

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de ingeniería



“DETERMINACIÓN DE LA FUENTE DE NITRÓGENO Y SU CANTIDAD PARA
OPTIMIZAR LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE FERMENTACIÓN DE
JUGO DE CAÑA DE SORGO DULCE A NIVEL DE LABORATORIO”

Trabajo de graduación presentado por Natalya Maribel Hernández Son para optar al grado
académico de Licenciada en Ingeniería Química

Guatemala

2012

“DETERMINACIÓN DE LA FUENTE DE NITRÓGENO Y SU CANTIDAD PARA
OPTIMIZAR LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE FERMENTACIÓN DE
JUGO DE CAÑA DE SORGO DULCE A NIVEL DE LABORATORIO”

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de ingeniería

“DETERMINACIÓN DE LA FUENTE DE NITRÓGENO Y SU CANTIDAD PARA
OPTIMIZAR LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE FERMENTACIÓN DE
JUGO DE CAÑA DE SORGO DULCE A NIVEL DE LABORATORIO”

Trabajo de graduación presentado por Natalya Maribel Hernández Son para optar al grado
académico de Licenciada en Ingeniería Química

Guatemala

2012

CONTENIDO

CONTENIDO.....	VI
LISTA DE CUADROS	VIII
LISTA DE GRÁFICOS.....	X
LISTA DE FIGURAS	XII
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT	XIV
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES.....	2
A. Etanol.....	2
B. Usos del etanol	2
1. Combustible para automóviles.....	2
2. Preparación de bebidas	3
3. Solvente químico	3
4. Otros usos	3
C. Ventajas de producir etanol a partir de sorgo dulce en lugar de caña de azúcar	4
D. Fermentación	5
1. Levaduras.....	5
2. Fermentación alcohólica	6
3. Nutrientes de la levadura durante la fermentación	8
E. Estudios previos a cerca de la fermentación de jugo de caña de sorgo dulce para obtener etanol.....	10
III. JUSTIFICACIÓN.....	12
IV. OBJETIVOS.....	14
V. PROBLEMA A RESOLVER.....	15
VI. METODOLOGÍA	16
A. Pruebas de fermentación de jugo de caña de sorgo con diferentes fuentes de nitrógeno como nutrientes.	16

B. Pruebas de fermentación de jugo de caña de sorgo con la mejor fuente de nitrógeno en diferentes cantidades.....	16
C. Cromatografía de gases	16
D. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).....	16
VII. RESULTADOS.....	17
II. DISCUSIÓN.....	23
III. CONCLUSIONES.....	29
IV. RECOMENDACIONES	31
V. BIBLIOGRAFÍA.....	32
VI. APÉNDICE	34
A. Procedimiento.....	34
B. Datos originales	40
C. Cálculo de muestra	50
D. Datos calculados	54
E. Análisis de varianza.....	59
F. Análisis de error	63
G. Gráficos	65
H. Figuras	81

LISTA DE CUADROS

Cuadro No. 1: Estudios previos de obtención de etanol por fermentación de jugo de caña de sorgo.....	11
Cuadro No. 2: Porcentaje de etanol obtenido en cada fermentación con cada fuente de nitrógeno.....	17
Cuadro No. 3: Etanol producido y consumo de azúcares en la fermentación variando la concentración de fosfato de amonio	19
Cuadro No. 4: Fuente de nitrógeno con mayor producción de etanol.....	22
Cuadro No. 5: Especificaciones de equipo utilizado en las pruebas a nivel laboratorio	36
Cuadro No. 6: Porcentaje de nitrógeno en cada nutriente	40
Cuadro No. 7: Cantidad de la fuente de nitrógeno agregada a cada 100mL de medio en las pruebas con diferentes fuentes.....	40
Cuadro No. 8: Cantidad de fosfato de amonio agregada a cada 100mL de medio en las pruebas con diferentes concentraciones de ésta fuente de nitrógeno	41
Cuadro No. 9: Porcentaje de etanol y azúcares durante 24 horas en las muestras control...	41
Cuadro No. 10: Porcentaje de etanol y azúcares durante 24 horas en las muestras con fosfato de amonio.....	42
Cuadro No. 11: Porcentaje de etanol y azúcares durante 24 horas en las muestras con extracto de levadura.....	43
Cuadro No. 12: Porcentaje de etanol y azúcares durante 24 horas en las muestras con peptona.....	44
Cuadro No. 13: Porcentaje de etanol y azúcares durante 24 horas en las muestras con sulfato de amonio.....	45
Cuadro No. 14: Porcentaje de etanol y azúcares durante 24 horas en las muestras con baja concentración de fosfato de amonio (0.5g/100mL)	46
Cuadro No. 15: Porcentaje de etanol y azúcares durante 24 horas en las muestras con concentración media de fosfato de amonio (1.0g/100mL)	47
Cuadro No. 16: Porcentaje de etanol y azúcares durante 24 horas en las muestras con alta concentración de fosfato de amonio (1.5g/100mL)	48

Cuadro No. 17: Absorbancia y peso de las suspensiones de levadura utilizadas.....	48
Cuadro No. 18: pH de los medios utilizados en las pruebas con diferentes fuentes de nitrógeno.....	49
Cuadro No. 19: pH de los medios utilizados en las pruebas con diferentes concentraciones de fosfato de amonio.....	49
Cuadro No. 20: Concentración de levadura en la suspensión utilizada para fermentar	54
Cuadro No. 21: Porcentaje de etanol obtenido con cada fuente de nitrógeno.....	55
Cuadro No. 22: Tasa de producción de etanol con cada fuente de nitrógeno.	55
Cuadro No. 23: Porcentaje de azúcares consumidos en la fermentación con cada fuente de nitrógeno	56
Cuadro No. 24: Tasa de consumo de azúcares con cada fuente de nitrógeno.....	56
Cuadro No. 25: Porcentaje de etanol obtenido en la fermentación con diferentes concentraciones de fosfato de amonio.....	57
Cuadro No. 26: Tasa de producción de etanol en la fermentación con diferentes concentraciones de fosfato de amonio.....	57
Cuadro No. 27: Porcentaje de azúcares consumidos con en la fermentación con diferentes concentraciones de fosfato de amonio.....	58
Cuadro No. 28: Tasa de consumo de azúcares en la fermentación con diferentes concentraciones de fosfato de amonio.....	58
Cuadro No. 29: Análisis de varianza para la tasa de producción de etanol con diferentes fuentes de nitrógeno utilizando $\alpha=0.05$	59
Cuadro No. 30: Análisis de varianza para la tasa de producción de etanol con diferentes concentraciones de fosfato de amonio utilizando $\alpha=0.05$	60
Cuadro No. 31: Análisis de varianza para la tasa de consumo de azúcares con diferentes fuentes de nitrógeno utilizando $\alpha=0.05$	61
Cuadro No. 32: Análisis de varianza para la tasa de consumo de azúcares con diferentes concentraciones de fosfato de amonio utilizando $\alpha=0.05$	62

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico No. 1: Porcentaje de etanol obtenido según la fuente de nitrógeno.	17
Gráfico No. 2: Tasa de producción de etanol según la fuente de nitrógeno.....	18
Gráfico No. 3: Porcentaje de azúcares consumidos según la fuente de nitrógeno.	18
Gráfico No. 4: Tasa de consumo de azúcares en la fermentación según la fuente de nitrógeno	19
Gráfico No. 5: Porcentaje de etanol obtenido según la concentración de fosfato de amonio agregada	20
Gráfico No. 6: Tasa de producción de etanol según la concentración de fosfato de amonio agregada	20
Gráfico No. 7: Porcentaje de azúcares consumidos según la concentración de fosfato de amonio agregada	21
Gráfico No. 8: Tasa de consumo de azúcares según la concentración de fosfato de amonio	21
Gráfico No. 9: Concentración de etanol y azúcares en la fermentación de la muestra control, corrida 1	65
Gráfico No. 10: Concentración de etanol y azúcares en la fermentación de la muestra control, corrida 2	66
Gráfico No. 11: Concentración de etanol y azúcares en la fermentación utilizando fosfato de amonio como fuente de nitrógeno, corrida 1	67
Gráfico No. 12: Concentración de etanol y azúcares en la fermentación utilizando fosfato de amonio como fuente de nitrógeno, corrida 2	68
Gráfico No. 13: Concentración de etanol y azúcares en la fermentación utilizando extracto de levadura como fuente de nitrógeno, corrida 1	69
Gráfico No. 14: Concentración de etanol y azúcares en la fermentación utilizando extracto de levadura como fuente de nitrógeno, corrida 2	70
Gráfico No. 15: Concentración de etanol y azúcares en la fermentación utilizando peptona como fuente de nitrógeno, corrida 1	71
Gráfico No. 16: Concentración de etanol y azúcares en la fermentación utilizando peptona como fuente de nitrógeno, corrida 2	72

Gráfico No. 17: Concentración de etanol y azúcares en la fermentación utilizando sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, corrida 1	73
Gráfico No. 18: Concentración de etanol y azúcares en la fermentación utilizando sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, corrida 2	74
Gráfico No. 19: Concentración de etanol y azúcares en la fermentación utilizando fosfato de amonio a concentración baja (0.5g/100mL) como fuente de nitrógeno, corrida 1	75
Gráfico No. 20: Concentración de etanol y azúcares en la fermentación utilizando fosfato de amonio a concentración baja (0.5g/100mL) como fuente de nitrógeno, corrida 2.....	76
Gráfico No. 21: Concentración de etanol y azúcares en la fermentación utilizando fosfato de amonio a concentración media (1.0g/100mL) como fuente de nitrógeno, corrida 1	77
Gráfico No. 22: Concentración de etanol y azúcares en la fermentación utilizando fosfato de amonio a concentración media (1.0g/100mL) como fuente de nitrógeno, corrida 2.....	78
Gráfico No. 23: Concentración de etanol y azúcares en la fermentación utilizando fosfato de amonio a concentración alta (1.5g/100mL) como fuente de nitrógeno, corrida 1	79
Gráfico No. 24: Concentración de etanol y azúcares en la fermentación utilizando fosfato de amonio a concentración alta (1.5g/100mL) como fuente de nitrógeno, corrida 2.....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura No. 1: Curva de crecimiento microbiano	9
Figura No. 2: Procedimiento experimental de producción de etanol por fermentación de jugo de caña de sorgo dulce.....	34
Figura No. 3: Diagrama de entradas y salidas de la fermentación para la producción de etanol a partir de jugo de caña de sorgo dulce	35
Figura No. 4: Caña de sorgo dulce limpia	81
Figura No. 5: Extracción de jugo de caña de sorgo dulce	81
Figura No. 6: Caldo sabouraud para propagación de levadura.....	82
Figura No. 7: Muestras con diferentes fuentes de nitrógeno	82
Figura No. 8: Muestras con diferentes concentraciones de fosfato de amonio	83

RESUMEN

El objetivo principal de esta investigación es determinar la fuente de nitrógeno que permite obtener mayor cantidad de etanol en un tiempo definido de 24 horas de fermentación de jugo de caña de sorgo dulce. Las fuentes de nitrógeno bajo análisis fueron: peptona, extracto de levadura, sulfato de amonio y fosfato de amonio.

Cada prueba se realizó en duplicado y manteniendo las mismas condiciones de fermentación para cada medio. Asimismo se agregó cada fuente de nitrógeno en cantidades adecuadas para proveer 0.1g de nitrógeno en los 100mL de cada muestra.

Para la cuantificación de etanol se analizaron las muestras por medio de cromatografía de gases utilizando nitrógeno como gas acarreador e isopropanol como estándar interno. Se cuantificaron los azúcares por medio de cromatografía líquida de alta resolución utilizando agua como fase móvil.

Los resultados mostraron que se obtiene mayor cantidad de etanol al utilizar fosfato de amonio como fuente de nitrógeno, y a partir de ello se realizaron nuevas pruebas variando la concentración de esta fuente para determinar si existía relación entre dicha concentración y la producción de etanol.

Se concluye principalmente que la mayor cantidad de etanol se produce al fermentar el medio con mayor concentración de fosfato de amonio ($1.5003 \pm 0.0001\text{g}/100\text{mL}$). El porcentaje de etanol obtenido fue de $12.259 \pm 0.107\%$ con $78.706 \pm 3.301\%$ de consumo de los azúcares presentes en el medio. Además se obtuvo una tasa de producción de etanol de $0.091 \pm 0.001 \text{ g/Lmin}$ y una tasa de consumo de azúcares de $0.057 \pm 0.004 \text{ g/Lmin}$.

ABSTRACT

The main purpose of this research is to determine the source of nitrogen that allows higher amount of ethanol in a defined time of a 24-hours-sweet-sorghum cane-juice-fermentation. The nitrogen sources under analysis were: peptone, yeast extract, ammonium sulfate and ammonium phosphate.

Each test was carried out in duplicate and they were kept under the same fermentation conditions for each medium. Likewise, each nitrogen source was added in adequate amounts to provide 0.1g of nitrogen in each 100mL sample.

For ethanol quantification, samples were analyzed by gas chromatography using nitrogen as the carrier gas and isopropanol as the internal standard. Sugars were quantified by high performance liquid chromatography using water as the mobile phase.

The results showed that a greater amount of ethanol is obtained by using ammonium phosphate as the nitrogen source and from these results, new tests were performed varying the concentration of this source to determine if there was a relationship between this concentration and the production of ethanol.

It is mainly concluded that the greatest amount of ethanol is produced by fermenting the medium with a greater concentration of ammonium phosphate ($1.5003 \pm 0.0001\text{g}/100\text{mL}$). The percentage of ethanol obtained was $12.259 \pm 0.107\%$ with $78.706 \pm 3.301\%$ of consumption of the sugars present in the medium. Besides, it was obtained an ethanol production rate of $0.091 \pm 0.001\text{ g/Lmin}$, and a sugar consumption rate of $0.057 \pm 0.004\text{ g/Lmin}$.

I. INTRODUCCIÓN

El etanol ha sido elaborado y utilizado por el hombre por miles de años en una gran variedad de formas incluyendo comidas, medicina, relajante, como afrodisiaco, para efectos eufóricos, para propósitos recreativos, inspiración artística y ceremonias religiosas. Debido a su bajo punto de congelación se ha empleado como fluido en termómetros para medir temperaturas inferiores a -40°C . A raíz de la problemática energética actual uno de los propósitos más sobresalientes del etanol ha sido como combustible ya que es una alternativa atractiva para disminuir el uso de derivados del petróleo.

Para producir un etanol de una fuente renovable se han empleado diversos métodos, entre ellos la fermentación a partir de azúcares naturales. Dichos azúcares están presentes en plantas como la caña de azúcar y la remolacha azucarera. Recientemente ha surgido el interés por producir el etanol de otros recursos tales como el jugo de caña de sorgo dulce debido a que esta planta presenta alta resistencia a diferentes condiciones de cultivo y gran contenido de azúcares.

Muchos esfuerzos se han hecho para investigar y encontrar el microorganismo y condiciones de fermentación óptimos. En esta investigación se comprobará la efectividad de realizar la fermentación bajo las mismas condiciones utilizando diferentes fuentes de nitrógeno como nutriente y se recomendará la mejor fuente en su cantidad adecuada.

II. ANTECEDENTES

A. Etanol

El etanol es un líquido inflamable, incoloro, con un punto de ebullición de 78.4°C, punto de fusión de -114.3°C y densidad de 0.79g/cm³. Se usa en solventes, esencias, saborizantes, colorantes, medicinas, síntesis química y termómetros. Con su fórmula molecular C₂H₅OH, el etanol contiene 52% peso de carbono, 13% de hidrógeno y 35% de oxígeno. Debido a su valor calorífico, el etanol tiene una larga historia de uso como combustible para motores de combustión interna ya que es una alternativa para reemplazar los combustibles fósiles y disminuir las emisiones de dióxido de carbono. (Gupta & Demirbas 2011:73)

El etanol se prepara sintéticamente, tanto a partir del acetaldehído procedente del acetileno, como del etileno del petróleo. También se elabora a partir de los azúcares presentes en la caña de azúcar y remolacha azucarera entre otras especies que contengan azúcares fermentables, además se extrae de materiales celulósicos como la madera. El inconveniente en los materiales celulósicos es que la celulosa debe ser convertida a glucosa para luego producir etanol a partir de ella. El producto obtenido de la fermentación debe tratarse por medio de métodos que permitan purificar el etanol producido, actualmente la técnica de destilación se ha desarrollado para aumentar la concentración del etanol y por medio de ciertos agentes deshidratantes que extraen el agua residual se ha logrado producir etanol de alta pureza. (National Academy of Sciences, 1983:15)

B. Usos del etanol

1. Combustible para automóviles. Si se compara con la gasolina, el etanol tiene mayor número de octano y mayor calor de vaporización. Estas propiedades permiten una mayor tasa de compresión y menor tiempo de combustión en un motor, lo cual resulta en una mayor eficiencia. Ya que el

etanol es un combustible oxigenado se reducen las emisiones de óxidos de nitrógeno de la combustión. La desventaja del etanol es que tiene menor densidad energética que la gasolina, es corrosivo, presenta dificultad de arranque debido a su baja presión de vapor, baja luminosidad de la flama, miscibilidad con el agua y algunas toxicidades a los ecosistemas. (Gupta & Demirbas, 2011:74)

Por los aspectos descritos el etanol es de uso apropiado en una mezcla con gasolina para motores de gasolina. Hasta el 20% de etanol puede ser usado en la gasolina sin hacer modificaciones en el motor. Un alcohol al 95% puede ser usado en motores con modificaciones que incluyen el reemplazo de los componentes sensibles al alcohol. No es posible adaptar etanol a motores de diesel debido a su bajo número de cetano y alto calor de vaporización, lo que impide su ignición espontánea. (National Academy of Sciences, 1983:21) (Gupta & Demirbas, 2011:74)

2. Preparación de bebidas. El etanol es tradicionalmente usado como una sustancia bebible, con regulaciones de producción y estándares que reflejan su uso para este fin más que para combustible. (National Academy of Sciences, 1983:21)

3. Solvente químico. Existen diversos procesos en los que el etanol puede ser utilizado como solvente químico, por ejemplo en la producción de tintas, barnices, nitrocelulosa, cosméticos, fármacos y alimentos. Las pinturas, líquidos de frenos, lubricantes, pesticidas y explosivos consumen etanol en algún punto de su fabricación. Además se puede utilizar para producir acetaldehído, precursor del ácido acético, anhídrido acético, butanol y butadieno. (National Academy of Sciences, 1983:23)

4. Otros usos

a. Alumbrado y cocina. En estufas fabricadas para usar

alcoholes puede usarse etanol como combustible. La llama es limpia con baja producción de olor y humo. Además es un combustible relativamente seguro ya que tiene la ventaja sobre los combustibles derivados del petróleo en ser miscible con agua por lo que es más fácil de controlar en caso de fuegos accidentales.

Para alumbrado el etanol utilizado en lámparas produce una flama cuando se agrega una pequeña cantidad de iluminante como keroseno, aceite vegetal o grasa animal. (National Academy of Sciences, 1983:21)

b. Combustible de calderas. Es posible aprovechar el etanol como combustible de calderas, ya que los costos de conversión de una caldera a una caldera de etanol son modestos en comparación a los de una caldera de carbón; además el etanol tiene un menor factor de contaminación. (National Academy of Sciences, 1983:22)

C. Ventajas de producir etanol a partir de sorgo dulce en lugar de caña de azúcar

Las materias primas más utilizadas para la producción de alcohol son: caña de azúcar, granos de cereales (maíz, cebada, arroz), uvas, algunos tubérculos (mandioca, remolacha azucarera y papa). En la fermentación con levadura la caña de azúcar y la remolacha azucarera presentan la ventaja de de contener azúcares directamente fermentables, es decir sacarosa, glucosa y fructosa. Sin embargo el uso de estos cultivos para la producción de etanol compite con su uso como fuente de alimento. El sorgo dulce ha surgido como una fuente de azúcares fermentables para la producción de etanol que no compite con su uso alimenticio ya que dichos azúcares se encuentran en el tallo o caña de la planta y para fines alimenticios se utiliza el grano.

