

**Evaluación del contenido de glucosa de  
biomasa lignocelulósica por hidrólisis  
enzimática en mutantes *bmr* de sorgo**

**Victor David Figueroa Bueso**

**Zamorano, Honduras**

Diciembre; 2009

ZAMORANO  
CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

# **Evaluación del contenido de glucosa de biomasa lignocelulósica por hidrólisis enzimática en mutantes *bmr* de sorgo**

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingeniero en Ciencia y Producción Agropecuaria en el  
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Victor David Figueroa Bueso**

**Zamorano, Honduras**  
Diciembre; 2009

# **Evaluación del contenido de glucosa de biomasa lignocelulósica por hidrólisis enzimática en mutantes *bmr* de sorgo**

Presentado por:

Victor David Figueroa Bueso

Aprobado:

---

Juan Carlos Rosas, Ph.D.  
Asesor principal

---

Miguel Vélez, Ph.D.  
Director Carrera de Ciencia y  
Producción Agropecuaria

---

Marcelino Guachambala, Ing. Agr.  
Asesor

---

Raúl Espinal, Ph.D.  
Decano Académico

---

Francisco Javier Bueso, Ph.D.  
Asesor

---

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.  
Rector

---

Abelino Pitty, Ph.D.  
Coordinador de Fitotecnia

## RESUMEN

Figuroa, V. 2009. Evaluación del contenido de glucosa de biomasa lignocelulósica por hidrólisis enzimática en mutantes *bmr* de sorgo. Proyecto especial de graduación del Programa de Ingeniero Agrónomo. Zamorano, Honduras. 14 p.

En los últimos años ha habido un incremento notorio en los intereses políticos y ambientales para establecer una producción sólida de energías renovables. Una opción que destaca es la producción de bioetanol de segunda generación. El uso de genotipos con mayor contenido de glucosa optimiza el aprovechamiento de esta tecnología. El propósito del estudio fue evaluar el contenido potencial de glucosa de 161 mutantes *bmr* desarrollados a través de mutagénesis química (EMS) y cinco genotipos silvestres. La evaluación se realizó a través de un proceso de hidrólisis enzimática con las enzimas Novozyme y Celluclast. El rango de producción de glucosa observado fue 29.9 a 113.5 ± 14.4 mg glucosa/g biomasa. El promedio de las muestras fue de 69.2 mg glucosa/g biomasa. Se seleccionó un grupo de 23 mutantes superiores (15% de la población), los cuales mostraron un promedio de 92.8 mg glucosa/g biomasa, de este grupo se eligieron seis mutantes con rendimientos superiores a 94 mg glucosa/g biomasa los cuales forman el grupo de mutantes élite, con una producción promedio de 100.5 mg glucosa/g biomasa. El contenido de glucosa de los genotipos silvestres fue de 71.7 mg glucosa/g biomasa, los mutantes élites presentan una superioridad en rendimiento de glucosa de 40.17% que equivale a 28.8 mg glucosa/g biomasa más que los silvestres.

**Palabras clave:** Bioetanol, mutagénesis química, genotipos.

## ABSTRACT

Figuerola, V. 2009. Evaluation of the content of glucose of lignocellulosic biomass by enzymatic hydrolysis in *bmr* sorghum mutants. Bachelor in Science and Agricultural Production. 14 p.

