

Instituto Tecnológico de Costa Rica
Escuela de Biotecnología
Carrera Ingeniería en Biotecnología
Informe de Trabajo Final de Graduación

**EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA FERMENTATIVA DE
DIVERSAS VARIEDADES DE SORGO PARA LA
PRODUCCIÓN DE ETANOL CARBURANTE**

José Raúl Cascante Alpizar
Cartago, Costa Rica
2007

EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA FERMENTATIVA DE DIVERSAS VARIEDADES DE SORGO PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL CARBURANTE

José Raúl Cascante Alpizar*

RESUMEN

La producción de etanol es un proceso que se ha realizado a través de miles de años. Recientemente, con la búsqueda de nuevas fuentes energéticas y el surgimiento del etanol como una de las opciones más viables, ha nacido la necesidad de realizar estudios que permitan la producción en el país de dicha sustancia a partir de nuevas materias primas y no únicamente mediante la fermentación de la melaza obtenida a partir de la caña de azúcar.

El sorgo es un cereal de reciente introducción en Costa Rica y hasta el momento su cultivo se ha realizado únicamente a nivel experimental en diversas zonas como Los Chiles, Guanacaste y Parrita. Por su alto contenido de almidón, la facilidad de tecnificación de su cultivo y cosecha por su similitud agronómica con el arroz, así como por los promisorios rendimientos obtenidos a nivel de campo, el sorgo constituye una materia prima excelente para la producción de etanol en el país.

Mediante la presente investigación se evaluó el rendimiento fermentativo de 10 variedades distintas de sorgo, determinándose rendimientos de entre 385 y 408 litros de alcohol por tonelada de grano, rendimientos que resultan muy similares a los reportados en otros países donde dicho cereal es utilizado con este propósito. De la misma forma, se determinó un costo de producción por litro de etanol de entre \$0,29-\$0,38, el cual es ligeramente superior al reportado en Estados Unidos para la

producción de etanol a partir de cereales. La principal razón de esto se debe al costo que representa en Costa Rica el empleo de enzimas amilasas importadas para la sacarificación del almidón y la preparación del mosto fermentable.

Asimismo se estableció que las diferencias en contenido de almidón entre las diferentes variedades afecta la eficiencia tanto enzimática como fermentativa, al generar variaciones en el contenido inicial de glucosa en el mosto.

De la misma manera, se determinó un posible efecto negativo de los taninos presentes en las variedades de sorgo denominadas como rojas sobre el crecimiento de las levaduras, mostrando estas variedades conteos mucho menores.

Finalmente se concluyó que de las variedades analizadas, si bien todas mostraron buenos rendimientos, cuatro de ellas Cs27, Ámbar, Diamante y H8966 pueden considerarse como óptimas para la producción de etanol, al menos en cuanto a lo que ha fermentación se refiere.

* INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2007.

EVALUATION OF THE FERMENTATIVE EFFICIENCY OF TEN DIFFERENT VARIETIES OF SORGHUM FOR THE PRODUCTION OF FUEL ETHANOL

José Raúl Cascante Alpízar*

ABSTRACT

The production of ethanol is a process that has been done since hundreds of years ago. Recently, in the search of new energetic sources, ethanol has emerged as one of the most viable options. For that reason, in our country has born the necessity of studying the production of this substance from new raw material and not only by the fermentation of sugar cane molasses.

The sorghum was recently introduced in Costa Rica as a farm crop and has only been cultivated experimentally in Los Chiles, Guanacaste and Parrita. Because of its high content of starch, the easy of its cultivation and the high camp yields obtained, the sorghum constitutes an excellent raw material for the ethanol production in our country.

With this investigation it was determined the fermentative yield of ten different varieties of sorghum, obtaining yields between 385-408 liters per ton of grain. These results are very similar to those achieved in other countries, like de United States. In the same way, it was determined that the cost of the production of one liter of ethanol by this method is between \$0,29-\$0,38. The main component of the costs is the enzymes price, which is very high here in Costa Rica compared to other countries.

Also it was established that the differences between starch content in the different varieties affects the enzymatic and fermentative efficiency, producing variations in the initial content of sugar in the mash.

In the same way, it was determined a possible negative effect of the presence of tannins in the red sorghum varieties in the development of yeast, showing very low cellular counts.

Finally, it was concluded that of the varieties analyzed in this work, in spite of all varieties show good yields, four of them CS27, Ámbar, Diamante and H8966 can be considered to be very good for the production of ethanol, at least when talking about fermentation.

* Graduation Final Work Report, Escuela de Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2007.

**EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA FERMENTATIVA DE DIVERSAS VARIEDADES
DE SORGO PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL CARBURANTE**

**Informe presentado a la Escuela de Biotecnología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología**

Miembros del Tribunal

**PhD. Miguel Rojas
Profesor Asesor-ITCR**

**Lic. Bolívar Alfaro
Asesor- FANAL**

**Ing. Roberto Tinoco
Lector**

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado en primer lugar a Dios porque Él ha sido la fuerza motriz que me ha permitido salir adelante en mis estudios. Él me ha dado la sabiduría necesaria, así como la paciencia y la fuerza para afrontar las situaciones más adversas que puedan presentarse en la vida de cualquier persona. Gracias Señor por estar siempre a mi lado, por guiar mis pasos y no permitir que pierda mi camino en un mundo que cada día se torna más difícil y que cada día también parece olvidarse un poco más de Tí.

A mis padres Raúl y Ana porque gracias a ellos es que hoy me encuentro donde estoy, gracias por su apoyo incondicional y por estar siempre ahí para mí, no importa el día, ni la hora ni la situación. Ellos han sido un pilar vital para que yo estudiara Biotecnología, pues siempre me han motivado para que tome mis decisiones de acuerdo con mi persona, mis deseos y para lograr mi propia realización personal.

A mis amigos Andrés, Eduardo y José Isaías, fueron mi apoyo durante todos estos años en el TEC, estuvieron a mi lado en las buenas, en las no tan buenas, en las malas, en las pésimas..., en fin, en todos los tipos de circunstancias que podrían haberse presentado durante esta etapa de mi vida que parece concluir con la elaboración de este Trabajo de Graduación. Son las personas más capaces que halla conocido y espero que en un futuro seamos tan unidos como lo somos ahora y como lo fuimos durante nuestra vida como estudiantes del TEC.

AGRADECIMIENTOS

Para la realización de este proyecto, he contado con el apoyo de gran cantidad de personas, que me han ayudado tanto directamente como con su aporte a nivel de consejos y comentarios.

Quiero agradecer primero que nada al Lic. Bolívar Alfaro por permitirme trabajar a su lado y en su laboratorio, fueron muchos los consejos que de él recibí y que fueron vitales para la conclusión de esta investigación. Más que un asesor fue un amigo para mí y fue el encargado de darme la confianza necesaria para afrontar el reto que esta investigación representó en su momento.

Al Ing. Roberto Tinoco por permitirme trabajar en esta importante investigación del INTA, por confiar en mi persona y en mis atestados como estudiante de Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. De igual forma, gracias por estar siempre pendiente de los resultados y de la forma como todo iba aconteciendo en el laboratorio.

En general, a todo el personal de Laboratorio de Control de Calidad de la Fábrica Nacional de Licores, se comportaron de una manera excelente conmigo, me recibieron como uno más de ellos y colaboraron directamente conmigo en las distintas pruebas o ensayos que debieron realizarse con este trabajo.

Al Dr. Miguel Rojas por haber confiado en mi persona y aceptar el reto que representaba dirigir este trabajo de graduación, gracias por la paciencia, el tiempo y los consejos brindados.

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	4
DEDICATORIA	7
AGRADECIMIENTOS.....	8
ÍNDICE	9
ÍNDICE DE CUADROS.....	11
ÍNDICE DE FIGURAS.....	12
INTRODUCCIÓN	13
OBJETIVOS.....	15
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
MARCO TEÓRICO	17
3.1. La fermentación.....	17
3.1.1. Las levaduras	17
3.1.2. Materias fermentables y para la producción de etanol.....	18
3.1.3. Hidrólisis enzimática del almidón	20
3.2. El sorgo.....	21
3.2.1. Cultivo del sorgo.....	23
3.3. Principales procesos industriales en el procesamiento del almidón para la producción de etanol.....	25
3.4. Producción de etanol a partir de sorgo.....	26
3.4.1. Molienda.....	27
3.4.2. Cocción.....	27
3.4.3. Fermentación	27

3.4.4. Destilación	28
METODOLOGÍA	29
4.1. Determinación de pH y temperatura	29
4.2. Hidrólisis enzimática y fermentación.....	30
4.3. Recuperación del residuo sólido	31
4.4. Determinación del porcentaje alcohólico.....	32
4.5. Determinación de Azúcares Totales Invertidos: ATI inicial y ATI final.....	32
4.6. Determinación del porcentaje de almidón en sorgo.....	34
4.7. Determinación del porcentaje de almidón residual	34
4.8. Eficiencia enzimática inicial	35
4.9. Eficiencia enzimática final	35
4.10. Eficiencia fermentativa en planta.....	36
4.11. Conteo de levaduras	36
4.12. Rendimiento de variedad (R; litros de etanol/tonelada)	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
5.1. Parámetros físico-químicos y de la fermentación	38
5.1.1. Factores externos a la fermentación.....	39
5.1.2. Factores internos de la fermentación	42
5.2. Costos.....	56
CONCLUSIONES	59
RECOMENDACIONES	61
BIBLIOGRAFÍA	63
ANEXO 1	66

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 5.1. Contenido de almidón en grano de las variedades de sorgo analizadas.....	41
Cuadro 5.2. Eficiencia enzimática y de fermentación de las diversas variedades de sorgo analizadas.....	45
Cuadro 5.3. Conteo de levaduras a las 24 horas de iniciada la fermentación.....	48
Cuadro 5.4. Rendimientos y eficiencia fermentativa de las diversas variedades analizadas.....	51
Cuadro 5.5. Disposición de las diversas variedades de acuerdo con el porcentaje alcohólico producido y su eficiencia fermentativa.....	53
Cuadro 5.6. Rendimiento en litros de alcohol/tonelada de grano las diversas variedades de sorgo analizadas.....	54
Cuadro 5.7. Masa residual, porcentaje de almidón y porcentaje del peso inicial para cada variedad después de realizada la fermentación.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Relación entre el porcentaje de almidón en grano, la eficiencia enzimática y la eficiencia fermentativa.....	50
---	----

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la humanidad se halla inmersa en un fuerte debate sobre su futuro, sobre todo en relación a ciertos aspectos prioritarios e impostergables de la agenda mundial, entre los que encontramos la pobreza, el suministro de alimentos y la disponibilidad de agua; hay otros dos tópicos que también complementan esa preocupación: los recursos naturales y el problema latente de la energía.

Dentro de estos dos últimos tópicos, el tema de la energía reviste de vital importancia en toda esta discusión en vista de los fuertes intereses económicos y geopolíticos que su entorno mantiene y la disponibilidad finita de sus reservas naturales.

Es en este marco mundial y de realidad nacional donde surge la necesidad de buscar nuevas opciones energéticas que permitan alcanzar como mínimo cierto grado de independencia, al menos en cuanto a lo que a combustibles se refiere. Así surge de nuevo en Costa Rica el interés de utilizar el etanol como combustible, mezclándolo en hasta un 10% con la gasolina y generando un posible ahorro tanto para el país como para los consumidores finales.

El empleo de etanol en la gasolina no es algo nuevo en Costa Rica, ya en la década de los 80`s había tratado de implementarse su utilización; sin embargo, la falta de capacidad técnica y de infraestructura, así como un reequilibrio de los precios internacionales del crudo dieron al traste con el proyecto (Chaves, 2003). Desdichadamente, en la actualidad el empleo de etanol no es una realidad en Costa Rica particularmente por razones políticas, ya que en lo que al ámbito técnico se refiere, experiencias internacionales como la brasileña respaldan absolutamente la iniciativa. Actualmente, esta en vigencia un plan piloto en la zona Pacífico Central y Norte, cuyos resultados no están hasta el momento muy claros.

En nuestro país, debido a la producción y a la industrialización que ha recibido la caña de azúcar, la totalidad del etanol producido (ya sea por CATSA o Taboga) es

obtenido a partir de la melaza generada por dicha industria. Sin embargo, en miras a un plan nacional de ahorro y reconversión energética que contemple el empleo de la mezcla etanol-gasolina en la totalidad del territorio nacional, surge la necesidad de considerar otras fuentes como posible sustrato para la generación de etanol, debido tanto a la temporalidad de la producción azucarera así como al hecho de que la alta demanda de etanol que podría esperarse de un plan de cobertura nacional.

Es aquí donde el sorgo cobra fuerza como posible materia prima, debido no sólo a la factibilidad de cultivo del mismo en zonas donde la caña no es tan eficiente, sino también en la necesidad de diversificar la producción de etanol, de modo que una política gubernamental de biocombustibles involucre a diversos sectores productivos a nivel nacional, en particular en lo que al ámbito agrícola se refiere. Así también surgió la necesidad de evaluar los rendimientos fermentativos de diversas variedades de sorgo granífero y realizar estudios que permitan iniciar la comprensión de los procesos técnicos y tecnológicos detrás de la fermentación del mismo. Son estos motivos los que permitieron la realización de este Trabajo de Graduación.

