



---

***Secretaría de Educación Pública***

---

**TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO**

Instituto Tecnológico de Veracruz

**ESTUDIO DE LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO PARA LA  
PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE SORGO DULCE**

Tesis

Que para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

Carlos Omar Parra Escudero

Asesores:

Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga

Dra. Beatriz Torrestiana Sánchez

Dra. Patricia G. Mendoza García

H. Veracruz, Ver.

Junio 2016

## RESUMEN

Parra Escudero, Carlos Omar. Maestría en ingeniería bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. 2016. **Estudio de la fermentación en estado sólido para la producción de etanol a partir de sorgo dulce**. Asesores: Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga, Dra. Beatriz Torrestiana Sánchez, Dra. Patricia G. Mendoza García.

El agotamiento del petróleo y el calentamiento global han traído interés sobre el desarrollo de biocombustibles, que puedan funcionar como una alternativa verde al uso de combustibles fósiles. La rentabilidad de los biocombustibles está directamente ligada al empleo de materias primas de bajo costo y al desarrollo de procesos energéticamente costo-eficientes. Debido al inminente aumento en la demanda de biocombustibles, es necesario estudiar alternativas de obtención que complementen las prácticas actuales.

Aunque la producción de etanol de sorgo dulce se hace de manera convencional en cultivos sumergidos, en los últimos años se ha renovado el interés en las fermentaciones en estado sólido (FES), sobre todo en los países orientales, en donde se han desarrollado procesos completos y eficientes, logrando disminuir los costos asociados al consumo de energía en las operaciones de molienda y evaporación de las fermentaciones convencionales.

El objetivo de este trabajo fue implementar la tecnología de FES a escala laboratorio utilizando dos levaduras (*S. cerevisiae* ITV-01 y *P. kudriavzevii* ITV-S42), para lo cual se realizaron cinéticas para cada levadura y tipo de fermentación (matraz de 500 mL para cultivo sumergido, recipiente estático 250 ml de muestra destructiva para FES); además, se evaluó también el efecto del paso de esterilización del material sólido previo a la fermentación, el efecto del tamaño de inóculo y la adición de nutrientes.

Se midió pH, °Brix, conteo celular en cámara de Thoma y se realizó HPLC para azúcares y etanol. Los experimentos fueron realizados por duplicado.

Se observó que las levaduras utilizadas en este trabajo crecieron de manera adecuada en el cultivo sólido presentado valores de viabilidad por encima del 90%. Con respecto a *S. cerevisiae* ITV-01, los cultivos sumergidos alcanzaron mayor rendimiento de etanol, hasta en un 19%, no obstante, la FES permitió alcanzar productividades más elevadas, hasta en un 76%, reduciendo el tiempo requerido de fermentación a la mitad. Por otro lado, para *P. kudriavzevii* ITV-S42 el consumo de los azúcares fermentables fue aprovechado para la producción de biomasa, por lo que esta no produjo etanol. De acuerdo a los resultados obtenidos la FES no necesita una etapa de esterilización del material sólido previa a la fermentación, lo que disminuye el gasto energético y reduce el tiempo de proceso al prescindir de una operación unitaria. El consumo de azúcares para crecimiento aumenta con el tamaño de inóculo, lo que disminuye la producción máxima de etanol, mientras, la productividad disminuye con la disminución del tamaño de inóculo. En presencia de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  aumenta el consumo de azúcares, pero disminuye la producción de etanol, lo que indica que este suplemento promueve el crecimiento mas no la fermentación; por otro lado, la adición de Urea no tiene un efecto significativo.

**CONTENIDO**

<b>RESUMEN</b> .....	<b>I</b>
<b>CONTENIDO</b> .....	<b>III</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>V</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEORICO</b> .....	<b>3</b>
2.1. SORGO DULCE .....	3
2.2. ETANOL DE SORGO DULCE .....	5
2.3. FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO (FES) .....	8
2.4. VENTAJAS DE LA FES .....	9
2.5. ASPECTOS BIOTECNOLÓGICOS EN FES .....	11
<b>3. ESTADO DEL ARTE</b> .....	<b>17</b>
<b>4. JUSTIFICACION</b> .....	<b>24</b>
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
5.1. OBJETIVO GENERAL .....	25
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>6. METODOLOGIA</b> .....	<b>26</b>
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>31</b>
7.1. COMPARACIÓN ENTRE FERMENTACIÓN CONVENCIONAL Y FES, Y EFECTO DE LA ESTERILIZACIÓN. 31	
7.1.1. <i>S. cerevisiae</i> ITV-01 .....	31
7.1.2. <i>P. kudriavzevii</i> ITV-S42 .....	38
7.2. EFECTO DEL TAMAÑO DE INOCULO SOBRE EL CRECIMIENTO CELULAR, EL CONSUMO DE AZÚCARES Y LA PRODUCCIÓN DE ETANOL. ....	42
<b>8. CONCLUSIONES PARCIALES</b> .....	<b>46</b>
<b>9. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>47</b>

## Índice de tablas

<i>Tabla 2.1. Rendimiento potencial de etanol por materia prima en el sur del Sahara en África (Reddy, Kumar, and Ramesh 2007).</i> .....	4
<i>Tabla 2.2 Ventajas comparativas de la producción de etanol de sorgo dulce con respecto a la caña de azúcar y su melaza (Reddy, Kumar, and Ramesh 2007).</i> .....	4
<i>Tabla 2.3. Ventajas del sorgo dulce sobre la caña de azúcar (Reddy, Kumar, and Ramesh 2007).</i> .....	5
<i>Tabla 2.4. Clasificación y tipos de fermentadores para FES. Ventajas y desventajas.</i> .....	16
<i>Tabla 3.1. Balance de energía para la producción de etanol de sorgo dulce (Gibbons, Westby, and Dobbs 1986)</i> .....	19
<i>Tabla 7.1. Velocidades específicas de crecimiento máximas calculadas para las fermentaciones sumergida (FES), FES esteril y Fes no esteril para S. cerevisiae ITV-01</i> .....	32
<i>Tabla 7.2. Rendimiento, productividad y % eficiencia para las fermentaciones sumergida (FES), FES esteril y Fes no esteril en S. cerevisiae ITV-01.</i> .....	38
<i>Tabla 7.3. Velocidades específicas de crecimiento máximas calculadas para las fermentaciones sumergida (FES), FES esteril y Fes no esteril para P. kudriavzevii ITV-S42</i> .....	40
<i>Tabla 7.4. Velocidades específicas de crecimiento máximas calculadas para las fermentaciones sumergida (FES), y FES con diferentes tamaños de inóculo</i> .....	43
<i>Tabla 7.5. Rendimiento, productividad y % eficiencia para las fermentaciones sumergida (FES) y FES no esteril con diferentes tamaños de inóculo en S. cerevisiae ITV-01</i> .....	45

## Índice de figuras

<i>Figura 1.1. Producción de biocombustibles en U.S. para el periodo 1980-2015, datos tomados de la página web de Renewable Fuels Association.</i>	2
<i>Figura 2.1. Diagrama de proceso para la producción convencional de etanol de sorgo dulce.</i>	7
<i>Figura 2.2. FES de trozos prensados de sorgo dulce, vista lateral y superior del recipiente utilizado (Rolz y de León, 2013)</i>	8
<i>Figura 2.3. Diagrama de proceso para la producción de etanol de sorgo dulce utilizando FES.</i>	10
<i>Figura 2.4. Aspectos fundamentales en FES.</i>	11
<i>Figura 2.5. Factores para la elección de un sustrato para FES.</i>	12
<i>Figura 2.6. Clasificación y características principales de bioreactores en FES.</i>	15
<i>Figura 3.1. Variación de la velocidad de formación de etanol con la velocidad de rotación de un fermentador de tambor rotatorio (Kargi y Curme, 1985).</i>	18
<i>Figura 3.2. Efecto de la concentración de inóculo, <math>X_0</math>, en la pérdida de masa durante la FES de bagazo de sorgo dulce (Bryan 1990).</i>	20
<i>Figura 3.3. Rendimiento de etanol [g etanol/100 g de tallo de sorgo] contra tiempo de fermentación [h] para:</i>	21
<i>Figura 6.1. Diagrama metodológico general.</i>	26
<i>Figura 6.2. Protocolo de preparación del microorganismo. Activación y adaptación.</i>	28
<i>Figura 6.3. Muestras destructivas utilizadas en cinética de FES con recipiente estático</i>	29
<i>Figura 6.4. Protocolo de procesamiento de muestras.</i>	29
<i>Figura 7.1. Concentración vs tiempo en fermentación de sorgo dulce usando <i>S. cerevisiae</i> ITV-01.</i>	32
<i>Figura 7.2. °Brix vs tiempo en fermentación de sorgo dulce usando <i>S. cerevisiae</i> ITV-01.</i>	33
<i>Figura 7.3. pH vs tiempo en fermentación de sorgo dulce usando <i>S. cerevisiae</i> ITV-01.</i>	34
<i>Figura 7.4. Cinética de consumo de azúcares (glucosa y fructosa) en fermentación de sorgo dulce usando <i>S. cerevisiae</i> ITV-01.</i>	35
<i>Figura 7.5. Cinética de producción de etanol en fermentación de sorgo dulce usando <i>S. cerevisiae</i> ITV-01.</i>	35
<i>Figura 7.6. Muestras de sorgo dulce triturado utilizadas en FES, a la izquierda muestra esterilizada, y a la derecha muestra no esterilizada.</i>	36
<i>Figura 7.7. Consumo de azúcares y producción de etanol en FES. Microflora nativa.</i>	37
<i>Figura 7.8. Concentración vs tiempo en fermentación de sorgo dulce usando <i>P. kudriavzevii</i> ITV-S42.</i>	39
<i>Figura 7.9. Imagen demostrativa de la cantidad de biomasa presente en la muestra centrifugada de jugo prensado del sólido fermentado por <i>P. kudriavzevii</i> ITV-S42.</i>	39

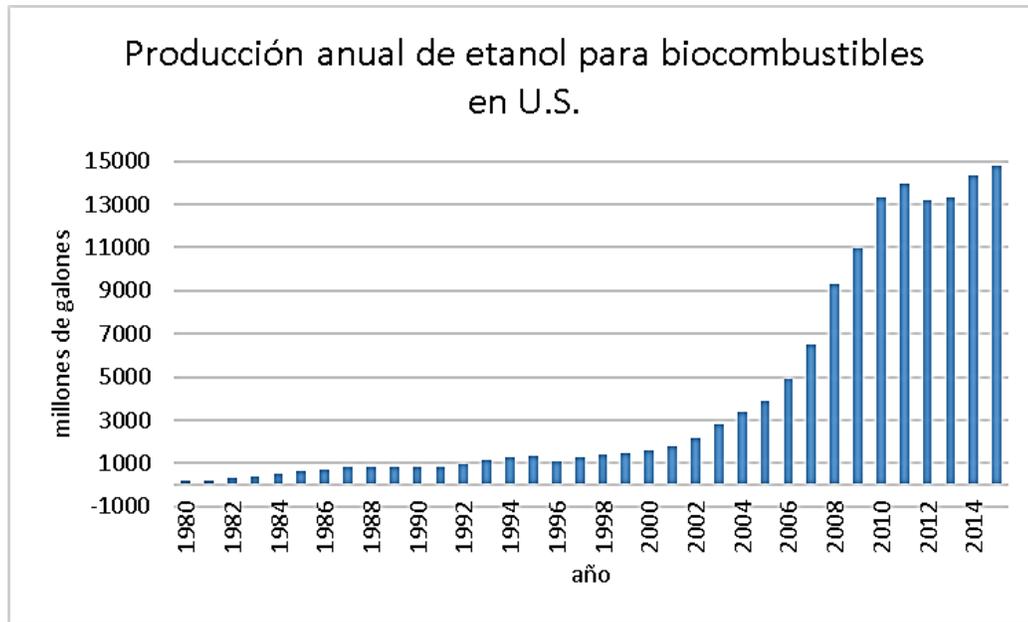
<i>Figura 7.10. Cinética de consumo de azúcares (glucosa y fructosa) en fermentación de sorgo dulce usando P. kudriavzevii ITV-S42.</i> .....	41
<i>Figura 7.11. Cinética de producción de etanol en fermentación de sorgo dulce usando P. kudriavzevii ITV-S42.</i> .....	42
<i>Figura 7.12. Concentración de biomasa vs tiempo para S. cerevisiae ITV-01, evaluación del efecto del tamaño de inóculo.</i> .....	43
<i>Figura 7.13. Cinética de consumo de azúcares (glucosa y fructosa) en fermentación de sorgo dulce usando S. cerevisiae ITV-01, evaluación del efecto del tamaño de inóculo.</i> .....	44
<i>Figura 7.14. Cinética de producción de etanol en fermentación de sorgo dulce usando S. cerevisiae ITV-01, evaluación del efecto del tamaño de inóculo.</i> .....	45

## 1. INTRODUCCIÓN

La influencia de los precios del petróleo en la agricultura y en los precios de los alimentos tiene diferentes vertientes: en primer lugar, la incidencia en los precios de los insumos para la producción, principalmente fertilizantes agroquímicos y combustibles para maquinaria agrícola. En segundo lugar, la elaboración de combustibles a partir de maíz y/o caña de azúcar y la presión que han generado en los mercados internacionales.

En 2009, el petróleo observó un precio bajo, en promedio 59 US\$/barril, lo anterior como resultado, en gran medida, de la crisis financiera internacional. Durante 2010, la recuperación económica incidió en una tendencia al alza del precio del petróleo, manteniendo los precios en un rango entre 70 y 85 US\$/barril. Los precios continuarán subiendo en el largo plazo, mientras que la economía mundial se expanda, la demanda mundial crecerá más rápidamente que las fuentes de abastecimiento disponible, lo que aumentará el precio y motivará el uso de biocombustibles. Durante el periodo de análisis 2011-2020 según SAGARPA (2011), se estima que el crecimiento promedio anual de los precios del petróleo será de aproximadamente 5%.

Con el tiempo se observa entonces la tendencia al aumento de la producción de biocombustibles, en la Figura 1.1 se observa el aumento en la producción de etanol para el periodo 1980-2015, es claro el gran aumento en la demanda de biocombustibles en este periodo. Como dato de interés, en el periodo 2000-2007, la producción de biocombustibles a nivel mundial aumento en cuatro veces; aun así, seguía contando para menos del 3% del suministro global de combustible para transporte (Coyle 2007).



**Figura 1.1.** Producción de biocombustibles en U.S. para el periodo 1980-2015, datos tomados de la página web de Renewable Fuels Association.

La bioenergía debería jugar un papel esencial como objetivo de investigación para reemplazar los combustibles fósiles con alternativas viables para reducir a largo plazo las emisiones de dióxido de carbono, esto con el fin de alcanzar procesos económicos y ambientalmente sostenibles (Yuan *et al.*, 2008).