Otras ventajas del sorgo dulce para la producción de etanol son:

- Período de crecimiento rápido, alrededor de 4 a 5 meses.

- Es adaptable a distintos tipos de terrenos y condiciones climáticas, no sólo en trópicos sino también en regiones frías.
- Al igual que la caña de azúcar el sorgo dulce provee su propio combustible para destilación.
- El sorgo dulce puede ser cultivado en campos abandonados con una inversión relativamente baja.
- Bajo requerimiento de fertilizantes.
- Alta eficiencia del uso de agua ($\frac{1}{3}$ de lo usado para caña de azúcar y $\frac{1}{2}$ de lo usado para maíz).
- El rendimiento de la planta potencialmente es de 45 a 80 toneladas de etanol por hectárea. (Chohnan, *et al.* 2010:1) (Wu, *et al.* 2009:1)

D. Fermentación

La práctica de la fermentación se ha llevado a cabo desde tiempos antiguos. Evidencias dejadas por civilizaciones antiguas como las de Babilonia y Egipto muestran su conocimiento sobre la elaboración de pan y cerveza usando fermentación.

La palabra *ferment* significa hervir con agitación. Se deriva del latín *fermentum* (levadura) o *fermentare* (causar aumento). En un sentido amplio la fermentación incluye todos los procesos microbianos usados industrialmente o de forma casera. Además incluye los procesos de deterioro microbiológico. Las fermentaciones de forma general pueden ser divididas en fermentaciones alcohólicas por levaduras, fermentaciones ácidas por bacterias, fermentaciones alcohólicas/ácidas y fermentaciones por hongos. (Reed & Nagodawithana, 1991:2)

1. Levaduras. Una levadura es un hongo unicelular importante por su capacidad de convertir azúcares mediante fermentación para producir diversos productos. (Reed & Nagodawithana, 1991:2)

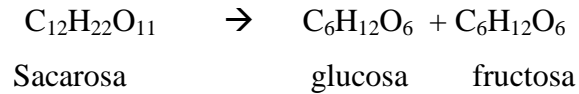
La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es la mejor levadura para fermentación y tiene la facultad de crecer en forma anaerobia. Sus células se propagan vegetativamente. Su esporulación se puede inducir en agar acetato con lo que se puede obtener de una a cuatro esporas. (Reed & Nagodawithana, 1991:20)

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* son empleadas en tres principales procesos industriales. El primero incluye la producción de bebidas alcohólicas y alcohol industrial, el segundo se refiere a la producción de levadura específicamente para cubrir las necesidades de la industria de panadería, y el tercero emplea la levadura para la producción de biomasa, extractos y compuestos para sabores. (Reed & Nagodawithana, 1991:31)

Las células de esta levadura son de forma ovoide, elipsoide o elongada con un tamaño celular de 3-7 X 4-12 μ m. Esta especie puede producir de 18 a 20% de etanol por volumen. (Reed & Nagodawithana, 1991:157)

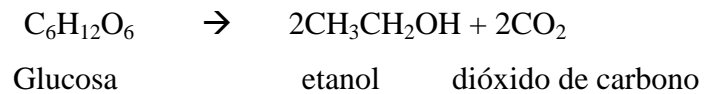
2. Fermentación alcohólica. En la fermentación alcohólica la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) convierte los azúcares simples, como la glucosa y la fructosa, en alcohol etílico y dióxido de carbono. Una gran variedad de sustratos obtenidos de especies vegetales se han utilizado para producir etanol por medio de fermentación; aquí se incluyen materias primas que contienen azúcares, fécula o celulosa. Esta fermentación es compleja ya que los cultivos impuros de levaduras producen una amplia gama de otras sustancias como el aceite de fusel, glicerina y diversos ácidos orgánicos. El líquido fermentado contiene de un 7 a 12% de etanol. Por medio de destilación puede concentrarse hasta un 95%. (Gupta & Demirbas, 2011:77)

En la primera etapa de la fermentación la enzima invertasa contenida en la levadura convierte la sacarosa en glucosa y fructosa



(Gupta & Demirbas, 2011:77)

La fermentación de glucosa usando *Saccharomyces cerevisiae* prosigue con la glicólisis a través de la cual una molécula de glucosa es metabolizada produciendo dos moléculas de piruvato, el cual bajo condiciones anaeróbicas (en ausencia de oxígeno), produce etanol y dióxido de carbono como desechos metabólicos de la levadura. La reacción que tiene lugar es:



Durante la glicólisis se producen dos moléculas de trifosfato de adenosina (ATP), las cuales son usadas para las necesidades energéticas de la síntesis celular de la levadura. El uso del ATP es necesario para continuar la fermentación sin interrupción. (Gupta & Demirbas, 2011:82)

Para fuentes como caña de azúcar, remolacha azucarera y sorgo dulce, el jugo es fermentado directamente. En el proceso de fermentación es importante la producción de etanol así como los microorganismos involucrados. Los parámetros clave del microorganismo que afectan el rendimiento del proceso son: rango de temperatura, rango de pH, tolerancia al alcohol, tolerancia a inhibidores, tolerancia osmótica, tasa de crecimiento, productividad, especificidad, rendimiento y estabilidad genética. (Gupta & Demirbas, 2011:78)

Entre las ventajas de usar *Saccharomyces cerevisiae* como microorganismo encargado de la fermentación puede mencionarse que requiere bajos niveles de pH, y tiene una alta tolerancia al etanol y otros inhibidores. (Gupta & Demirbas, 2011:79)

Generalmente la fermentación se lleva a cabo en procesos batch debido a que la exposición del microorganismo a altas concentraciones de etanol da fin al proceso. (Gupta & Demirbas, 2011:79)

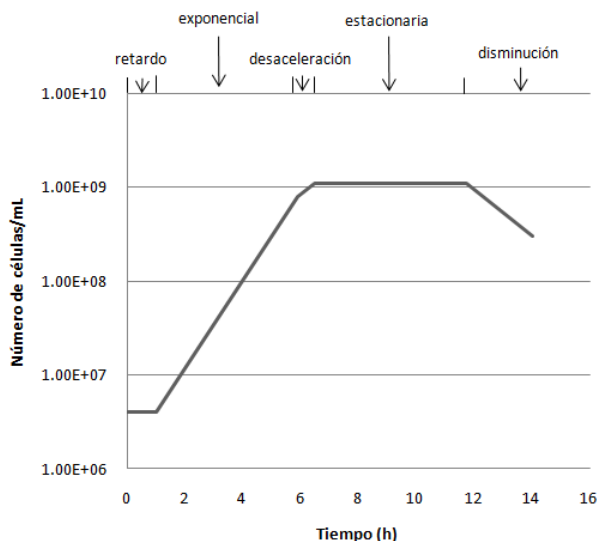
En general la producción de etanol por fermentación a partir de una fuente de glucosa debe seguir los siguientes pasos:

- a. Pre tratamiento o conversión de la materia prima en un sustrato adecuado para fermentación.
- b. Fermentación con levadura del sustrato para convertirlo a etanol y dióxido de carbono.
- c. Purificación y separación del etanol de los subproductos y desechos. (National Academy of Sciences, 1983:30)

a. Nutrientes de la levadura durante la fermentación. Debido a que el nitrógeno es utilizado para la biosíntesis de proteínas (enzimas entre otras), ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular de un microorganismo, es considerado un elemento importante como nutriente de la levadura durante la fermentación.

El crecimiento de la levadura generalmente es descrito en términos de los parámetros de la cinética asociada a las diferentes etapas de crecimiento: fase de retardo, fase de crecimiento exponencial, fase de desaceleración, fase estacionaria y de disminución (ver Figura No.1, página 11). La fuente de nitrógeno afecta el rendimiento máximo de levadura producida y el tiempo en el que la tasa de crecimiento comienza a descender. (Jitjaroen, 2007:6)

Figura No. 1: Curva de crecimiento microbiano



El nitrógeno afecta el crecimiento de la levadura y la fermentación por diferentes mecanismos. Suplementos complejos de nitrógeno pueden estimular el crecimiento de la levadura a un mayor grado que una fuente simple, además puede estimular el crecimiento de la levadura en etapas posteriores de fermentación satisfaciendo sistemas de transporte, los cuales son menos inhibidos por el etanol. El incremento resultante en la tasa de crecimiento y rendimiento de biomasa es acompañado de mayores tasas de fermentación. (Jitjaroen, 2007:6)

Baja concentración de nitrógeno inicial causa agotamiento y la tasa de crecimiento de la levadura disminuye rápidamente. La tasa de producción de dióxido de carbono máxima es directamente proporcional a la concentración inicial de nitrógeno en el medio. Concentraciones intermedias de nitrógeno tienen un efecto neutral mientras una baja concentración inicial reduce la producción de dióxido de carbono. (Jitjaroen, 2007:6)

El nitrógeno inorgánico puede ser suministrado como gas de amonio, sales de amonio o nitratos. Las sales de amonio como el sulfato de amonio usualmente producirán condiciones ácidas. (Stanbury, *et al.* 1995:101)

El nitrógeno orgánico puede ser suministrado como aminoácido, proteína o urea. Pueden utilizarse peptonas como fuentes de proteínas hidrolizadas derivadas de la caseína, de carne o de plantas ya que en formulaciones apropiadas intensifican el crecimiento del microorganismo. Algunos compuestos que pueden utilizarse como fuentes de nitrógeno incluyen harina de soya, harina de maní, harina de semilla de algodón y extracto de levadura debido a su contenido de aminoácidos y otros nutrientes como vitaminas del complejo B. (Stanbury, *et al.* 1995:101)

En mezclas de fuentes de nitrógeno, los componentes individuales de nitrógeno pueden influenciar la regulación metabólica, por lo que hay asimilación preferencial por un componente hasta que su concentración haya disminuido. (Stanbury, *et al.* 1995:103)

E. Estudios previos a cerca de la fermentación de jugo de caña de sorgo dulce para obtener etanol

Muchos esfuerzos se han realizado para identificar las mejores condiciones de fermentación para optimizar la producción de etanol a partir de jugo de caña de sorgo dulce. Sin embargo el uso de las fuentes de nitrógeno ha sido variado tanto en fuente como en cantidad utilizada. Algunos de los estudios realizados se muestran en el siguiente cuadro:

Cuadro No. 1: Estudios previos de obtención de etanol por fermentación de jugo de caña de sorgo.

Autor	Condiciones de fermentación	Nutrientes agregados	Tasa de producción de etanol (g/Lmin)
Dávila <i>et al</i>	Normales	19 a 39 mg/L de nitrógeno libre de amina	0.05928
Guigou <i>et al</i>	Normales	3 g/L de extracto de levadura, 3 g/L de extracto de malta y 5 g/L de peptona	0.09649
Khongsay <i>et al</i>	Normales	0.5% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.03333
Laopaiboon, Thanonkeo <i>et al</i>	Fermentación por lote	0.5% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.01833
Laopaiboon, Nuanpeng <i>et al</i>	Gravedad muy alta	3 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de peptona	0.06785
Shen Liu <i>et al</i>	Levadura (<i>S. cerevisiae</i>) inmovilizada	10g/100mL de glucosa, 0.5g/100mL de extracto de levadura, 0.5 g/100mL de peptona, 0.1g/100mL de K_2HPO_4 y 0.1g/100mL de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.08810
Yue <i>et al</i>	Gravedad muy alta	3.77 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /L	0.05200

III. JUSTIFICACIÓN

Los combustibles derivados del petróleo han tenido una posición dominante como fuentes de energía debido a que inicialmente fueron de fácil obtención y bajo costo. A partir del alza del precio del petróleo y el descenso de su calidad como combustible se han buscado nuevas fuentes de energía. El conocimiento de las necesidades actuales y futuras de energía, y el potencial de los recursos es la base para elaborar un programa de energía a partir de biomasa. Alternativas como el uso de alcohol son objeto de estudio y se consideran las propiedades del sorgo como cultivo bioenergético.

Se propone la producción de etanol a partir de la fermentación del jugo de caña de sorgo dulce debido a su alto contenido de azúcares. La resistencia del sorgo a la sequía y al calor lo hace un cultivo importante en regiones áridas, y es uno de los cultivos alimentarios más importantes del mundo ya que su semilla representa el principal grano en algunas partes de África, Asia, India y China donde constituye gran parte de la dieta humana. Esta semilla se emplea también en alimentación animal, en la producción de forrajes y para la elaboración de bebidas alcohólicas.

En lo que se refiere a la fermentación la nutrición de los microorganismos tiene gran valor práctico ya que una célula viva requiere una fuente de energía y materiales a partir de los cuales sus componentes puedan ser sintetizados.

Se hace énfasis en mayor rapidez de la fermentación dependiendo de la fuente de nitrógeno agregada. Este elemento juega un papel importante para cualquier célula porque se involucra en la estructura, actividades sintéticas y catabólicas, y en las sustancias que determinan cómo debe comportarse la célula.

Por esta razón es conveniente estudiar y determinar la fuente de nitrógeno que proporciona mayores beneficios a la levadura para producir la mayor cantidad de etanol en el menor tiempo.

IV. OBJETIVOS

A. Objetivo general

1. Determinar la fuente de nitrógeno y su cantidad ideal para maximizar la producción de etanol a partir de la fermentación de jugo de caña de sorgo dulce.

B. Objetivos específicos

1. Establecer el porcentaje de etanol obtenido al fermentar jugo de caña de sorgo dulce y utilizar como fuente de nitrógeno fosfato de amonio en un período de 24 horas.
2. Determinar el porcentaje de etanol obtenido al fermentar jugo de caña de sorgo dulce y utilizar como fuente de nitrógeno extracto de levadura en un período de 24 horas.
3. Definir el porcentaje de etanol obtenido al fermentar jugo de caña de sorgo dulce y utilizar como fuente de nitrógeno peptona en un período de 24 horas.
4. Especificar el porcentaje de etanol obtenido al fermentar jugo de caña de sorgo dulce y utilizar como fuente de nitrógeno sulfato de amonio en un período de 24 horas.

V. PROBLEMA A RESOLVER

Dado que la producción del etanol a partir del jugo de caña de sorgo dulce se realiza por medio de fermentación, se pretende encontrar la mejor fuente de nitrógeno para optimizar la producción de etanol durante este proceso y describir la variación de dicha producción con respecto a la variación en la cantidad de nitrógeno agregado. Esto debido a que recientemente se han realizado esfuerzos por aprovechar el jugo obtenido de la caña de sorgo dulce, especialmente para producir etanol ya que la semilla es aprovechada para consumo humano y animal. Cabe resaltar que esta producción no pone en riesgo la seguridad alimentaria y se aprovechan las facilidades de cultivo del sorgo dulce.

VI. METODOLOGÍA

A. Pruebas de fermentación de jugo de caña de sorgo con diferentes fuentes de nitrógeno como nutrientes.

El objetivo de estas pruebas fue encontrar la fuente de nitrógeno que mejora la producción de etanol en un tiempo definido, en un medio con la misma cantidad de azúcares fermentables disponibles. Las fuentes de nitrógeno a analizar fueron: fosfato de amonio, peptona, extracto de levadura y sulfato de amonio; todas comparadas con una prueba control. Cada fermentación se realizó utilizando levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*).

B. Pruebas de fermentación de jugo de caña de sorgo con la mejor fuente de nitrógeno en diferentes cantidades.

Una vez seleccionada la mejor fuente de nitrógeno se realizaron nuevas fermentaciones variando la concentración de dicha fuente para comprobar si existía alguna relación entre la cantidad de nitrógeno agregada al medio y el porcentaje de etanol obtenido. Se utilizó levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*) para cada prueba.

C. Cromatografía de gases

Cada muestra obtenida durante la fermentación fue centrifugada para eliminar impurezas. Se cuantificó el etanol presente en cada una por medio de cromatografía de gases con nitrógeno como gas acarreador para obtener resultados exactos y precisos.

D. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

Cada muestra fue filtrada e ingresada al equipo de cromatografía líquida utilizando agua como fase móvil para cuantificar azúcares presentes de forma exacta y precisa.

VII. RESULTADOS

A. Etanol obtenido en cada fermentación.

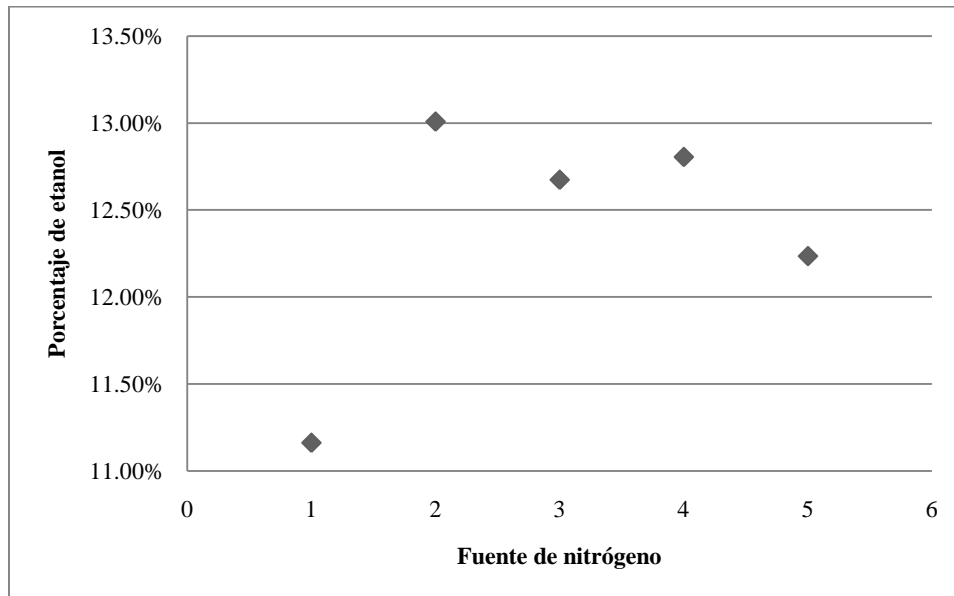
Cuadro No. 2: Porcentaje de etanol obtenido en cada fermentación con cada fuente de nitrógeno

No.	Fuente de nitrógeno	Concentración de nitrógeno (g/100 mL)	Porcentaje de etanol final	Tasa de producción de etanol (g/Lmin)	Porcentaje de azúcares consumidos	Tasa de consumo de azúcares (g/Lmin)
1	-	-	11.162 ± 0.740 %	0.081 ± 0.005	89.009 ± 4.057 %	0.074 ± 0.007
2	Fosfato de amonio	0.1003 ± 0.0000	13.008 ± 0.206 %	0.094 ± 0.001	92.080 ± 1.844 %	0.081 ± 0.000
3	Extracto de levadura	0.1001 ± 0.0001	12.674 ± 0.115 %	0.092 ± 0.001	96.652 ± 0.624 %	0.085 ± 0.001
4	Peptona	0.1002 ± 0.0001	12.805 ± 0.969 %	0.093 ± 0.007	81.363 ± 4.499 %	0.070 ± 0.003
5	Sulfato de amonio	0.1009 ± 0.0001	12.235 ± 0.032 %	0.089 ± 0.000	77.844 ± 4.520 %	0.068 ± 0.003

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

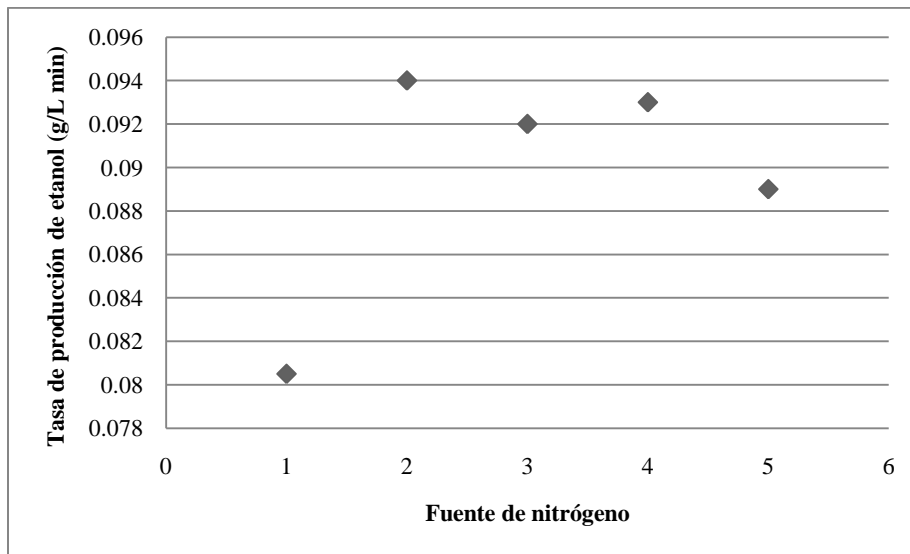
B. Dispersión del porcentaje etanol obtenido según la fuente de nitrógeno.