CAPÍTULO II OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

1. Determinar la factibilidad de producir etanol a partir de la fermentación de sorgo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la eficiencia fermentativa de diferentes variedades de sorgo para la producción de etanol con fines carburantes.
2. Determinar el contenido de almidón de diferentes variedades de sorgo mediante metodologías químicas.
3. Determinar el contenido inicial de glucosa a partir del cual se inicia cada proceso fermentativo.
4. Cuantificar el crecimiento de las levaduras en las diferentes fermentaciones, para de determinar posibles factores que puedan interferir con su desarrollo.
5. Determinar la eficiencia de hidrólisis de las enzimas utilizadas bajo las condiciones del ensayo.
6. Determinar la cantidad de residuo remanente en cada fermentación así como su contenido de almidón.
7. Analizar el comportamiento experimental mostrado por las amilasas empleadas en esta investigación, con el propósito de poder realizar las recomendaciones necesarias para la optimización de su uso.

8. Determinar el efecto del contenido de almidón de las diversas variedades de sorgo sobre la eficiencia enzimática así como el efecto de la concentración inicial de azúcar en el mosto sobre el rendimiento fermentativo.

CAPÍTULO III

MARCO TEÓRICO

La producción de alcohol a partir de glucosa es uno de los procesos biotecnológicos más antiguos y en términos generales, se considera el proceso fermentativo más ampliamente estudiado y mejor conocido. Sin embargo, la producción de etanol a partir de sorgo involucra el empleo de almidones como fuente de carbohidratos, los cuales deben ser hidrolizados previamente hasta azúcar libre, de modo que se hallen metabólicamente disponibles para las levaduras; en contraste con la producción a partir de melaza de caña de azúcar, la cual una vez diluida puede ser inmediatamente sometida a la acción de estos microorganismos.

La dinámica del proceso de fermentación, en particular a partir de materia amilácea, es la que se presenta con el debido detalle a continuación.

3.1. La fermentación

En términos bioquímicos, se denomina fermentación al catabolismo anaeróbico en el que un compuesto orgánico sirve al mismo tiempo como donador y como aceptor de electrones y en el que el ATP se produce por fosforilación a nivel de sustrato (Madigan *et al*, 2004). En términos prácticos, se denomina así al proceso en el cual la actividad microbiana genera un producto distinto al inicial, como sucede con la fermentación alcohólica, donde el azúcar es finalmente transformada en alcohol y dióxido de carbono. Según McNeil y Harvey (1990), la fermentación puede ser llevada a cabo utilizando agentes biológicos como levaduras, hongos y bacterias.

3.1.1. Las levaduras

Los diferentes grupos de microorganismos que intervienen en la fermentación alcohólica varían en cuanto a morfología, tamaño y formas de reproducción, siendo semejantes en la síntesis enzimática, la cual se encarga de catalizar las reacciones. En el ámbito industrial, sin embargo, el microorganismo favorito para llevar a cabo

este proceso es la levadura de cerveza *Saccharomyces cerevisiae*, aunque existen otra gran variedad de levaduras actualmente empleadas para llevar a cabo este proceso.

En general, las levaduras carecen de flagelos o cilios para moverse. Su tamaño varía según la especie, nutrimentos, sustrato, edad y otros factores (Stewart & Russel, 1985). El control del pH así como el suministro de nutrientes es vital para el adecuado desarrollo de las levaduras y por ende para ocurrencia de la fermentación. En general, se considera como un pH óptimo aquel que se halle entre 4,5-5,0; y la adición de microelementos, urea, sulfato de magnesio y fosfato diamónico son también vitales para el desarrollo de las levaduras. El general, se recomienda un contenido de glucosa de entre el 16-25%, sin embargo el rendimiento óptimo se obtiene con un contenido situado entre el 17-18% (Stewart & Russel, 1985, Rainbow y Rose, 1963).

3.1.2. Materias fermentables y para la producción de etanol

Básicamente, cuatro grupos de primeras materias se emplean para la producción de etanol. El primero de estos grupos comprende las sustancias que contienen harina de almidón. Estas no pueden someterse a fermentación sin una preparación, por ser necesario transformar previamente el almidón en azúcar. Esto generalmente se logra gracias a la cocción con ácidos diluidos o al empleo de enzimas, que pueden tener su origen exógeno o provenir de los mismos granos cuyo almidón desea hidrolizarse, y cuya síntesis es activada durante el proceso de malteado, tal y como sucede en la producción cervecera. Sin embargo, con el desarrollo de la producción industrial de enzimas a bajo costo, el empleo del malteado ha sido desplazado inclusive de la industria cervecera misma (Ullman, 1980).

Comprenden el grupo dos las sustancias que contienen azúcar, de las que puede obtenerse alcohol por fermentación y subsiguiente destilación. Pertenecen a este grupo ante todo la remolacha y la caña de azúcar, lo productos secundarios de la

fabricación de azúcar, como las melazas, y además diversos frutos y raíces, hojas y otros órganos vegetales que contienen azúcar (Ullman, 1980).

Al grupo tres corresponden las sustancias que contienen alcohol, de las cuales puede obtenerse éste directamente por destilación. Los principales, vino y cerveza y los desechos de las vinerías y cervecerías. El grupo cuatro comprende las materias celulósicas, como madera y turba, y los desechos de la fabricación de celulosa, lejías bisulfíticas (Ullman, 1980).

3.1.2.1. Materias amiláceas

El almidón se forma en los gránulos de clorofila de las plantas verdes por influencia directa de la luz del sol. Aparece como primer producto de asimilación. Forma pequeños gránulos que continuamente se redisuelven. Grandes gránulos de almidón se encuentran únicamente en las acumulaciones de reserva, donde se forma a expensas de la sustancia ya asimilada. Todas las féculas y almidones del comercio deben considerarse como almidón de reserva. Su forma es distinta y característica de la planta de que procede. Los gránulos de los tubérculos de patata son de forma oval con estratificación excéntrica. El tamaño medio es de 0,09 mm. La estratificación es producida por el distinto espesor de las capas. El almidón de reserva de las distintas especies de vegetales es de grano notablemente menor, y casi siempre estratificado centralmente. Los gránulos de almidón se consideran como formaciones cristalinas que están compuestas por triquitas dispuestas radialmente. La estratificación corresponde a las sucesiones del día y la noche. Además de almidón, el gránulo contiene celulosa, proteínas, amidas, grasas y cenizas. El contenido de sustancias amilácea pura oscila entre el 96 y el 99,11% (Ullman, 1980).

El almidón en estado seco es muy higroscópico. Calentado a más de 160 °C se convierte en almidón soluble y a más elevada temperatura en dextrinas. Es insoluble en alcohol, éter y agua fría,; en agua caliente se convierte en engrudo. Una cantidad de 100 g de almidón necesita para engrudizarse al menos 40 g de agua. Calentando el engrudo de almidón a 125 °C este se licua, pero por enfriamiento vuelve a

separarse una porción de almidón. Para la obtención de glucosa a partir de éste, es necesario el empleo de enzimas o ácidos diluidos (Reichelt, 1986).

Proporcionan almidón para la fabricación de alcohol numerosas plantas, siendo las más importantes los cereales/granos, las patatas o papas, otras raíces y tubérculos, entre otras.

3.1.3. Hidrólisis enzimática del almidón

Reichelt (1986) señala, como se mencionó anteriormente, que durante la década de los setentas la licuefacción y sacarificación del almidón utilizando enzimas se incremento mucho más que la tradicional hidrólisis ácida y ácido-enzimática. La tecnología enzimática aplicada al procesamiento del almidón provee alta producción, significativo mejoramiento en la calidad del producto, además de ahorro de energía. El almidón se encuentra en la planta en grandes gránulos que pueden ser vistos a través del microscopio. En los cereales, estos gránulos se hallan dispuestos en capas concéntricas. Este carbohidrato está formado por dos tipos de uniones poliméricas de glucosa de alto peso molecular: la amilosa que consiste de una cadena no ramificada de uniones alfa-1,4 de glucosa de 250 a 300 unidades de largo y en forma de una hélice; y la amilopectina que es una cadena ramificada de uniones alfa-1,4 y alfa-1,6 de hasta 1000 unidades de largo. Estos dos polímeros se unen para formar una estructura cristalina. Para la conversión de este almidón en azúcar (fermentable), se emplea el efecto combinado del molido, el calentado y el uso de enzimas microbiales.

El uso de enzimas está ampliamente extendido en la industria moderna, y esta determinado por la especificidad, estabilidad, capacidad y costo de las mismas, así como de su gran eficiencia, ya que son pequeñas las cantidades requeridas para un determinado proceso industrial. En lo que se refiere al proceso de sacarificación de almidones, Lyons (1983) señala que son tres tipos de enzimas microbiales las que

presentan interés industrial: las endoamilasas, las exoamilasas y las enzimas desramificantes.

Las endoamilasas son aquellas que hidrolizan las uniones alfa-1,4D-glucosídicas en el interior del sustrato. Las exoamilasas hidrolizan alterna o sucesivamente las uniones alfa-1,4D-glucosídicas de las terminales no reductoras del sustrato y su acción no es inhibida por los enlaces alfa-1,6-glucosídicos que no son hidrolizados por ellas. Por su parte, las enzimas desramificantes hidrolizan las uniones alfa-1,6D-glucosídicas en la amilopectina (Lyons, 1983). Dentro de estas enzimas, dos ejemplos comerciales y que constituyeron las enzimas utilizadas en la presente investigación para la sacarificación del almidón son la Termamyl® 120 L y la AMG 300 L, ambos productos de la casa comercial Novozymes. Termamyl es un producto líquido que contiene una alfa-amilasa sobresalientemente termoestable expresada y producida mediante una cepa genéticamente modificada de *Bacillus licheniformis*. Esta es una endoamilasa que hidroliza las uniones 1,4 alfa-glucosídicas de la amilosa y la amilopectina. El almidón por lo tanto es rápidamente fragmentado en dextrinas solubles y oligosacáridos. Por su parte, la AMG 300 L es una glucoamilasa obtenida de una cepa seleccionada de *Aspergillus niger*, capaz de hidrolizar tanto las uniones 1,4- así como las 1,6-alfa del almidón licuado, permitiendo entonces la liberación de glucosa libre.

Varios factores afectan la actividad de las enzimas, algunos de ellos son pH, temperatura, buffers, concentración del sustrato, efecto de inhibidores, entre otras. Para el caso de la Termamyl®, ésta requiere la presencia de Ca^{2+} , trabaja a alta temperatura (90 °C) y a un pH de entre 6,0-6,5. Por su parte, para la AMG 300 L, tanto la temperatura como el pH óptimo son mucho más bajos (50-55 °C y 5,0-5,5).

3.2. El sorgo

El sorgo, en conjunto con el maíz, la cebada, la avena y el trigo, constituyen los granos/cereales favoritos para la producción de etanol por su contenido de almidón.

En lo que corresponde al sorgo, cerca del 65-70% de su composición es efectivamente almidón (Ullman, 1980).

Los primeros informes muestran que el sorgo existió en India en el siglo I d. C. Esculturas que lo describen se hallaron en ruinas asirias de 700 años a. C. Sin embargo, el sorgo quizás sea originario de África Central -Etiopía o Sudán-, pues es allí donde se encuentra la mayor diversidad de tipos. Esta diversidad disminuye hacia el norte de África y Asia. Existen sin embargo, ciertas evidencias de que surgió en forma independiente tanto en África como en la India. Los tipos silvestres encontrados en África Central y del Este no son aconsejables para usar en la agricultura actual, pero los fitogenetistas continúan buscándolos para crear nuevos germoplasmas, con el objeto de incorporar características deseables dentro de las líneas genéticas actuales. El sorgo como cultivo doméstico llegó a Europa aproximadamente hacia el año 60 d. C. pero nunca se extendió mucho en este continente. No se sabe cuándo se introdujo la planta por primera vez en América. Las primeras semillas probablemente se llevaron al hemisferio Occidental en barcos de esclavos procedentes de África (Sánchez, 2000).

Los primeros sorgos dejaban mucho que desear como cultivo granífero. Eran muy altos y, por lo tanto, susceptibles al vuelco y difíciles de cosechar. Además maduraban muy tardíamente. Los tipos Kafir y Milo fueron seleccionados como productores de granos por los primeros colonos en las grandes planicies debido a que su tolerancia a la sequía es mayor que la del maíz. Con el advenimiento de las máquinas cosechadoras se hicieron selecciones a partir de los materiales originales, obteniendo tipos más precoces y algo más bajos. Sin embargo, fue la combinación de "tipos" de sorgo granífero, iniciada por John B. Seiglinger de Oklahoma, lo que hizo posible cultivarlos utilizando la cosecha mecanizada. El desarrollo posterior de los tipos precoces, así como de variedades resistentes a enfermedades e insectos, junto con el mejoramiento de otras prácticas de producción, estableció firmemente el sorgo granífero como un importante cultivo (Sánchez, 2000).