Los costos de la materia prima son los más significantes en la producción de biocombustibles, con alrededor del 37% para etanol en base a azúcar en Brasil y 50% para etanol en base a maíz en Estados Unidos (Coyle 2007). Otro componente de mayor costo es la energía, la cual puede alcanzar el 20% de los costos de operación de la producción de biocombustible en algunos países. El futuro de la bioenergía dependerá de las nuevas tecnologías que puedan ofrecer una alternativa a los procesos actuales para así lograr un mejor aprovechamiento de las materias primas y disminuir el gasto energético que los procesos de producción de biocombustibles requieren.

## 2. MARCO TEORICO

### 2.1. Sorgo dulce

El sorgo dulce es similar al sorgo grano, pero presenta un crecimiento más rápido, mayor producción de biomasa, mejor adaptación, no es utilizado como alimento y tiene un gran potencial para la producción de etanol. El sorgo dulce es una especie más eficiente en cuanto a consumo de agua y puede crecer exitosamente en trópicos semiáridos, donde otros cultivos tales como el maíz fallan en prosperar (Wu et al. 2010).

Debido a que el sorgo dulce requiere menos agua y tiene un mayor contenido de azúcares fermentables que la caña de azúcar, la cual contiene más azúcares cristalizables, el sorgo dulce es más adecuado para la producción de etanol que la caña de azúcar u otras fuentes, y el etanol de sorgo dulce es más limpio que el etanol de caña de azúcar, cuando se mezcla con gasolina. Estudios piloto en India indican que la producción de etanol de sorgo dulce es costo efectiva. En la Tabla 2.1., se observa una comparación entre los rendimientos potenciales para producción de etanol de diversos cultivos en la zona sur del Sahara en África, debido a que el sorgo dulce puede ser cosechado varias veces al año, el sorgo dulce presenta rendimientos bastante superiores (Reddy *et al.*, 2007).

El periodo de crecimiento del sorgo dulce (alrededor de 4,5 meses) y el requerimiento de agua (8000 m<sup>3</sup> más de dos cultivos) son cuatro veces menores que los de la caña de azúcar (12-16 meses y 36000 m<sup>3</sup> de agua, respectivamente).

**Tabla 2.1.** Rendimiento potencial de etanol por materia prima en el sur del Sahara en África (Reddy, Kumar, and Ramesh 2007).

<b>Materia prima</b>	<b>Rendimiento de biomasa (ton/año)</b>	<b>Rendimiento de etanol (litros/ton)</b>	<b>Rendimiento de etanol (litros/ha*año)</b>
<b>Melaza</b>	na*	270	na*
<b>Caña de azúcar</b>	50	70	3500
<b>Sorgo dulce</b>	92	108	5000
<b>Maíz</b>	6	370	2220
<b>Yuca</b>	12	180	2160
<b>Madera</b>	20	160	3200

\*na: no aplica

Su costo de cultivo de sorgo dulce es también cuatro veces menor que el de la caña de azúcar. Estos factores, junto su rentabilidad para propagación de semillas, cultivo mecanizado capacidad de producción de etanol comparable a la caña de azúcar y a sus melazas hacen al sorgo dulce una fuente de materia prima viable para la producción de etanol. También, el costo de la producción de etanol de sorgo dulce es más económico que los precios predominantes de la producción con caña de azúcar, como se observa en la Tabla 2.2.

**Tabla 2.2** Ventajas comparativas de la producción de etanol de sorgo dulce con respecto a la caña de azúcar y su melaza (Reddy, Kumar, and Ramesh 2007).

<b>Cultivo</b>	<b>Costo de cultivo (\$/ha)</b>	<b>Duración del cultivo</b>	<b>Requerimiento de agua</b>	<b>Productividad de etanol (litros/ha)</b>
<b>Sorgo dulce</b>	4903,38	4 meses	8000 m <sup>3</sup> más de 2 cultivos	5600/año más de dos cultivos
<b>Caña de azúcar</b>	13551.72	12-16 meses	36000 m <sup>3</sup> /cultivo	6500/cultivo
<b>Melaza de caña de</b>	-	-	-	850/año

azúcar				
--------	--	--	--	--

Otra de las características que posee el sorgo dulce es que el nivel de polución de su etanol tiene  $\frac{1}{4}$  del oxígeno biológico disuelto y menor oxígeno químico disuelto comparado al etanol producido de melaza. Así, el sorgo dulce ofrece buenas perspectivas para la producción de etanol desde los puntos de vista económico, de producción y de protección ambiental (Tabla 2.3.).

**Tabla 2.3.** Ventajas del sorgo dulce sobre la caña de azúcar (Reddy, Kumar, and Ramesh 2007).

Como cultivo	Como fuente de etanol	Como desecho (vinaza)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Periodo de gestación más corto</li> <li>• Cultivo en tierras secas</li> <li>• Mayor resistencia</li> <li>• Sencillo de cultivar</li> <li>• Cumple con las necesidades de forraje/alimento.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proceso amigable con el ambiente.</li> <li>• Calidad superior</li> <li>• Menos sulfuro</li> <li>• Mayor octanaje</li> <li>• Amigable con los automóviles (hasta un 25%)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Valor biológico mayor</li> <li>• Rico en micronutrientes</li> <li>• Usado como fertilizante, alimento para ganado o en cogeneración de energía.</li> </ul>

## 2.2. Etanol de sorgo dulce

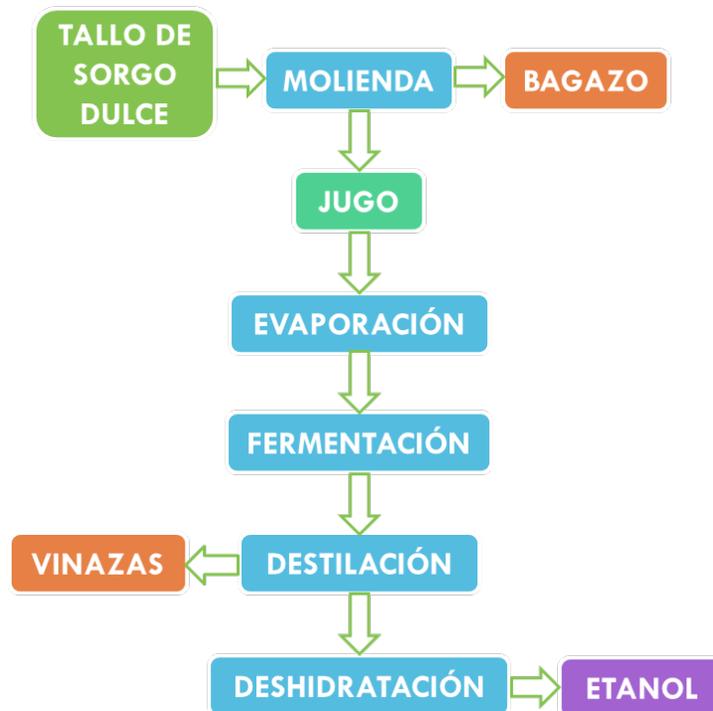
La producción de etanol y la eficiencia de fermentación varía dependiendo de la variedad de sorgo dulce y la proporción de azúcares en él. La rapidez del consumo de glucosa, de producción de etanol, y de crecimiento celular son mayores para una concentración óptima de azúcares con una combinación de levaduras específica a el sustrato. Esto siempre debe ser determinado para optimizar cualquier proceso de fermentación (Imam y Capareda, 2011).

El jugo extraído de la caña de sorgo dulce puede ser directamente fermentado en etanol usando levaduras, la cual requiere pocas etapas de proceso y menos energía que la fermentación de almidón. No obstante, la cinética de fermentación, el rendimiento de etanol y la concentración final de etanol, la cual no es solamente crítica para las etapas de separación y la rentabilidad de la producción, son altamente afectadas por la temperatura, la concentración de sólidos en el jugo y la carga de levadura (Luo *et al.*, 2014).

El proceso convencional de producción de etanol de sorgo dulce se lleva a cabo como se muestra en la Figura 2.1. El material cosechado es llevado a una zona de recepción donde se agrupa para ser prensado en la etapa de molienda donde se extraerá el jugo, este es recolectado comúnmente en un tanque sedimentador donde esperara a ser bombeado a la siguiente etapa; el bagazo obtenido de la molienda puede ser utilizado en procesos de fermentación de segunda generación y también se puede dar la posibilidad de utilizarlo para cogeneración de energía.

El jugo obtenido de la etapa de molienda es bombeado a la etapa de evaporación donde se concentra en azúcares mediante la extracción de agua, el jugo ahora más concentrado en azúcares se recupera en los tanques de fermentación donde será inoculado con levadura en fermentación activa proveniente del tanque de fermentación semilla que se deben preparar con antelación. Cuando la fermentación del jugo alcanza un nivel de conversión de azúcares a etanol adecuado, el mosto es entonces bombeado a la etapa de destilación donde se pasa a través de las diferentes columnas definidas por el proceso para obtener un producto más concentrado en etanol, de esta etapa se obtiene como subproducto la vinaza, alcanzando valores de 8-16 litros de vinaza por litro de etanol, estas vinazas pueden ser utilizadas como fuente de azúcares para producción de etanol de segunda generación, pueden ser realimentadas al tanque de mosto para ser de nuevo

destiladas en caso de conservar concentraciones importantes de etanol, pueden ser utilizadas como fertilizante por su contenido nutritivo o puede salir del proceso como residuo; en cuyo caso deberá tener un tratamiento adecuado que considere su potencial impacto ambiental. Al terminar la rectificación usualmente la concentración de etanol se encuentra en el azeotropo, lo que implica la necesidad de una etapa de deshidratación para la separación de agua, uno de los métodos más utilizados para este fin es el empleo de tamices moleculares como la zeolita que retenga el agua y permitan obtener alcohol anhidro que pueda ser utilizado como biocombustible.



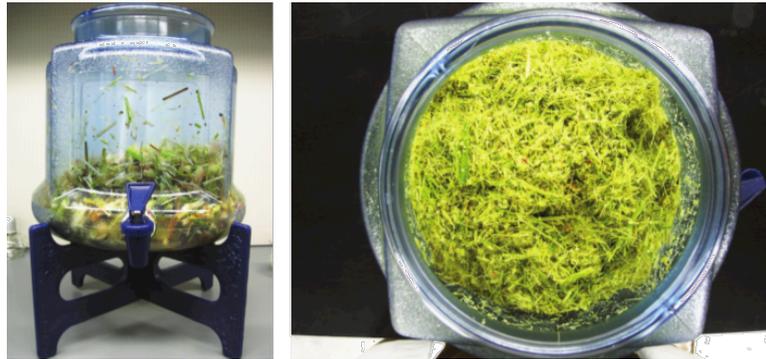
**Figura 2.1.** Diagrama de proceso para la producción convencional de etanol de sorgo dulce.

Con respecto a la producción de etanol de sorgo dulce, y como se mencionó anteriormente, los costos que el consumo de energía representa una parte elevada de los costos de operación del proceso; además sumado a esto la necesidad de un tratamiento adecuado a la vinaza residual del proceso y los gastos que esto acarrea

surge la necesidad de utilizar nuevas tecnologías que puedan lograr un proceso más costo eficiente y disminuir el impacto del mismo sobre el medio ambiente.

### 2.3. Fermentación en estado sólido (FES)

La fermentación sólida puede ser definida como un cultivo de microorganismos adheridos a un soporte sólido poroso y humedecido en el cual el medio líquido está extendido en una capa muy fina en contacto con una interface aérea. Las bacterias, levaduras y hongos son los microorganismos que pueden crecer en fermentación sólida, pero la mayoría de las investigaciones se llevan a cabo con hongos filamentosos (Diaz 2013). En la Figura 2.2. Se observa un ejemplo de FES de sorgo dulce para producción de etanol.



**Figura 2.2.** FES de trozos prensados de sorgo dulce, vista lateral y superior del recipiente utilizado (Rolz y de León, 2013)

Pandey *et al.*, (2000) definen como fermentación en estado sólido al crecimiento de microorganismos en un material sólido y húmedo, siendo el material sólido la fuente energética, el sustrato también puede estar formado por un material sólido inerte y húmedo, al cual se le adiciona una fuente energética.

En un proceso de FES, generalmente no se requiere agregar agua si el sustrato tiene un contenido alto de humedad (Pandey, Soccol, and Mitchell 2000) y no necesariamente se tiene que inocular con alguna especie de microorganismo, si existe la posibilidad de potencializar el crecimiento de algunas de las especies microbianas de las que se encuentran de manera natural en los sustratos; algunos de estos tienen una amplia diversidad de microorganismos, en este caso se tiene un sistema heterogéneo (Diaz 2013). Debido a la ausencia de agua libre, se emplean fermentadores pequeños para la FES y por tanto se requiere menos esfuerzo para los procesos de separación (downstream). Las cepas nativas o silvestres de bacterias y hongos tienden a un mejor comportamiento en condiciones de FES que los microorganismos genéticamente modificados, reduciendo además costos de energía y de requerimientos (Robinson *et al.* 2002).

En la Figura 2.3. Se observa un diagrama para la producción de etanol de sorgo dulce utilizando FES, en él se observa que esta tecnología no necesita la extracción del jugo ni su concentración mediante evaporación lo que disminuye el gasto de energía; además tiene una producción muy reducida de vinazas, y el bagazo agotado en azúcar es una fuente de nutrientes muy utilizada como alimento para ganado, lo que disminuye el impacto ambiental de los residuos de la producción de bioetanol y les da un valor agregado.

#### **2.4. Ventajas de la FES**

Se consideran como ventajas los siguientes aspectos: Los medios de cultivo son simples, generalmente cultivos o subproductos agrícolas que presentan un alto contenido de los nutrientes necesarios. La baja actividad del agua es de gran ayuda para evitar las contaminaciones, especialmente de bacterias y levaduras. La

concentración natural del sustrato permite utilizar reactores más pequeños en comparación con los utilizados en otro tipo de fermentación. Tienen mayor productividad volumétrica. La aireación forzada es facilitada por la porosidad del soporte, lo que permite una alta transferencia de oxígeno al microorganismo.



**Figura 2.3.** Diagrama de proceso para la producción de etanol de sorgo dulce utilizando FES.

En FES pueden emplearse, frecuentemente conidios como inóculo en los procesos de crecimiento de hongos, lo cual disminuye los costos y las manipulaciones en la preparación del inóculo. Los conidios de los hongos que se producen son mucho más resistentes y tienen mejor adaptabilidad a las condiciones en las que se aplican como agente de biocontrol. El proceso de recobrado es simplificado. Algunos productos son utilizados integralmente, como alimento animal, productos para el control biológico. Los procesos se consideran generalmente como tecnologías limpias (Díaz 2013).