An increase in the political and environmental interests to establish a solid renewable energy production has occurred in the last few years. A relevant option is the production of second generation bio ethanol. The use of crops with higher glucose content optimizes the use of this technology. The purpose of this study was to evaluate the potential glucose content of a total of 161 *bmr* sorghum mutants developed through chemical mutagenesis (EMS) and five wild types. The evaluation was done through an enzymatic hydrolysis process with two enzymes (Novozyme and Celluclast). The glucose production rank observed was of 29.9 to 113.5 mg glucose/g biomass. The average of the total population was of 69.2 mg glucose/g biomass; the variance was of 208.1 mg glucose/g biomass and the standard deviation of 14.4 mg glucose/g biomass. A group of 23 sorghum superior mutants was selected (15% of the population), they showed an average of 92.8 mg glucose/g biomass. Of this selected group, six mutants were chosen with yields higher than 94 mg glucose/g biomass, they make part of the elite mutants with an average production of 100.5 mg glucose/g biomass. The glucose content of these wild type genotypes was of 71.7 mg glucose/g biomass. The elite mutants present an average superiority in glucose yield of 28.8 mg glucose/g biomass in relation to the wild types, which is equal to a 40.2 % increase in glucose yield.

**Key Words:** Bioethanol, chemical mutagenesis, genotypes.

## CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas .....	ii
Resumen.....	iii
Abstract.....	iv
Contenido.....	v
Índice de cuadros, figuras y anexos .....	vi
1. <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
2. <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	3
3. <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	5
4. <b>CONCLUSIONES</b> .....	9
5. <b>RECOMENDACIONES</b> .....	10
6. <b>LITERATURA CITADA</b> .....	11
7. <b>ANEXO</b> .....	12

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

### Cuadro

1. Variación del contenido de glucosa (mg glucosa/g biomasa) en mutantes *bmr* de sorgo.....5
2. Valores promedio en mg glucosa/g biomasa de los grupos de los mutantes *bmr* superiores y élite. ....8

### Figura

1. Distribución de los mutantes *bmr* y controles de sorgo según su variación en la acumulación de glucosa. ....6
2. Distribución de los genotipos de los mutantes *bmr* según su contenido de glucosa... ..7

### Anexo

1. Contenido de glucosa en la población total de los individuos mutantes y silvestres de los genotipos evaluados .....12
2. Flujograma de procesos para la extracción de glucosa de las muestras de sorgo estudiadas.....14

## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha habido un incremento notorio en el interés de políticos y ambientalistas para establecer una producción sólida de energías renovables. Se entiende por energías renovables como aquellas energías que al utilizarse no devastan ni agotan su fuente.

De 1990 a 1996 hubo un incremento en la producción de CO<sub>2</sub> en Norteamérica, (excluyendo a México) de 8.7% (141, 000,000 t de C) causado por la utilización de combustibles fósiles. En este mismo lapso de tiempo, América Latina incrementó en 13.2% las emisiones de CO<sub>2</sub> (38, 000, 000 t de C) (Pinguelli y Kahn 2001).

Se espera que la producción de energías renovables disminuya la dependencia de los países de Sudamérica y el Medio Oriente que poseen combustibles fósiles. Si se inicia de lleno en la producción de energías renovables, esto contribuirá en una reducción significativa del gas de efecto invernadero dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

En países como Estados Unidos la mayor parte del etanol es producido a partir de almidón de maíz (*Zea mays*, L.), pero la producción de granos es insuficiente para satisfacer la demanda local y de otros países, particularmente latinoamericanos, donde el maíz forma parte de la canasta básica. Estos países dependen de la producción de maíz de Estados Unidos para llenar sus demandas alimenticias y mantener un precio moderado o alcanzable por parte de familias de escasos recursos, ya que la producción propia no es suficiente para satisfacer la demanda (Vermerris y Saballos 2007).

Un estudio realizado por el Departamento de Agricultura y el Departamento de Energía de Estados Unidos ha mostrado que más de 1.3 billones de toneladas de biomasa de desperdicio de actividades agrícolas y forestales podrían usarse anualmente para su procesamiento con fines de producción de biocombustibles. Esta cantidad sería suficiente para reemplazar 30% de los requerimientos de combustible para fines de transporte en este país (Taylor, s.f.).

La hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica de hojas y tallos de maíz y sorgo (*Sorghum bicolor*) puede proveer una fuente abundante de azúcares fermentables. Aunque la producción de etanol a partir de estos azúcares es factible desde el punto de vista del balance energético, actualmente su producción no es económicamente competitiva. Se puede hacer mejoras en el procesamiento, incrementar los rendimientos y mejorar la composición de la biomasa de estos cultivos.

