

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS
SUPERIORES DE MONTERREY

CAMPUS MONTERREY

DIVISION DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA

PROGRAMA DE GRADUADOS EN INGENIERIA



TECNOLÓGICO
DE MONTERREY.

OBTENCION DE JARABES FRUCTOSADOS
A PARTIR DE ALMIDON DE DOS TIPOS
DE SORGO (*Sorghum bicolor*)

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA

OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA

POR

BALTAZAR AGUILASOCHO LEYVA

MONTERREY, N. L.

FEBRERO DE 2004

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MONTERREY

CAMPUS MONTERREY
DIVISIÓN DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
PROGRAMA DE GRADUADOS EN INGENIERIA



**TECNOLÓGICO
DE MONTERREY.®**

**OBTENCIÓN DE JARABES FRUCTOSADOS A PARTIR DE
ALMIDÓN DE DOS TIPOS DE SORGO (*Sorghum bicolor*)**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA
POR

BALTAZAR AGUILASOCHO LEYVA

MONTERREY, NL FEBRERO 2004

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Baltazar y Jesús Elaine, por apoyarme en todo momento y por demostrarme su amor y cariño.

A mis abuelos, Pedro y Camerina, y Enedina, por ser ejemplos a seguir y por el cariño que siempre me han profesado.

A mis hermanas Elayne y Aime por quererme y hacerme sentir muy bien en todo momento.

A toda mi familia por mantenernos unidos y así sentirme apoyado y querido por todos.

A mis amigos de Monterrey, Chuy, Beno y Edgardo (menos por mandil) y a mis amigos de Sinaloa, Juanpe, Nelson, Francisco, Chuy, Alfredo y Campeón por ayudarme a salir de la monotonía de la escuela.

A mis amigos de Sinaloa, Juanpe, Nelson, Francisco, Chuy, Alfredo y Campeón por apoyarme.

A Reelena y Miguel, por brindarme su amistad y ayudarme a hacer mas placentera mi estancia en Monterrey.

A mis compañeros de maestría: Alex, Jorge, Helena, Nidia, Osear y Benito, por su colaboración y disposición en los momentos en los que los necesité, además por hacerme agradable y más digerible la maestría.

Al Dr. Mario Álvarez por su tiempo, disposición y su GRAN apoyo en la tesis, además de su gran optimismo en los momentos más difíciles de la maestría.

Al Dr. Sergio Serna por permitirme trabajar con el.

A la Dra. Rebeca Romero y a la rmg. Clara Domínguez, por su aporte en el análisis de los resultados estadísticos.

INDICE

	Página
Abreviaturas	i
Índice de figuras	ii
Índice de tablas	iv
1. INTRODUCCION	1
2. LITERATURA REVISADA	4
2.1 Almidón	4
2.1.1 Propiedades fisicoquímicas del almidón	5
2.1.2 Estructura de almidones	6
2.1.3 Sorgo	7
2.1.4 Almidón de sorgo	10
2.2 Fuentes de obtención de almidón	11
2.3 Proceso de obtención de almidón	14
2.4 Calidad de los almidones	15
2.5 Producción de jarabes	16
2.5.1 Hidrólisis ácida	17
2.5.2 Hidrólisis enzimática	17
2.5.2.1 Licuefacción	18
2.5.2.2 Sacarificación	18
2.5.2.3 Refinación	20
2.5.2.4 Isomerización	20
2.6 Cinética enzimática	21
3. MATERIALES Y METODOS	23
3.1 Materia prima	23
3.1.1 Análisis químico	24
3.1.2 Propiedades físicas	24
3.2 Molienda húmeda de maíz y sorgo	24
3.2.1 Remojo	25
3.2.2 Molienda	25
3.2.3 Separación de fracciones	26
3.2.4 Secado	26
3.2.5 Calidad de los almidones	28
3.2.5.1 Color de los almidones	28
3.3 Conversión enzimática de almidón a jarabes fructosados	29
3.3.1 Licuefacción	30
3.3.2 Sacarificación	30

3.3.3 Refinación	31
3.3.4 Isomerización	32
3.4 Determinación de características de los jarabes	34
3.4.1 Contenido de glucosa	34
3.4.2 Grados Brix	35
3.4.3 Color del jarabe	35
3.5 Modelación	35
3.5.1 Modelación sacarificación	35
3.5.2 Modelación en isomerización	36
3.6 Análisis estadístico para los datos experimentales	37
4. RESULTADOS Y DISCUSION	38
4.1 Análisis químico proximal de los granos.	38
4.2 Análisis de propiedades físicas de los granos	39
4.3 Rendimiento de fracciones de molienda húmeda	40
4.3.1 Grado de refinación de los almidones	42
4.3.1.1 Contenido de proteína del almidón	43
4.3.1.2 Contenido de ceniza del almidón	45
4.3.1.3 Color de los almidones	45
4.4 Conversión enzimática de almidón a jarabes fructosados	46
4.4.1 Licuefacción	47
4.4.2 Sacarificación	48
4.4.3 Refinación	59
4.4.3.1 Centrifugación	59
4.4.3.2 Filtrado secuencial a través de columnas de carbón activado, resina aniónica y resina catiónica	60
4.4.4 Isomerización	61
4.4.5 Concentración	67
4.5 Rendimientos globales	68
5. CONCLUSIONES	70
6. RESUMEN	73
7. BIBLIOGRAFIA	76
8. ANEXO	81

ABREVIATURAS

A.A.C.C American Association of Cereal (Asociación Americana de Químicos de cereales).

A.O.A.C Association of Official Analytical Chemists (Asociación Americana de Químicos Analíticos)

ELN Extracto Libre de Nitrogeno

% Por ciento

gr/cm³ Gramos por centímetro cúbico

mg/ml miligramo por mililitro

°C Grados Centígrados

ITESM Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey

cm Centímetros

Kg Kilogramo

Desv. Estandar Desviación estandar

l Litro

hrs Horas

ml Mililitros

min Minutos

rpm Revoluciones por minuto

ml/min Mililitro por minuto

nm Nanometros

Kg/HL Kilogramos por hectolitro

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras de glucosas unidas por enlaces glucosídicos α -1,4 y α -1,6	7
Figura 2. Moléculas de almidón con posibles hidrólisis llevadas a cabo por las enzimas α -amilasa, β -amilasa, pululanasa y amiloglucosidasa	19
Figura 3. Estructura de glucosa y fructosa	21
Figura 4. Diagrama de flujo del proceso experimental de molienda húmeda o refinación de almidón	27
Figura 5. Gráfica de color de CIELAB en tres planos (L, a, y b). El valor de L* se representa en el eje central. Los ejes a* y b* aparecen sobre el plano horizontal	29
Figura 6. Gráfica de color de CIELAB en 2 planos (a y b)	29
Figura 7. Diagrama de flujo para la obtención de jarabes fructosados a partir de almidón	33
Figura 8. Curvas estándar de correlación absorbancia-concentración de glucosa	34
Figura 9. Curva de conversión a glucosa de almidones de maíz, sorgo ceroso y sorgo normal previamente licuificados	50
Figura 10. Comparación entre curva obtenida experimentalmente en la sacarificación de almidón de maíz y la curva ajustada por simulación matemática	51
Figura 11. Comparación entre curva obtenida experimentalmente en la sacarificación de almidón de sorgo ceroso y la curva ajustada por simulación matemática	51
Figura 12. Comparación entre curva obtenida experimentalmente en la sacarificación de almidón de sorgo normal y la curva ajustada por simulación matemática	52

Figura 13. Curvas logísticas ajustadas a cada una de las concentraciones de glucosa para maíz, sorgo ARG1 y sorgo 631. ARG 1 significa sorgo ceroso y 631 significa sorgo normal	55
Figura 14. Jarabes después de la sacarificación: los tres primeros frascos son de sorgo normal, seguidos por tres de maíz y tres de sorgo ceroso. La nubosidad observada son dextrinas que no alcanzan a ser hidrolizadas a glucosa	59
Figura 15. Jarabes glucosados refinados después de pasar por centrifugación, carbón activado, resina aniónica y resina catiónica	60
Figura 16. Disminución de la concentración de glucosa con respecto al tiempo durante la reacción de isomerización. Las curvas indican promedios para jarabes de maíz, sorgo ceroso y sorgo normal	62
Figura 17. Comparación entre resultados experimentales de la disminución de glucosa en la isomerización de maíz y la curva ajustada por modelación matemática	63
Figura 18. Comparación entre resultados experimentales de la disminución de glucosa en la isomerización de sorgo ceroso y la curva ajustada por modelación matemática	64
Figura 19. Comparación entre curva obtenida experimentalmente de la disminución de glucosa en la isomerización de sorgo normal y la curva ajustada por modelación matemática	64
Figura 20. Curvas exponenciales ajustadas a cada una de las concentraciones de fructosa para maíz, sorgo ceroso y sorgo normal	66

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis químico proximal de maíz, sorgo ceroso y sorgo normal	38
Tabla 2. Propiedades físicas de maíz, sorgo normal y sorgo ceroso	40
Tabla 3. Efecto del tipo de grano en los rendimientos de fracciones de molienda húmeda para maíz, sorgo ceroso y sorgo normal	42
Tabla 4. Efecto del tipo de grano en el contenido de proteína y cenizas en almidones	43
Tabla 5. Color de almidones deshidratados obtenidos a partir de maíz, sorgo ceroso y sorgo normal	46
Tabla 6. Concentración final promedio de glucosa en jarabes, obtenido de los diferentes tipos de almidón, y porcentaje total de conversión de almidón a glucosa	49
Tabla 7. Parámetros cinéticos obtenidos de la modelación matemática a través de la ecuación de Michaelis Menten en la sacarificación de dextrinas de maíz, sorgo ceroso y sorgo normal	53
Tabla 8. Resultados de los tres ajustes a los datos cada tratamiento (glucosa) con el modelo Logístico $y(t) = a / (1 + b_i e^{-c_i t})$ donde a es la concentración máxima, b es la concentración inicial y c es la tasa de crecimiento	56
Tabla 9. Concentración final de glucosa obtenida en sacarificación. Valores calculados de manera experimental y a través de las modelaciones matemáticas de Michaelis Menten y logístico	57
Tabla 10. Velocidades de conversión en sacarificación obtenidas de las modelaciones de las cinéticas promedio para cada tipo de grano	58
Tabla 11. Color de los jarabes de glucosa obtenidos a partir de los diferentes tipos de almidones	58
Tabla 12. Concentraciones iniciales de sustrato, finales de productos y conversión para la reacción de isomerización de jarabes glucosados de maíz, sorgo ceroso y sorgo normal	61

Tabla 13. Parámetros cinéticos obtenidos de la modelación matemática a través de la ecuación de Michaelis Menten en la isomerización de jarabes glucosados de maíz, sorgo ceroso y sorgo normal 65

Tabla 14. Resultados de los tres ajustes a los datos cada tratamiento (fructosa) con el modelo Exponencial $y(t) = \alpha * (\beta * t)$ donde α es la concentración inicial al tiempo cero y β es la tasa de cambio 66

1. INTRODUCCION

Del total de granos y tubérculos producidos en el mundo solo el 1.3% es procesado para la obtención de almidón. El maíz representa la fuente del 85% de la producción de almidón esto debido a sus bajos costos de producción, su alto contenido de este carbohidrato y valor de los subproductos (germen, gluten y salvado), sin embargo, se a considerado al sorgo (*Sorghum bicolor* L Moench) granífero como una fuente alternativa de almidón debido a que tiene características similares al maíz y por su más bajo costo comparativo. La producción de sorgo en países industrializados se ha canalizado principalmente al a producción de alimentos balanceados para animales.

En México, el cultivo de sorgo no se conocía antes de la primera mitad de la década de los 50's, pero hoy en día es el segundo cultivo en importancia en términos de producción total, después del maíz y representa un tercio de la producción total de cereales. En el año 2001 se produjeron 6.5 millones de toneladas. En tanto que en datos de la FAO (2002), el rendimiento de maíz es del orden de las 20.1 millones de toneladas métricas producidas en 6.8 millones de hectáreas. México ocupa el segundo lugar en el continente americano en producción de sorgo antecedido solo por los Estados Unidos de América, lo que lo coloca en un papel privilegiado para el uso de este cereal para la elaboración de productos alimenticios.

Existen diferentes alternativas para la obtención de almidón tales como: trigo, arroz, papa, sorgo, etc. El sorgo ha aumentado su potencial para la obtención de almidón gracias a nuevas variedades e híbridos los cuales pueden adaptase mejor a este proceso.

En nuestros días los almidones obtenidos de la molienda de maíz son convertidos a una gran variedad de productos tales como: almidones modificados para la industria de alimentos, textil y del papel, edulcorantes para bebidas, repostería y confitería, etanol para combustible y bebidas alcohólicas para consumo humano y productos fermentados para farmacéuticos.

El 70% de los almidones producidos son destinados a la producción de edulcorantes los cuales son principalmente jarabes glucosados y fructosados. El consumo de jarabes glucosados y fructosados se ha incrementado gracias a factores como: liberación del precio del azúcar, valor nutrimental y mejores características organolépticas.

Los jarabes glucosados y fructosados son obtenidos comercialmente del almidón de maíz a través de 2 métodos, los cuales están basados, uno en la hidrólisis ácida, y el otro por conversión enzimática. Antes de los años 60 los hidrolizados eran producidos por el método ácido. Sin embargo, esta tecnología tenía varias desventajas tales como producciones pobres de la hidrólisis, formación de azúcares amargos, y un gusto salado en los productos terminados. La introducción de la hidrólisis enzimática produjo tecnología más específica y mas rápida, además de tener menos subproductos indeseables de degradación lo que se traduce en menos purificación y mayores rendimientos.

La obtención de jarabes fructosados consta de los siguientes pasos. Para la producción de almidón es necesario llevar a cabo el remojo del grano, molienda húmeda, separación de fracciones, purificación del almidón y el secado. Después de obtener el almidón se procede a:

Una licuefacción donde se gelatiniza e hidroliza parcialmente el almidón por la enzima α -amilasa a dextrinas.

Una sacarificación, donde las dextrinas son convertidas a glucosa por medio de un complejo enzimático que consta de amiloglucosidasa, que en ocasiones es coadyuvada con β -amilasa y pululanasa.

Un refinado donde el jarabe resultante es pasado a través de carbón activado, resina aniónica y resina catiónica.

Una isomerización donde el jarabe glucosado es convertido a jarabe fructosado gracias a la acción de la enzima glucosa isomerasa (Wiseman 1991).

En el presente trabajo buscamos demostrar que 2 híbridos contrastantes de sorgo blanco (uno con endospermo normal y el otro con endospermo ceroso) pueden ser una alternativa factible para la producción de almidón, jarabes glucosados y jarabes fructosados, sustituyendo al maíz que es la fuente que tradicionalmente se utiliza.

2. LITERATURA REVISADA

2.1 Almidón

El almidón es uno de los principales constituyentes de las plantas superiores, es la forma principal en que los carbohidratos son almacenados en organelos especiales de reserva, para que sean utilizados en las diferentes etapas del ciclo de vida (Shannon y Garwood, 1984). En forma abundante se encuentran en semillas, raíces y tubérculos. Es el único polisacárido que se produce en pequeños paquetes llamados gránulos (Whistler y Daniels, 1985), los cuales se desarrollan durante el crecimiento y maduración de la planta en organelos intracelulares llamados plástidos.

Las mutaciones afectan el desarrollo de la semilla, el desarrollo y morfología del gránulo de almidón, así como su composición de polisacárido. De esas mutaciones genéticas, la que tiene importancia para el trabajo es la del gen ceroso (wx). Este gen ha sido identificado tanto en el maíz como en sorgo, arroz y cebada. Estos mutantes producen gránulos de almidón en el endospermo y el polen los cuales contienen cerca del 100% de amilopectina (Shannon y Garwood 1984). La apariencia del grano y de los gránulos de almidón es similar al de los de sus contrapartes normales, sin embargo, sus propiedades físico-químicas, viscoamilográficas y reológicas o de comportamiento son muy diferentes. Esta diferencia en propiedades se debe fundamentalmente al contenido de amilosa.

2.1.1 Propiedades fisicoquímicas del almidón

Cambios en la estructura del almidón tales como propiedades de fusión, el gelatinizado o la fragmentación son afectados por varios factores tales como: la relación agua-almidón, la temperatura, la velocidad de calentamiento, la morfología, la relación amilosa-amilopectina, distribución y tamaño del gránulo, y por la adición de algunas sustancias químicas tales: azúcar, sal, proteínas, lípidos y otras. Viéndose afectados a su vez, el comportamiento de las propiedades viscoelásticas de los almidones (Kokin *et al* 1992).

De las propiedades fisicoquímicas de los almidones, la gelatinización y la viscosidad son dos de las más importantes; debido a que en base a ellas puede determinarse tanto la fuente de almidón como la aplicabilidad industrial del mismo.

En su forma nativa, los gránulos de almidón contienen una cantidad significativa de agua (10-12%) y presentan las siguientes características: son insolubles en agua fría, se hinchan en forma reversible con agua a temperaturas por debajo de su temperatura inicial de gelatinización, desvían el plano de luz polarizada mostrando birrefringencia y son relativamente inaccesibles al ataque enzimático (Serna-Saldivar y Rooney, 1995). La cantidad y distribución del agua dentro del gránulo de almidón es importante con respecto a las propiedades físicas y a las reacciones químicas del almidón. Un hinchamiento irreversible de los gránulos de almidón ocurre cuando estos son calentados por arriba de su temperatura de gelatinización. Cada gránulo sufre este fenómeno de manera diferente, reflejándose así diferencias en la organización molecular dentro del gránulo (Kokini *et al* 1992).

Watson citado por Rooney et al (1980) menciona que la temperatura de gelatinización para los almidones de sorgo con endospermo normal y con endospermo ceroso fluctúa entre 66 y 77 °C. Debido a la importancia de esta propiedad fisicoquímica, para la medición del perfil de viscosidad durante el calentamiento se han desarrollado diferentes metodologías. De estas una de las más ampliamente utilizadas es el viscoamilograma.

El uso de almidones ha revolucionado la industria de los alimentos procesados permitiendo, con base en sus propiedades y composición, la producción de una gama de alimentos e ingredientes muy amplia y variada. Los almidones de maíz y sorgo no modificados, forman una pasta viscosa, compacta y opaca que se transforma en un gel rígido. Son empleados como espesantes de salsas, gravies, aderezos, pudines y rellenos para pasteles. Por otro lado, los almidones cerosos, tanto de maíz como de sorgo, son usados en alimentos donde es deseable una alta capacidad de atrapamiento de agua, claridad en la pasta o en el gel y una buena resistencia a la retrogradación, como por ejemplo en sopas preparadas y en alimentos congelados por la propiedad de no presentar sinéresis.

2.1.2 Estructura de almidones

Los almidones cerosos contienen 100% de amilopectina, mientras que los almidones normales, tanto de endospermo corneo como harinosos contienen 75% de amilopectina y 25% de amilosa (Palmer, 1992).

La amilosa consta de cadenas lineales de unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos α -1,4 y la amilopectina de cadenas ramificadas de glucosa unidas por enlaces α -1,4 y α -1,6.

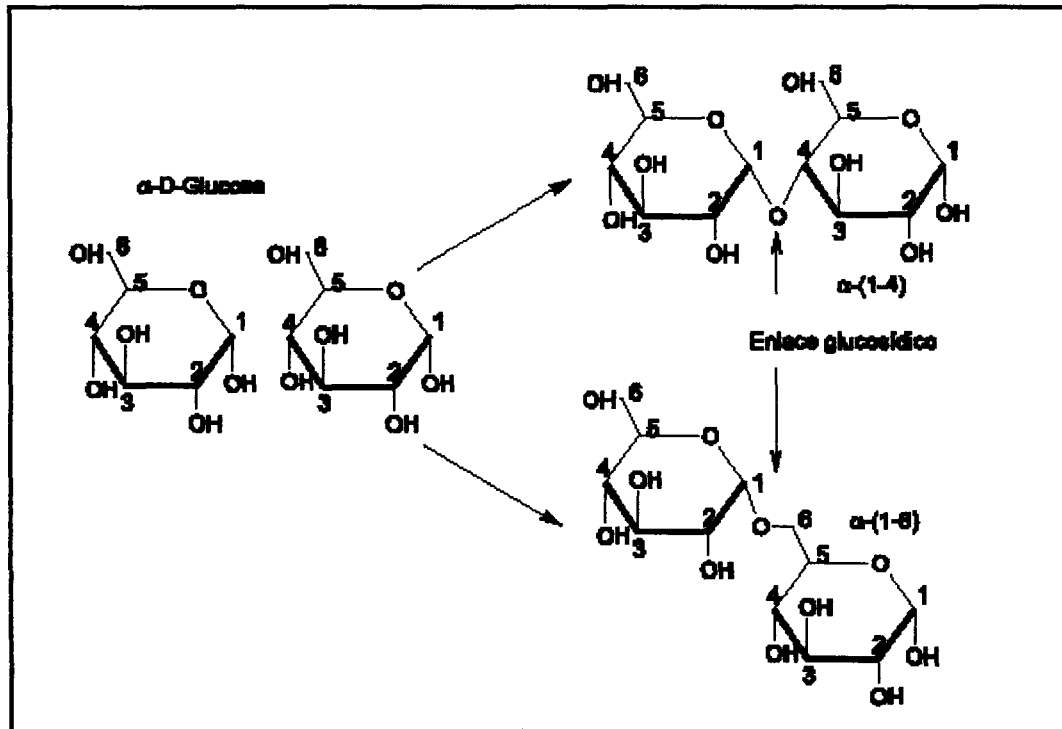


Figura 1. Estructuras de glucosas unidas por enlaces glucosídicos α -1,4 y α -1,6 (Miralbes, 2003).