Pero el proceso más trascendental, sin embargo, aún no había llegado. Como resultado de las investigaciones de Quinby y Stephens de Texas, los híbridos se hicieron realidad hacia 1950 y actualmente los rendimientos alcanzan a más de 13.440 kg/ha en los sorgos graníferos híbridos (Sánchez, 2000).

Los sorgos graníferos se cultivan generalmente en áreas demasiado secas o cálidas para la producción exitosa de maíz. Se originaron en los trópicos, pero ahora están adaptados a Zonas Norte y Sur, tan alejadas como las latitudes de 45 grados. Se los cultiva extensivamente en África, India, Manchuria, Argentina y EE.UU. Algunos sorgos también crecen en otras partes de Asia, Europa, América Central y del Sur. Están adaptados a los climas más áridos debido a su fuerte sistema radical, su capacidad de dormancia y enrollamiento de las hojas, su baja relación de transpiración y la cubierta cerosa de las hojas. Además de su tendencia a reanudar el crecimiento cuando se alivia del stress hídrico, la planta de sorgo produce también nuevas cañas cuando se rompe la humedad si la sequía no fue prolongada (Sánchez, 2000).

Los sorgos graníferos tienen granos relativamente grandes que se separan fácilmente de las glumas. El tallo no es dulce. Los granos pueden ser blancos amarillentos, rojos o rosas, con pericarpio y testa coloreados, lo que indica presencia de taninos (Sánchez, 2000).

3.2.1. Cultivo del sorgo

Para el cultivo del sorgo, los mayores rendimientos se dan en suelos profundos, sin exceso de sales, con buen drenaje, sin capas endurecidas, de buena fertilidad y de pH entre 6,2 y 7,8. Sin embargo, el sorgo es moderadamente tolerante a suelos con alguna salinidad y/o alcalinidad, siendo su comportamiento, ante esas condiciones mejor que la de otros cultivos como maní, soja y maíz (Sánchez, 2000).

El sorgo tolera mejor la sequía y el exceso de humedad en el suelo que la mayoría de los cereales y crece bien bajo una amplia gama de condiciones en el suelo.

Responde favorablemente a la irrigación, lográndose excelentes resultados bajo riego. Requiere un mínimo de 250 mm durante su ciclo para llegar a producir grano y pueden obtenerse buenos rendimientos con 350 mm, Pero, para lograr altas producciones, el requerimiento de agua varía entre 450 y 600 mm, dependiendo del ciclo del híbrido elegido y las condiciones ambientales.

Las mayores exigencias en agua comienzan unos 30 días después de la emergencia y continúan hasta el llenado de los granos, siendo las etapas más críticas las de panojamiento y floración, puesto que deficiencias hídricas en estos momentos producen importantes mermas en los rendimientos.

Los mayores rendimientos se lograrán cuando el uso de agua esté disponible durante toda la estación de cultivo. A pesar de que el sorgo tiene la capacidad de permanecer latente durante la sequía, para volver luego crecer en períodos favorables, las situaciones de stress modifican su comportamiento: el inicial conduce generalmente a una prolongación del ciclo de cultivo, mientras que el stress tardío acelera la madurez (Sánchez, 2000).

La siembra debe coincidir con el inicio de las lluvias de primavera para que el sistema radicular se desarrolle y establezca bien antes de que se inicien los períodos secos estacionales. Es fundamental que el suelo tenga una adecuada humedad a la siembra para lograr una emergencia rápida y uniforme y una buena implantación del cultivo.

Por ser una especie de origen tropical, el sorgo requiere temperaturas altas para su desarrollo normal, siendo por lo tanto más sensible a las bajas temperaturas que otros cultivos (Sánchez, 2000).

3.3. Principales procesos industriales en el procesamiento del almidón para la producción de etanol

En general, son tres los procesos industriales utilizados para la producción de etanol a partir de almidones, y que acoplan diversas etapas (gelatinización, hidrólisis, fermentación y por último destilación), a saber: 1) El proceso por carga alemán, 2) El proceso por carga americano y 3) El proceso continuo (Novozymes). Sin embargo, dado que las pruebas no serán llevadas a cabo en un reactor industrial sino más bien en un fermentador de laboratorio, la totalidad de los procesos ocurre en un mismo tanque de reacción, razón por la cual el proceso a realizar no coincide en su totalidad con ninguno de los tres anteriormente mencionados, donde los procesos de gelatinización e hidrólisis ocurren en reactores especializados dispuestos para tal fin. Sin embargo, con el propósito de detallar un poco la dinámica de dichos procesos, a continuación se presenta una breve explicación de los mismos.

En el proceso por carga alemán la materia prima es gelatinizada sin previa maceración de esta mediante cocinado a vapor directo en un cocinador Henze. Posteriormente la masa es pasada a presión a través de una válvula de coladera en el tubo de la masa, donde toma lugar la licuefacción, de acuerdo con alguno de dos procedimientos: la licuefacción a alta temperatura y la licuefacción a baja temperatura, donde son adicionadas las enzimas amilasas. Posteriormente, acontece el proceso de sacarificación, donde las dextrinas formadas previamente son degradadas a glucosa fermentable (Poulson, 1983).

Por su parte, en el proceso por carga americano, la materia prima es molida antes de entrar al cocinador, haciendo la agitación mecánica necesaria durante la ocurrencia de este proceso. La licuefacción es llevada a cabo posteriormente en el cocinador en dos etapas. Posteriormente ocurre la sacarificación. Al igual que en el caso anterior, es en estas dos etapas finales donde se procede a agregar las enzimas hidrolíticas correspondientes (Poulson, 1983).

En lo que corresponde al proceso continuo, este es similar al proceso americano, sin embargo, la cocción ocurre por inyección directa de vapor dentro del cocinador y no por el calentamiento del mismo (Poulson, 1983).

3.4. Producción de etanol a partir de sorgo

La producción de etanol a partir de cereales es un procedimiento bastante conocido, pues constituye la base para la elaboración de diversas bebidas alcohólicas, como por ejemplo la cerveza. La producción de etanol a partir de sorgo, con fines industriales, es un proceso común en algunas zonas de los Estados Unidos, aunque paulatinamente este cereal ha sido desplazado por el maíz (Shapouri & Gallagher, 2005). El proceso industrial seguido, sin embargo, es igual al empleado para otras materias amiláceas, tales como el maíz o la cebada, no existiendo diferencia con los procedimientos industriales comúnmente seguidos para la fermentación de materias amiláceas (Bean *et al*, 2006) ya descritos.

En Latinoamérica, en Argentina por ejemplo, son tres las destilerías que producen alcohol a partir de cereales (maíz y sorgo granífero), dependiendo la elección de uno u otro, de la disponibilidad de materia prima y fundamentalmente de las cotizaciones de ambos cereales. Por regla general recurren a la utilización del sorgo granífero. El proceso realizado en dichas destilerías es el que se describe a continuación (SAGPyA, 2000):

En el proceso de producción de alcohol etílico a partir de cereales como el maíz o el sorgo, el almidón presente en los granos es solubilizado y parcialmente hidrolizado por medio de una acción enzimática y de temperatura en la cocción. Los productos que se generan son reducidos por vía enzimática a glucosa para ser fermentados por la levadura y generar alcohol etílico y anhídrido carbónico (CO₂). El alcohol se separa por destilación del medio y es depurado y purificado. El CO₂ generado durante la fermentación es recuperado, comprimido, purificado y licuado para su almacenaje.

Los residuos sólidos de la destilación (solubles e insolubles) se centrifugan, evaporan y secan. En algunos casos, como sucede con el sorgo, estos pueden ser empleados para la elaboración de alimento para animales.

Los procesos a los que se ve sometido el grano son los siguientes:

3.4.1. Molienda

El cereal es transportado mecánicamente hasta la planta de alcohol para su molienda, la que se realiza por medio de molinos a martillos con el fin de reducir su granulometría y de esta forma facilitar su acondicionamiento. El cereal molido, se pesa y se envía a la siguiente etapa.

3.4.2. Cocción

La cocción consiste en dos etapas, la cocción misma y una etapa previa de remojo. Dichas etapas consisten en:

- Remojo: se introduce en el tanque de remojo donde se forma una suspensión de cereal, llamada mosto, con el objeto de humectarlo y acondicionarlo para su posterior tratamiento. Se ajusta el pH, se controla la temperatura y la concentración de sólidos. El mosto se constituye de cereal molido, vinazas (residuo sin insolubles de la destilación), agua de pozo y condensados recuperados del evaporador.
- Cocción: el mosto es calentado con vapor con el objetivo de solubilizar y parcialmente hidrolizar el almidón. Luego se le da un determinado tiempo de residencia para completar así la licuefacción del almidón.

3.4.3. Fermentación

Primeramente, se procede con el proceso de sacarificación, en el cual al mosto cocido se le baja la temperatura mediante un enfriador y se bombea al fermentador que se encuentra en estado de asepsia. Luego se le agrega la enzima sacarificante.

La acción de esta enzima es reducir el almidón parcialmente hidrolizado del mosto en azúcares fermentescibles, casi en su totalidad. Posteriormente sigue la siembra, que consiste en inocular el mosto sacarificado con levadura, a una temperatura determinada. Finalmente acontece la fermentación: En esta etapa, por la acción de la levadura, los azúcares fermentescibles son transformados principalmente en alcohol etílico y dióxido de carbono además de otros productos en menor proporción.

3.4.4. Destilación

El alcohol producido en la fermentación es separado del mosto por destilación fraccionada por arrastre de vapor. Una vez separado, pasa a las etapas de purificación, a saber:

- **Depuración:** Es la primer etapa de purificación. Tiene por objeto eliminar la mayor proporción de compuestos más volátiles que el alcohol etílico.
- **Rectificación:** En esta etapa, el alcohol es purificado de los compuestos menos volátiles que el alcohol etílico y concentrado para obtener el grado deseado. A este se lo denomina alcohol buen gusto.
- **Afinación:** El alcohol buen gusto es sometido a una tercera etapa de purificación, llamada afinación o desmetilizado, con el objetivo de eliminar el metanol y prácticamente todas las impurezas más volátiles que puedan haber quedado de las etapas anteriores y que le darían olores no deseados, logrando de esta manera un alcohol buen gusto de alta pureza. El alcohol etílico producido es analizado organoléptica y cromatográficamente con la frecuencia especificada, y almacenado en los tanques de producción.

CAPITULO IV METODOLOGÍA

Durante el desarrollo práctico del presente Trabajo de Graduación se realizaron una serie de análisis y procedimientos con el propósito de determinar diversos parámetros tales como eficiencia enzimática, eficiencia fermentativa, porcentaje alcohólico, entre otros. La metodología empleada para cada uno de estos, así como el detalle y las fórmulas empleadas para la determinación de otras variables se presenta a continuación. El mismo fue realizado en la Unidad de Microbiología del Laboratorio de la Fábrica Nacional de Licores en Grecia, Alajuela.

La metodología utilizada para cada una de las fermentaciones realizadas fue la misma, esto con el propósito de reducir las fuentes de variación lo menos posible, procurando restringir las variables únicamente a características específicas de cada una de las variedades analizadas.

Las variedades fueron analizadas en el siguiente orden y fechas:

Fermentación	Variedad	Día de inicio
1	H8966	29 de agosto
2	Brillante	5 de setiembre
3	Cs27	12 de setiembre
4	CR40030	19 de setiembre
5	Diamante	26 de setiembre
6	Oro Blanco	3 de octubre
7	Ámbar	10 de octubre
8	Eskameca	17 de octubre
9	Acero	24 de octubre
10	H82G55	31 de octubre

4.1. Determinación de pH y temperatura

Dichas determinaciones, en las pruebas en que resultasen necesarias, fueron realizadas mediante el empleo de termómetros debidamente calibrados o de pHmetros digitales. Para el caso de la fermentación, las variables fueron controladas

mediante el equipo que el mismo fermentador (Microferm-Fermentor New Brunswick Scientific) cuenta para llevar a cabo dicho fin. Una lista del equipo empleado en la presente investigación se presenta a continuación:

- Fermentador Microferm-Fermentor New Brunswick Scientific Co. Inc. Edison, N.J. USA
- Licuadora Commercial Blender, modelo 31BL91 Blender 7010
- pHmetro Corning 340 Serie C6-345
- Cromatógrafo de Gas Hewlett Packard HP 68900* (todavía no confirmado)
- Autoclave Enviromental Tectonics Corporation
- Incubadora de baja temperatura Precision GCA Corporation
- Columnas de destilación de espiral simple y de reflujo
- Balanza Ohaus Heavy Duty
- Balanza Ohaus Cent-o-gram
- Diversidad de cristalería

4.2. *Hidrólisis enzimática y fermentación*

Se procedió a mezclar 3 kilogramos de sorgo en 7,6 litros de agua manteniéndose bajo agitación a 200 rpm, los motivos de este factor de dilución se expondrán más adelante. Posteriormente se adicionaron 2,16 g de carbonato de calcio (cofactor de la enzima Termamyl® 120L), se ajustó el pH a 6.00 y se agregaron 30 mililitros (ml) de la amilasa Termamyl® 120L. Posteriormente se procedió a calentar dicha mezcla hasta alcanzar los 90 °C, temperatura a la cual se mantuvo por un período de 20 minutos.