Esto requiere un mejor entendimiento de la composición y estructura de las paredes celulares de los organismos vegetales ya que el alto contenido de celulosa y lignina afecta la eficiencia de la hidrólisis enzimática.

Hay muchos recursos genéticos disponibles para la mejora genética del maíz y el sorgo como fuentes de biomasa lignocelulósica. La utilización de mutantes existentes, la generación de nuevos mutantes por métodos tradicionales o con el uso de ingeniería genética, pueden ayudar al desarrollo de variedades comerciales de maíz y sorgo con una biomasa aprovechable.

En el caso particular del sorgo, se han utilizado mutantes *bmr* (del inglés brown midrib mutants) que fueron desarrollados en la Universidad de Purdue a través de mutagénesis química. A partir de ese momento se han identificado mutantes *bmr* adicionales con una composición química de la pared celular muy variable. Estos mutantes muestran una coloración rojiza-café en su tejido vascular, principalmente en las venas primarias de las hojas (Vermerris y Saballos 2007).

El material genético con el que se trabajó es derivado de la mutación de la línea BTx-623. La semilla de esta línea fue tratada con el mutagénico químico etil metano sulfonato (EMS). El EMS introduce un metilo en la guanina que ya no se aparea con la citosina provocando la transición de GC a AT. Producto de la mutagénesis se obtuvieron 1.600 líneas (M2) de las cuales fueron incrementadas (M3) las que poseían características morfológicas alteradas, y características agronómicas interesantes. Se seleccionaron 768 mutantes basados en la coloración de la vena media y fueron sometidos a una técnica denominada TILLING (Targeting induced local lesion in genome) para identificar las mutaciones a nivel del genoma. El Tilling identificó dos mutaciones en dos líneas independientes que afectaron al gen que codifica la producción de ácido caféico O- metil transferasa (COMT), tenían la vena principal de sus hojas de color café, esta característica fenotípica es un marcador de un bajo contenido de lignina, material limitante para la extracción de glucosa. Al llegar a su madurez fisiológica el sorgo silvestre presenta un contenido de lignina del 12.4%, mientras que los mutantes *bmr* presentan 10.7% (Spada sf.).

Se ha utilizado un gen candidato para clonar el primer gen *bmr* especial para sorgo. Los mutantes generados tienen una actividad fuertemente reducida de la enzima biosintética de lignina Ácido caféico O-metiltransferasa (COMT) (Bout y Vermerris 2003).

En el presente estudio se determinó la producción de glucosa en mutantes *bmr* y en genotipos silvestres de sorgo, a partir de su biomasa lignocelulósica al llegar a su madurez reproductiva. Se comparó la concentración de glucosa obtenida mediante hidrólisis enzimática entre los mutantes élite *bmr* de sorgo (*Sorghum bicolor*) y cinco genotipos silvestres utilizados como controles. Se seleccionaron los genotipos con una producción de glucosa superior a 86 mg glucosa/g biomasa.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 UBICACIÓN

El estudio se desarrolló en el laboratorio Vemerris del Centro de Investigación de Cáncer y Genética en la Universidad de Florida, en un lapso de dos meses y medio. La hidrólisis enzimática fue realizada utilizando las enzimas Novozyme y Celluclast. Novozyme es una enzima que desdobra la celobiosa (celobiasa) generada por el microorganismo *Aspergillus niger* y Celluclast se obtiene de una cepa del hongo *Trichoderma reesei* que cataliza el desdoblamiento de celulosa a glucosa (Sigma s.f).

### 2.2 PROCEDIMIENTOS

**Molido:** Se trituraron los tallos en partículas de 0.5 mm, usando un molino Thomas-Wiley Laboratory Mill, Model 4 de Thomas Scientific que se limpió minuciosamente después del molido de cada muestra para evitar contaminación entre ellas. El número de identificación del tallo fue colocado en las bolsas.

