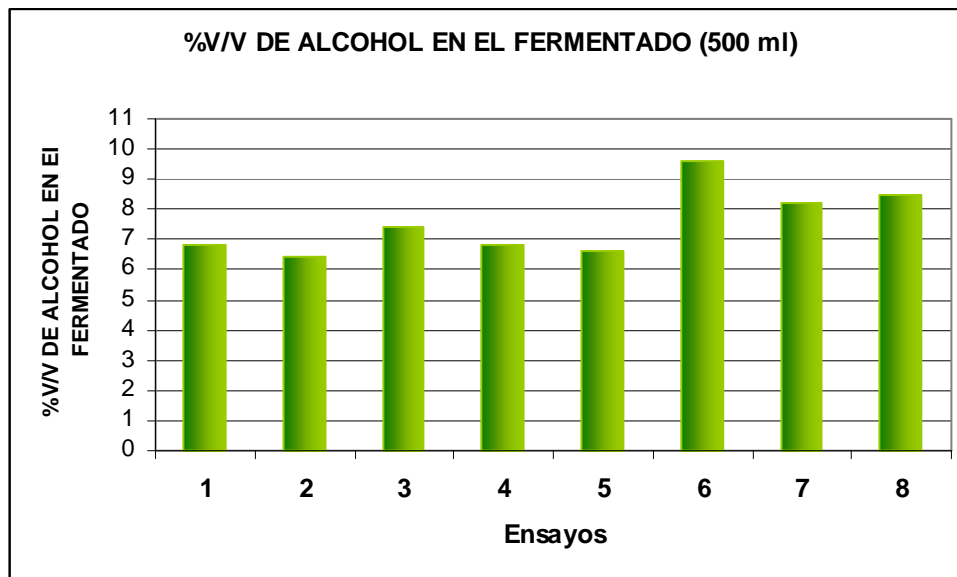
Según los resultados obtenidos las condiciones más adecuadas para fermentar los jugos de sorgo dulce a 18 grados BRIX con la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* nativa son las condiciones del ensayo 3, cuya eficiencia fue de 55.25%, 36.8 ml de alcohol producido y productividad de 2.42 Etanol producido (g)/ (litros de fermentado \* tiempo de fermentación en horas). Para los jugos a 25 grados BRIX la mejor condición son las del ensayo 6 cuya eficiencia fue 50.75% (a pesar que tuvo una contaminación por aire y su rendimiento fuera uno de los más bajos), 48 ml de alcohol producido y con una productividad 3.16 Etanol producido (g)/ (litros de fermentado \* tiempo de fermentación en horas), ésta productividad fue la más alta de los ocho ensayos.

Los resultados obtenidos tanto para las fermentaciones usando la cepa *Saccharomyces cerevisiae* nativa como para los que se usó la levadura ethanol red muestran que la concentración de etanol incrementa cuando se eleva la concentración de sustrato, pero dicho aumento repercute en el tiempo que toma la fermentación afectando la productividad, por lo tanto, estos tres son directamente proporcionales.

Las eficiencias con ethanol red fueron superiores con respecto a las fermentaciones realizadas con la cepa *Saccharomyces cerevisiae* nativa. El ensayo 11 presentó la mejor eficiencia, 73.19%, pero la menor productividad debido a que el tiempo de fermentación fue de 67 horas.

Si en la etapa de extracción de los jugos se obtuviera un porcentaje de extracción satisfactorio, por ejemplo del 58%, se alcanzarían valores cercanos a los 40.24 litros de etanol por tonelada de caña de sorgo realizando la fermentación con la cepa *Saccharomyces cerevisiae* nativa. De igual forma usando la levadura ethanol red los valores llegarían a los 50.75 litros de etanol por tonelada de caña de sorgo. Por tanto estos resultados son buenos pues la literatura reporta rendimientos de 40 litros de etanol por tonelada de caña de sorgo (Cruz, 2007).

En cuanto a la conversión se puede decir que de 500 ml de jugo de sorgo dulce se obtuvo en promedio un volumen de 37.67 ml de etanol, es decir, la conversión a etanol de jugo de sorgo dulce fue de un 7.5% del volumen inicial. La literatura reporta valores teóricos de 9% para el sorgo dulce lo cual indica que los resultados obtenidos en las fermentaciones realizadas son satisfactorios. En la figura 7 se reportan los porcentajes en volumen de alcohol en el fermentado obtenidos en la fermentación de los ocho primeros ensayos con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* nativa.