Gráfico No. 1: Porcentaje de etanol obtenido según la fuente de nitrógeno.



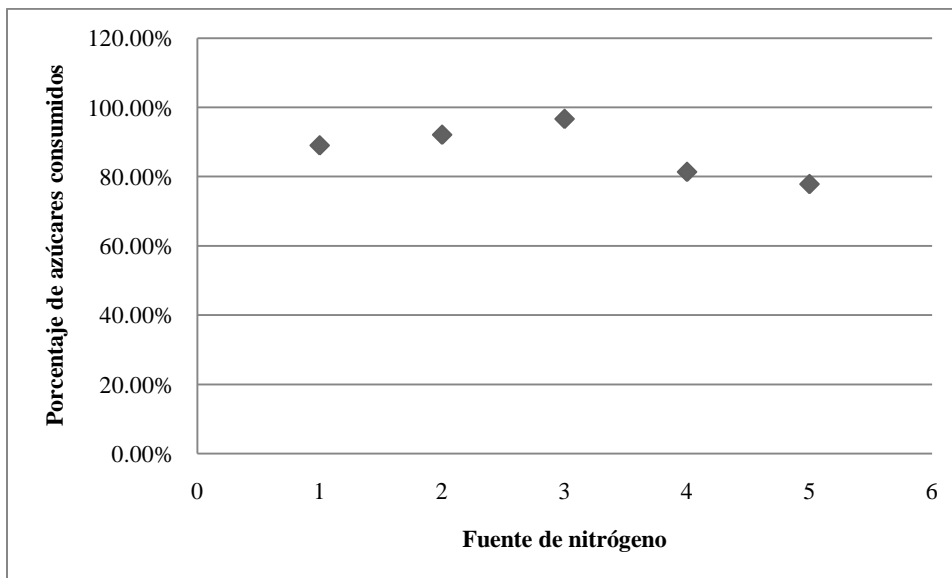
C. Dispersión de la tasa de producción de etanol en la fermentación con cada fuente de nitrógeno.

Gráfico No. 2: Tasa de producción de etanol según la fuente de nitrógeno.



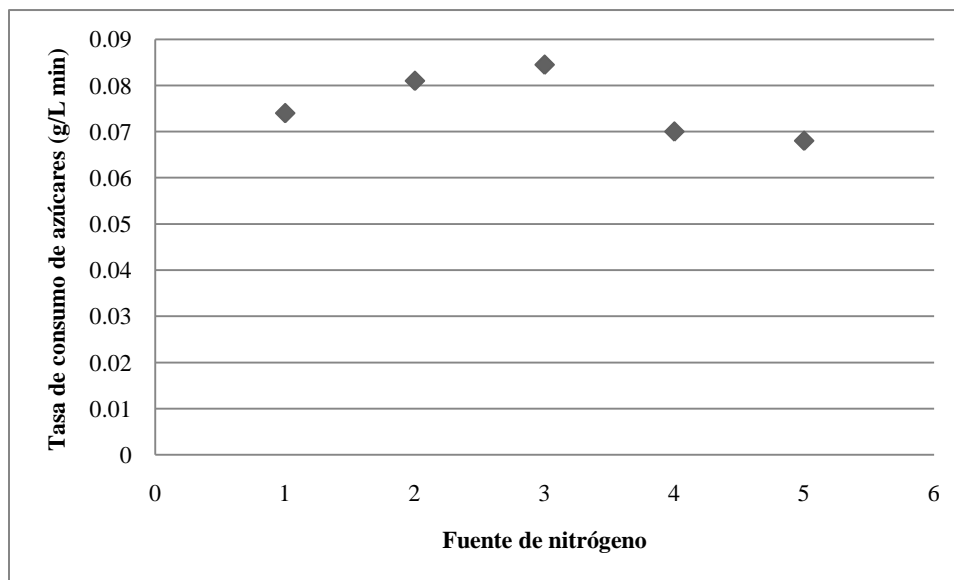
D. Dispersión del porcentaje de los azúcares consumidos en la producción de etanol en los frascos con cada fuente de nitrógeno.

Gráfico No. 3: Porcentaje de azúcares consumidos según la fuente de nitrógeno.



E. Dispersión de la tasa de consumo de azúcares en la fermentación según la fuente de nitrógeno.

Gráfico No. 4: Tasa de consumo de azúcares en la fermentación según la fuente de nitrógeno



F. Etanol obtenido en cada fermentación variando la concentración de fosfato de amonio

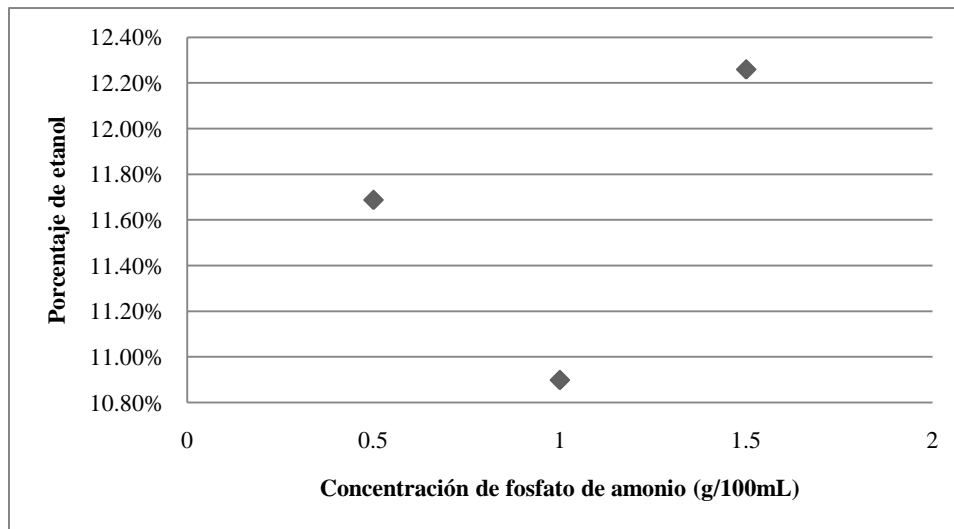
Cuadro No. 3: Etanol producido y consumo de azúcares en la fermentación variando la concentración de fosfato de amonio

No.	Concentración de fosfato de amonio (g/100 mL)	Porcentaje de etanol final	Tasa de producción de etanol (g/Lmin)	Porcentaje de azúcares consumidos	Tasa de consumo de azúcares (g/Lmin)
1	0.5003 ± 0.0003	11.687 ± 0.656 %	0.086 ± 0.005	75.200 ± 4.081 %	0.057 ± 0.004
2	1.0065 ± 0.0007	10.898 ± 0.363 %	0.080 ± 0.003	78.706 ± 2.113 %	0.058 ± 0.001
3	1.5003 ± 0.0001	12.259 ± 0.108 %	0.091 ± 0.001	78.706 ± 3.301 %	0.057 ± 0.004

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

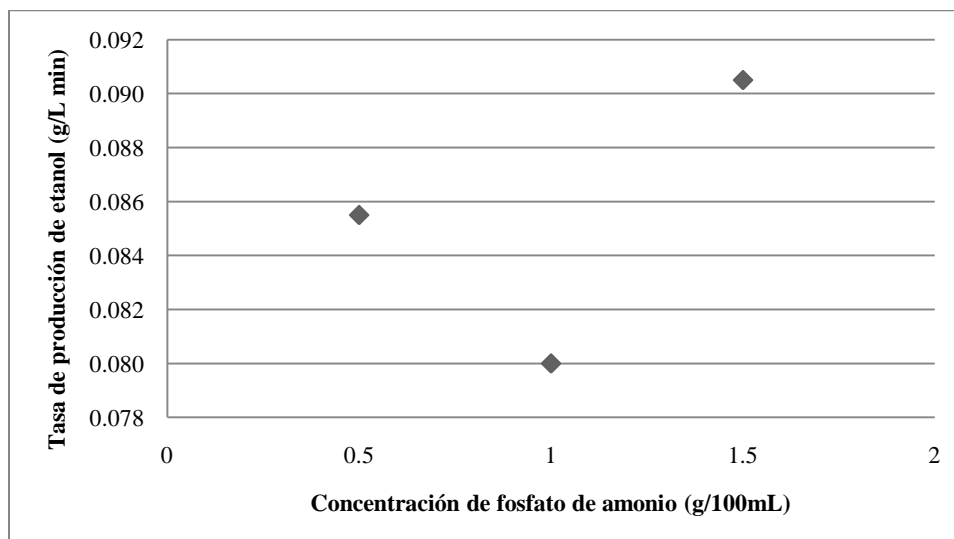
G. Dispersión del porcentaje de etanol obtenido en cada fermentación con variación en la cantidad de fosfato de amonio

Gráfico No. 5: Porcentaje de etanol obtenido según la concentración de fosfato de amonio agregada



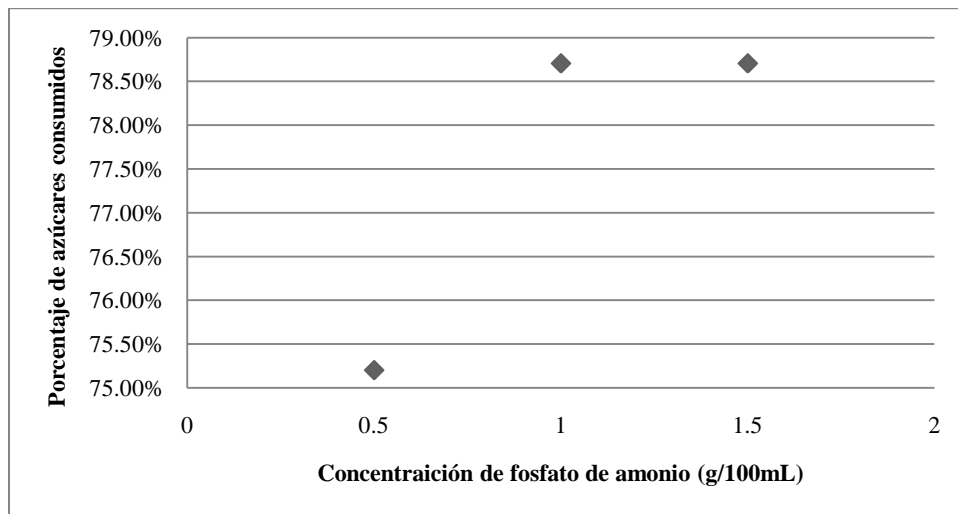
H. Dispersión de la tasa de producción de etanol en cada fermentación con variación en la cantidad de fosfato de amonio

Gráfico No. 6: Tasa de producción de etanol según la concentración de fosfato de amonio agregada



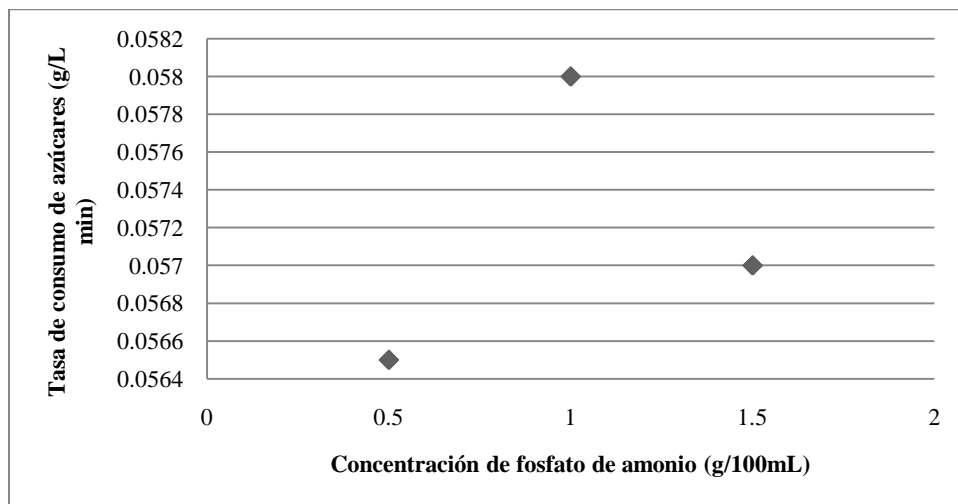
- I. Dispersión del porcentaje de los azúcares consumidos en la producción de etanol en cada fermentación con variación en la cantidad de fosfato de amonio

Gráfico No. 7: Porcentaje de azúcares consumidos según la concentración de fosfato de amonio agregada



- J. Dispersión de la tasa de consumo de azúcares en cada fermentación con variación en la cantidad de la mejor fuente de nitrógeno.

Gráfico No. 8: Tasa de consumo de azúcares según la concentración de fosfato de amonio



K. Determinación de la mejor fuente de nitrógeno y su cantidad óptima en la producción de etanol a partir de jugo de caña de sorgo dulce.

Cuadro No. 4: Fuente de nitrógeno con mayor producción de etanol

Fuente de nitrógeno	Concentración de fosfato de amonio (g/100mL)	Porcentaje de etanol final	Porcentaje de azúcares consumidos
Fosfato de amonio	1.5003 ± 0.0001	12.259 ± 0.107 %	78.706 ± 3.3011 %

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

VIII. DISCUSIÓN

Existe un gran número de fuentes de nitrógeno posibles a poner a prueba como nutrientes en fermentación, pero a través de las fuentes seleccionadas en esta investigación se constituye un grupo representativo de las fuentes más usadas en el laboratorio e industria, además son fuentes de buena disponibilidad. Para determinar la mejor fuente de nitrógeno como nutriente para la fermentación de jugo de caña de sorgo dulce se tomaron en cuenta cuatro fuentes que son: fosfato de amonio, extracto de levadura, peptona y sulfato de amonio.

Las fuentes puestas a prueba incluyen tanto orgánicas como inorgánicas y por lo tanto en cada una se verificó que el pH del medio al agregar cada reactivo no presentara una variación muy drástica y fuera adecuado para el desempeño de la levadura. Según el Cuadro No. 18 y No. 19 (página 49) todas las mediciones evidenciaron pH ácido entre 4.4 y 5.2 lo cual provee condiciones del medio aceptables para la levadura y por lo tanto no fue necesario hacer ningún ajuste al medio.

Cada prueba se realizó en 100mL de jugo de caña de sorgo dulce y se agregaron las fuentes de nitrógeno en cantidades que garantizaran que su aporte de nitrógeno fuera de 0.1g en el medio, debido a la relación de carbono y nitrógeno que requiere el microorganismo para el metabolismo de enzimas, de esta manera se pueden comparar claramente los efectos de cada fuente en el medio sin considerar los efectos de la cantidad de nitrógeno que cada una aporta.

Fue importante someter a esterilización tanto el caldo de cultivo de levadura como los medios de jugo de caña de sorgo a fermentar con el fin de evitar la acción de microorganismos presentes en los medios que afectarían la fermentación y competirían con la levadura por el consumo de azúcares. La fermentación se llevó a cabo en medios sin agitación para evitar

aumentar la cantidad de oxígeno disuelto en el medio y propiciar en la levadura la producción de etanol por medio de un proceso anaerobio.

Además de las pruebas realizadas con fuentes adicionales de nitrógeno se realizó una prueba control (sin nitrógeno adicional) con el fin de comprobar que la adición de dicho nutriente afecta la producción de etanol en la fermentación. Todas las pruebas mostraron mayor producción de etanol que la prueba control, la cual mostró $11.162 \pm 0.740\%$ de etanol luego de la fermentación durante 24 horas.

Los resultados obtenidos para la tasa de producción de etanol con cada una de las fuentes de nitrógeno son notablemente mayores a los valores extraídos en la literatura descritos en el Cuadro No. 1 (página 11), superados únicamente por el ensayo elaborado por Guigou *et al*, que utiliza una combinación de extracto de levadura, extracto de malta y peptona en el medio de fermentación y obtiene una tasa de producción de etanol de 0.09649 g/Lmin .

A. Etanol obtenido al utilizar fosfato de amonio como fuente de nitrógeno

Como puede observarse en el Gráfico No. 1 (página 17) el porcentaje final de etanol luego de la fermentación durante 24 horas es notablemente mayor en las pruebas realizadas con fosfato de amonio dando como resultado $13.008 \pm 0.206\%$ con una tasa de producción de etanol de 0.094 g/Lmin . Sin embargo los valores relacionados con el consumo de azúcares quedan en segundo plano, ya que se obtiene $92.080 \pm 1.844\%$ de azúcares consumidos con una tasa de consumo de $0.081 \pm 0.000 \text{ g/Lmin}$, que son valores menores a los obtenidos en las pruebas con extracto de levadura.

B. Etanol obtenido al utilizar extracto de levadura como fuente de nitrógeno

Las pruebas con extracto de levadura muestran el mayor consumo de azúcares, siendo éste $96.652 \pm 0.624\%$ con una tasa de consumo de 0.085 g/Lmin . Sin embargo los valores obtenidos para la producción de etanol son de $12.674 \pm 0.115\%$ con una tasa de producción de 0.092 g/Lmin , que son

valores menores a los obtenidos en las pruebas con fosfato de amonio. Ver Cuadro No. 2 (página 17).

C. Etanol obtenido al utilizar peptona como fuente de nitrógeno

Utilizando peptona como fuente de nitrógeno se obtuvo el segundo mayor porcentaje de producción de etanol, con un valor de $12.805 \pm 0.969\%$ y una tasa de producción de 0.093 ± 0.007 g/Lmin. El porcentaje de azúcares consumidos fue de $81.363 \pm 4.499\%$ con una tasa de consumo de 0.070 g/Lmin. Ver Cuadro No. 2 (página 17).

D. Etanol obtenido al utilizar sulfato de amonio como fuente de nitrógeno

Los resultados de las pruebas con sulfato de amonio fueron los más bajos tanto en producción de etanol como en consumo de azúcares. Se obtuvo $12.235 \pm 0.032\%$ de etanol con una tasa de producción de 0.089 ± 0.000 g/Lmin, el porcentaje de azúcares consumidos fue de $77.844 \pm 4.520\%$ con una tasa de consumo de 0.068 ± 0.003 g/Lmin. Ver Cuadro No. 2 (página 17).

