

PRODUCCION DE BIOETANOL A ESCALA DE LABORATORIO A PARTIR DE SORGO GRANIFERO (*Sorghum bicolor* L. Moench)

BIOETHANOL PRODUCTION FROM GRAIN SORGHUM (*Sorghum bicolor* L. Moench) AT LABORATORY SCALE

Picca Aurora^{1*}, Mirta Castaño¹, Julián Isasti¹
María Pereyra Cardozo¹, Miguel Ángel Fernández¹
Enzo David Ferrari¹, Rodolfo Domínguez¹ &
Héctor Paccapelo¹

Recibido 02/08/2018
Aceptado 06/03/2019

RESUMEN

En el presente trabajo se investigó la producción de bioetanol a partir de sorgo granífero, en respuesta a la necesidad de explorar otros materiales para obtener alcohol por fermentación. Se diseñó un protocolo experimental de laboratorio para evaluar el rendimiento en bioetanol en 7 genotipos. La producción de bioetanol varió de 428,13 a 481,5 ml.kg MS⁻¹ después de 68 horas de fermentación. Los genotipos INTA Blanco y Antel INTA expresaron un rendimiento en bioetanol significativamente diferente. En esta investigación no pudo determinarse el efecto de las propiedades particulares del grano sobre la bioconversión. El alto rendimiento de bioetanol demuestra que el sorgo granífero puede ser una alternativa para diferentes regiones, ya que es un cultivo que se adapta a diferentes tipos de suelos y clima.

PALABRAS CLAVE: fermentación alcohólica, taninos, almidón

ABSTRACT

The production of ethanol from grain sorghum was investigated in the present work, in response to the need of exploring other materials to obtain alcohol by fermentation. A laboratory experimental protocol was designed in order to evaluate ethanol yield, from grain in 7 genotypes. The ethanol production varied from 428,13 to 481,5 ml.kg MS⁻¹ at 68 hours of fermentation. INTA Blanco and Antel INTA genotypes significantly differed in ethanol yield. Through this research it was not possible to determine the impact of particular grain properties on bioconversion. The high ethanol yield demonstrated that grain sorghum can be an alternative for different regions, since it is a crop that adapts to different soil types and climate.

KEY WORDS: alcoholic fermentation, tannins, starch

INTRODUCCIÓN

El reciente interés e incremento en la producción de bioetanol ha sido principalmente provocado por su uso como combustible automotriz. La ventaja del bioetanol con respecto a los combustibles fósiles es que se obtiene de fuentes renovables y representa una

oportunidad interesante para el desarrollo agrícola. La desventaja más obvia es que su producción puede competir por el uso de recursos alimenticios (Chuck-Hernández, 2011). En orden de alcanzar el objetivo de crecimiento en la producción de biocombustibles durante las próximas décadas, es esencial extender las fuentes de materia prima a cultivos de producción más económica. Por tal motivo, es crítica la incorporación de nuevos cultivos de alta productividad y de buena adaptación a condiciones climáticas y edáficas. Al respecto, existen avanzados estudios en la utilización de sorgo como materia prima en la producción de

Cómo citar este trabajo:

Picca A., Castaño, M., Isasti, J., Pereyra Cardozo, M. C., Fernández, M. A., Ferrari, E. D., Domínguez, R., y Paccapelo, H. (2019). Producción de bioetanol a escala de laboratorio a partir de sorgo granífero (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Semiárida*, 29(1), 11-17.

¹ Universidad Nacional de La Pampa. Facultad de Agronomía. Santa Rosa, Argentina

* apicca@agro.unlpam.edu.ar



bioetanol (Wu *et al.*, 2007; Almodares & Hadi, 2009; Barcelos *et al.*, 2011; Chuck-Hernández *et al.*, 2011; Davila-Gómez *et al.*, 2011; Alegre *et al.*, 2013; Nasidi *et al.*, 2015; Xuan *et al.*, 2015; Nkomba *et al.*, 2016).

El sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) es una especie rústica que puede ser cultivada en una gran variedad de ambientes y tipos de suelos. Es muy eficiente en ambientes cálidos y con intensidad luminosa alta, como los prevalecientes en regiones semiáridas. Se destaca por su mayor adaptación y mejor respuesta en condiciones edafo-climáticas limitantes, dando estabilidad de rendimientos en situaciones productivas de menor potencialidad, donde el maíz no responde. Es tolerante a deficiencias hídricas: requiere aproximadamente un tercio del agua para la producción de grano o biomasa comparado con el maíz o la caña de azúcar. A su vez, puede producir satisfactoriamente aún con bajo nivel de fertilidad, adaptándose a ambientes marginales no compitiendo, en general, en superficie con otras especies para alimento humano. El sorgo puede ser utilizado tanto para la producción de biocombustibles de primera generación (bioetanol a partir de grano o azúcar de tallos) como en alternativas de segunda y tercera generación (aprovechamiento del bagazo, biogás, etc.) (Chuck-Hernández *et al.*, 2011; Giorda *et al.*, 2012).

El proceso de producción de bioetanol en base a molienda seca de sorgo involucra varios pasos: 1) molienda del grano, 2) gelatinización, licuefacción y sacarificación del almidón, 3) inoculación con levaduras y fermentación de los azúcares a bioetanol. En cualquiera de estos pasos pueden ocurrir efectos adversos que resulten en un menor rendimiento de bioetanol y en una reducida eficiencia de conversión (Wu *et al.*, 2007).

El objetivo de este estudio fue comparar diferentes genotipos de sorgo como sustrato y evaluar un método potencial para la producción de bioetanol a partir de este cereal

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal y determinaciones

El ensayo se llevó a cabo en el Campo Experimental de la Facultad de Agronomía de la

Universidad Nacional de La Pampa, ubicado en la ruta 35 km 334, Santa Rosa, La Pampa (Argentina), a 36° 46' de latitud sur y 64° 17' longitud oeste y a 210 msnm (metros sobre el nivel del mar), durante 2014. El suelo se clasificó como Paleustol petrocálcico (Soil Survey Staff, 1999), con escasa pendiente superficial y un manto de tosca en el subsuelo, a una profundidad que varió entre 1,0 y 1,2 metros. La siembra se efectuó con sembradora neumática en una densidad de 10 semillas por metro lineal y a 0,5 m entre hileras lográndose alrededor de 18 plantas por m² a la emergencia. Cada parcela tuvo 10 m de largo por 6 surcos de ancho, bajo un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. La fecha de la siembra fue el 28 de noviembre de 2014. Se condujo en secano sin limitaciones nutricionales. Se emplearon cinco cultivares de sorgo granífero (*Sorghum bicolor* L. Moench), INTA Blanco, ProINTA 341, Pakarí INTA, Antel INTA y Nehúen INTA y dos líneas experimentales, Experimental Manfredi 3 y Experimental Manfredi 155, cedidas por la EEA INTA Manfredi, Córdoba.

Las determinaciones realizadas fueron: peso de mil granos, peso hectolítrico, humedad, contenido total de proteína, taninos totales, taninos condensados, textura de endosperma, rendimiento de bioetanol, azúcares fermentables disponibles y grado alcohólico.

El peso de los granos (g) se calculó sobre una muestra de 200 granos y se extrapoló al peso de 1000 granos (PMG). El Peso Hectolítrico (PH) se determinó como el promedio del peso corregido de los granos contenidos en una probeta de 100 ml, sobre dos repeticiones y se realizó la conversión a kg.hl⁻¹.

La determinación del contenido de humedad se llevó a cabo según el método AACC 44-15A (2000).

El contenido total de proteínas se midió sobre grano entero por el método Micro-Kjeldhal modificado para ácido bórico (Método 46-12, AACC, 2000).