**Figura 7.** %V/V de alcohol en el fermentado (500 ml)

Comparando los rendimientos obtenidos para el sorgo dulce, 40 a 50 litros de etanol por tonelada de caña de sorgo, con los rendimientos reportados por las industrias que trabajan con caña de azúcar, 70 litros de etanol por tonelada de caña (Sánchez, 2005), se puede observar que los valores son buenos considerando que la eficiencia del proceso realizado en este trabajo no superó el 60% y se puede mejorar en próximas investigaciones, se vislumbra una excelente oportunidad de trabajar con el sorgo dulce como materia prima en la producción de etanol.

Por otra parte los ensayos con jugo de sorgo y vinazas (12 y 13) presentaron una buena fermentación sin inhibición de la levadura. Se evidenció que a medida que aumenta la concentración de vinazas en el medio a fermentar el porcentaje de conversión por parte de la levadura disminuye.

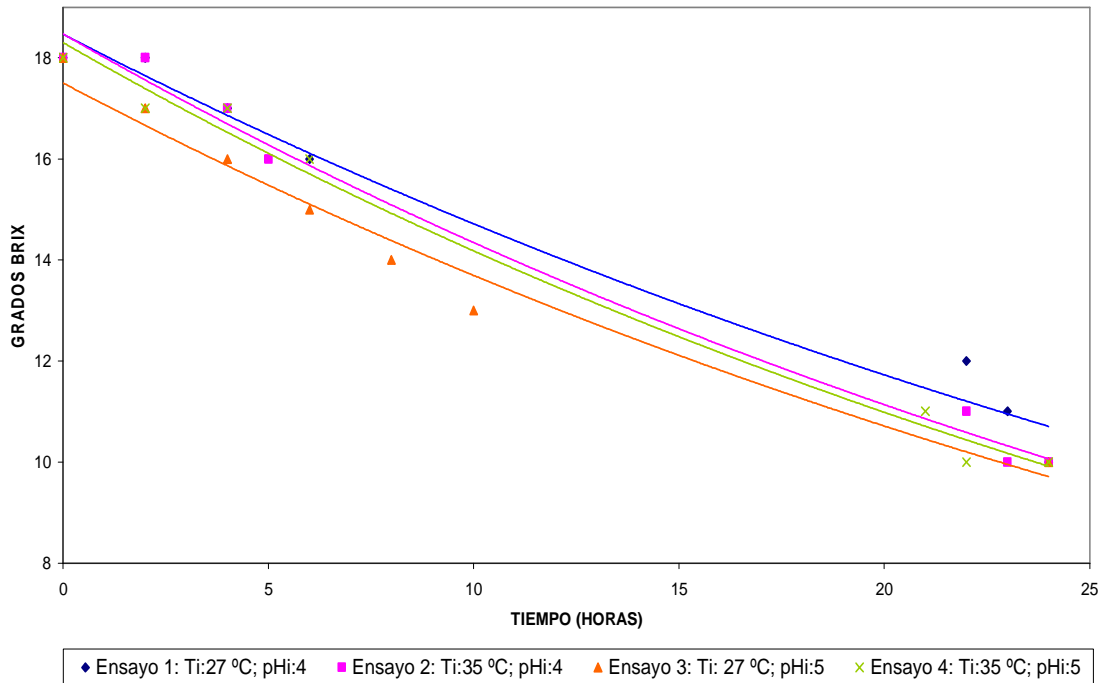
### **3.3 CURVAS CINÉTICAS DE LOS ENSAYOS DE FERMENTACIÓN CON *Saccharomyces cerevisiae* NATIVA**

En la figura 8 se encuentra la curva cinética para los ensayos 1 a 4. Estos ensayos se realizaron con la cepa *Saccharomyces cerevisiae* nativa y concentración inicial de 18 grados BRIX. La curva muestra el comportamiento de los grados BRIX con respecto al tiempo. En la gráfica se observó que durante el tiempo de fermentación de 24 horas la conversión para los cuatro ensayos fue la misma (Concentración inicial: 18 grados BRIX; Concentración final: 10 grados BRIX). En los ensayos 3 y 4, los cuales trabajaron a pH inicial de 5, se evidencia una mayor velocidad de reacción porque este pH inicial permite que durante la fermentación no se alcance un pH igual o inferior a 3.7 donde la levadura se inhibe.