Con respecto a la producción de etanol de sorgo dulce utilizando FES se resaltan las siguientes ventajas:

- Alta productividad
- Alta concentración del producto
- Bajo requerimiento energético
- Menor volumen de agua
- Menor volumen del reactor
- Menor producción de vinazas

## 2.5. Aspectos biotecnológicos en FES

Los aspectos biotecnológicos más importantes a considerar en los procesos de fermentación de estado sólido (Figura 2.4.) son: el sustrato a fermentar, el microorganismo involucrado y el diseño del biorreactor utilizado (Ferrer *et al.*, 2014).

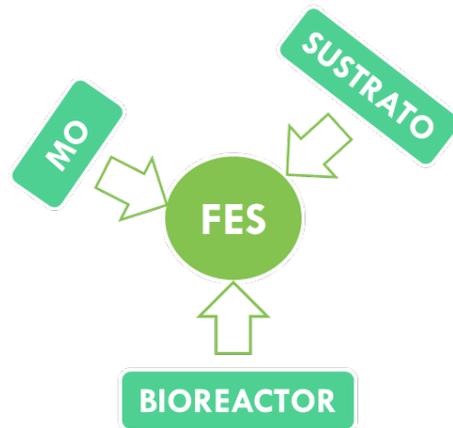


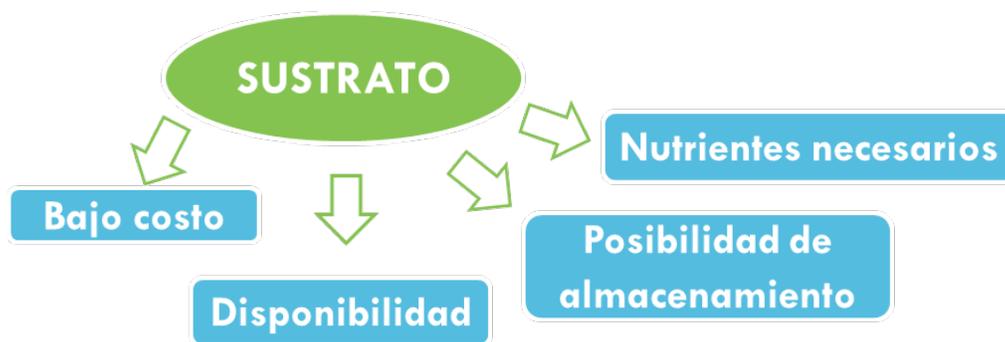
Figura 2.4. Aspectos fundamentales en FES.

Diversos cultivos y desechos agroindustriales tienen características fisicoquímicas adecuadas para utilizarse como sustratos en los bioprocesos de FES. Su composición química caracterizada por contener azúcares reductores, además de la presencia de polisacáridos como celulosa y hemicelulosa, es de importancia

fundamental como fuente de carbono para los microorganismos. Sin embargo, la presencia de la lignina representa un factor perturbador en la disponibilidad de esos polisacáridos para el desarrollo microbiano, ya que es un sustrato recalcitrante formado por polifenoles. Debido a esto, es necesario incrementar el área superficial para el desarrollo microbiano, modificando el tamaño de partícula mediante pretratamiento mecánico y en algunas ocasiones, la accesibilidad a la fuente de nutrientes mediante pretratamientos químicos y enzimáticos (Ferrer, Machado, and Brieva 2014).

Como sustrato ideal para la FES se considera aquél que provea a los microorganismos de todos los nutrientes necesarios para el metabolismo celular y fermentativo. Por otro lado, si algunos de los nutrientes no se encuentran en niveles adecuados, es necesario utilizar un suplemento como fuente externa del mismo.

La selección de un cultivo o un desecho agroindustrial para usarlo como sustrato depende de los siguientes factores: costo, disponibilidad en cantidades adecuadas para justificar una aplicación industrial y posibilidad de almacenamiento sin causar deterioro morfológico y microbiológico. En la Figura 2.5 se observa un esquema que resume las características de un sustrato que pueda ser empleado en FES.



**Figura 2.5.** Factores para la elección de un sustrato para FES

Las ventajas primarias del sorgo dulce son: Su alta productividad de etanol, 3700 a 5600 litros/ha por año; su adaptabilidad a diversos climas y suelos; y su necesidad reducida de nitrógeno en fertilizantes y agua comparado con cultivos convencionales como el maíz (Gibbons *et al.*, 1986).

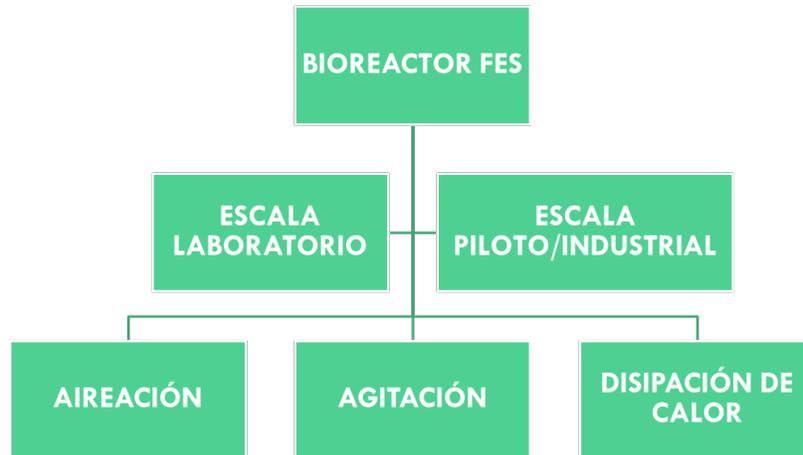
En FES, se pueden utilizar bacterias, levaduras y hongos; aunque los microorganismos (MO) más utilizados son cepas de hongos filamentosos. Aunque hay varios MO que pueden acumular grandes concentraciones de etanol, históricamente, el MO más comúnmente usado ha sido la levadura, entre las levaduras, *Saccharomyces cerevisiae*, la cual puede producir etanol a concentraciones tan altas como 18% del caldo de fermentación, es el MO más utilizado en producción de etanol (Lin y Tanaka, 2006).

Existe un gran interés en la utilización de *S. cerevisiae* para transformar cultivos y desechos agroindustriales en productos bioquímicos de valor comercial, por medio de la FES, porque se ha encontrado que durante la FES se manifiestan características fisiológicas diferentes en los microorganismos en comparación con la Fermentación líquida (FL). Entre los productos comerciales más importantes, se encuentran algunas enzimas que son excretadas al medio y cuya producción por FL se presenta en forma muy disminuida debido a los fenómenos de represión catabólica. A veces, las enzimas producidas por FS tienen características modificadas, como un aumento en su termo resistencia, menores tiempos de producción y mayor actividad. Los efectos que se derivan de la utilización de FS sobre los microorganismos son múltiples como modificaciones en el transporte de azúcares, la composición de la pared, la membrana celular y en la actividad enzimática (Diaz 2013).

Aunque *S. cerevisiae* es el MO más utilizado en fermentación, también hay MO no *Saccharomyces* que han llamado la atención, en especial aquellos que han sido aislados de los sustratos de interés. Por ejemplo, *Pichia pastoris* esta entre las levaduras más utilizadas de la industria, por su alta velocidad de crecimiento, adaptabilidad a los cambios de escala en birreactores y la posibilidad de alcanzar altas concentraciones celulares, redituando en altas productividades (Nuñez y Favela, 2012).

La última década ha sido una de las más importantes para el desarrollo en el diseño, operación y escalamiento de birreactores para la fermentación en medio sólido. Los tipos de birreactores más estudiados han sido los de bandeja y los de tambor rotatorio y desde hace pocos años se han introducido un nuevo tipo de birreactores en fermentación en medio sólido denominados de cama empacada o columna de lecho fijo. Algunos de los birreactores utilizados a escala laboratorio son cajas Petri y matraces Erlenmeyer. Estos son utilizados por su simplicidad, los cuales no operan con aeración ni agitación forzada, en ellos solamente es controlada la temperatura del cuarto de incubación.

Dentro de los procesos de fermentación en medio sólido existen actualmente dos categorías: a escala laboratorio en las cuales se utilizan pequeñas cantidades de medio sólido hasta pocos kilogramos, y el otro que es a escala piloto y escala industrial en donde se utilizan desde kilogramos hasta toneladas (Figura 2.6).



**Figura 2.6.** Clasificación y características principales de bioreactores en FES.

En la primera categoría existen muchos diseños de bioreactores, los cuales llegan a ser muy sofisticados, mientras que en la segunda categoría es poca la variedad de bioreactores utilizados, solo algunos de los bioreactores a nivel industrial pueden operar en condiciones estériles, en la Tabla 2.4 se clasifican los tipos más comunes de reactor utilizados en FES.

**Tabla 2.4.** Clasificación y tipos de fermentadores para FES. Ventajas y desventajas.

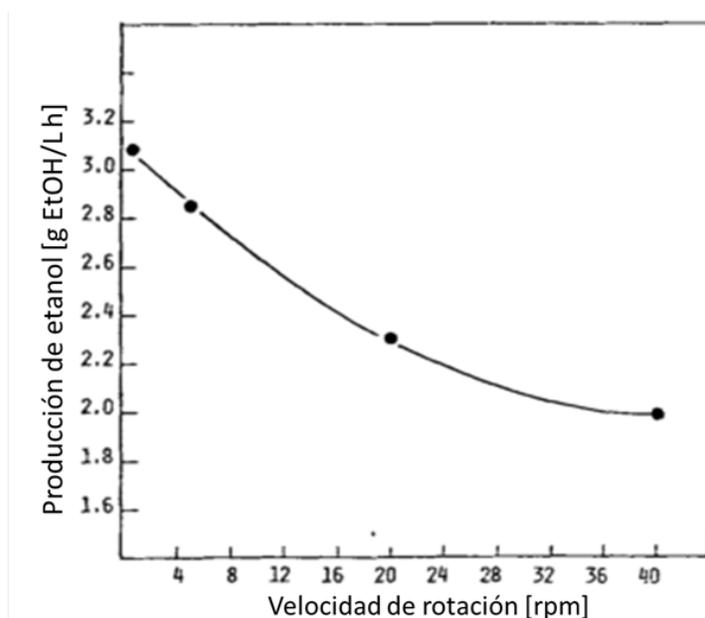
<b>BIOREACTOR</b>	<b>VENTAJAS</b>	<b>DESVENTAJAS</b>
<b>Escala laboratorio</b>		
<b>Columna</b>	Económico, fácil montaje, monitoreo y control de humedad, temperatura, biomasa y CO <sub>2</sub> . Conexión en forma continua de varias columnas.	Canales preferenciales de O <sub>2</sub> , dificultad en la toma de muestra y problemas en la eliminación de calor.
<b>Columna estéril</b>	Control de humedad y temperatura. Sistema de esterilización previo a inoculación y toma de muestras.	Formación de gradientes de concentración de O <sub>2</sub> y nutrientes.
<b>Tambor horizontal</b>	Mayor aireación y mezclado del sustrato. Existen varios diseños con modificaciones que mejoran la remoción de calor.	Daño de estructura micelial. Dificultad en el control de temperatura y humedad. Poco volumen utilizado en el tambor.
<b>Zymotis</b>	Mejor transferencia de calor.	Problemas de asepsia en el proceso. Mayor compactación de la cama de sustrato.
<b>Growtek</b>	Facilidad en la toma de muestras. Mayor contacto entre el medio de cultivo y el soporte sólido. Menor acumulación de calor en la cama de sustrato.	No cuenta con un sistema de aireación. Solo se puede manejar una sola carga de 400 mL de medio líquido por fermentación
<b>Proceso continuo</b>	Menor tiempo de residencia. Mejor mezclado y crecimiento fúngico. Mayor asepsia.	Transferencia no homogénea de calor. Aglomeración de células por rompimiento micelial.
<b>Columna charola</b>	Económico. Alta transferencia de O <sub>2</sub> y aireación. Mayor transferencia de nutrientes. Fácil remoción de temperaturas elevadas.	Primer prototipo. Optimizar la cantidad y tamaño de las charolas en el volumen del cilindro.
<b>Escala piloto y/o industrial</b>		
<b>Biocon</b>	Automatizado en el control de variables de estudio del crecimiento microbiano. Altos niveles de asepsia. Equipo compacto.	Dificultad en la toma de muestra. Rápida generación de calor exotérmico por crecimiento microbiano.
<b>Lecho fluidizado</b>	Operación de forma continua. Menor aglomeración del sustrato. Incremento en la transferencia de O <sub>2</sub> y humedad. Variedad de configuraciones de soportes.	Formación de altos esfuerzos cortantes que pueden afectar al microorganismo y al rendimiento del producto.

### 3. ESTADO DEL ARTE

Núñez y Favela en el (2012), propusieron el cultivo en medio sólido como alternativa para la producción de biomasa y enzimas, gracias a las ventajas que ofrece en comparación con el cultivo sumergido. Considerando que para la producción de biomasa en condiciones de cultivo en medio sólido es necesario favorecer la transferencia de O<sub>2</sub>, evaluaron el uso de capas finas de poliuretano (EPU) como soporte para el crecimiento de *P. pastoris*. Además, evaluaron la concentración inicial de glucosa (50 a 150 g/L) sobre la producción de biomasa de *P. pastoris*. Estos experimentos demostraron que el rendimiento  $Y_{x/s}$  (g/g) disminuye al aumentar la concentración de glucosa obteniéndose un  $Y_{x/s}$  de 0.45 para una  $S_0 = 50$  g/L, valor muy cercano al teórico 0.5, lo cual demuestra que este sistema estaba bien aireado, pero para  $S_0 = 150$  g/L obtuvieron un  $Y_{x/s}$  de 0.28.

Las conclusiones de este trabajo se pueden resumir en que el modelo de estudio propuesto para la producción de biomasa de *P. pastoris* a partir de glucosa como fuente de carbono y energía en un medio de cultivo impregnado en espuma de poliuretano bajo condiciones de cultivo en medio sólido, permitió demostrar que la producción de levaduras en placas de EPU con un espesor  $h = 0.7$  cm y  $S_0 = 50$  g/L, es un sistema más simple que el cultivo sumergido, aireado y agitado por lote simple y produce rendimientos y concentraciones celulares similares (20 g/L). Incluso que si se permite un metabolismo mixto (aerobio y fermentativo) se puede alcanzar con  $S_0 = 150$  g/L, la concentración celular de 40 g/L, valor que ya calificaría en el límite inferior de los cultivos densos. Los cuales llegan a tener hasta más de 100 g/L de levaduras en cultivos sumergidos y controlados en forma de lote alimentado. También obtuvieron que los efectos de grosor de las placas de EPU sobre el crecimiento de *P. pastoris* no son tan importantes como el efecto de la concentración inicial de glucosa.