2.1.3 Sorgo

Los sorgos constituyen un gran número de plantas incluidas en el género *sorghum* de la familia de las gramíneas que tienen diversas aplicaciones y una característica en común, su resistencia al calor y a la sequía, que ha hecho que fueran conocidos y cultivados – principalmente los productores de grano- desde varios miles de años antes de la era cristiana (Ibar Albiña, 1984).

Por su aplicación pueden clasificarse en 4 grandes grupos: sorgos de granífero, sorgos dulces, sorgos escoberos y sorgos forrajeros.

Los sorgos granífero son los más extendidos por el mundo y pertenecen a la especie *Sorghum bicolor*, de la que existen numerosas variedades e híbridos. Se emplean para explotar a sus cariósides y hasta cierto punto como forraje. Los sorgos dulces pertenecen a la variedad *Saccharatum* del *Sorghum vulgare* y se caracterizan por contener, en sus tallos, un jugo azucarado, del que una vez extraído por trituración y prensado de las plantas, se obtiene un zumo, que después de ser concentrado por calor, da lugar a un jarabe, que se consume como edulcorante en los Estados Unidos. Estos sorgos también se ensilan para producir forraje nutritivo y palatable de alto valor. Los sorgos escoberos o de espiga (*Sorghum vulgare*, variedad *technicum*) se caracterizan por tener inflorescencias (panículas) muy anchas y provistas de ramificaciones largas y flexibles, que se emplean para la confección de escobas. Finalmente los sorgos forrajeros pertenecen a distintas especies, variedades e híbridos del género *Sorghum*, algunas variedades ya citadas (sorgo dulce y sorgo granífero) y otras más importantes como pasto del Sudán (*Sorghum sudanense*), pasto de Túnez (*Sorghum virgatum*), sorgo de Alepo, hierba de Johnson (*Sorghum halepense*) y el sorgo negro (*Sorghum alimum*).

El sorgo granífero (*Sorghum bicolor* L. Moench) es un cereal cuya característica de resistir a la sequía y adaptarse a ecosistemas secos tropicales y subtropicales en todo el mundo lo hacen único y constituyen el alimento básico de millones de personas en los continentes Africano y Asiático (Serna-Saldivar y Rooney, 1995). Como otros cereales es una incomparable fuente de almidón y proteína, que puede procesarse de muy

diversas maneras para generar una amplia gama de productos industrializados (Palmer, 1992).

El sorgo, al igual que otros cereales, es una excelente fuente de almidón y proteína y puede procesarse para obtener almidón, harina, *grits* y hojuelas (Palmer 1992). El grano de sorgo se considera una cariósida desnuda, aunque algunos tipos africanos retienen sus glumas después de la cosecha. Los granos difieren ampliamente en tamaño o peso (3-80 mg), varían de 68.5-76.0 Kg/HL, y densidad (1.15-1.38 g/cm³). Los sorgos comerciales en Estados Unidos son generalmente de 4 mm de longitud, 2 mm de ancho, y 2.5 mm de grosor, un peso de grano de 25-35 mg, 72.3-74.8 Kg/HL, y densidades que varían de 1.28-1.36 g/cm³. Las cariósidas consisten de 3 componentes anatómicos distintivos: pericarpio (capa más externa), endospermo (tejido de almacenamiento secundario) y germen (tejido de almacenamiento primario) (Serna-Saldivar y Rooney, 1995). El pericarpio y la testa del sorgo tienen importantes aplicaciones en el proceso de alimentos debido a su contenido variable de polifenoles y grosor.

El color de los granos varía desde el rojo, negro-púrpura y café a *beige*, amarillo, blanco o crema. Algunas variedades de sorgo no retienen su testa durante el desarrollo. Sin embargo, cuando esta presente, la testa puede contener altos niveles de materiales fenólicos.

Los compuestos fenólicos de la testa pigmentada provocan colores oscuros en los productos integrales o preparados a partir de grano entero. El proceso del sorgo está muy influenciado por las cantidades de compuestos fenólicos del grano lo cual puede inhibir enzimas, causar astringencia y colores indeseables en los productos terminados (Palmer, 1992).

El endospermo es el tejido presente en mayor cantidad en los granos, está formado por la capa de aleurona y el tejido almidonoso, este último consta de los gránulos de almidón, proteínas de reserva (prolaminas y glutelinas) y una pared celular la cual delinea las células del endospermo. Puede ser de textura suave o harinosa, intermedia donde la parte exterior es córnea y la interior harinosa o de textura dura, córnea o vítrea. Depósitos de proteína en el endospermo tienden a formar una matriz proteica, en tanto que en el endospermo córneo depósitos similares forman cuerpos proteicos que forman pequeñas indentaciones en los gránulos de almidón (Palmer, 1992).

2.1.4 Almidón de sorgo

Por sus características el almidón de sorgo se puede usar con los mismos fines industriales y alimenticios que el almidón de maíz ya que es muy similar en composición y en propiedades viscoamilográficas (Watson, 1984).

Del 50 al 75% del grano de sorgo es almidón. El almidón se localiza dentro de los gránulos en los cuales las moléculas de amilosa y amilopectina están unidas por puentes de hidrógeno (Rooney y Pflugfelder, 1986).

Los gránulos de almidón del sorgo son de aproximadamente 10 micrómetros de diámetro, contienen cerca de 75 % de amilopectina y 25 % de amilosa. Durante la germinación o malteado, los gránulos presentes en el endospermo harinoso son hidrolizados más rápidamente que aquellos del endospermo córneo. Esta diferencia en los rangos de hidrólisis refleja diferencias en la hidratación de los tejidos y en la compactación del almidón más que diferencias en la composición química de los almidones.

La hidrólisis más rápida de los almidones de sorgos cerosos en contraste con los sorgos normales se debe a que los primeros tienen una matriz proteica más débil.

Las ventajas agronómicas del sorgo sobre el maíz son, menor necesidad de agua, por sus largas raíces pues puede aprovechar mejor la humedad del suelo a mayor profundidad. Al cesar el período de sequía, el sorgo puede abandonar su estado de vida latente, recobrando su vitalidad normal. Para producir una cosecha normal de grano, tiene con el 50% del agua que necesita el maíz (Ibar Albiña, 1984). El sorgo tolera mejor que el maíz la salinidad del suelo y por su amplia tolerancia al pH del suelo responde mejor a la aplicación de fertilizantes (Ibar Albiña, 1984). Finalmente, si bien el sorgo es más resistente a los gusanos perforadores de tallo, está más expuesto a la acción depredadora de los pájaros (Ibar Albiña, 1984).

2.2 Fuentes de obtención de almidón

Uno de los usos más importantes de los cereales es como materia prima para la obtención de almidones. La industria refinadora de este carbohidrato, también llamada de molienda húmeda, tiene como objetivo principal obtener el máximo rendimiento de gránulos nativos o sin dañar. La industria refinadora de almidón está dominada por pocas empresas y utiliza casi exclusivamente el grano de maíz como materia prima. Más del 90% del almidón comercial refinado a nivel mundial es extraído de maíz. Esto se debe a que el grano contiene una alta proporción de almidón (mayor del 70%) y principalmente al alto valor económico comercial de los subproductos del proceso: gluten, germen y fibra (Serna-Saldivar, 1996).

Existen procesos diseñados y adaptados para la extracción de almidón de otros cereales. El almidón de sorgo posee características similares al del maíz con la ventaja de que el grano es más barato y esta disponible en cantidades adecuadas en algunas regiones del mundo como África, Asia y América donde las condiciones climáticas favorecen su cultivo.

La producción industrial de almidón de sorgo se realiza en algunos países africanos y se practicó por algún tiempo en los Estados Unidos. Sin embargo, se discontinuó su uso en Estados Unidos por que el producto de la molienda húmeda de sorgos rojos o marrones era un almidón de color rosa indeseable debido a que las variedades e híbridos presentaban una alta cantidad de compuestos fenólicos (Serna-Saldivar, 1996). Estos compuestos fenólicos se encuentran en la testa o cubierta de la semilla de los sorgos rojos o marrones y son considerados como factores antinutrimientales (Serna-Saldivar, 1996). Además del color rosa *per se* del almidón no es permitido en el mercado, es por esta razón, que los almidones de sorgo deben de ser blanqueados al final del proceso de refinación. Además, la molienda húmeda de sorgo rinde menores cantidades de almidón en comparación con el maíz. Sin embargo, las propiedades fisicoquímicas de los almidones de sorgo son casi idénticas a las del maíz (Serna-Saldivar, 1996).

Las limitaciones del sorgo como materia prima para la obtención de almidón son:

Una capa de cera presente en el pericarpio o cubierta del fruto, la cual se deposita naturalmente sobre la superficie del grano con el objetivo de prevenir la deshidratación de la cariósida. Esta capa de cera representa aproximadamente un 0.3% del total del grano en base seca e interfiere en el

proceso de refinación. La proporción de germen en el sorgo es menor que la del maíz; por lo tanto, no se obtiene tanto aceite como subproducto.

El grano de sorgo contiene un 65% de endospermo vítreo a comparación del maíz que tiene solo 54% (esto depende mucho de la variedad). Esto repercute en la recuperación del almidón debido a la cantidad de proteína entrecruzada en la matriz proteica en esta región del endospermo, la cual envuelve a los gránulos de almidón (Watson, 1955).

Las cariósides de sorgo contienen una capa adicional de endospermo denominada endospermo periférico que yace debajo de la capa de aleurona. Esta capa de células contiene mucha proteína altamente entrecruzada y esto dificulta la penetración de la solución de remojo involucrada en la molienda húmeda además de que estas células contaminan al almidón (Wall y Paulis, 1978).

El sorgo de pericarpio grueso contiene de 3 a 4% de almidón en el mesocarpio. El mesocarpio es removido al separar la fibra en la obtención del almidón de molienda y consecuentemente se pierde ese almidón. Y por último el tamaño más pequeño de la cariósida de sorgo en comparación con el maíz dificulta su molienda.

Los sorgos blancos de endospermo suave (que contienen una menor proporción de endospermo vítreo) son candidatos importantes para la industria de molienda húmeda ya que contienen menos cantidad de compuestos fenólicos y el producto obtenido de la refinación presenta un color blanco. Se prefiere que las cariósides tengan poca proporción de endospermo vítreo para facilitar el desprendimiento de los gránulos del almidón de la matriz proteica. Sin embargo, las proteínas de la matriz

proteica del endospermo de sorgo se encuentra más entrecruzadas que las proteínas de la matriz proteica del endospermo de maíz, obteniéndose menos rendimientos de almidón de primera (Moheno *et al* 1999).

Los almidones de arroz (intervalo de gelatinización de 68-77°C), trigo (58-64°C), papa (61°C) y tapioca (59°C), tienen propiedades viscoamilográficas distintas a la de los almidones de maíz y de sorgo, por lo que ocupan otro lugar específico en el mercado (Hoseney, 1994).

2.3 Proceso de obtención de almidón

El proceso de molienda húmeda del sorgo tiene los mismos principios que el de maíz (Rooney y Serna-Saldivar, 1991, Watson, 1984). El sorgo puede ser usado como materia prima en países donde su precio es más bajo como es el caso de México. Este procedimiento consiste en un remojo inicial de los granos en una solución de dióxido de azufre con el objetivo de suavizarlos, posteriormente son molidos y el almidón es separado del gluten y otras impurezas por filtración, centrifugación e hidroclones.

En los granos de maíz, los gránulos de almidón dentro de las células del endospermo se encuentran incrustados dentro de una matriz proteica. Esta matriz debe ser hidrolizada o modificada antes de que el almidón pueda ser liberado, por lo que el dióxido de azufre es indispensable para su liberación. El dióxido de azufre al combinarse con el agua de remojo se convierte en ácido sulfuroso que desintegra a las proteínas, mediante el rompimiento de los enlaces o puentes disulfuro. De esta manera se liberan los gránulos de almidón y consecuentemente se facilita la completa separación del almidón y del gluten. Durante el tiempo de remojo, de manera natural hay crecimiento de microorganismos del género

Lactobacillus, por lo que se incrementa el contenido de ácido láctico en la solución de remojo el cual tiene un efecto sinergista con el dióxido de azufre para la desintegración de las proteínas; este efecto también se puede lograr si se adiciona el ácido láctico como un reactivo químico a la solución de remojo (Moheno *et al* 1999).

Durante la etapa de remojo, el grano absorbe gradualmente agua hasta llegar a un contenido de humedad de 45-50%, permitiendo fácilmente la separación del germen, la fibra, el gluten y el almidón.

2.4 Calidad de los almidones

Los parámetros utilizados para asignarle calidad al almidón son varios, incluyendo su pureza y sus propiedades viscoamilograficas (que no se encuentre dañado el almidón por calor o hidrólisis enzimática). La pureza del almidón o su grado de refinación, se mide determinando la presencia de proteína y cenizas. La cantidad de proteína no debe de pasar de 0.35% en base seca. La cantidad de proteína presente refleja la separación eficiente de la matriz y cuerpos proteicos de los gránulos (Serna Saldivar, 1996). La cantidad de cenizas no debe sobrepasar 0.3% en base seca (Moheno *et al* 1999). Las cenizas presentes en el almidón indican la presencia de contaminantes inorgánicos originalmente presentes en el pericarpio y germen.

Las propiedades viscoamilograficas de almidón corresponden a su huella digital y reflejan si hubo daño durante el proceso de molienda húmeda. Si un almidón supuestamente nativo no genera un viscoamilograma propio de su fuente, entonces este almidón se dañó mecánicamente, enzimáticamente o térmicamente durante la extracción y es en términos prácticos inservible

para las industrias. Las temperaturas de secado de la fracción de almidón además de la temperatura generada durante la etapa de remojo y demás etapas de la molienda deben ser monitoreadas cuidadosamente para evitar la temprana pre-gelatinización del almidón.

2.5 Producción de jarabes

El almidón es principalmente la base para la elaboración de jarabes o edulcorantes glucosados y fructosados que cada día son más utilizados y demandados por las industrias alimentarias. Esta transformación se basa en la hidrólisis de las cadenas de amilosa y amilopectina por medio de enzimas o tratamiento ácido con la posterior transformación de la glucosa a fructosa por medio de un sistema enzimático llamado glucosa isomerasa (Serna-Saldivar, 1996). Tradicionalmente los jarabes glucosados se obtenían por hidrólisis ácida, pero por este método no era posible alcanzar una concentración de glucosa alta sin que aparecieran sabores desagradables. La α -amilasa y la glucoamilasa (amiloglucosidasa) son las enzimas más usadas en la industria de almidón, siendo además relativamente baratas (Wiseman, 1991).

Se considera jarabe glucosado a la solución acuosa concentrada de sacáridos con un valor de equivalentes de dextrosa de 20 o mayor (Pomeranz, 1985), obtenido por hidrólisis de almidón comestible. Los equivalentes de dextrosa son un indicador de el total de azúcares reductores calculados como D-glucosa en base seca, esta inversamente relacionado con el grado de polimerización (Lloyd y Nelson, 1984).

2.5.1 Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida rompe los enlaces α -1,4 y α -1,6 al azar, debido a que el ácido no tiene especificidad. La hidrólisis propicia otras reacciones indeseables como lo es la generación de metilfurfural que cambia negativamente el color y sabor del jarabe (Lloyd y Nelson, 1984). Esta se lleva a cabo en una suspensión de 35-40% de almidón en una solución débil de ácido clorhídrico (0.02-0.2 N) calentando a 150 °C en un reactor presurizado por 15 a 20 minutos hasta alcanzar los grados de dextrosa deseados (Serna-Saldivar, 1996).

2.5.2 Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática del almidón es más específica que la hidrólisis ácida para la producción de jarabes glucosados, minimiza la aparición de sabores y colores desagradables, así como la formación de productos indeseables de degradación. Requiere el uso secuencial de las enzimas α -amilasa y amiloglucosidasa para obtener el jarabe glucosado y de la enzima glucosa isomerasa para convertir el jarabe glucosado en jarabe fructosado. El almidón debe solubilizarse antes de llevar a cabo su hidrólisis esto se logra calentando la pasta de almidón hasta que los gránulos gelatinicen y solubilicen (Wiseman, 1991).

Para obtener jarabes fructosados es necesario llevar a cabo los siguientes pasos: licuefacción, sacarificación, refinado e isomerización.

2.5.2.1 Licuefacción

Actualmente la industria utiliza preferentemente a la α -amilasa termoestable derivada de *Bacillus licheniformis* puesto que puede catalizar la reacción hasta temperaturas de 105°C. De esta manera se puede lograr la licuefacción del almidón en cortos periodos de tiempo hasta alcanzar 10 a 15 equivalentes de dextrosa. Después de la gelatinización la α -amilasa continua la acción durante algunas horas a 95 °C hidrolizando enlaces α -1,4 al azar en la amilosa y la amilopectina, dando productos de bajo peso molecular, solubles y menos viscosos, cuya ruptura esta limitada por la presencia de los enlaces glucosídicos α -1,6 en los puntos de ramificación de la molécula del almidón nativo (Wiseman, 1991).

El proceso industrial consiste en tratar una suspensión de 30 a 40% de almidón en agua agregando 5 ppm calcio con α -amilasa a un pH de 6 y una temperatura de 80 a 110 °C por 90 minutos (Wiseman, 1991). El almidón es gelatinizado y depolimerizado a un fluido de fácil manejo. Una variante del proceso es calentar hasta 120-180 °C para gelatinizar y después agregar α -amilasa bajando la temperatura a 90-105°C durante 1 a 3 horas hasta alcanzar 15-20 equivalentes de dextrosa (Lloyd y Nelson, 1984).

2.5.2.2 Sacarificación

La amiloglucosidasa cataliza la etapa de hidrólisis de los enlaces α -1,4 del almidón y los oligosacáridos, liberando extremos de glucosa a partir del extremo no reductor de la cadena. Los enlaces α -1,6 también se hidrolizan pero más lentamente hasta producir jarabes con casi 100% de glucosa. El almidón licuificado con 28-30 de sólidos, se ajusta a un pH de 4 - 4.5 y se calienta a 60°C, se agrega la suficiente amiloglucosidasa para alcanzar el

nivel deseado de glucosa en 24-96 horas (Wiseman, 1991). Debido a la baja velocidad de hidrólisis de enlaces α -1,6 se ha propuesto el uso combinado de amiloglucosidasa y la enzima desramificante pululanasa o isoamilasa, logrando aumentos en el contenido de glucosa a pesar de llevar a cabo la reacción a un pH 5.5-6, en el que la amiloglucosidasa es menos activa (Wiseman, 1991). También es utilizada β -amilasa para producir unidades de maltosas.