La figura 9 muestra las curvas cinéticas para los ensayos 5 a 8 con *Saccharomyces cerevisiae* nativa y concentración inicial de 25 grados BRIX. Se observa la variación de los grados BRIX con respecto al tiempo.

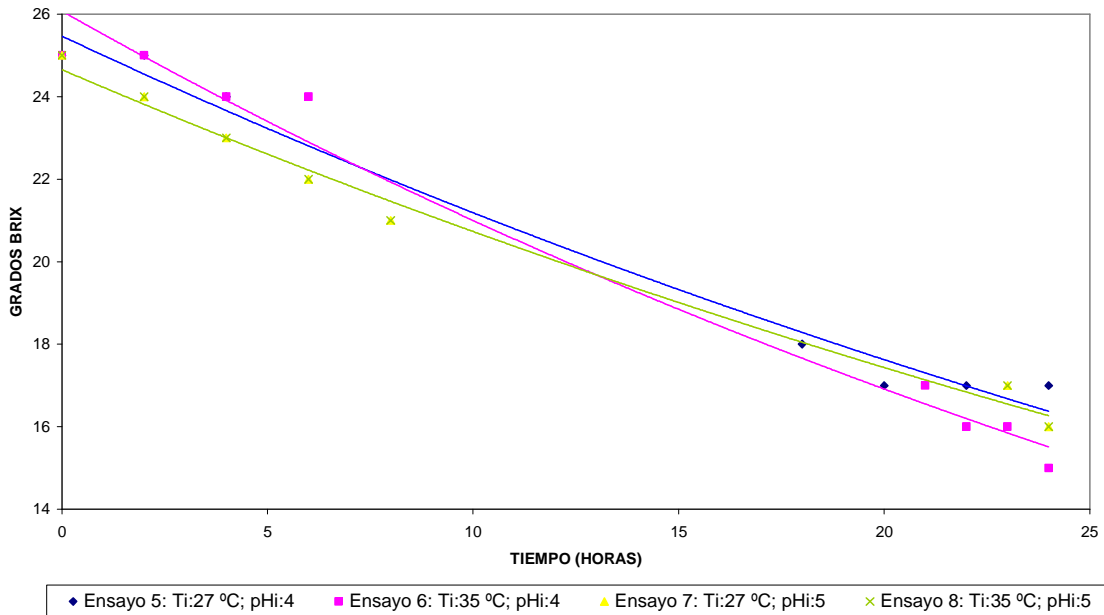
Las curvas cinéticas para los ensayos 5 a 8 (figura 9) mostraron un comportamiento similar a las curvas de los ensayos 1 a 4 (figura 8) excepto para la curva del ensayo 6 la cual durante las primeras 8 horas tuvo un comportamiento retardado respecto a las curvas 5, 7 y 8 pero luego de este tiempo su cinética se aceleró debido a una contaminación de oxígeno durante la fermentación anaeróbica

CURVAS CINÉTICAS CONCENTRACIÓN INICIAL 18 BRIX CON *Saccharomyces cerevisiae* NATIVA



**Figura 8.** Curva cinética de ensayos 1 a 4, concentración inicial 18 grados BRIX con *Saccharomyces cerevisiae* nativa.

CURVAS CINÉTICAS CONCENTRACIÓN INICIAL 25 BRIX CON *Saccharomyces cerevisiae* NATIVA



**Figura 9.** Curvas cinéticas de ensayos 5 a 8, concentración inicial 25 grados BRIX con *Saccharomyces cerevisiae* nativa.