Kargi y Curme en 1985, evaluaron la fermentación de los azúcares presentes en partículas sólidas de sorgo dulce triturado en un fermentador de tambor rotatorio (FTR) usando una cepa de levadura tolerante a etanol. La influencia de la velocidad de rotación del reactor de tambor rotatorio fue investigada y comparada con experimentos en recipiente estático. La velocidad de formación de etanol decreció con el incremento en la velocidad rotacional, como se observa en la Figura 3.1. La máxima velocidad de formación de etanol y el máximo grado fueron 3,1 g EtOH/L h (basado en el volumen de jugo exprimido) y 9,6 g EtOH/100 g de pulpa, respectivamente, a 1 rpm de velocidad de rotación.



**Figura 3.1.** Variación de la velocidad de formación de etanol con la velocidad de rotación de un fermentador de tambor rotatorio (Kargi y Curme, 1985).

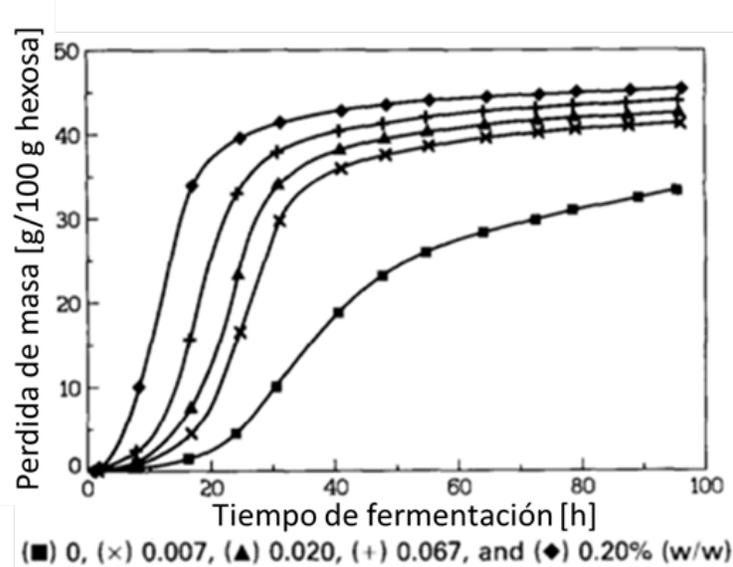
Gibbons *et al.* en 1986, utilizaron sorgo dulce triturado pasterizado y sin pasterizar para evaluar el efecto de la esterilización en la producción de etanol en un reactor de proceso continuo y encontraron que los rendimientos de etanol fueron los mismos para ambos procesos, lo que indica que se podría obviar la necesidad de pasterizar en futuros procesos de FES para producción de etanol. Además, hicieron los

balances de energía para el proceso con o sin pasteurización (Tabla 3.1.) y encontraron que el método con pasteurización tiene un balance de energía significativamente mayor, debido a la alta energía utilizada en el mismo.

**Tabla 3.1.** Balance de energía para la producción de etanol de sorgo dulce (Gibbons, Westby, and Dobbs 1986)

Parametro	Energia (KJ/L) producida o consumida	
	Con pausterización	Sin pausterización
Transporte	16	16
Secado/almacenamiento	7429	7429
Molienda	1087	1087
Pasteurización	4043	0
Fermentación	20	20
Prensado	97	97
destilación	7565	7565

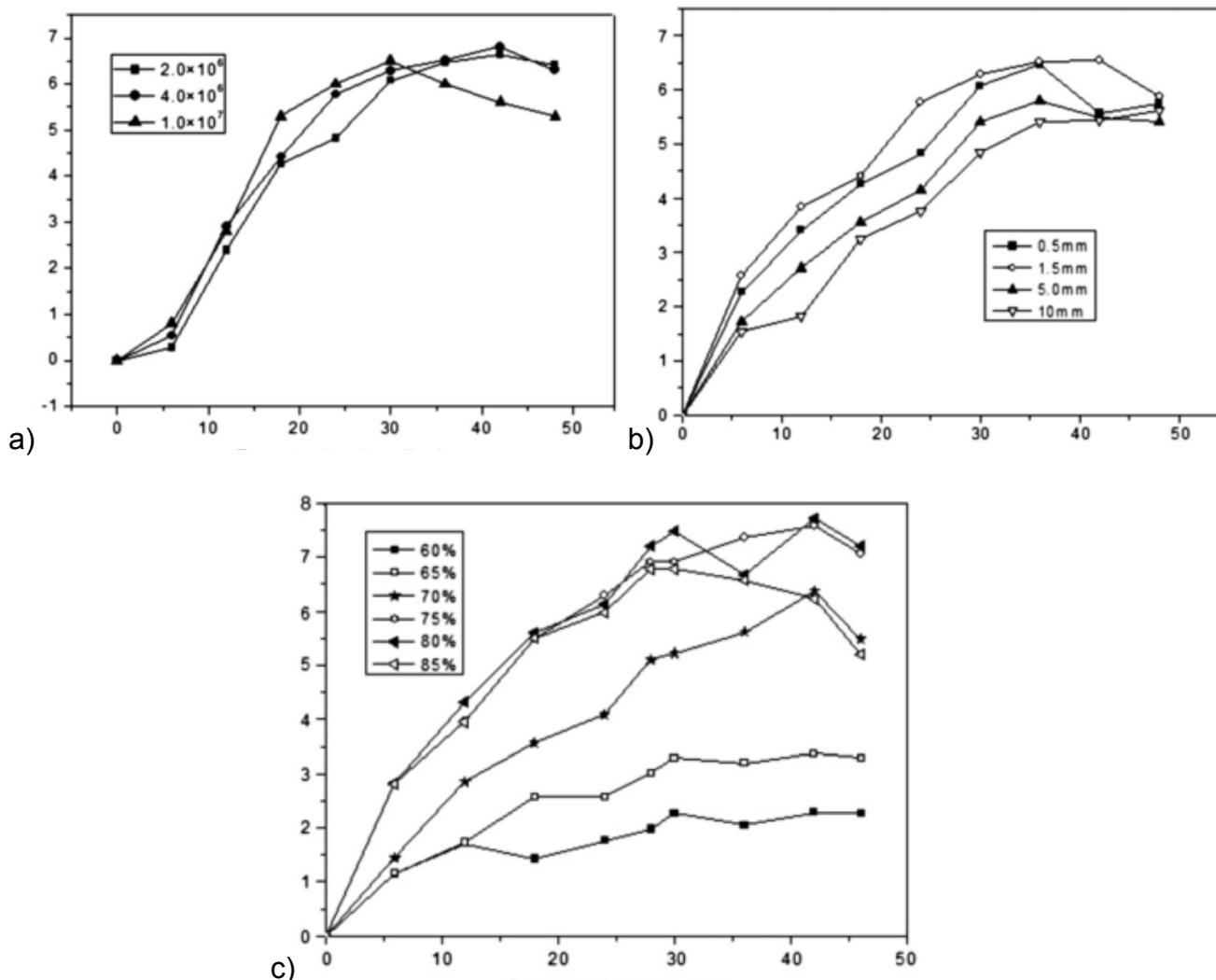
Bryan en 1990, estudio la FES de sorgo dulce sin esterilizar y observo que los MO nativos del sustrato fermentan los azucars en el sorgo sin esterilizar cuando se almacena a condiciones adiabáticas por 60-120 horas. Etanol es el mayor producto seguido por ácido láctico, dextranos, manitol, glicerol y ácido acético. Además, evaluó el efecto del tamaño de inculo de *S. cerevisiae* y encontró que esta decrece los niveles de ácido láctico, dextranos y manitol, mientras incrementa la velocidad de formación y el rendimiento de los oros productos. Pero a niveles muy elevados de tamaño de inculo los rendimientos de etanol bajan como se observa en la Figura 3.2. Esto se debe según Bryan (1990) al aumento de la respiración que causa que el acetaldehído, precursor del etanol, se evapore con el CO<sub>2</sub>.



**Figura 3.2.** Efecto de la concentración de inóculo,  $X_0$ , en la pérdida de masa durante la FES de bagazo de sorgo dulce (Bryan 1990).

Yu *et al.* en el (2008) evaluaron la influencia del tamaño de inóculo, el tamaño de partícula y el contenido de humedad, en el rendimiento de etanol de sorgo dulce utilizando FES. El comportamiento de los parámetros evaluados se muestra en la Figura 3.3. Los valores óptimos obtenidos para los parámetros evaluados fueron  $4 \times 10^6$  células/g sorgo para tamaño de inóculo, 1,5 mm de tamaño de partícula y 75% de humedad.

Rolz y de León en el (2013), evaluaron una variante en la forma de inoculación para el proceso de FES. Obtuvieron el jugo al prensar a baja presión trozos del tallo de sorgo dulce. El jugo se inoculó con levadura y se dejó fermentar parcialmente. Luego se adicionó de regreso a los sólidos prensados y se procede con la FES. Ellos comprobaron experimentalmente que la adición de levadura a trozos del tallo de sorgo dulce puede realizarse en forma homogénea y rápida por medio del jugo en fermentación activa.



**Figura 3.3.** Rendimiento de etanol [g etanol/100 g de tallo de sorgo] contra tiempo de fermentación [h] para: a) tamaño de inoculo, b) tamaño de partícula de sorgo y c) humedad (Yu et al., 2008).

Li *et al.* en el (2013), hicieron un estudio demostrativo de la conversión costo-efectiva de azúcares fermentables de sorgo dulce en etanol con FES. Utilizaron un fermentador de tambor rotatorio de 55 m de longitud y 3,6 m de diámetro, seguido de una destilación en estado sólido con arrastre de vapor. Sus resultados muestran que el tiempo de residencia es menor de 30 h y alcanzaron un 90,5% del rendimiento teórico para la producción de etanol. Esto muestra que el escalamiento de un sistema de FES es factible. Además, se reporta que el costo de la producción de

etanol es de \$615,4/ton con la premisa de que el precio de los vástagos de sorgo dulce es de \$30/ton.

Du *et al.* en el (2014), identificaron una cepa de *S. cerevisiae*, la TSH1, del suelo en el cual el sorgo dulce era almacenado. La cepa presento una excelente capacidad fermentativa de etanol, y la habilidad de sobre llevar las condiciones de stress de la FES. Además, escalaron gradualmente desde un frasco estático de 500 mL a un tambor rotatorio de 127 m<sup>3</sup> y eventualmente construyeron un tambor rotatorio de 550 m<sup>3</sup> para establecer un proceso industrial eficiente. Estos resultados demuestran que la tecnología de FES puede ser utilizada de manera factible y económica para producir etanol de sorgo dulce.

En la Tabla 3.2. se presenta un resumen de los antecedentes mencionados. En ella se observa el MO utilizado, los parámetros de operación, los resultados obtenidos para la producción de etanol y el principal aporte de información a considerar en FES.

Como síntesis de antecedentes se tiene:

- Aunque se han obtenido buenos resultados con *S. cerevisiae*, es posible encontrar microorganismos autóctonos de sistemas naturales que pudieran ser utilizados en FES.
- Dependiendo de las condiciones de operación es posible evitar el paso de esterilización del sustrato antes de la fermentación.
- Se ha observado que el tamaño de partícula y el tamaño del inóculo son parámetros importantes en el desarrollo de la FES.
- En varios trabajos se ha demostrado que es posible emplear de manera factible la FES aún en comparación a las fermentaciones sumergidas.

Tabla 3.2. Características principales de los antecedentes mencionados.

AUTORES	MO	REACTOR	PARÁMETROS DE OPERACIÓN	RESULTADOS	APORTE
Kargi y Curme, 1985	<i>S. cerevisiae</i> NRRL Y-11572	Tambor rotatorio	Vel. Rotación: 1- 40 rpm Partícula: 0,2-7 mm Humedad: 65% 4x10 <sup>9</sup> cel/g de sorgo	80% del teórico 9,6g EtOH/100g 3,1g EtOH/L h	La producción de etanol disminuye con el aumento en la velocidad de rotación.
Gibbons <i>et al.</i> , 1986	<i>S. cerevisiae</i> NRRL Y-2034	Proceso continuo	Partícula: 25,4 mm Humedad: 70% 5x10 <sup>7</sup> cel/g de sorgo	85% del teórico 14g EtOH/100g	La esterilización no influyó en la producción de etanol.
Bryan, 1990	<i>S. cerevisiae</i> (Universal Foods Corporation)	Recipiente estático	Partícula: 6-300 mm Humedad 60-85% Inoculo: 0-0,2% p/p	6,3g EtOH/100g	Tamaños de inóculo elevado disminuyen el rendimiento de etanol.
Yu <i>et al.</i> , 2008	Baker yeast AF37X	Recipiente estático	Partícula: 0,5-10 mm Humedad:60-85% 2, 4 y 10x10 <sup>6</sup> cel/g de sorgo	91% del teórico 7,9g EtOH/100g	Valores óptimos: 4x10 <sup>6</sup> cel/g de sorgo Partícula: 1,5 mm 75 % de humedad.
Rolz y de León, 2013	<i>S. cerevisiae</i> (Destilería)	Recipiente estático	Partícula: 200-300 mm Humedad: 70% Inóculo 10% v/v de jugo	85% del teórico 10g EtOH/100g	Jugo en fermentación activa como medio de inoculación homogénea.
Li <i>et al.</i> , 2013	<i>S. cerevisiae</i> TSH1	Tambor rotatorio industrial (D:3,6 m; L: 55 m)	Vel. Rot: 0,02-0,25 rpm Partícula: 1-50 mm Humedad: 66% 1-2 mg cel/g de sorgo Carga del reactor: 68%	90,5% del teórico 41,4g EtOH/100g	Mostraron que un proceso industrial con buenos rendimientos es posible.
Du <i>et al.</i> , 2014	<i>S. cerevisiae</i> TSH1	Tambor rotatorio (50 L - 550 m3)	Vel. Rotación: 0,5 rpm Humedad: 40, 50, 60, 70% Carga del reactor: 55%	88% del teórico 11,3g EtOH/Kg h	Aislaron la TSH1 y mostraron la factibilidad en FES a gran escala para etanol de sorgo dulce.

#### 4. JUSTIFICACION

Debido al inminente aumento en la demanda de biocombustibles es necesario estudiar alternativas de obtención que complementen las prácticas actuales, alternativas que disminuyan el gasto de energía y que sean más amables con el medio ambiente.

La fermentación de estado sólido es un sistema denominado de las tres Es: energético, económico y ecológico (Raghavarao *et al.*, 2003). Convirtiéndolo en una alternativa tecnológica prometedora para la producción de etanol debido al ahorro de costos de proceso y a la disminución del impacto ambiental.

Por este motivo es necesario desarrollar investigaciones que permitan adoptar esta tecnología en las prácticas actuales del país, empezando por supuesto, desde la escala laboratorio.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Desarrollar un sistema de producción de etanol de sorgo dulce utilizando fermentación en estado sólido a escala laboratorio y caracterizar las principales variables del proceso.