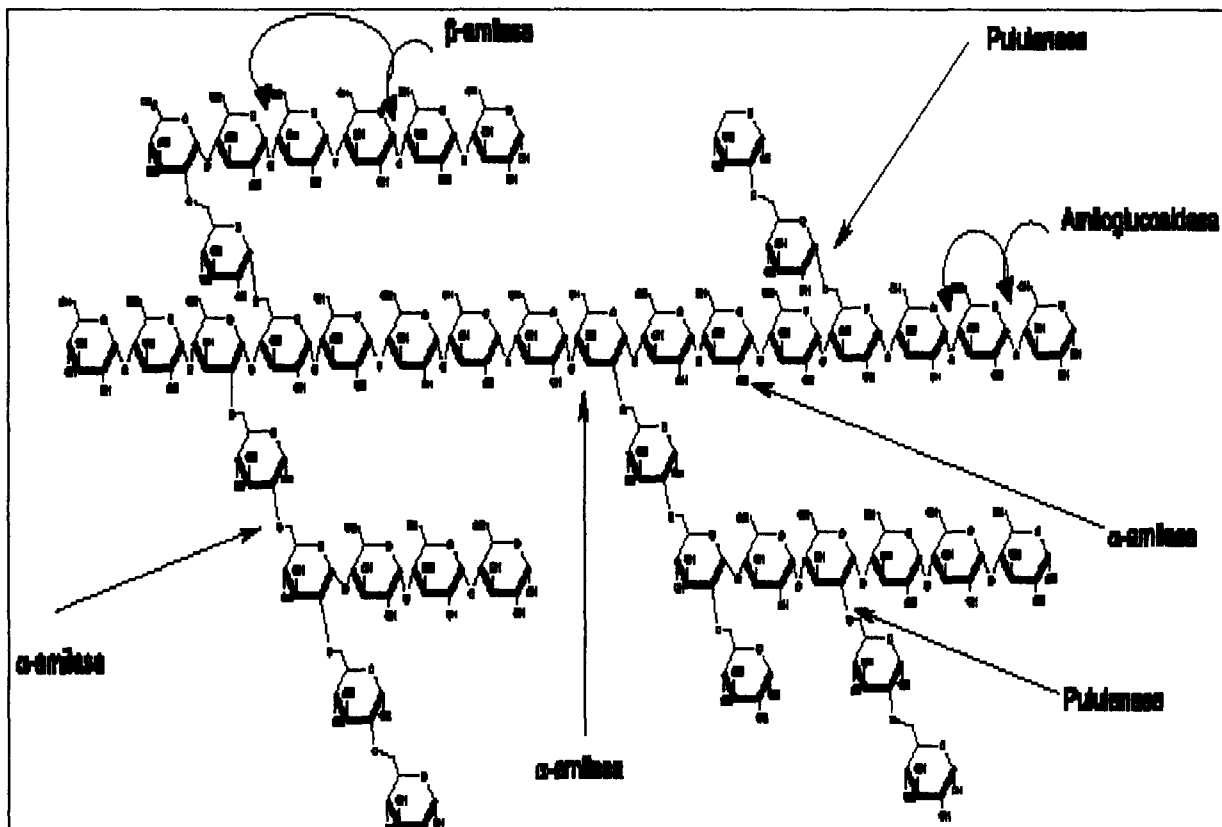


Figura 2. Moléculas de almidón con posibles hidrólisis llevadas a cabo por las enzimas α -amilasa, β -amilasa, pululanasa y amiloglucosidasa (Miralbes 2003).

2.5.2.3 Refinación

Los jarabes resultantes de la conversión ácida, ácida-enzimática o enzimática son refinados y clarificados con el objetivo de remover cenizas, pigmentos, proteína soluble, grasa insoluble y almidón resistente al ataque enzimático. Esto es logrado mediante procesos de centrifugación integrados a un sistema de paso a través de filtros con carbón activado y resinas iónicas (Serna-Saldivar, 1996). Para la clarificación se remueven trazas de grasa, proteína y dextrinas por centrifugación, posteriormente a este paso se utilizan columnas con carbón activado y resinas de intercambio iónico para remover impurezas tales como pigmentos, precursores de color y material proteico (Hebeda, 1987).

2.5.2.4 Isomerización

Si se convierte glucosa en fructosa, el producto aumenta su dulzura y en consecuencia su valor. Una forma de llevar a cabo esto es la isomerización alcalina, aunque esta técnica produce un color excesivo y demasiados subproductos. La glucosa isomerasa es una enzima que isomeriza la glucosa a concentraciones elevadas, dando lugar a jarabes de maíz ricos en fructosa, este procedimiento es el que más enzima inmovilizada consume mundialmente y su producción de jarabes alcanza varios millones de toneladas por año. Esta enzima es apta para utilizarse en forma inmovilizada puesto que es intracelular, es estable a temperaturas elevadas, suficientes para frenar la contaminación microbiana, y porque todos los reactantes son moléculas pequeñas de forma que plantean pocos problemas de difusión. Para activar la enzima es necesario añadir trazas de magnesio, en forma de sulfato. Los iones magnesio sufren la competencia de los iones calcio, por lo que su concentración debe ser de aproximadamente 20 veces

mayor que la de calcio. La mayoría de los jarabes ricos en fructosa manufacturados en la actualidad, se fabrican utilizando preparaciones de la empresa Novozyme de células enteras de *Bacillus coagulans* (Wiseman, 1991).

La glucosa isomerasa asociada con las células de *Bacillus coagulans* se separa por centrifugación del medio de cultivo, se entrecruza con glutaraldehído, se rompe en pequeñas partículas y se seca para mejorar la resistencia mecánica de los gránulos. La enzima inmovilizada se emplea en reactores en columna a una temperatura de 60°C para producir jarabes que contienen aproximadamente 42-43% en peso de fructosa y una intensidad de color bajo (Wiseman, 1991).

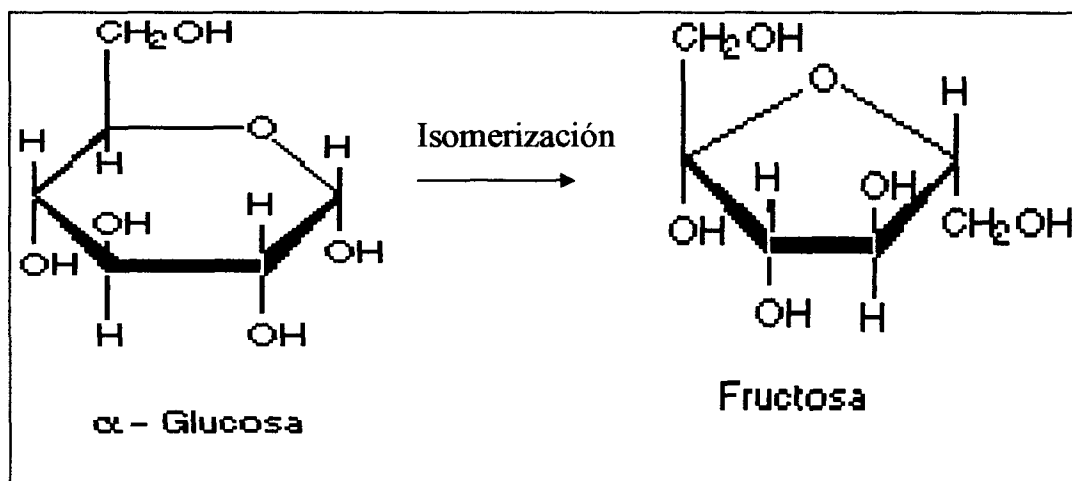


Figura 3. Estructura de glucosa y fructosa (Miralbes 2003)

2.6 Cinética enzimática

Las reacciones enzimáticas se caracterizan porque aunque se aumente la concentración de sustrato la velocidad no aumenta linealmente, es decir aparece un efecto de saturación. La saturación se debe a que todos los

centros activos están ocupados. La velocidad depende de la cantidad de enzima con sustrato suficiente.

Dos de los parámetros más importantes dentro de las cinéticas de enzimas son la velocidad máxima (V_{max}) y la constante de afinidad (K_m) (Bailey, 1986).

La velocidad de una reacción catalizada por un enzima puede medirse con relativa facilidad, ya que en muchos casos no es necesario purificar o aislar a la enzima. La medida se realiza siempre en las condiciones óptimas de pH, temperatura, presencia de cofactores, etc, y se utilizan concentraciones saturantes de sustrato (cuando todos los centros activos de las enzimas están ocupados por el sustrato). En estas condiciones, la velocidad de reacción observada es la velocidad máxima (V_{max}). La velocidad puede determinarse bien, midiendo la aparición de los productos o la desaparición del sustrato. La constante de afinidad (K_m) es a la concentración de sustrato a la que la velocidad es $1/2 V_{max}$. Es una medida de la afinidad de la enzima por el sustrato. El valor de K_m da idea de la afinidad del enzima por el sustrato: a menor K_m , mayor afinidad del enzima por el sustrato, y a mayor K_m , menor afinidad (Wiseman, 1991).

3. MATERIALES Y METODOS

El trabajo se llevó a cabo en dos partes. La primera tuvo como objetivo la obtención de almidón refinado a partir de sorgo ceroso, sorgo normal y maíz amarillo. La segunda consistió en la conversión de almidones a jarabes glucosados y fructosados. Para llevar a cabo la segunda parte fue necesario diseñar procesos enzimáticos para licuificar el almidón a dextrinas, convertir las dextrinas a glucosa (sacarificación), refinar los jarabes fructosados e isomerizar parcialmente la glucosa en fructosa.

3.1 Materia prima

Se utilizaron 2 tipos de sorgo, uno con el endospermo ceroso y otro con el endospermo normal. El sorgo ceroso (ARG1) y el sorgo (ATX631) normal fueron proporcionados por el programa de fitomejoramiento de la Universidad de Texas A&M. El maíz amarillo utilizado se obtuvo de la compañía local AgroInsa a través del departamento de Tecnología de Alimentos del ITESM. El maíz obtenido y seleccionado fue el típico sembrado en el cinturón de maíz de los Estados Unidos.

Para la limpieza del grano, fue primeramente necesario remover materia de bajo peso. Esto se hizo dejando caer el grano desde una altura de 1 metro en oposición a una corriente de aire. Posteriormente el material se paso por un tamiz con orificios de 0.5 cm. Una vez tamizado los granos, se eliminaron manualmente los granos dañados, quebrados y cualquier otra partícula ajena al maíz y/o sorgos. Los granos limpios se empacaron en bolsas de polietileno en lotes de 1 Kg. y se almacenaron en refrigeración a 4°C (*Fisher Scientific Isotemp*, Conway, AR U.S.A) hasta el momento que se inicio el proceso de molienda húmeda.

3.1.1 Análisis químicos

El análisis proximal de los granos y almidones se llevó a cabo de acuerdo a los métodos aprobados por la A.A.C.C (1986) y la A.O.A.C (1990). La humedad se determinó mediante el método gravimétrico 44-16 de la A.A.C.C. La proteína se determinó a través del método MicroKjehdahl 960.52 de la A.O.A.C. Las cenizas se determinaron por el método 08-03 de la A.A.C.C. La cantidad de grasa o extracto etéreo y la cantidad de fibra cruda se determinaron por los métodos 32-20 y 32-10 de la A.A.C.C., respectivamente. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

3.1.2 Propiedades físicas

Se sometieron a un análisis que incluyó pruebas de medición de peso de 1000 granos, peso hectolítrico y textura de endospermo. El peso hectolítrico se determinó en el *Winchester Bushel Meter* de acuerdo a métodos oficiales de E.U.A. La textura del endospermo se determinó subjetivamente después de diseccionar 10 cariósides y observar la proporción de endospermo vítreo y endospermo harinoso o suave. El peso de 1000 granos se llevó a cabo pesando 100 granos seleccionados aleatoriamente en una balanza OHAUS *Analytica Plus* y el peso resultante se multiplicó por 10.

3.2 Molienda húmeda de maíz y sorgo

La molienda húmeda a nivel laboratorio se basó en la técnica implementada por Moheno Pérez (1994).

3.2.1 Remojo

Se pesaron 500 gr de grano limpio de maíz, sorgo ceroso y sorgo normal en base a 14 % de humedad. Los granos se colocaron en frascos de vidrio con tapadera, siendo sometidos a remojo en 1L de solución de bisulfito de sodio (ctl) y ácido láctico (DEQ S.A. de C.V.). La solución de remojo se preparó disolviendo 1.48 gr. de bisulfito de sodio y 4.7 ml de ácido láctico al 85% en 1L de agua destilada, la solución fue previamente calentada a 50°C en una incubadora (*Fisher-Scientific*, Pittsburg, PA U.S.A), hasta que alcanzó esta temperatura se adicionaron los granos y se colocaron en incubación a 50°C (*Fisher-Scientific*) por 48 hrs.

3.2.2 Molienda

Posterior al remojo el grano se separó en 2 porciones másicas equivalentes y se licuó a la máxima velocidad en una licuadora. Se tamizaron en una malla 40 las 2 porciones por separado. Cada fracción que fue retenida en la malla fue lavada con 150 ml de agua destilada; el agua para el lavado fue bombeada a un flujo de 100 ml/seg (Bomba peristáltica *Masterflex Cole Palmer*). Las 2 fracciones retenidas en la malla se juntaron y se lavaron con 200ml de agua destilada al mismo flujo en la malla 40.

El material que pasó la malla 40 durante todos los tamizados anteriores, se tamizó a través de la malla 100 para obtener la suspensión de almidón-gluten. Después el primer tamizado se lavó el material retenido en la malla 100 con 300 ml de agua destilada tal como se realizó en el primer lavado, y se unió esta fracción de lavado a la primera suspensión almidón-gluten. El material que no paso la malla se unió al retenido por la malla 40 y se secó a 50 °C (*Fisher-Scientific*) por 24 hrs para obtener fibra. La diferencia de

proceso entre maíz y sorgos en la molienda radicó en que para el sorgo se utilizó el doble de volumen de agua en cada tamizado.

3.2.3 Separación de fracciones

La suspensión de almidón y gluten obtenida se bombeó con un flujo de 100ml/seg (Bomba peristáltica *Masterflex Cole-Palmer*) a través de un canal de sedimentación para lograr separar el gluten del almidón. Para lograr la separación efectiva del almidón, el canal de sedimentación de 3m de largo se niveló y posicionó en un ángulo de 0.7 °. El almidón de primera con mayor densidad que el gluten se sedimentó en los primeros 270cm del canal y se recuperó. En los restantes 30cm se sedimentó el almidón de segunda, y lo que salió de el canal de sedimentación fue una solución de gluten. Para evitar pérdidas de sólidos y lograr obtener almidones más refinados la solución que salió del canal durante los primeros 5 min se recirculó. Después de que el total de la suspensión almidón-gluten fue bombeada a través de la canal se lavó el sedimentó con agua (3.5 L para sorgos y con 4.5 L para maíz). Cuando se terminó el lavado, el almidón se dejó por media hora a temperatura ambiente en la canal para deshidratarlo parcialmente. La suspensión de gluten se dejó sedimentar por 1 día para poder eliminar la mayoría de agua sobrenadante por decantación.

3.2.4 Secado

Se secaron todas las fracciones (fibra, almidón de primera, almidón de segunda y gluten) en una estufa de aire forzado (*Fisher-Scientific*) a 50° C durante 24 hrs. Posteriormente se dejaron enfriar por 1 hr a temperatura ambiente, se pesaron en una balanza (*Precision Plus Ohaus*) y se colocaron

en bolsas de polietileno. El almidón deshidratado se refrigeró en bolsas de polietileno a 4°C hasta su utilización y análisis.

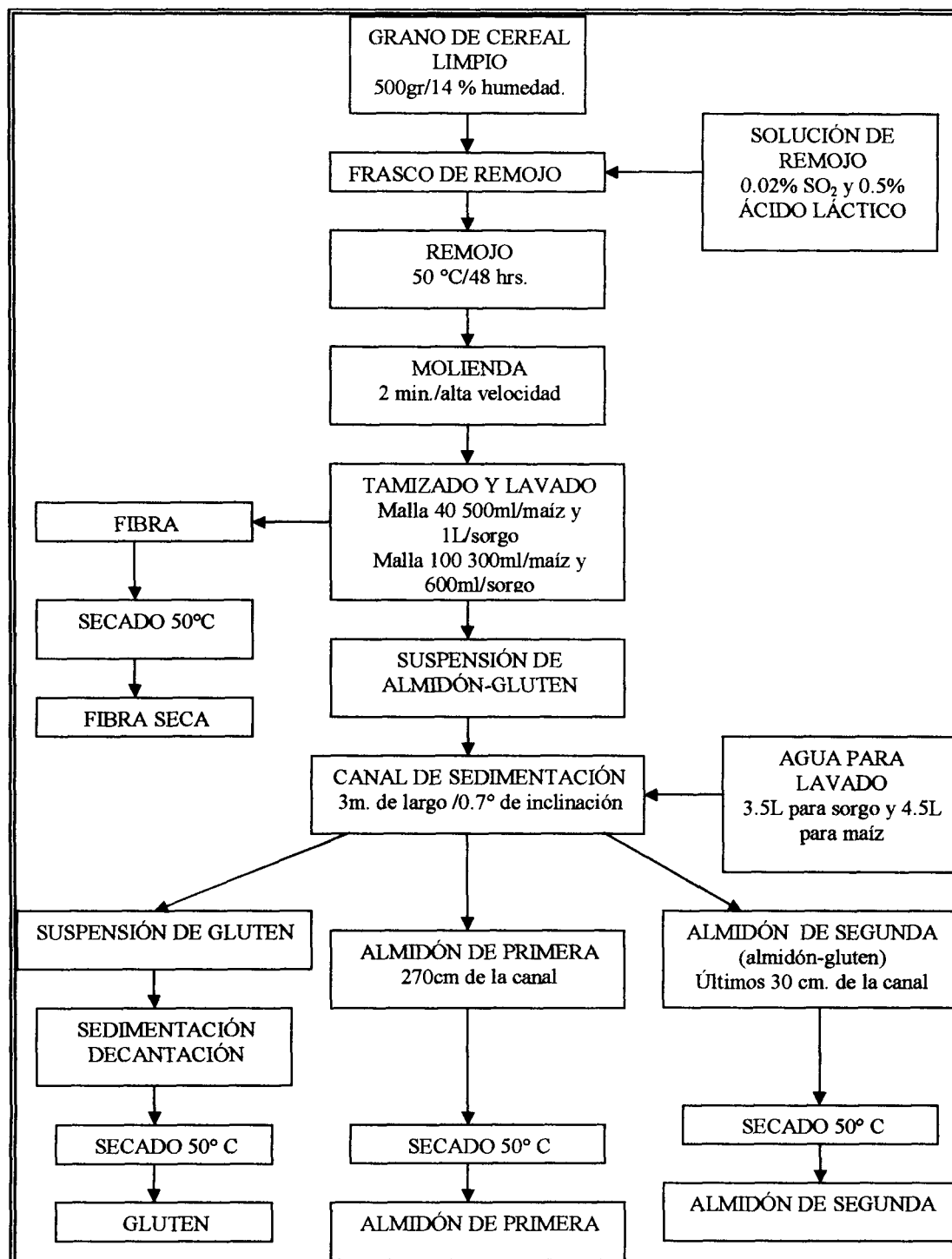


Figura 4. Diagrama de flujo del proceso experimental de molienda húmeda o refinación de almidón.

3.2.5 Calidad de los almidones

El contenido de proteínas y cenizas de los almidones se tomó como base para determinar la calidad de los mismos. La cuantificación la proteína se determinó a través del método MicroKjehdahl 960.52 de la A.O.A.C. (1990). El factor de conversión de nitrógeno a proteína fue de 6.25. Las cenizas fueron cuantificadas por el método gravimétrico 08-03 de la A.A.C.C. (1986), donde las muestras fueron incineradas a 550 °C.

3.2.5.1 Color de los almidones

Para la determinación del color de los almidones se utilizó un colorímetro (Minolta CR-300) basado en el sistema de color CIE (*Comisión internationale de l'Eclairage*) con la expresión numérica de CIE (L^* , a^* , b^*). Se calculó el valor de la diferencia total de color ΔE mediante la siguiente ecuación $(L^2 + a^2 + b^2)^{1/2}$.

Cuando un color se expresa en CIELAB, la L define la claridad, "a" denota el valor rojo/verde y "b" el valor amarillo/azul. Las figuras 4 y 5 muestran las gráficas de color para L, a y b. El eje "a" corre de izquierda a derecha. Una medición de color en la dirección +a muestra un desplazamiento hacia el rojo. En el eje "b" un movimiento hacia +b representa un cambio hacia el amarillo. El centro del eje L muestra $L=0$ (negro o absorción total) en el fondo. En el centro de este plano es neutral o gris.

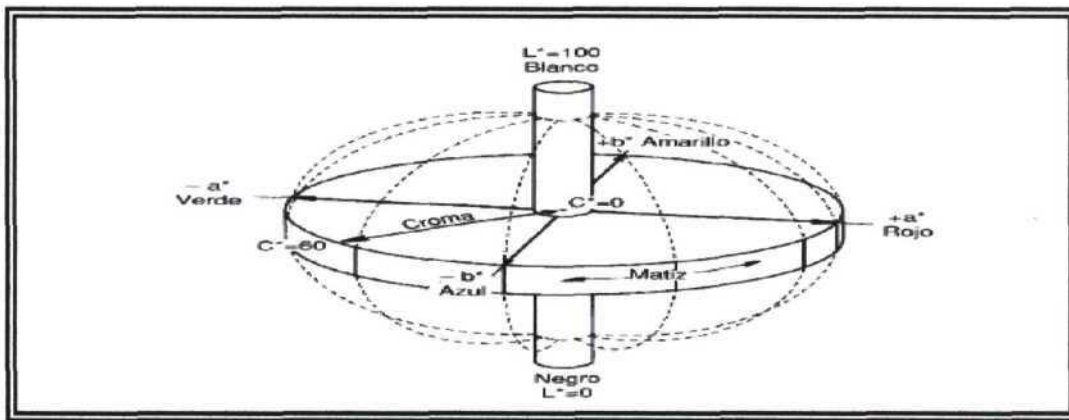


Figura 5. Gráfica de color de CIELAB en tres planos (L, a, y b). El valor de L^* se representa en el eje central. Los ejes a^* y b^* aparecen sobre el plano horizontal (X-Rite 2000).