E. Elección de la mejor fuente de nitrógeno

Los resultados obtenidos agregando nitrógeno como nutriente en la fermentación de jugo de caña de sorgo dulce son mayores a los valores típicos de fermentación sin fuente de nitrógeno, ya que en un período de 24 horas de fermentación estos valores se encuentran entre 4.2 y 11.2% de etanol producido dependiendo de las condiciones de fermentación. Esto demuestra que la adición de una fuente de nitrógeno contribuye a una fermentación más rápida ya que en 24 horas se obtuvo de $12.235 \pm 0.032\%$ a $13.008 \pm 0.206\%$ de etanol.

De acuerdo a los resultados observados en el Cuadro No. 2 (página 17) se determinó que la mejor fuente de nitrógeno para optimizar la producción de etanol es el fosfato de amonio ya que el porcentaje de etanol producido es el mayor en relación a las demás fuentes y asciende a $13.008 \pm 0.206\%$ luego de 24 horas de fermentación. A partir de estos resultados se realizaron nuevas

pruebas en las que se buscó diferenciar el efecto de la concentración de ésta fuente de nitrógeno en la fermentación.

En las pruebas realizadas con diferentes concentraciones de fosfato de amonio se consideraron tres concentraciones teóricas que son 0.5g/100mL, 1.0g/100mL y 1.5g/100mL. Experimentalmente se trabajó con concentraciones ligeramente mayores a los valores teóricos debido al error de medición del reactivo a agregar.

De acuerdo al Gráfico No. 5 (página 20) se puede observar que con una concentración inicial de 0.5003 ± 0.0003 g de fosfato de amonio en 100mL del medio se obtuvo $11.687 \pm 0.656\%$ de etanol y al utilizar una concentración de 1.0065 ± 0.0007 g/100mL el porcentaje de etanol obtenido fue de $10.898 \pm 0.363\%$. Esta variación indica que no hay aumento significativo en la cantidad de etanol producido al aumentar la concentración de fosfato de amonio de 0.5003 ± 0.0003 g/100mL a 1.0065 ± 0.0007 g/100mL, pero si puede observarse un aumento notable al incrementar ésta concentración a 1.5003 ± 0.0001 g/100mL ya que se obtuvo $12.259 \pm 0.107\%$ de etanol.

En lo relacionado a la tasa de producción de etanol se observa en el Gráfico No. 6 (página 20) que el mayor valor se obtiene con la concentración más alta de fosfato de amonio puesta a prueba, siendo ésta tasa de producción 0.091 ± 0.001 g/Lmin. Además, en el Gráfico No. 7 (página 21) se observa que el porcentaje de azúcares consumidos es mayor en las dos concentraciones mayores de fosfato de amonio y sus valores son muy similares, $78.706 \pm 2.133\%$ y $78.706 \pm 3.301\%$ respectivamente. Se observa que la tasa de consumo de azúcares es muy similar para las tres pruebas y su variación puede deberse a que los resultados experimentales se aproximan a un modelo lineal ideal.

F. Análisis de varianza en la producción de etanol y consumo de azúcares

Los resultados de las tasas de producción de etanol y consumo de azúcares fueron sometidos a un análisis de varianza para determinar la existencia de una diferencia estadística entre ellos. Para dicho análisis se tomó en cuenta un nivel

de significación α de 0.05 y los resultados de la prueba de Fisher tomando como estadístico de prueba el valor F. En el Cuadro No. 29 (página 59) pueden observarse los valores calculados para este análisis con respecto a la tasa de producción de etanol con diferentes fuentes de nitrógeno y se observa que el valor del estadístico F es de 3.82, que se compara con el valor F crítico obtenido de una tabla de valores teóricos de acuerdo al nivel de significación establecido y a los grados de libertad considerados en la prueba. El valor del F crítico es de 5.19 que es mayor que el 3.82 obtenido del análisis por lo que se concluye que no puede rechazarse la hipótesis nula que indica que las medias de tasa de producción de etanol son iguales utilizando diferentes fuentes de nitrógeno. Este análisis no puede asegurar que una fuente de nitrógeno sea mejor que otra porque la variación en la producción de etanol fue mínima. Sin embargo la elección de la mejor fuente de nitrógeno para la fermentación de jugo de caña de sorgo dulce se realiza en base a los resultados observados en el Cuadro No. 2 (página 17) y se determina que la mejor fuente es el fosfato de amonio.

El análisis de varianza se llevó a cabo de la misma forma para la tasa de consumo de azúcares utilizando diferentes fuentes de nitrógeno y puede observarse en el Cuadro No. 30 (página 60) que su valor de F es de 1.88, el cual es notablemente menor que el F crítico de 5.19, por lo que se concluye de manera similar que para la tasa de producción de etanol, que no puede asegurarse que la tasa de consumo de azúcares sea diferente usando distintas fuentes de nitrógeno; y por los resultados observados experimentales se establece que la mejor fuente de nitrógeno para la fermentación es el fosfato de amonio.

Luego de determinar que el fosfato de amonio provee mejores resultados se llevaron a cabo las pruebas con ésta fuente a diferentes concentraciones y se estudiaron bajo el mismo análisis de varianza. Como puede observarse en el Cuadro No. 31(página 61) y No. 32 (página 62), los valores de F son menores

que el valor F crítico tanto para la tasa de producción de etanol como para la tasa de consumo de azúcares, y por lo tanto se concluye que a pesar de que el análisis estadístico no muestra una diferencia significativa entre las pruebas con variación de concentración de la fuente de nitrógeno, los resultados experimentales indican que se obtiene mayor tasa producción de etanol y consumo de azúcares a mayor concentración de fosfato de amonio en el medio.

IX. CONCLUSIONES

- A. Al utilizar fosfato de amonio como fuente de nitrógeno en la fermentación de jugo de caña de sorgo dulce se obtuvo $13.008 \pm 0.206\%$ de etanol producido en 24 horas.
- B. Al utilizar extracto de levadura como fuente de nitrógeno en la fermentación de jugo de caña de sorgo dulce se obtuvo $12.647 \pm 0.115\%$ de etanol producido en 24 horas.
- C. Al utilizar peptona como fuente de nitrógeno en la fermentación de jugo de caña de sorgo dulce se obtuvo $12.805 \pm 0.969\%$ de etanol producido en 24 horas.
- D. Al utilizar sulfato de amonio como fuente de nitrógeno en la fermentación de jugo de caña de sorgo dulce se obtuvo $12.235 \pm 0.032\%$ de etanol producido en 24 horas.
- E. Agregando nitrógeno a la fermentación se obtuvo un rango de etanol producido entre $12.235 \pm 0.032\%$ y $13.008 \pm 0.206\%$, lo cual es mayor que lo obtenido de la prueba control donde se produjo $11.162 \pm 0.740\%$ de etanol.
- F. La mejor fuente de nitrógeno en la fermentación de jugo de caña de sorgo dulce durante 24 horas fue fosfato de amonio, ya que produjo $13.008 \pm 0.206\%$ de etanol.

- G. Al variar la concentración de fosfato de amonio en el medio de fermentación la mayor concentración de etanol se obtuvo al utilizar 1.5003 ± 0.0001 g de fosfato de amonio en 100mL del medio cuyo resultado fue $12.259 \pm 0.107\%$ de etanol con una tasa de producción de 0.091 ± 0.001 g/Lmin.
- H. Al utilizar 1.5003 ± 0.0001 g de fosfato de amonio en 100mL del medio la tasa de producción de etanol fue de 0.091 ± 0.001 g/Lmin y la tasa de consumo de azúcares fue de 0.057 ± 0.004 g/Lmin
- I. Al utilizar 1.5003 ± 0.0001 g de fosfato de amonio en 100mL del medio el porcentaje de azúcares consumidos fue de $78.706 \pm 3.301\%$

X. RECOMENDACIONES

- A. Verificar que la densidad óptica de la levadura utilizada en la fermentación no sea menor a 1.600 basada en la absorbancia a 540 nm leída por un espectrofotómetro UV-visible.
- B. Llevar a cabo las fermentaciones a 30°C sin agitación para evitar aumentar la cantidad de oxígeno disuelto en el medio y favorecer la producción de etanol.
- C. Extraer muestras de los medios en períodos de tiempo específicos que permitan obtener datos igualmente distribuidos de las 24 horas de fermentación, y de esa forma generar un modelo lineal más exacto.
- D. Realizar fermentaciones a nivel planta piloto en triplicado utilizando fosfato de amonio como fuente de nitrógeno.
- E. Evaluar a nivel planta piloto los factores económicos de utilizar fosfato de amonio como fuente de nitrógeno en la fermentación.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Alcohol Fuels. Options for Developing Countries. 1983. National Academy of Sciences. United States of America 109 págs.

Chohnan, Shigeru, *et al.* 2010. «Fuel ethanol production from sweet sorghum using repeated-batch fermentations». *Bioscience and bioengineering* . (536): 1-4.

Dávila-Gómez, F. J., *et al.* 2011. «Evaluation of bioethanol production for five different varieties of sweet and forage sorghums (*Sorghum bicolor* (L) Moench)» *Industrial Crops and Products* (33): 611-616

Guigou, Mairan, *et al.* 2011. «Bioethanol production from sweet sorghum: Evaluation of post-harvest treatments on sugar extraction and fermentation» *Biomass and Bioenergy* (35): 3058-3062

Gupta, Ram, & Demirbas, Ayhan. 2011. *Gasoline, Diesel, and ethanol Biofuels form Grasses and Plants.* Cambridge. Cambridge University Press. 512 págs.

Jitjaroen, Wanphen. 2007. *Influence of yeast strains and nutritive supplementson enological characteristics of tropical fruit wines.* Gottingen. Cuvillier Verlag. 420 págs.

Khongsay, Naulchan, *et al.* 2010. «Growth and Batch Fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* on Sweet Sorghum Juice under Normal and Very High Gravity Conditions». *Asian Network for Scientific Information.* 9 (1): 9-16

Laopaiboon, Lakkana; Thanonkeo, Pornthap, *et al.* 2007. «Ethanol production from sweet sorghum juice in batch and fed.batch fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*». *World J Microbiol Biotechnol* (23):1497-1501

Laopaiboon, Lakkana; Nuanpeng, Sunan, *et al.* 2007. «Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: Effects of carbon and nitrogen supplementations». *Bioresource Technology* (100):4176-4182

Reed, Gerald & Nagodawithana, T. 1991. *Yeast Technology*. New York. Van Nostrand Reinhold. 454 págs.

Shen, F. *et al.* 2009. «Effects of Temperature, pH, Agitation and Particles Stuffing Rate on Fermentation of Sorghum Satlk Juice to Ethanol». *Energy Sources, Part A*. (31):646-656

Skoog, Douglas, y James Holler. *Fundamentos de Química Analítica*. México: Thomson, 2005.

Stanbury, Peter, *et al.* 1995. *Principles of fermentation technology*. Great Britian. PERGAMON. 710 págs.

Wu, Xiaorong, *et al.* 2009. «Features of sweet sorghum juice and their performance in ethanol fermentation». *Industrial Crops and products* . (31): 164-170.

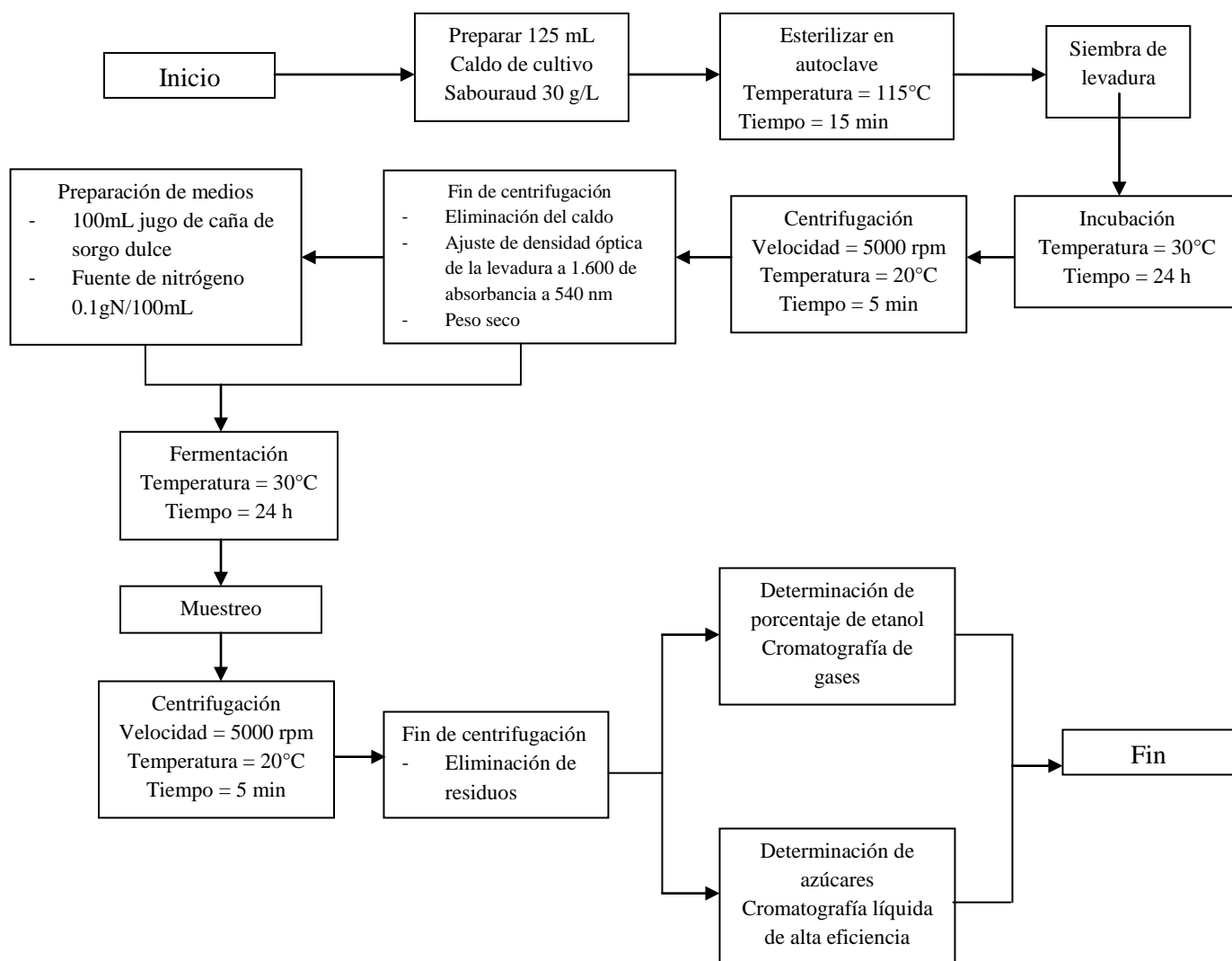
Yue, Guojun, *et al.* 2012. «The influence of nitrogen sources on ethanol production by yeast from concentrated sweet sorghum juice». *Biomass and Bioenergy*.XXX: 1-5.

XII. APÉNDICE

A. Procedimiento

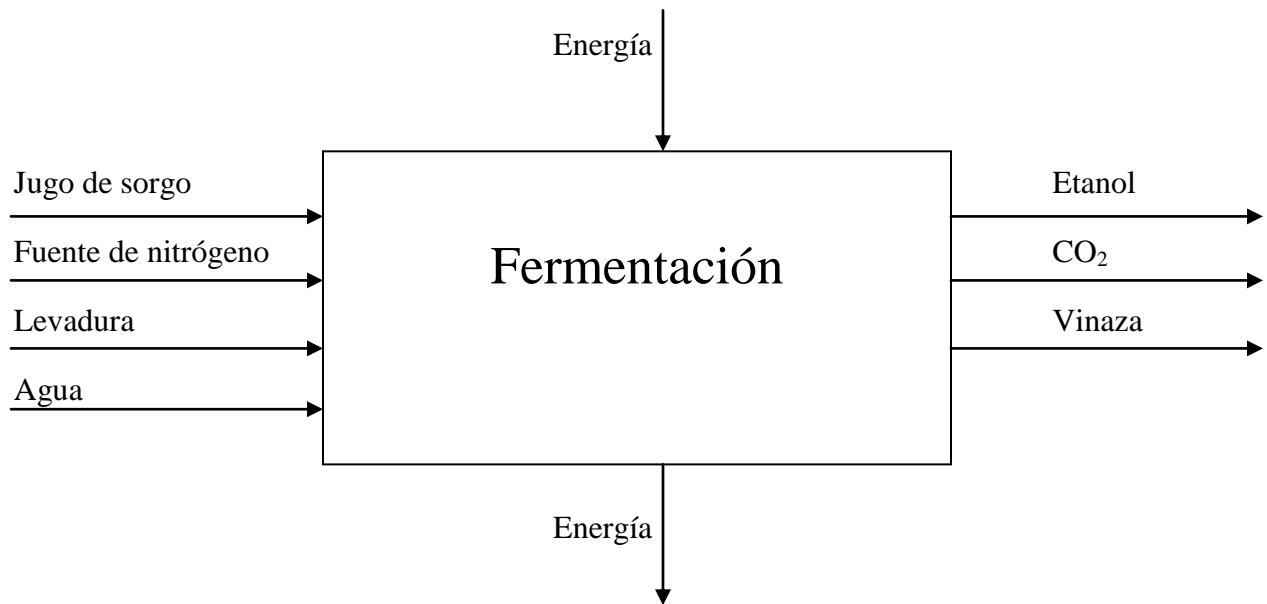
1. Diagrama de procedimiento experimental

Figura No. 2: Procedimiento experimental de producción de etanol por fermentación de jugo de caña de sorgo dulce.



2. Diagrama de entradas y salidas de la fermentación para producción de etanol

Figura No. 3: Diagrama de entradas y salidas de la fermentación para la producción de etanol a partir de jugo de caña de sorgo dulce



3. Especificación del equipo utilizado en las pruebas a nivel laboratorio

Cuadro No. 5: Especificaciones de equipo utilizado en las pruebas a nivel laboratorio

Nombre del equipo	Especificaciones
Incubadora con agitación	Marca: Lab companion Modelo: SI-300/300R/600/600R Frecuencia: 60/50 Hz Voltaje: 100 V Corriente: 10 A
Autoclave	Marca: Napco Modelo: 8000-DSE Frecuencia: 60 Hz Corriente: 14.5 A Voltaje: 120 V Potencia: 1750 W
Incubadora con agitación	Marca: New Brunswick Scientific Modelo: G-25 Frecuencia: 50/60 Hz Voltaje: 120 V Corriente: 10 A Potencia: 1200 W
Brixómetro	Marca: Sper Scientific Modelo: 300034

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

Cuadro No. 5: Especificaciones de equipo utilizado en las pruebas a nivel laboratorio

Nombre del equipo	Especificaciones
Centrífuga	Marca: Eppendorf AG Modelo: 5804R Frecuencia: 60 Hz Voltaje: 120 V Corriente: 12 A Potencia: 1300 W Energía cinética: 27450 Nm Presión de operación: 45 bar Refrigerante: R134 A
Centrífuga	Marca: Fisher Scientific Modelo: ZZ8 Velocidad máxima: 3400 rpm Voltaje: 120 V Corriente: 2.1 A
Incubadora	Marca: Fisher Scientific Modelo: 5502 Rango: 20-80 °C Voltaje: 120 V Corriente: 7.7 A Potencia: 600 W
Espectrofotómetro UV-Visible	Marca: Shimadzu Modelo: UV-HIWITZ-40 Voltaje: 120 V Potencia: 160 W

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

Cuadro No. 5: Especificaciones de equipo utilizado en las pruebas a nivel laboratorio

Nombre del equipo	Especificaciones	
Potenciómetro	Marca:	ICM
	Modelo:	45100
	Voltaje:	120 V
Balanza analítica	Marca:	OHAUS
	Modelo:	Pioneer
	Capacidad:	210 g
	Voltaje:	120 V
	Frecuencia:	50/60 Hz
	Corriente directa:	8-14.5 VCA
	Potencia:	4 W
Cromatógrafo de gases (GC)	Marca:	Agilent
	Modelo:	6890
	Voltaje:	200 V
	Corriente:	15 A
	Columna:	HP-PLOT/Q 30m 0.32mm
	Detector:	Ionización de llama (FID)
	Tiempo máximo de	
	corrida:	999.99 min
	Estándar interno:	Isopropanol
	Gas acarreador:	Nitrógeno

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

Cuadro No. 5: Especificaciones de equipo utilizado en las pruebas a nivel laboratorio

Nombre del equipo	Especificaciones
Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC)	Marca: Agilent Modelo: 1200 Potencia: 55 W Voltaje: 100-200 o 220-240 V Frecuencia: 50/60 Hz Columna: Biorad Aminex HPX-87P 300x7.87mm Fase móvil: Agua Detector: Índice de refracción (RID)

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

B. Datos originales

1. Porcentaje de nitrógeno contenido en cada fuente utilizada como nutriente en la fermentación.

Cuadro No. 6: Porcentaje de nitrógeno en cada nutriente

Fuente de nitrógeno	Porcentaje de nitrógeno
Fosfato de amonio	12.07%
Extracto de levadura	9.80%
Peptona	15.90%
Sulfato de amonio	21.00%

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

2. Cantidad de fuente de nitrógeno agregada a cada medio

Cuadro No. 7: Cantidad de la fuente de nitrógeno agregada a cada 100mL de medio en las pruebas con diferentes fuentes.