Esta entrada de oxígeno al medio favoreció al crecimiento celular. Cuando se interrumpió esta entrada de oxígeno existía en el medio una gran carga de levaduras lo que permitió un mejor rendimiento en la conversión del sustrato a etanol, por esta razón el ensayo 6 es el de mayor producción de etanol (48 ml de etanol producidos). Las curvas de los ensayos 7 y 8 son idénticas porque tuvieron un comportamiento similar durante la fermentación, por tanto se encuentra una sobre la otra y de igual manera estas curvas tienen una mayor velocidad de reacción que la curva 5, la cual trabajó con un pH inicial de 4. Estos resultados indican que se obtiene mejores resultados trabajando con pH inicial de 5 y la temperatura no es tan relevante mientras se encuentre dentro del rango de 27°C a 35 °C.

En las figuras 8 y 9 se observa que las curvas no alcanzaron a estabilizarse en 24 horas de fermentación, es de esperarse que después de las 25 horas estas curvas logren su estabilidad puesto que en este tiempo las levaduras inician su fase de muerte como se puede observar en la curva de crecimiento celular para la especie *Saccharomyces cerevisiae* nativa en la figura 10. Cuando esta etapa inicia la conversión de sustrato se detiene en la fermentación. También se presentó un comportamiento similar, generalmente cada dos horas había disminución en un grado BRIX, esto se explica porque el tiempo de duplicación de las levaduras es de aproximadamente 1.5 a 2 horas (Fogler. 2001).

El rendimiento de las reacciones nunca será del 100% debido a que todo el sustrato consumido no se transforma en etanol porque las levaduras también utilizan este sustrato para su propio mantenimiento, para su crecimiento celular y en la producción de etanol.

CURVA DE CRECIMIENTO PARA LA ESPECIE *Saccharomyces cerevisiae* NATIVA

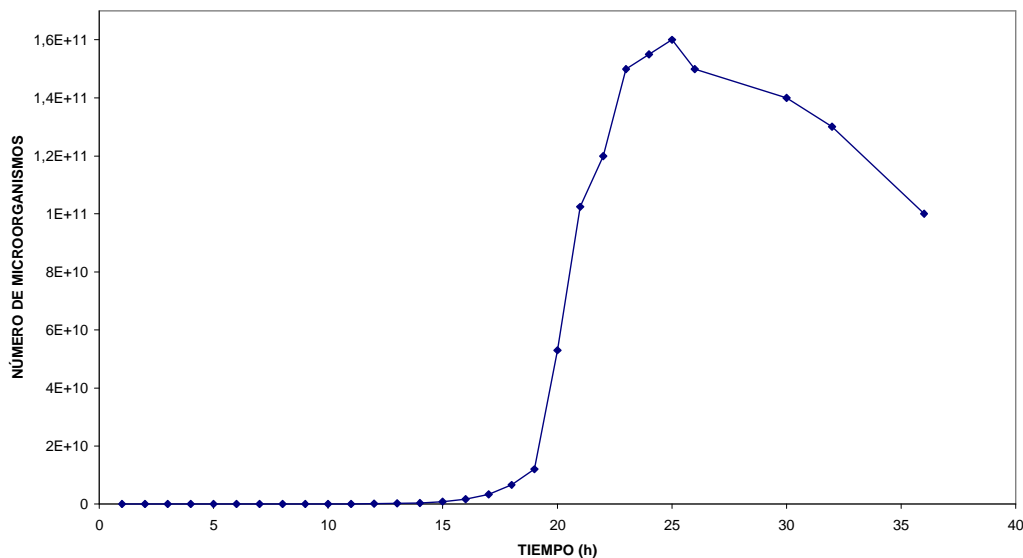


Figura 10. Curva de crecimiento para la especie *Saccharomyces cerevisiae* nativa.

#### 4. CONCLUSIONES

- Las fermentaciones de los jugos de sorgo dulce para producir bioetanol es un proceso posible y eficiente por lo tanto se recomienda utilizar la planta de sorgo dulce como materia prima alternativa para apoyar la demanda de recursos en la producción de bioetanol.
- Se presenta una mayor velocidad de reacción y mejores rendimientos al fermentar jugos de sorgo dulce con la cepa nativa *Saccharomyces cerevisiae* a condiciones iniciales de pH de 5.
- Los rendimientos para la obtención de bioetanol a partir de sorgo dulce alcanzaron los 40 litros de etanol por tonelada de caña de sorgo hasta 50 litros de etanol por tonelada de caña de sorgo, contando con una eficiencia que no superó el 60%.
- Es posible realizar fermentaciones de jugo de sorgo dulce y vinazas en concentraciones hasta un 15 % v/v, de esta forma se presenta la posibilidad de recircular parte de las vinazas al proceso de fermentación y una alternativa de tratamiento para las mismas.