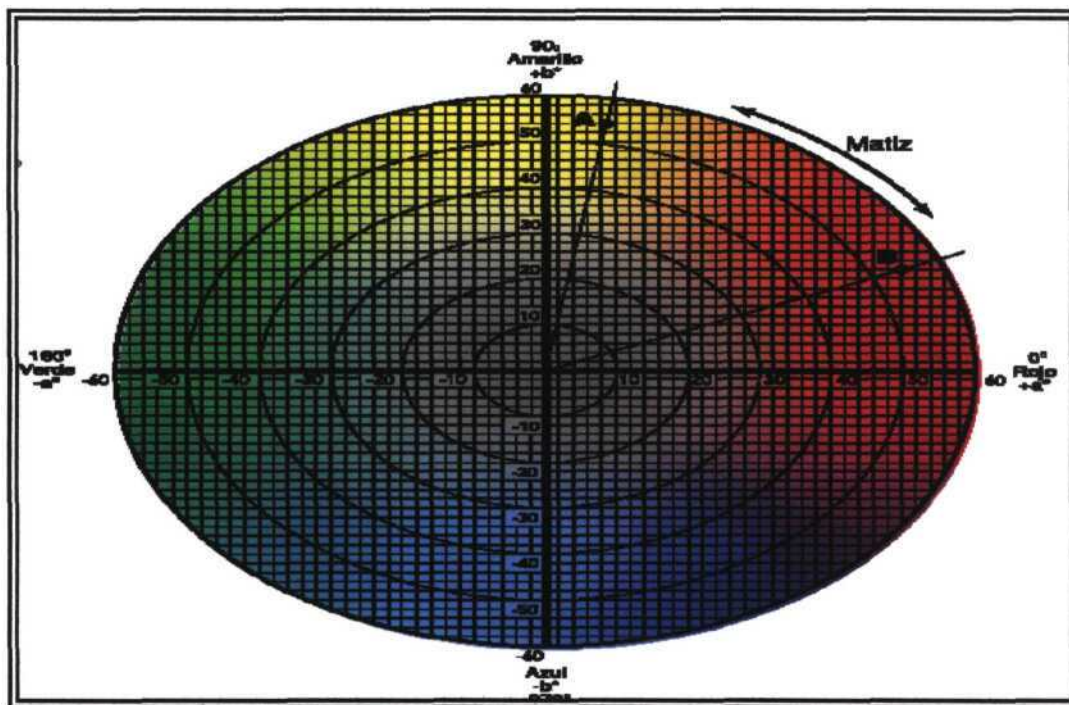


Figura 6. Gráfica de color de CIELAB en 2 planos (a y b) (X-Rite 2000).

3.3 Conversión enzimática de almidón a jarabes fructosados

El proceso de conversión enzimática constó de cuatro partes fundamentales: 1) Licuefacción; 2) Sacarificación; 3) Refinación e 4) Isomerización. Para estos cuatro procesos se utilizó el almidón de primera extraído del sorgo ceroso, sorgo normal y maíz.

3.3.1 Licuefacción

El objetivo de la licuefacción fue convertir la suspensión de almidón a una solución de dextrinas solubles. Se prepararon 500 ml de una suspensión al 30 % en peso de almidón-agua en un vaso de precipitado de 1000 ml, se agregaron 5 ppm de calcio como CaO y se ajustó el pH a 5.4 con ácido clorhídrico 0.1N. La suspensión obtenida se calentó a 70°C en baño maría con agitación manual. Una vez que la suspensión alcanzó esta temperatura se agregó 0.23 ml de enzima α – amilasa (Termamyl Supra, Novozymes). La suspensión se llevo hasta 85° C y se dejó a esta temperatura por 2.5 horas teniendo una agitación manual cada 10 min, el matraz fue cubierto con papel aluminio para minimizar pérdidas de agua. Durante esta etapa ocurrió simultáneamente la gelatinización y dextrinización del almidón. Terminado este proceso, se dejó enfriar el licuificado a temperatura ambiente hasta que fuera posible manipularse con las manos. El licuificado se tapó y se refrigeró a 4° C hasta ser utilizado.

3.3.2 Sacarificación

El volumen de licuificado se ajustó a 500 ml compensando el agua que podía haber perdido en la licuefacción. El pH de la solución se ajustó a 4.3 con ácido clorhídrico 0.1N y se calentó a 60°C en baño maría con agitación manual cada 10 min. Al alcanzar los 60° C se agregaron 6 ml de un complejo enzimático de glucoamilasas, pululanases y β -amilasas (Dextrozyme E, Novozyme). Esta mezcla se mantuvo así por 16 horas y se tomaron muestras a las 0.5, 1hra y posteriormente cada hora hasta llegar a las 16 horas de biocatálisis. La concentración de glucosa fue cuantificada de acuerdo a la técnica de glucosa oxidasa (Villaseñor, 1997).

3.3.3 Refinación

Se centrifugaron los jarabes resultantes a 4,000 rpm por 7 min. (centrífuga IEC centra MP4R), y los sedimentos fueron separados y descartados por decantación.

Los jarabes después de ser centrifugados fueron pasados por gravedad a través de una columna de 2.6 cm de ancho y 20 cm de largo empacada con 13 cm de carbón activado en gránulos de 2-3mm de diámetro (Activon G-61, PAIS). Se filtraron los jarabes al vacío con papel filtro (Whatman número 1), antes de ser pasados a través de las resinas.

Después de la filtración en carbón activado, se paso el jarabe centrifugado primeramente a través de una columna con resina aniónica (Diaion WA30, Supelco), la columna tenía las mismas proporciones que la del carbón activado y fue empacada de la misma forma.

Posteriormente el jarabe semirefinado se hizo pasar a través de una resina catiónica (Amberlite 200C, Fluka) empacada en una columna de las mismas proporciones que las anteriores.

La activación de ambas resinas se llevó a cabo de la misma forma, como se indica a continuación. La resina se virtió en un vaso de precipitado de 500 ml al cual se agregó suficiente agua destilada hasta pasar el nivel de la resina en aproximadamente 2 cm aproximadamente. Los contenidos se agitaron suavemente y se dejó reposar por 15 min. Se decantó el exceso de agua y se reemplazó por agua destilada fresca, se agitó nuevamente y se dejó reposar por 5 a 10 min. La segunda agua de lavado fue decantada y posteriormente se agregó *buffer* de fosfatos (DEQ S.A de C.V) con un pH

de 6.5 asegurando que los fenólicos, en el caso de la resina aniónica, y el calcio en el caso de la resina catiónica, estuvieran ionizados y pudieran ser separados.

3.3.4 Isomerización

La isomerización se llevó a cabo con glucosa isomerasa inmovilizada (Sweetzyme IT, Novozyme). Se empacaron 22.3 gramos de la enzima en una columna y se hizo fluir agua a través de la chaqueta de la columna a 64.5°C para mantener la temperatura adecuada. Se colocaron 100ml de jarabe glucosado (previamente ajustado el pH a 7.5 y adicionado 20 ppm de sulfato de magnesio (Analítica S.A de C.V)) en un vaso de precipitado el cual a su vez se colocó en una plancha hasta que alcanzó la temperatura de 60 °C , después de alcanzada esta temperatura se bombeo el jarabe glucosado a la columna a una razón de 1.5 ml/min, al concluir esta operación, se midió el volumen de jarabe que salió de la columna y esta se sustrajo a los 100 ml para conocer cantidad de jarabe que se retuvo en la columna y tuberías. Medido el volumen se aforó a 200 ml el jarabe fructosado.

El jarabe glucosado fue bombeado (Masterflex Microprocesor Pump) por 150 min con recirculación y se tomaron muestras a los 10, 20, 40, 60, 90, 120 y 150 min para medir la cantidad de fructosa producida. Para este propósito se utilizó el método de la glucosa oxidasa utilizado en la sacarificación, la cantidad de fructosa se midió indirectamente cuantificando la concentración de glucosa residual en el jarabe.

Después de obtenidos los jarabes fructosados se concentraron en un rotavapor (*Buchi*) a 70°C hasta alcanzar los 70 ° Brix.

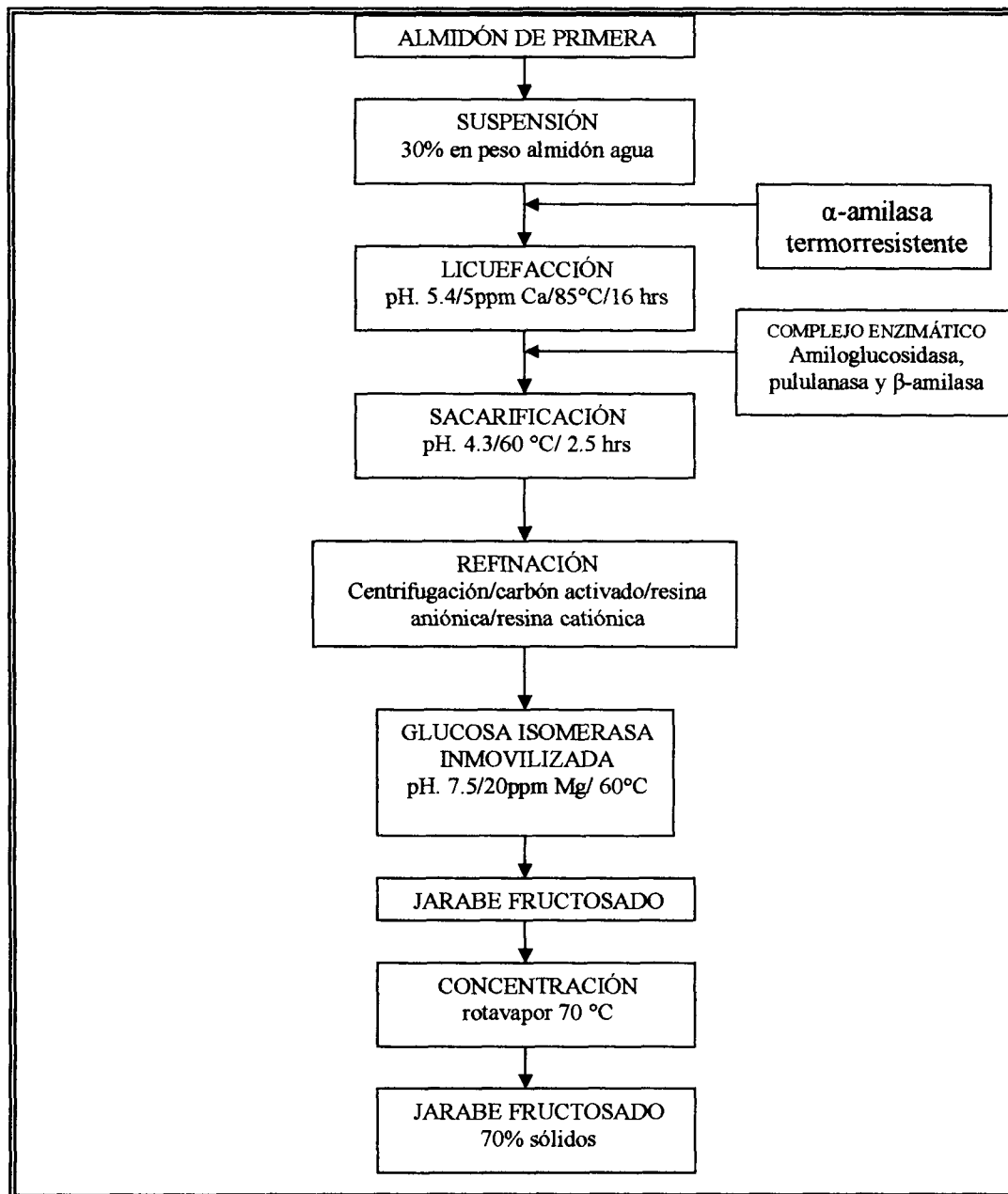


Figura 7. Diagrama de flujo para la obtención de jarabes fructosados a partir de almidón.

3.4 Determinación de características de los jarabes

3.4.1 Contenido de glucosa

Para la determinación de glucosa se utilizó el método de la glucosa oxidasa (Pipco, 2001), con el *kit* de ensayo de glucosa proporcionado por Sigma (número de producto GAGO-20). El método espectrofotométrico fue montado en un instrumento Beckman DU 50, midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm.

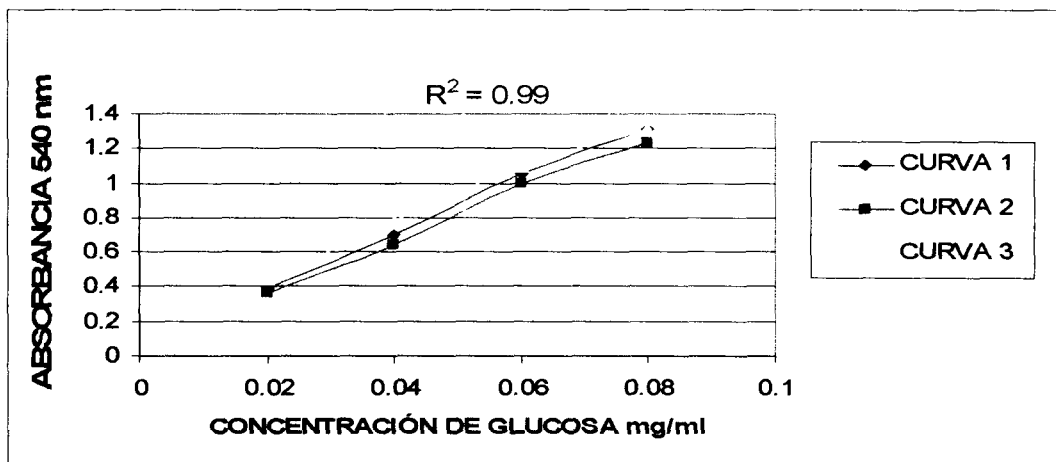


Figura 8. Curvas estándares de correlación absorbancia-concentración de glucosa.

Se obtuvo una curva estándar para correlacionar concentración de glucosa con absorbancia durante la sacarificación y la isomerización. Todas las correlaciones estuvieron por arriba de 0.99 y la ecuación promedio obtenida de las tres curvas fue:

$$X = \frac{Y - 0.1084}{15.0896} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde :

x = concentración de glucosa

y = absorbancia

3.4.2 Grados Brix

Los grados Brix de las muestras se midieron a temperatura ambiente con un refractómetro manual (Sagar Brix refractometer, Sper Scientific) con una escala de 0 a 80 unidades.

3.2.1.5 Color del jarabe

Para la determinación del color de los jarabes se utilizó la metodología utilizada para almidones en el apartado 3.2.6.

3.5 Modelación

Se llevaron a cabo dos modelaciones matemáticas para encontrar los parámetros cinéticos de cada una de las corridas promedio de sacarificación e isomerización. Para la sacarificación se utilizaron la modelación de Michaelis Menten y la modelación Logística, y para isomerización se utilizó la modelación de Michaelis Menten y la modelación exponencial. La metodología para la modelación Logística y la modelación exponencial se muestran en el anexo I.

La metodología utilizada para la modelación de Michaelis Menten fue la siguiente:

3.5.1 Modelación en sacarificación

Para encontrar la curva de simulación se utilizó la ecuación de Michaelis

Menten $v = \frac{V_{MAX}S}{K_m + S}$ en función al diferencial de producto $dp/dt = V_{max}$

(s)/K_m + s (ecuación 2). Con esta ecuación se obtuvo el cambio de la concentración de producto en el intervalo de tiempo de 1 min variando la K_m y la concentración inicial de sustrato, este cambio en el producto se fue sumando en una columna para obtener la concentración final de producto, además el cambio en la concentración de producto se multiplicó por -1 para obtener la disminución de sustrato también en el intervalo de tiempo de 1 min, la cantidad de sustrato se fue restando en una columna para conocer la concentración final de sustrato.

Para encontrar la diferencias entre la curva simulada y la obtenida experimentalmente, se restaron los valores experimentales a los valores de la simulación en los puntos de medición (30 min, 60min y así sucesivamente hasta las 960 min) y se elevaron al cuadrado, al final se sumaron los cuadrados. Se busco el mínimo valor en la suma de cuadrados variando K_m y la concentración inicial de sustrato. Para encontrar el mínimo se utilizó la función solver del paquete estadístico de Excel.

Se determinó y se fijó la V_{max} a partir de los primeros puntos de las curvas en donde tuvieran una correlación mayor a 0.95.

3.5.2 Modelación en isomerización

Se llevo a cabo de la misma manera que en sacarificación, solo que en este caso se obtuvo $ds/dt = -(V_{max} (s)/K_m + s)$ (ecuación 3) en el intervalo de tiempo de 0 a 2.5 hrs.

3.6 Análisis estadístico para los datos experimentales.

Se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico JMP^R versión 5.0 (SAS Institute INC. Cary, NC U.S.A). Se llevó a cabo análisis de varianza (ANOVA) y separación de medias a través de la prueba LSD ($p < 0.05$).

4. RESULTADOS Y DISCUSION

En este capítulo se presentan y discuten los resultados del proceso experimental que se siguió. El lector recordará que en este estudio se analizaron tres tipos de granos, maíz y dos tipos de sorgo con propiedades contrastantes en su composición de almidón. Es propósito central de esta sección, comparar rendimientos, calidades y en resumen factibilidad de utilización de sorgo de endospermo normal o ceroso como alternativa al uso de maíz para obtener jarabes dextrinizados, glucosados y fructosados.

4.1 Análisis químico proximal de los granos.

Los resultados del análisis químico proximal para cada uno de los granos estudiados se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Análisis químico proximal de maíz, sorgo ceroso y sorgo normal.

	Maíz		Sorgo ceroso		Sorgo normal	
	Porcentaje promedio	Desviación estándar	Porcentaje promedio	Desviación estándar	Porcentaje promedio	Desviación estándar
Humedad	13.28	0.21	12.71	0.06	13.63	0.02
Proteína	7.25	0.10	10.88	0.13	10.72	0.04
Cenizas	1.08	0.19	1.14	0.02	1.7	0.24
Grasa	3.71	0.05	1.15	0.62	1.14	0.88
Fibra cruda	1.66	0.12	0.51	0.03	1.08	0.43
^{&} ELN	73.02	0.45	73.61	0.61	71.73	1.12

[&] ELN = Extracto libre de nitrógeno

Cada valor es el promedio de 3 observaciones. Los valores están expresados en base húmeda.

La composición química de los granos de sorgo ceroso, sorgo normal y maíz utilizados en la investigación concuerda con la reportada en literatura (Rooney y Serna Saldivar 1991, Moheno Pérez *et al.*, 1999, Serna-Saldivar *et al.*, 2003). La composición química de estos cereales es muy similar entre sí, excepto en cantidad de proteína, la cual fue superior en los sorgos. El extracto libre de nitrógeno, fracción donde se encuentra todo el almidón, fue muy similar entre los granos estudiados. Esto implica que los tres tipos de grano tienen (en principio) el mismo potencial como materias primas para la obtención de almidón y jarabes¹.

4.2 Análisis de propiedades físicas de los granos

Con el propósito de validar la calidad de los granos utilizados, se determinaron sus propiedades físicas (en específico peso de 1000 granos, peso hectolítrico² y textura del endospermo). Los resultados de dichas evaluaciones se reportan en la Tabla 2. Estos resultados indican que ambos tipos de sorgo se encuentran dentro de las especificaciones para granos de alta calidad (Rooney y Serna Saldivar, 1991, Osorio Morales *et al.*, 2000, Villaseñor Medina, 1997). Los parámetros para el maíz también se encuentran dentro de los esperados para un maíz suave dentado (Rooney y Serna Saldivar, 1991).

¹ Posteriormente se discutirá la validez de esta aseveración, al comparar rendimientos experimentales

² La relevancia de estos parámetros físicos como factores de calidad del grano se refiere en la sección de Literatura revisada.

Tabla 2. Propiedades físicas de maíz, sorgo normal y sorgo ceroso.

	Promedio	Desv. estándar	Promedio	Desv. estándar	Promedio	Desv. estándar
Peso 1000 granos	359.66	0.28	30.66	0.58	26.33	0.57
Peso hectolítrico kg/HL	74.68	0.86	79.53	0.10	78.78	0.55
Textura de endospermo ^a	Suave		Intermedio		Intermedio	

^a Determinado subjetivamente observando granos disectados

4.3 Rendimiento de fracciones de molienda húmeda

En la Tabla 3 se reportan rendimientos de almidón y diferentes subproductos para los tres tipos de granos analizados. En lo que respecta a extracción de gluten y almidón de segunda, no existió una diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los distintos granos estudiados. El maíz rindió entre 5 y 6 % más almidón que los sorgos. Durante la etapa de lavado de la fibra en la molienda húmeda se observaron diferencias de comportamiento entre el maíz y los dos sorgos. Por ejemplo, fue necesario utilizar el doble de agua para extraer el almidón residual de la fibra para el caso de ambos sorgos. Mientras que para el caso del lavado de maíz, el agua de salida ya no presentaba un aspecto lechoso, lo que si ocurrió para ambos tipos de sorgo (indicativo de presencia residual de almidón). Obsérvese el renglón referente a contenido de fibra de la tabla 3. Para ambos sorgos, el valor de fibra determinado es mayor que para el caso del maíz. Se puede inferir

entonces, que aún después de lavar con el doble de volumen de agua, en la fracción de fibra de los sorgos aún se retuvo almidón residual.