Posteriormente se bajó la temperatura a 50 °C, se ajustó el pH a 5.00 y se adicionaron 30 ml de la enzima glucoamilasa (amiloglucosidasa) AMG 300L. La mezcla se mantuvo en agitación a 200 rpm por un período de dos horas.

A continuación se ajustó el pH a 4.80, se agregaron 10,6 g de úrea, 10,6 g de fosfato diamónico, 5,3 g de microelementos (Fe 3,10%, Mg 1,05%, Mn 0,25%, Zn 5,05%, Cu 0,04%, B 0,05%; porcentajes expresados en relación al peso) y 5,3 g de sulfato de magnesio y se incorporó a la mezcla el contenido de cuatro tubos de ensayo en levaduras, pertenecientes a dos cepas de alto rendimiento propiedad de la Fábrica Nacional de Licores, el cual que correspondió al inóculo empleado para iniciar la fermentación. Cada uno de estos tubos de ensayo consistía en un cultivo de levaduras en 5 ml de agar Sabourand-Dextrosa con crecimiento homogéneo; esta metodología de inoculación se siguió de acuerdo a experiencias anteriores alcanzadas en el laboratorio donde se llevó a cabo el trabajo.

Así se dio inicio al proceso fermentativo, el cual se desarrolló a temperatura ambiente (30 °C aproximadamente) y se prolongó por un espacio temporal de 42 horas. El proceso de fermentación fue realizado a dicha temperatura puesto que a escala industrial constituye una temperatura óptima para la obtención de los mejores rendimientos en cuanto a producción de etanol y la recomendada para llevar a cabo fermentaciones alcohólicas experimentales (Shigechi *et al*, 2004; De Rasor, 1980; González, 1955) y no demandaba gastos energéticos para el control de temperatura.

4.3. Recuperación del residuo sólido

Después de acontecida la fermentación, se procedió a filtrar el fermento a través de una malla o tela. El filtrado era posteriormente escurrido a mano y se secó mediante calentamiento en estufa a 70 °C por período de 3 días. A continuación se procedió a pesar la masa seca recuperada, la cual corresponde al denominado DGS o Derivado de Grano Seco. Posteriormente estos residuos fueron entregados a la Lic. Sandra Quirós del Laboratorio de Control de Calidad de la Cooperativa de Productores de

Leche Dos Pinos, para el análisis de los mismos en procura de evaluar su posible uso para la fabricación de concentrados para animales.

4.4. *Determinación del porcentaje alcohólico*

Se midieron 50 ml de fermento con una pipeta volumétrica de dicho volumen, los mismos fueron posteriormente transvasados a un balón de destilación de 500 ml. Seguidamente se adicionó 50 ml de agua para aumentar el volumen y evitar la desecación de la muestra durante la destilación que prosigue. Subsiguientemente, se destiló a fuego moderado hasta recoger 50 ml en un balón aforado de dicho volumen. Finalmente se determinó el porcentaje alcohólico mediante el uso de un refráctometro, midiendo el índice de refracción y haciendo corresponder su valor mediante una tabla con el respectivo porcentaje de contenido alcohólico (Fanal, 2004).

4.5. *Determinación de Azúcares Totales Invertidos: ATI inicial y ATI final*

Con esta prueba se logró determinar el porcentaje de azúcares (glucosa) liberados por la acción enzimática y que serán los disponibles para la acción de las levaduras (ATI inicial) así como el porcentaje de azúcares remanente que no fue empleado por las levaduras (ATI final) Se empleó el procedimiento dado por Lane & Eynon (1940). Para esto se procedió a tomar una cantidad de muestra cuya titulación no consumiese menos de 15 ml ni más de 50 ml de la misma y que no durara más de tres minutos para llegar al punto final durante la titulación. Este complejo procedimiento se presenta a continuación:

Primero se tomó una cantidad de muestra (para el caso del ATI inicial, la cantidad de muestra empleada correspondió a 5 ml del mosto hidrolizado; para el caso del ATI final, correspondió a 100 ml del fermento) a la cual se le agregaron 5 ml de HCl 1+1 y 10 ml de agua. Dicha mezcla se calentó a 80 °C y se mantuvo a esta temperatura por

espacio de 5 minutos. Seguidamente se dejó enfriar y una vez frío se agregaron unas gotas de fenolftaleína para poder neutralizar con NaOH 7 N hasta el viraje de color de dicho indicador ácido-base. A continuación dicha mezcla fue pasada a un balón aforado de 200 ml y se llevó a la marca de aforo. Para el caso del ATI inicial, dicha mezcla se hallaba muy concentrada como para ser titulada directamente, por lo cual tuvo que ser diluida dos veces, tomando 100 ml de la misma y diluyéndola con agua hasta 200 ml en un nuevo balón aforado de dicho volumen.

Seguidamente se procedió con la titulación, de la siguiente manera: se tomaron 5,0 ml de cada solución de Fehling A y B (este reactivo se prepara en dos soluciones separadas, las cuales se mezclan en el momento preciso en que se va a utilizar) y se mezclaron en un erlenmeyer de 100 ml. Posteriormente se llenó una bureta de 50 ml con la soluciones de azúcares preparadas anteriormente. Cada titulación debió realizarse cuatro veces, la primera como acercamiento y las otras tres para la obtención del valor exacto. Así, para el caso del acercamiento, a la mezcla de Fehling se le agregó 15 ml desde la bureta y se puso a hervir por un minuto y 30 segundos sobre una plantilla, a continuación se agregaron 5 gotas de azul de metileno y se tituló agregando solución desde la bureta gota a gota, anotando al final el volumen consumido. Posteriormente, se realizaron tres titulaciones más idénticas a la anteriormente descrita, sin embargo en estas en lugar de agregar los 15 ml iniciales se agregó una cantidad 1,5 ml menor a la determinada en la primera titulación de acercamiento. El volumen de muestra consumido se anotó y se empleó para la determinación del ATI según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de ATI} = (\text{Factor} * 10) / (\% \text{ de dilución} * \text{ml consumidos})$$

NOTA: El factor de la solución de Fehling empleada fue de 53,3. Dicho factor viene determinado desde la preparación de la solución misma, la cual fue elaborada por un laboratorista de la Unidad Química del Laboratorio de Control de Calidad de la Fábrica Nacional de Licores.

4.6. Determinación del porcentaje de almidón en sorgo

El porcentaje de almidón presente en la muestra se determinó mediante la hidrólisis química y enzimática del mismo, para la posterior cuantificación de los azúcares totales invertidos presentes en la muestra, partiendo del hecho de que todo azúcar detectable provendría del almidón hidrolizado.

En este caso, dicho ATI se determinó, al igual que en el caso anterior, mediante titulación, haciendo uso del reactivo de Fehling.

El procedimiento de hidrólisis total del almidón presente se realizó de la siguiente manera:

Se procedió a pesar 5 g de muestra y mezclarlos con 100 ml de agua destilada y 1 ml de alfa-amilasa. A continuación se calentó por una hora a 70 °C. Posteriormente se dejó enfriar, se agregó agua suficiente para completar 250 ml y se filtró. Posteriormente se tomaron los 250 ml del filtrado y se les agregaron 20 ml de HCl 1+1 y se dejaron bajo reflujo por un período de dos horas. Se dejó enfriar nuevamente y se neutralizó con NaOH 7 N mediante el empleo de fenolftaleína como indicador. A continuación se ajustó el volumen a 500 ml y se titula con la solución de Fehling. Para este caso, al igual que en el caso anterior, resultó necesario diluir la muestra, sin embargo, el factor de dilución varió entre las variedades siendo de 2,5 (80 ml de la solución de azúcares hasta alcanzar un volumen final de 200, completándolo con agua) para las de menor contenido de almidón y de 4 (50 ml de la solución de azúcares hasta alcanzar un volumen final de 200, completándolo con agua) para las de mayor contenido de este polisacárido.

4.7. Determinación del porcentaje de almidón residual

Para la determinación del porcentaje de almidón residual se utilizó el mismo procedimiento descrito para sorgo, nada más que en lugar de 5 g de este cereal se utilizaron 5 g del Derivado de Grano Seco (DGS) recuperado mediante filtración del

fermento. En este caso a diferencia de lo acontecido para el sorgo en cereal, no se requirió dilución posterior para la adecuada determinación del ATI.

4.8. Eficiencia enzimática inicial

La eficiencia enzimática inicial $t=0$ hrs se determinó mediante el cálculo de la masa de glucosa liberada inicialmente en relación con el contenido en almidón de cada variedad de sorgo.

Así, la *masa de almidón presente* se determinó mediante la siguiente fórmula: Masa muestra (3 kg) x Porcentaje de almidón por variedad.

Por su parte, la *masa de azúcar liberada* se determinó mediante la siguiente fórmula: Masa del fermento (10,6 kg) x ATI inicial.

La eficiencia enzimática en $t=0$ hrs se determinó entonces mediante la fórmula 1:

FÓRMULA 1

Eficiencia enzimática $t=0$ hrs = (Masa de azúcar liberada/masa de almidón presente) x 100

4.9. Eficiencia enzimática final

La eficiencia enzimática final $t=42$ hrs por su parte se determinó mediante el cálculo de la masa de almidón residual en relación con el contenido en almidón de cada variedad. Se indica como tiempo 42 horas puesto que dado que la AMG 300L (glucoamilasa) posee actividad residual durante el proceso fermentativo y puede ocurrir liberación de glucosa hasta el último instante de la fermentación, que duró precisamente ese tiempo. A su vez, como la fórmula misma lo indica, para el cálculo de esta variable se parte de la concentración de almidón remanente en el DGS residual de la fermentación.

Así, la *masa de almidón remanente* se determinó gracias a la fórmula: (masa DGS x Porcentaje de almidón residual)/100

Por otro lado, la *masa de almidón presente* se determinó mediante la fórmula descrita anteriormente, es decir: Masa muestra (3 kg) x Porcentaje de almidón por variedad.

La eficiencia enzimática final fue entonces determinada a través de la siguiente fórmula:

FÓRMULA 2

Eficiencia enzimática t=42 hrs = (masa de almidón presente - masa de almidón remanente)/masa de almidón presente x 100

4.10. Eficiencia fermentativa en planta

La eficiencia fermentativa en planta se determinó mediante la fórmula descrita por González 1955 en una Memoria Cubana sobre Fermentación Alcohólica. Dicha fórmula se detalla a continuación:

FÓRMULA 3

Eficiencia fermentativa: $\frac{(\text{Porcentaje alcohólico} \times 0.791)}{\text{ATI inicial} \times 0.511} \times 100$

4.11. Conteo de levaduras

El conteo de levaduras se realizó a las 24 horas de iniciada la fermentación mediante el empleo de una cámara Neubauer, depositando una gota de la muestra en el cubreobjetos, la cual por capilaridad llena el espacio entre el cubre y el portaobjetos. Posteriormente se dejó reposar la cámara por un minuto después de ser colocada en el microscopio y seguidamente se procedió con el conteo de las levaduras presentes en el cuadro central. El factor de dilución de la muestra fue de 100, por lo tanto, el número de levaduras vendría dado por la fórmula:

FÓRMULA 4

Número de levaduras en la muestra = total de levaduras contadas x 1000 x 10 x 100.

Para cada fermentación se tomó una cantidad de cuatro muestras, el promedio de estas muestras es el que se reporta en el apartado de resultados.

4.12. Rendimiento de variedad (R; litros de etanol/tonelada)

El cálculo del rendimiento en litros de etanol por tonelada se realizó mediante los siguientes cálculos matemáticos:

FÓRMULA 5

R = l Alcohol /ton sorgo

$$R = \frac{\text{Volumen de fermento (10,6 l)} \times \text{Porcentaje alcohólico}}{3} \times 1000$$

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Parámetros físico-químicos y de la fermentación

Para la fermentación del sorgo se siguió el procedimiento descrito por Alfaro (2003) para la fermentación de yuca y otras materias amiláceas, y que ha sido empleado ya en ocasiones previas en los laboratorios de la Fábrica Nacional de Licores. Los resultados obtenidos coinciden con lo esperado en el sentido de que la producción de etanol a partir de granos, semillas o cereales es totalmente viable y efectiva, siempre y cuando se cumpla con un pretratamiento que permita que el azúcar contenido en el almidón presente en los granos pueda estar disponible para el metabolismo de las levaduras. De hecho en algunos países como los Estados Unidos, los granos y cereales constituyen la principal materia prima empleada para la producción de etanol con fines carburantes (Chaves, 2003); en nuestro país, por el contrario, debido a la disponibilidad de otra materia prima, la producción de etanol ha sido en su totalidad a partir de la melaza de la caña de azúcar. La excepción a la anterior afirmación lo constituye la industria cervecera nacional, la cual por las características mismas del proceso de producción de esa bebida ha debido emplear diversos tipos de cereales y granos; sin embargo nunca se ha utilizado en nuestro país alcohol producido a partir de este tipo de materias primas como alcohol carburante. Para las variedades de sorgo analizadas en la presente investigación, todas las fermentaciones realizadas presentaron rendimientos superiores al 10,90% de contenido alcohólico, lo que permite señalarlas como fermentaciones exitosas si se comparan con fermentaciones realizadas a partir de otros tipos de materias fermentables tales como la melaza de la caña de azúcar o la yuca, donde los rendimientos obtenidos empleando el mismo equipo de laboratorio utilizado en esta investigación han rondado un porcentaje alcohólico de el 8,31% y el 5,45% respectivamente (Alfaro, 2003).