Para la determinación de taninos totales se utilizó el protocolo propuesto por Price & Butler (1977) que se basa en la extracción de las

sustancias tánicas con agua hirviendo, en la que se solubilizan. Se trata de un método cualitativo de apreciación visual por colores determinados. La aparición del color verde claro indica porcentaje de taninos totales menor al 0,4% y se considera bajo en taninos. El verde oscuro indica entre el 0,4 y 0,8% de taninos, lo que se considera valor medio y por último el color azul indica alto valor en taninos, mayor al 0,8%.

Para los taninos condensados se siguió la prueba del blanqueo con cloro (Chloro bleach test con base álcali) de SENASA (2011). Para la clasificación de los granos en las distintas categorías se adoptó lo propuesto por Alegre *et al.* (2013). Se consideraron “con taninos condensados” los que presentaron un color marrón oscuro a negro y los “sin taninos” un color blanco a amarillo claro con el hilum de color castaño oscuro. Los materiales clasificados como “bajo tanino” presentaron manchas castañas sobre un fondo color blanco a amarillo.

La textura del endosperma se determinó visualmente según la escala de Rooney & Miller (1982).

La producción de bioetanol se realizó acorde al protocolo propuesto por Alegre *et al.* (2013) con modificaciones. Los granos de sorgo fueron molidos en un molino a hélice (Dalvo) hasta un tamaño de partícula menor a 1 mm de diámetro. Para la digestión enzimática, 30 gramos de muestra fueron colocados en erlenmeyers de 250 ml a los que se le agregó 100 ml de medio de fermentación (extracto de levadura, 0,3%; peptona de carne, 0,35%; KH_2PO_4 , 0,2%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1%; pH 5,5) previamente calentado a 60-70°C y 400 uL de enzima α -amilasa (Spyzeme R RSL). Los frascos se mantuvieron en baño térmico a 90°C con agitación a 125 rpm por 2 horas. Posteriormente fueron enfriados hasta 40-45°C y el pH ajustado a 4,5 con HCl 1N. En estas condiciones fueron agregados 100 uL de enzima glucoamilasa (Distillase R SSF). Los frascos fueron llevados nuevamente al baño térmico a 60°C durante 2 horas en agitación.

Para la fermentación se enfriaron los frascos a temperatura ambiente (20-25°C) y se les agregó 3 ml de *Saccharomyces cerevisiae*. Los

frascos fueron cerrados con tapones con mangueras que permitían el burbujeo del CO_2 liberado en una solución de BaCl_2 y se mantuvieron en baño térmico a 30°C, con agitación, durante 68 hs aproximadamente.

La determinación del rendimiento de bioetanol se realizó por gravimetría. Para esto se pesaron los frascos antes y después del proceso fermentativo. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado y se utilizaron blancos de fermentación.

La evaluación del grado de alcohol probable en la muestra se realizó mediante la cuantificación de grados Brix en el sobrenadante final, utilizando un refractómetro de Abbe.

La estimación de la concentración de bioetanol se realizó mediante el método del ácido crómico (Caputi *et al.*, 1968) midiendo la absorbancia a 584 nm en espectrofotómetro

Análisis estadístico

Se realizó el Análisis de la Varianza para los datos de rendimiento de bioetanol y se utilizó la prueba de Diferencias Mínimas Significativas ($p < 0,05$) para separar promedios con el programa InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2008). Se realizaron análisis de correlación entre el rendimiento de bioetanol y las variables morfoagronómicas.

RESULTADOS

El resultado de las determinaciones en todas las variedades se muestra en la Tabla 1. Coincidentemente con lo informado por Alegre *et al.* (2013), el híbrido INTA Blanco mostró el mayor rendimiento de bioetanol (481,5 ml.kg MS^{-1}), mientras que el menor valor, correspondió al cultivar Antel INTA (428,13 ml.kg MS^{-1}), encontrándose diferencia significativa solo entre los genotipos antes mencionados.

