UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS.

Mejoras en la producción de bioetanol combustible a partir de sorgo grano

Maestría en Biotecnología

Lic. Bioq. María Belén Ramírez

Directores de tesis:
Dra. Ing. Quím.Claudia Lareo
M. Sc. Ing. Quím. Daniel Ferrari

Tribunal:
Dra. Claudia Etchebehere
Dra. Gabriela Irazoqui
Dra. Silvana Vero

Montevideo, Agosto 2014

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a las personas que participaron directa o indirectamente del presente trabajo mediante su colaboración y confianza.

A Claudia y Daniel por la dirección de esta tesis y por haberme brindado todo su apoyo y experiencia a lo largo de estos años.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por el incentivo económico.

Al Dr. Daniel Vázquez (INIA) que suministró la materia prima para trabajar.

A mis compañeras del Departamento de Bioingeniería, por compartir sus conocimientos y brindarme un entorno de afecto y amistad que no voy a olvidar, a Elo, Mairan, Lauri, Lyliam, Vero, Juli, Vale, Flo y Maru. A Eliana por su colaboración en los ensayos.

A mi familia que me acompañó de forma incondicional durante estos años de estudio y por enseñarme que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr objetivos.

A mis amigos de siempre. A mis amigas colegas, Lu y Maggie.

Y muy especialmente a Juan, por esperarme estos dos años.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS 2
TABLA DE CONTENIDO 3
RESUMEN 7
1- INTRODUCCIÓN 9
1.1- Bioetanol 10
1.2- Producción y uso de bioetanol en el mundo 10
1.3- Situación actual del bioetanol en el país 11
1.4- Procesos de producción de etanol 13
1.5- Sorgo 16
1.5.1- Características agronómicas y fisicoquímicas 16
1.5.2- Producción de sorgo a nivel mundial y en el país 16
1.6- Producción de bioetanol a partir de materiales amiláceos 17
1.6.1- Almidón 17
1.6.1.1- Amilosa 18
1.6.1.2- Amilopectina 18
1.6.2- Propiedades del almidón 19
1.6.2.1- Gelatinización 19
1.6.2.2- Retrogradación 20
1.7- Proceso de producción de etanol a partir de sorgo grano 21
1.7.1- Molienda 22
1.7.2- Conversión del almidón a azúcares fermentables 23
1.7.2.1- Gelatinización 23
1.7.2.2- Licuefacción 24
1.7.2.3- Sacarificación 25
1.7.3- Fermentación 25
1.7.4- Recuperación del etanol 28
1.8- Factores que afectan el rendimiento de etanol a partir de sorgo grano 29
1.8.1- Efectos de la variedad de sorgo y tipo de almidón 29
1.8.2- Interacciones almidón-proteína 30
1.8.3- Efecto de los taninos 30
2- OBJETIVOS 32
2.1- Objetivo general 33
2.2- Objetivos específicos 33

3- MATERIALES Y MÉTODOS 34
3.1- Materia prima 35
3.2- Caracterización fisicoquímica 36
3.2.1- Determinación del tamaño de partícula de la harina 36
3.2.2- Determinación del contenido de humedad 36
3.2.3- Determinación de cenizas 36
3.2.4- Determinación del contenido de almidón 36
3.2.5- Determinación del contenido de amilosa y amilopectina 37
3.2.6- Determinación del contenido de taninos 37
3.2.6- Determinación del contenido de proteínas 38
3.3- Variaciones de la viscosidad durante la gelatinización 39
3.3.1- Ensayo de gelatinización de 23 minutos 39
3.3.2- Ensayos de licuefacción 40
3.3.2.1- Licuefacción sin gelatinización 40
3.3.2.2-Licuefacción con gelatinización 41
3.4- Ensayos de hidrólisis enzimática 41
3.4.1- Enzimas 41
3.4.2- Ensayos de licuefacción 41
3.4.3- Ensayos de sacarificación 42
3.4.4- Ensayos de hidrólisis enzimática con gelatinización previa 42
3.4.5- Ensayos de hidrólisis con proteasa 43
3.4.5.1-Ensayos de hidrólisis con proteasa sin gelatinización 43
3.4.5.2- Ensayos de hidrólisis con proteasa con gelatinización 43
3.5- Remoción de taninos 45
3.5.1- Tratamiento con formaldehído 45
3.5.2- Tratamiento con NaOH 46
3.6- Ensayos de sacarificación y fermentación en simultáneo (SSF) 49
3.6.1- Microorganismo 49
3.6.2- Desarrollo de inóculo 49
3.6.3- Gelatinización 49
3.6.4- Licuefacción 50
3.6.5- Sacarificación y fermentación en simultáneo 50
3.6.6- Recuento de microorganismos 51
3.6.6.1- Desarollo de inóculo 51
3.6.6.2- Sacarificación y fermentación en simultáneo 52
3.6.7- Determinación del contenido de azúcares, etanol y glicerol 53
3.6.7.1-Método del Ácido Dinitrosalicílico (DNS) 53

3.6.7.2-Cromatografía Líquida 53
3.6.7.3-Cromatografía gaseosa 53
3.6.8- Preparación de las muestras a analizar 54
3.7- Cálculos 54
3.7.1- Determinación del contenido de almidón 54
3.7.2- Determinación del contenido de amilosa y amilopectina 55
3.7.3- Determinación del contenido de taninos 55
3.7.4- Eficiencia de hidrólisis 56
3.7.5- Producción de CO_2 57
3.7.6- Yp/s (g_{etanol} /$g_{sustrato}$) 57
3.7.7- Eficiencia de fermentación 58
3.8- Análisis estadístico 58
4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN 59
4.1- Caracterización fisicoquímica de la materia prima 60
4.2- Variaciones de la viscosidad durante la gelatinización 61
4.3- Efecto de la gelatinización sobre la etapa de licuefacción 64
4.3.1- Licuefacción sin gelatinización 65
4.3.2- Licuefacción con gelatinización 66
4.4- Ensayos de hidrólisis enzimática 68
4.4.1- Ensayos de licuefacción - Efecto de la dosificación de α-amilasa. 68
4.4.2- Ensayos de sacarificación - Efecto de la dosificación de AMG 70
4.4.3- Ensayos de licuefacción y sacarificación con gelatinización previa 72
4.4.4- Efecto de la adición de pepsina sobre la hidrólisis del almidón 73
4.4.4.1- Efecto de la adición de pepsina, ensayos sin gelatinización 74
4.4.4.2- Efecto de la adición de pepsina, ensayos con gelatinización 75
Tabla 4.5. Comparación de los ensayos de licuefacción y sacarificación para cada variedad, con distintas dosificaciones de enzimas, con y sin gelatinización, con y sin acondicionamiento ácido, con y sin agregado de pepsina. 76
4.5- Ensayos de remoción de taninos 77
4.5.1- Tratamiento con formaldehído 77
4.5.2- Tratamiento con NaOH 78
4.6- Ensayos de sacarificación y fermentación simultaneas (SSF) 79
4.6.1- Ensayos con relación sólido: líquido 1:5 79
4.6.2- Ensayos con relación sólido:líquido 1:4 83
4.6.3- Ensayos con relación sólido:líquido 1:3, incluyendo remoción de taninos y mezcla de variedades 85
5- CONCLUSIONES 89

6- ANEXOS 97
6.1- Análisis estadístico 98
6.1.1- Fermentación 1.3 98
6.1.2- Fermentación 1.4 99
Ensayos con Gelatinización 99
Ensayos sin Gelatinización 99
Variedad F10Plus con y sin gelatinización 100
Variedad 8419 con y sin gelatinización 100
Variedad Flash1 con y sin gelatinización 101
6.1.3- Fermentación 1.5 102
Ensayos con Gelatinización 102
Ensayos sin Gelatinización 103
Variedad Flash10 Plus con y sin gelatinización 104
Variedad 8419 con y sin gelatinización 104
Variedad Flash1 con y sin gelatinización 104
6.1.4- Tratamientos de remoción de taninos 106
Tratamiento sobre el grano 8419 106
Tratamiento sobre el grano Flash1 106
Tratamiento sobre la harina 8419 107
Tratamiento sobre la harina Flash1 107
6.1.5- Rendimientos de hidrólisis en los ensayos de licuefacción en el reómetro 108
Comparación de las tres variedades sin gelatinización 108
Comparación de las tres variedades con gelatinización 108
Flash 10 Plus 109
8419 109
Flash 1 109
6.2- Producción de CO_2 111
6.2.1 Producción de CO_2 de la SSF con relación 1:3 111
6.2.2 Producción de CO_2 de la SSF con relación 1.4 112

RESUMEN

El sorgo grano es una materia prima agrícola atractiva para la producción de etanol debido a su alto contenido en almidón y altos rendimientos agrícolas en comparación a otros cereales. La transformación del sorgo grano en etanol, requiere la molienda inicial del grano, hidrólisis del almidón a glucosa mediante el uso de enzimas (α-amilasas y amiloglucosidasas) y posterior fermentación de la glucosa a etanol por levaduras. El etanol producido, se separa mediante etapas de destilación y deshidratación, para obtener un producto con la pureza requerida por las especificaciones técnicas. Una alta concentración de taninos en los granos mejora los rendimientos agrícolas debido a una menor depredación por aves, pero reduce la eficiencia industrial y el valor nutricional del residuo formado. Estos aspectos llevan a utilizar, en adición a las amilasas y amiloglucosidasas, otras enzimas como proteasas para mejorar la digestibilidad del almidón, encareciendo los costos operativos, y descartar el uso de variedades de sorgo de alto rendimiento agrícola por la presencia de inhibidores de las enzimas o de las levaduras como los taninos. Cada variedad de sorgo tendrá una respuesta diferente a su procesamiento industrial, en términos de rendimiento y velocidad, como consecuencia de sus características de composición y puede requerir el uso de condiciones operativas propias de pretratamiento, temperatura, tiempo de reacción, tipo y dosificación de enzimas.

Se realizó la caracterización fisicoquímica de tres variedades comerciales de sorgo grano, Flash 10 Plus, 8419 y Flash 1, que difieren en su contenido de taninos, con el fin de determinar las más promisorias para el proceso de producción de etanol, de modo de evaluar el uso de variedades de mayor productividad agrícola. Las variedades mostraron un contenido similar de almidón (68 - 71%, base seca) y contenidos de tanino de < 0.2% (Flash 10 Plus), 1.1% (8419) y 2.0% (Flash 1).

Se determinaron los perfiles de viscosidad de las suspensiones de harina de sorgo en agua, de manera de caracterizar los materiales, obteniéndose viscosidades entre 2309 y 3453 cP y temperaturas de empastamiento entre 74 y 76ºC, similares a la temperatura óptima de la enzima α-amilasa.

Se evaluó realizar una etapa de gelatinización previa a la hidrólisis con α-amilasa. Se obtuvieron viscosidades altas con las tres variedades (entre 6437 y 8071 cP) y se mejoró la eficiencia de hidrólisis en un 34.5 y un 39.8% para las variedades de contenido de tanino medio y alto, no observándose diferencias en la variedad de bajo contenido de taninos.

Se realizaron ensayos de hidrólisis enzimática, evaluando la dosificación de las enzimas α-amilasa y amiloglucosidasa. A medida que aumentó el contenido de taninos la eficiencia de hidrólisis disminuyó en las etapas de licuefacción y sacarificación. Cuando se realizó una etapa de gelatinización previa, las eficiencias de hidrólisis fueron similares para las tres variedades, entre 87 y 88.3% con 5.4 y 11.7 µL/g harina en base seca, de α-amilasa y amiloglucosidasa, respectivamente (la mitad de la dosis utilizada en los ensayos sin gelatinización).

Se evaluó si el agregado de una proteasa mejoraba la eficiencia de hidrólisis al romper la interacción entre las proteínas y el almidón. No se obtuvieron diferencias entre el ensayo con pepsina y el control, con ninguna de las variedades estudiadas.

Se estudiaron dos tratamientos de remoción de taninos, con formaldehído y con hidróxido de sodio, sobre el grano y sobre la harina. Los porcentajes de remoción fueron altos en

todos los casos, siendo el más efectivo el tratamiento alcalino sobre el grano, 83.2 % con la variedad 8419 y 93.9% con la variedad Flash 1.

Se evaluó la producción de etanol a partir de medios de cultivo con altos contenidos en azúcares los cuales permitirían obtener altas concentraciones de etanol y de esta manera reducir los costos energéticos de su recuperación por destilación. Se realizaron ensayos de sacarificación y fermentación simultáneos con relaciones sólido:líquido 1:3, 1:4 y 1:5 para las tres variedades de sorgo estudiadas. En las relaciones 1:4 y 1:5 se evaluó si la etapa de gelatinización mejoraba los rendimientos del proceso. En ambos casos se observó que la velocidad fue mayor cuando se realizó la etapa de gelatinización. En los ensayos 1:3 además se trabajó con la variedad 8419 pretratada con hidróxido de sodio para inactivar los taninos y con una mezcla de las tres variedades (relación 1:1:1). Los mejores resultados se obtuvieron con la variedad 8419 pretratada con hidróxido de sodio, en una relación sólido:líquido 1:3. Se obtuvo una concentración de etanol de 107 g/L a las 68 horas, con una eficiencia de hidrólisis del 100%.

Los resultados de este trabajo permiten concluir que el uso de una variedad de sorgo grano con mayores contenidos de taninos requiere una etapa de gelatinización previa para obtener un desempeño de la hidrólisis de almidón y fermentación similar al observado en la variedad con bajo contenido en tanino.
.
Se obtuvieron para las tres variedades ensayadas, considerando las relaciones sólido a líquido 1:4 y 1:5, rendimientos globales de 0.46 - 0.49 gramos de etanol por gramo de azúcares consumidos expresados como glucosa, que corresponden a eficiencias del 92 - 96% y rendimientos industriales de 355 - 368 litros de etanol por tonelada de grano seco.

1- INTRODUCCIÓN

1.1- Bioetanol

El bioetanol es un combustible líquido alternativo a los combustibles fósiles muy atractivo porque se obtiene de fuentes renovables y puede usarse en motores en mezclas con gasolina o solo. Además, aunque la energía equivalente de etanol es 68% menor que la de los combustibles derivados del petróleo, la combustión de etanol es más limpia (debido a que contiene oxígeno). Se produce a partir de diversas materias primas agrícolas y su uso reduce la emisión de gases de efectos invernadero. La principal desventaja que plantea la producción de bioetanol como combustible es que puede competir por el uso de recursos alimenticios. Por esta razón se busca diversificar la producción agrícola con la inclusión de nuevas materias primas, para interferir lo menos posible en la producción de alimentos, así como también promover el desarrollo de zonas rurales deprimidas mediante la generación de trabajo (Mussatto et al., 2010; Vohra et al., 2014).

1.2- Producción y uso de bioetanol en el mundo

Los mercados de etanol se encuentran encabezados por Estados Unidos, Brasil y, en menor medida, la Unión Europea, como se muestra en la Figura 1.1. La producción de etanol en el año 2013 fue de 50.3, 23.7 y 51.9 millones de m^3, respectivamente (RFA, 2013).

Las materias primas utilizadas para la producción de etanol combustible son principalmente caña de azúcar en Brasil y maíz en Estados Unidos. La producción de etanol de materiales azucarados, como la caña de azúcar y remolacha azucarera, representa alrededor del 40% del bioetanol total producido y alrededor del 60% corresponde a materiales amiláceos (Mussatto et al., 2010).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE), se espera que en el período 2013-2022 se incremente la producción de etanol, casi 70% respecto a la media de 2010-2012, principalmente como resultado de las políticas de promoción de la demanda, creciendo un 4% anual hasta llegar a unos 168 millones de m^3. Esta cantidad seguramente exigirá 12% y 29% de la producción mundial de cereales secundarios y caña de azúcar, respectivamente (OCDE-FAO, 2013).

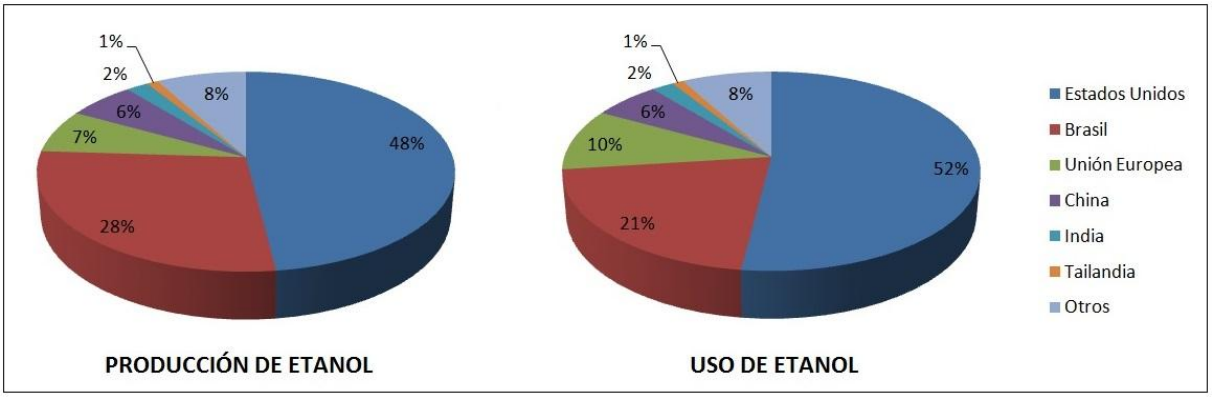

Figura 1.1. Distribución regional de la producción y el uso mundial de etanol previstos para el 2022. *Fuente:* Secretariados de la OCDE y de la FAO (2013).

Las perspectivas de la FAO para el año 2022 indican que las materias primas dominantes para el etanol seguirán siendo los cereales secundarios y la caña de azúcar como se muestra en la Figura 1.2. La producción de otras fuentes se compone sobre todo de residuos de todo tipo y en particular de madera, así como de raíces y tubérculos.

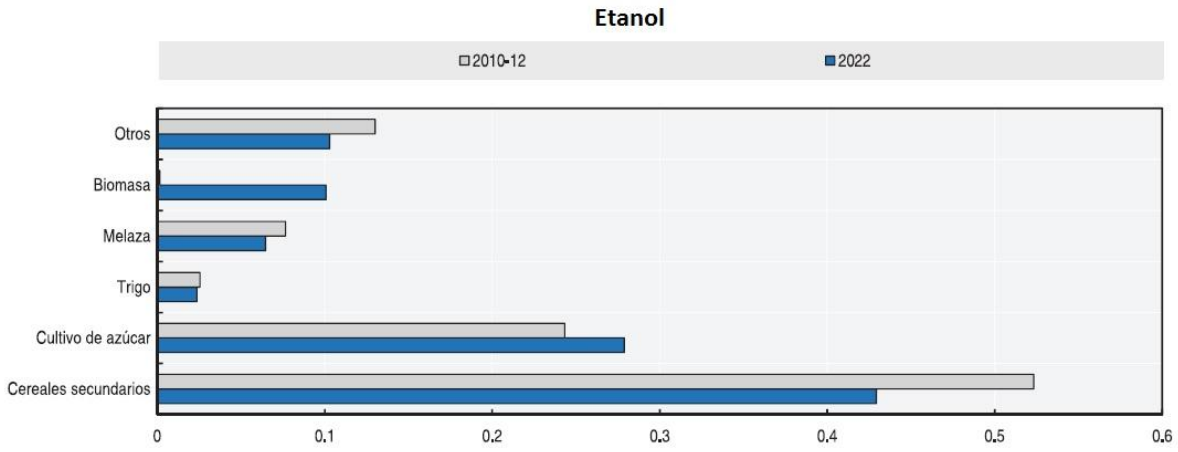

Figura 1.2. Proporción de materias primas utilizadas en la producción de bioetanol. *Fuente:* Secretariados de la OCDE y de la FAO (2013).

1.3- Situación actual del bioetanol en el país

El sector energético de Uruguay se caracteriza por una oferta escasamente diversificada, con fuerte dependencia de los combustibles fósiles importados, básicamente petróleo y en menor proporción gas natural y carbón. El resto corresponde a energías renovables

de origen nacional, energía hidráulica (dependiendo de las condiciones hidrológicas anuales) y biomasa. La Figura 1.3 muestra el consumo final de energía nacional por fuente para el año 2012. En el año 2013 el promedio mensual de las importaciones de petróleo crudo y derivados de petróleo estuvo por encima de los 233 mil m^3. El sector transporte, el cual depende casi exclusivamente de combustibles derivados del petróleo, representó aproximadamente el 30% del consumo energético total en el 2012 (Balance Energético Nacional 2012; Series estadísticas de petróleo y derivados, 2014).

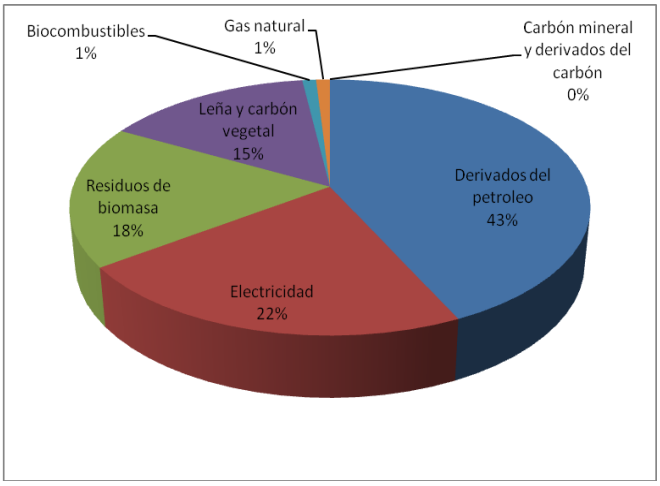

Figura 1.3. Consumo final de energía por fuente en el 2012. *Fuente*: Balance Energético Nacional 2012, Dirección Nacional de Energía, MIEM.

La Ley de Agrocombustibles (N°18.195), aprobada en el año 2007, tiene como objetivo el fomento y la regulación de la producción, comercialización y utilización de biocombustibles. Establece horizontes de sustitución de combustibles fósiles por combustibles nacionales y requisitos medioambientales para la producción (Ley18.195, 2007). En el caso del etanol la incorporación en las gasolinas de uso automotivo es de hasta el 5% y a partir del 2015 ese porcentaje será el mínimo obligatorio. Esta ley busca impulsar el desarrollo nacional de biocombustibles, mediante emprendimientos que procuren generar una diversidad de coproductos (energía eléctrica, alimento animal, biofertilizantes, azúcar para consumo humano, etc.), mitigando la competencia, en el uso del suelo y del agua, con la producción de alimentos.

La producción de bioetanol combustible, con la capacidad actual instalada en nuestro país, fue de 30 mil m^3 anuales en el 2013, a partir de jugo de caña de azúcar y sorgo dulce, en la planta de Bella Unión, que equivalen a una sustitución de gasolina del orden

del 5 a 8% en volumen (ALUR, 2014a). Un aumento en el nivel de sustitución requiere diversificar las materias primas y la zona de producción. Un proyecto de ALUR para la producción de bioetanol combustible en Paysandú, será la primera planta industrial en América Latina en utilizar sorgo grano como materia prima principal. La elección se debió a su buena adaptabilidad a nuestras condiciones climáticas, experiencia de los productores locales que lo producen para ración, altos rendimientos y alto contenido de almidón. Se dispone de un programa de mejora de variedades para la producción de bioenergía y co-producción de alimentos. Este cultivo tiene la ventaja adicional que es adecuado para el sistema de rotación con la soja, lo cual contribuye al cuidado de los suelos. También se prevé utilizar otros granos como maíz, trigo y cebada. La planta comenzará a funcionar en el tercer trimestre de 2014, producirá anualmente 70 mil m^3 de etanol y demandará el equivalente de 50 mil hectáreas de granos para su funcionamiento. Además, la planta procesará 50 mil toneladas anuales de alimento animal y 12 MWh de electricidad (ALUR, 2013, 2014b).

1.4- Procesos de producción de etanol

La producción de bioetanol tiene como principales factores de costo, la materia prima y la demanda de energía. Por tal motivo es necesario contar con materias primas con alto contenido de carbohidratos, procesos de transformación eficientes, optimizados energéticamente y una fuente de energía accesible y barata (Kwiatkowski et al., 2006).

Las tecnologías utilizadas para la producción de etanol se clasifican de acuerdo a la materia prima a utilizar pero en todos los casos constan de tres etapas principales:

1) Obtención de los azúcares fermentables,
2) Conversión de los azúcares a etanol por fermentación y
3) Recuperación del etanol y purificación (etapas de destilación y deshidratación, para obtener un producto con la pureza requerida por las especificaciones técnicas.)

La Figura 1.4 muestra un esquema de la producción de etanol a partir de caña de azúcar, maíz y biomasa lignocelulósica. Todos los procesos tienen operaciones similares de fermentación y recuperación de etanol pero usan diferentes técnicas para liberar azúcares fermentables y generar diferentes coproductos.

Los materiales ricos en azúcares fermentables, como la caña de azúcar y el sorgo dulce, y los ricos en almidón, como los cereales, usan una tecnología denominada de “primera generación”, basada en el uso de agua, enzimas para hidrolizar el almidón y microorganismos fermentadores. En estos casos el costo de la materia prima representa hasta el 80% de costo final del combustible. En el caso de la caña de azúcar y sorgo dulce luego de la extracción de los azúcares fermentables queda un residuo sólido (bagazo) que puede ser utilizado como combustible para producir energía (vapor y electricidad) en la planta (Chuck-Hernández et al., 2011).

El etanol de “segunda generación” se obtiene a partir de materiales lignocelulósicos, como residuos agrícolas, pasto y otros materiales fibrosos que están compuestos principalmente por lignina, celulosa y hemicelulosa. Se utilizan etapas de pretratamiento químicas (ácidas o alcalinas), enzimáticas y térmicas para liberar los azúcares fermentables de la celulosa (glucosa) y hemicelulosa (glucosa, xilosa y arabinosa, principalmente). Estos tratamientos previos tienen los costos más representativos del proceso. Luego el material se fermenta a etanol. Estas diferencias con respecto a los procesos de primera generación hacen que la producción de etanol a partir de materiales lignocelulósicos no sea aún económicamente competitivo (Mussatto et al., 2010).

Existen tecnologías descritas como de “tercera generación”, basadas en el uso de algas, que permiten principalmente la producción de biodiesel.