Dentro de las variables involucradas en el proceso de fermentación y que indudablemente afectan de manera alguna la eficiencia de la misma, para el caso del procedimiento descrito y que fue empleado en la presente investigación, se revisten de vital importancia en primer lugar factores externos de la fermentación; y en segundo lugar, una serie de factores internos o de fermentación dentro de los cuales podemos señalar las enzimas empleadas, el control de la temperatura/pH y la variedad de las levaduras utilizadas. Con respecto a los factores externos podríamos señalar que estos son los responsables primordiales de las diferencias observadas; mientras que los internos a pesar de que se procuró que fuesen homogéneos para todas las muestras analizadas, se hallan a merced de estas variables externas, lo que genera que los parámetros relacionados con la fermentación, tales como el % ATI inicial (contenido de glucosa presente en el mosto a fermentar) por ejemplo, varíen entre las muestras a la hora de iniciar el proceso fermentativo. Es por este motivo que cada uno de estos tipos de factores será brevemente comentado a continuación de manera individual.

De la misma manera, si bien es cierto que las condiciones de fermentación se mantuvieron invariables a lo largo de las 10 pruebas realizadas, resulta necesario aclarar algunos aspectos importantes para poder justificar dicha metodología. La aplicación de una metodología uniforme se justifica en el hecho de que el objetivo primero del presente trabajo era evaluar los rendimientos de las diferentes variedades para poder emitir criterios de comparación entre ellos así como demostrar la factibilidad de producir etanol a partir de sorgo en cantidades considerables para un posterior escalamiento industrial, por lo cual resultaba necesario y vital que la única variable fuese la variedad empleada en cada una de las pruebas.

5.1.1. Factores externos a la fermentación

Con los factores externos se pretende hacer referencia a aquellas variables relacionadas con cada una de las variedades de sorgo así como de su manejo previo a la fermentación. Así, encontramos variables externas que fueron iguales para todas

las muestras, como por ejemplo el grado de molienda del grano; otras por su parte, como el grado de contenido de almidón o la presencia/ausencia de taninos, son variables específicas de cada una de las variedades analizadas.

Uno de los factores que mayor trascendencia tienen para un adecuado tratamiento de hidrólisis enzimática del almidón y la posterior fermentación del mosto producido es la molienda del grano (Corredor *et al*, 2005). Esto se justifica en el hecho de que con una adecuada molienda de los granos de sorgo, las partículas producidas serán de mucho menor tamaño a la muestra original y habrá un mayor contacto entre las mismas y la solución que contiene las diversas enzimas empleadas en el proceso, permitiendo una mejor hidrólisis enzimática del almidón.

De igual manera, para las condiciones experimentales y el equipo utilizado, el empleo de una suspensión fina permite un mejor desempeño del fermentador, sobre todo en lo referido a las condiciones de agitación. A partir de la experiencia adquirida con fermentaciones previas realizadas en la misma Fábrica Nacional de Licores con muestras con tamaño distinto de partícula, las 10 muestras analizadas fueron sometidas al grado de molienda considerado como óptimo, lo que permitió una adecuada suspensión de las muestras así como unos porcentajes de eficiencia enzimática relativamente altos (todos superiores al 90%). Dichos resultados serán comentados más adelante en el presente informe.

De igual forma existen otros factores del grano que ya no fueron uniformes para todas las muestras, puesto que son particulares para cada una de las variedades de sorgo ensayadas. Así por ejemplo, los niveles de almidón de cada variedad así como la presencia o no de taninos en el grano podrían influir en los rendimientos observados.

Con respecto al contenido de almidón de cada variedad, los resultados se presentan en el cuadro 5.1. Los mismos se mantuvieron en un rango de entre el 66,37% y el 81,06%. Dichos resultados coinciden con la reportado en la literatura, que indica un contenido promedio de entre el 65%-70% de almidón en dicho grano (Ullman, 1980).

Esta variable resulta vital puesto que permite tener una idea de cual puede ser la cantidad de azúcar liberada para cada variedad, aunque en términos generales las diferentes variedades parecen mostrar un contenido de almidón similar entre sí, mostrando los valores más altos aquellas variedades de sorgo correspondientes a las denominadas del tipo blanco (especialmente Diamante y Eskameca), aunque hubo dos variedades de las denominadas del tipo rojo que presentaron un contenido de almidón bastante alto (CR40030 y H82G55). Estas cuatro variedades con contenido de almidón superior al 78% mostraron todas un comportamiento similar en algunas de las variables analizadas como su menor eficiencia enzimática final, difiriendo sin embargo en otros aspectos tales como el porcentaje alcohólico producido. Posibles razones de esto se expondrán a lo largo del presente análisis.

Cuadro 5.1. Contenido de almidón en grano de las variedades de sorgo analizadas.

Variedad	Porcentaje de almidón
H8966	70.51
Brillante	72.60
Cs27	66.37
CR40030	79.94
Diamante	81.06
Oro Blanco	71.18
Ámbar	72.84
Eskameca	79.89
Acero	73.97
H82G55	79.66

En lo concerniente al contenido de almidón, este podría señalarse como una de las variables existentes entre las diferentes fermentaciones realizadas, y de hecho constituye al parecer la principal diferencia entre las variedades de sorgo analizadas en el presente trabajo. Indudablemente, si las condiciones de hidrólisis enzimática y fermentación fueron idénticas para todas las muestras analizadas, las diferencias en

cuanto a los valores de eficiencia enzimática, ATI inicial y demás datos podrían deberse a dicho factor, una asociación que tratará de establecerse más adelante cuando se hable en concreto de dichos parámetros.

Con respecto a la presencia de taninos, debe recordarse que aquellas variedades denominadas rojas a diferencia de las denominadas blancas se caracterizan precisamente por la presencia de dichas sustancias a nivel del grano; estos mismos taninos se reportan como inhibidores del crecimiento de levaduras (González, 1955; Kaufman *et al*, 2006). Esto es vital puesto que existe un nivel óptimo de conteo de levaduras que se relaciona con una alta eficiencia fermentativa, constituyendo también otra posible variable que pueda afectar los valores de rendimiento obtenidos.

5.1.2. Factores internos de la fermentación

5.1.2.1. Enzimas empleadas

Indudablemente el empleo de enzimas comerciales permite que la hidrólisis del almidón ocurra con una alta eficiencia. Esto resulta vital puesto que permite una alta disponibilidad inicial de azúcar, que vaya acorde con los valores porcentuales recomendados para una fermentación eficiente. En lo que corresponde al pretratamiento enzimático, se emplearon dos enzimas comerciales de la casa Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca), líder en la producción mundial de enzimas de uso industrial y con representante en Costa Rica (TRISAN, La Uruca, San José). Con respecto a sendas enzimas, se respetaron las condiciones recomendadas por el fabricante; para el caso de Termamyl® 120 L el pH se ajustó a 6.0 y la temperatura estuvo entre los 90-100 °C, para el caso de la AMG 300L (glucoamilasa) el pH se ajustó a 5.0 y la temperatura se mantuvo a 50 °C. En lo que corresponde al volumen de enzima empleada, se utilizaron cantidades superiores a las recomendadas por el fabricante en ambos casos. Así, tanto para la Termamyl® 120L como para la AMG 300L (glucoamilasa) se emplearon 10 ml de las mismas por kilogramo de sorgo, cuando lo recomendado era una concentración de 1,6-2,8 ml/kg y 1,2 ml/kg

respectivamente. Sin embargo, los tiempos empleados en esta investigación fueron menores a los recomendados por el fabricante. Por ejemplo, para la AMG 300L (glucoamilasa), la concentración de 1,2 ml/kg era recomendada para un proceso de sacarificación que se extendiera por 40 horas, cuando en nuestro caso, dicho paso duró escasamente dos horas. Por su parte para la Termamyl® 120L y según el proceso de fermentación estadounidense (American Batch Process; Novozymes, 2000), el cual era el más similar al realizado experimentalmente en este trabajo, se hacían dos aplicaciones de la enzima, una antes del proceso de cocción para evitar una excesiva viscosidad del mosto durante la gelatinización del almidón y otra aplicación posterior para aumentar la formación de dextrinas, para un rango recomendado de entre 1,6-2,8 ml/kg, en un proceso cuya duración era de al menos una hora. En nuestro caso, la aplicación de la enzima se realizaba previa a la cocción y todo el proceso se realizaba en 30 minutos.

La variación entre la metodología empleada, con respecto a los procesos industriales descritos en la literatura (Novozymes, 2000), se debe fundamentalmente a que los equipos disponibles a escala de laboratorio son totalmente distintos a los empleados por la industria, asimismo las enzimas tenían un tiempo de aproximadamente 4 meses de haber sido abiertas por primera vez, así que para no correr el eventual riesgo de malgastar alguna muestra por una baja eficiencia enzimática se prefirió utilizar una mayor cantidad de estas en comparación a la recomendada industrialmente por el fabricante. Cabe señalar sin embargo que la vida útil de las mismas es de un año y que los altos rendimientos obtenidos en cuanto a eficiencia enzimática parecen indicar que estas enzimas se hallaban íntegras casi en su totalidad. Además, por las características del proyecto, el objetivo primordial era demostrar la factibilidad de producir etanol a partir de sorgo en una cantidad considerable y competitiva, en particular en comparación con los rendimientos obtenidos a partir de melaza de caña de azúcar.

Sin embargo resulta vital señalar que a escala industrial y para que la producción de etanol a partir de sorgo sea rentable económicamente debe reducirse la

concentración de enzimas empleadas al menos al nivel recomendado por el fabricante, o encontrar enzimas cuyo costo permita reducir esta variable lo máximo posible. Aparte de eso, si se desea un pretratamiento enzimático que no resulte costoso, el consumo de energía para el calentamiento del mosto debe reducirse lo máximo posible, por lo cual, periodos de cocción a 90 °C superiores a los 30 minutos resultarían poco viables, igual sucedería si durante el proceso de sacarificación debiese mantenerse el mosto a 50 °C por períodos de hasta 40 horas; en gran parte a esta consideración se debe que los tiempos de la metodología empleada en este trabajo procuraron ser cortos. A su vez, dichos tiempos podrían ser reducidos aún más puesto que la eficiencia enzimática obtenida según la metodología empleada es alta, tal y como se comentará más adelante; sin embargo para poder afirmar esto debe realizarse una investigación orientada únicamente a la optimización de los tiempos necesarios para la hidrólisis enzimática, la misma recomendación aplicaría también para la búsqueda de la concentración óptima de las enzimas en la cual se minimicen los costos obteniendo siempre el máximo rendimiento.

Así, de acuerdo a las condiciones de pretratamiento/hidrólisis enzimática dadas en este trabajo y empleando una masa de 3 kilogramos de sorgo, tomando un contenido de almidón del 70% y suponiendo una hidrólisis enzimática con eficiencia 90%, el contenido de azúcar en el mosto sería de aproximadamente el 18%, cifra que en la literatura se menciona como idónea para una elevada actividad fermentativa por parte de la levadura y con la menor azúcar residual posible. De hecho es a partir de este razonamiento que se diluyen los 3 kg de sorgo en 7,6 l de agua, factor de dilución que para nada resulta azaroso aunque bien podría ser optimizado, tal y como se plantea más adelante.

El porcentaje de azúcar inicial viene representado en este caso por el ATI inicial, que como puede verse en el Cuadro 5.2, mostró siempre un valor entre el 18,06% y el 21,12%. Sin embargo, debe señalarse que las enzimas por sus características de alta estabilidad y termofilia, pudieron mantener una actividad residual durante el proceso de fermentación de 42 horas, liberando aún más azúcar. Esto se evidencia

cuando se compara la eficiencia enzimática t=0 hrs con la eficiencia enzimática t=42 hrs, siendo esta última ligeramente mayor muy probablemente debido a esta capacidad de actividad residual anteriormente mencionada. Con respecto a sendas determinaciones cabe señalar que los resultados obtenidos denotan la alta eficiencia de las enzimas empleadas puesto que para t=0 hrs las eficiencias obtenidas fueron mayores al 90% y para t=42 hrs estas fueron todas mayores al 95%.

Cuadro 5.2. Eficiencia enzimática y de fermentación de las diversas variedades de sorgo analizadas.