## BIBLIOGRAFÍA

- BERNAL, Jaime. Obtención de variedades de sorgo dulce para la producción de alcohol carburante en tres regiones de Colombia. CORPOICA. 2007.
- CALDERÓN PÉREZ, Nayda M. Evaluación del uso de antibióticos como mecanismo para el control de contaminantes bacterianos en la fermentación para la producción de alcohol etílico. Trabajo de Grado (Microbiólogo Industrial). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Microbiología Industrial. Bogotá. 2007.
- COBOS BECERRA, Yazmín L. ORTIZ GOMEZ, Helda M. Evaluación del impacto ambiental producido por el tratamiento anaerobio de vinazas. Trabajo de Grado (Especialista en Ingeniería Ambiental). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físico – Químicas. Especialización en Ingeniería Ambiental. Bucaramanga. 2007.
- CORPOICA. Manual de caña de azúcar para la producción de panela. CIMPA. Barbosa, Santander. 1998.
- CRUZ BARRERA, Freddy Mauricio. Caracterización de Sorgo Dulce (*Sorghum Bicolor*) para la producción de Alcohol etílico. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Agosto 2007.
- DE LA CRUZ SORIANO, Raquel. Características de Cultivo de Sorgo Dulce. Cuba. 2007. [En línea] disponible en: <[www.monografias.com/trabajos51/sorgo-dulce/sorgo-dulce2.shtml](http://www.monografias.com/trabajos51/sorgo-dulce/sorgo-dulce2.shtml)>
- FAO. Sorgo dulce en China. 2002. [En línea] disponible en: <[www.fao.org/ag/es/magazine/0202sp2.htm](http://www.fao.org/ag/es/magazine/0202sp2.htm)>
- FAJARDO, Erika. SARMIENTO, Sandra. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo de Grado (Microbiólogo Industrial). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Microbiología Industrial. Bogotá. 2007.

- FERNANDEZ, Carina. GARRO, Oscar A. Alcohol a partir de sorgo dulce. Sacarificación y Fermentación. Universidad del Nordeste de Argentina. Argentina. 2005
- FOGLER, Scott H. Elementos de Ingeniería de las Reacciones Químicas. Prentice Hall. Tercera edición. México. 2001. Pág. 398
- GARASSINI, Luis A. Microbiología Agraria. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Maracay. 1967.
- ICCA. MAGFOR. JICA. Cadena Agroindustrial - Etanol. Nicaragua. 2004. [En línea] disponible en: <[www.iica.int.ni/Estudios\\_PDF/Cadena\\_Etanol.pdf](http://www.iica.int.ni/Estudios_PDF/Cadena_Etanol.pdf)>
- MINAGRICULTURA. Estrategia de desarrollo de biocombustibles: Implicaciones para el sector agropecuario. Bogotá, Colombia. 2006. [En línea] disponible en: <[www.minagricultura.gov.co](http://www.minagricultura.gov.co)>
- RAJVANSHI, A. K., JORAPUR, R. M. NIMBKAR, N. Ethanol from sweet Sorghum. Publication N° NARI-ALC-1. Nimbkar Agricultural Research Institute, Phaltan 415523. Maharashtra. June 1989.
- SÁNCHEZ, Oscar J. CARDONA, Carlos A. Producción biotecnológica de alcohol carburante I: Obtención a partir de diferentes materias primas. INTERCIENCIA. Vol. 30 N° 11. Noviembre. 2005.