Ha sido encontrado un amplio rango de eficiencia en la producción de bioetanol a partir de sorgo (Wu *et al.*, 2007). Este proceso básicamente genera bioetanol a partir del almidón de los granos de sorgo, por lo que se espera que, a mayor concentración de almidón de los granos cabría esperar un mayor rendimiento de bioetanol, sin embargo, Wang *et*

al. (2008), trabajando con 70 variedades de sorgo encontraron diferencias de hasta el 7,4% en la producción de bioetanol entre variedades con similar concentración de almidón. En nuestro estudio se observó que el cultivar de mayor peso de grano produjo un menor rendimiento en alcohol lo cual se asocia a la correlación negativa y significativa (-0,68) encontrada entre ambas variables. Asumiendo una relación positiva entre el peso del grano y la concentración de almidón, también podemos expresar que la concentración de almidón no es la principal determinante en la producción de bioetanol. En el sorgo, es ya bien conocido, que el rendimiento de bioetanol se ve afectado cuando el contenido de proteínas se incrementa, debido a una relación inversa entre el contenido de almidón y el contenido de proteína (Wang *et al.*, 2008). Acorde a esto, en nuestro trabajo se encontró que el cultivar INTA Blanco (genotipo de mayor rendimiento de bioetanol) presentó el menor contenido de proteínas y el cultivar Antel INTA (genotipo de menor rendimiento de bioetanol) presentó el mayor contenido de proteínas (Tabla 1). Sin embargo, aún con la misma cantidad de proteína, la eficiencia de fermentación puede variar hasta 8% indicando que existen otros factores que influyen en la tasa de conversión del almidón (Wang *et al.*, 2008). Otros autores expresan que entre los factores claves que afectan el rendimiento de bioetanol a partir de los granos de sorgo se encuentran: la

dureza del grano y tamaño de partícula, concentración de almidón y digestibilidad, tipo y cantidad de compuestos fenólicos, contenido de amilosa, formación de complejos amilosa-lípidos durante el amasado y viscosidad de la masa entre otros (Wu *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2008, Yan *et al.*, 2009).

En términos generales, las variedades de sorgo con tipo de endosperma ceroso o waxy (aproximadamente 100% amilopectina) presentan mayor rendimiento en bioetanol que las variedades no cerosas o normales (aproximadamente 75% de amilopectina y 25% de amilosa) a igualdad de contenido total de almidón. Esto podría explicarse por los efectos adversos del mayor contenido de amilosa durante la gelatinización. La gelatinización reducida puede restringir el acceso de las enzimas hidrolíticas a las moléculas de almidón, resultando en una pobre conversión a glucosa (Wang *et al.*, 2008). Todos los genotipos testeados en este trabajo presentan el tipo de endosperma normal (Giorda, comunicación personal). El valor promedio de rendimiento de bioetanol obtenido en nuestro estudio (459,62 ml.kg MS⁻¹) fue similar o levemente superior a los citados por la bibliografía. Chuck-Hernández *et al.* (2011) sugieren un valor medio de 390 L por tonelada. Alegre *et al.* (2013) obtuvieron un promedio de 458,74 ml.kg MS⁻¹; Yan *et al.* (2009) trabajando con granos de sorgo de alta concentración de taninos germinados y sin

Tabla 1: Rendimiento en bioetanol en sorgo granífero y propiedades de los granos.

Table 1: Bioethanol yields in grain sorghum and grain properties.

Genotipo	PMG (g)	PH	Taninos (%)	Taninos condensados	%H	TE	Rendimiento (ml.kg MS ⁻¹)	GBM	CE v/v	CE °GL	Proteína (%N*6,25)
INTA Blanco	22,0 d	78,65 b	< 0,4	Sin taninos	7,47	2	481,77 a	7,05	93,28	1,11	6,60 d
ProINTA 341	24,0 c	79,15 b	< 0,4	Bajo taninos	7,77	3	469,26 ab	6,55	92,94	1,08	8,72 c
Pakarí INTA	27,0 b	75,75 d	> 0,8	Con taninos	8,41	4	469,09 ab	3,25	93,59	1,07	7,16 d
ExpMf 3	22,5 cd	72,05 f	> 0,4 < 0,8	Bajo taninos	8,00	3	465,60 ab	7,00	92,09	0,99	9,13 bc
ExpMf 155	27,0 b	74,35 e	< 0,4	Sin taninos	8,18	3	458,93 ab	6,70	95,85	1,07	9,53 ab
Nehuen INTA	23,0 cd	77,10 c	> 0,8	Con taninos	7,80	4	444,57 bc	6,30	90,71	1,05	7,06 d
Antel INTA	31,0 a	80,70 a	< 0,4	Bajo taninos	7,66	2	428,13 c	6,55	93,58	1,02	9,94 a