#	Variedad	% almidón en grano	ATI inicial	Eficiencia enzimática t=0 hrs	Eficiencia enzimática t=42 hrs	% de almidón en mosto	Eficiencia de fermentación
1	H8966	70.51	19.04	95.41	96.10	19.96	92.28
2	Brillante	72.60	19.60	95.39	97.22	20.55	87.90
3	Cs27	66.37	18.06	96.15	96.81	18.78	98.91
4	CR40030	79.94	21.02	92.91	94.89	22.62	81.59
5	Diamante	81.06	20.66	90.06	95.62	22.94	92.31
6	Oro Blanco	71.18	19.22	95.41	97.08	20.15	87.79
7	Ámbar	72.84	20.04	97.21	96.50	20.62	91.15
8	Eskameca	79.89	21.12	93.41	96.01	22.61	81.72
9	Acero	73.97	20.02	95.63	96.79	20.93	87.29
10	H82G55	79.66	21.05	93.37	95.42	22.55	82.43

Para la eficiencia enzimática en t=0 hrs, puede observarse que aquellas variedades con mayor contenido de almidón fueron las que presentaron los valores menores de eficiencia, aunque bien todos los valores fueron altos. Esto puede deberse a dos posibles situaciones, la primera de ellas que el tiempo de hidrólisis inicialmente no fue lo suficiente para la hidrólisis total del almidón presente en dichas variedades, por lo cual, un porcentaje considerable de esta hidrólisis ocurre ya iniciada la

fermentación; el segundo de ellos podría ser que producto de la alta concentración de azúcar que se logra inicialmente con estas variedades, alguna de las enzimas empleadas, en particular la AMG 300L (glucoamilasa), viese reducida su actividad por alguna inhibición debida precisamente a esta alta concentración de producto alcanzada, concentración que se verá reducida al iniciar la fermentación, ocurriendo entonces una posterior hidrólisis residual de ese azúcar que pudiese quedar remanente en forma dextrinas, lo que explica el aumento de la eficiencia enzimática en $t=42$ hrs. Esto podría visualizarse también si observamos la relación existente entre la concentración final de almidón en el mosto y el rendimiento enzimático observado en $t=0$ hrs, donde queda claro que en cuanto mayor fue la concentración, la eficiencia enzimática se vio reducida ligeramente.

Esta observación podría utilizarse como parámetro para poder individualizar el coeficiente de dilución (preparación del mosto) para cada variedad de acuerdo a su contenido de almidón, en procura de los mejores rendimientos. En ese sentido, el porcentaje de almidón óptimo para llevar a cabo la hidrólisis enzimática parece encontrarse entre el 18-21%, puesto que las variedades cuya concentración del almidón en mosto se encontró en dicho rango porcentual mostraron la mejor eficiencia enzimática para $t=0$ hrs (Cuadro 5.2), valores superiores a 21% mostraron una leve reducción de dicha variable para $t=0$ hrs. De igual forma, para el caso de la eficiencia fermentativa también se observa el mismo comportamiento obteniéndose el mejor resultado para aquella variedad cuya fermentación tuvo el ATI inicial menor (ATI inicial = 18,06%, para una eficiencia fermentativa del 98,91%), lo que podría indicar que existe no solo una cantidad de almidón óptima para una adecuada hidrólisis enzimática sino también una cantidad de azúcar óptima para una fermentación eficiente y que ambos parámetros pueden ser controlados manipulando, como anteriormente se mencionó, de una manera individual a cada variedad en lo que corresponde a su coeficiente de dilución. De la misma forma, puesto que la eficiencia enzimática se ve reflejada directamente en el valor del ATI inicial alcanzado, resulta entonces lógico suponer que la definición del coeficiente de

dilución óptimo del almidón permitirá alcanzar el valor de ATI inicial, tal que la eficiencia fermentativa sea la mejor y el almidón residual sea el menor posible, lográndose así el máximo aprovechamiento de cada kilogramo de sorgo. Por ejemplo la variedad Cs27 fue la que presentó el mejor rendimiento fermentativo con un bajo nivel de almidón residual, esto en parte debido a que esta fue la variedad que mostró tener un menor contenido de almidón en grano, lo que permitió que tanto el porcentaje de almidón en mosto (previo a la hidrólisis enzimática) y el ATI inicial (previo a la fermentación) se hallaran en los valores anteriormente mencionados. Lo mencionado busca señalar una tendencia observada en las fermentaciones realizadas, sin embargo debe complementarse con investigaciones específicas dirigidas a su correspondiente corroboración, esto puesto que los rendimientos en cuanto a fermentación son afectados por otras variables, una de ellas por ejemplo la cantidad de levaduras alcanzada durante el proceso de fermentación.

Del análisis anteriormente realizado también podría suponerse que, de las dos enzimas empleadas, Termamyl® 120L y AMG 300L (glucoamilasa), esta última constituye la responsable del incremento en el azúcar liberada, es decir del aumento en la eficiencia enzimática entre $t=0$ hrs y $t=42$ hrs. Esto debido a que para la enzima Termamyl® 120L, su rango de temperatura óptima se halla entre los 85-100 °C, por lo cual su actividad residual a temperatura de fermentación (30-35 °C) es nula. Este dato resulta de gran importancia puesto que podría considerarse alguna modificación en los tiempos dados a las enzimas durante el pretratamiento del mosto procurando alcanzar el aprovechamiento máximo del almidón disponible.

5.1.2.2. *Crecimiento de las levaduras*

Una variable de suma importancia en la obtención de buenos rendimientos en procesos de fermentación alcohólica es el tipo/cepa de levadura que se utilice para llevar a cabo dicho proceso; así en este caso, las dos cepas de levadura empleadas pertenecían a la especie *Saccharomyces cerevisiae* y sendas cepas fueron usadas en conjunto en cada fermentación. Estas cepas pertenecen a la Fábrica Nacional de

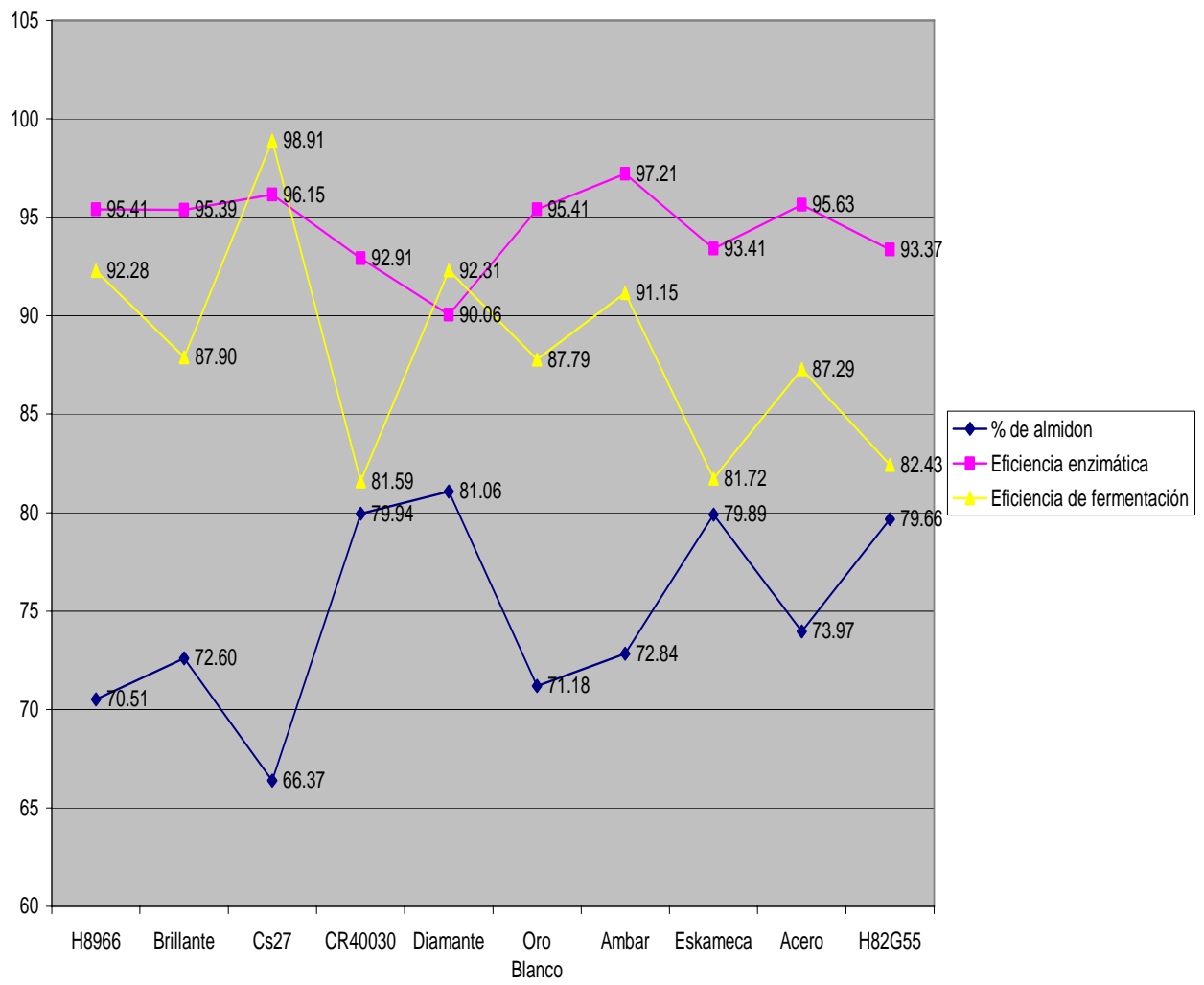
Licores y aunque fueron empleadas en las mismas condiciones en cada una de las fermentaciones realizadas (no constituyendo por ende una variable a lo interno de la investigación), se recalca este factor en vista de que si se desea industrializar la producción de etanol a partir de sorgo, debe considerarse el hecho de que los resultados expuestos en el presente trabajo fueron obtenidos empleando dichas cepas y que dichos resultados pueden variar si se emplean otras distintas, ya sea aumentando o reduciendo los rendimientos.

De igual forma, la concentración de células de levadura que logre desarrollarse durante el proceso de fermentación resulta vital para la obtención de buenos rendimientos. Por este motivo, en los procesos industriales, entre las 18-24 horas de haber iniciado el mismo, el contenido celular (de levaduras) en el mosto debe ser mayor a 130×10^6 células/ml, para que la calidad y cantidad del producto obtenido pueda considerarse como buena (González, 1955). Los resultados obtenidos en esta investigación para las diversas variedades de sorgo analizadas se presentan en el cuadro 5.3.

Cuadro 5.3. Conteo de levaduras a las 24 horas de iniciada la fermentación.

Fermentación	Variedad	Millones de lev/ml (10^6 células/ml)
1	H8966	204
2	Brillante	174
3	Cs27	237
4	CR40030	139
5	Diamante	363
6	Oro Blanco	311
7	Ámbar	289
8	Eskameca	342
9	Acero	156
10	H82G55	179

Como puede observarse, todos los valores obtenidos fueron superiores a los 139×10^6 células/ml de levaduras por mililitro, pudiéndose catalogar las fermentaciones realizadas al menos como buenas en cuanto al crecimiento celular de levaduras observado. Como puede observarse, los conteos más altos fueron obtenidos en aquellas variedades denominadas sorgos blancos, específicamente Diamante, Oro Blanco y Eskameca. Para el caso de la variedad Diamante, esta presentó el mejor porcentaje alcohólico y el mejor conteo de levaduras. Sin embargo, las otras dos variedades de sorgo blanco, Oro Blanco y Eskameca, fueron de todas las variedades analizadas las que presentaron los menores porcentajes alcohólicos. Esto viene a señalar que como anteriormente se mencionó, en términos de eficiencia fermentativa, los resultados se ven afectados por diferentes aspectos y aún más, la combinación distinta de éstos. Por ejemplo, podría suponerse que si bien para el caso de la variedad el crecimiento de las levaduras fue bueno, el alto ATI inicial que presentaron pudo tener algún efecto, o la cantidad de azúcar inicial fue más alta de lo debido para que la producción de etanol fuera la máxima en el tiempo dado, lo que indudablemente se ve reflejado en el valor numérico de la eficiencia fermentativa, ya que esta determina cuanta de la azúcar disponible inicialmente se transformó en etanol. Debe señalarse que si bien durante la fermentación puede existir actividad residual por parte de la AMG 300L (glucoamilasa), que libere mayor cantidad de azúcar a la inicialmente liberada en $t=0$ hrs; con el paso del tiempo de fermentación y la acidificación del medio, la levadura ve reducida drásticamente su capacidad de realizar la fermentación alcohólica, no pudiendo fermentar esta azúcar paulatinamente liberada; lo que podría explicar porque a pesar del repunte de la eficiencia enzimática en $t=42$ hrs, la eficiencia fermentativa no es alta para todas las variedades. Resulta entonces lógico el porque las variedades con alto contenido de almidón fueron las que mostraron menor eficiencia enzimática en $t=0$ y también la menor eficiencia fermentativa (a excepción de la variedad Diamante), tal y como muestra en la Figura 5.1.



EXCEL

Figura 5.1. Relación entre el porcentaje de almidón en grano, la eficiencia enzimática y la eficiencia fermentativa.