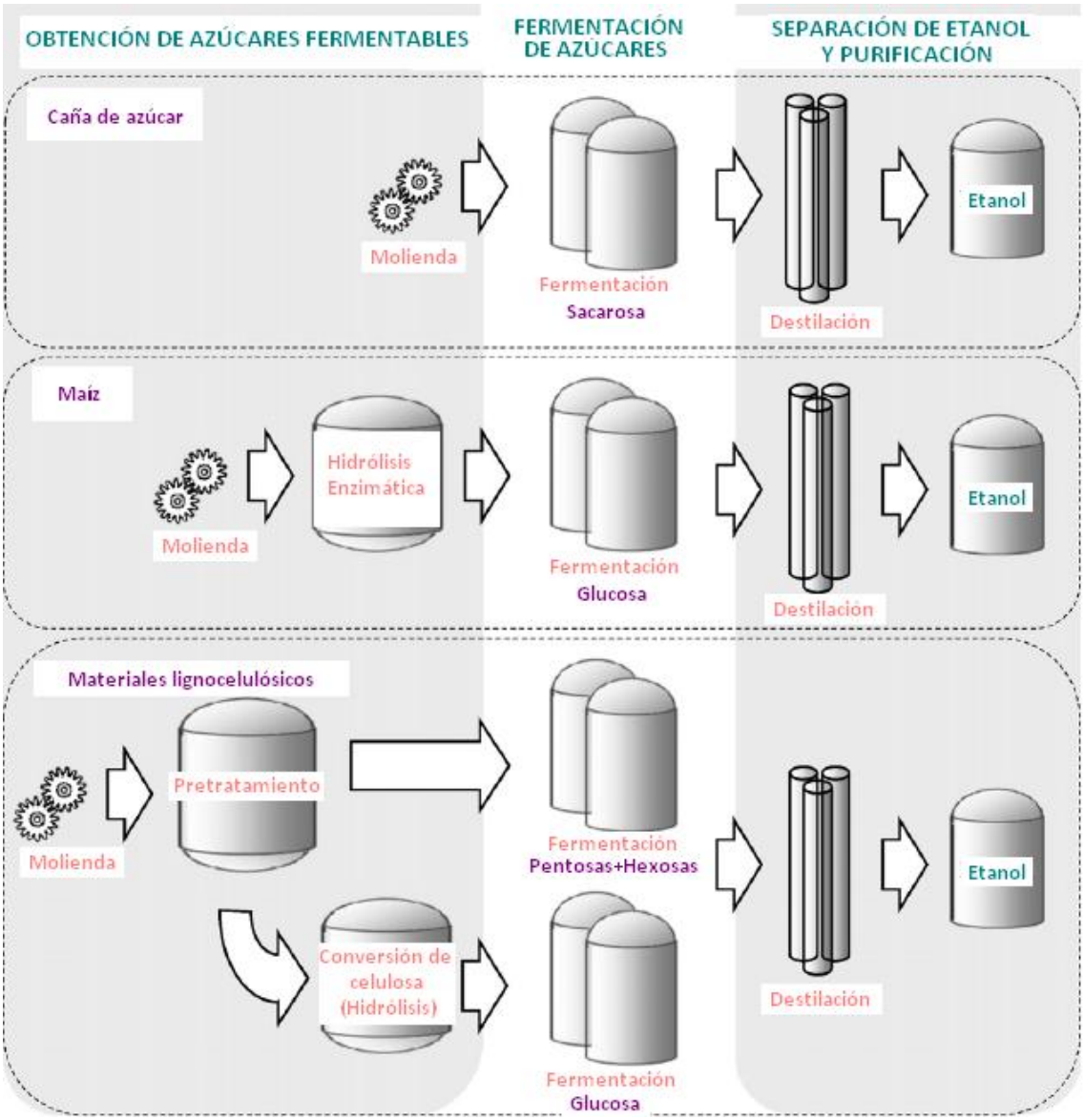

Figura 1.4. Esquema general de producción de etanol a partir de caña de azúcar, maíz y biomasa lignocelulósica (adaptado de Mussatto et al., 2010).

1.5- Sorgo

1.5.1- Características agronómicas y fisicoquímicas

El sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) es un cereal rico en almidón de composición similar a la del maíz, que tiene la capacidad de crecer en una amplia gama de tipos de suelo y climas, lo cual le confiere importantes ventajas agronómicas. Es muy eficiente en el uso del agua y a la sequía. Por estos motivos este cultivo presenta un gran potencial en la producción de bioetanol (Perez-Carrillo et al., 2012; Zhao, 2008).

Los granos de sorgo están constituidos por tres componentes: pericarpio (una capa protectora que los recubre), el embrión o germen y el tejido de almacenamiento o endosperma. De los tres componentes, la mayor proporción del grano la constituye el endosperma, entre un 80 a un 85%, el germen oscila entre 7 a 12% y el pericarpio no supera el 8%. El endosperma está compuesto por los gránulos de almidón y la matriz proteica (Montiel y Elizalde, 2004).

El principal componente químico de los granos de sorgo es el almidón, el que puede variar entre un 56 a un 77% del peso seco del grano. El segundo componente que se encuentra en mayor proporción en el grano son las proteínas que pueden oscilar entre 7 a 16% del peso seco del grano (Vermerris, 2008).

1.5.2- Producción de sorgo a nivel mundial y en el país

Existen tres grandes grupos de variedades de sorgo: sorgo grano, forrajero y dulce. El sorgo grano es la porción comúnmente más utilizada en el mundo para alimentación animal y humana, así como la variedad más intensivamente cosechada (Chuck-Hernández et al., 2011).

De todos los cereales el sorgo grano es el quinto más producido en el mundo, con 57 millones de toneladas en el año 2012, siendo México, Nigeria, Estados Unidos e India los principales países productores en el año 2012 (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Principales países productores de sorgo. (Fuente: FAOSTAT 2013. Datos 2012)

PAIS	PRODUCCION (toneladas)
México	6.969.502
Nigeria	6.900.000
Estados Unidos	6.272.360
India	6.010.000
Argentina	4.252.310
Etiopía	3.604.262
Australia	2.238.912
Brasil	2.016.873
China	2.000.000
Burkina Faso	1.923.805
Sudán	1.883.000
Níger	1.375.697
Malí	1.212.440
Chad	1.200.000
Camerún	1.102.000

1.6- Producción de bioetanol a partir de materiales amiláceos

1.6.1- Almidón

El almidón se almacena en el endospermo del grano, donde se produce como gránulos semicristalinos, que tienen áreas organizadas (cristalinas) y amorfas (Rooney y Pflugfelder, 1986). Los gránulos de almidón son huecos y tienen un núcleo hidrófobo y poros que se extienden desde la superficie hasta el centro. El almidón está compuesto de dos componentes moleculares básicos: amilosa y amilopectina (Figura 1.5). Estas moléculas son idénticas en sus unidades básicas (glucosa) pero difieren en su organización estructural (enlaces). La relación amilosa:amilopectina y el tamaño de los gránulos varía según el origen del almidón y tiene un rol importante en determinar las propiedades fisicoquímicas del almidón y como reacciona a su procesamiento (Vermerris, 2008).

1.6.1.1- Amilosa

La amilosa se compone de moléculas de D-glucosa que se encuentran unidas mediante enlaces glucosídicos α-(1,4), como se observa en la Figura 1.6. Los monómeros de glucosa forman un polímero de cadena lineal que es ligeramente soluble en agua. La amilosa es el componente clave involucrado en en la absorción de agua, hinchazón y gelificación. Es más susceptible a la gelatinización y retrogradación (Niba, 2006).

1.6.1.2- Amilopectina

La amilopectina se compone de moléculas de D-glucosa que se encuentran unidas mediante enlaces α-(1,4) como en la amilosa, así como también unidades de D-glucosa unidas mediante enlaces α-(1,6), por lo tanto es una molécula altamente ramificada y de mayor tamaño que la amilosa (Figura 1.6). La amilopectina cuyas moléculas no pueden alinearse unas con otras debido a sus ramificaciones, presentan buena estabilidad en la solución. Sus dispersiones no forman geles ni cambian significativamente la viscosidad (Niba, 2006).

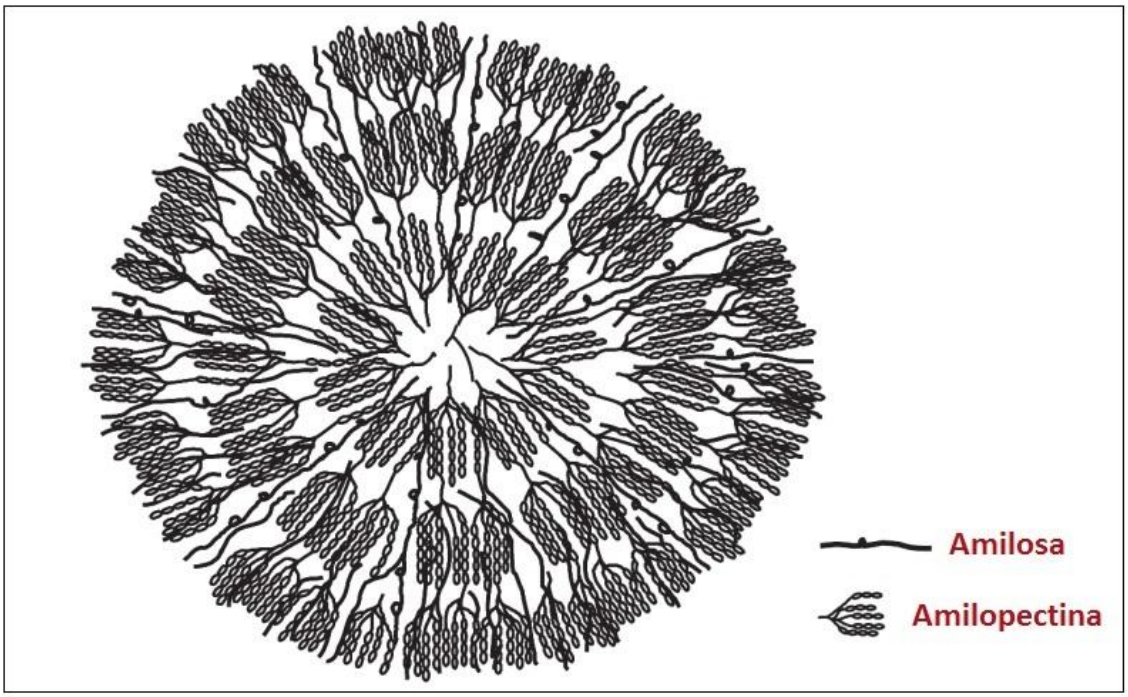

Figura 1.5. Esquema de la organización del gránulo de almidón (adaptado de Jane, 2009).

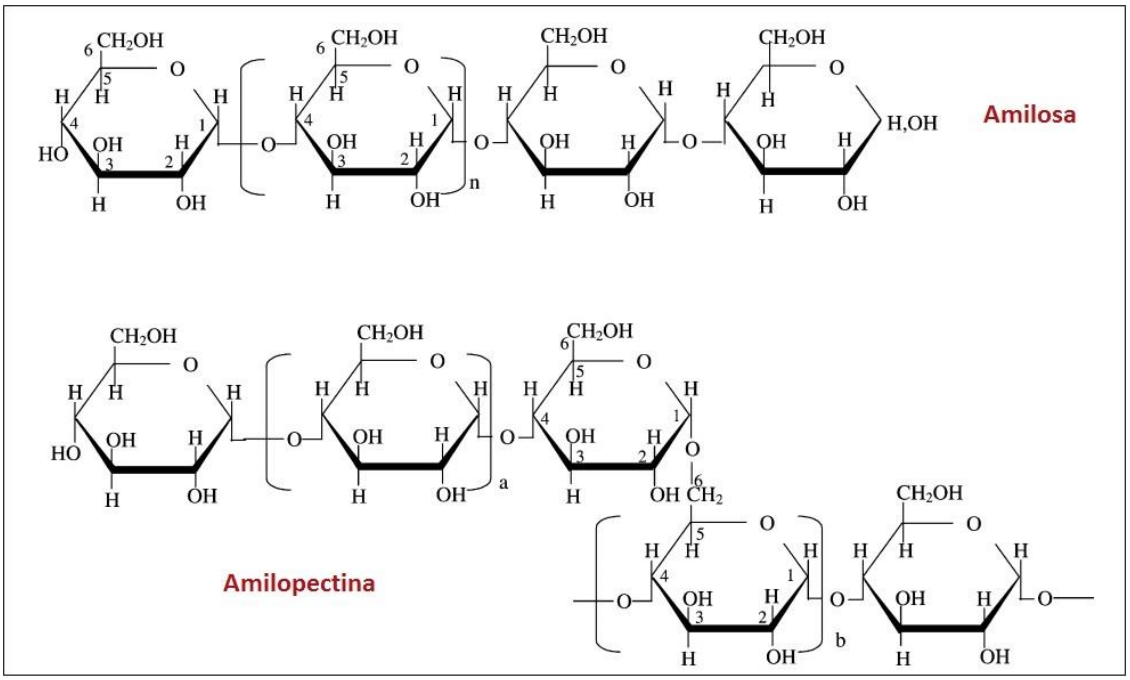

Figura 1.6. Estructura de las moléculas de amilosa y amilopectina (adaptado de Tester et al., 2004).

1.6.2- Propiedades del almidón

1.6.2.1- Gelatinización

La gelatinización ocurre cuando la estructura ordenada del gránulo de almidón se desorganiza y reorganiza en presencia de calor y humedad suficiente. Cuando se calienta una suspensión de almidón en agua, la estructura cristalina de los gránulos se desorganiza, debido a la rotura de enlaces de hidrógeno intra e inter moleculares. Posteriormente, las moléculas de agua forman enlaces de hidrógeno con los grupos hidroxilo expuestos de la amilosa y la amilopectina, lo cual resulta en un aumento en la hinchazón del gránulo, o *swelling,* varias veces su tamaño original. La capacidad de hincharse esta fuertemente influenciada por la magnitud de la interacción entre las cadenas del almidón dentro de los dominios amorfo y cristalino. El alcance de esta interacción está determinado por la relación amilosa:amilopectina y las características de estas en términos de peso molecular/distribución, grado y longitud de ramificación y la conformación. La absorción de agua causa un desorden en la organización molecular del gránulo, los polímeros de pequeño tamaño salen del interior del gránulo y eventualmente el gránulo se rompe o colapsa. Las moléculas de amilosa se liberan desde los gránulos gelatinizados y tienden a asociarse unas con otra a través de puentes de hidrógeno

intermoleculares que forman una red estructural que atrapa los gránulos (Figura 1.7), lo que resulta en la formación de un gel (Fu et al., 2012; Lee et al., 2005; Niba, 2006).

Almidones con altos contenidos en amilosa pueden necesitar altas temperaturas de gelatinización. La temperatura de gelatinización del sorgo se encuentra generalmente entre 68 a 77 ºC (Vermerris, 2008).

1.6.2.2- Retrogradación

El enfriamiento del almidón gelatinizado resulta en la reasociación de la amilosa liberada de los gránulos, el gránulo hinchado de almidón retorna a una forma más ordenada y parcialmente cristalina, sin embargo, no puede retornar a su forma original (Figura 1.7). Este es el proceso de retrogradación, que también puede ser denominado *setback.* Esta reasociación y recristalización de la amilosa causa la liberación del agua absorbida durante la gelatinización que conduce al fenómeno denominado sinéresis (Niba, 2006).

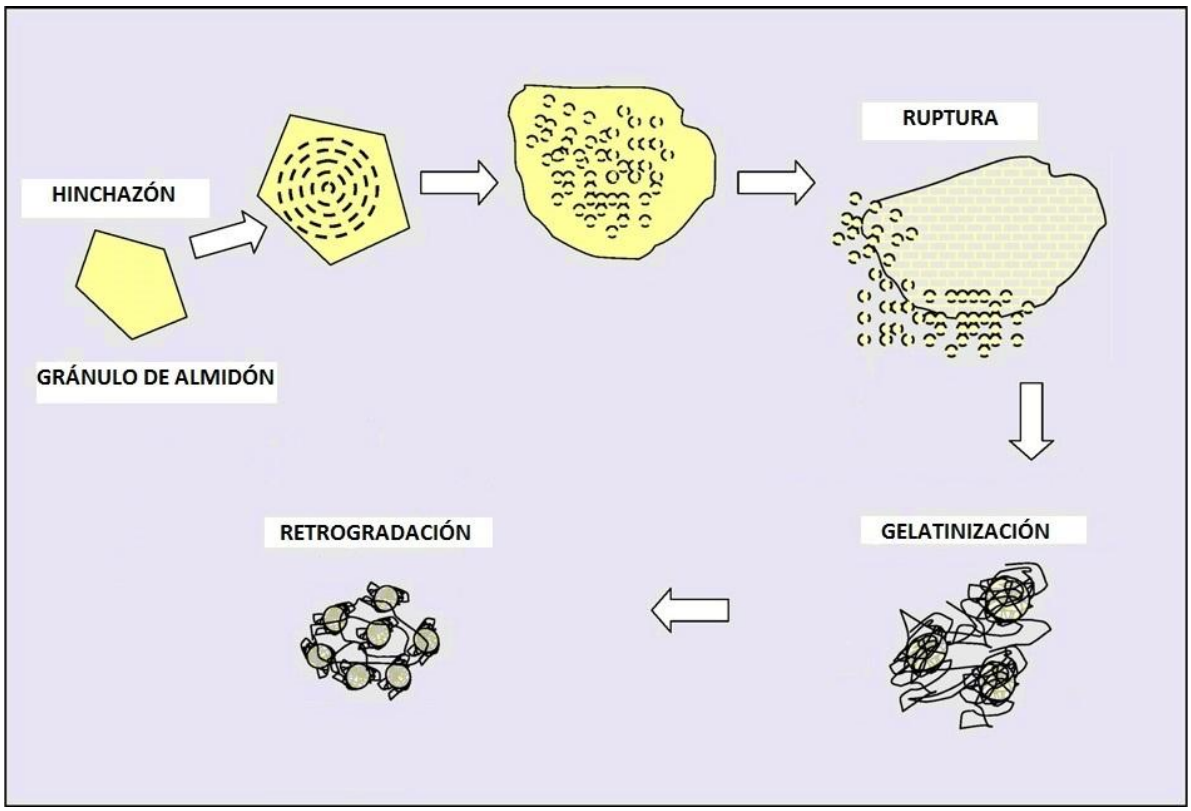

Figura 1.7. Esquema de los procesos de gelatinización y retrogradación del almidón (adaptado de Iida et al., 2008).

1.7- Proceso de producción de etanol a partir de sorgo grano

El proceso de producción de etanol a partir de sorgo grano es el típico usado en materiales amiláceos y consiste en los siguientes pasos esquematizados en la Figura 1.8:

1) Molienda
2) Conversión del almidón a azúcares fermentables
    - Gelatinización
    - Licuefacción
    - Sacarificación
3) Fermentación
4) Recuperación del etanol anhidro (Destilación/deshidratación)

La optimización del proceso industrial debe estar dirigida a lograr: alta eficiencia de hidrólisis, alta eficiencia de fermentación, proceso rápidos, baja dosificación de enzimas ya que las mismas tienen un costo y no se reciclan, bajo uso de energía y alta concentración final de etanol de modo de reducir los costos de la destilación y deshidratación (Kwiatkowski et al., 2006; Wu et al., 2006, 2007).

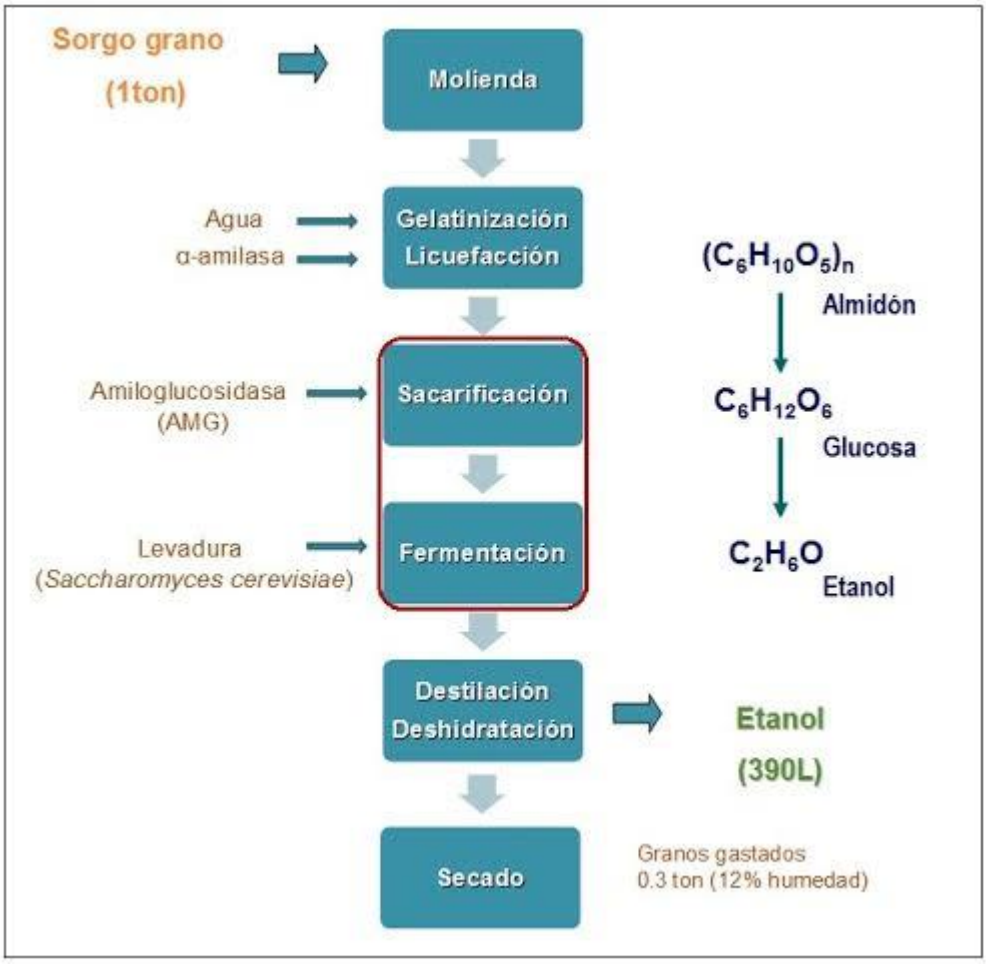

Figura 1.8. Esquema de las etapas de producción de etanol a partir de sorgo grano. La línea roja indica que la etapa de sacarificación se realiza en forma simultánea a la fermentación (adaptado de Chuck-Hernández et al., 2011).

1.7.1- Molienda

En el proceso de molienda seca, los granos del sorgo se separan de la paja y otros desechos y son molidos para obtener una harina. El tamaño de partícula deseado maximiza la accesibilidad de los gránulos de almidón a una solución al tiempo que permite que las partículas no fermentadas puedan separarse fácilmente del líquido al final del proceso.

1.7.2- Conversión del almidón a azúcares fermentables

El proceso de hidrolizar el almidón a azúcares fermentables utiliza una combinación de calor y enzimas, en tres etapas:

1.7.2.1- Gelatinización

Primero los gránulos de almidón se dispersan en agua mediante el uso de calor y agitación. Este proceso de *swelling* o hinchamiento de los gránulos de almidón, denominado gelatinización, produce una suspensión de elevada viscosidad. Cuando se trabaja con suspensiones de harina de sorgo grano se pueden alcanzar picos de viscosidad entre 911 y 3213 cP a 95°C, según la variedad de sorgo y su composición fisicoquímica, como se observa en los perfiles de viscosidad de la Figura 1.9 (Zhao, 2008).

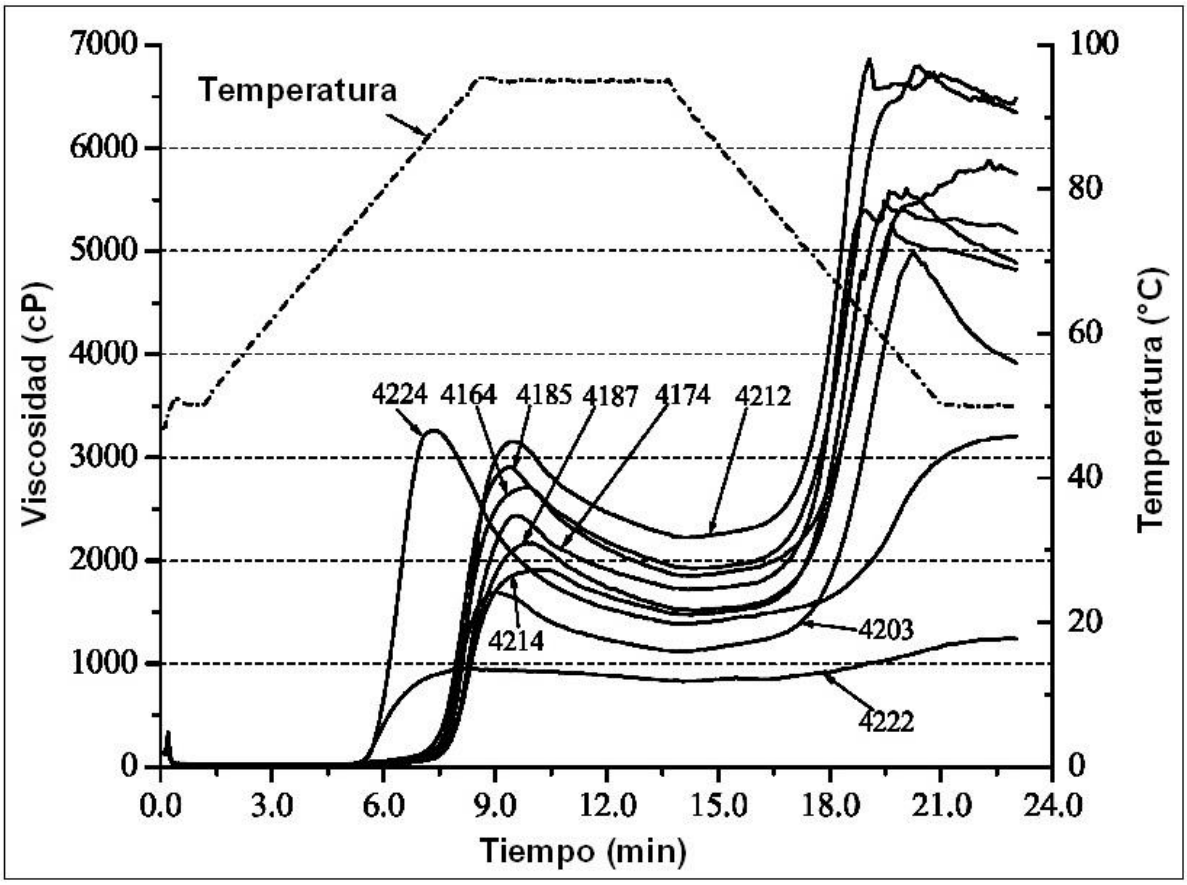

Figura 1.9. Perfiles de viscosidad de distintas variedades de sorgo grano estudiadas por Zhao (2008).

1.7.2.2- Licuefacción

Luego de la gelatinización, el almidón se hidroliza parcialmente a dextrinas (oligosacáridos solubles de glucosa en agua) por la adición de la enzima α-amilasa, una endohidrolasa termoestable. Como se muestra en la Figura 1.10, esta enzima cliva los enlaces glucosídicos α-D-(1,4) internos, tanto de la amilosa como de la amilopectina. Este proceso, denominado licuefacción, ocurre generalmente a altas temperaturas y se produce una reducción de la viscosidad de la suspensión que facilita su manipulación industrial (agitación y bombeo).

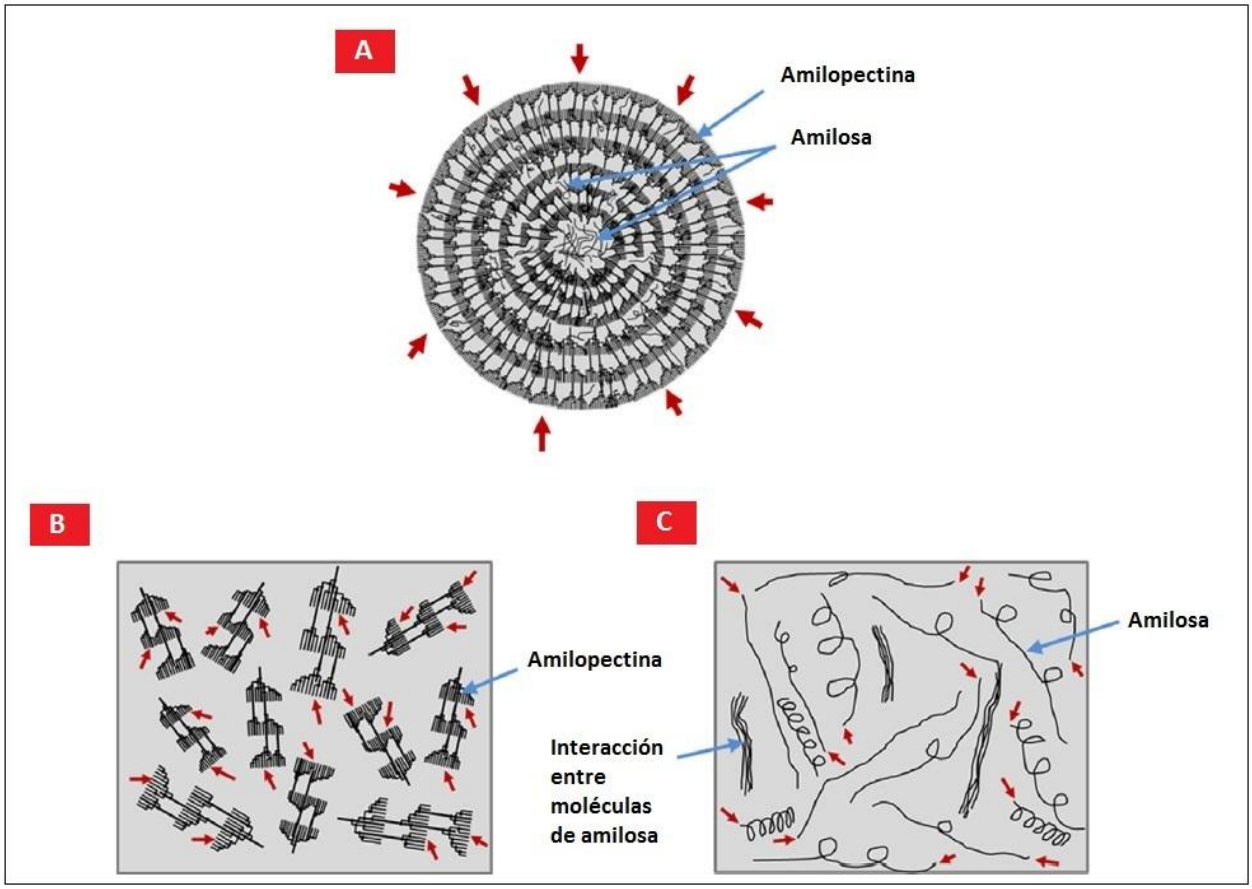

Figura 1.10. Esquema del modo de acción de la α-amilasa en la etapa de licuefacción. A) Estructura del gránulo de almidón; B) Moléculas de amilopectina dispersas; C) Móleculas de amilosa dispersas. Las flechas rojas indican los puntos de acceso de la enzima (adaptado de Naguleswaran et al., 2014).