Las diferencias observadas en rendimientos de almidón a favor del maíz concuerdan con los resultados de Moheno *et al.*, (1999). Los mismos autores reportan rendimientos de almidón para el sorgo ceroso y el sorgo normal un poco menores a los obtenidos en este estudio. Esta diferencia se sustenta en lo reportado en literatura (Rooney y Serna Saldivar, 1991). Los sorgos presentan mayor dificultad en la extracción del almidón, pues se encuentra mayormente asociado a la matriz proteica o gluten. Según Watson *et al.*, (1955) esto se debe según a la presencia de endospermo periférico y a que los gránulos de almidón están más fuertemente cubiertos por la matriz proteica, lo que hace más difícil la separación de almidón y gluten. La matriz y cuerpos proteicos del sorgo tienen una mayor cantidad de puentes de disulfuro que las proteínas del endospermo del maíz y por consiguiente son más difíciles de hidrolizar (Wall y Paulis, 1978).

Al comparar ahora rendimientos para ambos sorgos. Se esperaría un porcentaje mayor de almidón de sorgo ceroso en comparación con lo encontrado en sorgo normal, ya que el sorgo ceroso no contiene endospermo periférico o capa de subaleurona y además posee una matriz proteica más débil. Se ha reportado (Rooney y Pflugfelder, 1986) que la estructura y morfología del sorgo ceroso es mas parecida a la del grano de maíz y por lo tanto debería comportarse de manera similar a este en cuanto a rendimientos de extracción de almidón. No obstante, los rendimientos de almidón para sorgo ceroso fueron menores que los de sorgo normal y maíz (sin embargo, la diferencia entre ambos sorgos en este rubro no es significativa ($p>0.05$)).

Tabla 3. Efecto del tipo de grano en los rendimientos de fracciones de molienda húmeda para maíz, sorgo ceroso y sorgo normal.

	Maíz		Sorgo ceroso		Sorgo normal	
	Base seca %	Desv. estándar	Base seca %	Desv. estándar	Base seca %	Desv. estándar
Almidón	66.71a ¹	1.01	60.27b	1.36	61.05b	1.84
Almidón de segunda	2.79a	0.44	3.61a	0.42	2.82a	0.53
Fibra	15.22b	0.56	21.99a	2.17	23.00a	0.88
Gluten	10.86a	1.41	12.93a	2.16	11.07a	1.28

¹Letras diferentes entre columnas indican que los valores son significativamente diferentes (LSD test, $p > 0.05$)

4.3.1 Grado de refinación de los almidones

Los parámetros de calidad para cuantificar el grado de refinación de los almidones utilizados fueron los contenidos de proteína, cenizas y color (ver Tabla 4).

Tabla 4. Efecto del tipo de grano en el contenido de proteína y cenizas en almidones.

	Humedad %	Desv. estándar	Proteína %	Desv. estándar	Cenizas %	Desv. estándar
Maíz	5.42	0.51	0.43	0.01	0.03	0.01
Maíz	4.65	0.16	0.50	0.04	0.03	0.01
Maíz	8.86	0.27	0.65	0.14	0.08	0.01
Promedio	6.31		0.53b¹		0.05b	
Sorgo ceroso	3.29	0.68	0.59	0.03	0.08	0.06
Sorgo ceroso	5.73	0.02	0.54	0.01	0.11	0.01
Sorgo ceroso	6.3	0.50	0.81	0.08	0.12	0.06
Promedio	5.10		0.65ab		0.10a	
Sorgo normal	4.7	0.13	0.73	0.01	0.04	0.08
Sorgo normal	4.17	1.22	0.83	0.07	0.07	0.06
Sorgo normal	7.73	1.44	0.76	0.07	0.06	0.047
Promedio	5.53		0.78a		0.07ab	

¹Letras diferentes entre promedios indican que los valores son significativamente diferentes (LSD test, $p < 0.05$)

Cada valor es el promedio de tres observaciones.

4.3.1.1 Contenido de proteína del almidón

El gluten es separado del almidón de molienda debido a su más baja densidad (1.1 g/cm^3) en comparación con la del almidón (1.5 gr/cm^3), lo que permite la separación por sedimentación o centrifugación. Sin embargo el almidón puede contener proteína cuando el proceso de separación es deficiente (Watson, 1984). El contenido residual de proteína en el almidón

es entonces un indicador de eficiencia del proceso de separación proteína-almidón, y por tanto un parámetro de calidad del producto.

Watson (1984) y May (1987) reportan que el contenido de proteína en almidones producidos industrialmente, bajo condiciones convencionales de operación debe ser inferior a 0.3% para ser considerados de primera calidad.

Los resultados de contenido de proteína en los almidones de primera presentados en la Tabla 4 están por encima de los documentados por Watson (1984) y Serna Saldivar *et al.*, (2003), pero están por debajo de aquellos observados por Moheno *et al.*, (1999) y similares a Villaseñor (1997) en estudios similares al aquí presentado. Por lo tanto los almidones extraídos en este estudio pueden considerarse como de calidad aceptable.

En general el contenido promedio de proteína en almidones de maíz se encuentra por debajo de los dos sorgos. Esto es debido a que además de que *per se* el sorgo presenta mayor cantidad de proteína, también contiene endospermo periférico y proteínas entrecruzadas que se quedan ligadas a los gránulos de almidón que conforman (Watson, 1984). La textura suave del endospermo del maíz (evaluada subjetivamente por inspección visual, Serna-Saldivar, comunicación personal) favoreció que los gránulos de almidón se separaran más fácilmente y con menor residuo de proteína (Tabla 4).

El promedio de proteína del almidón de sorgo ceroso fue menor al de sorgo normal y esto se puede considerar lógico puesto que el sorgo ceroso posee una matriz proteica más débil que los sorgos normales lo que hace más fácil de separar.

4.3.1.2 Contenido de ceniza del almidón

El contenido de cenizas en los almidones como criterio de calidad ha sido poco referenciado en la literatura, Watson (1984) reporta que los almidones de maíz o sorgo contienen aproximadamente 0.1%, mientras que Kulkarni *et al.*, (1987) reporta valores más altos para almidones obtenidos comercialmente en la India. Estos autores reportan valores promedio de 0.3% a 0.4%.

Los valores de contenido de ceniza reportados en la Tabla 4 oscilan entre 0.03 y 0.12%, lo que los sitúan dentro de los rangos citados en bibliografía y los obtenidos por Serna Saldivar *et al.*, (2003), Villaseñor (1997) y por debajo de los resultados obtenidos por Moheno *et al.*, (1999).

El mayor contenido de cenizas se observó en el sorgo ceroso, seguido por el sorgo normal y por último el maíz. El análisis estadístico de este indicador de calidad solo percibe como significativa la diferencia entre sorgo ceroso y maíz (prueba LSD, $p < 0.05$).

4.3.1.3 Color de los almidones

En general, el almidón de maíz sin modificar es un polvo blanco con una tonalidad pálida amarilla y el sorgo rosa pálido. En el caso particular del sorgo, esta coloración rosada se deriva de la presencia de compuestos fenólicos presentes en el pericarpio (Watson, 1984). Sin embargo, para que un almidón se considere de alta calidad, su color debe ser lo más cercano al blanco (Watson, 1984), si esto no sucediera se puede llevar a cabo un

proceso de blanqueado con peróxido de hidrógeno, permanganato de potasio, hipoclorito de sodio y clorito de sodio (May, 1987).

Tabla 5. Color de almidones deshidratados obtenidos a partir de maíz, sorgo ceroso y sorgo normal

	L*	a*	b*	ΔE^+
Maíz 1 ^{ra}	95.85	-1.47	5.37	96.01
Maíz 2 ^{da}	95.60	-1.43	5.16	95.76
Maíz 3 ^{ra}	95.65	-1.53	5.47	95.80
Sorgo ceroso 1 ^{ra}	95.70	-0.32	2.18	95.72
Sorgo ceroso 2 ^{da}	95.88	-0.38	2.32	95.90
Sorgo ceroso 3 ^{ra}	95.47	-0.41	2.14	95.49
Sorgo normal 1 ^{ra}	96.14	-0.35	1.78	96.15
Sorgo normal 2 ^{da}	95.60	-0.33	1.65	95.61
Sorgo normal 3 ^{ra}	95.52	-0.41	1.63	95.53

*L define la claridad +L blanco y -L negro, y a y b denotan +a rojo, -a verde, +b amarillo y -b azul (ver materiales y métodos figuras 5 y 6).

⁺ ΔE (valor de diferencia total de color) se obtiene de la siguiente ecuación $\Delta E = (L^2 + a^2 + b^2)$

Se puede observar en los resultados mostrados en la tabla 7 que los almidones tienen un color similar al blanco y se encuentran dentro del parámetro de calidad. Cabe mencionar que los valores de L y E casi tuvieron los valores máximos posibles (100). Valores de 100 de L y E indican el mayor valor de blancura posible. Este resultado es relevante, pues indica que el proceso de extracción de almidón fue efectivo en términos de remoción de pigmentación, evitándose entonces la necesidad de una etapa de “blanqueo” químico posterior que implicaría un costo adicional de proceso.

4.4 Conversión enzimática de almidón a jarabes fructosados

En esta subsección se presentan y discuten los resultados correspondientes a las etapas de transformación de almidón a jarabes fructosados. En esta secuencia se incluyen procesos de: (a) licuefacción enzimática (utilizando α -amilasa termoresistente); (b) sacarificación utilizando un complejo

enzimático constituido por tres enzimas (amiloglucosidasa, pululanasa y β -amilasa); (c) refinación que consiste en una centrifugación y posteriores etapas secuenciales de filtrado en carbón activado, una resina aniónica y una resina catiónica³, y (d) isomerización utilizando un sistema de glucosa-isomerasa.

4.4.1 Licuefacción

Durante esta etapa, el almidón se hidroliza parcialmente en dextrinas. El producto es una mezcla de dextrinas lineales y ramificadas con una distribución de pesos moleculares dependiente de factores tales como la estructura del almidón, tiempo y condiciones de reacción. En principio, es posible seguir la evolución de esta reacción midiendo la cantidad de extremos reductores expuestos por la hidrólisis (expresados como equivalentes de dextrosa). Es importante hidrolizar el almidón por el tiempo suficiente ya que la eficiencia del siguiente paso (sacarificación) depende mucho del grado de hidrólisis obtenido durante la licuefacción (se recomiendan 20 equivalentes de dextrosa) (Wiseman, 1991). Entre más equivalentes de dextrosa se tenga más disponible estará el sustrato (para el complejo enzimático constituido por amiloglucosidasa, pululanasa y β -amilasa. En este estudio no se realizaron determinaciones de eficiencia de esta etapa, pero se seleccionaron condiciones de proceso que asegurasen una alta conversión de almidón a dextrinas: pH=5.4, temperatura=85 °C, y concentración de iones Ca^{+2} =5 ppm (de acuerdo a especificaciones recomendadas por el proveedor de la enzima). Se especificó un tiempo de proceso de 2.5 horas (superior a la recomendación del proveedor).

³ Las especificaciones de las enzimas y resinas utilizadas se presentan en la sección de material y métodos.

4.4.2 Sacarificación

En general, la sacarificación contempla el uso de la enzima amiloglucosidasa, algunas veces complementada con pululanasa y β -amilasa para obtener el jarabe glucosado con un alto valor de conversión (Wiseman, 1991). En reportes previos, se documenta el uso de amiloglucosidasa en un reactor de recirculación acoplado a membrana, obteniéndose rendimientos altos en el proceso de conversión de jarabes dextrinizados a jarabes glucosados (Villaseñor, 1997). En este estudio, se aborda la etapa de sacarificación con variaciones sustantivas. Se utiliza un complejo enzimático que incluye una amiloglucosidasa, una pululanasa, y una β -amilasa con el propósito de mejorar el desempeño global del proceso bio-catalítico. Se incorporan herramientas estadísticas para validar la existencia de diferencias significativas en el comportamiento de la curva de conversión de los tres jarabes estudiados. Se proponen tres diferentes modelos de ajuste a los datos experimentales (un modelo de Michaelis-Menten, un modelo Gompertziano y un modelo logístico). Se evalúa la calidad de ajuste de cada modelo a los datos experimentales, y se discute la significancia física de los valores identificados para cada modelo. Finalmente, se comparan valores de rendimiento, conversión, y velocidad de reacción, para cada uno de los jarabes estudiados.

La Tabla 6 muestra resultados promedio de concentración final de glucosa, concentración de sólidos disueltos (expresada como grados Brix) y porcentajes de conversión para cada uno de los jarabes glucosados obtenidos.

Se utilizaron 150 gr de almidón (con una concentración de 300 mg/ml) de cada uno de los cereales convirtiéndose a glucosa (en promedio) 132.09gr

de almidón de maíz, 132.51gr de almidón de sorgo ceroso y 125.49 de almidón de sorgo normal (los porcentajes de conversión se muestran en la Tabla 6).

Tabla 6. Concentración final promedio de glucosa en jarabes, obtenido de los diferentes tipos de almidón, y porcentaje total de conversión de almidón a glucosa.

	°Brix	Almidón mg/ml	Glucosa mg/ml	Porcentaje de conversión
Maíz	27.16	300	264.18a ¹	88.06
Sorgo ceroso	28.33	300	265.02a	88.34
Sorgo normal	27	300	251.85a	83.66

¹Letras diferentes entre concentraciones de glucosa indican que los valores son significativamente diferentes (LSD test, $p < 0.05$)

De acuerdo con Lloyd y Nelson (1984), las dextrinas lineales son convertidas rápidamente a glucosa cuando se someten a una hidrólisis con amiloglucosidasa y las ramificadas son menos susceptibles al ataque enzimático debido a que la amiloglucosidasa corta más lentamente a los enlaces glucosídicos α -1,6. Esto implicaría que el sorgo ceroso tardaría más tiempo en alcanzar máxima conversión ya que más del 95% de almidón está conformado por moléculas de amilopectina y de cadenas ramificadas con enlaces glucosídicos α -1,6. Debido a la baja velocidad de hidrólisis de enlaces α -1,6 por la enzima amiloglucosidasa, Hebeda (1987) propuso el uso combinado de esta, con la enzima desramificante pululanasa para incrementar la velocidad reconversión a glucosa. De hecho, el complejo enzimático que se utilizó en este trabajo incluye una pululanasa. Adicionalmente, la enzima β -amilasa hace también un trabajo sinérgico y complementario, ayudando en la hidrólisis rompiendo enlaces α -1,4 cada dos monómeros de glucosa.

En la Figura 9 se muestran las curvas promedio de evolución de la concentración de glucosa (producto) con respecto al tiempo, para cada uno de los jarabes obtenidos de los diferentes tipos de grano en estudio. El resultado del trabajo combinado de las tres enzimas del complejo utilizado, se ve reflejado en una aparente igualdad⁴ en el valor de las velocidades iniciales de conversión para los diferentes tipos de jarabe.

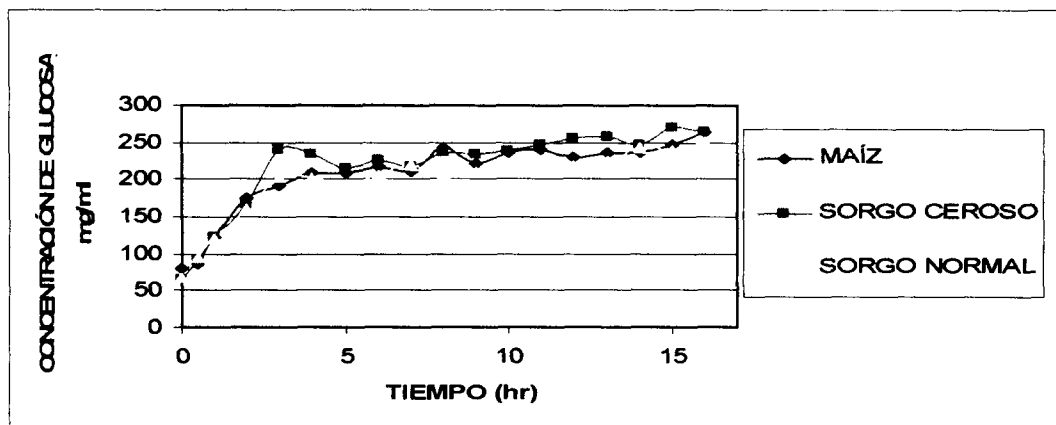


Figura 9. Curva de conversión a glucosa de almidones de maíz, sorgo ceroso y sorgo normal previamente licuificados.

En la Figura 9 también se observa aparentemente una conversión final mayor para el caso de los jarabes dextrinizados de sorgo ceroso y maíz. Para validar la significancia de equivalencias o diferencias de velocidades y conversiones, se sometieron los datos experimentales a distintos procedimientos de ajuste.

Las Figuras 10, 11 y 12, muestran el ajuste de los datos experimentales de curvas de conversión a un modelo Michaelis Menten (M-M)⁵ para jarabes glucosados provenientes de maíz, sorgo normal y sorgo ceroso respectivamente. El modelo clásico M-M consta de dos parámetros de

⁴ Posteriormente se presentará validación estadística de esta aseveración.

⁵ Los detalles de implementación del ajuste se describen en la sección de Materiales y Métodos.

ajuste (K_m y v_{max}). Sin embargo, en el ajuste se incluyó como parámetro adicional la concentración inicial de sustrato. De estos tres parámetros, el valor de v_{max} se fijó en base al análisis de pendientes de las curvas de conversión (figuras 10, 11, y 12).

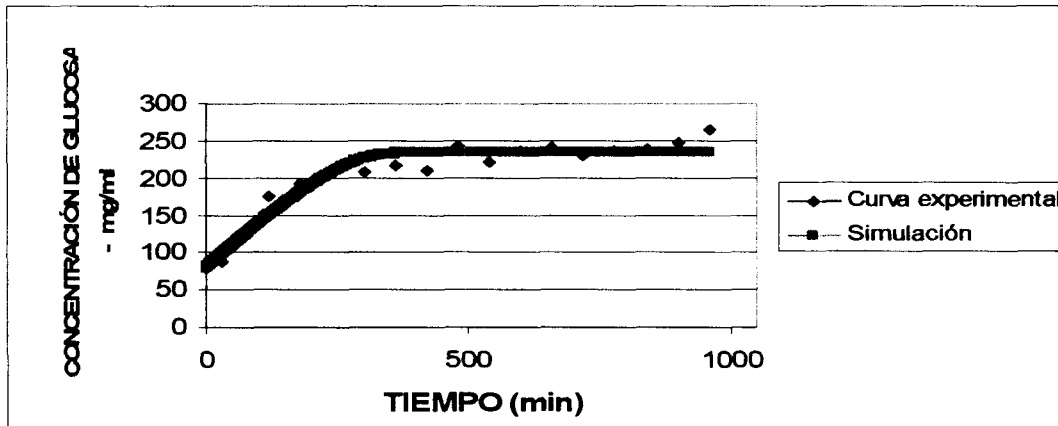


Figura 10. Comparación entre curva obtenida experimentalmente en la sacarificación de almidón de maíz y la curva ajustada por simulación matemática. El mínimo valor de la sumatoria de cuadrados para el ajuste fue de 3366.73 (ver materiales y métodos).

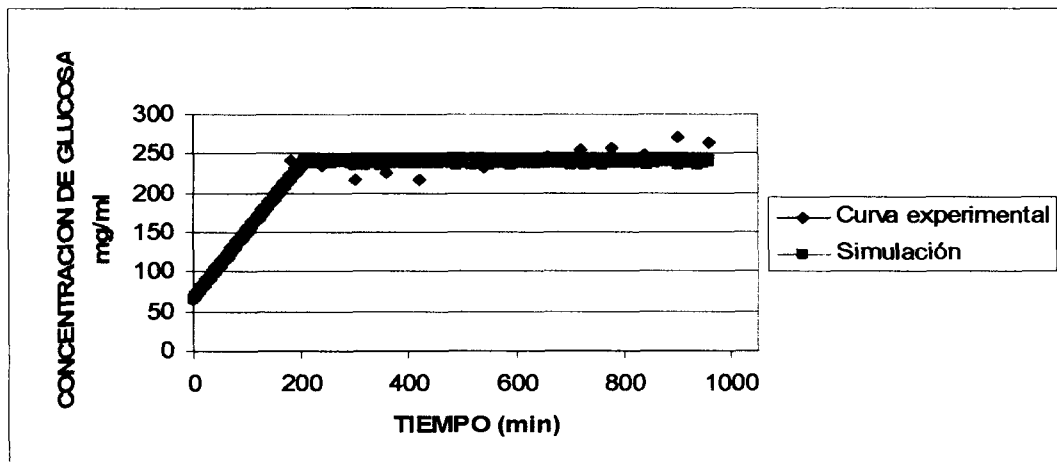


Figura 11. Comparación entre curva obtenida experimentalmente en la sacarificación de almidón de sorgo ceroso y la curva ajustada por simulación matemática. El mínimo valor de la sumatoria de cuadrados para el ajuste fue de 3860.15 (ver materiales y métodos).