### 5.2. Objetivos específicos

- Caracterizar las cinéticas de crecimiento de los MO y de producción de etanol, tanto en cultivo sumergido, como en estado sólido en recipiente estático.
- Evaluar el efecto del tamaño de inóculo en la producción de etanol en cultivo sólido en recipiente estático.
- Evaluar el efecto de la adición de nutrientes en la producción de etanol en cultivo sólido en recipiente estático.

## 6. METODOLOGIA

El trabajo experimental a realizar fue dividido en 4 fases de acuerdo a los objetivos específicos; en la Figura 6.1 se observa el diagrama general de la metodología que se llevo a cabo.

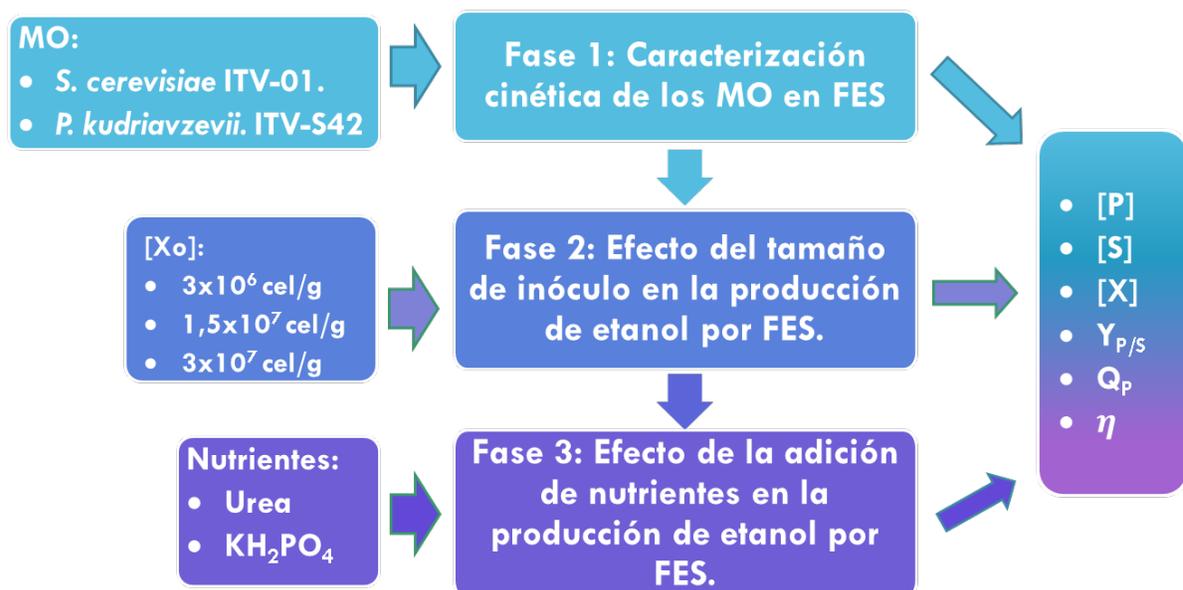


Figura 6.1. Diagrama metodológico general.

En la fase 1 se llevó a cabo la caracterización cinética de los microorganismos, se realizaron por duplicado las cinéticas para dos levaduras: *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01, levadura de uso común para producción de etanol y *Pichia kudriavzevii* ITV-S42, levadura nativa aislada del jugo de sorgo, las fermentaciones correspondientes de llevaron a cabo en recipientes estáticos a modo de fermentadores no agitados no aireados, para lo cual se emplearon matraces de 250 mL. Se medio para ambas levaduras sus concentraciones de producto, sustrato y biomasa, y se calculo, la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), los rendimientos producto-sustrato ( $Y_{p/s}$ ), la productividad ( $Q_p$ ) y la eficiencia ( $\eta$ ).

En la fase 2 se evaluó el efecto del tamaño de inóculo sobre la producción de etanol de sorgo dulce en FES, para lo cual se usaron tres niveles:  $3 \times 10^6$ ,  $1,5$  y  $3 \times 10^7$  cel/g de sorgo para el tamaño de inóculo. Los experimentos se realizaron por duplicado para cada levadura utilizada en la fase 1.

En la fase 3 se evaluó el efecto de la adición de nutrientes sobre la producción de etanol de sorgo dulce en FES, esto se realizó con las mejores condiciones encontradas en la fase 2. Se realizaron tres pruebas evaluando el efecto de agregar Urea ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y una combinación de los dos, y se compararon con los resultados obtenidos en la fase 2 en ausencia de nutrientes. Estos experimentos se realizaron por duplicado para cada levadura.

El sustrato a utilizar fue sorgo dulce cuyos tallos fueron triturados utilizando una picadora de forraje. Una vez triturado fue almacenado en congelación en bolsas de plástico. Los microorganismos a utilizar en los diferentes experimentos fueron *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 y *Pichia kudriavzevii* ITV-S42, cepas proporcionadas por el laboratorio de bioingeniería de la UNIDA, Tecnológico de Veracruz, México.

El protocolo de activación de las cepas se llevó a cabo preparando el medio de activación como se indica en la tabla de la Figura 6.2., este es esterilizado durante 15 min en autoclave a  $121^\circ\text{C}$ . Después se inocula el medio estéril empleando tres azadas y se deja incubar durante 12 horas a  $30^\circ\text{C}$  con 150 rpm de agitación orbital. Al cabo de ese tiempo se realiza el conteo celular y se inocula el volumen adecuado de medio según se necesite (usualmente  $3 \times 10^6$  cel/mL) sobre el medio de adaptación que contiene jugo de sorgo dulce, esta adaptación se realiza durante 12 horas a  $30^\circ\text{C}$  y con 150 rpm de agitación orbital. Cuando el periodo de adaptación

acaba se inocula por aspersión las partículas de sorgo dulce triturado y se lleva a cabo la FES. En la Figura 6.2. se presenta un diagrama del protocolo de activación y la composición del medio de activación.

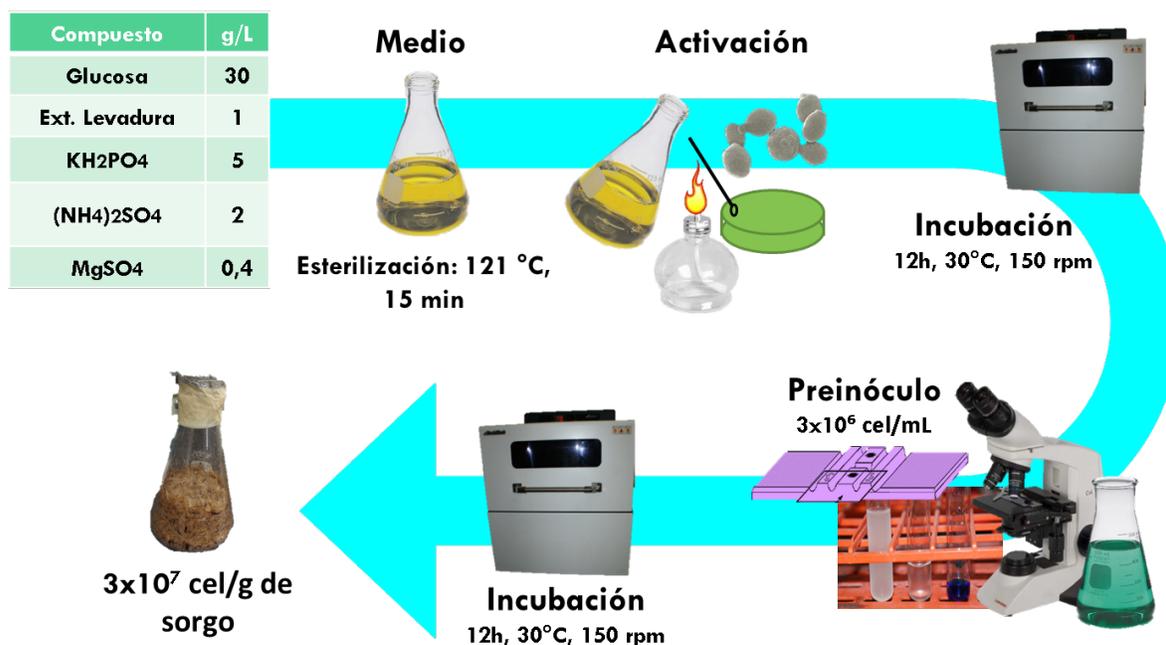


Figura 6.2. Protocolo de preparación del microorganismo. Activación y adaptación.

Las muestras analizar de FES se obtienen prensando el material sólido en una prensa Carver para obtener el jugo, con el fin de medir las variables de interés como en Bryan, 1990; Kargi & Curme, 1985; Yu et al., 2008. Con el fin de tener cantidad suficiente de material para prensar se utilizaron muestras destructivas para cada punto medido en la cinética; para ello se pesaron 30 g de sorgo dulce triturado en matraces de 250 ml, que pudieron o no ser esterilizados de acuerdo al experimento realizado, en la Figura 6.3., se presenta una imagen de las muestras destructivas utilizadas en FES. La esterilización se llevó a cabo en autoclave a 121°C durante 15 min. El jugo extraído utilizando la prensa es recuperado en un tubo de ensayo para medir pH, °Brix y hacer la dilución respectiva para calcular la concentración celular

por conteo con cámara de Thoma; además se centrifuga 1,5 mL de jugo en un tubo Eppendorf a 10000 revoluciones por 10 minutos, el sobrenadante es almacenado para medir contenido de azúcares y etanol por HPLC. En la Figura 6.4. se presenta un diagrama para el protocolo de toma de muestras.



Figura 6.3. Muestras destructivas utilizadas en cinética de FES con recipiente estático

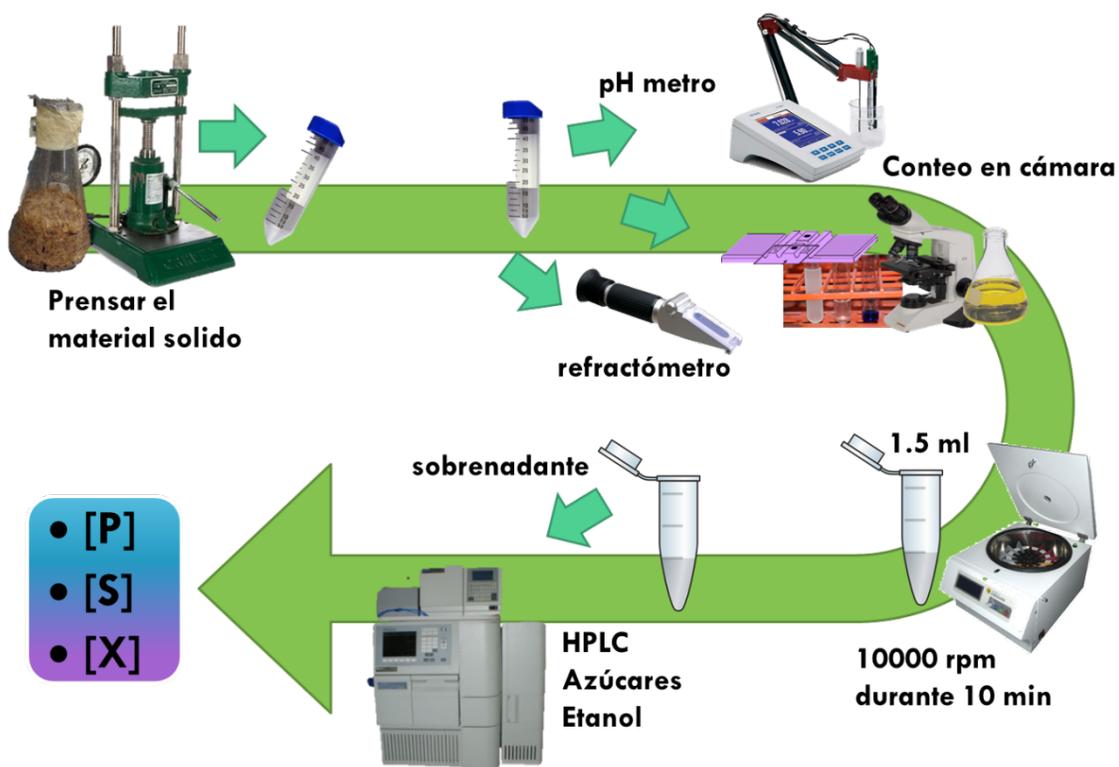


Figura 6.4. Protocolo de procesamiento de muestras.

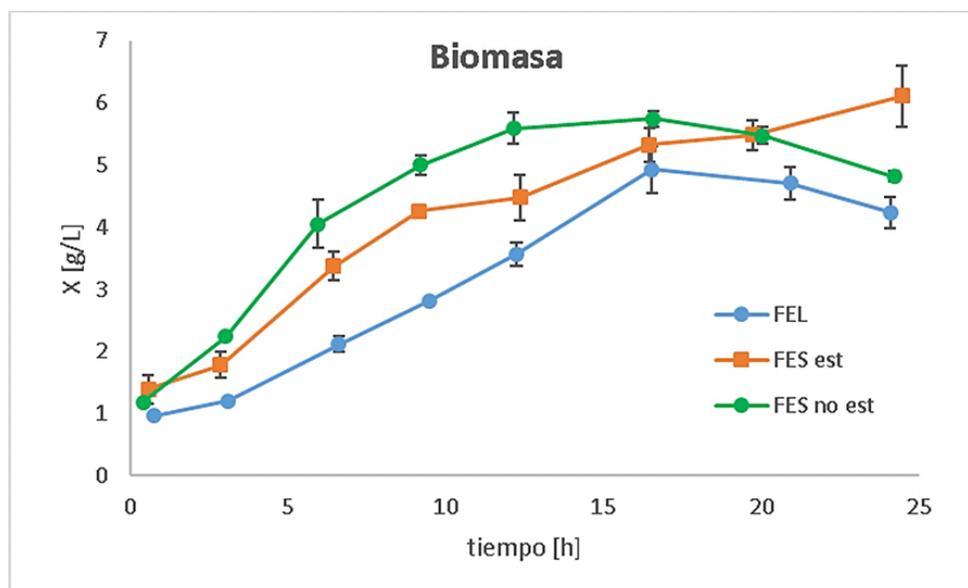
Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante análisis de varianza de una variable (one-way ANOVA). Las diferencias entre valores medios fueron comparadas usando la prueba de rango múltiple de Tukey con un nivel de significancia definido como  $P \leq 0.05$  usando Minitab 17.0 (Minitab Inc., State College, Pennsylvania).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Comparación entre fermentación convencional y FES, y efecto de la esterilización.

#### 7.1.1. *S. cerevisiae* ITV-01

Con el fin de llevar a cabo una comparación de los resultados obtenidos por las pruebas de FES se llevó a cabo una fermentación sumergida utilizando 300 ml de jugo de sorgo dulce en un matraz de 500 ml, el protocolo de activación y adaptación de los MO fue el ilustrado en la Figura 6.3. utilizando como tamaño de inóculo  $3 \times 10^6$  cel/mL. Cada tres horas se tomó una muestra y se analizó utilizando el protocolo descrito en la Figura 6.5. Además de la fermentación sumergida, se llevaron a cabo dos tipos de cinéticas de FES diferenciadas por la aplicación del paso de esterilización previo a la inoculación del medio sólido. En la Figura 7.1. se observa el crecimiento de la biomasa con el tiempo para las tres cinéticas realizadas: sumergida (FEL), sólida esterilizada (FES est) y sólida no esterilizada (FES no est).