1.7.2.3- Sacarificación

En la etapa final de obtención de los azúcares fermentables, denominada sacarificación, la suspensión se lleva a las condiciones óptimas de temperatura y pH de la enzima amiloglucosidasa (AMG). La AMG hidroliza los enlaces α-(1,4) y α-(1,6) de los polímeros del almidón desde su extremo no reductor, resultando en la conversión completa del almidón a glucosa.

Algunas veces se adicionan otras enzimas para aumentar la conversión del almidón, como pululanasas, que hidrolizan los puntos de ramificación del almidón, y disminuyen la formación de isomaltosa, proteasas, que actúan sobre la matriz almidón-proteínas, y xilanasas, celulalasas y beta-glucanasas, utilizadas para reducir la viscosidad. La reducción de la viscosidad facilita la manipulación de las suspensiones, permitiendo trabajar con concentraciones de sólidos mayores, y disminuyendo el gasto de energía, ya que una viscosidad alta impacta en la transferencia de calor y el bombeo (Vermerris, 2008).

1.7.3- Fermentación

El microorganismo más comúnmente utilizado en la producción de bioetanol a escala industrial es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que fermenta eficientemente las hexosas como glucosa, manosa y galactosa y disacáridos, como sacarosa y maltosa. El microorganismo utilizado debe proporcionar altos rendimientos en etanol, tener una alta productividad y tolerar altas concentraciones de etanol. La glucosa se metaboliza a piruvato por la vía de Embden-Meyerhoff, el piruvato se convierte a acetaldehído y el acetaldehído se reduce a etanol (Glazer y Nikaido, 2007).

Una molécula de glucosa se convierte a dos moléculas de etanol y dos de CO_2 como se observa en la Figura 1.11. El rendimiento de etanol teórico es de 0.51 g por g de glucosa consumida y se producen 0.49 g de CO_2. En general se obtiene entre un 90 y un 93% del rendimiento teórico, ya que una parte de la glucosa se desvía hacia la producción de biomasa celular, glicerol y otros subproductos de la fermentación (Vermerris, 2008).

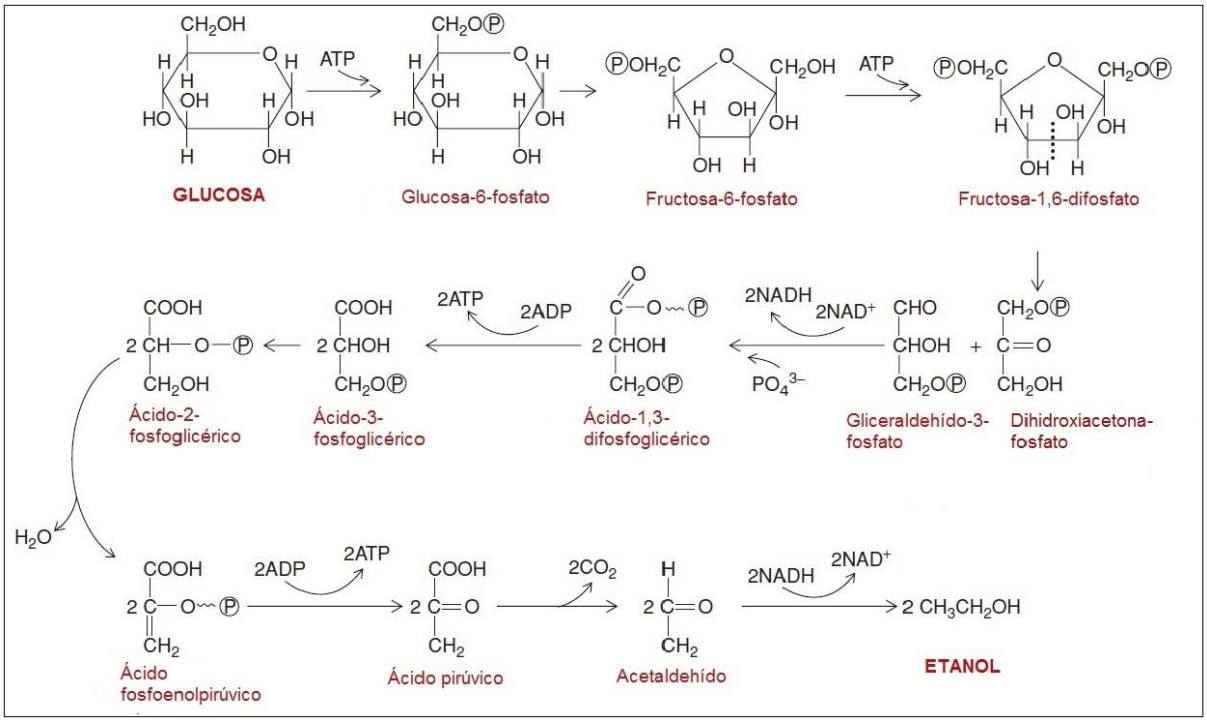

Figura 1.11. Conversión de glucosa a etanol (adaptado de Glazer y Nikaido, 2007).

Para aumentar el rendimiento en la obtención de etanol es común utilizar procesos integrados de hidrólisis (sacarificación) y fermentación. Estos métodos ayudan a minimizar la inhibición por producto generada en la hidrólisis, eliminar algunos pasos del proceso global, reducir costos y aumentar los rendimientos de etanol. En el proceso denominado SHF (del inglés *Separate Hydrolisis and Fermentation*) se trabaja con las etapas de sacarificación y fermentación por separado. La ventaja que presenta este proceso es que ambas etapas se realizan en condiciones óptimas, de temperatura y pH, tanto para la AMG como para la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, puede producirse una inhibición de la enzima por la alta concentración de glucosa presente en el medio.

En el proceso denominado sacarificación y fermentación en simultáneo (SSF, del inglés *Simultaneous Saccharification and Fermentation*), se agrega la levadura al mismo tiempo que la enzima AMG. Este método ha resultado ser uno de los más eficientes en la obtención de etanol ya que reduce la inhibición por producto de la AMG, y el número de reactores utilizados. Sin embargo, la hidrólisis enzimática se realiza a una temperatura menor (30ºC) a la óptima para las enzimas (~60 - 70°C). Generalmente se elige una temperatura intermedia, que sea tolerable para el microorganismo y que las enzimas

puedan tener un buen desempeño. Además, la baja concentración de glucosa libre limita de alguna manera, reduce la osmolaridad sobre todo en el caso de medios de cultivo con elevadas concentraciones de almidón.

Un aspecto importante del proceso industrial de producción de etanol es el balance hídrico. Exceso de agua agregada al proceso implica mayor consumo de energía para separar el etanol formado. La destilación es una de las etapas de mayor consumo de energía y el mismo aumenta cuando mayor es la cantidad de agua a eliminar, esto es cuando menor es la concentración final de etanol alcanzada en la fermentación. Se pueden obtener altas concentraciones de etanol si el medio de fermentación tiene un alto contenido de azúcares fermentables. Para lograr altas concentraciones de azúcares, se debe agregar una mínima cantidad de agua a la materia prima para preparar la suspensión previa a la hidrólisis. El medio así preparado usando los granos de sorgo molido contiene alto contenido en sólidos y generalmente elevada viscosidad. Estas propiedades del medio producen grandes dificultades en el manejo durante el proceso, y puede llevar a una hidrólisis lenta e incompleta del almidón a azúcares fermentables e incluso una fermentación incompleta ya que las levaduras serán expuestas a condiciones de estrés debidas a la alta presión osmótica producida por la elevada concentración de sólidos disueltos y además la altas concentraciones de etanol alcanzadas pueden llegar a ser tóxicas para las levaduras (Bai et al., 2008; Breisha, 2010).

Saccharomyces cerevisiae sintetiza glicerol como un metabolito osmoregulador en respuesta a la elevada presión osmótica debida a elevadas concentraciones de azúcares presentes en el medio (generalmente mayor a 150 - 200 g/L). En general, se produce al inicio de la fermentación, cuando la concentración de azúcares es elevada. En fermentaciones industriales se produce hasta 5 g de glicerol por 100 g de etanol. El glicerol se forma por la reducción de dihidroxiacetona fosfato (intermediario de la glicólisis) en glicerol 1-fosfato, que luego es desfosforilado a glicerol (Figura 1.12) (Glazer y Nikaido, 2007).

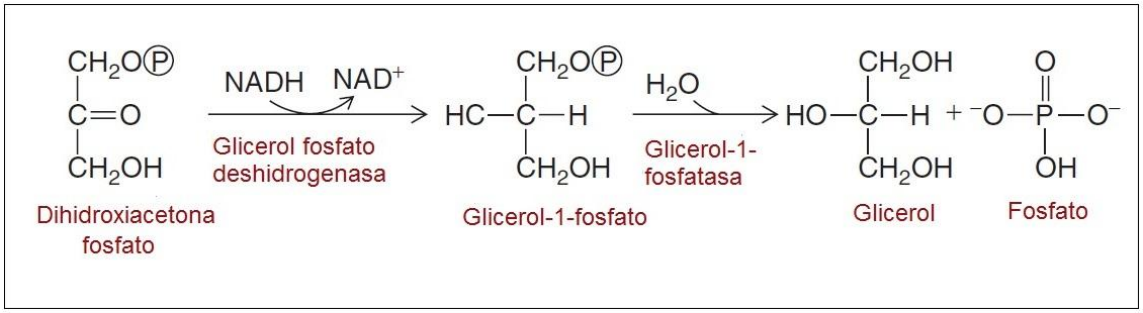

Figura 1.12. Formación de glicerol a partir de dihidroxiacetona fosfato (adaptado de Glazer y Nikaido, 2007).

1.7.4- Recuperación del etanol

Un aspecto importante del proceso es el balance hídrico. El exceso de agua agregada al proceso implica mayor consumo de energía para separar el bioetanol formado. El etanol se destila del medio fermentado hasta tener una mezcla azeotrópica (96% de etanol). Esta mezcla es deshidratada mediante tamices moleculares, hasta obtener una concentración de etanol de 99.5%. La destilación es una de las etapas de mayor consumo de energía y el mismo aumenta cuando mayor es la cantidad de agua a eliminar, esto es cuando menor es la concentración final de etanol alcanzada en la fermentación. Se pueden obtener altas concentraciones de etanol si el caldo de fermentación tiene un alto contenido de azúcares fermentables. Para lograr altas concentraciones de azúcares, se debe agregar una mínima cantidad de agua a la materia prima para preparar la suspensión previa a la hidrólisis, tal como se explicó en la sección 1.7.3.

1.8- Factores que afectan el rendimiento de etanol a partir de sorgo grano

Investigaciones recientes muestran que los factores clave que afectan el rendimiento de etanol y la eficiencia de fermentación a partir de sorgo grano, incluyen el contenido de almidón, la digestibilidad del almidón, el nivel de proteínas extraíbles, interacciones proteína-almidón, viscosidad de la suspensión del grano de sorgo molido en agua, contenido de compuestos fenólicos (taninos), relación amilosa-amilopectina, y formación de complejos amilosa-lípidos en la mezcla (du Preez et al., 1985; de Jong et al., 1987; Mullins y Smith, 1988; Mullins y Lee 1991; Wu et al., 2006, 2007; Wang et al. 2008; Zhao, 2008). En consecuencia, las variedades de sorgo con mayor rendimiento agrícola, ya sea de granos o de almidón por hectárea, no necesariamente producirán mayores rendimientos de etanol por cantidad de materia prima procesada. El rendimiento industrial depende también de la biodisponibilidad del almidón, sus características, su interacción con otros componentes del grano y la presencia de inhibidores. Cada variedad de sorgo tendrá una respuesta diferente a su procesamiento industrial, en términos de rendimiento y velocidad, como consecuencia de sus características de composición y puede requerir el uso de condiciones operativas propias de pretratamiento para la remoción de inhibidores, temperatura, tiempo de reacción, tipo y dosificación de enzimas, adición de nutrientes.

1.8.1- Efectos de la variedad de sorgo y tipo de almidón

Como se mencionó anteriormente, los gránulos de almidón consisten de una estructura semicristalina de amilosa y amilopectina. Para que las enzimas puedan hidrolizar el almidón, las moléculas de amilosa y amilopectina tienen que ser cambiadas a una forma amorfa para ser fácilmente accesibles a las enzimas hidrolíticas por un proceso conocido como gelatinización. En general, los almidones de cereales comunes contienen 20 a 30% de amilosa y 70 a 80% de amilopectina. Almidones con menos de un 5% de amilosa se definen como almidones cerosos ("*waxy*"). Se considera un almidón de alta amilosa cuando su contenido es mayor de 35%. Cuanto mayor es el contenido de amilosa la resistencia a la hidrólisis con α-amilasa es mayor. En general, las variedades de sorgo ceroso tienen mayores rendimientos de etanol que otras variedades no cerosas, con el mismo contenido de almidón (Wu et al., 2006).

1.8.2- Interacciones almidón-proteína

El almidón y las proteínas son los mayores componentes del sorgo grano. El contenido de almidón es un buen indicador del rendimiento de etanol en el proceso de molienda seca, pero por si solo no puede explicar la eficiencia de conversión. En general, los rendimientos de etanol disminuyen a medida que aumenta el contenido proteico. El contenido de proteínas del sorgo varía entre 6 a 18%, siendo las proteínas de almacenamiento un 70-90% de las proteínas totales (Zhao, 2008). Existe una relación fuertemente lineal entre la digestibilidad proteica y la eficiencia de fermentación, es posible que las muestras de sorgo con proteínas altamente digeribles provean más aminoácidos libres para el crecimiento de la levadura durante la fermentación. Sin embargo, es más probable que la interacción almidón-proteína, que reduce la susceptibilidad del almidón a la hidrólisis enzimática, tenga el principal efecto en la eficiencia de conversión y rendimiento de etanol, más que la deficiencia en nutrición. Si se trata la harina de sorgo con pepsina previo a la cocción o si la cocción se realiza con un agente reductor, se aumenta la digestibilidad del almidón, sugiriendo que la proteína actuaría como barrera para la digestión del almidón (Zhang y Hamaker, 1998).

1.8.3- Efecto de los taninos

Los taninos son compuestos secundarios muy abundantes en el reino vegetal, sintetizados por las plantas para protegerse de los herbívoros. Son compuestos fenólicos de alto peso molecular con la capacidad de unirse a macromoléculas tales como proteínas, carbohidratos estructurales y almidón, perjudicando de este modo su degradación. Se dividen en dos grupos principales, taninos hidrolizables y taninos condensados. Los taninos hidrolizables son polímeros de ácido gálico o elágico unidos mediante un enlace éster a un residuo de azúcar. Los taninos condensados son polímeros de flavonoides unidos mediante enlaces C-C (Figura 1.13). Los polifenoles presentes en el sorgo pertenecen al grupo de los taninos condensados (Oliveira et al., 2009, Muetzel y Becker, 2006).

Las variedades de bajo contenido de taninos, más favorables para la producción de bioetanol, pueden presentar una disminución en su rendimiento agrícola de hasta un 50% por depredación de las aves, siendo poco atractivas para los productores. Cuando se cultivan filas intercaladas de sorgos de bajo y alto tanino en plantaciones experimentales, las aves exhiben un alto grado de selectividad frecuentemente destruyendo el cultivar de

bajo tanino completamente, dejando el sorgo adyacente de alto tanino sin tocar (Bullard y York, 1985).

Los taninos además de proteger a las plantas de herbívoros también actúan evitando invasión de microorganismos patógenos debido a sus propiedades antimicrobianas y antifúngicas (Silanikove et al., 2001).

Los taninos forman complejos con las proteínas disminuyendo la digestibilidad y su calidad nutricional, actúan como inhibidores de enzimas y de las levaduras (Mullins y Lee, 1991). Se han probado diferentes técnicas para reducir el efecto de los taninos sobre la hidrólisis enzimática del almidón. En la literatura se pueden encontrar tres tipos de tratamiento principales: descascarado, germinación y detoxificacion química (Ali et al., 2009; Beta et al., 2000; Zhao, 2008). Dentro de los tratamientos de detoxificación química, se destacan el tratamiento con NaOH y con formaldehído.

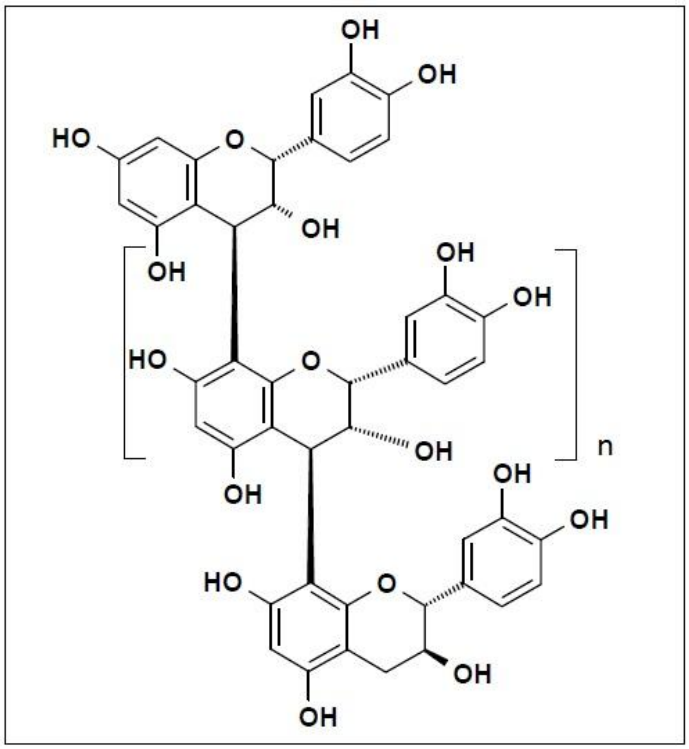

Figura 1.13. Estructura de los taninos condensados. En los taninos del sorgo n=15 (adaptado de Hagerman, 2002a).

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo general

Promover la producción nacional de bioetanol combustible, mediante la diversificación de materias primas y de la zona de producción.

2.2- Objetivos específicos

Realizar la caracterización fisicoquímica de variedades de sorgo grano con diferentes niveles de taninos de modo de evaluar el uso de variedades de mayor productividad agrícola.

Seleccionar las mejores condiciones del proceso industrial de hidrólisis enzimática del almidón y fermentación a etanol de variedades de sorgo grano con diferentes contenidos de taninos, de modo de lograr la mayor conversión y aprovechamiento de la materia prima, atendiendo dos factores claves: máxima conversión en etanol y mínimo uso de energía.

3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1- Materia prima

Se trabajó con tres variedades de sorgo (*Sorghum bicolor*) seleccionadas por el área de Evaluación de cultivares de INIA, por su contenido de taninos: de bajo contenido de taninos, menor a 0.2%, (Flash 10 plus), contenido de taninos medio, 1% (8419) y alto, 2% (Flash 1). Todas estas variedades de ciclo corto, fueron cultivadas en el mismo ensayo, denominado época 1 de La Estanzuela, 2011-2012. Se retiraron los restos de panoja como se muestra en la Figura 3.1 y se realizó la molienda de los granos de sorgo en un molino Bühler Miag disc Mill DLFV, las harinas obtenidas se guardaron en bolsas de plástico y se conservaron en cámara refrigerante a 4 ºC.

Figura 3.1. *Izquierda*: granos de sorgo y restos de panoja. *Derecha*: molino de discos.

3.2- Caracterización fisicoquímica

3.2.1- Determinación del tamaño de partícula de la harina

Mediante la técnica de tamizado se hicieron pasar 100 g de harina, de cada variedad de sorgo, por una malla con un tamaño de poro de 0.5 mm. Luego se pesaron ambas fracciones de harina, la retenida por el tamiz y la que lo atravesó, obteniéndose los porcentajes de harina con tamaño menor y mayor al tamaño de poro. Los métodos de determinación de almidón y amilosa mencionados a continuación, indican que el tamaño de partícula de la harina sea menor a 0.5 mm.

3.2.2- Determinación del contenido de humedad

Se determinó la humedad de las harinas de sorgo por secado de la muestra en estufa a 60 ºC hasta obtener un peso constante. Los ensayos se realizaron por triplicado.

3.2.3- Determinación de cenizas

El contenido de cenizas se determinó según la técnica de NREL (Sluiter et al., 2008), mediante calcinación en mufla a 550 ± 50 ºC hasta peso constante. Los ensayos se realizaron por triplicado.

3.2.4- Determinación del contenido de almidón

El contenido de almidón se determinó mediante el método de α-amilasa /amiloglucosidasa de NREL (Sluiter y Sluiter, 2008), el cual se basa en el Método de Megazyme (AOAC Method 996.11 y AACC Method 76.13). El almidón contenido en el material se hidrolizó con enzimas y los azúcares resultantes se midieron por cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC). Se utilizaron las enzimas comerciales: α-amilasa E-BLAAM100 (Megazyme International Ltda., Irlanda) y amiloglucosidasa E-AMGDF100 (Megazyme International Ltda., Irlanda). Se realizó un control sin enzimas para determinar si había azúcares libres presentes previo a la hidrólisis. Con cada set de muestras se determinó el contenido de almidón de un estándar de almidón de maíz

(Megazyme International Ltda., Irlanda). Los ensayos se realizaron por triplicado. El cálculo del contenido de almidón se muestra en el punto 3.7.

3.2.5- Determinación del contenido de amilosa y amilopectina

El contenido de amilosa y amilopectina se determinó con un kit de Megazyme (K-AMYL 04/06), el cual se basa en el método de la concavalina A (Con A) desarrollado por Yun y Matheson (1990) donde se realiza un paso de pretratamiento para remover lípidos previo al análisis (modificado de Morrison y Laignelet, 1983). En una primera etapa las muestras de almidón se dispersaron mediante calentamiento en dimetilsulfóxido (DMSO). Los lípidos se removieron por precipitación del almidón en etanol y recuperación del mismo por disolución en una solución de acetato/ solución de sales, de la cual se obtuvieron 2 alícuotas. En una de ellas se determinó el contenido de almidón total, hidrolizandolo a D-glucosa (con α-amilasa y amiloglucosidasa) y se determinó con el reactivo glucosa oxidasa/peroxidasa por absorbancia. En la alícuota restante se precipitó la amilopectina por el agregado de Con A y se removió por centrifugación. La amilosa, que se encontraba en el sobrenadante, se hidrolizó a D-glucosa y se cuantificó de igual manera. La concentración de amilosa en las muestras de almidón se calculó como la diferencia entre el contenido de glucosa de ambas alícuotas. Los cálculos se muestran en el punto 3.7. Los ensayos se realizaron por duplicado.

3.2.6- Determinación del contenido de taninos

El contenido de taninos se determinó mediante el método modificado de la vainillina (Price et al., 1978).

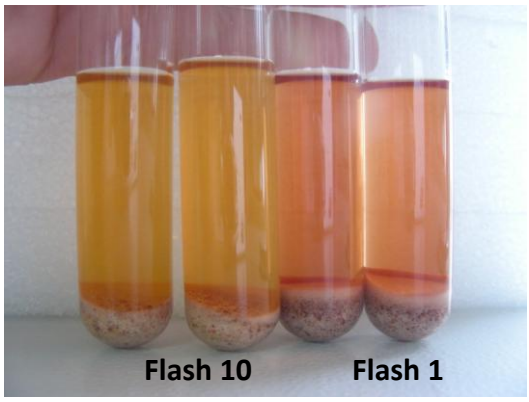

Figura 3.2. Extracción de taninos, se compara la variedad de bajo tanino (izquierda) con la de alto tanino (derecha).

Se mezclaron 0.5 g de harina (molida el mismo día que se realizó el ensayo) con 10 mL de HCl 1% por 20 minutos (Figura 3.2). Se tomó 1 mL de sobrenadante y se agregaron 5 mL de una solución de vainillina/HCl (mezcla de volúmenes iguales de 4% vainillina en metanol y 8% HCl en metanol). Luego de 20 minutos en baño de agua a 30 °C se midió la absorbancia a 500 nm, utilizando un espectrofotómetro UNICAM UV2, contra un blanco obtenido con el mismo procedimiento pero con 4% HCl en metanol en lugar de la solución de catequina. La técnica consiste en la reacción de un aldehído aromático, la vainillina, con el anillo metasustitutido de los flavonoles para dar un aducto de color rojo como se observa en la Figura 3.3 (Hagerman, 2002b). Se utilizó catequina como estándar para la curva de calibración por lo cual el resultado se expresó como equivalentes de catequina. Los cálculos se muestran en el punto 3.7. Los ensayos se realizaron por duplicado.

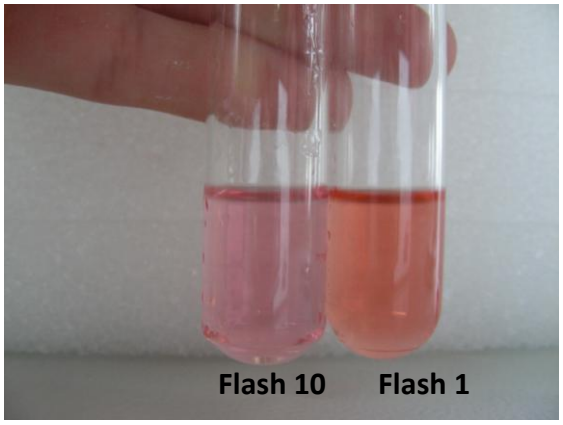

Figura 3.3. Reacción de la vainillina con los taninos presentes en el sorgo de las variedades de contenido bajo (izquierda) y alto (derecha).

3.2.6- Determinación del contenido de proteínas

El contenido de proteínas de las distintas variedades se determinó externamente, mediante el método Kjeldahl (Kjeltec, Foss-Tecator).

3.3- Variaciones de la viscosidad durante la gelatinización

Se evaluó el comportamiento reológico de suspensiones preparadas con harina de las diferentes variedades de sorgo grano durante la licuefacción, a efectos de su procesamiento industrial. Se estudiaron las características de gelatinización de las suspensiones a partir de medidas de viscosidad, utilizando un reómetro Anton Paar Physica MCR 301. Se determinaron los perfiles de viscosidad y temperatura *vs* tiempo.