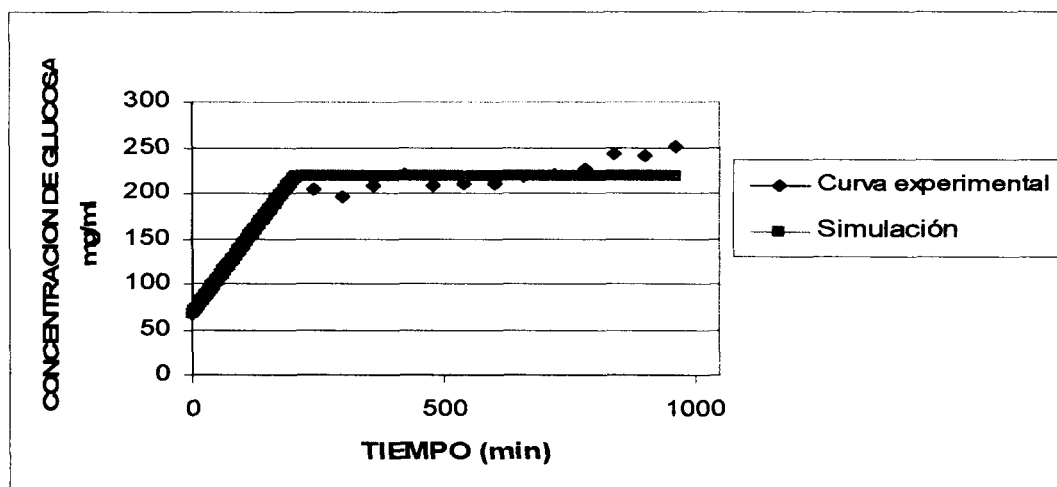


Figura 12. Comparación entre curva obtenida experimentalmente en la sacarificación de almidón de sorgo normal y la curva ajustada por simulación matemática. El mínimo valor de la sumatoria de cuadrados para el ajuste fue de 3540.33 (ver materiales y métodos).

Se aclara que en general, el valor de V_{max} no es equivalente al valor de velocidad inicial, pero para el caso de los experimentos aquí reportados tal consideración es válida. El comportamiento lineal de las curvas de conversión se extiende al menos por periodos de tiempo de 180 minutos (coeficiente de correlación $r^2 > 0.95$ en todos los casos). Esto implica que, en este tiempo la velocidad de reacción es independiente de la concentración de sustrato. Durante este tiempo, la concentración de sustrato varía significativamente⁶. Amplias variaciones de concentración de sustrato con un valor de velocidad invariable solo son posibles en condiciones cercanas a V_{max} , de manera que es justificable suponer el valor característico de la región lineal como equivalente a V_{max} . Los valores de los dos parámetros restantes del modelo, se obtuvieron por ajuste utilizando la función “solver” de la hoja de cálculo de Excel (Microsoft R). La tabla 7 resume los

⁶ En el periodo de comportamiento lineal de la velocidad de reacción, ocurre entre al menos el 50% de conversión de sustrato.

valores de los parámetros cinéticos obtenidos por esta estrategia. Los valores de K_m (en todos los casos bajos con relación a la concentración inicial de sustrato) implicarían una alta afinidad de la enzima por el sustrato. Esto es consistente con el hecho de que las curvas de conversión muestren comportamientos lineales prolongados. Si el valor de K_m es muy pequeño relativo a s , entonces $K_m + [S]$ es aproximadamente igual a $[S]$, y ambos factores se eliminan, obteniendo una igualdad entre v y V_{max} (prueba de consistencia con nuestra suposición para selección de v_{max}).

$$v = \frac{V_{MAX} S}{K_m + S}$$

Tabla 7. Parámetros cinéticos obtenidos de la modelación matemática a través de la ecuación de Michaelis Menten en la sacarificación de dextrinas de maíz, sorgo ceroso y sorgo normal.

	Vmax mg/min	Km mg/ml	Sustrato inicial (s) mg/ml
Maíz	0.68	20.09	154.74
Sorgo ceroso	0.85	0.23	176.28
Sorgo normal	0.74	0.35	152.37

Los parámetros cinéticos se calcularon por ajuste al modelo de Michaelis Menten $v = V_{max} [s]/(K_m + [s])$.

El valor de V_{max} fue superior en sorgo ceroso comparado con maíz y sorgo normal. Esto nos indica que fue mayor la velocidad de conversión de sustrato a producto en sorgo ceroso. Esto podría representar una ventaja competitiva de un proceso industrial basado en sorgo ceroso que implicaría reactores más compactos o tiempos de residencia más cortos (en un reactor

continuo). El valor de Km fue menor en el sorgo ceroso debido a que el complejo enzimático contenía la enzima pululanasa que rompe los enlaces α -1,6, estos enlaces se encuentran en mayor cantidad en el sorgo ceroso por lo cual el complejo es mas afin al sustrato, en este caso el almidón de sorgo ceroso.

Adicionalmente, se llevó a cabo un segundo procedimiento de modelación, esta vez basado en argumentos estadísticos. Los datos experimentales se ajustaron a un modelo logístico⁷:

$$y = \frac{a}{(1 + b * \exp(-c * t))}$$

En este modelo, **a** es la población máxima o carga máxima del sistema ecológico (concentración máxima de glucosa en el contexto de este estudio), **b** es la población inicial (concentración inicial de glucosa) y **c** es una tasa de crecimiento (parámetro análogo a una velocidad de reacción).

El desarrollo de este segundo procedimiento de ajuste y de la validación estadística correspondiente se presenta en el anexo I⁸. La figura 13 ilustra la calidad de ajuste del modelo logístico a los datos experimentales.

⁷ El modelo logístico es ampliamente utilizado en el área de ecología y dinámica de poblaciones.

⁸ Este desarrollo fue realizado por la Dra. Rebeca Romero Alvarez, profesora del Departamento de Matemáticas del ITESM, campus Monterrey.

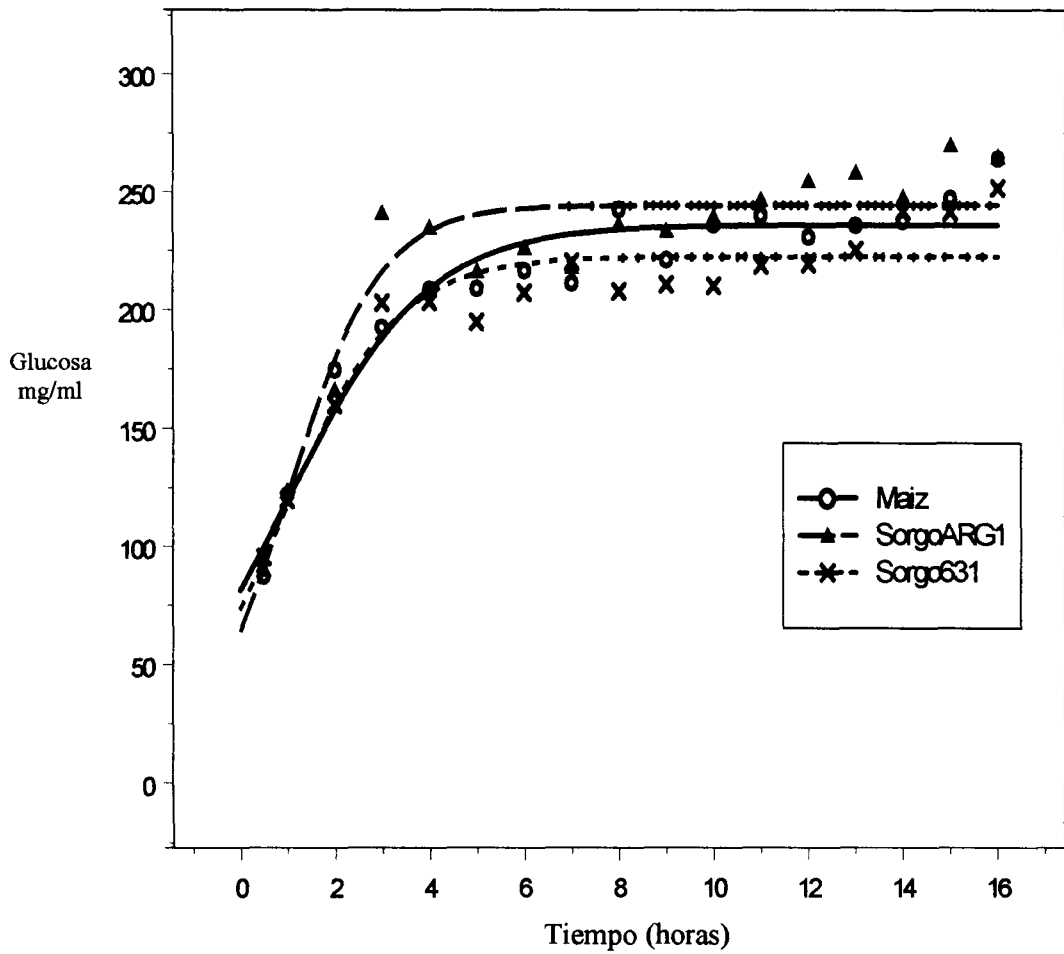


Figura 13. Curvas logísticas ajustadas a cada una de las concentraciones de glucosa para maíz, sorgo ARG1 y sorgo 631. ARG 1 significa sorgo ceroso y 631 significa sorgo normal.

Tabla 8. Resultados de los tres ajustes a los datos cada tratamiento (glucosa) con el modelo Logístico $y(t) = a / (1 + b_i e^{-ci t})$ donde **a** es la concentración máxima, **b** es la concentración inicial y **c** es la tasa de crecimiento. (Contribución de la Dra. Rebeca Romero Alvarez, Departamento de Matemáticas del ITESM, Campus Monterrey).

Tratamiento	Parámetros		Desviación estándar del parámetro estimado	Correlación entre parámetros		
				ab	ac	bc
Maíz	a	236.2	4.6939	-0.0092	-0.44	0.655
	b	1.90302	0.329284			
	c	0.6711	0.109435			
Sorgo ceroso	a	244.522	4.23009	-0.0282	-0.329	0.726
	b	2.82297	0.566327			
	c	1.02416	0.160117			
Sorgo normal	a	222.786	4.40971	-0.009	-0.383	0.676
	b	2.04473	0.401412			
	c	0.824175	0.147164			

Los resultados de la aplicación de esta prueba a los parámetros estimados indican que la concentración final de glucosa del sorgo ceroso es mayor que la concentración final de glucosa del maíz, la concentración final de glucosa del maíz es mayor que la concentración final de glucosa del sorgo normal y la concentración de glucosa del sorgo ceroso es mayor que la concentración de glucosa en el sorgo normal.

Se llevo a cabo también un análisis estadístico donde se compararon los últimos 13 puntos promedio de las 3 diferentes corridas, estos puntos se tomaron en cuenta dado que gracias a las graficas se observaba una estabilización en la concentración de glucosa. Los resultados obtenidos indicaron que existía diferencia significativa (LSD, $p < 0.05$) entre las

concentraciones de jarabe glucosado provenientes de sorgo ceroso y sorgo normal, no así entre maíz y sorgo ceroso, y maíz y sorgo normal.

De acuerdo a los datos de concentraciones finales promedio obtenidos experimentalmente para cada uno de los jarabes glucosados (ver Tabla 6) no existe diferencia significativa (LSD, $p < 0.05$) entre estos. Sin embargo, las concentraciones finales derivadas del ajuste de los datos experimentales a los modelos de Michaelis-Menten (ver tabla 7), de curva logística (ver tabla 8) y del estadístico de los 13 puntos promedio finales cuentan una historia diferente. El análisis estadístico realizado (ver anexo I) sobre el ajuste logístico no arroja diferencia significativa para velocidades de conversión (parámetro c) pero sí para las concentraciones finales de producto (parámetro a).

Las tablas 10 y 11 presentan una comparación de conversiones experimentales, conversiones derivadas del ajuste al modelo de Michaelis Menten, y conversiones derivadas del ajuste al modelo logístico. El lector podrá constatar la similitud de los resultados obtenidos por ambos modelos de ajuste.

Tabla 9. Concentración final de glucosa obtenida en sacarificación. Valores calculados de manera experimental y a través de las modelaciones matemáticas de Michaelis Menten y logístico.

	Maíz	Sorgo ceroso	Sorgo normal
Michaelis Menten	234.62	240.85	219.22
Logístico	236.20	244.52	222.78
Datos Experimentales	264.18	265.02	251.85

Tabla 10. Velocidades de conversión en sacarificación obtenidas de las modelaciones de las cinéticas promedio para cada tipo de grano.

	Maíz	Sorgo ceroso	Sorgo normal
Michaelis Menten	0.68	0.85	0.74
Logístico	0.67	1.02	0.82

4.4.2.1 Color de los jarabes glucosados

Tabla 11. Color de los jarabes de glucosa obtenidos a partir de los diferentes tipos de almidones.

	L	a	b	ΔE^+
Maíz 1 ^{ra}	36.91	-1.00	3.17	37.06
Maíz 2 ^{da}	40.12	-1.41	1.16	40.16
Maíz 3 ^{ra}	41.56	-1.74	0.77	41.60
Sorgo ceroso 1 ^{ra}	34.64	1.47	8.12	35.60
Sorgo ceroso 2 ^{da}	36.47	0.51	6.07	36.97
Sorgo ceroso 3 ^{ra}	35.92	-0.24	3.94	36.13
Sorgo normal 1 ^{ra}	37.94	-0.59	3.46	38.10
Sorgo normal 2 ^{da}	41.04	-1.42	1.11	41.07
Sorgo normal 3 ^{ra}	40.23	-1.25	0.19	40.24

*L define la claridad L= 100 blanco y L= 0 negro, y a y b denotan +a rojo, -a verde, +b amarillo y -b azul (ver materiales y métodos figuras 5 y 6).

⁺ ΔE se obtiene de la siguiente ecuación $\Delta E = (L^2 + a^2 + b^2)$

La medida de el color de los jarabes de glucosa se llevó a cabo de la misma forma que la medida de color de almidones, en esta ocasión se puede observar que los resultados mostrados en la tabla 7 no son homogéneos y esto fue debido a que existía una cantidad determinada de dextrinas en suspensión como se puede observar en la figura 10 lo que hacia que el color de cada uno de los jarabes fuera heterogéneo.



Figura 14. Jarabes después de la sacarificación: los tres primeros frascos son de sorgo normal, seguidos por tres de maíz y tres de sorgo ceroso. La nubosidad observada son dextrinas que no alcanzaron a ser hidrolizadas a glucosa

4.4.3 Refinación

El refinado se realiza para la remoción de contaminantes insolubles y solubles tales como cenizas, pigmentos y proteínas hidrosolubles solubilizadas durante el procesamiento. Para la clarificación se remueven trazas de grasa, proteína y dextrinas por centrifugación, después de llevar a cabo este paso con carbón activado y resinas de intercambio iónico impurezas tales como pigmentos, precursores de color y material proteico (Hereda, 1987).

La refinación se llevo a cabo en 4 pasos, una centrifugación y tres filtrados, carbón activado, resina aniónica débil y resina catiónica fuerte.

4.4.3.1 Centrifugación

Esta se llevo a cabo para separar las dextrinas que no fueron convertidas a glucosa, el sorgo ceroso fue el que mejor separación mostró y esto fue debido a que este tipo de sorgo probablemente contuvo mayor cantidad de

dextrinas ramificadas de mayor peso molecular las cuales precipitaron durante la centrifugación.

4.4.3.2 Filtrado secuencia! a través de columnas de carbón activado, resina aniónica y resina catiónica

El filtrado con carbón activado se llevó a cabo para remover impurezas, material proteico y pigmentos. La resina aniónica se utilizó principalmente para remover fenólicos y la resina catiónica para remover calcio que es un inhibidor de la glucosa isomerasa.



Figura 15. Jarabes glucosados refinados después de pasar por centrifugación, carbón activado, resina aniónica y resina catiónica.

Se puede observar en la figura 11 la disminución de insolubles los cuales podían ser percibidos en la figura 10. Esto indica que la remoción de insolubles fue satisfactoria, además de que existió una disminución en la intensidad de color de los jarabes.

Después de pasar por la el refinado disminuyó la concentración de glucosa en un 17.35% en maíz, 16.82% en sorgo ceroso y 17.55% de sorgo normal, terminando con una concentración de 218.33mg/ml en maíz, 220.44, en sorgo ceroso y 207.64 mg/ml en sorgo normal. Esto debido al jarabe que quedó embebido en los diferentes lechos empacados de refinación.

4.4.4 Isomerización

La literatura refiere configuraciones de reactores diversas para isomerizar glucosa a fructosa. Industrialmente el proceso se lleva a cabo en reactores continuos de lecho empacado (ver por ejemplo Hebeda, 1987, Wiseman, 1991). En este estudio se utilizó un reactor híbrido (combinación de tanque agitado y columna empacada con recirculación⁹). La columna se empacó con la enzima glucosa isomerasa inmovilizada (Sweetzyme IT, Novozyme). El reactor se operó vertiendo jarabe glucosado en un tanque agitado (vaso de precipitado) al tiempo inicial, y circulando este a través del reactor empacado a una velocidad de flujo volumétrico de 1.5 ml/min (para un tiempo aproximado de residencia de 33 minutos por paso). La corriente de salida de la columna era recirculada al tanque. Esta configuración permite explotar las ventajas de una alta concentración de enzima (en la columna) y es plenamente escalable.

Tabla 12. Concentraciones iniciales de sustrato, finales de productos y conversión para la reacción de isomerización de jarabes glucosados de maíz, sorgo ceroso y sorgo normal.

	Maíz	Sorgo ceroso	Sorgo normal
Concentración inicial de glucosa mg/ml	218.33	220.44	207.64
Glucosa después de isomerización mg/ml	108.45	109.34	113.05
Fructosa ^γ mg/ml	109.88	111.1	94.59
Conversión %	50.32a	50.39a	45.55a
° Brix	28	28	27

[†]Letras diferentes entre porcentajes de conversión indican que los valores son significativamente diferentes (LSD test, $p < 0.05$)

Se partió de una concentración inicial de almidón de 300 mg/ml.

^γSe cuantificó sustrato (glucosa) y la concentración de fructosa fue calculada por diferencia a partir de la concentración inicial de glucosa.

⁹ Consultar detalles de la configuración del reactor en la sección de materiales y métodos.

En la Tabla 12 se presentan las concentraciones de fructosa producida a partir de jarabes glucosados de maíz, sorgo ceroso y sorgo normal. Estas concentraciones corresponden a 50.32%, 50.39% y 45.55% de conversión. Hebeda (1987) reporta similares conversiones. Estos valores de concentración cumplen con el requisito industrial de conversión de al menos 42% a fructosa (42 HFCS).

Los resultados de concentración de sólidos, expresados como °Brix para cada jarabe producto también se muestra en la Tabla 9. La cantidad de grados Brix del maíz, sorgo ceroso y sorgo normal fue muy similar.

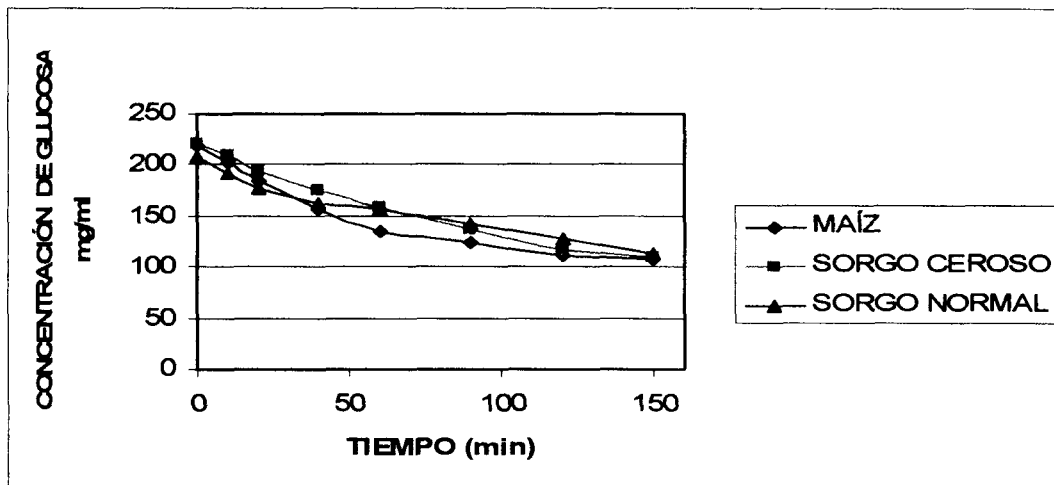


Figura 16. Disminución de la concentración de glucosa con respecto al tiempo durante la reacción de isomerización. Las curvas indican promedios para jarabes de maíz, sorgo ceroso y sorgo normal.

En la Figura 16 se observa aparentemente una conversión final mayor para el caso de los jarabes glucosados de sorgo ceroso y maíz. Para validar la significancia de equivalencias o diferencias de velocidades y conversiones,

se sometieron los datos experimentales a dos procedimientos de ajuste diferentes (ajuste a modelo M-M y a modelo exponencial).