**Figura 7.1.** Concentración vs tiempo en fermentación de sorgo dulce usando *S. cerevisiae* ITV-01.

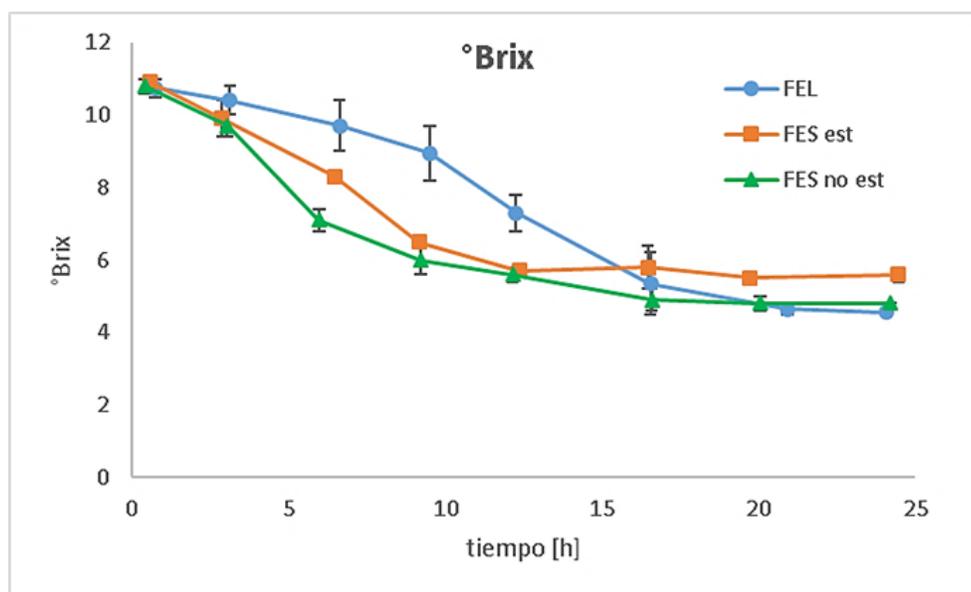
En la gráfica se observa que hubo crecimiento normal de la levadura en medio solido a pesar de la disminución de agua libre que el proceso de FES conlleva; llegando a alcanzar valores similares e incluso superiores a los de la fermentación sumergida. Al comparar la FES esterilizada con la no esterilizada se observa menor crecimiento en la FES no esterilizada, esto podría deberse a la competencia por los nutrientes que genera la microflora natural presente en el sorgo dulce, esto se refleja en las velocidades específicas de crecimiento de la Tabla 7.1.

**Tabla 7.1.** Velocidades específicas de crecimiento máximas calculadas para las fermentaciones sumergida (FES), FES esteril y Fes no esteril para *S. cerevisiae* ITV-01.

Cinética	$\mu_{\max}$ [1/h]	
	prom	desvesta
FEL	0.155	0.021
FES est	0.177	0.034
FES no est	0.222	0.028

Con el avance del tiempo de fermentación y la necesidad de usar factores de dilución más altos al preparar la muestra para contar en cámara de Thoma, se observó la desaparición de MO no *Saccharomyces*, esto puede ser debido a la actividad killer de la cepa utilizada. El buen crecimiento obtenido en FES indica que la humedad y la actividad de agua del soporte solido es adecuada para favorecer el crecimiento y la actividad metabólica de los MO inoculados (Costa *et al.*, 2010), además de que el pretratamiento de reducción de tamaño de partícula de sorgo dulce mejora las características de transferencia de masa que le permiten al MO obtener los nutrientes necesarios. Se calculó viabilidad para los MO en FES de hasta 99,6% después de 51 h de fermentación.

En la Figura 7.2. se presenta la disminución de los °Brix con respecto al tiempo de fermentación; se puede observar que la disminución de los sólidos disueltos en el jugo se dio más rápido para la FES que para la sumergida durante las primeras 12 h de fermentación, esto puede ser atribuido a la menor presencia de agua en el sólido, y a la diferencia de los equipos usados para la obtención del jugo que pueden ser en mayor o menor medida menos eficientes. Los grados °Brix disminuyeron más rápido en la FES sin esterilización, esto es debido a que la microflora nativa también consume sustratos, mientras no se inhibida su actividad por la característica killer de la levadura inoculada.



**Figura 7.2.** °Brix vs tiempo en fermentación de sorgo dulce usando *S. cerevisiae* ITV-01.

En la Figura 7.3. se puede observar el cambio en el pH con el tiempo para las tres cinéticas, aunque el pH en la FES resulta un poco más bajo que en la sumergida, las tres cinéticas mantuvieron un pH estable; según Paredes & Arechiga (2005), se puede saber que una cepa no está contaminada si el pH se mantiene constante, lo que prueba que la contaminación presente en la FES sin esterilizar es despreciable, lo que permitiría omitir este pretratamiento. Según Pandey *et al.* (2000), los procesos

de FES involucran MO que crecen rápidamente en bajas condiciones de agua, en donde el MO del proceso es capaz de imponerse a los organismos contaminantes, esto significa que el estricto manejo aséptico de la operación del biorreactor no es esencial, por supuesto, la operación debe ser llevada a cabo de la manera más limpia posible.

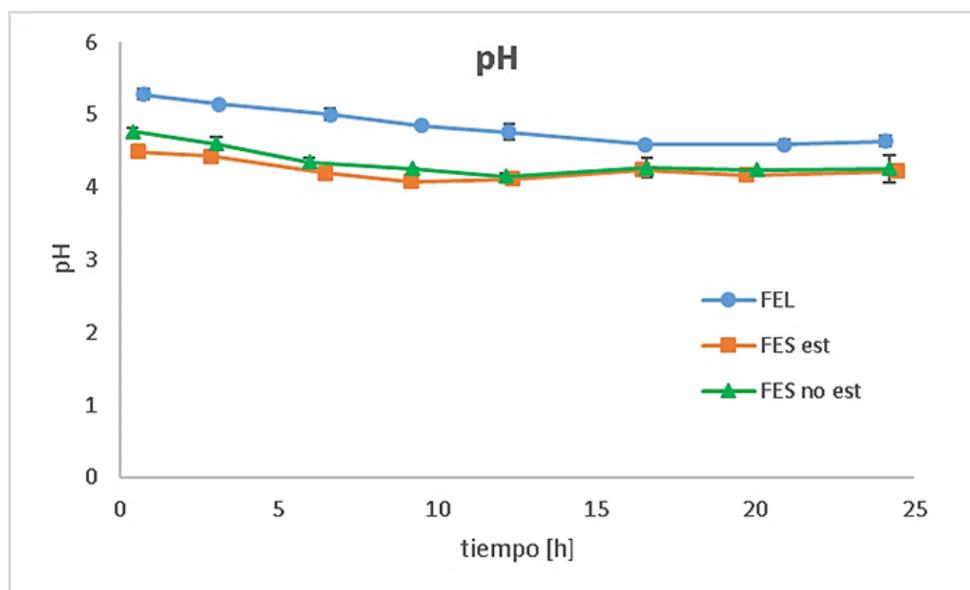
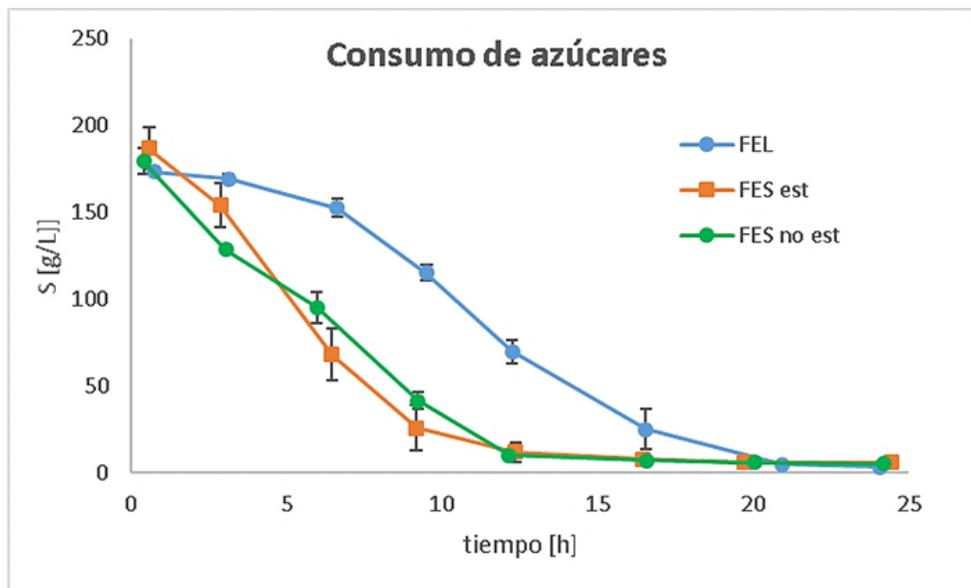


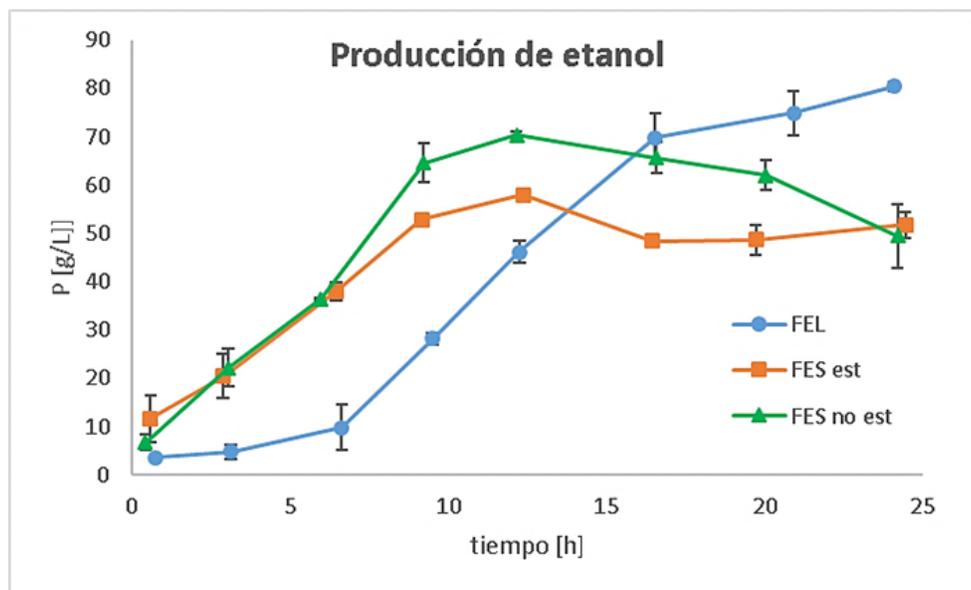
Figura 7.3. pH vs tiempo en fermentación de sorgo dulce usando *S. cerevisiae* ITV-01.

Según Raghavarao *et al.* (2003), se puede analizar la transferencia de masa a un nivel de microescala, el MO forma una biopelícula fina de células sobre el sustrato donde se da el crecimiento, esto permite la difusión inter e intraparticular de gases, enzimas, nutrientes y productos del metabolismo; esto depende de la fracción de vacío que se mantiene en la estructura. Si la humedad es alta los vacíos se llenan de agua y se dificulta la difusión de gases, si la humedad es baja, el crecimiento del MO se dificulta al escasear el medio de transferencia; por ende, la humedad debe ser óptima. Estos experimentos se llevaron a cabo a 70 % de humedad que según varios autores (Gibbons *et al.*, 1986; Kargi & Curme, 1985; Rolz & de León, 2013) es la

adecuada para la fermentación de sorgo dulce. Además, se midió actividad de agua para el sorgo triturado obteniendo valores de al menos 0,96.



**Figura 7.4.** Cinética de consumo de azúcares (glucosa y fructosa) en fermentación de sorgo dulce usando *S. cerevisiae* ITV-01.



**Figura 7.5.** Cinética de producción de etanol en fermentación de sorgo dulce usando *S. cerevisiae* ITV-01.

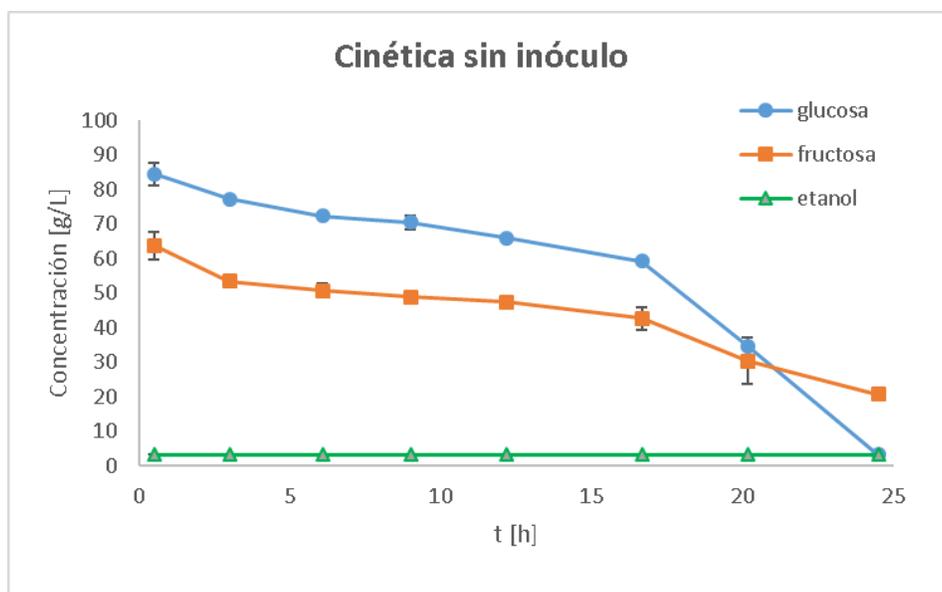
En las Figuras 7.4. y 7.5. se observa el consumo de azúcares (glucosa y fructosa) y la producción de etanol, respectivamente. Estos datos fueron obtenidos utilizando HPLC en las muestras a diferentes tiempos de fermentación. Se observa que para las fermentaciones solidas hubo mayor consumo de azucares y mayor producción de etanol en las primeras 12 horas de fermentación, como se mencionó antes si se considera el crecimiento como una biopelícula fina entonces hay buena transferencia de masa al comienzo de la fermentación, a medida que pasa el tiempo y los nutrientes se agotan es de esperar que la velocidad de transferencia de masa disminuya.