3.3.1- Ensayo de gelatinización de 23 minutos

Para determinar el perfil de gelatinización de las distintas suspensiones se utilizó como referencia el método de 23 minutos utilizado por Zhao (2008). El perfil de temperatura se resume en la Tabla 3.1. Se suspendieron 2.72 g de harina en 17 mL de agua destilada, en la cubeta de 20 mL del reómetro, obteniendo una relación sólido:líquido de 1:7. El proceso de calentamiento se acompañó de una agitación constante a 960 rpm por los primeros 10 segundos y 160 rpm hasta el final del análisis. Se determinaron los siguientes parámetros: *temperatura de empastamiento* (temperatura a la cual la viscosidad comienza a aumentar), *pico de viscosidad* (máxima viscosidad alcanzada durante el calentamiento y mantenimiento a 95ºC), *breakdown* (diferencia entre el pico de viscosidad y el punto menor de viscosidad), *viscosidad final* (viscosidad al final de la prueba después de enfriar a 50°C y mantenimiento a esta temperatura), *retroceso* (diferencia entre la viscosidad final y el punto menor de viscosidad) (Hasjim et al., 2013).

Tabla 3.1. Perfil de temperaturas del ensayo de gelatinización de 23 minutos.

Etapa	Condiciones
Temperatura inicial	50 °C
Tiempo inicial	1 minuto
Calentamiento de 50 °C a 95 °C	7.5 minutos, velocidad de calentamiento 6 °C/minuto
Temperatura de mantenimiento	95 °C por 5 minutos
Tiempo de enfriamiento de 95 °C a 50 °C	7.5 minutos, velocidad de calentamiento 6 °C/minuto
Temperatura final	50 °C
Tiempo de mantenimiento final	2 minutos
Tiempo total del ensayo	23 minutos

3.3.2- Ensayos de licuefacción

El ensayo de licuefacción simula la etapa de hidrólisis con la enzima α-amilasa. Se suspendieron 3.56 g harina en 16 mL de agua destilada, en la cubeta de 20 mL del reómetro, obteniendo una relación sólido:líquido 1:5. La dosis de enzima utilizada fue la misma que en los ensayos de licuefacción, 36 µL (11.4 µL/g). Se realizaron dos ensayos que se describen a continuación.

3.3.2.1- Licuefacción sin gelatinización

Al inicio del ensayo se agrega la enzima a la suspensión, se calienta a 50°C con una agitación a alta velocidad (960 rpm) por 10 segundos para dispersar los sólidos antes de las medidas de viscosidad. A partir de este momento la agitación se mantiene constante a 160 rpm durante todas las etapas del ensayo. Luego la temperatura se eleva a 75°C a una velocidad de calentamiento de 6°C/min (4.2 minutos) y se mantiene por 30 minutos.

3.3.2.2-Licuefacción con gelatinización

Al igual que en el ensayo sin gelatinización, la suspensión se calienta inicialmente a 50°C con una agitación de 960 rpm por 10 segundos y se mantiene por 1 minuto con una agitación de 160 rpm. A partir de este momento la agitación se mantiene constante a 160 rpm durante todas las etapas del ensayo. En este caso la temperatura se eleva a 95°C a una velocidad de calentamiento de 6°C/min (7.5 minutos) y se mantiene por 15 minutos, siendo esta la etapa de gelatinización. Luego, empleando la misma velocidad de enfriamiento, se lleva a 75°C (3.3 minutos) y se agrega la enzima. Se mantiene por 30 minutos.

En ambos casos se tomaron alícuotas al final del ensayo a las cuales se les agregó gotas de TCA 40% en baño de hielo para detener la reacción enzimática. Las muestras se centrifugaron a 6500 rpm por 10 minutos para descartar los restos de sólidos y se le determinó el contenido de azúcares reductores totales al sobrenadante, mediante la técnica de DNS. Se calculó la eficiencia de hidrólisis.

3.4- Ensayos de hidrólisis enzimática

3.4.1- Enzimas

Se utilizaron las siguientes enzimas: α-amilasa termoestable (Megazyme, 3000 U/mL), amiloglucosidasa (AMG) (Megazyme, 3260 U/mL), pepsina (Sigma-Aldrich, 601 U/mg).

3.4.2- Ensayos de licuefacción

Las harinas se mezclaron con agua, en matraces Erlenmeyer de 250 mL, para obtener suspensiones con una relación sólido líquido 1:5. El pH de las muestras fue 6 que concuerda con el pH óptimo de la α-amilasa por lo cual no fue necesario ajustarlo. Se evaluaron dos dosificaciones de la enzima α-amilasa, 100 y 200 µL (5.7 y 11.4 µL/g de harina en base seca, respectivamente). Los matraces se calentaron en un baño de agua a 75ºC (temperatura recomendada por el fabricante) por 180 minutos. Se tomaron alícuotas de 2 mL, cada 30 minutos, a las cuales se les agregó gotas de TCA 40% en

baño de hielo para detener la reacción enzimática. Las muestras se centrifugaron a 6500 rpm por 10 minutos para descartar los restos de sólidos y se le determinó el contenido de azúcares reductores totales al sobrenadante, mediante la técnica de DNS. Se calculó la eficiencia de hidrólisis (Punto 3.7).

3.4.3- Ensayos de sacarificación

Las harinas se mezclaron con agua, en matraces Erlenmeyer de 250 mL, para obtener suspensiones con una relación sólido líquido 1:5. Se adicionaron 200 µL de α-amilasa a cada matraz y se calentaron en un baño de agua a 75ºC por 90 minutos. Se tomaron alícuotas, a los 45 y 90 minutos, a las cuales se les agregó gotas de TCA 40% en baño de hielo para detener la reacción. A estas muestras se le determinó el contenido de azúcares reductores totales mediante la técnica de DNS. Luego se ajustó el pH de los matraces a 4.5 que es el pH óptimo de la AMG. Se evaluaron dos dosificaciones de la enzima AMG, 200 y 400 µL (11.4 y 22.8 µL/g, respectivamente). Los ensayos se realizaron en un agitador orbital a 60ºC y 150 rpm. Se tomaron alícuotas de 2 mL a las 16, 23 y 42 horas y la reacción se detuvo mediante el agregado de gotas de NaOH 1 M en baño de hielo. Las muestras se centrifugaron a 6500 rpm por 10 minutos para descartar los restos de sólidos y al sobrenadante se le determinó el contenido glucosa mediante HPLC. Se calculó la eficiencia de hidrólisis.

3.4.4- Ensayos de hidrólisis enzimática con gelatinización previa

Las harinas se mezclaron con agua, en matraces Erlenmeyer de 250 mL, para obtener suspensiones con una relación sólido líquido 1:5. Se realizó una etapa de gelatinización en baño de agua a 95°C durante 15 minutos. Se adicionaron 100 y 200 µL de α-amilasa a cada matraz (5.7 y 11.4 µL/g, respectivamente) y se calentaron en un baño de agua a 75ºC por 90 minutos. Se tomaron alícuotas, a los 60 y 90 minutos, a las cuales se les agregó gotas de TCA 40% en baño de hielo para detener la reacción. A estas muestras se le determinó el contenido de azúcares reductores totales mediante la técnica de DNS. Luego se ajustó el pH de los matraces a 4.5 que es el pH óptimo de la AMG. Se agregaron 200 µL de la enzima AMG (11.4 µL/g). Los ensayos se realizaron en estufa a 70ºC con agitación manual. Se tomaron alícuotas de 2 mL a los 30 y 60 minutos y 18 horas de agregada la enzima y la reacción se detuvo mediante el agregado de gotas de NaOH 1 M en baño de hielo. Las muestras se centrifugaron a 6500 rpm por 10 minutos

para descartar los restos de sólidos y al sobrenadante se le determinó el contenido glucosa mediante HPLC. Se calculó la eficiencia de hidrólisis.

3.4.5- Ensayos de hidrólisis con proteasa

3.4.5.1-Ensayos de hidrólisis con proteasa sin gelatinización

Las harinas se mezclaron con agua, en matraces Erlenmeyer de 250 mL, para obtener suspensiones con una relación sólido líquido 1:5. El pH de las muestras se ajustó a 2 que es el óptimo de la proteasa utilizada. Se agregó 1 mL de una solución de pepsina (20 mg/mL) a cada matraz y se incubaron a 37ºC por 2 horas. El pH se ajustó a 6 previo al agregado de 200 µL de α-amilasa y se incubó a 75ºC por 90 minutos. El pH se ajustó a 4.5 previo al agregado de 400 µL de AMG y se incubó en un agitador orbital a 60ºC y 150 rpm. Se tomaron alícuotas de 2 mL a los tiempos 0, 1.5, 3, 6 y 18 horas. Las muestras se centrifugaron a 6500 rpm por 10 minutos para descartar los restos de sólidos. La determinación de azúcares reductores totales de la etapa de licuefacción se realizó mediante la técnica de DNS y la determinación de glucosa de la etapa de sacarificación por HPLC. Se calculó la eficiencia de hidrólisis. Los ensayos se realizaron por duplicado. Se realizó un control sin pepsina en paralelo.

3.4.5.2- Ensayos de hidrólisis con proteasa con gelatinización

Las harinas se mezclaron con agua, en matraces Erlenmeyer de 250 mL, para obtener suspensiones con una relación sólido líquido 1:5. El pH de las muestras se ajustó a 2 que es el óptimo de la proteasa utilizada. Se agregó 1 mL de una solución de pepsina (20 mg/mL) a cada matraz y se incubaron a 37ºC por 2 horas. El pH se ajustó a 6 y se realizó una etapa de gelatinización, en baño de agua a 95ºC por 15 minutos. De esta manera también se logra desnaturalizar la enzima para evitar que actúe sobre las enzimas amilolíticas. Luego se agregaron 200 µL de α-amilasa y se incubó a 75ºC por 90 minutos. El pH se ajustó a 4.5 previo al agregado de 200 µL de AMG y se incubó en una estufa a 70ºC, agitando manualmente cada 15 minutos. Se tomaron alícuotas de 2 mL antes de la gelatinización, a las 1.5, 3, 4.5 y 6 horas. Las muestras se centrifugaron a 6500 rpm por 10 minutos para descartar los restos de sólidos. Las determinación de azúcares reductores totales de la etapa de licuefacción se realizó mediante la técnica de DNS y la

determinación de glucosa de la etapa de sacarificación por HPLC. Se calculó la eficiencia de hidrólisis. Los ensayos se realizaron por duplicado. Se realizó un control sin pepsina en paralelo.

3.5- Remoción de taninos

Los taninos presentes en las diferentes variedades de sorgo se desactivaron utilizando el método con formaldehído de Daiber y Taylor (1982) y el tratamiento de remoción alcalino de du Preez y colaboradores (1985).

3.5.1- Tratamiento con formaldehído

En este ensayo se utilizó formaldehído 0.04% y una relación sólido: líquido 1:1 (Figura 3.5). Se evaluó el tratamiento sobre el grano y sobre la harina (almacenada en cámara a 4°C) para evaluar si era igualmente efectivo en ambos materiales. Se dejó en remojo por 6 horas a temperatura ambiente y como control del ensayo se remojó en agua destilada en las mismas condiciones. Luego de secar las muestras, en estufa a 50°C por 16 horas, se realizó la molienda de los granos y se determinó el contenido de taninos como se describió en las actividades anteriores. Los ensayos se realizaron por duplicado.

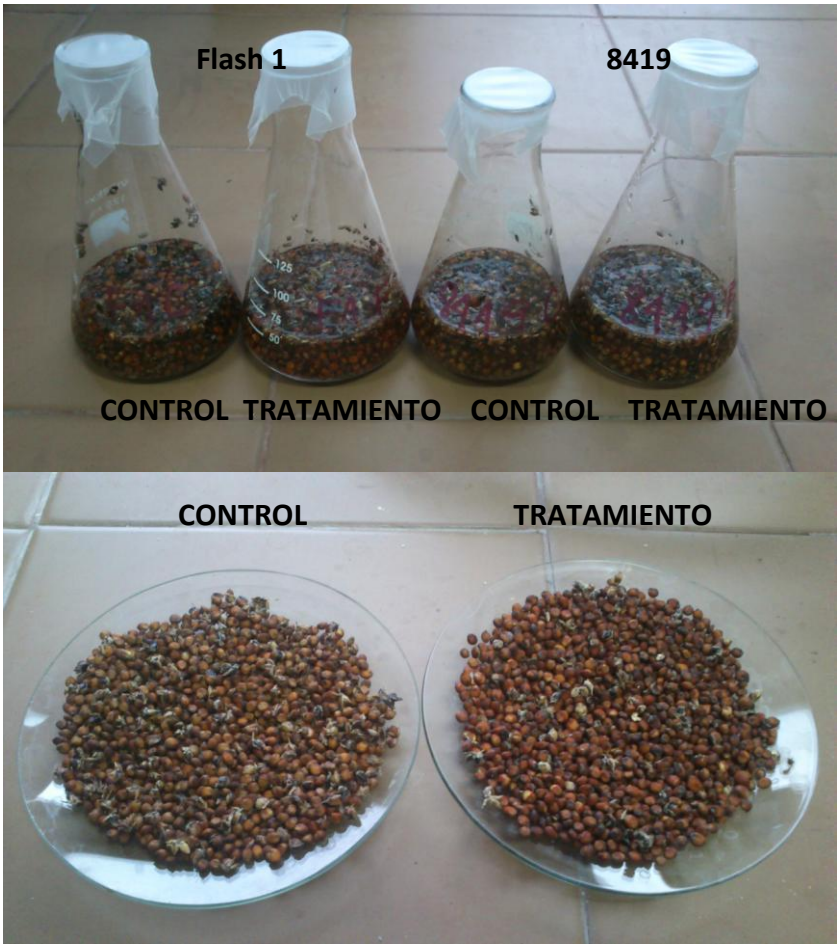

Figura 3.5. Tratamiento con formaldehido de las variedades de contenido de taninos medio y alto.

3.5.2- Tratamiento con NaOH

En este tratamiento se utilizó NaOH 1% y una relación sólido: líquido 1:1. Se dejó en remojo por 30 minutos en un agitador orbital a 40ºC y 100 rpm y luego se lavó con agua destilada para retirar el excedente como se muestra en la Figura 3.6. Como control de cada ensayo se remojó en agua destilada en las mismas condiciones del tratamiento. No fue posible determinar el contenido de taninos en harina de sorgo grano, debido al estado en el cual quedo la muestra luego del tratamiento alcalino, como se observa en la Figura 3.7. Luego de secar las muestras, en estufa a 50°C por 16 horas, se realizó la molienda de los granos y se determinó el contenido de taninos como se describe en las actividades anteriores. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Figura 3.6. *Arriba:* tratamiento con NaOH de las variedades contenido de taninos medio y alto. *Centro:* lavado con agua destilada. *Abajo:* después del secado se compara el control con agua destilada con el grano tratado con NaOH.

Figura 3.7. *Arriba:* harina tratada con formaldehído. *Abajo:* harina tratada con NaOH.

3.6- Ensayos de sacarificación y fermentación en simultáneo (SSF)

En los ensayos de SSF se suspendieron 29, 34 y 44 g de harina en 130, 116 y 106 mL de agua destilada, en matraces Erlenmeyer de 250 mL con tapa rosca, para obtener relaciones sólido:líquido 1:5, 1:4 y 1:3, respectivamente. Se estudió la SSF con y sin gelatinización previa para las condiciones 1:5 y 1:4, y el ensayo con una relación 1:3, se estudió solo con gelatinización. En los ensayos con relación 1:3 también se trabajó con la variedad 8419 tratada con NaOH al 1%, como se explica en el punto 3.5, y con una mezcla de harina de las tres variedades, en la misma proporción (1:1:1). A cada matraz se le adicionaron las siguientes sales para mejorar el desempeño de la levadura en la etapa de fermentación: $(NH_4)_2SO_4$, 5.19 g/L; $MgSO_4.7H_2O$, 0.55 g/L; KH_2PO_4, 1.53 g/L, cada 100 g/L glucosa.

3.6.1- Microorganismo

Se utilizó levadura de panadería comercial en polvo, *Saccharomyces cerevisiae* (Fleischmann).

3.6.2- Desarrollo de inóculo

Para la preparación del inóculo la levadura se cultivó en matraces de 500 mL con 100 mL de medio conteniendo: 100 g/L glucosa, 3 g/L extracto de levadura, 3 g/L extracto de malta y 5 g/L peptona. El pH se ajustó a 4.5 y se agregaron 5 g de levadura. Se incubó en un agitador orbital a 30ºC y 150 rpm por 10-12 horas.

3.6.3- Gelatinización

En los ensayos con una etapa previa de gelatinización, los matraces se colocaron en un baño de agua a 95ºC por 15 minutos y se agitaron con varilla cuando fue necesario para evitar la formación de grumos (Figura 3.8).

Figura 3.8. Gelatinización en baño de agua a 95ºC. Agitación con varilla de suspensiones con relación 1:3.

3.6.4- Licuefacción

A las suspensiones con un pH de 6, correspondiente al pH óptimo de la enzima, se les agregó 5.7 µL/g de α-amilasa. Los matraces se mantuvieron en estufa a 75ºC agitando cada 15 minutos por 90 minutos. Se tomaron alícuotas de 5 mL al tiempo final de licuefacción a las cuales se les agregó gotas de TCA 40% en baño de hielo para detener la reacción enzimática. Las muestras se centrifugaron a 6500 rpm por 10 minutos para descartar los restos de sólidos y se determinó el contenido de azúcares reductores totales en el sobrenadante, mediante la técnica de DNS.

3.6.5- Sacarificación y fermentación en simultáneo

En todos los casos, luego de la etapa de licuefacción el pH se ajustó a 4.5. Se agregaron 11.4 µL/g de AMG y se inoculó la levadura de manera de obtener una concentración inicial de $1x10^8$ células/mL. Los ensayos se realizaron en un agitador orbital a 30 ºC y 150 rpm, como se observa en la Figura 3.9. Se tomaron alícuotas de 5 mL luego del agregado de la AMG y antes de inocular la levadura, y a lo largo de todo el ensayo. La reacción enzimática se detuvo mediante el agregado de gotas de NaOH 1 M en baño de hielo. Las muestras se centrifugaron a 6500 rpm por 10 minutos para descartar los restos de sólidos y al sobrenadante se le determinó el contenido glucosa mediante HPLC.

Figura 3.9. Ensayo de SSF en agitador orbital.

3.6.6- Recuento de microorganismos

3.6.6.1- Desarollo de inóculo

La concentración celular del desarrollo de inóculo se determinó por recuento directo al microscopio en cámara de Neubauer. Se utilizó el colorante azul de metileno al 0.025 % (0.9% NaCl, 0.042% KCl, 0.048% $CaCl_2.6H_20$, 0.02% $NaHCO_3$ y 1% glucosa), para distinguir células vivas, que quedan incoloras y células muertas que se tiñen de azul. Las diluciones se prepararon con agua destilada estéril. Esta técnica permite observar morfología y estado del cultivo.

3.6.6.2- Sacarificación y fermentación en simultáneo

En los ensayos de SSF no fue posible utilizar el método de recuento en cámara de Neubauer debido a la presencia de sólidos disueltos en el medio de fermentación provenientes de la harina de sorgo, que dificultaban la preparación de las diluciones y la observación al microscopio. En este caso, para realizar el seguimiento de la fermentación, se determinó la producción de CO_2 por pérdida de masa de los matraces. Se graficó la pérdida de masa total ($g_{CO2}/g_{azúcares}$) *vs* tiempo (ver 3.7. Cálculos).

3.6.7- Determinación del contenido de azúcares, etanol y glicerol

3.6.7.1-Método del Ácido Dinitrosalicílico (DNS)

En los ensayos de licuefacción, la concentración de azúcares reductores totales, expresados como glucosa, se determinaron mediante la técnica de DNS (Miller, 1959) utilizando un espectrofotómetro UNICAM UV2.

3.6.7.2-Cromatografía Líquida

El contenido de azúcares (glucosa y maltosa) de los ensayos de caracterización, hidrólisis enzimática y SSF y el contenido de etanol y glicerol de los ensayos SSF, se determinó con un cromatógrafo líquido de alto desempeño (HPLC) Shimadzu, Japón, equipado con el software Class VP 5.04. Se utilizó un detector de índice de refracción (RID-10 A) y una columna Shodex SUGAR KS-801 con su correspondiente precolumna KS-G. Como fase móvil se trabajó con agua milliQ y un flujo de 0.7 mL/min, a una temperatura de 55ºC. El volumen de muestra inyectado fue de 20 µL y el tiempo total de corrida fue de 20 minutos.

3.6.7.3-Cromatografía gaseosa

La concentración de etanol de los ensayos de sacarificación y fermentación en simultáneo se determinó con un cromatógrafo de gases Shimadzu, Japón, modelo GC 2010 equipado con una columna RTX-Wax 1053025 0.5 μm (0.32 m x 30 m), un detector FID y un inyector automático (AOC-20i) en modo de inyección Split. Las condiciones de trabajo fueron: temperatura del detector 250ºC, temperatura de inyección 250ºC, relación de split 35. El gas carrier fue hidrógeno (presión = 23,1 kPa) y el make up nitrógeno (flujo = 30 mL/min). El volumen de muestra inyectado fue de 1 µL.

3.6.8- Preparación de las muestras a analizar

Para precipitar las proteínas presentes en las muestras, tanto para el HPLC como para el GC, se agregaron 100 µL de ácido sulfosalicílico 20% y se centrifugaron a 6500 rpm por 10 minutos. Las diluciones se prepararon con agua milli Q y se filtraron por filtros Millipore de difluoruro de polivinilideno de 0.22 µm.

3.7- Cálculos

3.7.1- Determinación del contenido de almidón

El contenido de almidón se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Almidón}\,(\%) = \left(\frac{C_{HPLC}\, x \left(\frac{V_{solucion}}{M_{harina}} \right)}{F\, x \left(\frac{R}{100} \right)} \right) x\ 100$$

siendo:

C_{HPLC}: concentración de glucosa de la muestra proveniente de la hidrólisis de la glucosa (concentración de glucosa final luego de la hidrólisis enzimática – concentración de glucosa sin agregado de enzimas) (g/L)

$V_{solución}$: volumen de la solución (L)

M_{harina}: masa de la harina en base seca (g)

F: factor de conversión de almidón a glucosa. 1.11 gramos de glucosa pueden ser obtenidos a partir de 1 g de almidón ($(C_6H_{10}O_5)n$) según la estequiometría de la reacción:

$$\underset{\text{almidón}}{(C_6H_{10}O_5)n} + n\ H_2O \rightarrow \underset{\text{glucosa}}{n\ C_6H_{12}O_6}$$

R: recuperación del estándar de almidón de maíz (96% almidón en base seca, 13.7% humedad) determinado como:

$$R\,(\%) = \left(\frac{C_{HPLC(estándar)}\ x\ V_{solución}}{F\ x\ M_{estándar}} \right) x\ 100$$

siendo:

$C_{HPLC(estándar)}$: concentración de glucosa del estándar de almidón de maíz (g/L)

$V_{solución}$: volumen de la solución (L)

$M_{estándar}$: masa del estándar de almidón de maíz en base seca (g).

3.7.2- Determinación del contenido de amilosa y amilopectina

La concentración de amilosa en las muestras de almidón se calculó como la diferencia entre el contenido de glucosa del sobrenadante del precipitado con Con A y el contenido de glucosa correspondiente almidón total.

$$\text{Amilosa}(\%) = \left(\frac{\left(\frac{C_{\text{Amilosa}}}{C_{\text{Almidón}}} \right) x\, F_{\text{dilución}}}{R} \right) x\ 100$$

siendo:

$C_{Amilosa}$: concentración de glucosa proveniente de la fracción correspondiente a la amilosa (g/L)

$C_{Almidón}$: concentración de glucosa proveniente de la solución de almidón total (g/L)

$F_{dilución}$: factor de dilución

R (%): recuperación del estándar de almidón de maíz (66% amilosa)

Este es el contenido de amilosa en base húmeda, se corrige para obtener el porcentaje en base seca como:

$$\text{Amilosa}(\%\,\text{base seca}) = \text{Amilosa}(\%) \times \left(\frac{100 - \%\,\text{humedad}}{100} \right)$$

3.7.3- Determinación del contenido de taninos

El contenido de taninos se calculó como:

$$\text{Taninos}(\%) = \frac{(C_{absorbancia} \times V_{solución})}{M_{harina}}$$

siendo:

$C_{absorbancia}$: concentración de taninos obtenida por medidas de absorbancia (g/L);
$V_{solución}$: volumen de la solución (L)
M_{harina}: masa de la harina en base seca (g)

3.7.4- Eficiencia de hidrólisis

$$\text{Eficiencia}\ (\%) = \left(\frac{C_{glucosa} \times V_{solución}}{M_{harina} \times 1.11} \right) \times 100$$

siendo:

$C_{glucosa}$: Concentración de glucosa proveniente de la hidrólisis del almidón (concentración de glucosa final luego de la hidrólisis enzimática – concentración de glucosa sin agregado de enzimas) (g/L). En los ensayos de licuefacción la concentración de glucosa corresponde a la concentración de azúcares reductores totales calculada por el método de DNS.
$V_{solución}$: volumen de la solución (L)
M_{harina} : masa de la harina en base seca (g)
Factor 1.11: como se explica en el item 3.7.1

3.7.5- Producción de CO_2

$$\text{Pérdida de masa total} = \frac{M_{CO2}}{M_{azúcares}}$$

$$M_{CO2} = (Mti - Mtf)_1 + (Mti - Mtf)_2 + \ldots + (Mti - Mtf)_n$$

$$M_{azúcares} = M_{harina} \times \left(\frac{\%\,Almidón}{100} \right) \times 1.11$$

siendo:

M_{CO2}: masa de CO_2 producida en cada punto más la masa de CO_2 producida en el o los puntos anteriores.

$M_{azúcares}$: masa de azúcares teóricos en base seca (g).

3.7.6- Yp/s (g_{etanol} /$g_{sustrato}$)

Rendimiento de etanol basado en la glucosa y maltosa consumidas, expresadas en equivalentes de glucosa.

$$Y_{P/S} = \frac{g_{etanol\,finales} - g_{etanol\,iniciales}}{g_{glucosa\,consumidos}}$$

Los gramos de glucosa consumidos se calcularon como los gramos de glucosa teóricos iniciales menos los gramos de glucosa residuales.

3.7.7- Eficiencia de fermentación

$$\text{Eficiencia de fermentación}\,(\%) = \frac{Y_{P/S}}{0.511^{*}}$$

*El rendimiento estequiométrico de 1 g de glucosa es de 0.511 g etanol según la siguiente reacción:

$$\underset{\text{glucosa}}{C_6H_{12}O_6} \rightarrow 2\,\underset{\text{etanol}}{C_2H_6O} + 2\,CO_2$$

3.8- Análisis estadístico

Se realizaron análisis de ANOVA de los datos experimentales para comprobar si las diferencias encontradas entre ellos eran estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) utilizando el software estadístico Infostat, versión estudiantil 2013, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina (di Rienzo et al., 2013).

4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1- Caracterización fisicoquímica de la materia prima

La composición de la variedades de sorgo grano ensayadas se presentan en la Tabla 4.1. El principal componente de los granos de sorgo es el almidón, el que puede variar entre un 70 a 80% de la materia seca del grano (Rooney y Pflugfelder, 1986). Las variedades ensayadas tienen un contenido de almidón de aproximadamente el 70% del grano, no observándose diferencias significativas.

La proporción de amilosa puede variar entre un 0 a 30%, dependiendo de la especie y de la variación genética dentro de la especie. Generalmente, los cereales poseen entre un 20 y un 30% de amilosa, excepto los denominados granos tipo *waxy* o cerosos donde la cantidad de amilosa es muy pequeña o prácticamente no está presente. La amilopectina generalmente comprende el 70 a 80% del almidón de los granos (Wu et al., 2006; Zhao, 2008). En este trabajo el contenido de amilosa de las variedades de sorgo estudiadas estuvo entre 11.5 y 14.4%.

El segundo componente que se encontró en mayor proporción en los granos fueron las proteínas, entre un 11.0 y un 12.1%, similar a los datos reportados por Perez-Carrillo et al. (2012). Los valores de humedad y cenizas también fueron similares a los encontrados en la bibliografía (Peralta-Contreras et al., 2013).

El contenido de taninos del sorgo grano depende de la variedad y puede variar entre 0 y 4 % del peso seco del grano (Ali et al., 2009; Wu et al., 2007). El rango observado en las variedades estudiadas fue desde un valor por debajo del límite de detección del método (< 0.2%) hasta 2% para la variedad Flash 1.