**Pesado:** Se pesó 1.75 g de cada una de las muestras de sorgo molido y que fue colocada en un tubo de 50 mL.

**Lavado:** Se preparó una solución de etanol al 50% en agua desionizada. Esta se calentó a 65 °C en Baño María y se añadieron 50 mL a cada tubo con muestra. Se agitó con Vortex para asegurar el contacto de la muestra con la solución de alcohol. Las muestras se calentaron a 65 °C por un mínimo de 30 minutos en el Baño María. Después se colocaron en el sonicador para introducir burbujas en las ranuras del sorgo molido sorgo y eliminar los taninos, flavonoides y azúcares solubles presentes en la muestra. Se colocó un embudo con un tapón de goma dentro de un ehrlen meyer, diseñado para obtener vacío. Se colocó un papel filtro en el embudo y se vertió el contenido de los tubos sobre el papel de filtro, se succionaron cada una de las muestras para eliminar la solución de etanol y todos los azúcares solubles disueltos. Las muestras fueron colocadas en un nuevo tubo.

**Secado:** Las muestras fueron secadas en el horno a 65 °C por 48 horas. Los grumos que se formaron fueron desintegrados usando una espátula para homegenizar el secado.

**Pesado:** Se utilizó una balanza analítica para pesar  $300 \pm 1$  mg de la muestra seca. Se introdujo este peso en tubos de 15 mL y se agregaron tres bolitas de vidrio (*E. coli rollers*) para favorecer el mezclado.

**Preparación del Coctel Enzimático:** Se utilizaron dos enzimas de la compañía Sigma: Celluclast al 0.43% (v/v) y Novozyme al 0.43% (v/v). Se agregaron 9.7 mL de coctel enzimático por muestra y se llevaron a la incubadora por 48 horas con agitación constante.

**Determinación de Concentración de Glucosa:** Se transfirió el sobrenadante de los tubos de 15 mL a microtubos de 1.5 mL. Los tubos fueron llevados a Baño María a 100 °C, para una inactivación completa de las enzimas. Se centrifugaron por 5 min a 14000 rpm para sedimentar las partículas más grandes. Se tomaron 3.5 µL de las muestras centrifugadas y se colocaron en las tiras del glucómetro por 10 segundos para visualizar las concentraciones de glucosa.

### **2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se utilizó el programa estadístico Statistix 8.1 para analizar los datos.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron 166 genotipos, cinco de ellos eran sorgo de tipo silvestre y fueron usados como controles, los 161 restantes eran mutantes que habían sido generados a través del tratamiento químico con el mutagénico EMS. La cantidad de glucosa promedio obtenida fue de  $69.15 \pm 14$  mg glucosa/g biomasa. El genotipo que mostró la menor contenido de glucosa por hidrólisis enzimática fue 95-BMR con 29.89 mg glucosa/g biomasa y el genotipo con la máxima de glucosa fue 741 con 113.50 mg glucosa/g biomasa (Cuadro 1).

Cuadro 1. Variación del contenido de glucosa (mg glucosa/g biomasa) en mutantes *bmr* de sorgo.

VARIABLES ESTADÍSTICAS	VALORES
Número de muestras	166
Promedio	69.15
Desviación Estándar	14.42
Varianza	208.06
Coefficiente de Variación (%)	20.86
Mínimo	29.89
Media	68.79
Máximo	113.50

La gran variación en el contenido de glucosa muestra que la mutagénesis química puede tener un gran aporte a la generación de nuevos genotipos. El gráfico 1 muestra la distribución del contenido de glucosa en una curva con tres grupos: uno basal donde se encuentran los genotipos con el menor rendimiento, uno exponencial donde se encuentran la mayoría de mutantes y los controles y uno superior decreciente en donde se encuentran los genotipos con un alto contenido de materia disponible para la extracción de glucosa.