La fermentación sumergida alcanzo valores más altos de producción de etanol y consumo de azucares que la FES, es claro que la homogeneidad de los componentes en la solución y la transferencia de masa facilitada en el agua obtienen mejores resultados con el tiempo. La FES no esterilizada consumió más rápido los azúcares y produjo mas etanol que la esterilizada, esto se puede atribuir a la presencia de microflora nativa que también consume los azúcares y a la posible disminución de azúcares disponibles para fermentación debido a la degradación (pardeamiento, caramelización) ocasionada por el tratamiento de esterilización. En la Figura 7.6. se observa la diferencia visual entre el material solido esterilizado y el no esterilizado.



**Figura 7.6.** Muestras de sorgo dulce triturado utilizadas en FES, a la izquierda muestra esterilizada, y a la derecha muestra no esterilizada.

Con respecto a la producción de etanol, es posible que la microflora nativa de las muestras solidas pudiera fermentar parte de los azúcares disponibles como en Bryan (1990), por lo cual se realizo una cinetica de prueba sin inocular el medio con las levaduras de estudio; encontrando que la microflora nativa no produjo etanol como se observa en la Figura 7.7. Otra de las razones del menor contenido de etanol en las muestras solidas es la posible pérdida del mismo durante la manipulación del material y el procedimiento de muestreo al que es sometido.



**Figura 7.7.** Consumo de azúcares y producción de etanol en FES. Microflora nativa

Se calcularon el rendimiento, la productividad y la eficiencia para el punto en el que se obtuvo la concentración más alta de etanol para cada cinética, los datos pertinentes se presentan en la Tabla 7.2. Se observó que la fermentación líquida alcanza un mayor rendimiento de etanol que las FES, como se describió antes las condiciones más homogéneas en el líquido permiten una mejor fermentación a etanol con el paso del tiempo, no obstante, las FES alcanzaron su concentración más alta de etanol al pasar alrededor de 12 horas de fermentación, mientras que la

fermentación sumergida alcanzo una concentración aproximadamente 14-39% mayor en el doble del tiempo. Esto se ve reflejado en el valor de productividad, el cual es hasta 74% mayor en la FES, esto significa una gran ventaja con respecto a las fermentaciones sumergidas ya que aunado al menor gasto energético y a la menor necesidad de pretratamientos, un menor tiempo de trabajo de los equipos significa menor gasto de energía, por ende, una mejora del proceso; más aún si consideramos que no se necesita esterilizar el material antes de la fermentación. Según Yu *et al.* (2008), se puede obtener mejores rendimientos de etanol para FES al disminuir el tamaño del inoculo, ya que una mayor concentración celular tiene más uso de azúcares en crecimiento y mantenimiento; aunque es obvio que una mayor concentración celular inicial reduce el tiempo de fermentación y también la probabilidad de contaminación del cultivo.

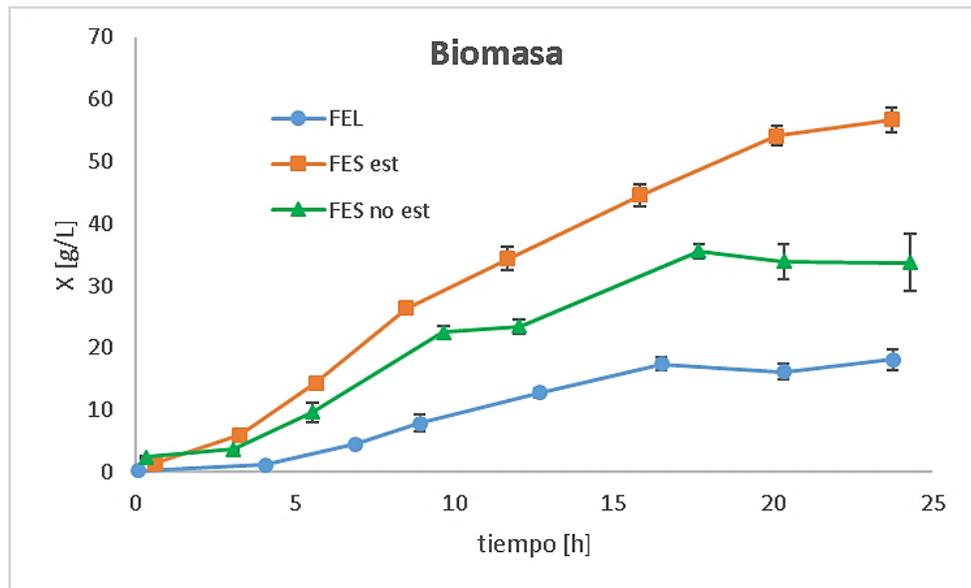
**Tabla 7.2.** Rendimiento, productividad y % eficiencia para las fermentaciones sumergida (FES), FES esteril y Fes no esteril en *S. cerevisiae* ITV-01.

Cinética	Y <sub>P/S</sub> [g etOH/g az]		Q <sub>P</sub> [g/(L*h)]		% eficiencia	
	Prom	desv est	Prom	desv est	Prom	desv est
FEL	0.468	0.006	3.337	0.044	91.830	1.195
FES est	0.310	0.006	4.688	0.052	60.716	1.129
FES no est	0.398	0.008	5.792	0.055	78.036	1.628

### 7.1.2. *P. kudriavzevii* ITV-S42

Los estudios se realizaron siguiendo los mismos procedimientos que para *S. cerevisiae* ITV-01, En la Figura 7.8. se observa el crecimiento de la biomasa con el tiempo para las tres cinéticas realizadas: sumergida (FEL), solida esterilizada (FES est) y sólida no esterilizada (FES no est). Se observa que al igual que con *S. cerevisiae* ITV-01 hubo crecimiento normal de la levadura en medio solido a pesar de la disminución de agua libre que el proceso de FES conlleva (viabilidad > 90%);

llegando a alcanzar en este caso valores muy superiores de concentración celular a los de la fermentación líquida, llegando a ser hasta 5 veces mayor; en la Figura se observa la cantidad bastante significativa de biomasa que contiene la muestra después de centrifugar con el fin de obtener el sobrenadante para HPLC.



**Figura 7.8.** Concentración vs tiempo en fermentación de sorgo dulce usando *P. kudriavzevii* ITV-S42.



**Figura 7.9.** Imagen demostrativa de la cantidad de biomasa presente en la muestra centrifugada de jugo prensado del sólido fermentado por *P. kudriavzevii* ITV-S42.

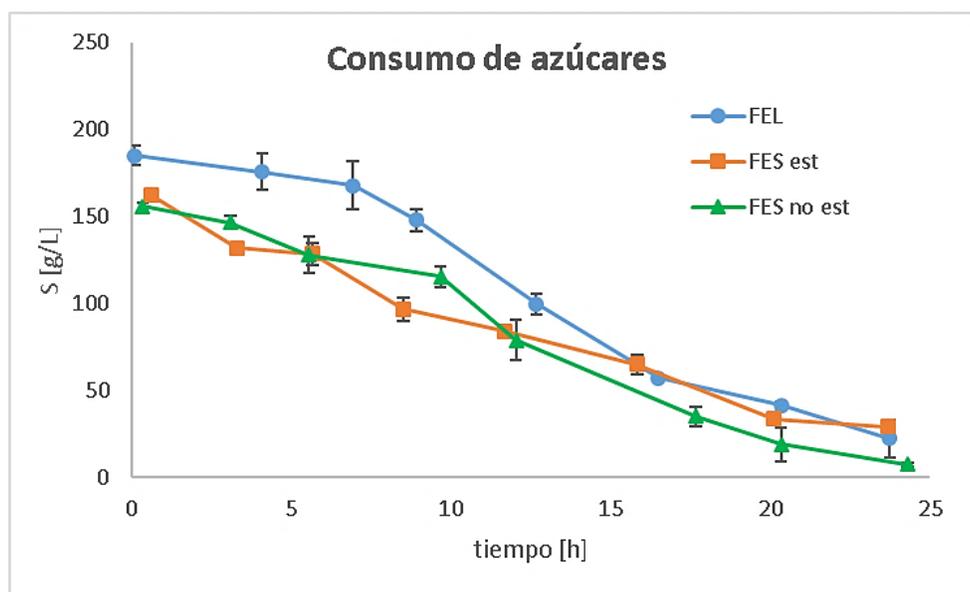
Al comparar la FES esterilizada con la no esterilizada se observa menor crecimiento en la FES esterilizada, esto podría deberse a la competencia por los nutrientes que genera la microflora natural presente en el sorgo dulce no esterilizado dejando menos azúcares disponibles para *P. kudriavzevii* ITV-S42; por otro lado la esterilización podría estar haciendo un efecto de hidrólisis sobre la hemicelulosa, dejando disponible mas azúcares, principalmente Xilosa, que a diferencia de *S. cerevisiae* ITV-01 si puede ser metabolizada por *P. kudriavzevii* ITV-S42, las velocidades específicas de crecimiento para este experimento se presentan en la Tabla 7.3. No se encontró diferencias significativas entre las  $\mu_{\max}$  de las cinéticas sólidas, lo cual indica que la diferencia en el crecimiento puede deberse, como se menciono antes, a una mayor disponibilidad de azúcares.

**Tabla 7.3.** Velocidades específicas de crecimiento máximas calculadas para las fermentaciones sumergida (FES), FES esteril y Fes no esteril para *P. kudriavzevii* ITV-S42.

Cinética	$\mu_{\max}$ [1/h]	
	prom	desvesta
FEL	0.421	0.016
FES est	0.454	0.060
FES no est	0.354	0.056

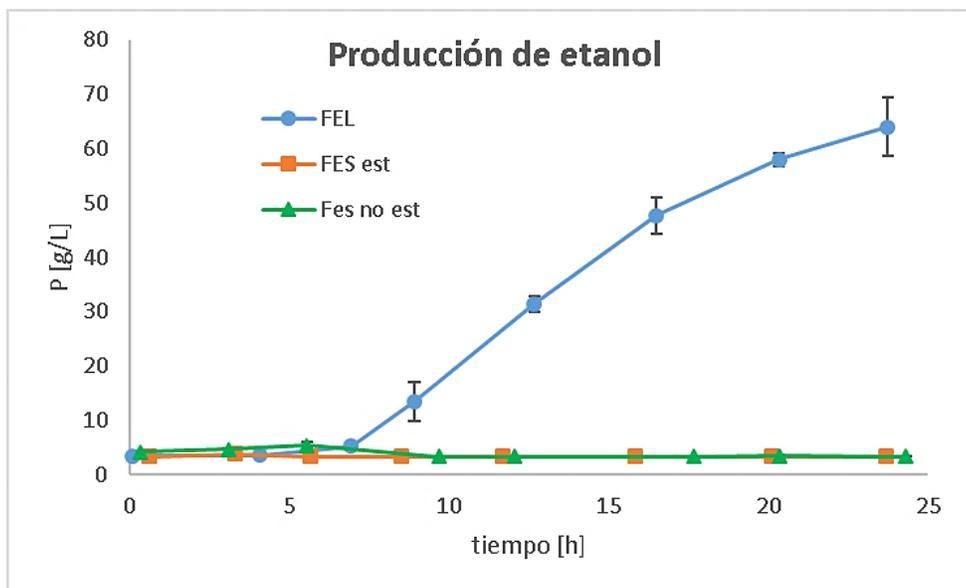
En las Figuras 7.10. y 7.11. se observa el consumo de azúcares (glucosa y fructosa) y la producción de etanol, respectivamente. Estos datos fueron obtenidos utilizando HPLC en las muestras a diferentes tiempos de fermentación. Con respecto al consumo de azúcares no se observa diferencia significativa debido al efecto de esterilización en las muestras sólidas. En cambio, con respecto a la producción de etanol se observa una gran diferencia entre las fermentaciones líquidas y las FES, ya que mientras la FEL se llevo a cabo de manera normal alcanzando aproximadamente 6,5 %p/v de concentración de etanol después de 24 h, las FES no produjeron etanol a lo largo del tiempo estudiado; esto esta relacionado con el incremento elevado en

la producción de biomasa que se presentó anteriormente para esta levadura, lo cual indica que *P. kudriavzevii* ITV-S42 llevó a cabo su metabolismo orientado a respiración en lugar de hacia la fermentación anaerobia en donde se fomenta la producción de etanol, lo cual explicaría el incremento en la biomasa con respecto a la FEL y la ausencia de etanol a lo largo del experimento. Por este motivo se recomienda realizar estudios con respecto a los efectos de represión catabólica y al metabolismo de esta levadura, desde el punto de vista de expresión de enzimas que pudieran estar ausentes y que ocasionen que se favorezca la ruta aerobia de crecimiento celular.



**Figura 7.10.** Cinética de consumo de azúcares (glucosa y fructosa) en fermentación de sorgo dulce usando *P. kudriavzevii* ITV-S42.

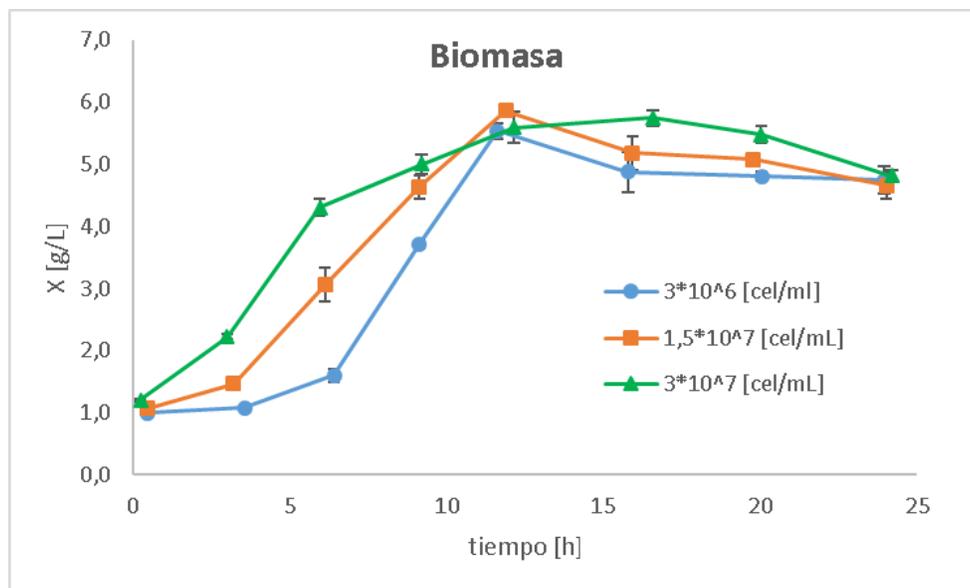
Ya que la levadura *P. kudriavzevii* ITV-S42 no produjo etanol, aun en las diferentes condiciones evaluadas, los resultados que se presentan para las dos siguientes fases del estudio son solo para *S. cerevisiae* ITV-01.