Tabla 4.1. Composición de las distintas variedades de sorgo grano.

Variedad	Humedad (%)	Almidón (%)	Amilosa (%)	Proteínas (%)*	Taninos (%)**	Cenizas (%)
Flash 10 Plus	11.46 ± 0.06	70.7 ± 0.9	11.5 ± 1.7	11.7	‹ 0.2	1.20 ± 0.00
8419	12.79 ± 0.02	68.4 ± 0.8	14.4 ± 0.9	11.0	1.06 ± 0.02	1.34 ± 0.04
Flash 1	12.36 ± 0.04	68.0 ± 0.4	14.4± 1.0	12.1	1.96 ± 0.24	1.24 ± 0.01

± desvío estándar del ensayo por duplicado o triplicado según corresponda.
*Determinación sobre una única muestra realizado externamente
**El contenido de taninos se expresa como porcentaje de equivalentes de catequina (EC), límite de detección 0.2% .

4.2- Variaciones de la viscosidad durante la gelatinización

Cuando se calienta una suspensión de harina de sorgo en agua se genera una pasta con una viscosidad elevada, difícil de manipular en escala industrial. En la Tabla 4.2 se muestran los parámetros determinados durante el ensayo de gelatinización de las suspensiones de harina de sorgo: temperatura de empastamiento, pico de viscosidad, *breakdown*, viscosidad final, *setback*.

Tabla 4.2. Parámetros de los viscogramas estudiados para cada harina.

Variedad	Temperatura de empastamiento (ºC)	Pico de viscosidad (cP)	Viscosidad final (cP)	*Breakdown* (cP)	*Setback* (cP)
Flash 10 Plus	76	2555 (10 min)	6096	540	4081
8419	74	3453 (8.7 min)	4677	1623	2847
Flash 1	76	2309 (9.5 min)	4909	511	3111

Zhao (2008) reportó que la presencia de taninos producen altas viscosidades en la suspensión harina de sorgo grano (elevada viscosidad final y pico de viscosidad) y que las variedades de sorgo más difíciles de hidrolizar con la enzima α-amilasa tienen picos de viscosidad elevados. En este trabajo se encontró que la variedad 8419, con un contenido de taninos medio, presentó el mayor pico de viscosidad (3453 cP). Sin embargo, Flash 10 Plus, con contenido bajo de taninos, tuvo la mayor viscosidad final (6096 cP) mientras que 8419 y Flash 1 tuvieron viscosidades finales similares (4677 y 4909 cP).

Las temperaturas de empastamiento fueron similares en las tres variedades de sorgo estudiadas (74 - 76°C) como se observa en la Tabla 4.2 y en la Figura 4.1. La gelatinización del almidón es la transición entre la estructura semi cristalina en los gránulos de almidón a una estructura amorfa (Cooke y Gidley, 1992). El aumento en la viscosidad se debe a la habilidad de las partículas de almidón de absorber agua e hincharse ("*swelling*"). Aunque la gelatinización del almidón sea el principal factor que contribuye al *swelling,* la gelatinización solo se asocia a la estructura cristalina mientras que el *swelling* se debe no solo al almidón sino también a otros componentes de la harina, como las proteínas y otros polisacáridos que no provienen del almidón. Por lo tanto no hay una relación única entre el empastamiento y las propiedades de gelatinización del almidón de la harina (Hasjim et al., 2013).

Se ha reportado que los almidones *waxy* (de bajo contenido de amilosa) alcanzan las viscosidades máximas en menor tiempo y presentan viscosidades finales menores que los que no son *waxy* (Zhao, 2008). En este trabajo, las tres variedades estudiadas presentaron un comportamiento similar en el tiempo, lo cual concuerda con el contenido de amilosa obtenido en la caracterización fisicoquímica.

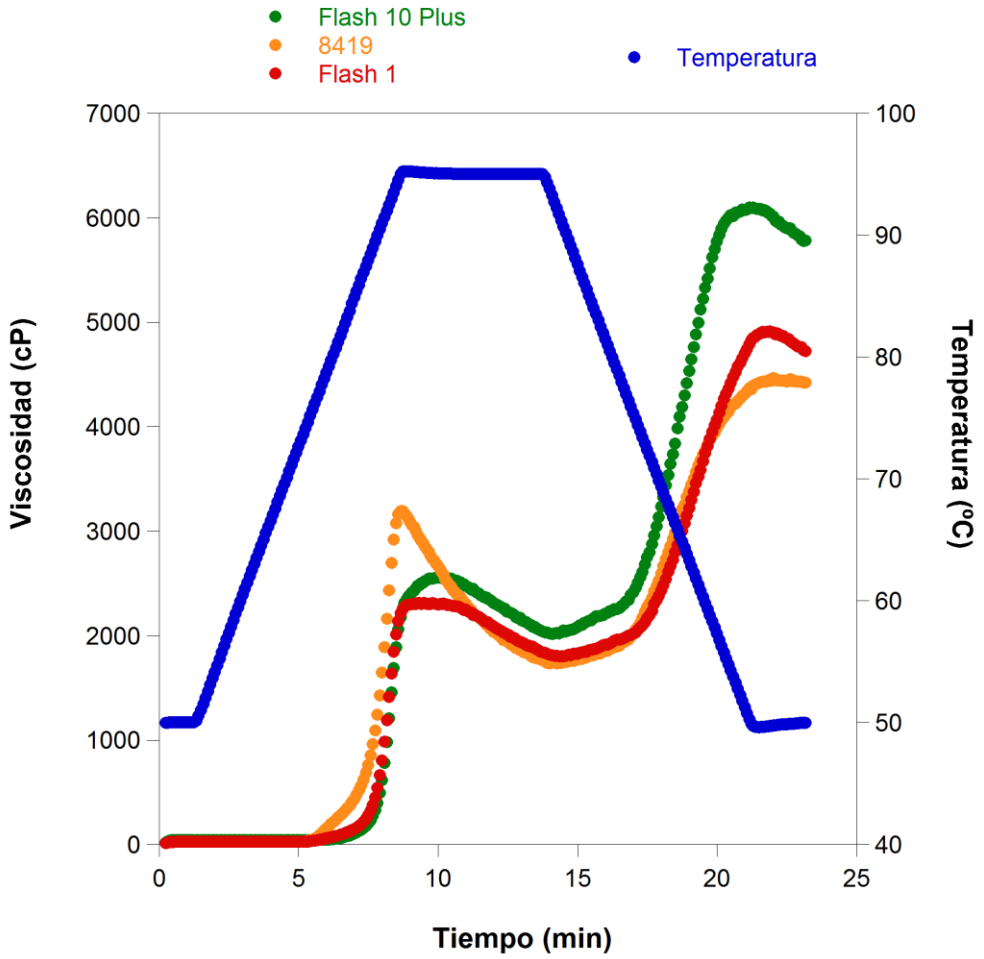

Figura 4.1. Perfil de viscosidad durante el calentamiento de suspensiones con las tres variedades de sorgo ensayadas.

Los viscogramas de las harinas de sorgo fueron similares a los encontrados por Zhao (2008) para otras variedades de sorgo grano. No presentaron picos bien definidos, posiblemente causados por restricciones del almidón a "hincharse" debidas a la encapsulación por parte de las proteínas, provocando que los gránulos de almidón no gelatinicen completamente durante la etapa a 95ºC. Este comportamiento de "empastamiento" parece ser típico de las harinas de sorgo y es diferente a los almidones de otros cereales como el trigo, la cebada y el *triticale* (un híbrido que se produce del cruzamiento entre trigo y centeno) (Mahasukhonthachat et al. 2010 a; 2010 b).

Un pico de viscosidad alto (*hot-paste viscosity*) es equivalente a una temperatura de "hinchazón" alta (post gelatinización). La viscosidad inicial es equivalente a una temperatura de "hinchazón" baja (el almidón dañado mecánicamente se hincha más que los almidones nativos, por lo tanto se espera que presente una viscosidad inicial mayor).

La viscosidad final (*cold-paste viscosity*) es una medida de la retrogradación del almidón y puede aumentar si los gránulos de almidón están menos impedidos a hincharse y reasociarse o retrogradar durante el enfriamiento.

Además de otras propiedades del almidón, las interacciones almidón-proteínas en el sorgo son probablemente responsables por las altas temperturas de empastamiento del sorgo, que en el estudio de Mahasukonthachat y colaboradores son mayores a 80ºC. Zhao (2008) encontró temperaturas de empastamiento en el rango de 76.7 a 89.6ºC para las harinas de sorgo de 68 variedades estudiadas.

Con respecto a las viscosidades finales de las suspensiones de sorgo grano, Zhao (2008) encontró una relación directa entre este parámetro y el rendimiento de etanol, siendo mayor para suspensiones que presentaron viscosidades finales menores (Zhao, 2008). En este trabajo, la variedad Flash 10 Plus con menor contenido de taninos presentó la mayor viscosidad final y setback. Sin embargo, esta variedad presentó las mayores eficiencias de hidrólisis, razón por la cual se esperaba encontrar buenos rendimientos de etanol.

4.3- Efecto de la gelatinización sobre la etapa de licuefacción

Como ya se ha mencionado, el calentamiento de un medio conteniendo almidón genera una suspensión con una viscosidad elevada difícil de manipular sobre todo a escala industrial. Con el fin de trabajar con suspensiones con bajas viscosidades, se evaluó el efecto de la etapa de gelatinización sobre los rendimientos de hidrólisis del almidón. Se realizaron ensayos con un reómetro que permitieron cuantificar la viscosidad de la suspensión durante las etapas de gelatinización y licuefacción de suspensiones de las diferentes variedades de harina de sorgo, y la eficiencia de hidrólisis en cada etapa.

4.3.1- Licuefacción sin gelatinización

La Figura 4.2 muestra los perfiles de viscosidad encontrados en los ensayos realizados sin gelatinización. Se observaron perfiles muy diferentes para las tres variedades de sorgo estudiadas. Cabe destacar que la temperatura de empastamiento encontrada para las tres variedades estudiadas (74 y 76°C, Tabla 4.2) fue similar a la temperatura utilizada durante la licuefacción (75°C). La variedad con menor contenido de taninos, Flash 10 Plus, no presentó pico de viscosidad, y la viscosidad disminuyó cuando la temperatura alcanzó los 75°C, temperatura óptima de la α-amilasa de acuerdo a la recomendación del fabricante. En el ensayo con la variedad 8419 hubo un balance entre los procesos de gelatinización y de licuefacción, observándose un pico de viscosidad. En el caso de la variedad con mayor contenido de taninos, Flash 1, la viscosidad aumentó cuando la temperatura llegó a los 75°C y siguió aumentando hasta el final del ensayo. Las diferencias entre las tres variedades sugieren posible inhibición de los taninos sobre la α-amilasa (Zhao, 2008).

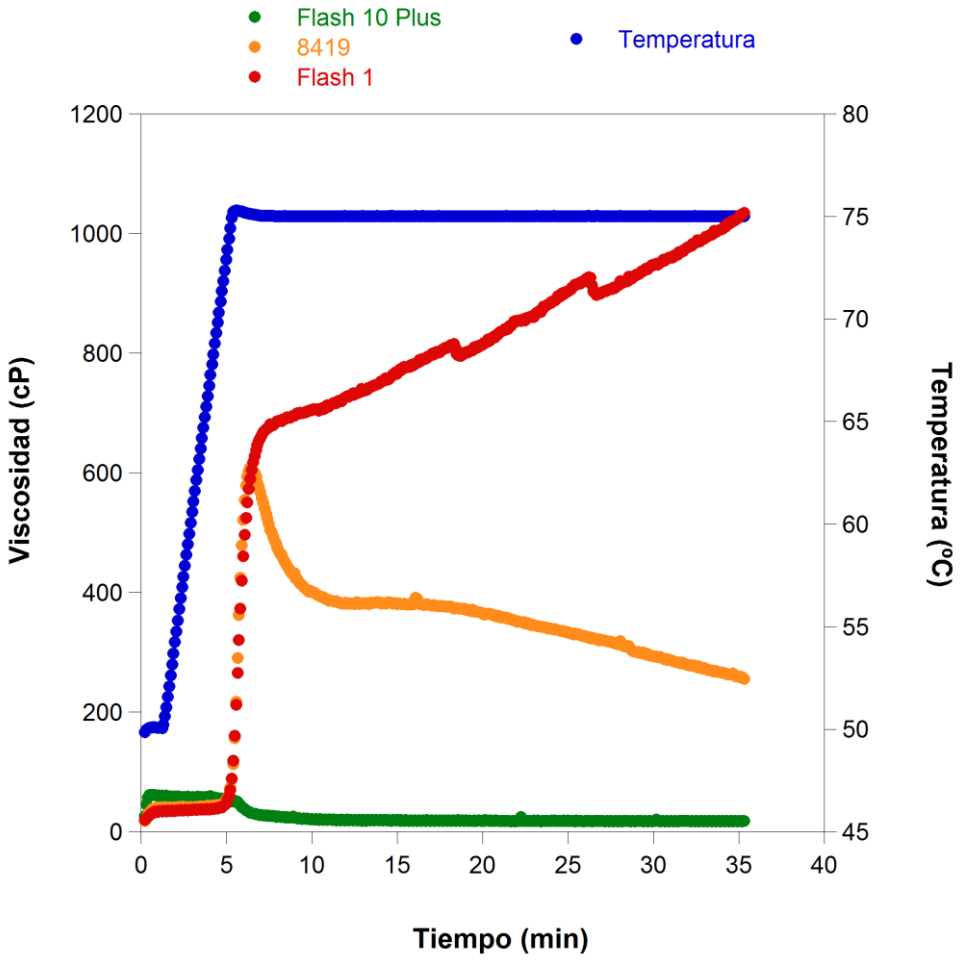

Figura 4.2. Perfil de viscosidad del ensayo de licuefacción sin gelatinización previa.

4.3.2- *Licuefacción con gelatinización*

La Figura 4.3 presenta los perfiles de viscosidad encontrados en los ensayos realizados con una etapa de gelatinización previa a la licuefacción. Las tres variedades tuvieron comportamientos similares en la etapa de gelatinización, alcanzando viscosidades de 6437 cP (Flash 10 Plus), 8071 cP (8419), 7489 cP (Flash 1). Luego del agregado de la α-amilasa la viscosidad disminuyó a valores por debajo de los 50 cP en todos los casos.

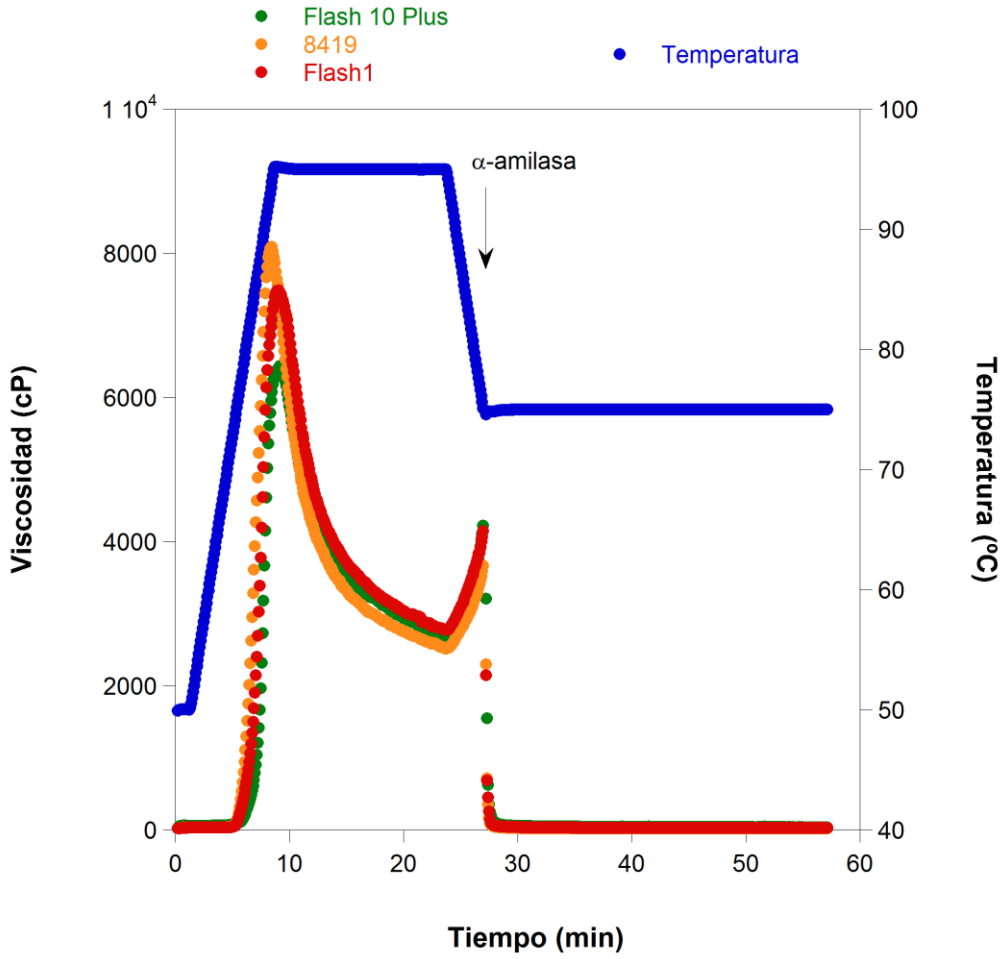

Figura 4.3. Perfil de viscosidad del ensayo de licuefacción con gelatinización previa.

La Tabla 4.3 presenta los rendimientos de hidrólisis de los ensayos realizados en el reómetro de licuefacción con y sin gelatinización. En los ensayos sin gelatinización, al aumentar el contenido de taninos, la eficiencia de la hidrólisis disminuyó de 50.1% a 4.5%. Sin embargo, cuando se realizó una etapa previa de gelatinización los rendimientos para las variedades de contenido de taninos bajo (Flash 10 Plus) y medio (8419) fueron similares, 48.0% y 47.9% respectivamente, mientras que la variedad de tanino alto (Flash 1) fue levemente inferior, 44.4%.

Luego de la gelatinización, tanto la variedad de tanino medio como la de tanino alto mostraron una diferencia importante en el rendimiento de licuefacción con respecto al ensayo sin gelatinización, 34.5 y 39.8%, respectivamente. Flash 10 Plus no mostró diferencias significativas al comparar los rendimientos de ambos ensayos.

Tabla 4.3. Eficiencia de hidrólisis para las distintas variedades de sorgo usando α-amilasa con y sin gelatinización previa.

Variedad	Taninos (%)	Eficiencia de hidrólisis (%)	
		Ensayo sin gelatinización	Ensayo con gelatinización
Flash 10 Plus	‹ 0.2	50.1	48.0
8419	1.06 ± 0.02	13.4	47.9
Flash 1	1.96 ± 0.24	4.5	44.4

4.4- Ensayos de hidrólisis enzimática

4.4.1- Ensayos de licuefacción - Efecto de la dosificación de α-amilasa.

La etapa de licuefacción involucra la hidrólisis parcial del almidón por la adición de α-amilasa. Se evaluaron dos dosificaciones de α-amilasa, 5.7 y 11.4 µL/g, respectivamente, expresadas en cantidad de materia prima seca. Estos valores se eligieron en base a recomendaciones del fabricante y trabajos previos con enzimas amilolíticas (Lareo et al., 2013). En la Figura 4.4 se muestran los perfiles de eficiencia de hidrólisis obtenidos con las variedades de sorgo estudiadas. Se encontró que al aumentar el contenido de taninos la eficiencia de la hidrólisis disminuyó. A los 60 minutos se obtuvieron los máximos de eficiencia para todas las variedades. En base a estos resultados, para los ensayos de sacarificación, presentados en la punto 4.4.2, se utilizó una dosificación de α-amilasa de 11.4 µL/g α-amilasa y se adicionó la enzima AMG a los 90 minutos, para asegurar una licuefacción completa.

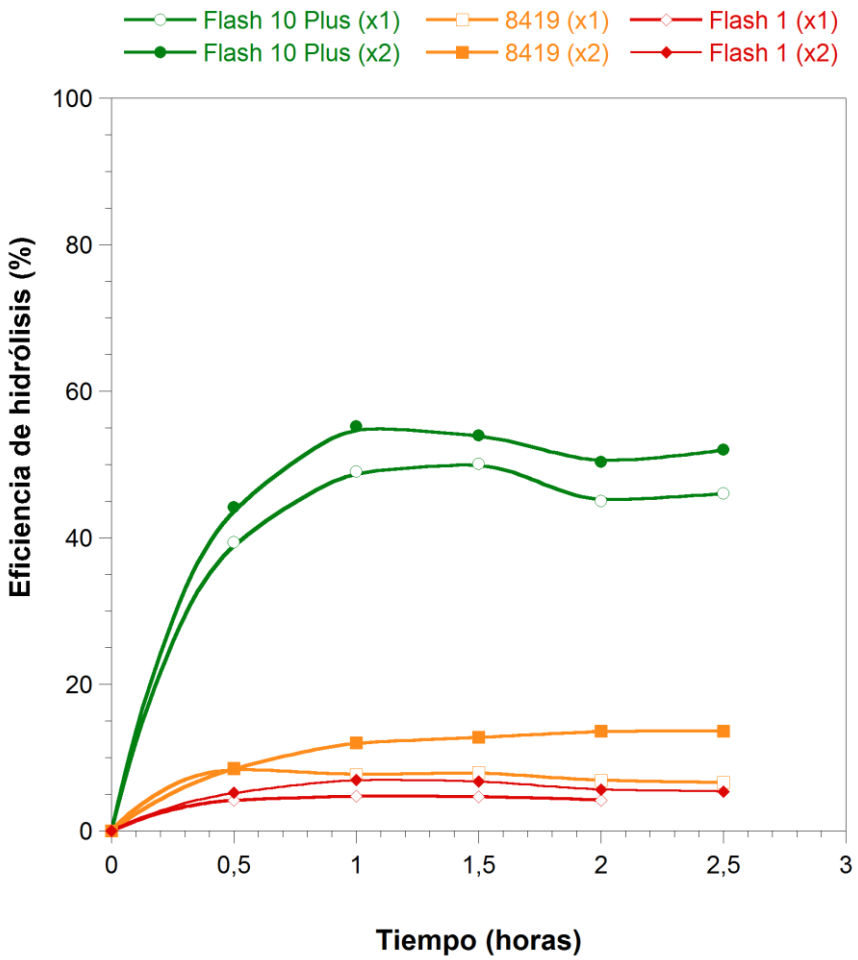

Figura 4.4. Efecto de la dosificación de α-amilasa en el proceso de licuefacción de harina de sorgo grano de las variedades: Flash 10 Plus (bajo tanino), 8419 (tanino medio) y Flash 1 (alto tanino). Ensayos sin etapa de gelatinización y con una relación sólido:líquido 1:5. (x1) y (x2) corresponden a dosificaciones de α-amilasa de 5.7 y 11.4 µL/g (base seca de harina de sorgo), respectivamente.

Tabla 4.4. Eficiencia de la hidrólisis de almidón para las diferentes variedades de sorgo en las etapas de licuefacción usando α-amilasa, sin gelatinización previa.

Variedad	Taninos (%)	Dosificación de α-amilasa (μL/g)	
		5.7	11.4
Flash 10 Plus	‹ 0.2	50.1	54.0
8419	1.06 ± 0.02	7.9	12.8
Flash 1	1.96 ± 0.24	4.6	6.8

Dosificación expresada en volumen de preparado enzimático por masa de harina de sorgo en base seca.

4.4.2- Ensayos de sacarificación - Efecto de la dosificación de AMG

Los ensayos de sacarificación (agregado de AMG) se realizaron luego del tratamiento de las suspensiones de harina de sorgo con 11.4 μL/g de α-amilasa durante 90 minutos. Se evaluaron dos dosificaciones de la enzima AMG 11.4 y 22.8 μL/g (expresada en base seca de harina de sorgo), de acuerdo a las dosis recomendadas por el fabricante y trabajos previos (Lareo et al., 2013). En la Figura 4.5 se muestran los perfiles de hidrólisis obtenidos. Para una dosis dada de AMG, al aumentar el contenido de taninos disminuyó la eficiencia de la hidrólisis, al igual que en la etapa de licuefacción. Luego de 16 horas, las eficiencias de hidrólisis permanecieron prácticamente constantes para todas las variedades estudiadas. Los resultados de eficiencia de hidrólisis se presentan en la Tabla 4.4.

Con respecto a las dosificaciones de la enzima, se observó mayor eficiencia de hidrólisis en todos los casos con una dosificación de AMG de 22.8 μL/g (Tabla 4.5). La variedad de bajo contenido de taninos, Flash 10 Plus tuvo un 67.6% frente a un 58.5% con 11.4 μL/g de AMG, 8419 61.8% y 41.1% y Flash 1 52.5% y 28.7%. Fue más notorio el efecto del aumento de enzima AMG en las variedades con alto contenido de taninos.

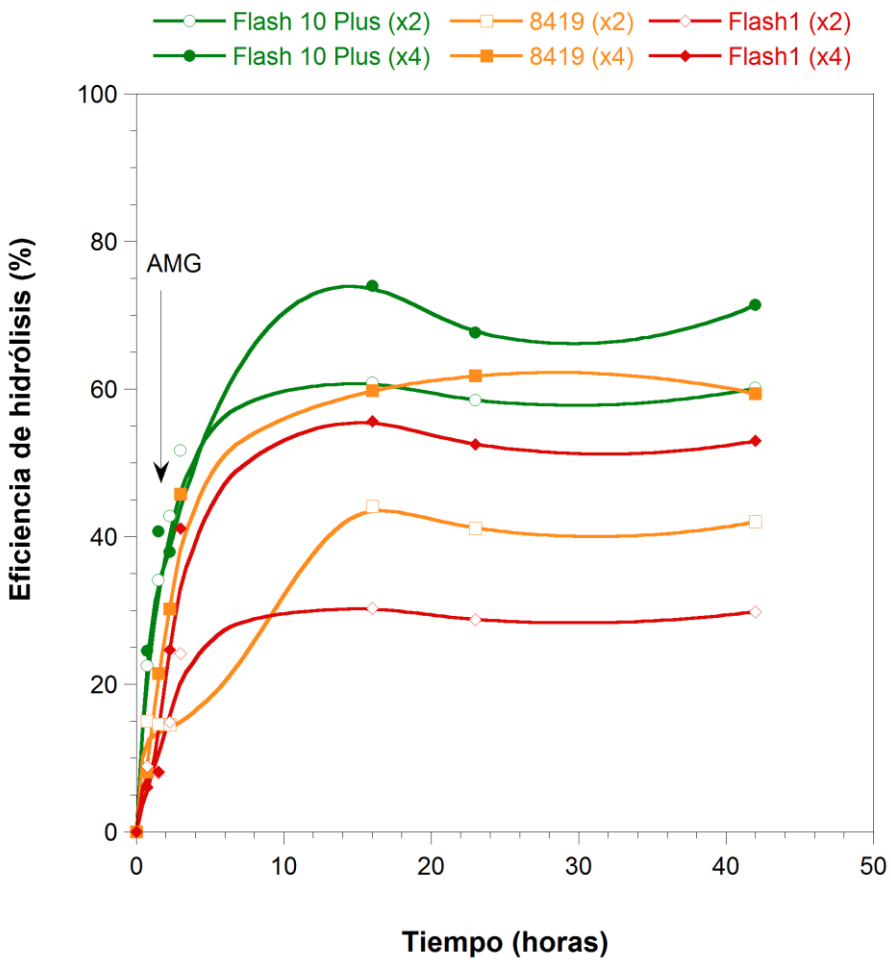

Figura 4.5. Efecto de la dosificación de enzima amiloglucosidasa (AMG) en el proceso de licuefacción de harina de sorgo grano de tres variedades que difieren en su contenido de taninos (Flash 10 Plus: bajo tanino. 8419: tanino medio. Flash1 alto tanino). Ensayos sin etapa de gelatinización, dosificación de α-amilasa 11.4 µL/g, relación sólido:líquido 1:5. La flecha indica el momento en el que se agregó la enzima AMG. (x2) y (x4) corresponden a 11.4 y 22.8 µL/g de AMG (base seca de harina de sorgo), respectivamente.