Por su parte, dado que las variedades de menor contenido de almidón eran precisamente las del tipo rojo, la presencia de taninos pudo haber inhibido el crecimiento inicial de las levaduras, evitando que los rendimientos fermentativos en estas variedades fueran aún mayores. De la misma forma, aquellas variedades rojas con alto contenido de almidón (CR40030 y H82G55), muestran junto con la variedad blanca Eskameca los peores rendimientos fermentativos, lo que viene a afirmar, de

igual manera, lo anteriormente mencionado, sobre como las variables ATI inicial, presencia de taninos y crecimiento celular por parte de las levaduras afectan de diversas maneras los rendimientos obtenidos.

5.1.2.3. Rendimiento fermentativo, porcentaje alcohólico y ATI final

En lo que corresponde al ATI final, es decir, esa glucosa residual que no fue transformada en etanol ni empleada por el metabolismo de la levadura para actividad celular alguna, todos los valores obtenidos fueron inferiores al 0,5%. Este dato reviste de vital importancia porque lo que con él se indica es que la pérdida de azúcar fermentable fue mínima. Resulta entonces importante señalar que las variedades cuyos coeficientes de dilución almidón/agua estuvieron entre los 18-21%, fueron los que mostraron menor ATI final o residual (Cuadro 5.4, a excepción de la variedad Diamante), de igual manera, estas fueron las variedades cuyo ATI inicial estuvo entre el 18,06 y el 20,66%.

Cuadro 5.4. Rendimientos y eficiencia fermentativa de las diversas variedades analizadas.

Prueba	Variedad	% almidón en grano	ATI inicial	ATI final	% alcohólico	Eficiencia de fermentación
1	H8966	70.51	19.04	0.29	11.35	92.28
2	Brillante	72.60	19.60	0.31	11.13	87.90
3	Cs27	66.37	18.06	0.27	11.54	98.91
4	CR40030	79.94	21.02	0.43	11.08	81.59
5	Diamante	81.06	20.66	0.30	12.32	92.31
6	Oro Blanco	71.18	19.22	0.33	10.90	87.79
7	Ámbar	72.84	20.04	0.30	11.80	91.15
8	Eskameca	79.89	21.12	0.48	11.15	81.72
9	Acero	73.97	20.02	0.31	11.29	87.29
10	H82G55	79.66	21.05	0.46	11.21	82.43

De las variedades analizadas, el mayor porcentaje alcohólico se obtuvo a partir de la variedad Diamante (sorgo blanco, 12,32%), seguido por la variedad Ámbar (sorgo rojo, 11,80%). Como puede observarse, ambas variedades mostraron un ATI inicial alto, indicando una gran disponibilidad inicial de azúcar para la fermentación. De

igual forma, ambas variedades mostraron un buen rendimiento fermentativo, superior al 90% en ambos casos. Los resultados en cuanto a rendimiento fermentativo y % alcohólico se presentan también en el Cuadro 5.4.

Las posibles razones de estas diferencias en cuanto a rendimientos se han tratado de explicar a lo largo de los anteriores apartados, sin embargo, resulta prácticamente imposible el poder concretarlas con el 100% de certeza. Al parecer, la variedad Diamante, a pesar de que mostró la menor eficiencia enzimática en t=0 hrs, alcanzó un ATI inicial y una concentración de levaduras (el conteo más alto de las 10 fermentaciones en t=24 hrs) tal que logró alcanzar el mayor porcentaje de alcohol (12,32%) con un rendimiento fermentativo superior al 90%, más alto que las otras variedades con elevado contenido de almidón, donde el ATI inicial alcanzado era bastante alto pero la producción de etanol no era la mejor, al menos en términos de rendimientos y porcentaje. Como se ha explicado ya, en estas variedades parece ser que este alto contenido de azúcar alcanzado, a pesar de los altos conteos de levaduras, ejerció algún efecto negativo sobre el metabolismo de las mismas viendo estas reducida su capacidad de producir etanol, o simplemente que la cantidad de azúcar inicialmente liberada fue demasiado alta para lograr transformarla en su totalidad antes que la caída del pH producto del mismo crecimiento de las levaduras afecte de manera drástica la producción de etanol. Parece ser que resulta vital alcanzar un ATI inicial cercano al 18% y no superior para obtener una buena eficiencia fermentativa (que puede también traducirse como la eficiencia mostrada por las levaduras para transformar azúcar en etanol), puesto que dicho valor coincide con el reportado en la literatura como contenido óptimo de glucosa en el mosto para una buena y eficiente fermentación (Stewart & Russel, 1985, Rainbow y Rose, 1963).

Los resultados obtenidos en lo correspondiente a porcentaje alcohólico no deben tomarse como la base única para recomendar una variedad; en términos generales, todas las variedades son idóneas para la producción de etanol puesto que muestran rendimientos superiores por ejemplo a los obtenidos a partir de melaza de azúcar; las pequeñas diferencias existentes entre las variedades factiblemente podrían ser

reducidas o eliminadas si se optimizan las condiciones de fermentación para cada variedad.

En términos de porcentaje alcohólico y eficiencia fermentativa, las variedades se ubican, en orden decreciente de eficiencia, tal y como lo muestra el siguiente cuadro:

Cuadro 5.5. Posición de las diversas variedades de acuerdo con el porcentaje alcohólico producido y su eficiencia fermentativa.

Posición	% alcohólico	Eficiencia fermentativa
1	Diamante	Cs27
2	Ámbar	Diamante
3	Cs27	H8966
4	H8966	Ámbar
5	Acero	Brillante
6	H82G55	Oro Blanco
7	Eskameca	Acero
8	Brillante	H82G55
9	CR40030	Eskameca
10	Oro Blanco	CR40030

Como se desprende del anterior cuadro, las variedades Diamante, Cs27, Ámbar y H8966 ocupan los primeros cuatro lugares en lo que corresponde a sendas cuantificaciones; por lo tanto, si hubiese que recomendar alguna variedad basándose única y exclusivamente en los resultados obtenidos en el presente estudio y tomando como criterio único resultados a nivel de fermentación, son estas cuatro variedades las que ofrecen los mejores resultados para la metodología empleada en la presente investigación. De dichas variedades, Diamante, Ámbar y Cs27 también habían estado entre los primeros cuatro lugares en cuanto a porcentaje alcohólico en una serie de pruebas realizadas anteriormente en los laboratorios de FANAL (Alfaro, 2005), con un fin similar al presente estudio. En este sentido, la consistencia de los resultados obtenidos permite sugerir que, en lo que a capacidad fermentativa se refiere, de las diez variedades analizadas éstas resultan las más eficientes.

Es destacable también el hecho de que de las dos variedades “más eficientes”, una pertenece al grupo de los sorgos blancos, la otra al de los sorgos rojos, mostrando que sendos tipos dan buenos rendimientos en lo concerniente a la producción de etanol. En este sentido, resulta más importante para poder recomendar una variedad con respecto a otra, la diferencia existente entre las variedades a nivel de rendimiento de cosecha por hectárea, puesto que en términos concluyentes, podría decirse que a nivel de fermentación todas las variedades son buenas y que los resultados obtenidos con el presente trabajo sólo demuestran la factibilidad de producir etanol, desde el punto de vista técnico, a partir de un grano de alto contenido de almidón como es el caso del sorgo.

En términos de rendimiento, los resultados en litros de etanol por tonelada se presentan a continuación en el Cuadro 5.6. Como puede observarse, para todas las variedades, los rendimientos se encuentran entre los 385-408 litros (l) por tonelada de sorgo, con una diferencia de 23 litros entre el menor y el mayor rendimiento.

Cuadro 5.6. Rendimiento en litros de alcohol/tonelada de grano las diversas variedades de sorgo analizadas.

Variedad	Rendimiento (l etanol/ton grano)
H8966	401.03
Brillante	393.26
Cs27	407.75
CR40030	391.49
Diamante	435.31
Oro Blanco	385.13
Ámbar	416.93
Eskameca	393.97
Acero	398.91
H82G55	396.09

Estos resultados coinciden con los reportados en otras partes. Por ejemplo Zou y Shi (2003) reportan rendimientos de 390 l etanol/tonelada de grano de sorgo y para los Estados Unidos, se reportan rendimientos similares de 385 l etanol/tonelada de grano de sorgo (USDA, 2002).

5.1.2.4. Residuos y su posible uso

Con respecto a los residuos, puede observarse una reducción fuerte de la masa inicial con respecto a la final, alcanzando algunas veces hasta el 10% del peso inicial. De igual forma, dichos residuos muestran un contenido variable de almidón residual, siendo mayor en aquellas variedades con mayor contenido de almidón, como se muestra en el cuadro 5.7. Esto constituye un problema puesto que se busca el mejor aprovechamiento de la materia prima disponible, por lo cual, altos niveles de almidón residual no resultan convenientes. Esta observación apoya la tesis, de que para las variedades de alto contenido de almidón, el coeficiente de dilución sorgo/agua debe optimizarse para cada variedad puesto que muestran el mismo comportamiento observado para la eficiencia enzimática en t=0 hrs y la eficiencia fermentativa.

Cuadro 5.7. Masa residual, porcentaje de almidón y porcentaje del peso inicial para cada variedad después de realizada la fermentación.

Fermentación	Variedad	Masa residual kg	% almidón residual	% del peso inicial remanente
1	H8966	0.450	18.32	15
2	Brillante	0.315	19.22	11
3	Cs27	0.343	18.52	11
4	CR40030	0.413	29.70	14
5	Diamante	0.429	24.81	14
6	Oro Blanco	0.302	20.64	10
7	Ámbar	0.361	21.20	12
8	Eskameca	0.412	23.20	14
9	Acero	0.385	18.49	13
10	H82G55	0.442	24.74	15

De igual forma, según los estudios de la Cooperativa de Productores de Leche Dos Pinos sobre la materia residual que se generó a partir de las fermentaciones realizadas en esta investigación, se han obtenido, para algunos casos, un derivado de grano seco con un contenido proteico de entre el 38% y el 43% (Quirós, 2006), el cual podría ser utilizado como aditivo para alimentos y concentrados para animales con muy buenos resultados, permitiendo la reducción de los costos de producción del etanol a partir de sorgo (Hamman *et al*, 2002).

Con respecto al procedimiento seguido para la recuperación del DGS hay que señalar sin embargo que por lo difícil que resulta manipular 10,6 litros de fermento pudo ocurrir alguna pérdida de residuo sólido durante el proceso de filtrado; sin embargo se procuró siempre que esta fuera lo menor posible. De igual manera, debe recordarse que en un proceso industrial la clarificación del fermento se hace mediante centrifugación, lo que permite precipitar partículas de menor tamaño a las que pueden recuperarse por filtración simple, aumentando la cantidad de DGS recuperada.

5.2. Costos

En lo concerniente a costos, existen tres componentes vitales para la producción de etanol a partir de sorgo, a saber: 1) Costos relacionados con las amilasas (los productos comerciales Termamyl® 120L y la AMG 300L), 2) Los costos de la materia prima, es decir, del sorgo y 3) Costos relacionados con el proceso de destilación.

Los costos por motivos de amilasas, utilizadas en la hidrólisis del almidón presente en el sorgo y la posterior liberación de glucosa fermentable, según la cotización número 282002 de la empresa TRISAN y siguiendo los parámetros de fermentación (concentración de cada una estas enzimas) recomendados por el fabricante de las mismas y no los utilizados experimentalmente en el presente trabajo, se requiere 1,6 litros de Termamyl® 120L y 1,2 litros de AMG 300L (glucoamilasa) por tonelada de sorgo. Cada una de estas enzimas tiene un costo de \$10,5 + IV por kilogramo y

densidad de 1,2 kg/l, para un costo por litro de \$12,61 + IV, lo que es igual a un costo final de \$14,25 por litro. Con un rendimiento promedio de 400 litros de etanol por tonelada de sorgo y un consumo de 2,8 litros de enzimas, el costo correspondiente a enzimas por litro de etanol sería de \$0,10. Estos costos son 10 veces mayores a los reportados en Estados Unidos para la producción de etanol a partir de maíz, otro grano con alto contenido amiláceo, donde dicho componente sólo aportó \$0,0365 por galón de etanol para el año 2002, es decir, un aporte de menos \$0,01 por litro (Shapouri & Gallagher, 2005) al costo de producción.

Por su parte, en lo correspondiente a costos de materia prima, basándose en los costos reportados por Tinoco (2006) y detallados en el Anexo 2, para una producción promedio estimada en 5 toneladas por hectárea y un costo por hectárea de \$567,41, el costo por tonelada de sorgo es de \$113,48, para un costo por litro de etanol de \$0,28.

El costo total por litro de etanol sería de \$0,38; sin considerar costos de destilación. Sin embargo, cabe señalar que con sorgo es posible obtener un rebrote cuyo rendimiento por lo general es del 50% del rendimiento inicial, obteniéndose un total de 7,5 toneladas por hectárea, reduciendo el costo correspondiente a materia prima a \$0,19 por litro para un costo total por litro de \$0,29. En Estados Unidos, para el periodo comprendido entre el año 1997 y el año 2003, el promedio pagado por litro de etanol fue de \$0,33. Para el 2005 por su parte, LAICA exportó desde Punta Morales alcohol a un precio de \$0,381/l (Horta, 2006).