Las Figuras 17, 18 y 19, muestran el ajuste de los datos experimentales de curvas de conversión a un modelo Michaelis Menten (M-M)¹⁰ para jarabes fructosados provenientes de maíz, sorgo normal y sorgo ceroso respectivamente. El procedimiento de ajuste es análogo al utilizado previamente para los datos correspondientes a la etapa de sacarificación.

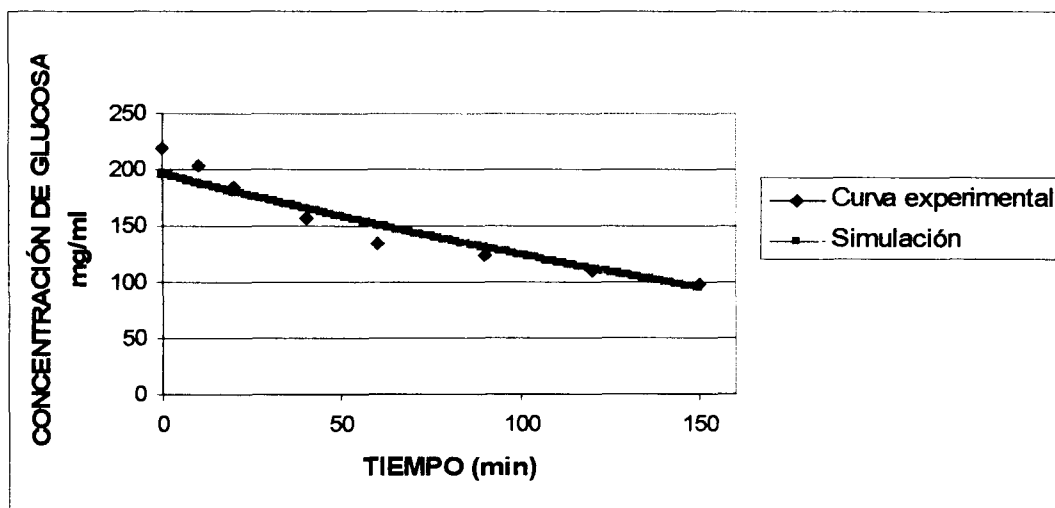


Figura 17. Comparación entre resultados experimentales de la disminución de glucosa en la isomerización de maíz y la curva ajustada por modelación matemática. El mínimo valor de la sumatoria de cuadrados para el ajuste fue de 818.8 (ver materiales y métodos).

¹⁰ Los detalles de implementación del ajuste se describen en la sección de Materiales y Métodos.

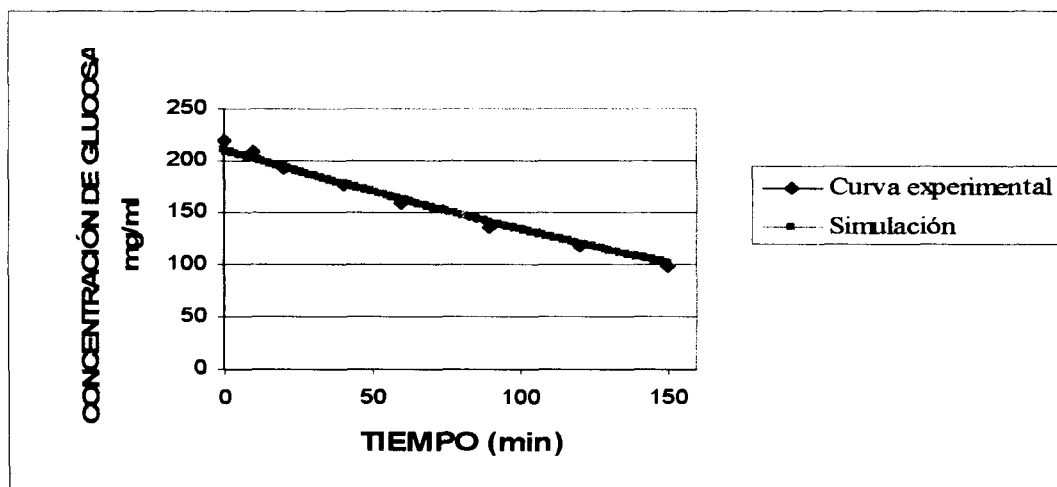


Figura 18. Comparación entre resultados experimentales de la disminución de glucosa en la isomerización de sorgo ceroso y la curva ajustada por modelación matemática. El mínimo valor de la sumatoria de cuadrados para el ajuste fue de 156.6 (ver materiales y métodos).

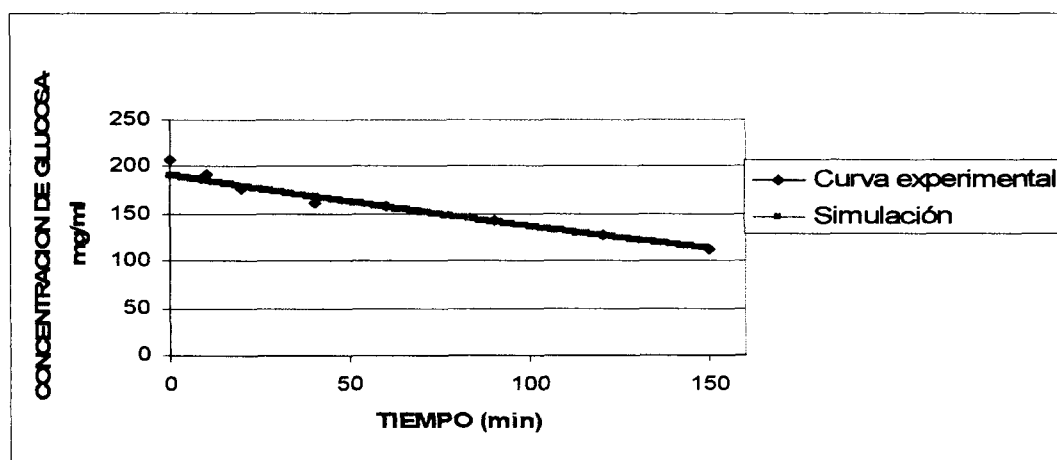


Figura 19. Comparación entre curva obtenida experimentalmente de la disminución de glucosa en la isomerización de sorgo normal y la curva ajustada por modelación matemática. El mínimo valor de la sumatoria de cuadrados para el ajuste fue de 92.87823 (ver materiales y métodos).

El lector podrá observar un comportamiento lineal en la disminución de sustrato con respecto al tiempo durante la isomerización glucosa-fructosa. Las pendientes ds/dt (velocidades de reacción) de cada uno de los

experimentos de isomerización se presentan en la tabla 13. El comportamiento lineal observado en las figuras 17, 18 y 19 denotan una cinética de orden 0 porque existió un impedimento de transferencia de masa debido al bajo flujo impuesto.

Tabla 13. Parámetros cinéticos obtenidos de la modelación matemática a través de la ecuación de Michaelis Menten en la isomerización de jarabes glucosados de maíz, sorgo ceroso y sorgo normal.

	Vmax mg/min	Km mg/ml	Sustrato inicial (s) mg/ml
Maíz	1.40	99.7	194.53
Sorgo ceroso	1.38	136.80	210.33
Sorgo normal	1.13	173.69	191.07

Los parámetros cinéticos se calcularon por ajuste al modelo de Michaelis Menten $V = V_{max} [s]/(K_m + [s])$.

El jarabe glucosado que mayor Vmax presentó fue el maíz, mientras que la enzima mostró mayor afinidad por el jarabe glucosado de sorgo ceroso (Km menor). Dada la sospecha de que el comportamiento de conversiones está dominado por impedimentos de transferencia de masa, los valores de Vmax y Km deben ser tomados con cautela pues físicamente no necesariamente implican parámetros meramente cinéticos.

Se llevó a cabo un segundo procedimiento de modelación, esta vez basado en argumentos estadísticos. Los datos experimentales se ajustaron a un modelo exponencial¹¹:

$$y = \alpha * \exp(\beta * t)$$

En este modelo, α es la concentración inicial de sustrato, β es la velocidad de conversión a producto.

¹¹ El modelo exponencial es ampliamente utilizado en el área de ecología, dinámica de poblaciones, y procesos químicos de primer orden.

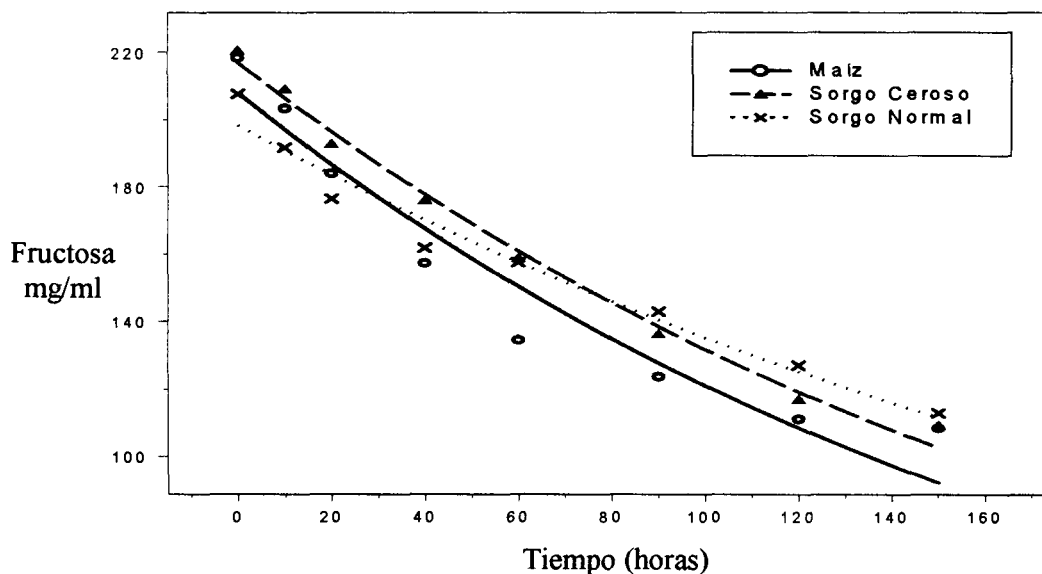


Figura 20. Curvas exponenciales ajustadas a cada una de las concentraciones de fructosa para maíz, sorgo ceroso y sorgo normal.

Tabla 14. Resultados de los tres ajustes a los datos cada tratamiento (fructosa) con el modelo Exponencial $y(t) = \alpha * (\beta * t)$ donde α es la concentración inicial al tiempo cero y β es la tasa de cambio.

Tratamiento	Parámetros		Desviación estándar	Correlación entre parámetros α β
	α	β		
Maíz	α	208.021	4.90311	-0.677
	β	-0.0054	0.00042	
Sorgo Ceroso	α	217.058	4.86026	-0.683
	β	-0.0050	0.00039	
Sorgo normal	α	198.298	4.74252	-0.701
	β	-0.0038	0.00038	

Los resultados de la aplicación de esta prueba a los parámetros estimados indican que en la isomerización, la velocidad de conversión de glucosa a

fructosa del sorgo ceroso fue igual que la velocidad de conversión de glucosa a fructosa del maíz, la velocidad de conversión de glucosa a fructosa del maíz fue mayor que la velocidad de conversión de glucosa a fructosa del sorgo normal, la velocidad de conversión de glucosa a fructosa del sorgo ceroso fue mayor que la velocidad de conversión de glucosa a fructosa del sorgo normal, la concentración inicial de glucosa en el jarabe obtenido de sorgo ceroso fue igual que la concentración inicial de glucosa en el jarabe obtenido de maíz, la concentración inicial de glucosa en el jarabe obtenido de maíz fue igual que la concentración inicial de glucosa en el jarabe obtenido de sorgo normal la concentración inicial de glucosa en el jarabe obtenido de sorgo ceroso fue mayor que la concentración inicial de glucosa en el jarabe obtenido de sorgo normal.

A pesar que a simple vista el porcentaje de conversión parece ser más elevado para el sorgo ceroso y el maíz comparado con el sorgo normal. El análisis de significancia estadística por la prueba LSD ($p < 0.05$) sobre los datos experimentales de porcentajes de conversión no arroja diferencias significativas entre los distintos jarabes. Sin embargo, las velocidades de conversión y las concentraciones iniciales derivadas del ajuste de los datos experimentales a partir de la curva exponencial (ver tabla 14) si muestran una diferencia significativa entre las velocidades de maíz y sorgo ceroso (estas dos iguales estadísticamente) contra sorgo normal (ver anexo I).

4.4.5 Concentración

Se llevo a cabo una concentración del jarabe fructosado en rotavapor hasta llegar a 70 °Brix. Esto se hace comercialmente para producir un jarabe con bajo A_w y así evitar el ataque de microorganismos.

4.5 Rendimientos globales

De los resultados aquí reportados, es posible calcular los siguientes rendimientos globales a partir de los datos experimentales y de modelación:

Partiendo de una base arbitraria de cálculo de 100gr de cereal y de los datos experimentales pueden obtenerse:

(a) 69.34ml de jarabe fructosado de maíz al 50.32% de fructosa con una concentración de 70°Brix.

(b) 63.25ml de jarabe fructosado de sorgo ceroso al 50.39% de fructosa con una concentración de 70°Brix.

(c) 60.36ml de jarabe fructosado de sorgo ceroso al 45.55% de fructosa con una concentración de 70°Brix.

Partiendo de una base arbitraria de cálculo de 100gr de cereal y de los datos obtenidos de la modelación logística pueden obtenerse:

(a) 66.07 ml de jarabe fructosado de maíz al 50.32% de fructosa con una concentración de 70°Brix.

(b) 62.28 ml de jarabe fructosado de sorgo ceroso al 50.39% de fructosa con una concentración de 70°Brix.

(c) 57.74 ml de jarabe fructosado de sorgo ceroso al 45.55% de fructosa con una concentración de 70°Brix.

Estos resultados integran los efectos de todas las eficiencias parciales de las etapas intermedias, constituyendo un indicador global de eficiencia del proceso. Si bien un proceso basado en maíz como materia prima reportaría ventajas globales en rendimiento, cuando se excluye del análisis la etapa de extracción de almidón, y solamente tomamos en cuenta la producción de jarabes dextrinizados, glucosados y fructosados a partir de una base equivalente de almidón, se observan rendimientos y calidades similares para los tres tipos de grano.

5. CONCLUSIONES

El maíz, sorgo ceroso y sorgo normal, fueron similares en el contenido de ELN o almidón. Los sorgos utilizados tuvieron un mayor peso hectolítrico y una textura de endospermo más dura que la del maíz.

El maíz tuvo 5% más de rendimiento de almidón de primera que los sorgos. El rendimiento de almidón del sorgo ceroso y normal fueron similares ($p>0.05$).

El grado de refinación de acuerdo al contenido de proteína en todos los almidones estuvo por encima del parámetro para considerarlo de primera calidad (0.3%), aunque los resultados pueden considerarse como de calidad aceptable. El contenido de cenizas en los almidones si cumplió con el estándar de primera calidad al estar por debajo de 0.3%.

El color de los almidones no fue afectado por el tipo de grano, muy probablemente debido a la utilización de sorgos blancos que son bajos en pigmentos fenólicos.

Partiendo de 300mg/ml de suspensión de almidón, el contenido final de glucosa en el jarabe no presentó diferencia significativa ($p>0.05$) entre sorgo ceroso, sorgo normal y maíz (265.02 mg/ml, 251.85mg/ml y 264.18 mg/ml respectivamente). La comparación de los últimos 13 puntos promedio de las 3 diferentes corridas presentó diferencia significativa ($p>0.05$) entre sorgo ceroso y sorgo normal, no así entre maíz y sorgo ceroso, y maíz y sorgo normal. El porcentaje de conversión de almidón de maíz, sorgo ceroso y sorgo normal a glucosa fue de 88.06, 88.34 y 83.66, respectivamente. De acuerdo a la modelación logística si existió diferencia

significativa entre los valores de concentración final donde sorgo ceroso > maíz > sorgo normal.

El porcentaje de conversión de glucosa a fructosa partiendo de 218.33 mg/ml, 220.44 mg/ml, 207.64 mg/ml de jarabe glucosado fue de 50.32 para maíz, 50.39 para sorgo ceroso y 45.55 para sorgo normal. Esto equivale a una conversión de 109.88 mg/ml para maíz, 111.1 mg/ml para sorgo ceroso y 94.54 mg/ml para sorgo normal. De acuerdo a la modelación de la fórmula de Michaelis Menten el porcentaje de conversión para maíz, sorgo ceroso y sorgo normal fue de 51.21, 51.60 y 40.95 respectivamente.

Partiendo de 100gr de grano se obtuvieron: 69.34ml, 63.25ml y 60.36ml de jarabe fructosado ajustado a 70°Brix de maíz, sorgo ceroso y sorgo normal, respectivamente.

Los parámetros cinéticos en la sacarificación calculados por la modelación matemática a partir de Michaelis Menten fueron los siguientes:

Para K_m el valor de maíz fue de 20.09 mg/ml, de sorgo ceroso 0.23 mg/ml y para sorgo normal 0.35 mg/ml. En lo que respecta a V_{max} , el maíz se obtuvo un valor de 0.68, el sorgo ceroso 0.85 y el sorgo normal 0.74.

En la isomerización la V_{max} de maíz, sorgo ceroso y sorgo normal fueron de 1.40 mg/min, 1.38 mg/min y 1.13mg/min, respectivamente. Los valores de K_m obtenidos en la isomerización para maíz sorgo ceroso y sorgo normal fueron de 131.21, 114.45 y 173.69 respectivamente.

Este estudio demuestra claramente que es factible producir jarabes dextrinizados, glucosados y fructosados, a partir de sorgo ceroso (más que

sorgo normal). Sin embargo, el maíz tuvo un rendimiento de aproximadamente 6% más de almidón que los dos tipos de sorgo. Una vez obtenidos los almidones, el rendimiento y calidad de los jarabes fueron muy similares. Se sugiere idear métodos para incrementar los rendimientos de almidón de sorgo si se desea que rinda semejantemente al jarabe de maíz.

6. RESUMEN

El presente trabajo consistió en obtener jarabes fructosados de dos diferentes variedades de sorgo, comparado con el maíz. Para alcanzar ese objetivo, primeramente se obtuvo almidón a través de un proceso experimental de molienda húmeda y posteriormente se convirtió el almidón en tres pasos secuenciales biocatalíticos en jarabes fructosados.

Para la obtención del jarabe fructosado primeramente se procedió a una licuefacción con α -amilasa termorresistente donde al mismo tiempo se gelatinizó el almidón y se hidrolizó a dextrinas. Posteriormente el jarabe dextrinizado se sacarificó con un complejo de amiloglucosidasa, β -amilasa y pululanasa. Terminada la sacarificación se procedió a refinar el jarabe glucosado por medio de centrifugación, y el paso a través de columnas secuenciales de carbón activado, resina aniónica y resina catiónica. Finalmente los jarabes refinados y clarificados se sometieron a una isomerización, con un sistema inmovilizado de glucosa isomerasa.

Se llevaron a cabo dos modelaciones matemáticas para obtener los parámetros cinéticos así como las concentraciones finales de glucosa y las concentraciones iniciales de fructosa de las corridas promedio de sacarificación e isomerización.

Los rendimientos obtenidos de almidón fueron 66.7%, 60.3% y 61.0% para el maíz, sorgo ceroso y sorgo normal, respectivamente y en jarabes glucosados de maíz, sorgo ceroso y sorgo normal, obtenidos partiendo de 300mg/ml de suspensión de almidón fueron de 265.02 mg/ml, 251.85mg/ml y 264.18 mg/ml de acuerdo al análisis experimental. De acuerdo a las modelaciones matemáticas fueron de 236.20, 244.52 y

222.78, respectivamente. En la refinación disminuyó la concentración de glucosa en un 17.35% en maíz, 16.82% en sorgo ceroso y 17.55% de sorgo normal. El porcentaje de conversión de glucosa a fructosa obtenido en la isomerización fue de 50.32 para maíz, 50.39 para sorgo ceroso y 45.55 para sorgo normal.

Los valores de Km en la sacarificación para el maíz, sorgo ceroso y sorgo normal fueron de 20.09, 0.23, y 0.35 respectivamente. En lo que respecta a Vmax para sacarificación obtenida de la modelación de Michaelis Menten y de la modelación logística, el maíz tuvo un valor de 0.68 y 0.67, el sorgo ceroso 0.85 y 1.02 y el sorgo normal 0.74 y 0.82 respectivamente.

Los valores de Km en la isomerización para el maíz, sorgo ceroso y sorgo normal fueron de 131.21, 114.45 y 173.69 respectivamente. En lo que respecta a Vmax para isomerización el maíz tuvo un valor de 1.40, el sorgo ceroso 1.38 y el sorgo normal 1.13.

Los rendimientos de jarabes fructosados ajustados a 70° Brix basados en 100gr de grano y a datos experimentales fueron de: 69.34, 63.25, 60.36 ml para el maíz, sorgo ceroso y sorgo normal, respectivamente.