PMG: Peso Mil Granos; PH: Peso Hectolítrico; %H: Humedad; TE: Textura Endosperma; Rendimiento: Rendimiento de Bioetanol en ml.kg MS⁻¹; GBM: Grados Brix Mosto Final; CE v/v: Concentración Bioetanol; CE °GL: Concentración Bioetanol en grados Guy Lussac; Prot. (%N*6,25): Contenido de Proteína

germinar informaron valores promedios de 409,72 ml.kg MS⁻¹ y 397,79 ml.kgMS⁻¹ respectivamente. Por otra parte, Yan *et al.* (2011) analizando 25 genotipos de sorgo waxy, obtuvieron valores promedio de 417,16 ml.kg MS⁻¹ y concluyeron que el rendimiento de bioetanol es esencialmente proporcional al contenido de almidón, teniendo muy poco efecto los bajos valores de contenido de amilosa de los granos utilizados, tanto en el rendimiento de bioetanol como en la eficiencia de fermentación.

La textura del endosperma de los granos de sorgo está determinada por la proporción relativa de endosperma córneo o harinoso. La textura afecta las propiedades de procesamiento de los granos, considerándose que los granos con alto porcentaje de endosperma córneo presentan mayor rendimiento en la molienda seca ya que el pericarpio es fácilmente removido dejando intacto el almidón del endosperma. Por otra parte, los granos harinosos presentan mejor comportamiento en la molienda húmeda en condiciones de laboratorio (Rooney & Miller, 1982).

Estos mismos autores propusieron una escala para la clasificación de los granos, en un rango del 1 al 5, correspondiendo el valor 1 a aquellos granos cuyo endosperma es completamente córneo y 5 para aquellos esencialmente harinoso. Todas las variedades utilizadas en este trabajo fueron caracterizadas como intermedias respecto de las dos fracciones anteriores, teniendo en cuenta la escala antes mencionada (Tabla 1), por lo que no pudo determinarse una relación entre la textura del endosperma y el rendimiento de bioetanol.

Los taninos generan efectos adversos en la digestibilidad del almidón debido a que interactúan con las proteínas (incluyendo enzimas hidrolíticas), iones metálicos y polisacáridos (Strumeyer & Malin, 1975; Rooney & Pflugfelder, 1986). Los taninos condensados forman complejos con las proteínas disminuyendo la digestibilidad y su calidad nutricional, actúan como inhibidores de enzimas y de las levaduras (Ramírez, 2014). Wu *et al.* (2007), encontraron que la licuefacción del almidón de los sorgos con taninos fue más dificultosa y lenta que en los sorgos waxy y

normales. Por su parte, Alegre *et al.* (2013), informaron que los cultivares de alto contenido en taninos condensados presentaron los menores rendimientos de bioetanol. Wang *et al.* (2008) concluyeron que las variedades con alta concentración de taninos no son una buena opción para la producción de bioetanol. En el presente trabajo no pudo asociarse el contenido de taninos con la producción de bioetanol, dado que los valores extremos en el rango de producción de bioetanol correspondieron a las variedades INTA Blanco y Antel INTA, caracterizadas como sin taninos condensados y baja en taninos condensados, respectivamente, y por otra parte valores intermedios de producción de bioetanol se obtuvieron en genotipos con alto contenido de taninos como Pakarí INTA y Nehuén INTA (Tabla 1). Existe cierta divergencia entre los resultados obtenidos por el método de Price y Butler para taninos totales y el método del blanqueo con cloro (SENASA, 2011) para algunos genotipos. Esto podría explicarse en primera medida porque ambos son métodos cualitativos que no tienen la rigurosidad de los métodos cuantitativos. Por otra parte, existen referencias que los resultados del método de blanqueo con cloro están sumamente influenciados por la humedad del grano y por el acondicionamiento de los mismos (Giorda, comunicación personal).