4.4.3- Ensayos de licuefacción y sacarificación con gelatinización previa

En la Figura 4.6 se presentan los perfiles de eficiencia de hidrólisis del almidón luego del proceso de licuefacción y sacarificación con una etapa previa de gelatinización. Se puede observar que los perfiles fueron muy parecidos para las tres variedades de sorgo estudiadas. No se observó el efecto de inhibición del proceso de hidrólisis al aumentar el contenido de taninos, tal como se había observado en los ensayos de hidrólisis sin gelatinización (Figura 4.5).

Las eficiencias de hidrólisis fueron mayores para los ensayos con gelatinización para la todas las dosificaciones de enzimas estudiadas (Tabla 4.5). Para una dosificación de 11.4 µL/g de α-amilasa y AMG, la eficiencia de hidrólisis aumentó un 50.9% en el caso de Flash 10 Plus (de 58.5 a 88.3%), 111.7% 8419 (de 41.1 a 87.3%) y 203.1% Flash 1 (de 28.7 a 87.0%) con respecto al mismo ensayo sin gelatinización previa. Con el fin de disminuir los costos industriales del uso de las enzimas, se realizó un ensayo con la mitad de la dosis de α-amilasa que la seleccionada inicialmente para los ensayos de sacarificación (5.7 µL/g) manteniendo la dosificación de AMG. Se encontró que la eficiencia de hidrólisis fue un poco menor para las tres variedades (Tabla 4.5), pero no disminuyó en forma significativa (disminuyó entre 0.4 a 5.4%).

El tiempo de reacción disminuyó considerablemente con la etapa de gelatinización; alrededor de las 4 horas se alcanzó la máxima eficiencia, en el caso de la variedad Flash 10 Plus.

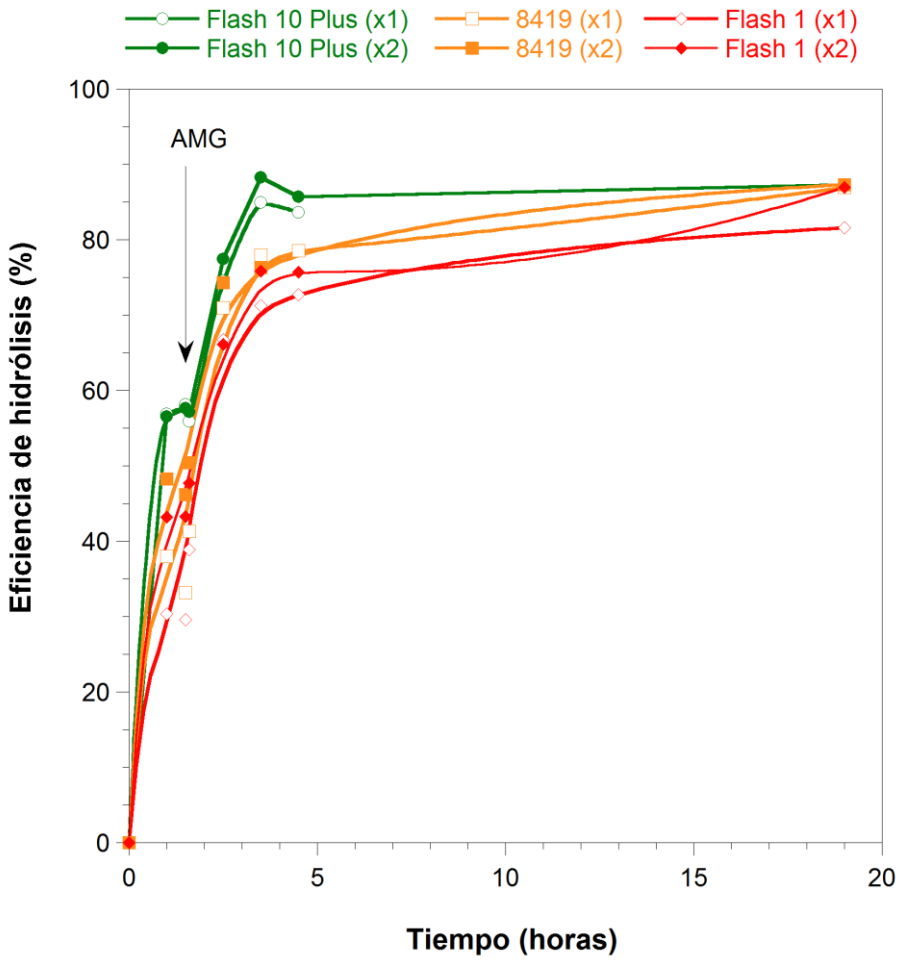

Figura 4.6. Ensayo de licuefacción y sacarificación luego de la etapa de gelatinización, evaluando la dosificacion de α-amilasa con 11.4 µL/g de AMG. Dosificaciones de α-amilasa: (x1): 5.7 µL/g , (x2): 11.4 µL/g (base se seca de harina de sorgo)

4.4.4- Efecto de la adición de pepsina sobre la hidrólisis del almidón

Se ha reportado que la adición de una proteasa previo al agregado de α-amilasa mejora en gran medida la hidrólisis del almidón debido a que reduce la asociación proteína – almidón (Wong et al., 2009). Se realizaron ensayos con el agregado de pepsina a efectos de evaluar su efecto sobre la hidrólisis.

4.4.4.1- Efecto de la adición de pepsina, ensayos sin gelatinización

En la Figura 4.7 se observa que el agregado de esta enzima no mejoró las eficiencias de hidrólisis para ninguna variedad de sorgo con respecto al control realizado (pre-acondicionamiento ácido sin adición de pepsina). Sin embargo, los valores alcanzados de eficiencia de hidrólisis fueron superiores a los alcanzados sin el tratamiento de la pepsina (Tabla 4.5). En el caso de Flash 10 Plus se obtuvo una eficiencia de hidrólisis de 77.8% con pepsina, frente a un 77.3% sin pepsina, la variedad 8419 56.0% y 61.0% y Flash 1 39.8% y 43.1%.

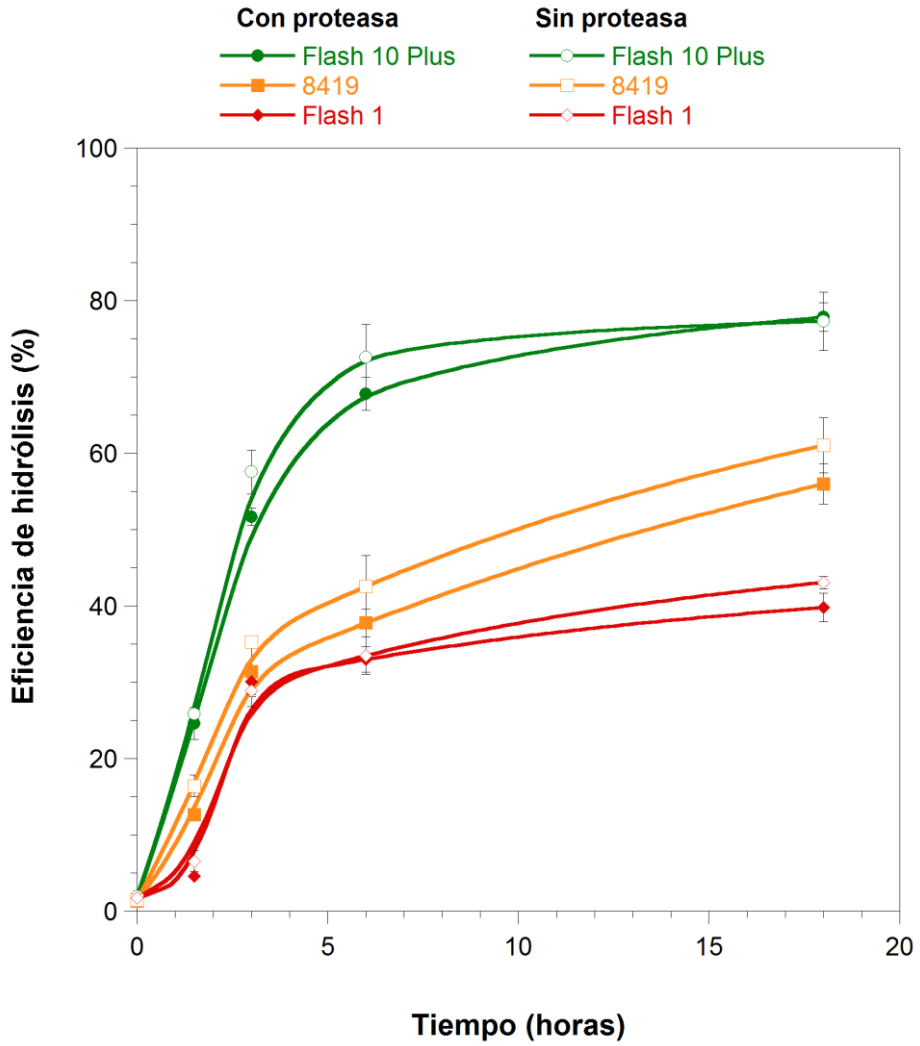

Figura 4.7. Efecto del agregado de pepsina sobre la hidrólisis del almidón usando 11.4 µL/g de α-amilasa y 22.8 µL/g de AMG. Ensayo sin gelatinización.

4.4.4.2- Efecto de la adición de pepsina, ensayos con gelatinización

En la Figura 4.8 se observa que, al igual que en el ensayo anterior, el agregado de la enzima no mejoró las eficiencias de hidrólisis para ninguna variedad de sorgo con respecto al control. Sin embargo, con la etapa de gelatinización los valores alcanzados de eficiencia de hidrólisis fueron similares para todas las variedades y superiores al ensayo donde no se realizó la etapa previa de gelatinización, entre un 83.5 y un 90.3% (Tabla 4.5).

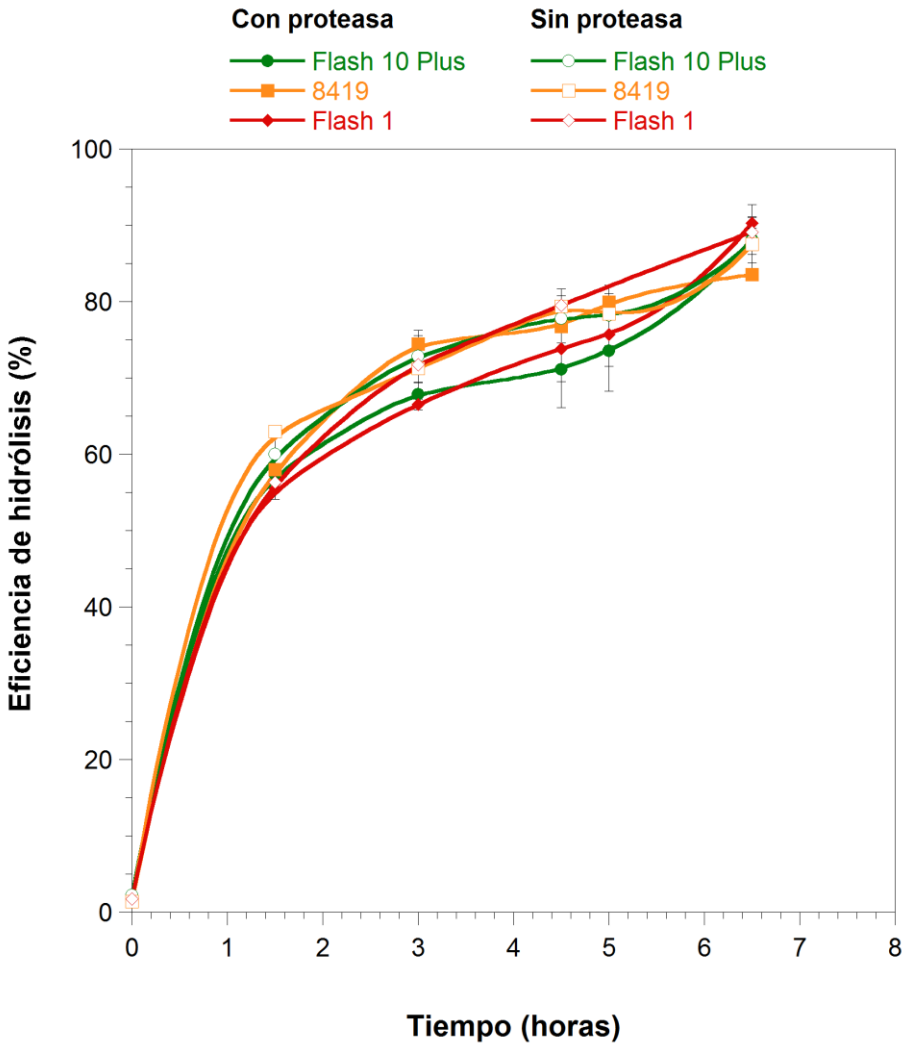

Figura 4.8. Efecto del agregado de pepsina sobre la hidrólisis del almidón usando 11.4 µL/g de α-amilasa y 22.8 µL/g de AMG. Ensayo con etapa de gelatinización.

Tabla 4.5. Comparación de los ensayos de licuefacción y sacarificación para cada variedad, con distintas dosificaciones de enzimas, con y sin gelatinización, con y sin acondicionamiento ácido, con y sin agregado de pepsina.

Variedad	Taninos (%)	Eficiencia de hidrólisis (%)							
		Sin acondicionamiento ácido (*)				Acondicionamiento ácido			
		Sin gelatinización		Con gelatinización		Sin gelatinización		Con gelatinización	
		α-amilasa (x2) AMG (x2)	α-amilasa (x2) AMG (x4)	α-amilasa (x1) AMG (x2)	α-amilasa (x2) AMG (x2)	α-amilasa (x2) AMG (x4)	Pepsina α-amilasa (x2) AMG (x4)	α-amilasa (x2) AMG (x2)	Pepsina α-amilasa (x2) AMG (x2)
Flash10Plus	‹ 0.2	58.5	67.6	85.0	88.3	77.3 ± 3.8	77.8 ± 1.9	87.9 ± 1.7	88.1 ± 3.0
8419	1.06 ± 0.02	41.1	61.8	86.9	87.3	61.0 ± 3.6	56.0 ± 2.7	87.5 ± 3.6	83.5 ± 0.5
Flash1	1.96 ± 0.24	28.7	52.5	81.6	87.0	43.1 ± 0.8	39.8 ± 1.9	89.1 ± 0.04	90.3 ± 2.4

Ensayos con dosificaciones de enzimas: α-amilasa y AMG: (x1): 5.7 µL/g , (x2): 11.4 µL/g, (x4) 22.8 µL/g, pepsina 1 mg/g (base se seca de harina de sorgo)

(*) Datos únicos sin replicación.

4.5- Ensayos de remoción de taninos

Los taninos presentes en las diferentes variedades de sorgo se removieron o desactivaron utilizando el método con formaldehído de Daiber y Taylor y el tratamiento de remoción alcalino de du Preez y colaboradores (Daiber y Taylor, 1982; du Preez et al., 1985).

Antes de realizar los ensayos, se evaluó si el almacenamiento había afectado el contenido de taninos sobre la harina guardada en cámara a 4ºC. Se comparó el contenido de taninos de la harina con el obtenido en el año 2012, cuya determinación fue realizada luego de la molienda (Tabla 4.6). Se observó una disminución en el porcentaje de equivalentes de catequina (EC) debido al almcenamiento, 19 y 31% para 8419 y Flash 1, respectivamente.

Tabla 4.6. Porcentaje de equivalentes de catequina para las variedades de contenido de taninos medio y alto.

Variedad	Año	
	2012	2014
8419	1.06 ± 0.02	0.86 ± 0.13
Flash 1	1.96 ± 0.24	1.36 ± 0.00

Valores expresados como equivalentes de catequina en base seca.

La Figura 4.9 muestra los resultados obtenidos con los dos tratamientos analizados.

4.5.1- Tratamiento con formaldehído

Zhao (2008) encontró que el contenido de taninos luego del tratamiento con formaldehído disminuyó en un 72.7%. Daiber y Taylor (1982) consiguieron una reducción de 95.8 %, cuando trabajaron con una concentración de fomaldehído de 0.04% y la remoción fue total cuando trabajaron con concentraciones mayores. Sin embargo, concentraciones mayores de formaldehído serían negativas para el grano y el formaldehído podría reaccionar con las proteínas haciéndolas menos solubles (Daiber y Taylor, 1982).

Cuando se ensayó este tratamiento en la variedad 8419 se observó una disminución total al trabajar con la harina (de 0.86 a menos de 0.2%) y una disminución de 81.2% cuando se trabajó con el grano (1.01 a 0.19%). En el caso de Flash 1 la remoción de taninos en la harina fue de 97% (1.36 a 0.04%) y en el grano disminuyó un 89.9% (de 1.49 a 0.15%).

4.5.2- Tratamiento con NaOH

El tratamiento con NaOH 1% presentó una buena remoción de taninos para las dos variedades que contenían taninos. Cuando se remojó la variedad 8419 en forma de granos en la solución alcalina se obtuvo una disminución del 83.2% de los taninos (1.01 a 0.17%). En el caso de Flash 1 la remoción fue de 93.9 % (de 1.49 a 0.09%). No fue posible realizar el ensayo con la harina, debido al estado en el que quedó luego del tratamiento. Este tratamiento es más agresivo que el de formaldehído (ver Figura 3.7).

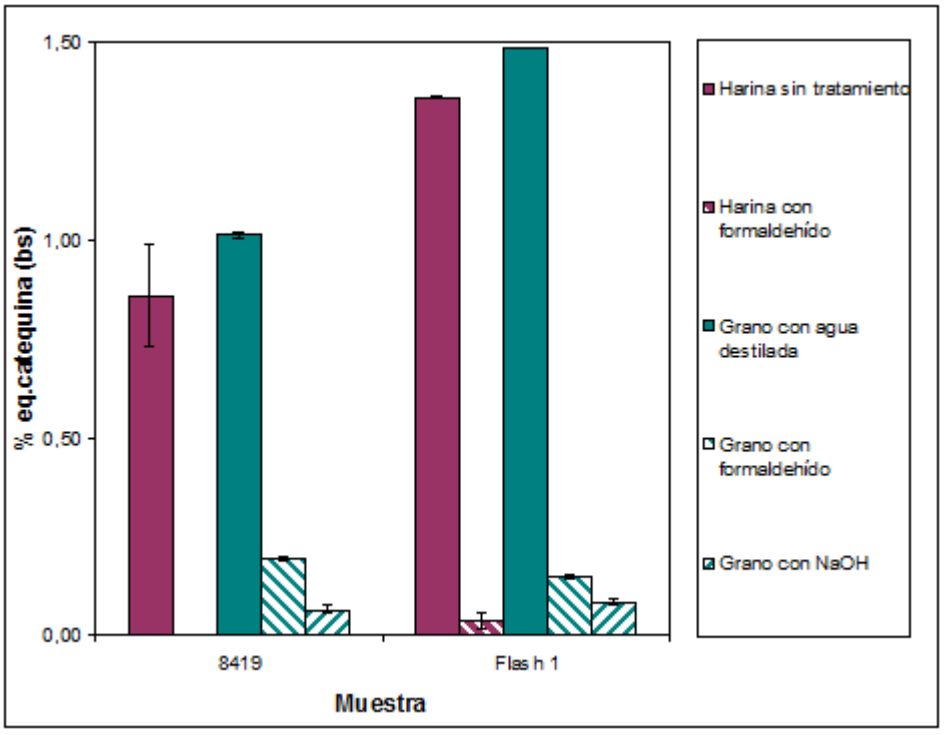

Figura 4.9. Porcentaje de equivalentes de catequina para las variedades de contenido de taninos medio y alto, luego de los tratamientos de inactivación.

4.6- Ensayos de sacarificación y fermentación simultaneas (SSF)

Los ensayos de fermentación de las suspensiones de sorgo se realizaron en forma simultánea a la etapa de sacarificación con el fin de evitar la posible inhibición por producto que puede presentar la hidrólisis enzimática de AMG y el ahorro de energía debido a que se elimina una etapa de calentamiento a 60 - 70°C. Se estudiaron distintas relaciones sólido:líquido: 1:5, 1:4 y 1:3, con el fin de evaluar fermentaciones con altas concentraciones de sustrato inicial de modo de obtener altas concentraciones de etanol, las cuales reducen los costos energéticos asociados a la etapa de separación de producto a nivel industrial (destilación).

4.6.1- Ensayos con relación sólido: líquido 1:5

Ensayos sin gelatinización previa

Se determinaron los azúcares reductores resultantes de la etapa de licuefacción, antes del agregado de la enzima AMG y la levadura. La variedad Flash 10 Plus tenía 70 g/L, 8419 14.10 g/L y Flash 1 5.96 g/L, correspondientes a eficiencias de hidrólisis de 52.1, 11.0 y 4.7%, respectivamente. Este comportamiento se relaciona con el contenido de taninos presente en cada variedad, mostrando que podría existir un efecto de inhibición sobre la enzima α-amilasa.

En la Figura 4.10, se observa que a tiempo inicial, tanto el contenido de glucosa como el de maltosa para los ensayos con la variedad Flash 10 Plus (54.9 y 21.9 g/L) fueron mayores que para las variedades restantes: 8419 (33.8 y 3.5 g/L) y Flash 1 (23.1 y 0.7 g/L).

Para la variedad Flash 10 Plus, se observó valores prácticamente nulos de glucosa y maltosa al cabo de 21 horas alcanzándose la máxima concentración de etanol. Para las variedades 8419 y Flash 1, se observó una velocidad menor, consumiendose la glucosa al cabo de 33 horas. Las concentraciones finales de etanol fueron de 56.9, 57.0 y 53.5 g/L, para Flash 10 Plus, 8419 y Flash 1, respectivamente. La producción de glicerol fue similar en todas las variedades, alrededor de 8 g/L. Los perfiles de fermentación se muestran en la Figura 4.10.

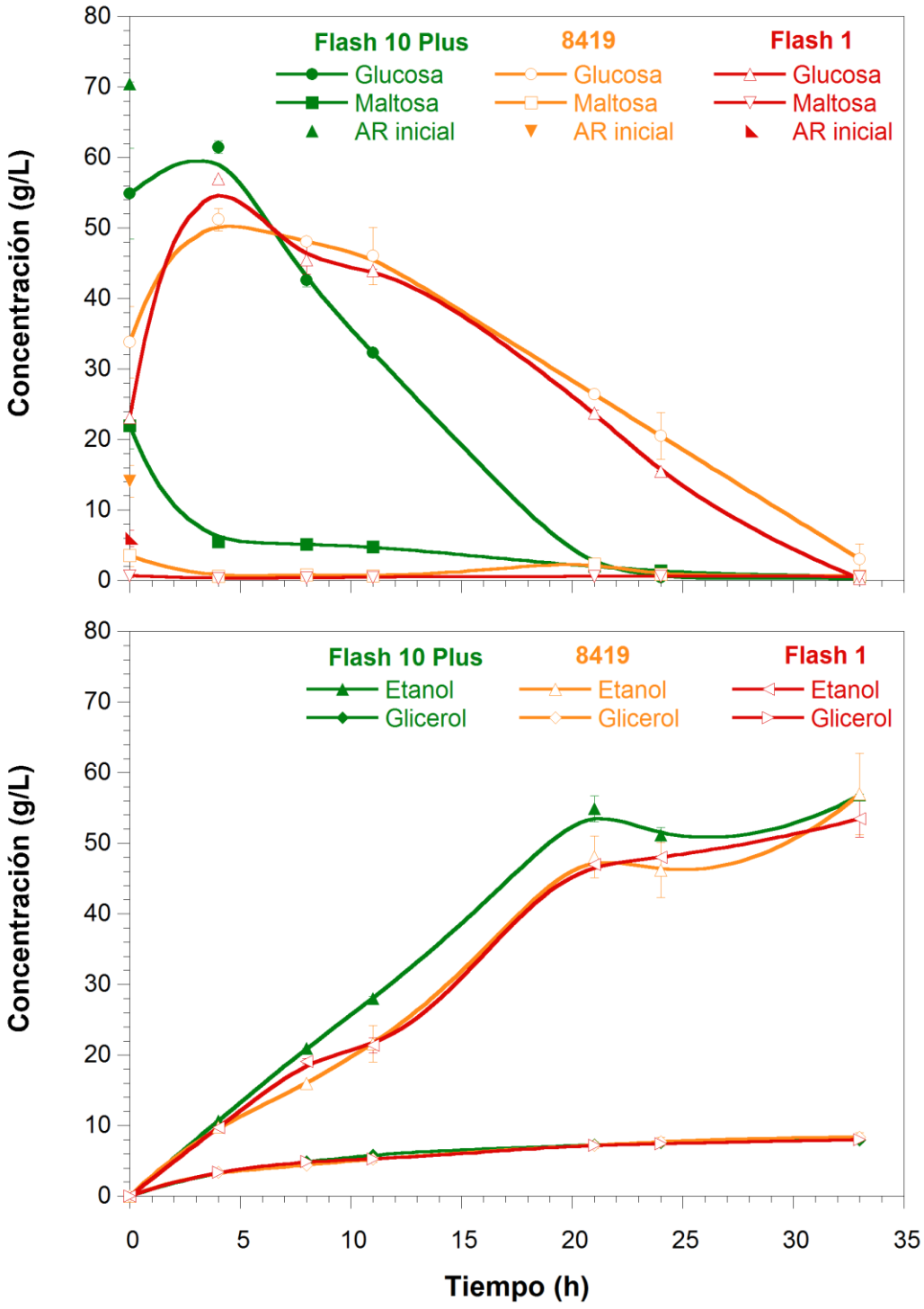

Figura 4.10. Perfiles de sacarificación y fermentación simultáneas de suspensiones de harina de sorgo con una relación sólido:líquido 1:5. Ensayos sin gelatinización previa. AR: azúcares reductores expresados como glucosa.

Los rendimientos de etanol en base a la cantidad de almidón en la materia prima para los ensayos con una relación sólido:líquido 1:5, sin gelatinización, estuvieron en el rango 0.42 - 0.44 g/g, los cuales correspondes a una eficiencia de fermentación de 82.4 - 86.3%.

Ensayos con gelatinización previa

No se encontraron diferencias entre las tres variedades de sorgo estudiadas antes del agregado de la enzima AMG y la levadura, tanto en la concentración de azúcares como en la eficiencia de hidrólisis: Flash 10 Plus 76.9 g/L, 8419 68.9 g/L y Flash 1 70.6 g/L, correspondientes a eficiencias de hidrólisis de 57.2, 53.7 y 55.2%, respectivamente. Esto sugiere que existe un efecto provocado por la gelatinización del almidón que reduce la potencial inhibición de los taninos sobre la enzima α-amilasa.

En la Figura 4.11 se observa que al inicio de la hidrólisis las concentraciones de glucosa y maltosa para las distintas variedades fueron mayores con respecto a las observadas en el ensayo sin gelatinización (Figura 4.10): Flash 10 Plus (101.7 y 28.1 g/L), 8419 (97.0 y 15.8 g/L) y Flash 1 (73.7 y 30.3 g/L). A diferencia de la SSF sin gelatinización previa, en este ensayo no se observó una diferencia en la cinética entre las distintas variedades. A las 21 horas se consumieron todos los azúcares y se obtuvo la máxima concentración de etanol en todos los ensayos. Las concentraciones finales de etanol fueron de 62.0, 59.8 y 60.1 g/L, Flash 10 Plus, 8419 y Flash 1, respectivamente. No hubo diferencias significativas en la producción de glicerol, siendo similar en todas las variedades y a los niveles observados en el ensayo sin gelatinización, alrededor de 8 g/L (Tabla 4.7). Los perfiles de fermentación se muestran en la Figura 4.11.

Los rendimientos de etanol en base a la cantidad de almidón en la materia prima para los ensayos con una relación sólido:líquido 1:5, con gelatinización, estuvieron en el rango 0.46 - 0.47 g/g, los cuales corresponden a eficiencias de fermentación elevadas en el rango 90.2 - 92.2% (Tabla 4.7).