Sin embargo, cabe señalar la importancia entonces de optimizar el proceso de hidrólisis enzimático, de modo que sea posible reducir aún más los costos. Este factor ya había sido señalado previamente; en este sentido, el aporte de la biotecnología puede ser vital para la optimización de los costos mediante la producción de este tipo de enzimas a nivel local y a un menor costo. De igual forma, el aprovechamiento y venta del DGS permitiría, de igual manera, una reducción de los costos presentados en este trabajo.

CAPÍTULO VI CONCLUSIONES

Del presente estudio correspondiente al análisis de diez distintas variedades de sorgo y sus rendimientos en la producción de etanol, se concluye que:

- La producción de etanol a partir de sorgo es técnicamente posible, como era de esperarse para una materia de alto contenido de almidón, siempre y cuando se lleve a cabo una hidrólisis enzimática previa.
- Las variedades analizadas muestran contenidos variables de almidón todos superiores al 65%, lo que las constituye en fuentes potenciales y extremadamente ricas en azúcares fermentables (glucosa libre).
- El contenido de almidón presente en el grano juega un papel importante para una alta hidrólisis enzimática inicial así como para una igualmente alta eficiencia fermentativa.
- Las variedades analizadas muestran todas después de fermentación un contenido alcohólico del fermento superior al 10,90%, indicando que son idóneas para la producción de etanol; mostrando rendimientos similares o superiores a los reportados en otras partes del mundo.
- Las diferencias observadas dentro de las variedades muy probablemente puedan reducirse si se optimiza el proceso de fermentación para cada una de ellas. En este sentido, el coeficiente de dilución inicial sorgo/agua juega un papel importante en el mejoramiento de los rendimientos. Un porcentaje de almidón en mosto de entre el 18%-21% fue el que permitió alcanzar los mejores rendimientos tanto a nivel de hidrólisis enzimática como de eficiencia fermentativa. Con la optimización de este coeficiente de dilución basado en el contenido de almidón del grano se podría alcanzar una mejoría a nivel de costos, ya que se generaría una reducción del precio

por litro de etanol así como en un aumento en los rendimientos por tonelada de sorgo.

- De las variedades analizadas bajo las condiciones seguidas en el presente trabajo y utilizando como patrón de recomendación únicamente los resultados observados en términos de fermentación, se considera como convenientes y se recomiendan para la producción de etanol a las siguientes: Cs27, Ámbar, Diamante y H8966.
- El grado de molienda del sorgo juega un papel importante para una adecuada hidrólisis enzimática; por este motivo en la presente investigación se alcanzaron rendimientos superiores a los alcanzados anteriormente en otros ensayos realizados con sorgo en la misma FANAL, donde el grado de molienda no fue el óptimo.
- Para la viabilidad industrial y comercial del proyecto los costos por motivo del empleo de enzimas (amilasas) deben reducirse aún más de modo tal que no representen la tercera parte del precio por litro del etanol producido.
- Los residuos generados después del proceso fermentativo muestran una alta capacidad para la elaboración de concentrados alimenticios para animales, lo que podría generar un ingreso adicional que permita la reducción de los costos de producción de etanol a partir de sorgo.

Estos resultados, en conjunto con los obtenidos en otras investigaciones realizadas en este mismo laboratorio, permiten señalar que desde el punto de vista experimental la metodología empleada para llevar a cabo las fermentaciones es efectiva, por lo cual podría emplearse como base en otros estudios de optimización del proceso tanto a nivel de rendimiento como de costos, dos aspectos importantes que deben considerarse a futuro si lo que se desea es llevar a cabo el proceso a escala industrial.

CAPÍTULO VII RECOMENDACIONES

Con el propósito de mejorar los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Graduación, así como para optimizar los procedimientos en él descritos, se recomienda:

- Realizar pruebas individuales para cada variedad o al menos para las cuatro que mostraron los mejores resultados, con el fin de observar si diferentes factores de dilución de la muestra permiten un mejoramiento de los rendimientos tanto a nivel de hidrólisis enzimática como a nivel de fermentación.
- Determinar el nivel de taninos presentes en las variedades denominadas del tipo rojo; el conocimiento de esta variable sería óptima para poder concluir sobre el efecto que la concentración de estas sustancias ejercen sobre la actividad fermentativa llevada a cabo por las levaduras.
- Realizar determinaciones del contenido de almidón con muestras procedentes de otros lugares y épocas, con el propósito de determinar la variabilidad del contenido de almidón del sorgo al cambiar la procedencia del mismo. En este sentido, si el contenido no es homogéneo, debe recomendarse un procedimiento fermentativo único a partir de la variedad que muestre los mejores rendimientos tanto a nivel de campo como en las propias pruebas de fermentación.
- Deben hacerse estudios con el propósito de optimizar las concentraciones de enzimas necesarias para lograr el mayor porcentaje de sacarificación del almidón presente en el sorgo, lo cual permitiría la reducción de los costos de una gran manera, teniendo en cuenta que dicho insumo constituye casi la tercera parte del costo por litro de producir etanol a partir de esta materia amilácea. En ese sentido, debe buscarse el acercamiento con otros sectores académicos con el propósito de analizar la factibilidad de producir estas enzimas en el país, siempre y cuando los

costos y la calidad del producto sean más favorables o al menos iguales a los de los suplidores extranjeros.

- Comparar los rendimientos fermentativos obtenidos en este estudio con los rendimientos específicos de cada variedad en campo; así pueden existir zonas donde las variedades idóneas sean distintas, en este sentido también podría requerirse la optimización de los procesos fermentativos para cada una de estas variedades. De este forma, dado que los rendimientos obtenidos son bastante altos, el rendimiento en campo podría resultar una variable más definitoria con respecto a la variedad a cultivar que los resultados mismos obtenidos en las presentes pruebas de fermentación.
- En lo concerniente al DGS, debe continuarse con la investigación en procura de analizar la factibilidad de uso del mismo para la elaboración de concentrados animales; de ser esto posible, dicho aspecto constituiría una posible manera de reducir los costos de producción de etanol a partir de sorgo y de igual forma permitiría el empleo de un material residual cuyo manejo podría resultar dificultoso en un proceso industrial de producción.

BIBLIOGRAFÍA

- Alfaro, B. 2005. Informe de rendimientos fermentativos de diversas variedades de sorgo, FANAL.
- Alfaro, B. 2003. Utilización de la yuca como sustituto de la melaza en la obtención de alcohol etílico, en la Fábrica Nacional de Licores. Trabajo de Graduación para optar al grado de Licenciatura en Biología con énfasis en Manejo de Recursos Naturales.
- Bean, S; Zhan, X; Wang, D; Mo, X; Sun, X.S & Boyle, D. 2006. Evaluation of ethanol production from extrusion-cooked sorghum flour. *Industrial Crops and Products*. 23:304-310.
<http://www.ars.usda.gov/research/publications/Publications.htm?seq_no_115=168506>
- Chaves, M. 2003. Producción de alcohol carburante en Costa Rica: Consideraciones sobre su potencial real de Uso. Dirección de Investigación y Extensión de la Caña de azúcar.
- Corredor, D.Y; Bean, S.R.; Schober, T.J. & Wang, D. 2005. Effect of decorticating sorghum on ethanol production and composition of distillers dry grain with solubles. Abstract No. 274 Page 154 in: Program Book of the 90th Annual Meeting of the AACC.
<http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq_no_115=178613>
- De Razor, R. 1980. Alcohol distiller`s manual for gasohol and spirits. Editorial Doña Carolina Distillers Magazine. Texas, Estados Unidos. pp. 27-51
- González, R. 1955. Procedimiento de laboratorio en la fermentación alcohólica de mieles. En: Memoria Cubana Sobre la Producción de etanol a partir de melaza de azúcar.
- Hamman, L. 2002. Economic Issues with Grain Sorghum. Department of Agricultural Economics, Kansas State University. AGMRC Magazine, August, 2002.
- Horta, L. 2006 Precios y costos para etanol combustible en América Central. Informe de la Comisión Económica para América Latina, Convenio CEPAL-República de Italia.
- Kaufman, R.C., Bean, S., Tuinstra, M. 2006. Comparison of tannins from sorghum: Differences in chemistry, biological activity and nutritional factors [abstract].

AACC International Meeting. Poster Paper No. 229.
<http://www.ars.usda.gov/research/publications/Publications.htm?seq_no_115=195361>

Lane, H y Eynon, L. 1940. Determination of reducing sugars by Fewhling`s solution with metylene blue indicador. Editorial Norman Rodger. London, United Kingdom.

Lyons, T.P. 1983. Alcohol-Power/fuel. In: Godfrey, Tony and Reichelt, Jon Editors. Industrial Enzymology, the applications of enzymes in industry. New York, USA. M. Stockton Press pp. 179-193

Madigan, M; Martinko, J & Parker, J. 2004. Biología de los microorganismos. Décima Edición, Editorial Prentice Hall. Madrid, España.

McNeil, B & Harvey, L.M. 1990. Fermentation: a practical approach. Editorial IRL. Oxford, New York pp. 1-16

Novozymes 2000. AMG and Termamyl fact sheet. Technical support. Advantages of using NovoAmylases. Novo Industrias, Denmark.

Poulson, P.B. 1983. Alcohol-Potable. In: Godfrey, Tony and Reichelt, Jon Editors. Industrial Enzymology, the applications of enzymes in industry. New York, USA. M. Stockton Press pp. 170-178

Quirós, S. 2006. Laboratorio de Control de calidad, Cooperativa Dos Pinos. Informe de composición de DGS residual de la fermentación de sorgo.

Rainbow, C & Rose, A. 1963. Biochemistry of Industrial Microorganisms. Editorial Academic Press. London, United Kingdom & New York, United States. pp. 391-395

Reichelt, J. 1986. Starch. In: Godfrey, Tony and Reichelt, Jon Editors. Industrial Enzymology, the applications of enzymes in industry. New York, USA. M. Stockton Press pp. 375-396

Sánchez, Miguel. 2000. Cultivo de sorgo granífero. En: <<http://www.ilustrados.com/publicaciones/EpylplypIVvGlnPBHt.php>>

Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos de Argentina (SAGPyA). 2000. Fermentación y destilación de maíz y sorgo en Argentina. En: <<http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/prensa/publicaciones/maiz/pag29.php>>

- Shapuri, H & Gallagher, P. 2005. USDA's 2002 Ethanol Cost-of-Production Survey U.S. Department of Agriculture, Office of the Chief Economist, Office of Energy Policy and New Uses. In: Agricultural Economic Report, Number 841. July 2005.
- Shigechi, H; Jun K; Yasuya F; Takeshi, M; Yohei ,B; Mitsuyoshi, U; Eiichi, S; Hideki, F & Akihiko K. 2004. Direct Production of Ethanol from Raw Corn Starch via Fermentation by Use of a Novel Surface-Engineered Yeast Strain Codisplaying Glucoamylase and α -Amylase. Applied and Environmental Microbiology. Aug. 2004, p. 5037–5040 Vol. 70, No. 8.
- Stewart, G.G. y Russel, I. 1985. The Biology of *Saccharomyces*. In : Demain, A.L. and Solomon, N.A. Editors. Biology of industrial microorganisms. Butterworths Publishers. Boston, USA pp. 511-534
- Tinoco, R. 2006. Costos de producción de sorgo en Costa Rica. Datos experimentales obtenidos en la Estación Experimental de Guanacaste, INTA, Costa Rica.
- Ullman, T. 1980. Enciclopedia de Química Industrial. Tomo IV. Industria Química Orgánica y sus productos. Editorial Gustavo Gilli. Madrid, España pp. 334-465
- USDA, 2002. En: Basic Steps in the Production of Ethyl Alcohol. <http://journeytoforever.org/biofuel_library/ethanol_motherearth/meCh3.html>

ANEXO 1

COSTO DE PRODUCCIÓN DE UNA HECTAREA DE SORGO

Descripción	Monto colones	Monto \$
Labores		
Preparación de terreno	45.000.00	86.54
Siembra +fertilización fórmula completa	15.000.00	28.85
Aplicación de herbicidas	20.000.00	38.46
Aplicación de insecticida	10.000.00	19.23
Fertilización nitrogenada y microelementos	10.000.00	19.23
Cosecha	35.000.00	67.30
Transporte, gastos administración, cargas	50.000.00	96.15
Subtotal	185.000.00	355.77
Productos		
Semilla	15.000.00	28.85
Fertilizante fórmula completa	36.000.00	69.23
Fertilizante nitrogenado	34.000.00	65.38
Herbicida	10.000.00	19.23
Insecticida	10.000.00	19.23
Microelementos y adherente	5.000.00	9.62
Subtotal	110.000.00	211.64
TOTAL	295.000.00	567.41

Producción estimada 5.000 kg por hectárea promedio experimental en riego y seco.

Equivalen a 108.7 sacos de 46 kilogramos

Costo del saco sin utilidad = $\text{¢}2.713.89 = \$ 5.21$

Fuente: Ing. Roberto Tinoco, INTA. 2006.