Los grados Brix dan una idea de la concentración de azúcares fermentables disponibles en el mosto. De manera que, los grados Brix disminuyen a medida que las levaduras utilizan los azúcares fermentables para llevar a cabo la fermentación alcohólica. Los valores obtenidos en el mosto final estuvieron en el rango de 6,30 a 7,05 grados Brix, excepto para Pakarí INTA (3,25), siendo similares a lo informado por Beltrán & Comba (2012) y por Barletta *et al.* (2012) para mostos finales de maíz y sorgo respectivamente.

CONCLUSIONES

Este estudio permitió poner a punto un procedimiento para obtener bioetanol a partir del grano de sorgo a escala de laboratorio. Se encontraron diferencias genotípicas en la producción de bioetanol, sin embargo no pudieron asociarse a las diferentes

características evaluadas del grano. Esta investigación se continuará, a fin de comprender los efectos de las propiedades del almidón y la estructura y función de las proteínas en el rendimiento de la producción de bioetanol a partir del grano de sorgo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la empresa Porta Hnos. S.A. y muy especialmente a la Ing. Nadia Comba, por proveernos gentilmente de las enzimas alfa amilasa, glucoamilasa y levaduras utilizadas en este trabajo. A la Ingeniera Laura María Giorda, de la Estación Experimental Agropecuaria INTA Manfredi por facilitarnos el material vegetal y al Mg. Luis Alberto Toselli, Director del G.I.S.I.Q (Grupo de Investigación en Simulación para Ingeniería Química) Facultad Regional Villa María, Universidad Tecnológica Nacional.

BIBLIOGRAFÍA

- Alegre, M., Copia, p. & Giorda, L. M. (2013). Sorgo granífero, fuente potencial para la producción de bioetanol en Argentina. II Simposio Nacional de Sorgo. Sociedad Rural de Pergamino, Buenos Aires.
- Almodares, A. & Hadi, M. R. (2009). Production of bioethanol from sweet sorghum (review). *African Journal of Agricultural Research*, 4, 772-780.
- American Association of Cereal Chemist. (2000). Approved Methods of the AACC. 10th Edition, American Assoc. St Paul, United States: Cereal Chemists Inc.
- Barcelos, C. A., Maeda, R. N., Betancur, G. J. V. & Pereira, N. Jr. (2011). Ethanol production from sorghum grains [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]: Evaluation of the enzymatic hydrolysis and the hydrolysate fermentability. *Brazilian Journal of chemical engineering*, 28(4), 597-604.
- Barletta, A. L., Sánchez, Y. I. & Valazza y L. A. (2012). Obtención de bioetanol a partir de la fermentación del sorgo. 5ª Jornadas de Ciencia y Tecnología de la Facultad Regional Villa María, Universidad Tecnológica Nacional, Villa María. Córdoba, Argentina. Recuperado de http://www.edutecne.utn.edu.ar/cytaal_frm/CyTAL_L_2012/TF/TF029.pdf
- Beltrán, R. A. y Comba, N. Z. (2012). Rendimientos de bioetanol en fermentaciones realizadas con mostos de alta concentración de sólidos. 5ª

Jornadas de Ciencia y Tecnología de la Facultad Regional Villa María, Universidad Tecnológica Nacional, Villa María. Córdoba, Argentina. Recuperado de www.edutecne.utn.edu.ar/cytaal_frm/CyTAL_2012/TF004.pdf