**Figura 7.11.** Cinética de producción de etanol en fermentación de sorgo dulce usando *P. kudriavzevii* ITV-S42.

## 7.2. Efecto del tamaño de inóculo sobre el crecimiento celular, el consumo de azúcares y la producción de etanol.

En esta etapa se analizó el efecto del tamaño de inóculo sobre el crecimiento de la levadura *S. cerevisiae* ITV-01, el consumo de azúcares y la producción de etanol en FES. Se probaron dos tamaños de inóculo adicionales más pequeños al utilizado en la fase anterior de este trabajo como en Yu *et al.* (2008). Los tamaños de inóculo a evaluar fueron entonces  $3 \times 10^6$ ,  $1,5 \times 10^7$  y  $3 \times 10^7$  cel/mL. En la Figura 7.12. se presenta los resultados obtenidos para producción de biomasa para las tres cinéticas realizadas. Se observa que con un mayor tamaño de inóculo hay una mayor concentración de biomasa a lo largo del experimento hasta alrededor de 12 h donde las concentraciones se hacen muy similares, esto es debido a que un menor tamaño de inóculo tuvo también una mayor velocidad específica de crecimiento máxima como se observa en la Tabla 7.4.



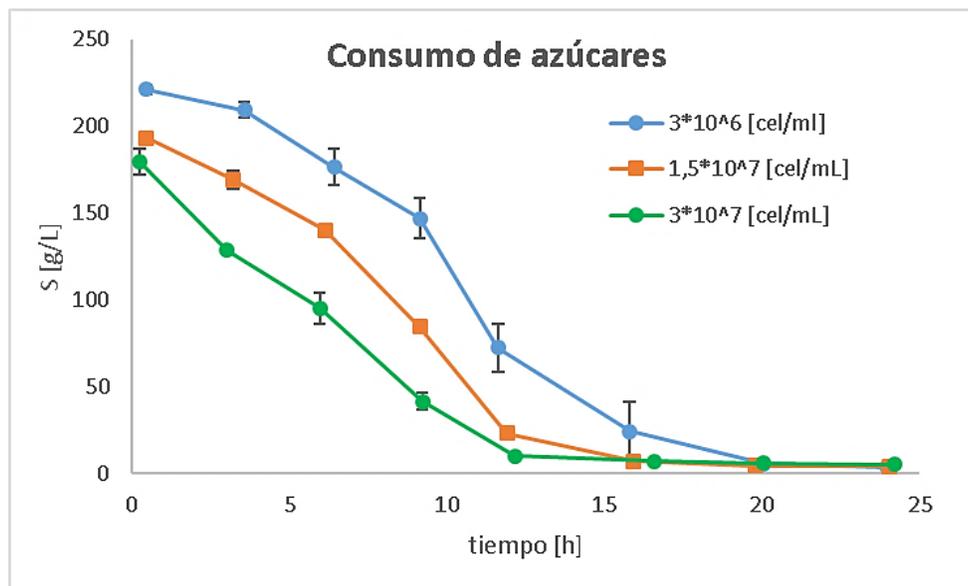
**Figura 7.12.** Concentración de biomasa vs tiempo para *S. cerevisiae* ITV-01, evaluación del efecto del tamaño de inóculo.

**Tabla 7.4.** Velocidades específicas de crecimiento máximas calculadas para las fermentaciones sumergida (FES), y FES con diferentes tamaños de inóculo.

Cinética	$\mu_{max}$ [1/h]	
	prom	desvesta
FEL	0.155	0.021
3*10 <sup>6</sup> [cel/mL]	0.292	0.027
1.5*10 <sup>7</sup> [cel/mL]	0.241	0.041
3*10 <sup>7</sup> [cel/mL]	0.222	0.028

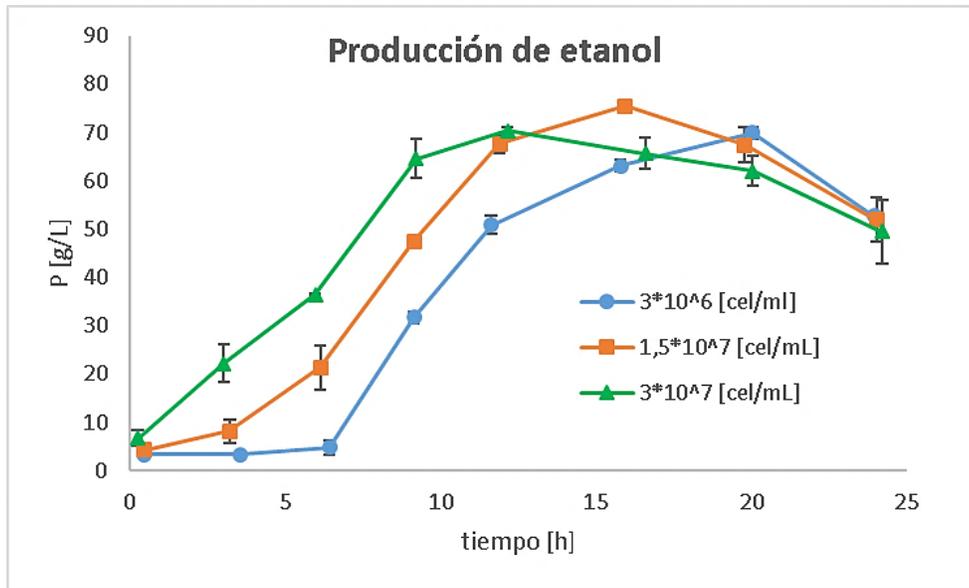
En las Figuras 7.13. y 7.14. se presenta el consumo de azúcares y la producción de etanol, respectivamente, para los diferentes tamaños de inóculo evaluados. Se observa que con un tamaño de inóculo mayor también es mayor el consumo de azúcares, esto es debido a que un mayor tamaño de inóculo requerirá mas azúcares para crecimiento y mantenimiento. Con respecto a la producción de etanol con un mayor tamaño de inóculo se alcanza mas rápido la concentración máxima de etanol

pero esta resulta ser menor que con tamaños de inóculo menores, ya que un mayor tamaño de inóculo requerirá un mayor consumo de azúcares para crecimiento y mantenimiento los cuales no estarían disponibles para la fermentación.



**Figura 7.13.** Cinética de consumo de azúcares (glucosa y fructosa) en fermentación de sorgo dulce usando *S. cerevisiae* ITV-01, evaluación del efecto del tamaño de inóculo.

Se calcularon el rendimiento, la productividad y la eficiencia para el punto en el que se obtuvo la concentración más alta de etanol para cada cinética, los datos pertinentes se presentan en la Tabla 7.5. se observa entonces que aumentar el tamaño de inóculo de  $1,5 \times 10^7$  cel/mL a  $3 \times 10^7$  cel/mL no tiene una variación significativa ni en el rendimiento ni en la eficiencia de la fermentación, pero si en la productividad donde se dio un aumento del 22%. El nivel evaluado de  $3 \times 10^6$  cel/mL tuvo los resultados mas bajos con respecto a rendimiento, productividad y eficiencia. Para la siguiente fase del estudio se decidió utilizar un tamaño de inóculo de  $1,5 \times 10^7$  cel/mL ya que este fue el que alcanzó la mayor concentración máxima de etanol.



**Figura 7.14.** Cinética de producción de etanol en fermentación de sorgo dulce usando *S. cerevisiae* ITV-01, evaluación del efecto del tamaño de inóculo.

**Tabla 7.5.** Rendimiento, productividad y % eficiencia para las fermentaciones sumergida (FES) y FES no esteril con diferentes tamaños de inóculo en *S. cerevisiae* ITV-01.

Cinética	Y <sub>P/S</sub> [g etOH/g az]		Q <sub>P</sub> [g/(L*h)]		% eficiencia	
	Prom	desv est	Prom	desv est	Prom	desv est
FEL	0.468	0.006	3.337	0.044	91.830	1.195
3*10 <sup>6</sup> [cel/mL]	0.321	0.008	3.486	0.066	62.854	1.597
1.5*10 <sup>7</sup> [cel/mL]	0.404	0.005	4.739	0.061	79.195	1.015
3*10 <sup>7</sup> [cel/mL]	0.398	0.008	5.792	0.055	78.036	1.628

## 8. CONCLUSIONES PARCIALES

Los cultivos sumergidos alcanzaron mayor rendimiento de etanol, hasta en un 20% con respecto a la FES no esterilizada, no obstante, la FES permite alcanzar productividades más elevadas, hasta 74%, reduciendo el tiempo requerido de fermentación a la mitad.

La FES no necesita una etapa de esterilización del material sólido previa a la fermentación, lo que disminuye el gasto energético y reduce el tiempo de proceso al prescindir de una operación unitaria.

*P. kudriavzevii* ITV-S42 no produce etanol en FES, en cambio, tiene un consumo de azúcares orientado al crecimiento, esto debido a la inhibición del metabolismo fermentativo de la levadura en el medio sólido.

El consumo de azúcares para crecimiento aumenta con el tamaño de inóculo, lo que disminuye la producción máxima de etanol, mientras, la productividad disminuye con el aumento del tamaño de inóculo.

## 9. BIBLIOGRAFIA

- Bryan, W. L. 1990. "Solid-State Fermentation of Sugars in Sweet Sorghum." *Enzyme and Microbial Technology* 12(6): 437–42.
- Costa, Marcia, Marcelo Torres, Haroldo Magariños, and Alejandro Reyes. 2010. "Producción Y Purificación Parcial de Enzimas Hidrolíticas de *Aspergillus Ficum* En Fermentación Sólida Sobre Residuos Agroindustriales Production and Partial Purification of *Aspergillus Ficum* Hydrolytic Enzymes in Solid State Fermentation of Agroindustri." *Colomb. Biotecnol.* 12(2): 163–75.
- Coyle, William. 2007. "The Future of Biofuels A Global Perspective." *Europe* 5(5): 24–29. <http://www.ers.usda.gov/AmberWaves/November07/Features/Biofuels.htm>.
- Diaz, Daniel. 2013. "DESARROLLO DE UN INÓCULO CON DIFERENTES SUSTRATOS MEDIANTE FERMENTACION SOLIDA SUMERGIDA." *Journal of Chemical Information and Modeling* 53: 1689–99.
- Du, Ran et al. 2014. "A Novel Wild-Type *Saccharomyces Cerevisiae* Strain TSH1 in Scaling-up of Solid-State Fermentation of Ethanol from Sweet Sorghum Stalks." *PloS one* 9(4): e94480. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3988051&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Ferrer, José R, José L Machado, and Jhanna Brieva. 2014. "Fermentación En Estado Sólido : Una Alternativa Biotecnológica Para El Aprovechamiento de Desechos Agroindustriales Solid State Fermentation : A Biotechnological Alternative for Exploitation of Agroindustrial Wastes." : 11–22.
- Gibbons, William R, Carl a Westby, and Thomas L Dobbs. 1986. "Solid-Phase Fermentation Process for Production of Fuel Ethanol from Sweet Sorghum Intermediate-Scale , Semicontinuous Solid-Phase Fermentation Process for Production of Fuel Ethanol from Sweet Sorghum." 51(1): 115–22.
- Imam, Tahmina, and Sergio Capareda. 2011. "Fermentation Kinetics and Ethanol Production from Different Sweet Sorghum Varieties." *Int J Agric & Biol Eng* 4(3): 33–40. [www.ijabe.org](http://www.ijabe.org).
- Kargi, F, and J a Curme. 1985. "Solid-State Fermentation of Sweet Sorghum to Ethanol in a Rotary-Drum Fermentor." *Biotechnology and bioengineering* 27(8): 1122–25.
- Li, Shizhong et al. 2013. "A Demonstration Study of Ethanol Production from Sweet Sorghum Stems with Advanced Solid State Fermentation Technology." *Applied Energy* 102: 260–65. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306261912007015>.
- Lin, Yan, and Shuzo Tanaka. 2006. "Ethanol Fermentation from Biomass Resources:

- Current State and Prospects.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 69(6): 627–42. <http://link.springer.com/10.1007/s00253-005-0229-x>.
- Luo, Zhenglin, Lijun Wang, and Abolghasem Shahbazi. 2014. “Optimization of Ethanol Production from Sweet Sorghum (*Sorghum Bicolor*) Juice Using Response Surface Methodology.” *Biomass and Bioenergy* 67: 53–59. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0961953414001974>.
- Nuñez, Diana, and Ernesto Favela. 2012. “DESARROLLO DE UN SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE *Pichia Pastoris* EN CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO.” *Saudi Med J* 33: 3–8.
- Pandey, Ashok, Carlos R. Soccol, and David Mitchell. 2000. “New Developments in Solid State Fermentation: I-Bioprocesses and Products.” *Process Biochemistry* 35(10): 1153–69.
- Paredes, Juan, and José Arechiga. 2005. “Construcción de Una Planta Para La Producción de Antibióticos.”
- Raghavarao, K.S.M.S, T.V Ranganathan, and N.G Karanth. 2003. “Some Engineering Aspects of Solid-State Fermentation.” *Biochemical Engineering Journal* 13(2–3): 127–35.
- Reddy, B, A Ashok Kumar, and S Ramesh. 2007. “Sweet Sorghum : A Water Saving Bio-Energy Crop 1.” : 1–12. [http://ec2-50-19-248-237.compute-1.amazonaws.com/4799/%5Cnhttp://www.iwmi.cgiar.org/EWMA/files/papers/Paper for Bioenergy and water-BelumReddy.pdf](http://ec2-50-19-248-237.compute-1.amazonaws.com/4799/%5Cnhttp://www.iwmi.cgiar.org/EWMA/files/papers/Paper%20for%20Bioenergy%20and%20water-BelumReddy.pdf).
- Robinson, T, P Nigam, and D Singh. 2002. “Fermentación En Estado Sólido: Una Tecnología Microbiana Promisoria Para La Producción De Metabolitos Secundarios.” *Vitae* 9(2): 27–36.
- Rolz, Carlos, and Roberto de León. 2013. “3.PROCESO ALTERNO PARA PRODUCIR Etanol de Sorgo Dulce.pdf.” *Revista de la Universidad del valles de Guatemala de Guatemala* 26: 35–40.
- SAGARPA. 2011. “SFA SAGARPA Perspectivas de Largo Plazo Para El Sector Agropecuario de México 2011-2020.” : 43.
- Wu, Xiaorong et al. 2010. “Features of Sweet Sorghum Juice and Their Performance in Ethanol Fermentation.” *Industrial Crops and Products* 31: 164–70.
- Yu, Jianliang, XuZhang, and Tianwei Tan. 2008. “Ethanol Production by Solid State Fermentation of Sweet Sorghum Using Thermotolerant Yeast Strain.” *Fuel Processing Technology* 89(11): 1056–59. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378382008000842>.
- Yuan, Joshua S. et al. 2008. “Plants to Power: Bioenergy to Fuel the Future.” *Trends in Plant Science* 13(8): 421–29. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138508001775>.