	Corrida 1	Corrida 2
Fuente de nitrógeno	peso \pm 0.00005 (g)	peso \pm 0.00005 (g)
Fosfato de amonio	0.8304	0.8308
Extracto de levadura	1.0215	1.0207
Peptona	0.6309	0.6300
Sulfato de amonio	0.4810	0.4801

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

3. Cantidad de fosfato de amonio agregada a cada medio.

Cuadro No. 8: Cantidad de fosfato de amonio agregada a cada 100mL de medio en las pruebas con diferentes concentraciones de ésta fuente de nitrógeno

	Corrida 1	Corrida 2
Concentración de fosfato de amonio	peso \pm 0.00005 (g)	peso \pm 0.00005 (g)
Baja	0.5001	0.5005
Media	1.0070	1.0060
Alta	1.5003	1.5002

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

4. Datos de producción de etanol y consumo de azúcares de la muestra de control.

Cuadro No. 9: Porcentaje de etanol y azúcares durante 24 horas en las muestras control

Tiempo (min)	Corrida 1		Corrida 2	
	Porcentaje de etanol	Porcentaje de azúcares presentes	Porcentaje de etanol	Porcentaje de azúcares presentes
0	0.00%	12.43%	0.00%	11.26%
125	0.20%	11.83%	0.17%	11.20%
245	1.51%	9.81%	1.11%	9.37%
380	3.11%	8.68%	2.10%	8.41%
420	3.34%	7.90%	3.11%	7.82%
1440	11.69%	1.01%	10.64%	1.56%

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

5. Datos de producción de etanol y consumo de azúcares utilizando fosfato de amonio

Cuadro No. 10: Porcentaje de etanol y azúcares durante 24 horas en las muestras con fosfato de amonio

Tiempo (min)	Corrida 1		Corrida 2	
	Porcentaje de etanol	Porcentaje de azúcares presentes	Porcentaje de etanol	Porcentaje de azúcares presentes
0	0.00%	12.42%	0.00%	12.51%
125	0.28%	12.20%	0.24%	12.39%
245	1.33%	9.91%	1.08%	10.95%
380	2.63%	9.03%	2.42%	9.74%
420	4.42%	8.08%	3.14%	9.16%
1440	13.15%	0.82%	12.86%	1.15%

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

6. Datos de producción de etanol y consumo de azúcares utilizando extracto de levadura

Cuadro No. 11: Porcentaje de etanol y azúcares durante 24 horas en las muestras con extracto de levadura

Tiempo (min)	Corrida 1		Corrida 2	
	Porcentaje de etanol	Porcentaje de azúcares presentes	Porcentaje de etanol	Porcentaje de azúcares presentes
0	0.00%	11.32%	0.00%	11.63%
120	0.27%	12.17%	0.32%	11.66%
240	0.96%	12.09%	1.14%	11.98%
360	2.37%	10.64%	2.72%	11.01%
500	5.67%	10.57%	4.92%	9.58%
1440	12.76%	0.43%	12.59%	0.34%

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

7. Datos de producción de etanol y consumo de azúcares utilizando peptona

Cuadro No. 12: Porcentaje de etanol y azúcares durante 24 horas en las muestras con peptona

Tiempo (min)	Corrida 1		Corrida 2	
	Porcentaje de etanol	Porcentaje de azúcares presentes	Porcentaje de etanol	Porcentaje de azúcares presentes
0	0.00%	11.65%	0.00%	11.93%
120	0.16%	11.50%	0.19%	11.83%
240	0.97%	11.37%	0.94%	12.04%
360	2.64%	10.84%	2.47%	9.96%
500	4.36%	9.92%	4.54%	10.30%
1440	13.49%	1.80%	12.12%	2.60%

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

8. Datos de producción de etanol y consumo de azúcares utilizando sulfato de amonio

Cuadro No. 13: Porcentaje de etanol y azúcares durante 24 horas en las muestras con sulfato de amonio

Tiempo (min)	Corrida 1		Corrida 2	
	Porcentaje de etanol	Porcentaje de azúcares presentes	Porcentaje de etanol	Porcentaje de azúcares presentes
0	0.00%	11.71%	0.00%	11.49%
120	0.25%	11.61%	0.25%	12.49%
240	1.23%	11.96%	1.03%	11.47%
360	2.27%	9.85%	2.47%	11.52%
500	5.12%	9.88%	4.38%	10.37%
1440	12.26%	2.22%	12.21%	2.91%

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

9. Datos de producción de etanol y consumo de azúcares utilizando baja concentración de fosfato de amonio

Cuadro No. 14: Porcentaje de etanol y azúcares durante 24 horas en las muestras con baja concentración de fosfato de amonio (0.5g/100mL)

Tiempo (min)	Corrida 1		Corrida 2	
	Porcentaje de etanol	Porcentaje de azúcares presentes	Porcentaje de etanol	Porcentaje de azúcares presentes
0	0.00%	10.89%	0.00%	10.46%
120	0.19%	10.07%	0.20%	10.32%
240	0.59%	9.18%	0.55%	9.47%
360	1.36%	8.51%	1.20%	9.29%
420	1.76%	8.48%	2.14%	8.70%
1440	12.15%	3.02%	11.22%	2.29%

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

10. Datos de producción de etanol y consumo de azúcares utilizando concentración media de fosfato de amonio

Cuadro No. 15: Porcentaje de etanol y azúcares durante 24 horas en las muestras con concentración media de fosfato de amonio (1.0g/100mL)

Tiempo (min)	Corrida 1		Corrida 2	
	Porcentaje de etanol	Porcentaje de azúcares presentes	Porcentaje de etanol	Porcentaje de azúcares presentes
0	0.00%	10.08%	0.00%	10.16%
120	0.21%	9.92%	0.22%	10.09%
240	0.57%	9.26%	0.55%	8.96%
360	1.54%	9.07%	1.24%	9.39%
420	2.57%	8.21%	1.88%	8.78%
1440	11.15%	2.00%	10.64%	2.32%

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

11. Datos de producción de etanol y consumo de azúcares utilizando alta concentración de fosfato de amonio

Cuadro No. 16: Porcentaje de etanol y azúcares durante 24 horas en las muestras con alta concentración de fosfato de amonio (1.5g/100mL)

Tiempo (min)	Corrida 1		Corrida 2	
	Porcentaje de etanol	Porcentaje de azúcares presentes	Porcentaje de etanol	Porcentaje de azúcares presentes
0	0.00%	9.99%	0.00%	9.78%
125	0.22%	9.96%	0.20%	9.18%
245	0.62%	8.51%	0.54%	8.37%
380	1.26%	8.57%	1.26%	8.68%
420	2.41%	8.29%	3.22%	7.78%
1440	12.34%	1.65%	12.18%	2.07%

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

12. Datos de soluciones de levadura

Cuadro No. 17: Absorbancia y peso de las suspensiones de levadura utilizadas

Suspensión	Absorbancia a 540 nm	Volumen solución de levadura (mL)	Peso tubo (g)	Peso tubo + levadura (g)
1	1.625 ± 0.0005	10.0 ± 0.1	11.6611 ± 0.0005	11.6734 ± 0.0005
2	1.720 ± 0.0005	10.0 ± 0.1	11.3252 ± 0.0005	11.3757 ± 0.0005
3	1.803 ± 0.0005	6.0 ± 0.1	12.3130 ± 0.0005	12.3383 ± 0.0005

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

13. Datos del pH de los medios luego de agregar las fuentes de nitrógeno

Cuadro No. 18: pH de los medios utilizados en las pruebas con diferentes fuentes de nitrógeno

Fuente de nitrógeno	pH \pm 0.05
-	5.2
Fosfato de amonio	4.4
Extracto de levadura	5.1
Peptona	5.0
Sulfato de amonio	4.8

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

Cuadro No. 19: pH de los medios utilizados en las pruebas con diferentes concentraciones de fosfato de amonio

Concentración de fosfato de amonio	pH \pm 0.05
Baja	4.60
Media	4.70
Alta	4.65

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

C. Cálculo de muestra

1. Cálculo de la cantidad de nutriente a agregar a cada medio según el porcentaje de nitrógeno que contiene.

Cada prueba se realizó con 0.1g de nitrógeno, se muestra el cálculo utilizando fosfato de amonio

$$\begin{aligned} \text{Cantidad de nutriente} &= \frac{\text{Nitrógeno requerido}}{\text{Contenido de nitrógeno en el nutriente}} \\ &= \frac{0.1g \text{ nitrógeno}}{12.07g \text{ nitrógeno} / 100 g \text{ Fosfato de amonio}} \\ &= 0.83g \text{ Fosfato de amonio} \end{aligned}$$

De la misma forma se calcula la cantidad de los demás nutrientes utilizados considerando sus porcentajes de nitrógeno.

2. Cálculo de la concentración real de nitrógeno en cada medio

Cada prueba se realizó con 100mL de solución, se muestra el cálculo utilizando fosfato de amonio para la corrida 1 de acuerdo a los datos del Cuadro No. 6 y 7 (página 40)

$$\text{Concentración} = \frac{(\text{muestra}) \times (\text{porcentaje nitrógeno})}{\text{volumen solución}}$$

Concentración

$$= \frac{(0.8304 \pm 0.00005g \text{ Fosfato de amonio}) \times \left(\frac{12.07 g \text{ nitrógeno}}{100 g \text{ Fosfato de amonio}} \right)}{100 \text{ mL}}$$

$$\text{Concentración} = \frac{0.1002 \pm 6.033 \times 10^{-6} g \text{ nitrógeno}}{100mL}$$

De la misma forma se calcula la concentración de nitrógeno en para las demás muestras con diferentes fuentes de nitrógeno y con diferentes porcentajes del mismo. Debido a que las muestras se realizaron en duplicado se hizo un promedio de las concentraciones para obtener los resultados.

3. Cálculo de la tasa de producción de etanol para cada fuente de nitrógeno.

Se muestra el cálculo para la corrida 1 de las muestras con fosfato de amonio basado en los datos del Cuadro No. 10 (página 42)

De acuerdo al tiempo y porcentaje de etanol se generó una ecuación de regresión lineal por medio de la hoja de cálculo Excel:

$$y = 0.0095x - 0.4957$$

Ver Gráfico No. 11 (página 67)

Se toma la pendiente como la tasa de producción de etanol:

$$\begin{aligned} \text{Tasa de producción de etanol} &= \frac{0.0095g}{100mL * min} * \frac{1000mL}{1L} \\ &= \frac{0.095g \text{ etanol}}{L * min} \end{aligned}$$

Se realiza el mismo procedimiento para la corrida 2:

$$\text{Tasa de producción de etanol} = \frac{0.093g \text{ etanol}}{L * min}$$

De los datos de ambas corridas se calcula un promedio:

$$\text{Tasa de producción de etanol} = 0.094 \pm 0.001 \frac{g \text{ etanol}}{L * min}$$

De la misma forma se calcula la tasa de producción de etanol para las demás pruebas.

4. Cálculo del porcentaje de azúcares consumidos

Se muestra el cálculo para la corrida 1 de las muestras con fosfato de amonio de acuerdo los datos del Cuadro No. 10 (página 42)

$$\% \text{Azúcares consumidos} = \frac{\text{Azúcares totales} - \text{azúcares residuales}}{\text{Azúcares totales}} * 100$$

$$\% \text{Azúcares consumidos} = \frac{\frac{12.417g}{100 \text{ mL solución}} - \frac{0.821g}{100 \text{ mL solución}}}{\frac{12.417g}{\text{mL solución}}} * 100$$

$$\% \text{ Azúcares consumidos} = 93.38\%$$

Se realiza el mismo procedimiento para la corrida 2:

$$\% \text{ Azúcares consumidos} = 90.78\%$$

De los datos de ambas corridas se calcula un promedio:

$$\% \text{ Azúcares consumidos} = 92.080 \pm 1.844\%$$

De la misma forma se calcula el consumo de azúcares para las demás muestras.

5. Cálculo de la tasa de consumo de azúcares para cada fuente de nitrógeno.

Se muestra el cálculo para la corrida 1 de las muestras con fosfato de amonio basado en los datos del Cuadro No. 10 (página 42)

De acuerdo al tiempo y porcentaje de azúcares presentes se generó una ecuación de regresión lineal por medio de la hoja de cálculo Excel:

$$y = -0.0081x + 12.282$$

Ver Gráfico No. 11 (página 67)

Se toma la pendiente como la tasa de consumo de azúcares, el signo negativo indica consumo.

$$\begin{aligned} \text{Tasa de consumo de azúcares} &= \frac{0.0081g}{100mL * min} * \frac{1000mL}{1L} \\ &= \frac{0.095g \text{ azúcares}}{L * min} \end{aligned}$$

Se realiza el mismo procedimiento para la corrida 2:

$$\text{Tasa de consumo de azúcares} = \frac{0.081g \text{ etanol}}{L * min}$$

De los datos de ambas corridas se calcula un promedio:

$$\text{Tasa de producción de etanol} = 0.081 \pm 0.000 \frac{g \text{ etanol}}{L * min}$$

De la misma forma se calcula la tasa de consumo de azúcares para las demás pruebas.

6. Concentración de la solución de levadura utilizada para fermentar

Se muestra el cálculo para la corrida 1 de los datos del Cuadro No. 17 (página 48)

$$\text{Peso seco} = (\text{Peso tubo} + \text{levadura}) - (\text{Peso tubo})$$

$$\text{Peso seco} = (11.6734 \pm 0.00005)g - (11.6611 \pm 0.00005)g$$

$$\text{Peso seco} = 0.0123 \pm 0.0001 \text{ g}$$

$$\text{Concentración} = \frac{\text{peso seco}}{\text{volumen solución}}$$

$$\begin{aligned} \text{Concentración} &= \frac{0.0123 \pm 0.00007 \text{ g}}{10.0 \pm 0.1 \text{ mL}} * \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \\ &= 1.2300 \pm 0.1230 \frac{\text{g levadura}}{\text{L solución}} \end{aligned}$$

De la misma forma se calcula la concentración para las demás corridas.

D. Datos calculados

1. Cantidad de levadura presente en la preparación utilizada para fermentar.

Cuadro No. 20: Concentración de levadura en la suspensión utilizada para fermentar

Suspensión	Peso seco (g)	Concentración de levadura (g/L)
1	0.0123 ± 0.0001	1.2300 ± 0.1230
2	0.0505 ± 0.0001	5.0500 ± 0.5050
3	0.0253 ± 0.0001	4.2167 ± 0.4217

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

2. Concentración final de etanol obtenida de la fermentación con cada fuente de nitrógeno.

Cuadro No. 21: Porcentaje de etanol obtenido con cada fuente de nitrógeno.

No.	Fuente de nitrógeno	Porcentaje de etanol final
1	-	11.162 ± 0.740 %
2	Fosfato de amonio	13.008 ± 0.206 %
3	Extracto de levadura	12.674 ± 0.115 %
4	Peptona	12.805 ± 0.969 %
5	Sulfato de amonio	12.235 ± 0.032 %

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

3. Tasa de producción de etanol con cada fuente de nitrógeno.

Cuadro No. 22: Tasa de producción de etanol con cada fuente de nitrógeno.

No.	Fuente de nitrógeno	Tasa de producción de etanol g/Lmin
1	-	0.081 ± 0.005
2	Fosfato de amonio	0.094 ± 0.001
3	Extracto de levadura	0.092 ± 0.001
4	Peptona	0.093 ± 0.007
5	Sulfato de amonio	0.089 ± 0.000

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

4. Porcentaje de azúcares consumidos en la fermentación con cada fuente de nitrógeno.

Cuadro No. 23: Porcentaje de azúcares consumidos en la fermentación con cada fuente de nitrógeno

No.	Fuente de nitrógeno	Porcentaje de azúcares consumidos
1	-	89.009 ± 4.057 %
2	Fosfato de amonio	92.080 ± 1.844 %
3	Extracto de levadura	96.652 ± 0.624 %
4	Peptona	81.363 ± 4.499 %
5	Sulfato de amonio	77.844 ± 4.520 %

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

5. Tasa de consumo de azúcares con cada fuente de nitrógeno

Cuadro No. 24: Tasa de consumo de azúcares con cada fuente de nitrógeno

No.	Fuente de nitrógeno	Tasa de consumo de azúcares g/Lmin
1	-	0.074 ± 0.007
2	Fosfato de amonio	0.081 ± 0.000
3	Extracto de levadura	0.085 ± 0.001
4	Peptona	0.070 ± 0.003
5	Sulfato de amonio	0.068 ± 0.003

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

6. Concentración final de etanol obtenida en cada fermentación con variación en la cantidad de fosfato de amonio

Cuadro No. 25: Porcentaje de etanol obtenido en la fermentación con diferentes concentraciones de fosfato de amonio.

No.	Concentración de fosfato de amonio (g/100 mL)	Porcentaje de etanol final
1	0.5003 ± 0.0003	11.687 ± 0.656 %
2	1.0065 ± 0.0007	10.898 ± 0.363 %
3	1.5003 ± 0.0001	12.259 ± 0.107 %

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

7. Tasa de producción de etanol en cada fermentación con variación en la cantidad de fosfato de amonio.

Cuadro No. 26: Tasa de producción de etanol en la fermentación con diferentes concentraciones de fosfato de amonio.

No.	Concentración de fosfato de amonio (g/100 mL)	Tasa de producción de etanol g/Lmin
1	0.5003 ± 0.0003	0.086 ± 0.005
2	1.0065 ± 0.0007	0.080 ± 0.003
3	1.5003 ± 0.0001	0.091 ± 0.001

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

8. Porcentaje de azúcares consumidos en cada fermentación con variación en la cantidad de fosfato de amonio.

Cuadro No. 27: Porcentaje de azúcares consumidos con en la fermentación con diferentes concentraciones de fosfato de amonio.

No.	Concentración de fosfato de amonio (g/100 mL)	Porcentaje de azúcares consumidos
1	0.5003 ± 0.0003	75.200 ± 4.081 %
2	1.0065 ± 0.0007	78.706 ± 2.113 %
3	1.5003 ± 0.0001	78.706 ± 3.301 %

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

9. Tasa de consumo de azúcares en cada fermentación con variación en la cantidad de la mejor fuente de nitrógeno.

Cuadro No. 28: Tasa de consumo de azúcares en la fermentación con diferentes concentraciones de fosfato de amonio.