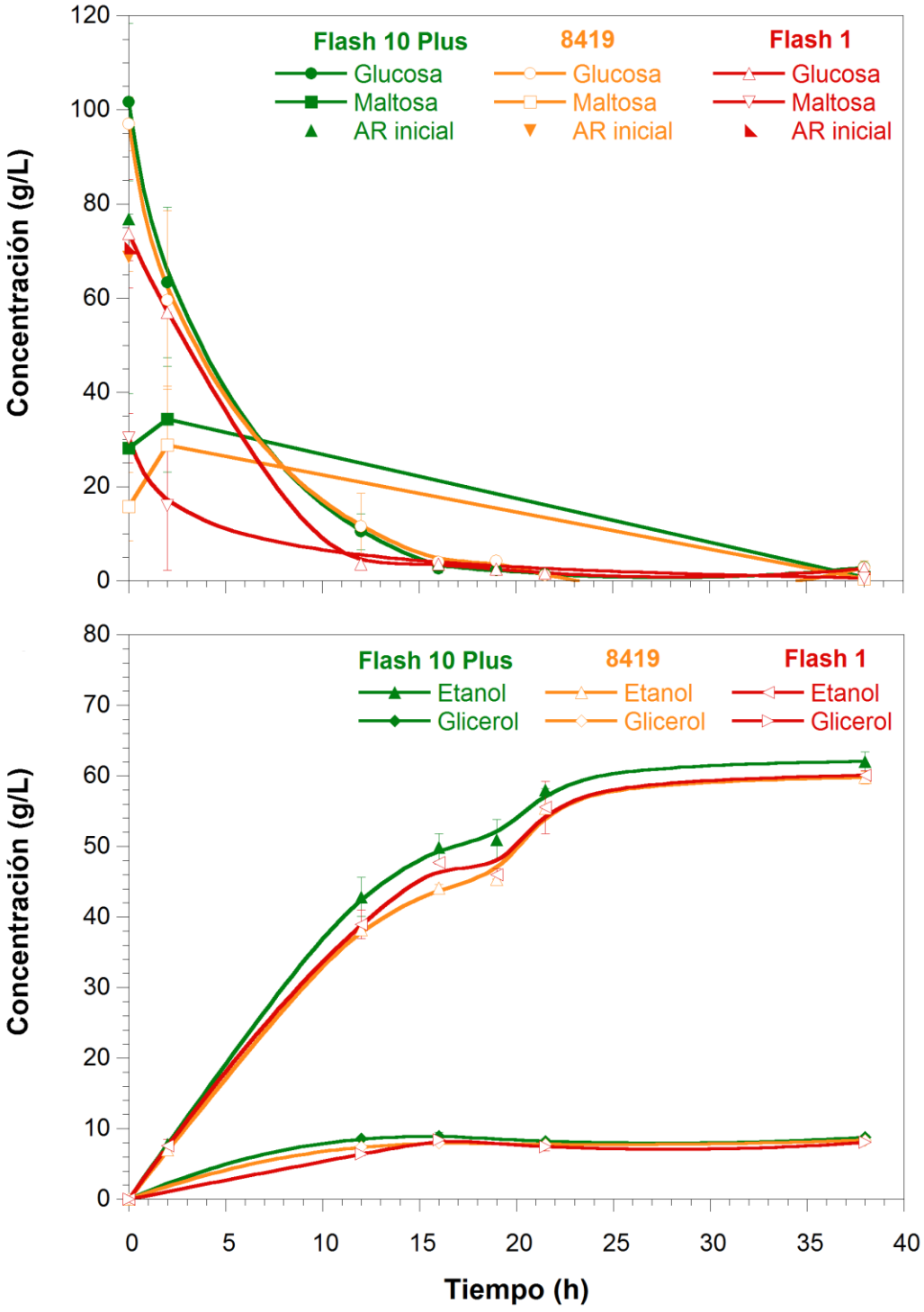

Figura 4.11. Perfiles de sacarificación y fermentación simultáneas de suspensiones de harina de sorgo con una relación sólido:líquido 1:5. Ensayos con gelatinización. AR: azúcares reductores expresados como glucosa.

.

4.6.2- Ensayos con relación sólido:líquido 1:4

En la Figura 4.12 se muestran los perfiles de sacarificación y fermentación simultáneas obtenidos para una relación sólido:líquido 1:4.

En los ensayos sin gelatinización se obtuvieron concentraciones de azúcares de 54.2, 44.7 y 35.71 g/L, correspondientes a eficiencias de hidrólisis de 34.4, 29.8 y 23.8%, para Flash 10 Plus, 8419 y Flash1, respectivamente.

Al igual que en el caso de los ensayos con relación sólido:líquido 1.5, en este ensayo también se observaron concentraciones mayores de azúcares reductores en los matraces con gelatinización, 102.2, 89.9 y 88.1 g/L para Flash 10 Plus, 8419 y Flash1, respectivamente. Estas concentraciones equivalen a eficiencias de hidrólisis de 64.9, 59.9 y 58.8%.

Con la etapa de gelatinización previa a la licuefacción, se obtuvieron las concentraciones máximas de etanol para las tres variedades, entre las 19 y las 23 horas, 79.6, 72.4 y 71.5 g/L. A este tiempo, la concentración de etanol en los ensayos sin gelatinización fue de 50.7, 50.5 y 48.6 g/L, obteniéndose concentraciones similares a las del ensayo con gelatinización luego de 88 horas de fermentación.

A diferencia de la SSF con relación 1:5, donde la concentración de glicerol fue similar para todas las variedades de sorgo, con esta nueva relación sólido:líquido se observaron diferencias significativas entre los ensayos con y sin gelatinización. Las concentraciones de glicerol para el ensayo con gelatinización fueron de 11.6, 11.3 y 11.5 g/L para Flash 10 Plus, 8419 y Flash 1, respectivamente (Tabla 4.7). En el caso del ensayo sin gelatinización las concentraciones de glicerol fueron de 9.2, 8.6 y 11.5 g/L para Flash 10 Plus, 8419 y Flash 1, respectivamente.

El crecimiento de biomasa se determinó en forma indirecta, por pérdida de peso (producción de CO_2). Se observaron perfiles de producción de CO_2 similares para las tres variedades de sorgo estudiadas. Sin embargo, se produjo una mayor cantidad de CO_2 en los ensayos realizados con una etapa de gelatinización previa, lo cual indicó que hubo un crecimiento celular mayor (ver Anexo 6.2).

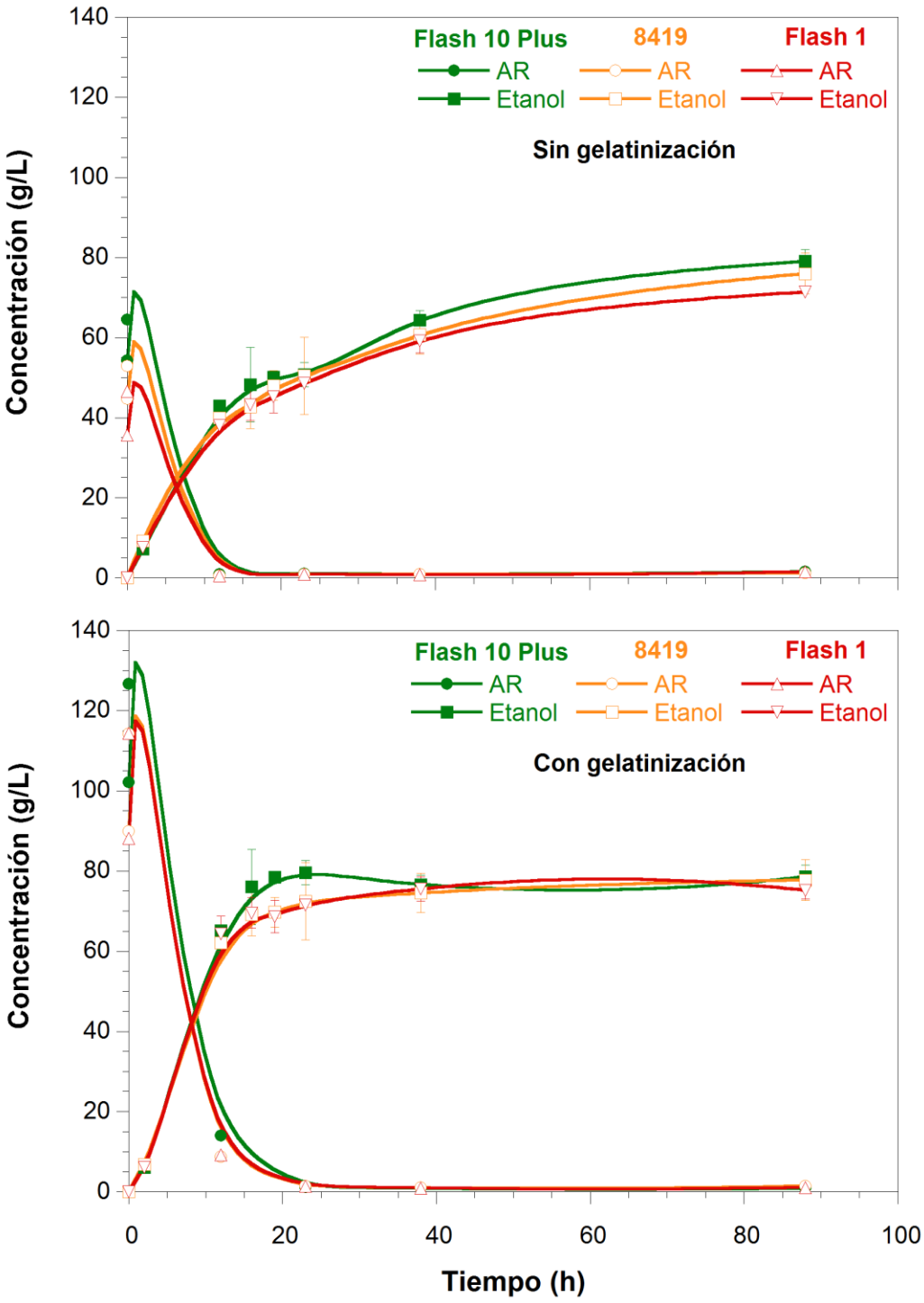

Figura 4.12. Perfiles de fermentación de suspensiones de sorgo con una relación sólido:líquido 1:4. Ensayos con y sin gelatinización. AR: azúcares reductores expresados como glucosa.

Los rendimientos de etanol en base a la cantidad de almidón en la materia prima para los ensayos con una relación sólido:líquido 1:4, estuvieron en el rango 0.38 - 0.40 g/g en los ensayos sin gelatinización y en el rango 0.47 - 0.49 g/g en los ensayos con gelatinización, los cuales corresponden a eficiencias de fermentación de 74.4 - 78.3% y 92.0 - 95.9%, respectivamente (Tabla 4.7).

4.6.3- Ensayos con relación sólido:líquido 1:3, incluyendo remoción de taninos y mezcla de variedades

En los ensayos con relación sólido:líquido 1:3 se realizaron ensayos solo con gelatinización, ya que quedó demostrado en los ensayos previos que dicha etapa mejora considerablemente los rendimientos del proceso. Los perfiles obtenidos se muestra en la Figura 4.13. Se ensayaron las tres variedades y se compararon los resultados con la variedad 8419 (de contenido de taninos intermedio), a la que se le realizó el tratamiento alcalino y con una mezcla de las tres harinas en similar proporción (en masa).

Las concentraciones iniciales de azúcares totales, antes del agregado de AMG y la levadura, fueron de 86.6, 79.3, 84.3 g/L para Flash 10 Plus, 8419 y Flash 1 respectivamente, 98.3 y 92.5 g/L respectivamente para la harina con el tratamiento de remoción de taninos y la mezcla de variedades. Estas concentraciones equivalen a eficiencias de hidrólisis de 43 a 47%.

A tiempo inicial de la SSF, no hubo diferencias en las concentraciones de glucosa y maltosa entre los ensayos: Flash10 Plus 142.7 y 42.9 g/L, 8419 143.2 y 35.8 g/L, Flash 1 125.3 y 42.6 g/L, 8419 con NaOH 149.7 y 42.9 g/L, mezcla de harinas 143.7 y 43.4 g/L. A las 17 horas de fermentación, en todos los ensayos se alcanzaron las concentraciones máximas de etanol, siendo el ensayo con tratamiento de remoción de taninos y el de la mezcla los que obtuvieron los mejores resultados, 86.3 y 76.4 g/L de etanol, respectivamente.

Se observó que a partir de las 40 horas aumentaron las concentraciones de glucosa, principalmente en el caso de las variedades 8419 y Flash 1 y de la mezcla, en menor medida Flash 10 Plus y 8419 con tratamiento, lo que indicaría que hubo una inhibición en la hidrólisis del almidón en las primeras horas de fermentación. Debido al aumento del contenido de

glucosa en el medio se produjo más etanol, obteniéndose a las 68 horas, concentraciones de 106.8, 94.1, 86.8, 83.5 y 89.6 g/L de etanol para 8419 con tratamiento, mezcla, Flash 10 Plus, 8419 y Flash 1, respectivamente. La concentración de glicerol fue de 11.7, 12.3, 12.1, 11.7 y 12.6 g/L para Flash 10 Plus, 8419, Flash 1, 8419 con tratamiento y la mezcla de harinas, respectivamente (Tabla 4.7).

Los rendimientos de etanol obtenidos en base a la cantidad de almidón en la materia prima fueron de 0.44 – 0.51 g/g, pero con un descenso en el rendimiento industrial debido la presencia de azúcares residuales sin fermentar (ver Tabla 4.7).
El rendimiento industrial del ensayo con remoción de taninos fue similar al encontrado en la literatura, entre 390 y 402 L/tonelada (Chuck-Hernández et al., 2011; Vermerris, 2008).

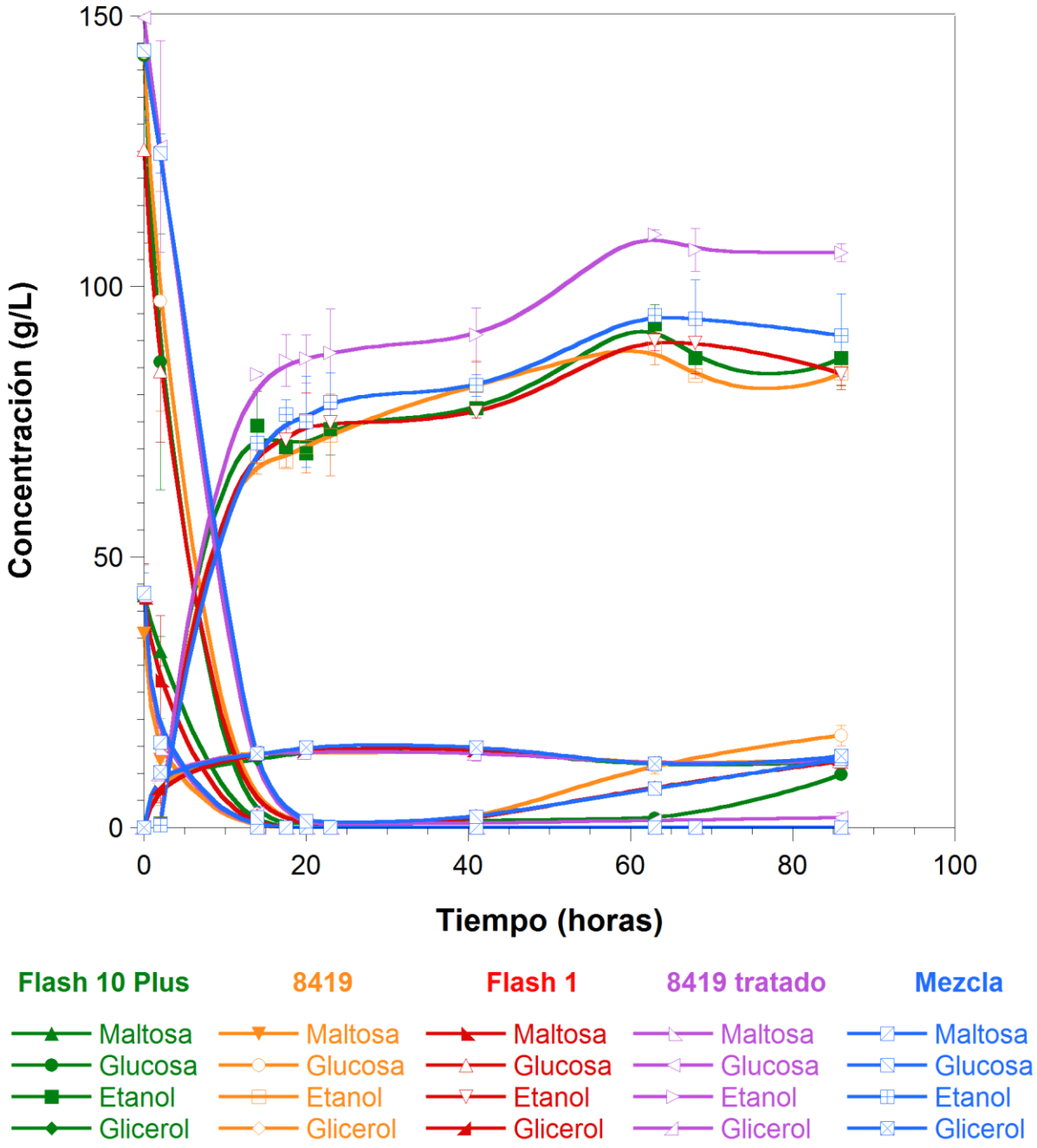

Figura 4.13. Perfiles de fermentación de suspensiones de sorgo con una relación sólido:líquido 1:3. Ensayos con gelatinización.

Tabla 4.7. Parámetros de sacarificación y fermentación simultáneas para las diferentes variedades de sorgo ensayadas.

Variedad	Relación sólido:líquido	Gelatinización	Glucosa teórica (*) (g/L)	Etanol (**) (g/L)	Glicerol (g/L)	$Y_{P/S}$ (***) ($g_{etanol}/g_{glucosa}$)	Eficiencia (%)	Rendimiento industrial (L/t, base seca)
Flash 10 Plus	1:5	No	134	56.9 ± 0.1	7.9 ± 0.4	0.42 ± 0.00	82.2 ± 0.1	332
		Si	134	62.0 ± 1.4	8.8 ± 0.4	0.46 ± 0.01	90.0 ± 2.0	362
	1:4	No	163	64.4 ± 2.7	9.2 ± 0.2	0.40 ± 0.02	78.3 ± 3.2	310
		Si	163	76.6 ± 2.4	11.6 ± 0.3	0.47 ± 0.01	92.0 ± 2.9	369
	1:3	Si	208	86.8 ± 1.1	11.7 ± 0.1	0.44 ± 0.01	86.1 ± 1.0	312
8419	1:5	No	128	57.0 ± 5.7	8.4 ± 0.6	0.44 ± 0.04	86.1 ± 8.8	338
		Si	128	59.8 ± 0.9	8.4 ± 0.0	0.47 ± 0.01	92.0 ± 1.4	355
	1:4	No	155	60.7 ± 3.7	8.6 ± 0.1	0.39 ± 0.02	76.3 ± 4.6	297
		Si	155	74.5 ± 4.9	11.3 ± 0.2	0.48 ± 0.03	93.9 ± 6.1	364
	1:3	Si	208	83.5 ± 0.5	12.0 ± 0.1	0.44 ± 0.00	86.1 ± 0.4	305
		Si(****)	211	106.8 ± 3.95	12.0 ± 0.4	0.51 ± 0.02	100 ± 3.7	390
Flash 1	1:5	No	128	53.5 ± 2.6	8.0 ± 0.2	0.42 ± 0.02	82.2 ± 4.0	316
		Si	128	60.1 ± 0.7	8.0 ± 0.0	0.47 ± 0.01	92.0 ± 1.0	355
	1:4	No	155	59.2 ± 0.2	7.7 ± 0.4	0.38 ± 0.00	74.4 ± 0.3	288
		Si	155	75.6 ± 3.0	11.5 ± 0.3	0.49 ± 0.02	95.9 ± 3.8	368
	1:3	Si	208	89.5 ± 5.6	11.9 ± 0.3	0.46 ± 0.03	90.0 ± 5.3	325
Mezcla 1:1:1	1:3	Si	211	94.1 ± 7.2	11.7 ± 0.0	0.48 ± 0.03	93.9 ± 6.8	341

(*) Glucosa inicial teórica calculada en base al contenido de almidón de la harina de sorgo y suponiendo hidrólisis total.
(**) Corresponde al máximo observado.
(***) $Y_{P/S}$: cantidad de etanol producido por cantidad de glucosa consumido (ver sección 3.7.6).
(****) Tratamiento con NaOH para reducir contenido de taninos.

5- CONCLUSIONES

Las variedades de sorgo comerciales ensayadas mostraron un contenido similar de almidón (68 - 71%, base seca), y un contenido de taninos de < 0.2% (Flash 10 Plus), 1.1 % (8419) y 2.0 % (Flash 1).

Las variedades de mayor nivel de taninos mostraron una menor eficiencia de hidrólisis enzimática del almidón, usando preparaciones comerciales de α-amilasa y AMG. Sin embargo un tratamiento previo de gelatinización (calentamiento a 95°C, 15 min) permitió mejorar la eficiencia para todas las variedades, sin diferencias significativas entre ellas (eficiencia 87 - 88%).

El comportamiento reológico durante la gelatinización e hidrólisis de las tres variedades de sorgo ensayadas fue similar al encontrado por otros autores. La temperatura de empastamiento para las tres variedades (74 - 76°C) fue similar a la temperatura óptima de la amilasa comercial utilizada (75°C). El pico de viscosidad observado en los ensayos de hidrólisis con gelatinización fue algo menor para la variedad de bajo tanino. No se observaron diferencias en el perfil de viscosidad *vs* tiempo de hidrólisis, una vez alcanzado dicho pico.

El uso de pepsina junto con las α-amilasa y AMG no mostró una mejora del desempeño de la hidrólisis enzimática del almidón.

Ensayos de hidrólisis enzimática y fermentación simultáneas para diferentes relaciones sólido a líquido de suspensiones de harina de sorgo a agua mostraron concentraciones finales de etanol y rendimientos de etanol similares para las tres variedades ensayadas. El tratamiento de gelatinización previo mejoró el rendimiento de etanol. Un aumento de la relación sólido a líquido de 1:5 a 1:4, con gelatinización previa, permitió aumentar la concentración final de etanol de 60 - 62 g/L a 75 - 77 g/L, mostrando similares niveles de rendimiento global (0.46 - 0.49 g de etanol por gramo de glucosa equivalente consumida), de eficiencia (92 a 96%) y de rendimiento industrial (355 - 368 L/t de sorgo, base seca). Un aumento en la relación de sólido a líquido a 1:3 permitió aumentar la concentración de etanol (84 - 90 g/L), pero con menor rendimiento industrial (305 - 325 t/L), debido a una transformación incompleta del almidón en etanol.

Los pretratamientos realizados permitieron remover el contenido de taninos en un 81-94%, siendo más efectivo el tratamiento alcalino con hidróxido de sodio. La remoción de taninos en la variedad 8419 mostró un mejor desempeño de la hidrólisis y fermentación simultáneas, lo cual sugiere que podría haber contribuido a una despolimerización parcial o pérdida de cristalinidad del almidón durante el pretratamiento, mejorando la extensión de la transformación, alcanzándose una eficiencia global del 100% y un rendimiento industrial de 390 L/t de sorgo (base seca)

Los ensayos de hidrólisis y fermentación simultáneas con una mezcla de harina de las tres variedades dieron resultados similares al uso de cada variedad individualmente.

El requerimiento de la gelatinización previa, particularmente en las variedades de sorgo con mayor contenido de taninos, ponen en evidencia restricciones para su uso en procesos de licuefacción y sacarificación de baja temperatura.

En síntesis, para las variedades ensayadas de sorgo no se encontraron diferencias importantes de comportamiento o desempeño, salvo un mayor impacto de la

gelatinización previa en la eficiencia de la hidrólisis enzimática y un mayor pico de viscosidad para las variedades de mayor contenido de taninos.

El rendimiento industrial observado fue similar a lo reportado por otros autores.

BIBLIOGRAFÍA

Ali, N., Eltinay, A., Elhalifa, A., Salih, O., & Yousif, N. (2009). Effect of alkaline pretreatment and cooking on protein fractions of a high-tannin sorghum cultivar. *Food Chemistry*, *114*(2), 646–648. doi:10.1016/j.foodchem.2008.10.001

ALUR. (2013). *ALUR - Alcoholes del Uruguay S.A.* http://www.alur.com.uy/articulos/2013/p-15-2-13.html (acceso agosto 2014).

ALUR. (2014a). *ALUR - Alcoholes del Uruguay S.A.* http://www.alur.com.uy/bellaunion.html (acceso agosto 2014)

ALUR. (2014b). *ALUR - Alcoholes del Uruguay S.A.* http://www.alur.com.uy/articulos/2014/p-21-3-14.html (acceso agosto 2014)

Bai, F. W., Anderson, W. A., & Moo-Young, M. (n.d.). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, *26*(1), 89–105. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.09.002

Beta, T., Rooney, L. W., Marovatsanga, L. T., & Taylor, J. R. N. (2000). Effect of Chemical Treatments on Polyphenols and Malt Quality in Sorghum. *Journal of Cereal Science*, *31*(3), 295–302. doi:10.1006/jcrs.2000.0310

Breisha, G. Z. (2010). Production of 16% ethanol from 35% sucrose. *Biomass and Bioenergy*, *34*(8), 1243–1249. doi:10.1016/j.biombioe.2010.03.017

Bullard, R. W., & York, J. O. (1985). *Progress in Plant Breeding–1*. *Progress in Plant Breeding–1* (pp. 193–222). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-407-00780-2.50012-6

Chuck-Hernández, C., Pérez-Carrillo, E., Heredia-Olea, E., & Serna-Saldívar, S. O. (2011). Sorgo como un cultivo multifacético para la producción de bioetanol en México: Tecnologías, avances y áreas de oportunidad. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, *10*(3), 529–549.

Cooke, D., & Gidley, M. J. (1992). Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinisation: Origin of the enthalpic transition. *Carbohydrate Research*, *227*(6), 103–112.

Daiber, K. H., & Taylor, J. R. N. (1982). Effects of formaldehyde on protein extraction and quality of high- and low-tannin sorghum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *30*(1), 70–72. doi:10.1021/jf00109a014

De Oliveira, G. S., Teresinha, T., Andrade, R., & Eliane, M. (2009). Animal Feed Science and Technology Fermentative characteristics and aerobic stability of sorghum silages containing different tannin levels, *154*, 1–8. doi:10.1016/j.anifeedsci.2009.07.003

Du Preez, J. C., de Jong, F., Botes, P. J., & Lategan, P. M. (1985). Fermentation alcohol from grain sorghum starch. *Biomass*, *8*(2), 101–117. doi:10.1016/0144-4565(85)90021-6

Fu, Z., Wang, L., Li, D., & Adhikari, B. (2012). Effects of partial gelatinization on structure and thermal properties of corn starch after spray drying. *Carbohydrate Polymers*, *88*(4), 1319–1325. doi:10.1016/j.carbpol.2012.02.010

Glazer, A. N., & Nikaido, H. (2007). *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology*.

Hagerman, A. E. (2002a). Condensed Tannin Structural Chemistry, *2*, 1–8.

Hagerman, A. E. (2002b). *The tannin handbook*.

Hasjim, J., Li, E., & Dhital, S. (2013). Milling of rice grains: effects of starch/flour structures on gelatinization and pasting properties. *Carbohydrate Polymers*, *92*(1), 682–90. doi:10.1016/j.carbpol.2012.09.023

Iida, Y., Tuziuti, T., Yasui, K., Towata, A., & Kozuka, T. (2008). Control of viscosity in starch and polysaccharide solutions with ultrasound after gelatinization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *9*(2), 140–146. doi:10.1016/j.ifset.2007.03.029

JA di Rienzo, F Casanoves, Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. (2013). *Infostat - Sofware estadístico. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina*. *Universidad Nacional de Córdoba, Argentina*.