## ANEXOS

### ANEXO 1

#### A. PREPARACIÓN AGAR YGC

El agar YGC se prepara de la siguiente manera:

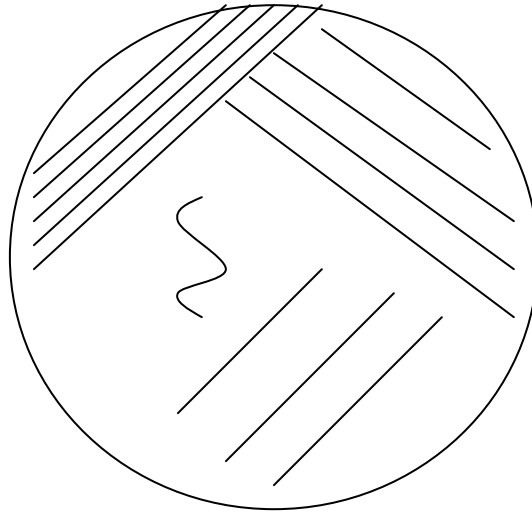
1. Antes de iniciar la preparación se debe esterilizar las cajas petri y los demás instrumentos para servir en una estufa a 200 °C durante 2 horas. Estos materiales deben estar empacados con papel kraff para evitar su contaminación en el momento de ser sacados de la estufa.
2. En un erlenmeyer se disuelve el agar YGC en agua destilada, 40 gramos de agar en 1000 ml de solución y se calienta en baño maría hasta que se disuelva completamente el agar.
3. La solución es llevada a autoclave a 15 psi durante 15 minutos.
4. Después de retirar la solución del autoclave se debe dejar enfriar hasta 45 °C y se procede a servirla en las cajas petri, 15 ml de solución para cada caja.
5. Es muy importante que en el momento de servir el agar en las cajas petri se mantenga encendidos, mínimo, cuatro mecheros. Estos ayudan a formar una barrera evitando la contaminación de los cultivos por las esporas presentes en el aire.

#### B. MÉTODO PARA REALIZAR LOS REPIQUES

Para realizar el repique del fermentado en las cajas petri se procede de la siguiente forma:

1. El fermentado (jugo azucarado) se diluye en agua peptonada. La dilución se hace de 1 en 10. Posteriormente esta solución se lleva a una dilución de 1 en 1000. Esta última es la indicada para realizar el repique en las cajas petri.

2. Con ayuda de un asa de punta curva se introduce en la solución a repicar y luego se realiza la siembra en las cajas de petri. La forma indicada para realizar la misma es como se muestra en la siguiente figura 11:



**Figura 11.** Forma de la siembra en la caja petri.

3. Luego de realizar la siembra se tapa la caja petri y se sella con papel parafinado. Se deja durante 3 días aproximadamente a temperatura ambiente y se observa los microorganismos que crecieron.
4. Después que se dé el crecimiento se toma con un asa de punta recta una pequeña cantidad de microorganismo de las distintas colonias formadas en la caja petri y se colorea en un porta objetos, se fija y se le adiciona coloraciones, para finalizar se observa en un microscopio el microorganismo coloreado. Las levaduras tienen un aspecto redondo y sin polos.
5. Luego de tener aislada e identificada la levadura se continúa repicando en cajas petri para mantener la especie.

### **C. CURVA DE CRECIMIENTO**

1. Preparar las aguas de dilución (Agua peptonada, solución de peptona universal al 0.2%).

2. Repartir en tubos de ensayo 9 ml para cada uno. Se deben preparar los tubos que sean necesarios.
3. En un erlenmeyer se inocula un volumen de jugo de sorgo con varias asadas de microorganismo, se inicia una fermentación aerobia (suministrar aire con bomba de acuario).
4. Cada hora se debe tomar 1 ml de fermentado y se diluye en un tubo de ensayo con las aguas de dilución (completar 10 ml), posteriormente de este tubo se toma 1 ml y se diluye en otro tubo de ensayo y así sucesivamente hasta tener EXP  $10^6$ .
5. Del último tubo de dilución se toma 100  $\mu$ l con una micropipeta (esterilizada) y se pasa a una caja petri con agar YGC, con ayuda de un asa digraski se esparce por toda la superficie. Se tapa la caja petri y se sella con papel parafinado. (En el momento de la siembra y dilución se debe mantener la asepsia adecuada).
6. Este procedimiento se realiza por 12 horas; Los medios de cultivo se dejan en crecimiento durante 48 horas (Temperatura 30 – 35 °C), por último se hace el conteo de las colonias que aparezcan. Este número se multiplica por las veces que se diluyó,  $\# * 10^6$  y esta es la población de levaduras que existían en el momento de tomar la muestra.