No.	Concentración de fosfato de amonio (g/100 mL)	Tasa de consumo de azúcares g/Lmin
1	0.5003 ± 0.0003	0.057 ± 0.004
2	1.0065 ± 0.0007	0.058 ± 0.001
3	1.5003 ± 0.0001	0.057 ± 0.004

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

E. Análisis de varianza

1. Varianza en la tasa de producción de etanol

a. Varianza en la tasa de producción de etanol para las pruebas con diferentes fuentes de nitrógeno.

H_0 : Las medias de tasa de producción de etanol son iguales utilizando diferentes fuentes de nitrógeno.

H_1 : Las medias de tasa de producción de etanol no son iguales utilizando diferentes fuentes de nitrógeno.

Cuadro No. 29: Análisis de varianza para la tasa de producción de etanol con diferentes fuentes de nitrógeno utilizando $\alpha=0.05$

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Varianzas	F
Entre niveles	0.000240	4	0.0000599	3.82
Interna o residual	0.000079	5	0.0000157	
Total	0.000318	9	0.0000353	

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

Dado que $F_{\text{crítico}} = F_{0.05,4,5} = 5.19$ se comprueba que $F < F_{\text{crítico}}$, por lo tanto no puede rechazarse la hipótesis nula (H_0)

b. Varianza en la tasa de producción de etanol para las pruebas con diferentes concentraciones de fosfato de amonio

H_0 : Las medias de tasa de producción de etanol son iguales utilizando diferentes concentraciones de fosfato de amonio.

H_1 : Las medias de tasa de producción de etanol no son iguales utilizando diferentes concentraciones de fosfato de amonio.

Cuadro No. 30: Análisis de varianza para la tasa de producción de etanol con diferentes concentraciones de fosfato de amonio utilizando $\alpha=0.05$

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Varianzas	F
Entre niveles	0.000110	4	0.0000276	4.18
Interna o residual	0.000033	5	0.0000066	
Total	0.000143	9	0.0000159	

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

Dado que $F_{\text{crítico}} = F_{0.05,4,5} = 5.19$ se comprueba que $F < F_{\text{crítico}}$, por lo tanto no puede rechazarse la hipótesis nula (H_0)

2. Varianza en la tasa de consumo de azúcares

a. Varianza en la tasa de consumo de azúcares para las pruebas con diferentes fuentes de nitrógeno

H_0 : Las medias de tasa de consumo de azúcares son iguales utilizando diferentes fuentes de nitrógeno

H_1 : Las medias de tasa de consumo de azúcares no son iguales utilizando diferentes fuentes de nitrógeno.

Cuadro No. 31: Análisis de varianza para la tasa de consumo de azúcares con diferentes fuentes de nitrógeno utilizando $\alpha=0.05$

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Varianzas	F
Entre niveles	0.000400	4	0.0001000	1.88
Interna o residual	0.000266	5	0.0000533	
Total	0.000666	9	0.0000741	

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

Dado que $F_{\text{crítico}} = F_{0.05,4,5} = 5.19$ se comprueba que $F < F_{\text{crítico}}$, por lo tanto no puede rechazarse la hipótesis nula (H_0)

- b. Varianza en la tasa de consumo de azúcares para las pruebas con diferentes concentraciones de fosfato de amonio

H_0 : Las medias de tasa de consumo de azúcares son iguales utilizando diferentes concentraciones de fosfato de amonio.

H_1 : Las medias de tasa de consumo de azúcares no son iguales utilizando diferentes concentraciones de fosfato de amonio.

Cuadro No. 32: Análisis de varianza para la tasa de consumo de azúcares con diferentes concentraciones de fosfato de amonio utilizando $\alpha=0.05$

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Varianzas	F
Entre niveles	0.000002	4	0.0000006	0.09
Interna o residual	0.000033	5	0.0000065	
Total	0.000035	9	0.0000039	

Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

Dado que $F_{\text{crítico}} = F_{0.05,4,5}=5.19$ se comprueba que $F < F_{\text{crítico}}$, por lo tanto no puede rechazarse la hipótesis nula (H_0)

F. Análisis de error

1. Incertidumbre en las divisiones y multiplicaciones

Se utiliza la ecuación:

$$\frac{S_y}{y} = \sqrt{\left(\frac{S_a}{a}\right)^2}$$

(Ecuación 1) (Skoog, 2005:130)

Se toma el cálculo de la propagación del error en la división y multiplicación al calcular la concentración real de nitrógeno en el medio al utilizar fosfato de amonio en la corrida 1 de acuerdo a los datos del Cuadro No. 6 y 7 (página 40)

$$S_y = 0.1002 * \sqrt{\left(\frac{0.00005}{0.8304}\right)^2} = 6.033 \times 10^{-6} \text{ g nitrógeno}$$

Se realizó el mismo cálculo para las demás concentraciones, multiplicaciones y divisiones durante la investigación.

2. Media

Se utiliza la ecuación:

$$Promedio = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n a_i$$

(Ecuación 2) (Skoog, 2005:93)

Se muestra el cálculo para la media de la tasa de producción de etanol de las muestras con fosfato de amonio basado en los datos del Cuadro No. 10 (página 42)

$$Promedio = \frac{0.095+0.093}{2} = 0.094 \frac{g \text{ etanol}}{L \text{ min}}$$

Se realizó el mismo cálculo para determinar el promedio de la molaridad de la solución problema.

3. Desviación estándar

Se calcula por medio de:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}}$$

(Ecuación 3) (Skoog, 2005:117)

Se toma el cálculo de la desviación estándar de los valores de la tasa de producción de etanol para las muestras con fosfato de amonio

$$s = \sqrt{\frac{2.00 * 10^{-6}}{2 - 1}} = 0.001 \frac{g \text{ etanol}}{L \text{ min}}$$

De la misma forma se calcula la desviación estándar para todos los promedios calculados.

G. Gráficos

Gráfico No. 9. Concentración de etanol y azúcares en la fermentación de la muestra control, corrida 1

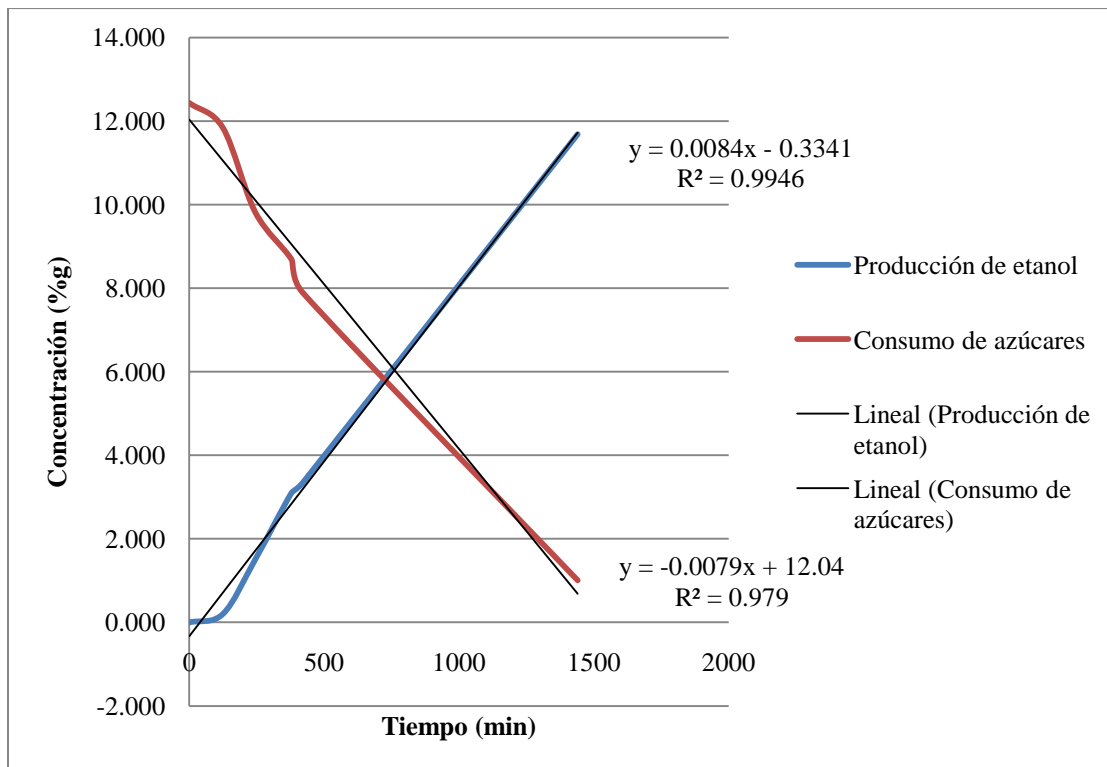


Gráfico No. 10: Concentración de etanol y azúcares en la fermentación de la muestra control, corrida 2

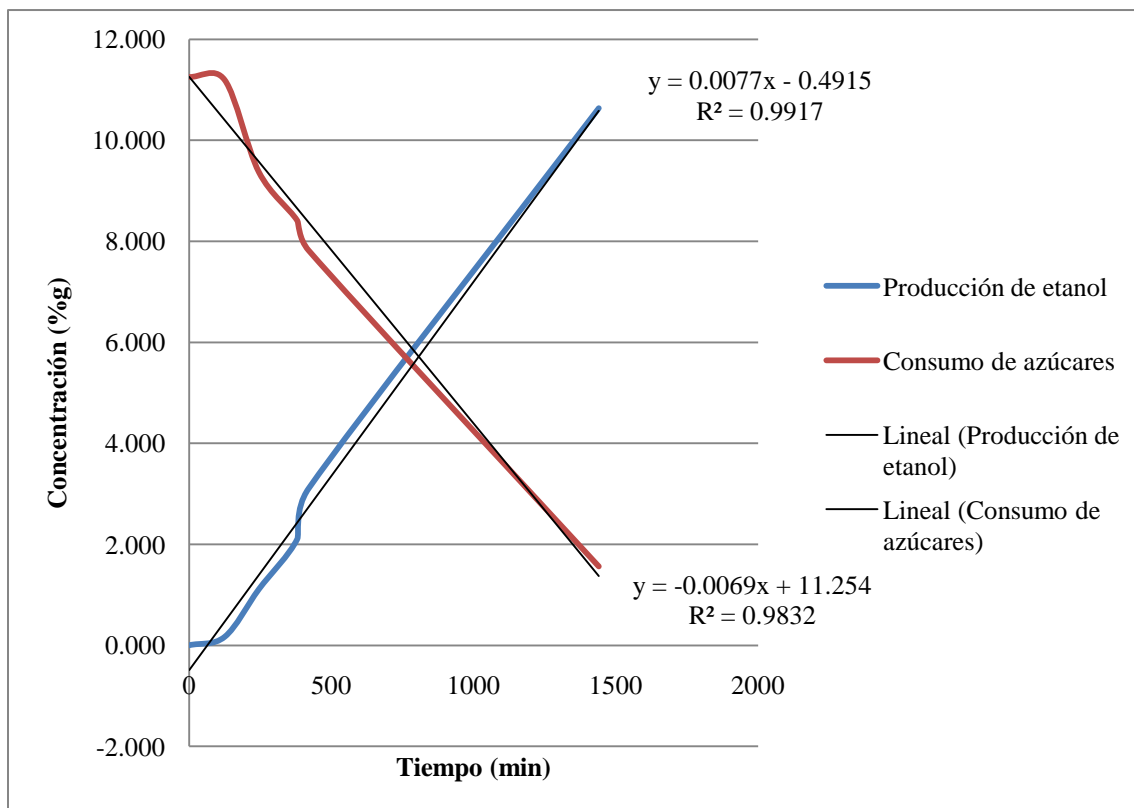


Gráfico No. 11: Concentración de etanol y azúcares en la fermentación utilizando fosfato de amonio como fuente de nitrógeno, corrida 1

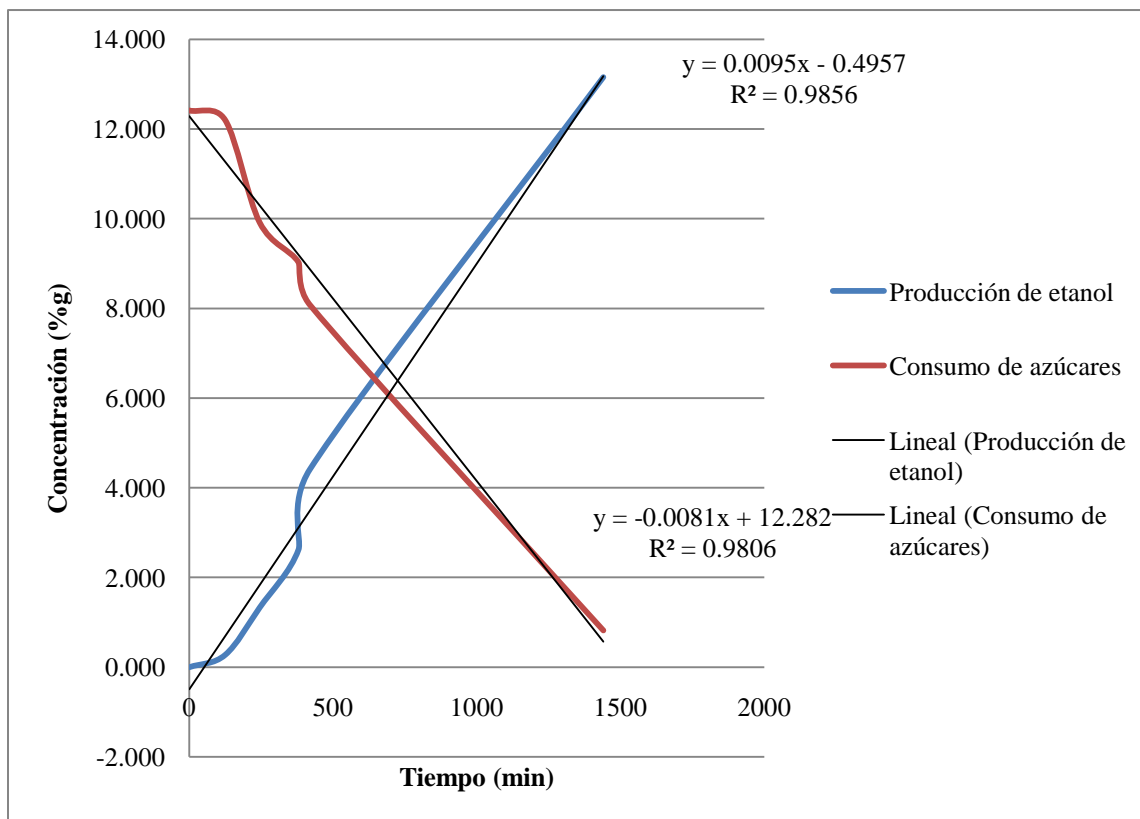


Gráfico No. 12: Concentración de etanol y azúcares en la fermentación utilizando fosfato de amonio como fuente de nitrógeno, corrida 2

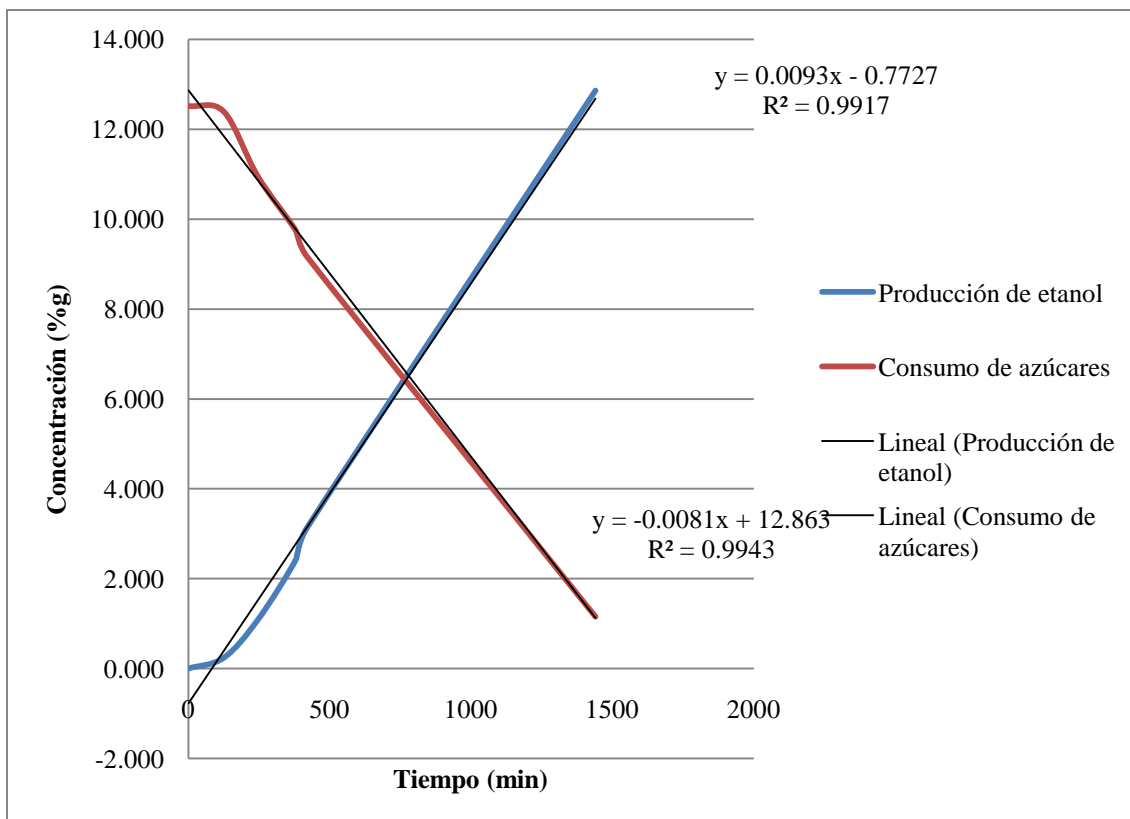


Gráfico No. 13: Concentración de etanol y azúcares en la fermentación utilizando extracto de levadura como fuente de nitrógeno, corrida 1