Jane, J. (2009). *Starch*. *Starch* (pp. 193–236). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-746275-2.00006-9

Kwiatkowski, J. R., McAloon, A. J., Taylor, F., & Johnston, D. B. (2006). Modeling the process and costs of fuel ethanol production by the corn dry-grind process. *Industrial Crops and Products*, *23*(3), 288–296. doi:10.1016/j.indcrop.2005.08.004

Lareo, C., Ferrari, M. D., Guigou, M., Fajardo, L., Larnaudie, V., Ramírez, M. B., & Martínez-Garreiro, J. (2013). Evaluation of sweet potato for fuel bioethanol production: hydrolysis and fermentation. *SpringerPlus*, *2*(1), 493. doi:10.1186/2193-1801-2-493

Lee, J. S., Kumar, R. N., Rozman, H. D., & Azemi, B. M. N. (2005). Pasting, swelling and solubility properties of UV initiated starch-graft-poly(AA). *Food Chemistry*, *91*(2), 203–211. doi:10.1016/j.foodchem.2003.08.032

Ley18.195. (2007). *Ley 18.195. Agrocombustibles. Uruguay*. http://www.parlamento.gub.uy/leyes/AccesoTextoLey.asp?Ley=18195&Anchor (acceso agosto 2014)

Mahasukhonthachat, K., Sopade, P. A., & Gidley, M. J. (2010a). Kinetics of starch digestion and functional properties of twin-screw extruded sorghum. *Journal of Cereal Science*, *51*(3), 392–401. doi:10.1016/j.jcs.2010.02.008

Mahasukhonthachat, K., Sopade, P. A., & Gidley, M. J. (2010b). Kinetics of starch digestion in sorghum as affected by particle size. *Journal of Food Engineering*, *96*(1), 18–28. doi:10.1016/j.jfoodeng.2009.06.051

Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, *31*(3), 426–428. doi:10.1021/ac60147a030

Montiel, M. D., & Elizalde, J. C. (2004). *Factores que afectan la utilización ruminal del grano de sorgo en vacunos*. *Rev. Arg. Prod. Anim.* http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_reservas/reservas_granos/13-montielyElizalde.pdf (acceso agosto 2014)

Morrison, W. R., & Laignelet, B. (1983). An improved colorimetric procedure for determining apparent and total amylose in cereal and other starches. *Journal of Cereal Science*, *1*(1), 9–20. doi:10.1016/S0733-5210(83)80004-6

Muetzel, S., & Becker, K. (2006). Extractability and biological activity of tannins from various tree leaves determined by chemical and biological assays as affected by drying procedure. *Animal Feed Science and Technology*, *125*(1-2), 139–149. doi:10.1016/j.anifeedsci.2005.05.018

Mullins, J. T., & Lee, J. H. (1991). Interactions of tannins with enzymes: A potential role in the reduced rate of ethanol fermentation from high-tannin biomass. *Biomass and Bioenergy*, *1*(6), 355–361. doi:10.1016/0961-9534(91)90016-6

Mussatto, S. I., Dragone, G., Guimarães, P. M. R., Silva, J. P. A., Carneiro, L. M., Roberto, I. C., … Teixeira, J. A. (2010). Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnology Advances*, *28*(6), 817–30. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.07.001

Naguleswaran, S., Vasanthan, T., Hoover, R., & Bressler, D. (2014). Amylolysis of amylopectin and amylose isolated from wheat, triticale, corn and barley starches. *Food Hydrocolloids*, *35*(Complete), 686–693.

Niba, L. (2006). *Handbook of Food Science, Technology, and Engineering, Volume 1, Chapter 3*.

OCDE-FAO. (2013). *OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2013*. Universidad Autónoma Chapingo. doi:10.1787/agr_outlook-2013-es

Peralta-Contreras, M., Chuck-Hernandez, C., Perez-Carrillo, E., Bando-Carranza, G., Vera-Garcia, M., Gaxiola-Cuevas, N., … Serna-Saldivar, S. O. (2013). Fate of free amino nitrogen during liquefaction and yeast fermentation of maize and sorghums differing in endosperm texture. *Food and Bioproducts Processing*, *91*(1), 46–53. doi:10.1016/j.fbp.2012.08.007

Perez-Carrillo, E., Serna-Saldivar, S. O., Chuck-Hernandez, C., & Cortes-Callejas, M. L. (2012). Addition of protease during starch liquefaction affects free amino nitrogen, fusel alcohols and ethanol production of fermented maize and whole and decorticated sorghum mashes. *Biochemical Engineering Journal*, *67*, 1–9. doi:10.1016/j.bej.2012.04.010

Price, M. L., Van Scoyoc, S., & Butler, L. G. (1978). A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *26*(5), 1214–1218. doi:10.1021/jf60219a031

RFA. (2013). *World Fuel Ethanol Production | RFA: Renewable Fuels Association*. http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production (acceso julio 2014)

Rooney, L. W., & Pflugfelder, R. L. (1986). Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn. *Journal of Animal Science*, *63*(5), 1607–23.

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., & Sluiter, J. (2008). *Determination of ash in biomass. Laboratory Analytical Procedure. NREL*. *National Renewable Energy Laboratory*.

Sluiter, A., & Sluiter, J. (2008). *Determination of starch in solid biomass samples by HPLC. Laboratory Analytical Procedure. NREL*. *National Renewable Energy Laboratory*.

Tester, R. F., Karkalas, J., & Qi, X. (2004). Starch—composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, *39*(2), 151–165. doi:10.1016/j.jcs.2003.12.001

Vermerris, W. (2008). *Genetic Improvement of Bioenergy Crops*. (W. Vermerris, Ed.). New York, NY: Springer New York. doi:10.1007/978-0-387-70805-8

Vohra, M., Manwar, J., Manmode, R., Padgilwar, S., & Patil, S. (2014). Bioethanol production: Feedstock and current technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *2*(1), 573–584. doi:10.1016/j.jece.2013.10.013

Wong, J. H., Lau, T., Cai, N., Singh, J., Pedersen, J. F., Vensel, W. H., … Buchanan, B. B. (2009). Digestibility of protein and starch from sorghum (Sorghum bicolor) is linked to biochemical and structural features of grain endosperm. *Journal of Cereal Science*, *49*(1), 73–82. doi:10.1016/j.jcs.2008.07.013

Wu, X., Zhao, R., Bean, S. R., Seib, P. A., McLaren, J. S., Madl, R. L., … Wang, D. (2007). Factors Impacting Ethanol Production from Grain Sorghum in the Dry-Grind Process 1. *Cereal Chemistry*, *84*(2), 130–136. doi:10.1094/CCHEM-84-2-0130

Wu, X., Zhao, R., Wang, D., Bean, S. R., Seib, P. A., Tuinstra, M. R., … O'Brien, A. (2006). Effects of Amylose, Corn Protein, and Corn Fiber Contents on Production of Ethanol from Starch-Rich Media 1. *Cereal Chemistry*, *83*(5), 569–575. doi:10.1094/CC-83-0569

Yun, S.-H., & Matheson, N. K. (1990). Estimation of Amylose Content of Starches after Precipitation of Amylopectin by Concanavalin-A. *Starch - Stärke*, *42*(8), 302–305. doi:10.1002/star.19900420805

Zhang, G., & Hamaker, B. R. (1998). Low α-Amylase Starch Digestibility of Cooked Sorghum Flours and the Effect of Protein 1. *Cereal Chemistry*, *75*(5), 710–713. doi:10.1094/CCHEM.1998.75.5.710

Zhao, R. (2008). *Impact of Sorghum Proteins on Ethanol Fermentation and Investigation of Novel Methods to Evaluate Fermentation Quality*. Tesis de doctorado, Department of Biological and Agricultural Engineering, College of Engineering, Kansas State University.

Zhao, R., Bean, S., Wu, X., & Wang, D. (2008). Assessing Fermentation Quality of Grain Sorghum for Fuel Ethanol Production Using Rapid Visco-Analyzer. *Cereal Chemistry*, *85*(6), 830–836. doi:10.1094/CCHEM-85-6-0830

6- ANEXOS

6.1- Análisis estadístico

6.1.1- Fermentación 1.3

Tiempo 17 horas

Cuadro de análisis de la varianza (SC tipo III)

F.V	S.C	Grados de libertad	CM	F	p-valor
Modelo	429.57	4	107.39	14.29	0.061
Ensayo	429.57	4	107.39	14.29	0.061
Error	37.58	5	7.52		
Total	467.15	9			

Test de Tukey. Alfa=0.05. DMS=10.99810
Error=7.5166. gl:5.

Ensayo	Medias	N	E.E.	
8419 (NaOH)	86.32	2	1.94	A
Mezcla 1:1:1	76.37	2	1.94	A
Flash1	71.72	2	1.94	B
Flash10Plus	70.38	2	1.94	B
8419	67.65	2	1.94	B

Tiempo 63 horas

Cuadro de análisis de la varianza (SC tipo III)

F.V	S.C	Grados de libertad	CM	F	p-valor
Modelo	566.26	4	141.56	26.03	0.0015
Ensayo	566.26	4	141.56	26.03	0.0015
Error	27.19	5	5.44		
Total	593.45	9			

Test de Tukey. Alfa=0.05. DMS=9.35477
Error=5.4382. gl:5.

Ensayo	Medias	N	E.E.	
8419 (NaOH)	109.60	2	1.65	A
Mezcla 1:1:1	94.67	2	1.65	B
Flash10Plus	93.00	2	1.65	B
Flash1	90.07	2	1.65	B
8419	88.54	2	1.65	B

6.1.2- Fermentación 1.4

Ensayos con Gelatinización

Tiempo 38 horas

Cuadro de análisis de la varianza (SC tipo III)

F.V	S.C	Grados de libertad	CM	F	p-valor
Modelo	4.37	2	2.18	0.17	0.8506
Ensayo	4.37	2	2.18	0.17	0.8506
Error	38.36	3	2.79		
Total	42.73	5			

Test de Tukey. Alfa=0.05. DMS=14.94279
Error=12.7870. gl:3.

Ensayo	Medias	N	E.E.	
Flash10Plus	76.62	2	2.53	A
Flash1	75.59	2	2.53	A
8419	74.53	2	2.53	A

Ensayos sin Gelatinización

Tiempo 38horas

Cuadro de análisis de la varianza (SC tipo III)

F.V	S.C	Grados de libertad	CM	F	p-valor
Modelo	28.54	2	14.27	2.05	0.2742
Ensayo	28.54	2	14.27	2.05	0.2742
Error	20.84	3	6.95		
Total	49.38	5			

Test de Tukey. Alfa=0.05. DMS=11.01497
Error=6.9482. gl:3.

Ensayo	Medias	N	E.E.	
Flash10Plus	64.40	2	1.86	A
8419	60.74	2	1.86	A
Flash1	59.20	2	1.86	A

Variedad F10Plus con y sin gelatinización

Cuadro de análisis de la varianza (SC tipo III)

F.V	S.C	Grados de libertad	CM	F	p-valor
Modelo	149.33	1	149.33	22.95	0.0409
Ensayo	149.33	1	149.33	22.95	0.0409
Error	13.01	2	6.51		
Total	162.34	3			

Test de Tukey. Alfa=0.05. DMS=10.96566
Error=6.5064. gl:2.

Ensayo	Medias	N	E.E.	
Con gelatinización	76.62	2	1.80	A
Sin gelatinización	64.40	2	1.80	B

Variedad 8419 con y sin gelatinización

Cuadro de análisis de la varianza (SC tipo III)

F.V	S.C	Grados de libertad	CM	F	p-valor
Modelo	190.16	1	190.16	10.22	0.0855
Ensayo	190.16	1	190.16	10.22	0.0855
Error	37.20	2	18.60		
Total	227.37	3			

Test de Tukey. Alfa=0.05. DMS=18.54142
Error=18.6020 gl:2.

Ensayo	Medias	N	E.E.	
Con gelatinización	74.53	2	3.05	A
Sin gelatinización	60.74	2	3.05	A

Variedad Flash1 con y sin gelatinización

Cuadro de análisis de la varianza (SC tipo III)

F.V	S.C	Grados de libertad	CM	F	p-valor
Modelo	268.63	1	268.63	59.77	0.0163
Ensayo	268.63	1	268.63	59.77	0.0163
Error	8.99	2	4.49		
Total	277.62	3			

Test de Tukey. Alfa=0.05.
Error=gl:2.

Ensayo	Medias	N	E.E.	
Con gelatinización	75.59	2	1.50	A
Sin gelatinización	59.20	2	1.50	B

6.1.3- Fermentación 1.5

Ensayos con Gelatinización

Tiempo 38horas

Cuadro de análisis de la varianza (SC tipo III)

F.V	S.C	Grados de libertad	CM	F	p-valor
Modelo	6.10	2	3.05	2.94	0.1961
Ensayo	6.10	2	3.05	2.94	0.1961
Error	3.11	3	1.04		
Total	9.21	5			

Test de Tukey. Alfa=0.05. DMS=4.25297
Error=1.0358. gl:3.

Ensayo	Medias	N	E.E.	
Flash10Plus	62.04	2	0.72	A
Flash1	60.07	2	0.72	A
8419	56.76	2	0.72	A

Ensayos sin Gelatinización

Tiempo 33 horas

Cuadro de análisis de la varianza (SC tipo III)

F.V	S.C	Grados de libertad	CM	F	p-valor
Modelo	15.71	2	7.85	0.59	0.6081
Ensayo	15.71	2	7.85	0.59	0.6081
Error	39.94	3	13.31		
Total	55.65	5			

Test de Tukey. Alfa=0.05. DMS=15.24757
Error=13.3139. gl:3.

Ensayo	Medias	N	E.E.	
8419	56.99	2	2.58	A
Flash10Plus	56.85	2	2.58	A
Flash1	53.49	2	2.58	A

Variedad Flash10 Plus con y sin gelatinización

Cuadro de análisis de la varianza (SC tipo III)

F.V	S.C	Grados de libertad	CM	F	p-valor
Modelo	56.40	1	56.40	21.85	0.0429
Ensayo	56.40	1	56.40	21.85	0.0429
Error	5.16	2	2.58		
Total	61.56	3			

Test de Tukey. Alfa=0.05. DMS=6.90735
Error=2.5816 gl:2.

Ensayo	Medias	N	E.E.	
Con gelatinización	64.36	2	1.14	A
Sin gelatinización	56.85	2	1.14	B

Variedad 8419 con y sin gelatinización

Cuadro de análisis de la varianza (SC tipo III)

F.V	S.C	Grados de libertad	CM	F	p-valor
Modelo	19.54	1	19.54	1.15	0.3952
Ensayo	19.54	1	19.54	1.15	0.3952
Error	33.88	2	16.94		
Total	53.42	3			

Test de Tukey. Alfa=0.05. DMS=17.69386
Error=16.9402 gl:2.

Ensayo	Medias	N	E.E.	
Con gelatinización	61.41	2	2.91	A
Sin gelatinización	56.99	2	2.91	A

Variedad Flash1 con y sin gelatinización

Cuadro de análisis de la varianza (SC tipo III)

F.V	S.C	Grados de	CM	F	p-valor

		libertad			
Modelo	67.82	1	67.82	18.42	0.0502
Ensayo	67.82	1	67.82	18.42	0.0502
Error	7.36	2	3.68		
Total	75.18	3			

Test de Tukey. Alfa=0.05. DMS=8.24808
Error=3.6811 gl:2.

Ensayo	**Medias**	**N**	**E.E.**	
Con gelatinización	61.72	2	1.36	A
Sin gelatinización	53.49	2	1.36	A

6.1.4- Tratamientos de remoción de taninos

Tratamiento sobre el grano 8419

Cuadro de análisis de la varianza (SC tipo III)

F.V	S.C	Grados de libertad	CM	F	p-valor
Modelo	1.58	2	0.79	51.68	0.0005
Ensayo	1.58	2	0.79	51.68	0.0005
Error	0.08	5	0.02		
Total	1.66	7			

Test de Tukey. Alfa=0.05. DMS=0.35881
Error=0.0153. gl:5.

Ensayo	Medias	N	E.E.	
Agua Destilada	1.02	4	0.06	A
Formaldehido	0.20	2	0.09	B
NaOH	0.07	2	0.09	B

Tratamiento sobre el grano Flash1

Cuadro de análisis de la varianza (SC tipo III)

F.V	S.C	Grados de libertad	CM	F	p-valor
Modelo	3.76	2	1.88	122.09	0.0001
Ensayo	3.76	2	1.88	122.09	0.0001
Error	0.08	5	0.02		
Total	3.83	7			

Test de Tukey. Alfa=0.05. DMS=0.35957
Error=0.0154. gl:5.

Ensayo	Medias	N	E.E.	
Agua Destilada	1.49	4	0.06	A
Formaldehido	0.15	2	0.09	B
NaOH	0.09	2	0.09	B

Tratamiento sobre la harina 8419

Cuadro de análisis de la varianza (SC tipo III)

F.V	S.C	Grados de libertad	CM	F	p-valor
Modelo	0.99	1	0.99	80.17	0.0009
Ensayo	0.99	1	0.99	80.17	0.0009
Error	0.05	4	0.01		
Total	1.04	5			

Test de Tukey. Alfa=0.05. DMS=0.25893
Error=0.0123. gl:4.

Ensayo	Medias	N	E.E.	
Agua Destilada	0.86	4	0.06	A
Formaldehido	0.00	2	0.08	B

Tratamiento sobre la harina Flash1

Cuadro de análisis de la varianza (SC tipo III)

F.V	S.C	Grados de libertad	CM	F	p-valor
Modelo	1.74	1	1.74	17424	0.0001
Ensayo	1.74	1	1.74	17424	0.0001
Error	2E-4	2	1E-4		
Total	1.74	3			

Test de Tukey. Alfa=0.05. DMS=0.04299
Error=0.0001 gl:2.

Ensayo	Medias	N	E.E.	
Agua Destilada	1.36	2	0.01	A
Formaldehido	0.04	2	0.01	B

6.1.5- Rendimientos de hidrólisis en los ensayos de licuefacción en el reómetro

Comparación de las tres variedades sin gelatinización

Cuadro de análisis de la varianza (SC tipo III)

F.V	S.C	Grados de libertad	CM	F	p-valor
Modelo	2330.60	2	1165.30	980.55	0.0001
Ensayo	2330.60	2	1165.30	980.55	0.0001
Error	3.57	3	1.19		
Total	2334.17	5			

Test de Tukey. Alfa=0.05. DMS=4.55546
Error= 1.1884. gl:3.

Variedad	Medias	N	E.E.	
Flash10Plus	50.07	2	0.77	A
8419	13.39	2	0.77	B
Flash1	4.54	2	0.77	C

Comparación de las tres variedades con gelatinización

Cuadro de análisis de la varianza (SC tipo III)

F.V	S.C	Grados de libertad	CM	F	p-valor
Modelo	17.05	2	8.52	455.04	0.0002
Ensayo	17.05	2	8.52	455.04	0.0002
Error	0.06	3	0.02		
Total	17.11	5			

Test de Tukey. Alfa=0.05. DMS=0.57195
Error= 0.0187 gl:3.

Variedad	Medias	N	E.E.	
Flash10Plus	47.99	2	0.10	A
8419	47.90	2	0.10	A
Flash1	44.37	2	0.10	B

Flash 10 Plus

Cuadro de análisis de la varianza (SC tipo III)

F.V	S.C	Grados de libertad	CM	F	p-valor
Modelo	4.31	1	4.31	2.40	0.2611
Ensayo	4.31	1	4.31	2.40	0.2611
Error	3.58	2	1.79		
Total	7.89	3			

Test de Tukey. Alfa=0.05. DMS=5.75213
Error= 1.7903. gl:2.

Ensayo	Medias	N	E.E.	
Sin gelatinización	50.07	2	0.95	A
Con gelatinización	47.99	2	0.95	A

8419

Cuadro de análisis de la varianza (SC tipo III)

F.V	S.C	Grados de libertad	CM	F	p-valor
Modelo	1190.94	1	1190.94	119094.01	<0.0001
Ensayo	1190.94	1	1190.94	119094.01	<0.0001
Error	0.02	2	0.01		
Total	1190.96	3			

Test de Tukey. Alfa=0.05. DMS=0.42990
Error= 0.0100. gl:2.

Ensayo	Medias	N	E.E.	
Con gelatinización	47.90	2	0.07	A
Sin gelatinización	13.39	2	0.07	B

Flash 1

Cuadro de análisis de la varianza (SC tipo III)

F.V	S.C	Grados de libertad	CM	F	p-valor
Modelo	1586.43	1	1586.43	152541.24	<0.0001
Ensayo	1586.43	1	1586.43	152541.24	<0.0001
Error	0.02	2	0.01		
Total	1586.45	3			

Test de Tukey. Alfa=0.05. DMS=0.43841
Error= 0.0104. gl:2.

Ensayo	Medias	N	E.E.	
Con gelatinización	44.37	2	0.07	A
Sin gelatinización	4.54	2	0.07	B

6.2- Producción de CO_2

6.2.1 Producción de CO_2 de la SSF con relación 1:3

En la Figura 6.1 se muestra el perfil de producción de CO_2, expresado como gramos de CO_2/ gramo de azúcares, vs. tiempo, de la SSF con relación 1:3 para las variedades Flash 10 Plus, 8419, Flash 1, 8419 con tratamiento de remoción de taninos y la mezcla de variedades.

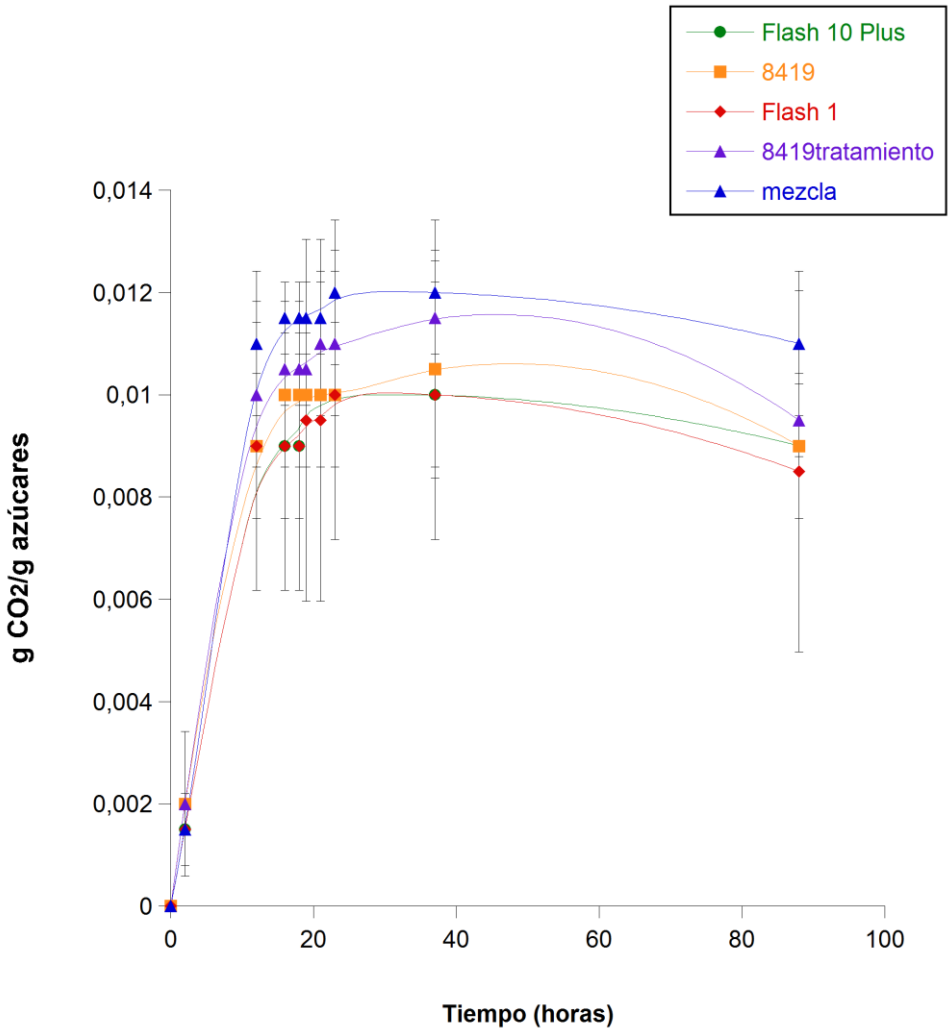

Figura 6.1 Perfil de producción de CO_2 de la SSF con relación 1:3.

6.2.2 Producción de CO_2 de la SSF con relación 1.4

En la Figura 6.2 se muestra el perfil de producción de CO_2, expresado como gramos de CO_2/ gramo de azúcares, vs. tiempo de la SSF con relación 1:4 para las variedades Flash 10 Plus, 8419 y Flash 1, con gelatinización y sin gelatinización.

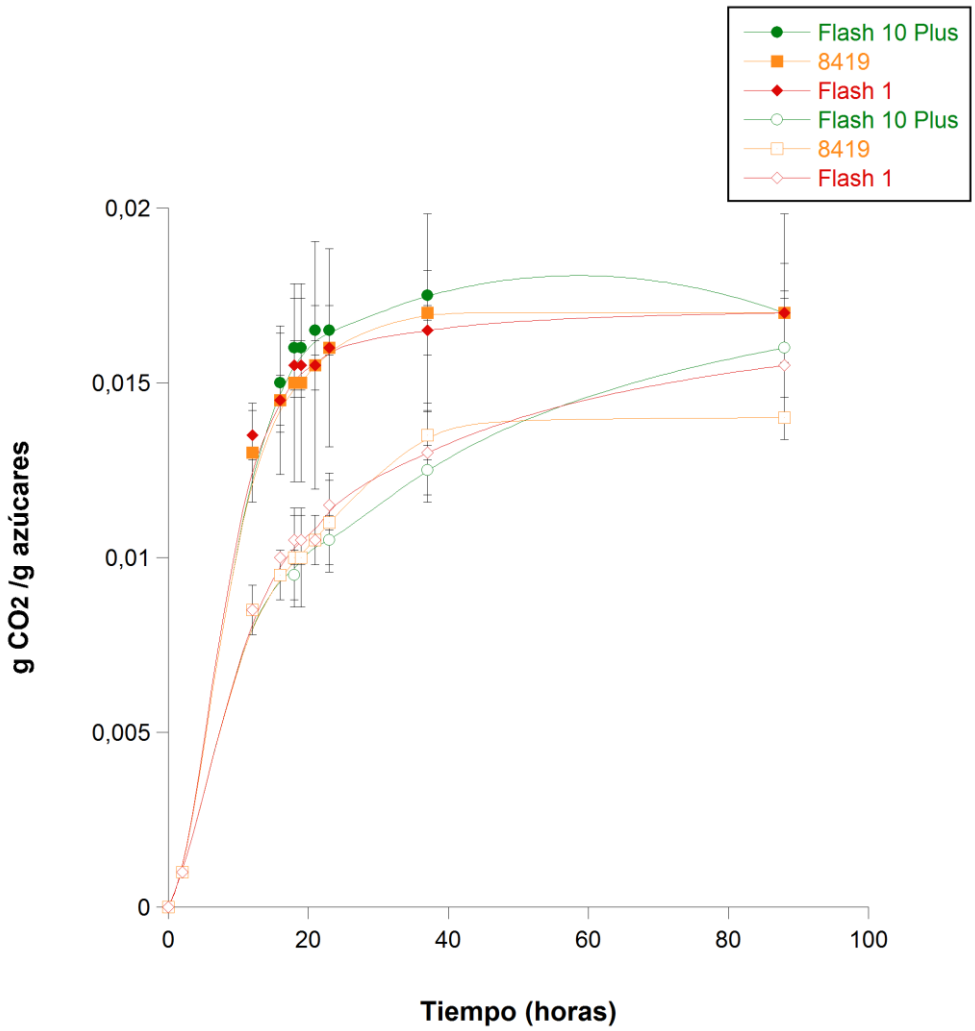

Figura 6.2 Perfil de producción de CO_2 de la SSF con relación 1:4. Los símbolos llenos indican que el ensayo se realizó con una etapa de gelatinización previa y los símbolos vacíos sin gelatinización.