- Caputi, A., Ueda, M. T. & Brown, T. (1968). Spectrophotometric determination of ethanol in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 19, 160-165.
- Chuck-Hernández, C., Pérez-Carrillo, E., Heredia-Olea, E. y Serna-Saldívar, S. O. (2011). Sorgo como un cultivo multifacético para la producción de bioetanol en México: tecnologías, avances y áreas de oportunidad. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10, 529-549.
- Dávila-Gómez, F. J., Chuck-Hernández, C., Pérez-Carrillo, E., Rooney, W. L. y Serna-Saldívar, S. O. (2011). Evaluation of bioethanol production from five different varieties of sweet and forage sorghums (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Industrial Crops and Products*, 33, 611-616.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M. y Robledo, C. W. (2008). InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Giorda, L. M., Ortiz, D., & Donato, L. B. (2012). ¿Porqué sorgo para bioenergía en Argentina?. II Simposio Nacional de Sorgo. Sociedad Rural de Pergamino, Buenos Aires.
- Nasidi, M., Agu, R. C., Deeni, Y., Giginyu, I. B. & Walker, G. (2015). Bioconversion of degraded husked sorghum grains to ethanol. *Bioethanol*, 2, 1-11.
- Nkomba, E. Y., van Rensburg, E., Chimphango, A. F. A & Görgens, J. F. (2016). The influence of sorghum grain decortication on bioethanol production and quality of the distillers' dried grains with soluble using cold and conventional starch processing. *Bioresource Technology*, 203, 181-189.
- Price, M. L. & Butler, L. G. (1977). Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25(6), 1268-1273.
- Ramírez, M. B. (2014). Mejoras en la producción de bioetanol combustible a partir de sorgo grano (Tesis de Maestría). Universidad de la República, Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay.
- Rooney, L. W. & Miller, F. R. (1982). Variation in the structure and kernel characteristics of sorghum. Proceedings of the International Symposium on Sorghum Grain Quality. ICRISAT Center

- Patancheru, India.
- Rooney, L. W. & Pflugfelder, R. L. (1986). Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn. *Journal of Animal Science*, 63, 1607-1623.
- SENASA (2011). Resolución 554/2011. Anexo XVIII (11)
- Soil Survey Staff (1999). Soil taxonomy: a basic system o soil classification for making and interpreting soil surveys. Agric. Handbook (2nd ed.), USDA
- Strumeyer, D. H. & Malin, M. J. (1975). Condensed tannins in grain sorghum: isolation, fractionation, and characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23(5), 909-914.
- Wang, D., Bean, S., McLaren, J., Seib, P., Madl, R., Tuinstra, M., Shi, Y., Lenz, M., Wu, X. & y Zhao, R. (2008). Grains sorghum is a viable feedstock for ethanol production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35, 313-320.
- Wu, X., Zhao, R., Bean, S. R., Seib, P. A., McLaren, J. S., Madl, R. L., Tuinstra, M., Lenz, M. C. & Wang, D. (2007). Factors impacting ethanol production from grain sorghum in the dry-grind process. *Cereal Chemistry*, 84, 130-136.
- Xuan, T. D., Phuong, N. T., Khang, D. T., & Khang, T. D. (2015). Influence of sowing times, densities, and soils to biomass and etano yield of sweet sorghum. *Sustainability*, 7, 11678-11678.
- Yan, S., Wu, X., Bean, S. R., Pedersen, J. F., Tesso, T., Chen, Y. R. & Wang, D. (2011). Evaluation of waxy grain sorghum for ethanol production. *Cereal Chemistry*, 88(6), 589-595.
- Yan, S., Wu, X., MacRitchie, F. & Wang, D. (2009). Germination-Improved Ethanol Fermentation Performance of Hig-Tannin Sorghum in a Laboratory Dry-Grind Process. *Cereal Chemistry*, 86(6), 597-600.
- Zhao, R., Bean, S. R., Joerger, B. P., Wang, D. & Boyle, D. L. (2008). Impact of mashing on sorghum proteins and its relationship to ethanol fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 946-953.