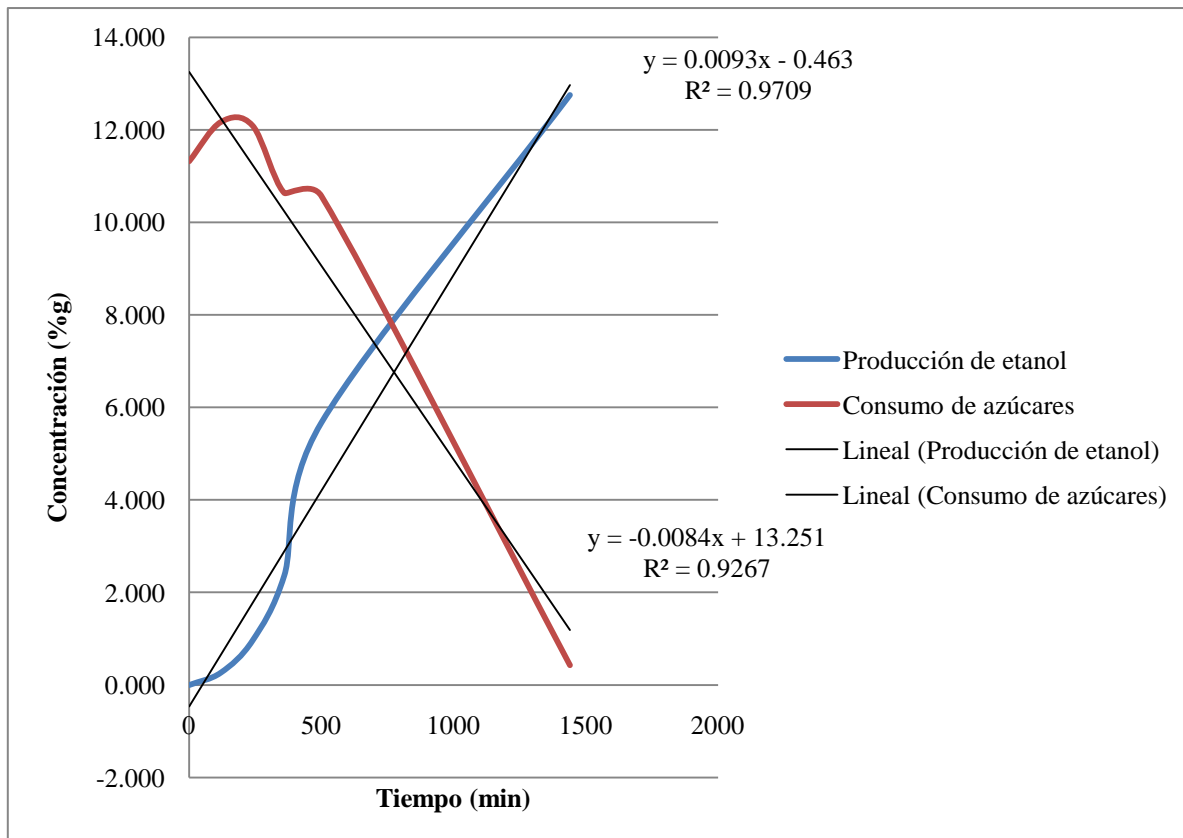


Gráfico No. 14: Concentración de etanol y azúcares en la fermentación utilizando extracto de levadura como fuente de nitrógeno, corrida 2

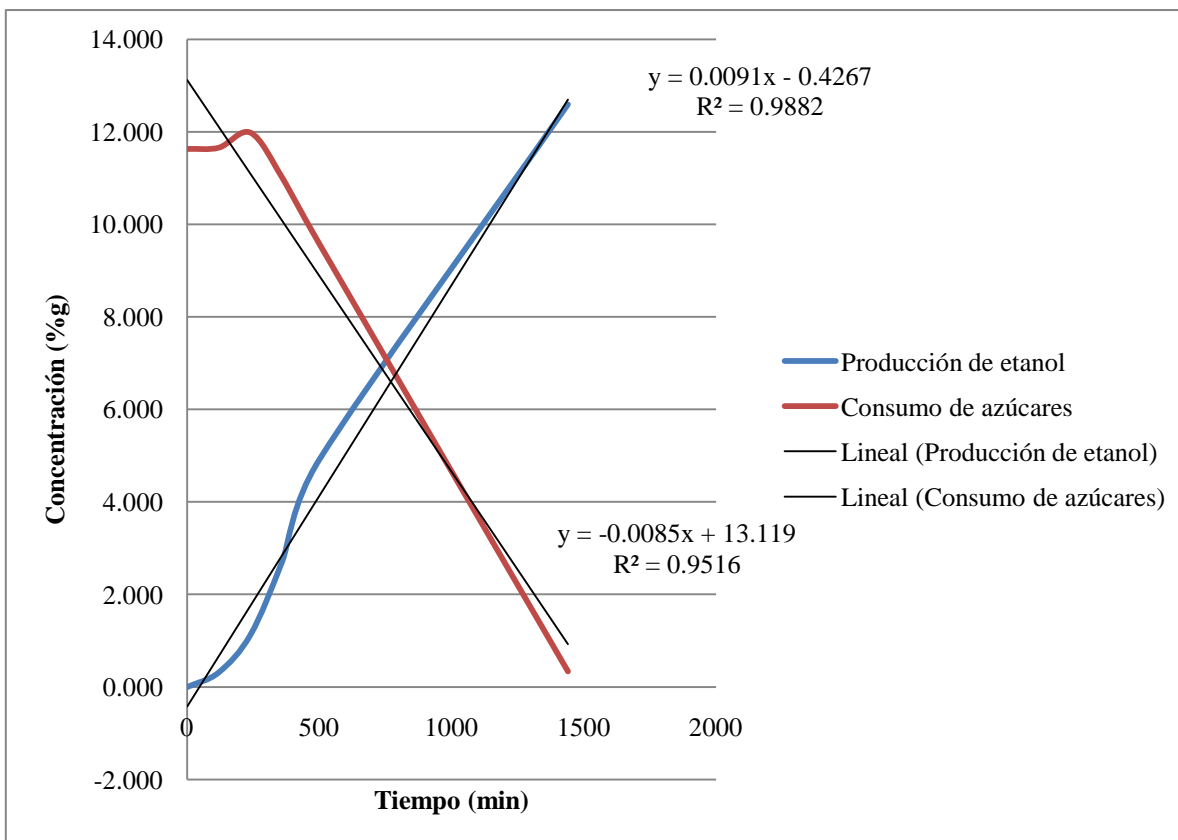


Gráfico No. 15: Concentración de etanol y azúcares en la fermentación utilizando peptona como fuente de nitrógeno, corrida 1

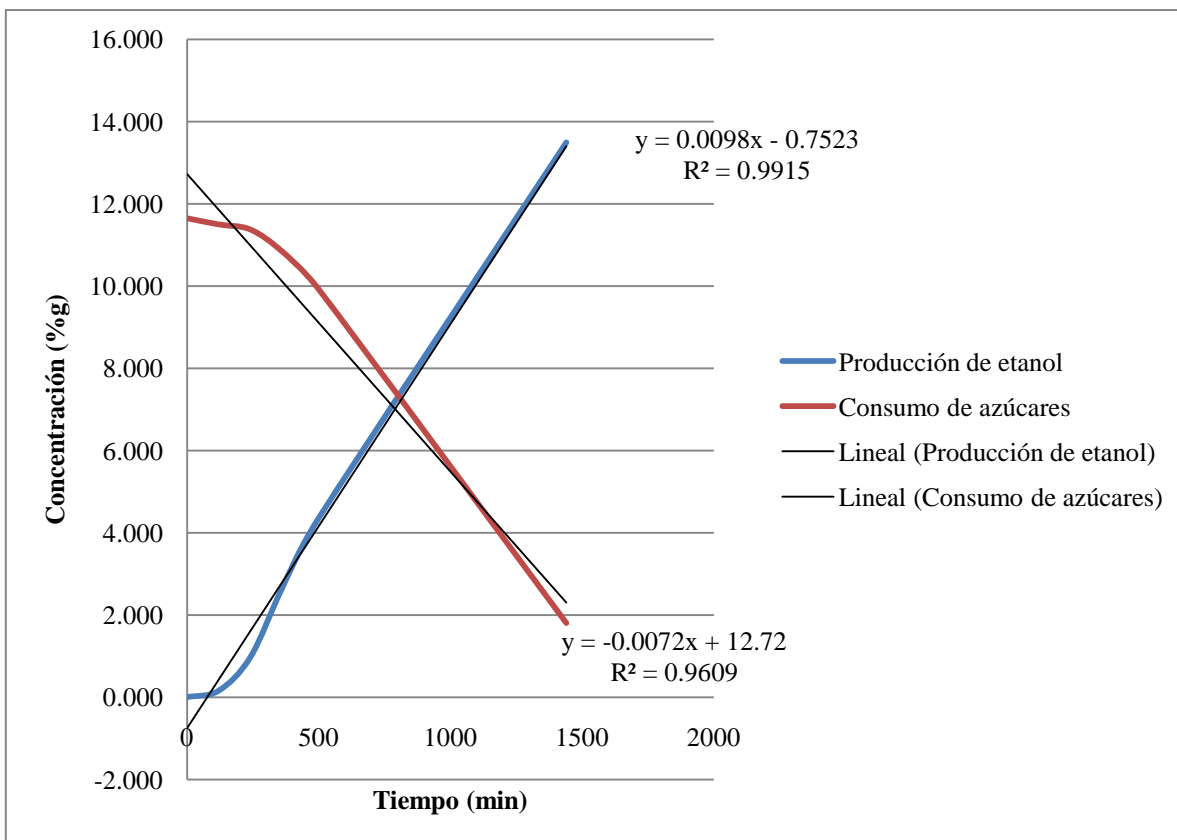


Gráfico No. 16: Concentración de etanol y azúcares en la fermentación utilizando peptona como fuente de nitrógeno, corrida 2

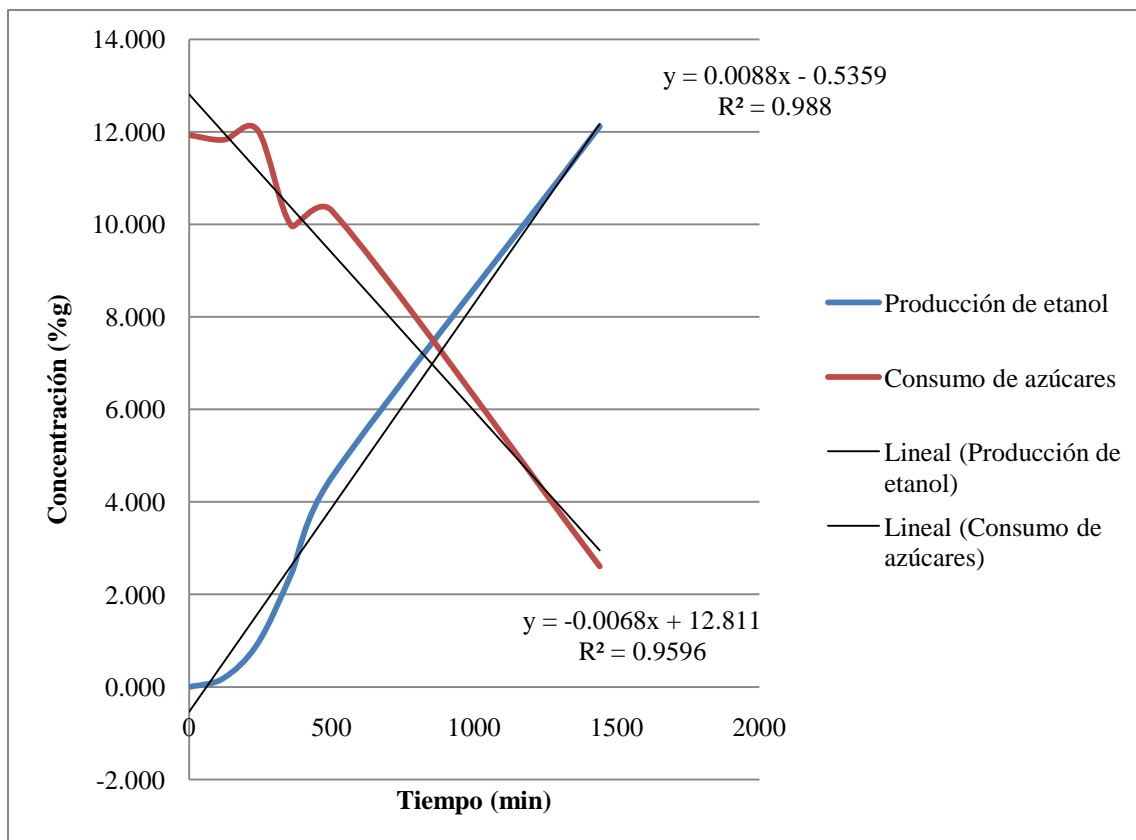


Gráfico No. 17: Concentración de etanol y azúcares en la fermentación utilizando sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, corrida 1

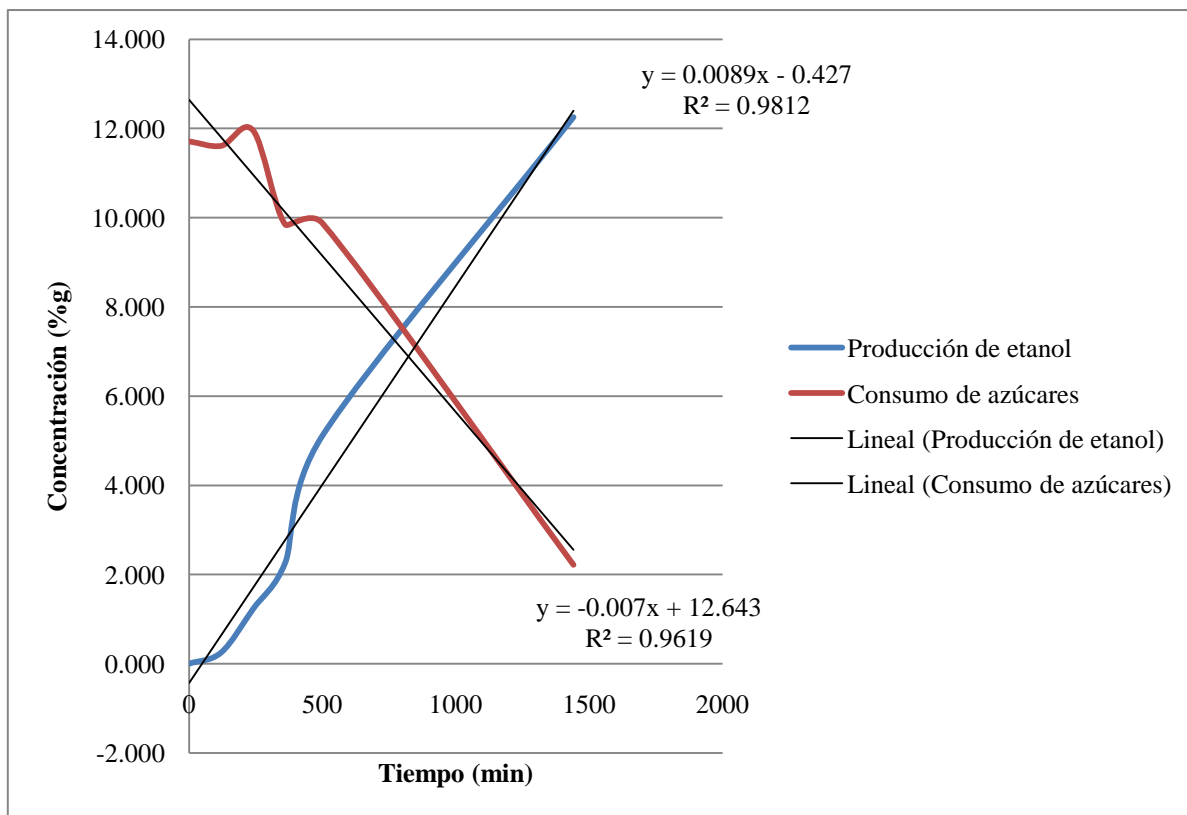


Gráfico No. 18: Concentración de etanol y azúcares en la fermentación utilizando sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, corrida 2

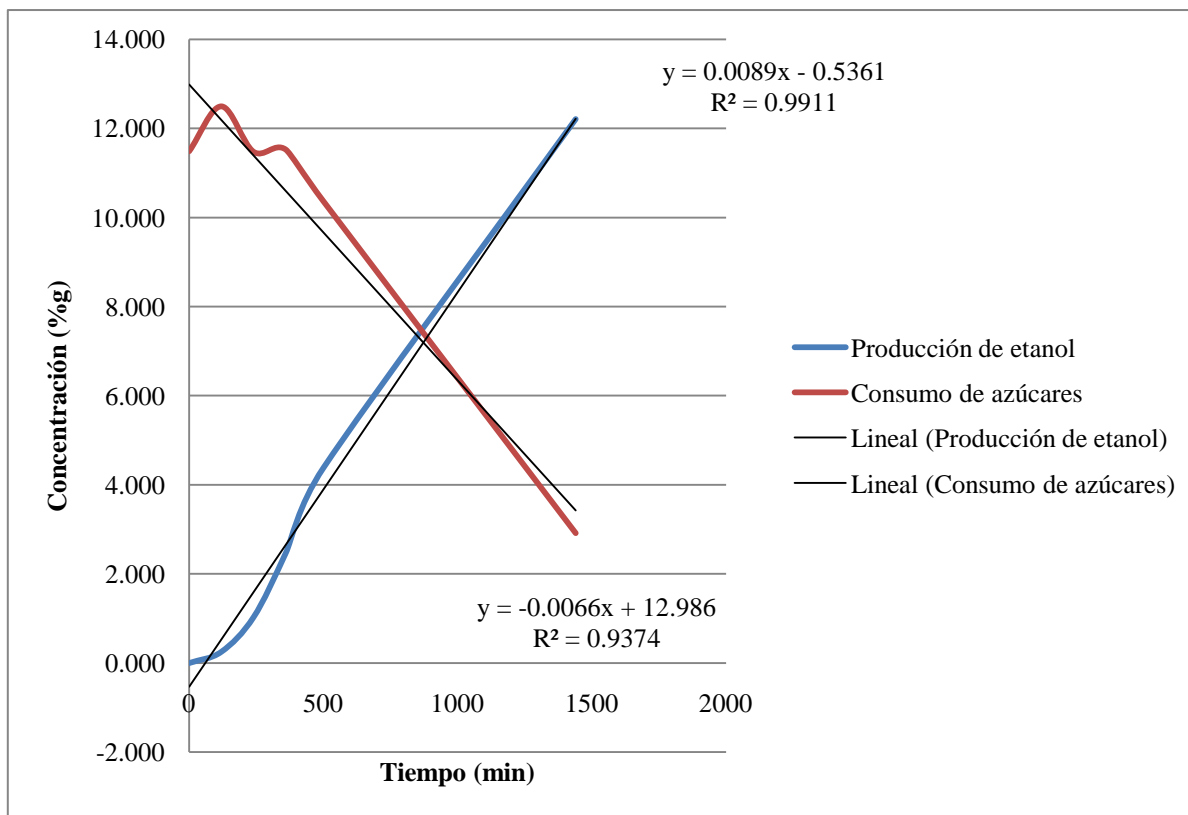


Gráfico No. 19: Concentración de etanol y azúcares en la fermentación utilizando fosfato de amonio a concentración baja (0.5g/100mL) como fuente de nitrógeno, corrida 1

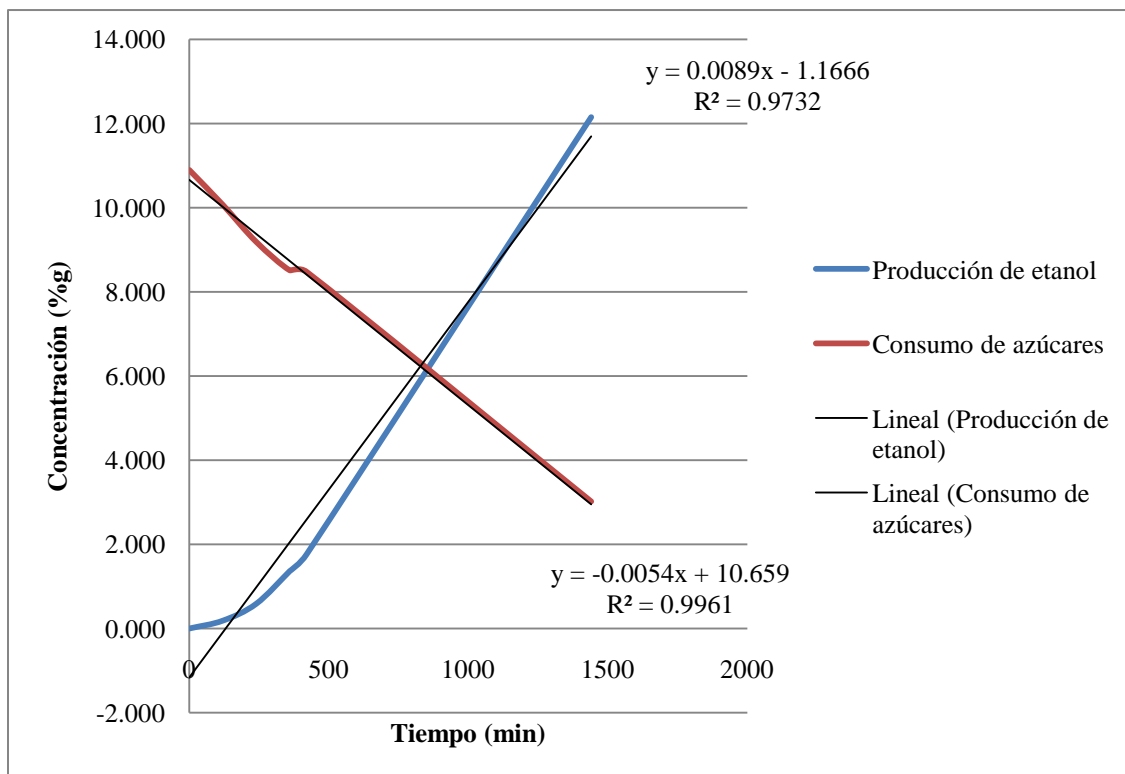


Gráfico No. 20: Concentración de etanol y azúcares en la fermentación utilizando fosfato de amonio a concentración baja (0.5g/100mL) como fuente de nitrógeno, corrida 2