Los rendimientos de jarabes fructosados ajustados a 70° Brix basados en 100gr de grano y a modelación logística fueron de: 66.07, 62.28, 57.74 para el maíz, sorgo ceroso y sorgo normal, respectivamente.

Este estudio demuestra que es factible producir jarabes fructosados a partir de sorgo normal y ceroso. Para incrementar los rendimientos de jarabe fructosados de sorgo es importante mejorar la efectividad del proceso de

molienda húmeda para aumentar los rendimientos de almidón a un nivel similar al obtenido de maíz.

7. BIBLIOGRAFIA

A.A.C.C. 1986. Approved Methods. American Association of Cereal Chemists. St Paul, MN. U.S.A.

A.O.A.C. 1991. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. 15th Edition. Arlington, VA. U.S.A.

BAILEY, J. y OLLIS, D. 1986. Biochemical Engineering Fundamentals. Second Edition. McGraw-Hill International Editions.

MIRALBES, C. Enzimas en Panaderia. Montagud Editores. Capítulo 3.
www.montagud.com

HEBEDA, R.E.1987. Corn Sweeteners (Ch. 17), Corn: Chemistry and Technology. S.A. Watson y P.E. Ramstad (eds). 2nd. American Association of Cereal Chemistry, St. Paul, MN. U.S.A.

HOSENEY, R.C. 1994. Principles of Cereal Science and Technology. Chapters 1, 2, 3, 4, 7 y 14. American Association of Cereal Chemists. St. Paul, MN. U.S.A.

IBAR, L. 1984. El Sorgo. Editia Mexicana, S.A. México D.F.

KOKINI, J.L., LAI, L. y CHEDID L.L. 1992. Effect of Starch Structure on Starch Rheological Properties. Food Technol 46(6):124.

KULKARNI, D.N., KSHIRSAGAR, S.S., y INGLE, U.M. 1987. Processing of Sorghum Grain for Starch and Glucose Syrup. en :

Technology and Application for Alternative Uses for Sorghum. Proceedings of the National Seminar, Marathawada Agricultural University, Parbhani, India.

LLOYD, N.E. y NELSON, W.J. 1984. Glucose and Fructose Containing Sweeteners from Starch. (Ch. 12) en : Starch: Chemistry and Technology, 2nd R.L. Whistler, J.N. Bemiller and E.F. Paschall (eds). Academic Press. Orlando, FL. U.S.A.

MAY, J.B. 1987. Wet Milling : Process and Products (Ch. 12). en : Corn: Chemistry and Technology. S.A. Watson and P.E. Ramstad (eds). American Association of Cereal Chemistry. St. Paul, MN. U.S.A.

SERNA-SALDIVAR, S.O. y MEZO, M. 2003. Effect of a Cell-Wall-Degrading Enzyme Complex on Starch Recovery and Steeping Requirements of Sorghum and Maize. Cereal Chemistry 80(2):148-143

MOHENO, J.A., ALMEIDA-DOMINGUEZ, H.D. y SERNA-SALDIVAR, S.O. 1999. Effect of Fiber Degrading Enzymes on Wet Milling and Starch Properties of Different Types of Sorghums and Maize. Starch/Starke 51:16-20

OSORIO, S.G., SERNA SALDIVAR, S.O., CHAVEZ, J., ALMEIDA-DOMINGUEZ, H.D. y ROONEY, L.W. 2000. Production of Brewing Adjuncts and Sweet Works from Different Types of Sorghums. American Society of Brewing Chemists. 58(1):21-25.

PALMER, G.H. 1992. Sorghum-Food, Beverage and Brewing Potentials. Process Bioch. 27:145

PIPCO, R. 2001. Conversión enzimática del guarapo con invertasa inmovilizada para la obtención de jarabes invertidos glucosados y fructosados. Tesis ITESM, campus Monterrey, México.

POMERANZ, Y. 1985. Functional Properties of Food Components. Academic Press, Inc. Orlando FL. U.S.A.

ROONEY, L.W., KHAN, M.N., y EARP, C.F. 1980. The Technology of Sorghum Products. en : Cereals for Food and Beverages: Recent Progress in Cereal Chemistry. Inglett y L. Munck (eds). Academic Press. New York, NY. U.S.A.

ROONEY L.W. y SULLINS, R.D. 1973. The Feeding Value of Waxy and Nonwaxy Sorghum Grains as Related to Endosperm Structure. (Ch. 6) en: Sorghum and Millets: Chemistry and Technology. Dendy, D.A.V. (ed). American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN. U.S.A.

ROONEY, L.W. y PFLUGFELDER R.L. 1986. Factor Affecting Starch Digestibility with Special Emphasis on Sorghum and Corn. J. Anim. Sci. 63:1607-1623.

ROONEY, L.W. y SERNA-SALDIVAR, S.O. 1991. Sorghums (Ch. 5). en : Handbook of Cereal Science and Technology. K.J. Lorenz and K. Kulp (eds). Marcel Dekker Inc. New York, NY. U.S.A.

SERNA-SALDIVAR, S.O. y ROONEY, L.W. 1995. Structure and Chemistry of Sorghum and Millets. (Ch. 4). en: Sorghum and Millets:

Chemistry and Techenology. Dendy, D.A.V. (ed). American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, MN. U.S.A.

SERNA-SALDIVAR, S.O. 1996. Química, Almacenamiento e Industrialización de los Cereales. AGT Editor, S.A. México, D.F., México.

SHANON J.C. y GARWOOD D.L. 1984. Genetic and Physilogy of Starch Development. (Ch. 3). Starch: Chemistry and Technology. 2nd Edition. R.L. Whistler, J.N. Bemiller and E.F. Paschall (eds). Academic Press. Orlando, FL. U.S.A.

WALL, S.J. y PAULIS, J.W. 1978. Corn and Sorghum Proteins. (Ch. 3) en: Advances of Cereal Science and Technology. Vol. 2 Y. Pomeranz (ed). American Association of Cereal Chemists. St. Paul, MN. U.S.A.

WATSON, S.A., y HIRATA Y. 1955. The Wet Milling Propierties of Sorghums, Agron. J. 47:11.

WATSON. S.A. 1984. Corn and Sorghum Starches: Production (Ch. 19) en: Starch: Chemistry and Technology. 2nd . R.L. Whistler, J.N. Bemiller and E.F. Paschall (eds). Academic Press. Orlando, FL. U.S.A.

WHISTLER R.L. y DANIELS J.R. 1985. Carbohydrates. (Ch 3). Food Chemistry. O. Fennema (ed). Marcel Dekker. New York, NY. U.S.A.

WISEMAN, A. 1991. Manual de biotecnología de las enzimas. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.

VILLASEÑOR, A. 1997. Obtención de jarabes glucosados a partir de almidón de cuatro variedades de sorgo (*Sorghum Bicolor* L. Moench), por medio de un proceso continuo de conversión enzimática y una membrana de ultrafiltración. Tesis de Maestría. Ingeniería de Alimentos. ITESM-Monterrey, México.

X-Rite, Incorporated – World Headquarters (2000). Guía para entender el color Grandville, Michigan U.S.A. www.x-rite.com

ANEXO

Comparación de modelos no-lineales para las concentraciones de glucosa y fructosa.

Metodología Estadística

Se presenta la metodología estadística para el caso de la concentración de glucosa y posteriormente se indican los resultados para la concentración de fructosa.

GLUCOSA

El problema estadístico consiste en determinar si las tres muestras de concentraciones de glucosa son iguales.

El problema se encuentra dentro del contexto siguiente: el de analizar datos con modelos no-lineales que requiere no sólo de diferentes pruebas estadísticas sino de la comparación de un mismo modelo dentro de situaciones experimentales diferentes. Para realizar este tipo de análisis se requiere pasar por las siguientes etapas.

- a) Elegir un modelo
- b) Estimar los parámetros
- c) Validar el modelo
- d) Comparar varias “realizaciones o versiones” del modelo

En un primer paso se realiza el ajuste individual del modelo para cada tratamiento y después se ajustan diferentes versiones del mismo modelo dejando uno o dos parámetros comunes a los datos de los tres tratamientos. En el segundo paso se comparan las realizaciones de los modelos para decidir cuál es el que mejor describe el comportamiento de la concentración de glucosa de los tres tratamientos diferentes.

Aunque se puede realizar el ajuste de un polinomio, un modelo no-lineal es preferible. Este tipo de modelos tiene parámetros que tienen un significado en el contexto del problema como la tasa de crecimiento, la concentración inicial y la concentración máxima.

Datos

Se trabajó con parejas de datos (t_i, y_i) para $i = 1, 2, \dots, n$ donde cada y_i es la concentración de glucosa en el tiempo t_i . Existen tres repeticiones de medición para cada tratamiento en el mismo tiempo t_i para la glucosa. En el caso de la fructosa las y_i son la media de las observaciones repetidas.

Comparación de modelos no-lineales para las concentraciones de glucosa y fructosa.

Elección del Modelo

Para explicar el crecimiento de la concentración de glucosa se probaron dos modelos el de Gompertz y el de la Logística, ver por ejemplo Seber y Wild (1989). La elección se hizo después de hacer una observación del comportamiento gráfico de los datos que muestran un crecimiento a partir de un valor

inicial y una asíntota horizontal para los valores grandes de tiempo. De acuerdo con el comportamiento mencionado se eligió el modelo de la Logística. Las características y calidad del ajuste son casi las mismas en ambos ajustes y las sumas de cuadrados de los errores son muy parecidas.

El modelo de la Logística es:

$$y = \frac{a}{(1 + b * \exp(-c * t))} + error$$

el significado de los parámetros es:

- a - concentración máxima
- b - concentración inicial
- c - tasa de crecimiento

El criterio de estimación empleado para realizar los ajustes fue el de cuadrados mínimos. Y en cuanto al software empleado fue SPLUS versión 6.1 ver por ejemplo Crawley (2002)

Se realizaron también ajustes de modelos compuestos, es decir, ajustes de modelos que comparten algunos parámetros en común. El criterio de Akaike (AIC) (Lebreton *et al*, 1992) fue empleado como una herramienta para la selección de modelos. Y también la prueba F basada en el cociente de verosimilitud donde la hipótesis que se prueba es H_0 : Modelo con parámetros comunes, ver por ejemplo Ratkowsky D.A (1983: 135)

Comparación de modelos no-lineales para las concentraciones de glucosa y fructosa.

Resultados Glucosa

Tratamiento	Parámetros	Desviación estándar del parámetro estimado	Correlación entre parámetros			
			ab	ac	bc	
Maíz	a	236.2	4.6939	-0.0092	-0.44	0.655
	b	1.90302	0.329284			
	c	0.6711	0.109435			
Sorgo ARG	a	244.522	4.23009	-0.0282	-0.329	0.726
	b	2.82297	0.566327			
	c	1.02416	0.160117			
Sorgo 631	a	222.786	4.40971	-0.009	-0.383	0.676
	b	2.04473	0.401412			
	c	0.824175	0.147164			

Tabla 1. Resultados de los tres ajustes a los datos cada tratamiento (glucosa) con el modelo Logístico $y(t) = a / (1 + b_i e^{-c_i t})$ donde **a** es la concentración máxima, **b** es la concentración inicial y **c** es la tasa de crecimiento. ARG significa sorgo ceroso y 631 significa sorgo normal.

- Se procedió entonces a realizar pruebas para ver:
- Si un solo modelo era suficiente para explicar el crecimiento de la concentración de glucosa.
- Si se requerían tres modelos, uno para cada tratamiento
- Si algún modelo compuesto era necesario (cada uno de los modelos compuestos compartía uno o dos parámetros)

Comparación de modelos no-lineales para las concentraciones de glucosa y fructosa.

Los resultados de los modelos compuestos se encuentran en la Tabla 2 con los valores de cada una de las herramientas para elegir el mejor modelo, el criterio de Akaike y el valor p de la prueba F.

Modelo	Descripción	AIC	Prueba F valor <i>p</i>
$a / (1 + b_i e^{-c_i t})$	a común	177.975	0.0277
$a_i / (1 + b e^{-c_i t})$	b común	169.223	0.3703
$a_i / (1 + b_i e^{-c t})$	c común	169.483	0.3340
$a / (1 + b e^{-c_i t})$	a y b comunes	177.218	0.0528
$a / (1 + b_i e^{-c t})$	a y c comunes	182.652	0.0223
$a_i / (1 + b e^{-c t})$	b y c comunes	165.967	0.5870
$a / (1 + b e^{-c t})$	a, b y c comunes	179.374	0.0491
$a_i / (1 + b_i e^{-c_i t})$	a, b y c individuales	171.000	

Tabla 2. Resultados de los ajustes compuestos con el modelo Logístico $y(t) = a / (1 + b_i e^{-c_i t})$ donde *a* es la concentración máxima, *b* es la concentración inicial y *c* es la tasa de crecimiento.

Los modelos compuestos presentan el valor del criterio de Akaike (AIC) así como el valor *p* de la prueba F

Así que de acuerdo con ambos criterios de selección, el más bajo criterio de Akaike y el valor *p* más alto, se sugiere el uso del modelo que comparte los parámetros *b* y *c* comunes.

Así el modelo seleccionado es:

$$y(\text{maiz}) = \frac{233.421}{(1 + 2.2382 * \exp(-0.847092 * t))} + \text{error}$$

$$y(\text{sorgoARG}) = \frac{245.602}{(1 + 2.2382 * \exp(-0.847092 * t))} + \text{error} \quad (1)$$

$$y(\text{sorgo631}) = \frac{223.229}{(1 + 2.2382 * \exp(-0.847092 * t))} + \text{error}$$

Comparación de modelos no-lineales para las concentraciones de glucosa y fructosa.

Se continúa con el análisis ahora con la comparación 2 a 2 de los parámetros a_i del modelo elegido. Se utiliza una prueba t (ver por ejemplo Kleinbaum & Kupper 1978:101) con el objeto de verificar las diferencias entre las concentraciones máximas de cada tratamiento.

$$t = \frac{\hat{\theta}_1 - \hat{\theta}_2}{\sqrt{s_{\hat{\theta}_1}^2 + s_{\hat{\theta}_2}^2}}$$

si $H_0: \theta_1 = \theta_2$

y las regiones críticas son:

$$t \geq t_{1-\alpha} \text{ para } H_a: \theta_1 > \theta_2$$

$$t \leq -t_{1-\alpha} \text{ para } H_a: \theta_1 < \theta_2$$

$$|t| \geq t_{1-\frac{\alpha}{2}} \text{ para } H_a: \theta_1 \neq \theta_2$$

a	t	Ho: $a_i = a_j$		Ho: $a_i \leq a_j$	
		valor p	conclusión	valor p	conclusión
Sorgo ARG vs Maíz	2.1530	0.0328	rechazo	0.0164	rechazo
Maíz vs Sorgo 631	1.8101	0.0722	Región de incertidumbre	0.0361	rechazo
Sorgo ARG vs Sorgo 631	3.9628	0.0001	rechazo	0.0001	rechazo

Tabla 3. Comparación 2 a 2 del parámetro a del modelo elegido (1). ARG significa sorgo ceroso y 631 significa sorgo normal.

Los resultados de la aplicación de esta prueba a los parámetros estimados indican que:

- el parámetro a de sorgo ARG es mayor que el parámetro a del maíz.
- el parámetro a de maíz es mayor que el parámetro a de sorgo 631
- el parámetro a de sorgo ARG es mayor que el parámetro a de sorgo 631

Comparación de modelos no-lineales para las concentraciones de glucosa y fructosa.

FRUCTOSA

Datos

Se trabajó con parejas de datos (t_i, y_i) para $i = 1, 2, \dots, n$ donde cada y_i es la media de las observaciones repetidas en el tiempo t_i .

Elección del Modelo

Para explicar el crecimiento de la concentración de fructosa se ajustó el modelo exponencial, ver por ejemplo Seber & Wild (1989).

El modelo Exponencial es:

$$y = \alpha * \exp(\beta * t) + error$$

el significado de los parámetros es:

- α - concentración inicial al tiempo cero
 β - tasa de cambio

Resultados Fructosa

Tratamiento	Parámetros	Desviación estándar	Correlación entre parámetros	
			α	β
Maíz	α	208.021	4.90311	-0.677
	β	-0.00541606	0.000421762	
Sorgo Ceroso	α	217.058	4.86026	-0.683
	β	-0.0049885	0.000389065	
Sorgo normal	α	198.298	4.74252	-0.701
	β	-0.00382651	0.000383922	

Tabla 4. Resultados de los tres ajustes a los datos cada tratamiento (fructosa) con el modelo Exponencial

$y(t) = \alpha * (\beta * t)$ donde α es la concentración inicial al tiempo cero y β es la tasa de cambio.

Comparación de modelos no-lineales para las concentraciones de glucosa y fructosa.

Modelo	Descripción	AIC	Prueba F <i>p</i>	valor
$\alpha e^{\beta t}$	α común	33.575		0.0424
$\alpha_i e^{\beta t}$	β común	34.224		0.0338
$\alpha_i e^{\beta_i t}$	α y β comunes	36.865		0.0225
$\alpha e^{\beta t}$	α y β individuales	30.000		

Tabla 5. Resultados de los ajustes compuestos con el modelo Exponencial $y(t) = \alpha * (\beta * t)$ donde α es la concentración inicial al tiempo cero y β es la tasa de cambio.

Los modelos compuestos presentan el valor del criterio de Akaike (AIC) así como el valor *p* de la prueba F

Así que de acuerdo con el más bajo criterio de Akaike se sugiere el uso de tres conjuntos de parámetros.

Así los modelos seleccionados son:

$$y(\text{maiz}) = 208.021 * \exp(-0.005416 * t) + \text{error}$$

$$y(\text{sorgo ceroso}) = 217.058 * \exp(-0.004988 * t) + \text{error} \quad (2)$$

$$y(\text{sorgo normal}) = 198.298 * \exp(-0.003826 * t) + \text{error}$$

Se continúa ahora con la comparación 2 a 2 de los parámetros a_i del modelo elegido. Se utiliza una prueba t (ver por ejemplo Kleinbaum & Kupper 1978:101) con el objeto de verificar cuáles son los parámetros diferentes entre los tratamientos

Comparación de modelos no-lineales para las concentraciones de glucosa y fructosa.

α	t	Ho: $\alpha_i = \alpha_j$		Ho: $\alpha_i \leq \alpha_j$	
		valor p	conclusión	valor p	conclusión
Sorgo ceroso vs Maíz	1.3090	0.2070	no rechazo	0.1035	no rechazo
Maíz vs Sorgo normal	1.4254	0.1712	no rechazo	0.0856	no rechazo
Sorgo ceroso vs Sorgo normal	2.7626	0.0128	rechazo	0.0064	rechazo

β	t	Ho: $\beta_i = \beta_j$		Ho: $\beta_i \leq \beta_j$	
		valor p	conclusión	valor p	conclusión
Sorgo ceroso vs Maíz	0.7451	0.4658	no rechazo	0.2329	no rechazo
Maíz vs Sorgo normal	2.7871	0.0122	rechazo	0.0061	rechazo
Sorgo ceroso vs Sorgo normal	2.1259	0.0476	rechazo	0.0238	rechazo

Tabla 3. Comparación 2 a 2 de los parámetros α y β del modelo elegido (2)

Los resultados de la aplicación de esta prueba a los parámetros estimados indican que:

- el parámetro α del sorgo ceroso es mayor que el parámetro α del sorgo normal.
- el parámetro β del maíz es mayor que el parámetro β del sorgo normal
- el parámetro β del sorgo ceroso es mayor que el parámetro β del sorgo normal
- el parámetro α de sorgo ceroso es igual que el parámetro α del maíz.
- el parámetro α del maíz es igual que el parámetro α del sorgo normal
- el parámetro β del sorgo ceroso es igual que el parámetro β del maíz

Comentarios sobre la comparación

El haber comparado los parámetros en forma separada (2 a 2) aumenta la correlación que pueden tener los parámetros estimados. En efecto los parámetros α y β tienen correlaciones superiores a -0.6 Estas pruebas resultan, de un cierto modo simplistas aparte de correlacionadas.

Comparación de modelos no-lineales para las concentraciones de glucosa y fructosa.

Bibliografía

Crawley M. J. (2002) *Statistical Computing: An Introduction to Data Analysis using S-Plus*; Wiley

Kleinbaum D.G. & Kupper L.L (1978) *Applied Regression Analysis and other Multivariable Methods* Duxbury Press

Lebreton, J.D. Burnham, K.P. Clobert J. & Anderson, D.R. (1992) *Modeling survival and testing biological hypothesis using marked animals: a unified approach with case studies*. Ecological Monographs

Ratkowsky D.A (1983) *Nonlinear Regression Modeling: A Unified Practical Approach*; Dekker

Seber G.A.F & Wild C.J. (1989) *Nonlinear Regression*; Wiley

Participaron en la elaboración de este análisis, del Departamento de Matemáticas:
Rebeca Romero Álvarez y Clara P. Domínguez Islas