En la Tabla 9 se muestra los datos tomados para realizar la curva de crecimiento de la levadura nativa. En la figura 12.se encuentra la curva.

**Tabla 9.** Datos de la curva de crecimiento de la levadura nativa

TIEMPO	MUESTRA	BRIX	T °C	pH	Rto. Celular
1	Jugo+Lev Silvestre	17,5	30	4,00	21xE2
2	Jugo+Lev Silvestre	17,5	32,4	4,00	21xE2
3	Jugo+Lev Silvestre	17,5	34	4,00	40xE2
4	Jugo+Lev Silvestre	17,3	33,1	4,00	80xE2
5	Jugo+Lev Silvestre	17,3	30	4,00	160xE2
6	Jugo+Lev Silvestre	17,1	29,7	4,00	240xE2
7	Jugo+Lev Silvestre	16,9	27,9	4,00	38xE3
8	Jugo+Lev Silvestre	16,8	27,8	4,00	64xE4
9	Jugo+Lev Silvestre	16,8	27,9	4,00	129xE5
10	Jugo+Lev Silvestre	16,5	27,8	3,90	260xE5
11	Jugo+Lev Silvestre	16,2	27,9	3,86	52xE6
12	Jugo+Lev Silvestre	15,6	27,4	3,80	104xE6
13	Jugo+Lev Silvestre	14,9	27,5	3,75	208xE6
14	Jugo+Lev Silvestre	14,2	27,6	3,71	416xE6
15	Jugo+Lev Silvestre	13,6	27,8	3,68	83,2xE7
16	Jugo+Lev Silvestre	13,1	27,9	3,62	166,4xE7
17	Jugo+Lev Silvestre	12,8	27,8	3,55	332,8xE7
18	Jugo+Lev Silvestre	12,2	27,7	3,52	66,56xE8
19	Jugo+Lev Silvestre	11,9	27,9	3,52	120xE8
20	Jugo+Lev Silvestre	11,9	28,1	3,52	53,0xE9
21	Jugo+Lev Silvestre	11,9	28	3,50	102,4xE9
22	Jugo+Lev Silvestre	11,5	28,3	3,50	120xE9
23	Jugo+Lev Silvestre	11,3	28,4	3,50	150xE9
24	Jugo+Lev Silvestre	10,8	28,7	3,50	155xE9
25	Jugo+Lev Silvestre	10,8	28,4	3,50	160xE9
26	Jugo+Lev Silvestre	10,8	28,3	3,55	150xE9
30	Jugo+Lev Silvestre	10,5	28,4	3,55	140xE9
32	Jugo+Lev Silvestre	10,5	28,6	3,55	130xE9
36	Jugo+Lev Silvestre	10,5	28,5	3,55	100xE9

## ANEXO 2

### A. DIATREA

Es un insecto originario del Continente Americano. Se han registrado 40 especies gramíneas como hospederos que le sirven de alimento en cultivos comerciales como maíz, sorgo, millo, arroz, avena, trigo, cebada, pastos forrajeros y malezas gramíneas. En la figura 13 se muestra uno de los tallos de sorgo dulce contaminados por diatrea.

Causa tres tipos principales de daño:

- a. Cogollos muertos: Por lesión y destrucción de sus puntos de crecimiento, reduciendo el número de tallos/ha y produciendo atraso de las plantillas (cañas que se siembran por primera vez), de preferencia en el período de 1 a 6 meses de edad de la caña.
- b. Daño de la semilla asexual, al perforar y destruir las yemas en el material de siembra, en la edad de semilleros.
- c. Perforaciones circulares en los nudos o entrenudos, con ataques a partir de los seis meses de edad del cultivo hasta el corte, con reducción sensible en el contenido de sacarosa, inversión de azúcares, facilitando la presencia de otros insectos como el *Metamasius* y el *Rhynchophorus*, o de enfermedades como *Physalospora tucumanensis*, el hongo de la “pudrición roja o muermo rojo” y el aumento en la cantidad de fibra (Corpoica, 1998).



**Figura 12.** Contaminación por diatrea.