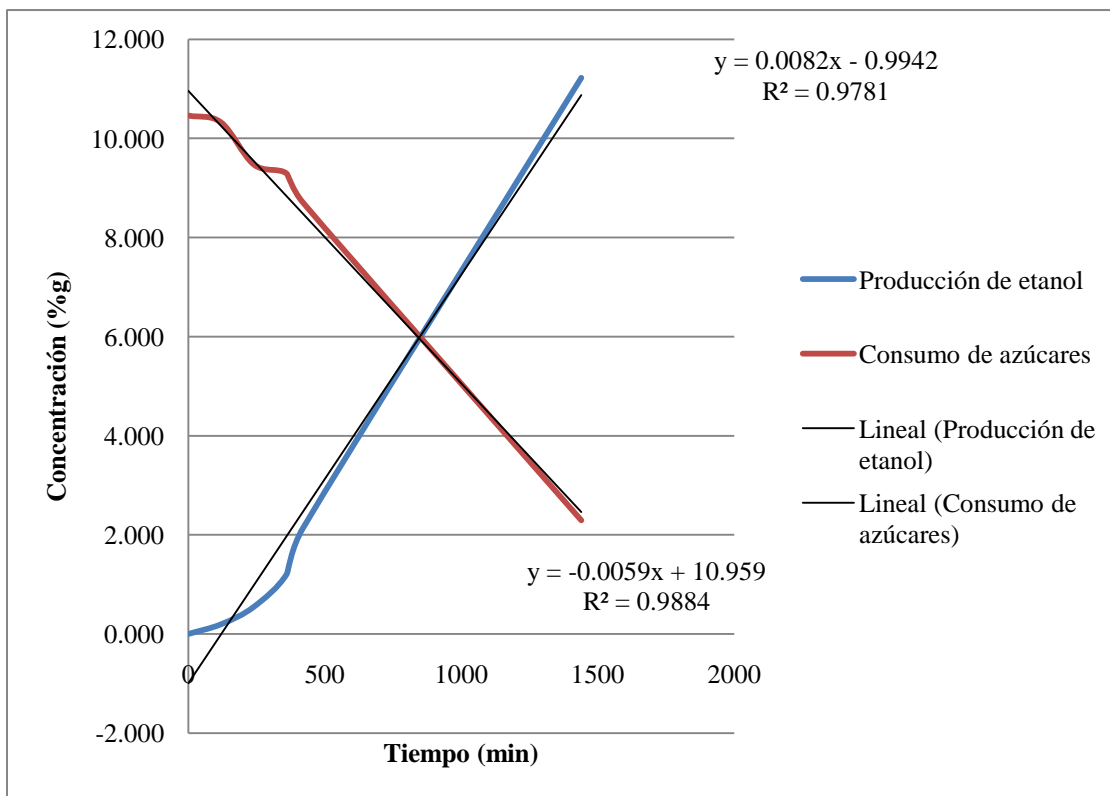


Gráfico No. 21: Concentración de etanol y azúcares en la fermentación utilizando fosfato de amonio a concentración media (1.0g/100mL) como fuente de nitrógeno, corrida 1

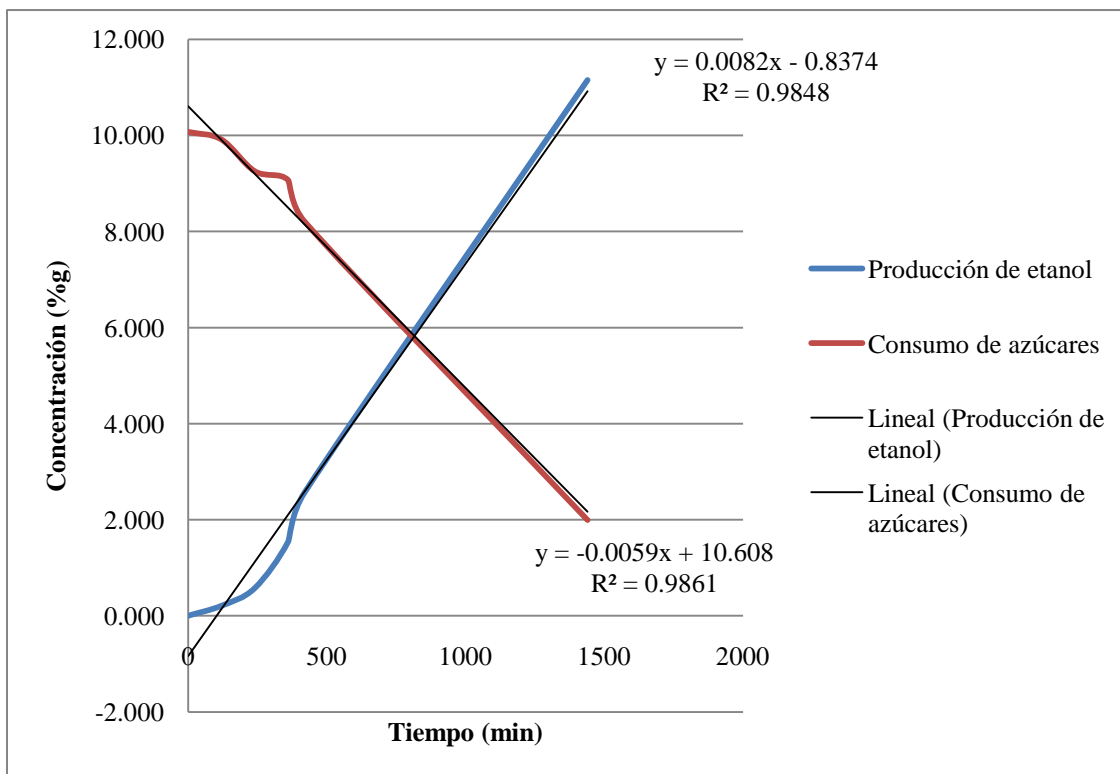


Gráfico No. 22: Concentración de etanol y azúcares en la fermentación utilizando fosfato de amonio a concentración media (1.0g/100mL) como fuente de nitrógeno, corrida 2

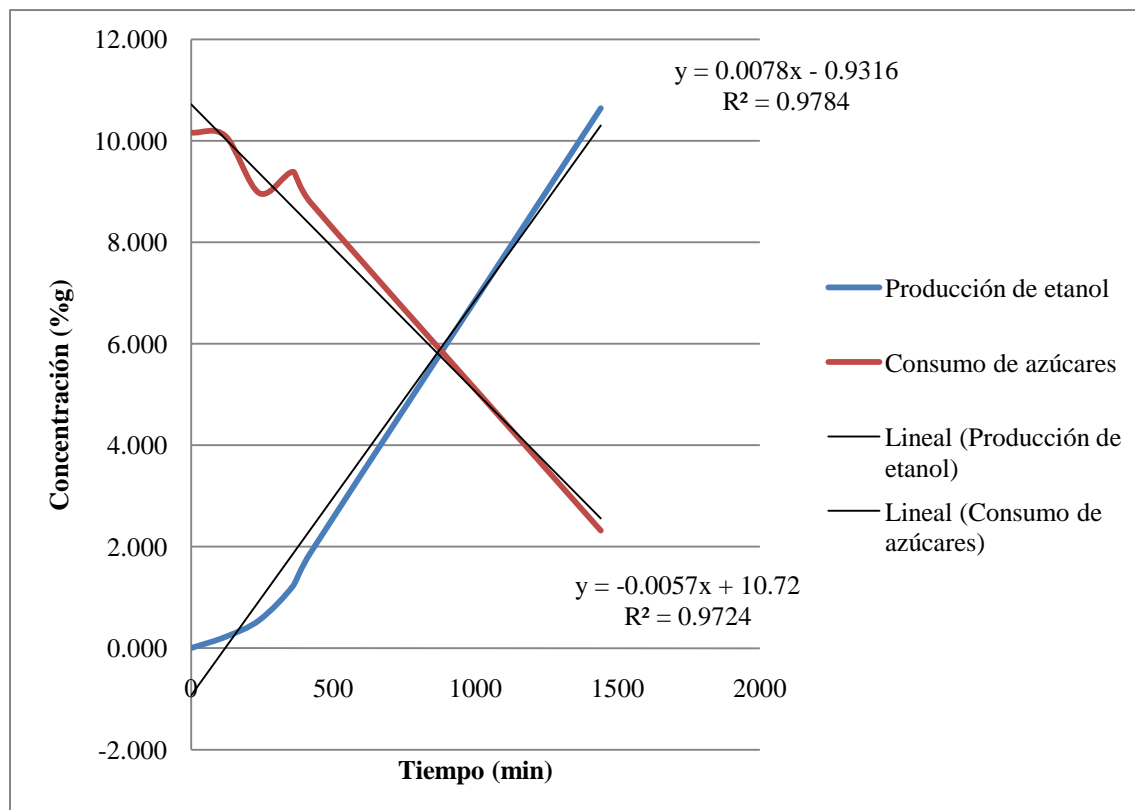


Gráfico No. 23: Concentración de etanol y azúcares en la fermentación utilizando fosfato de amonio a concentración alta (1.5g/100mL) como fuente de nitrógeno, corrida 1

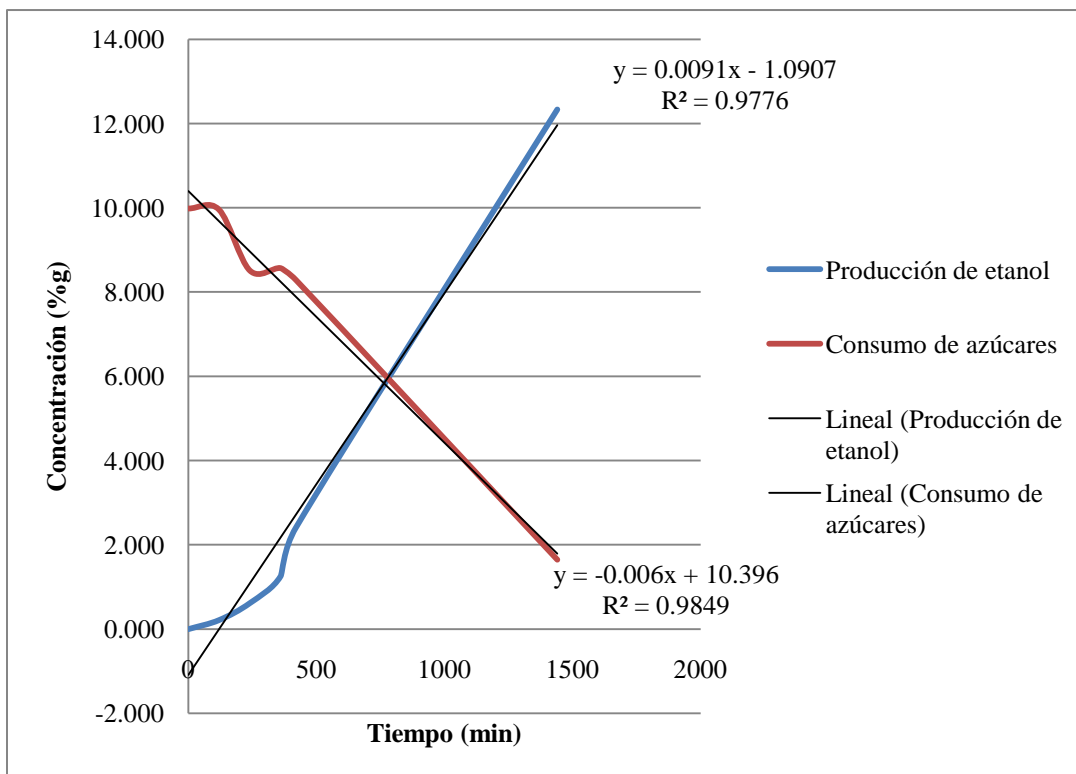
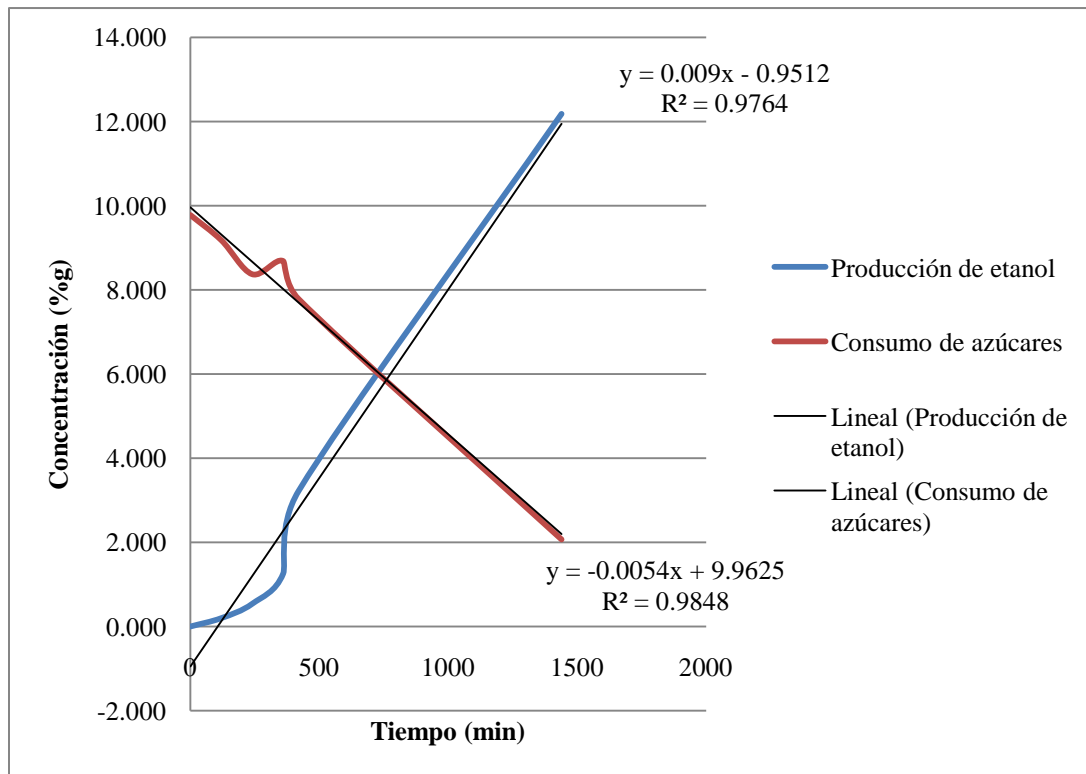


Gráfico No. 24: Concentración de etanol y azúcares en la fermentación utilizando fosfato de amonio a concentración alta (1.5g/100mL) como fuente de nitrógeno, corrida 2



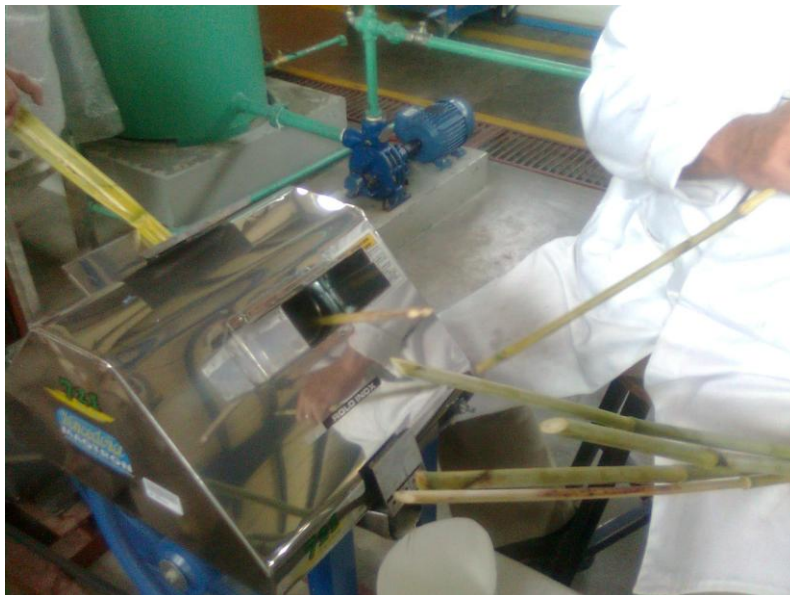
H. Figuras

Figura No. 4: Caña de sorgo dulce limpia, obtenida de UVG campus Sur, Santa Lucía Cotzumalguapa.



Fuente: Laboratorio de Operaciones Unitarias UVG

Figura No. 5: Extracción de jugo de caña de sorgo dulce



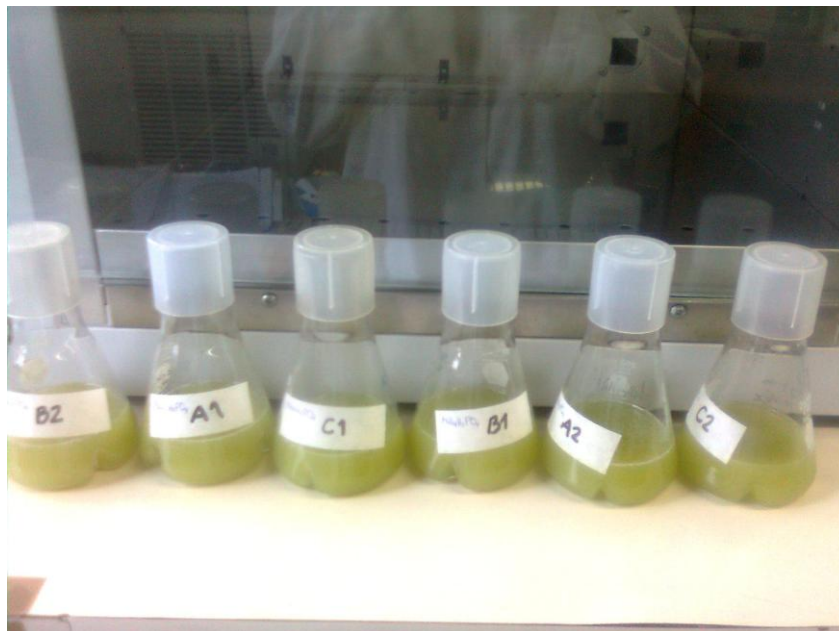
Fuente: Laboratorio de Operaciones Unitarias UVG

Figura No. 6: Caldo sabouraud para propagación de levadura



Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

Figura No. 7: Muestras con diferentes fuentes de nitrógeno



Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG

Figura No. 8: Muestras con diferentes concentraciones de fosfato de amonio



Fuente: Centro de Ingeniería Bioquímica UVG