En el rango de rendimientos mínimos se encuentran valores de 29.9 y 53.1 mg de glucosa/g de biomasa; en este rango se identificaron 23 genotipos. El incremento exponencial de la concentración de glucosa empieza a partir de 54 y termina en 94 mg glucosa/g biomasa, en éste rango fueron detectados 136 genotipos entre los que se encuentran los genotipos silvestres: BTx-1, BTx-2, BTx-3, BTx-4, BTx-5 (usados como controles). El 15% de los mutantes estudiados (>86 mg glucosa/g biomasa), conforman el grupo de los mutantes superiores. A partir de 94 mg de glucosa/g de biomasa la curva empieza a estabilizarse mostrando una disminución en el incremento de glucosa, esto les sirvió de base para seleccionar un grupo de mutantes élites.

El contenido promedio de glucosa de los genotipos silvestres fue de 71.7 mg/g de biomasa, mientras que el de los superiores fue de 92.8 mg/g y el de los mutantes élite 100.49 mg, es decir 28.8 mg/g más que los silvestres, lo que representa un 40.2% de aumento (Figura 2). El grupo de mutantes élite está formado por los genotipos: 562 BMR, 1606-13, 925-9, 6, 761-9 y el 741.

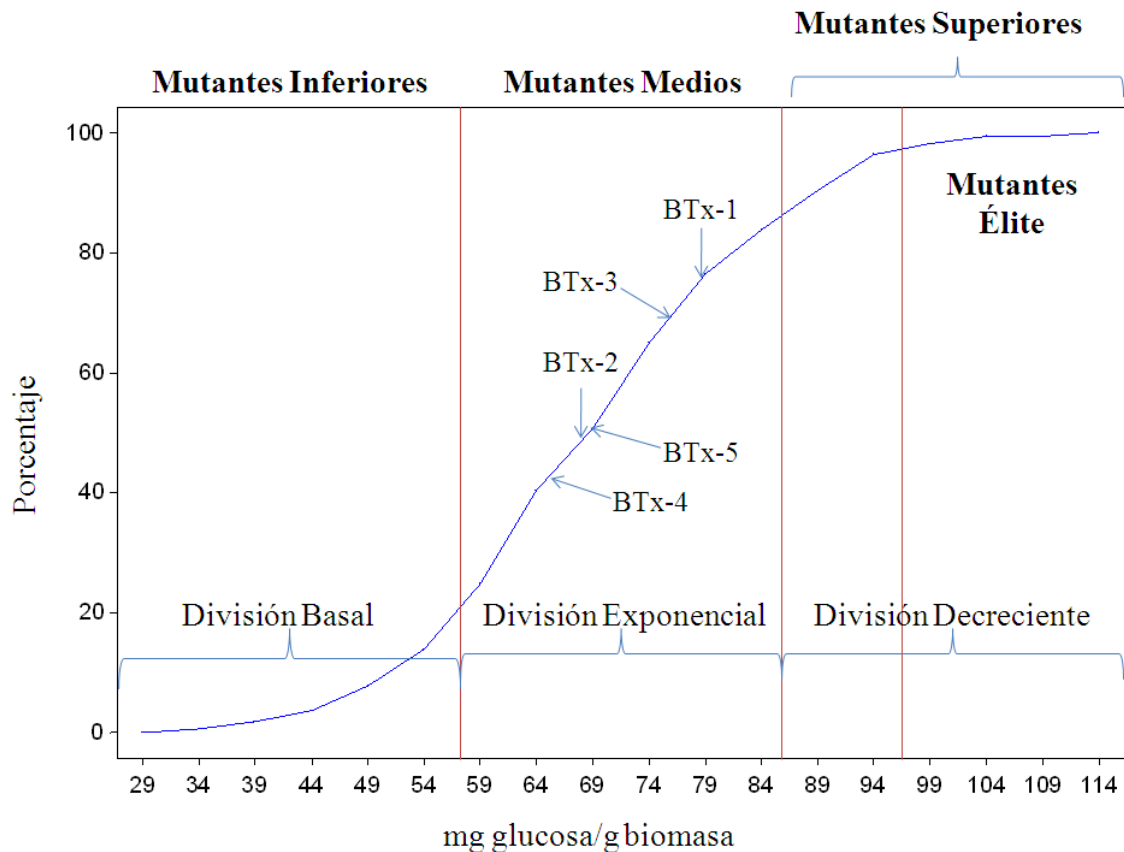


Figura 1. Distribución de los mutantes *bmr* y controles de sorgo según su variación en la acumulación de glucosa.

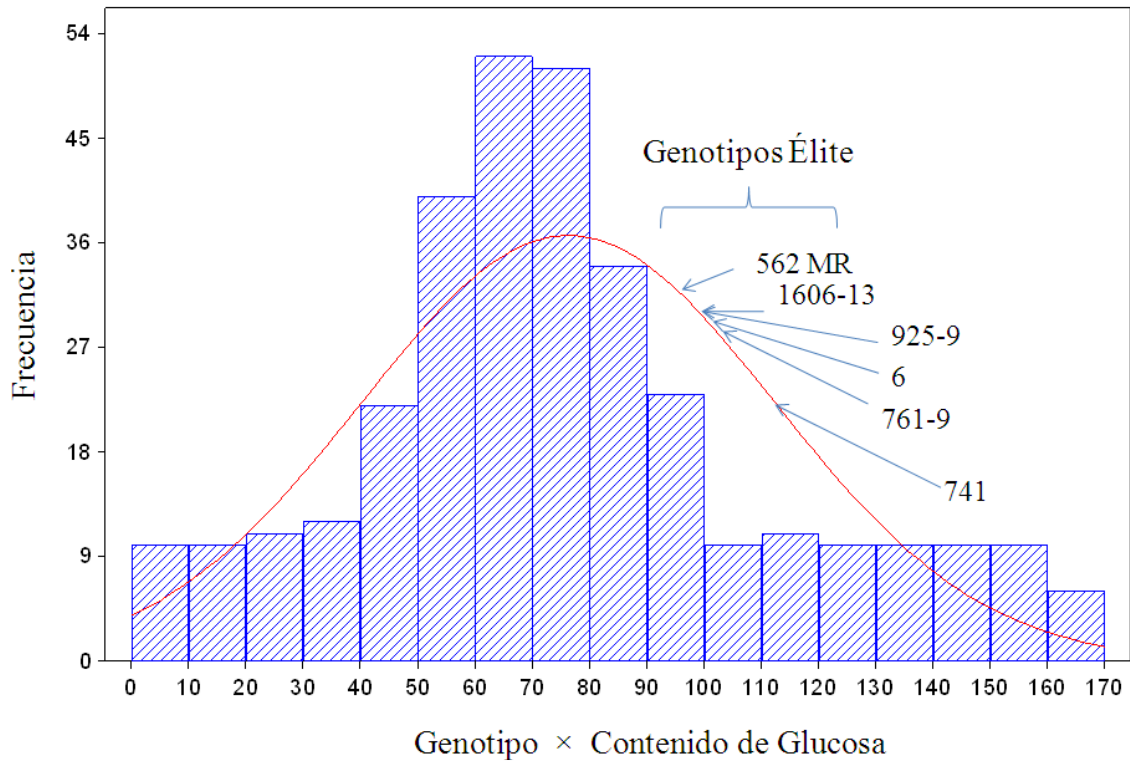


Figura 2. Distribución de los genotipos de mutantes *bmr* según su contenido de glucosa.

En el cuadro 2 se muestra el contenido de glucosa de los mutantes superiores y de los seis genotipos élite. El grupo de los 23 mutantes superiores muestran una buena coloración café de la vena media. Los valores del contenido de glucosa para la población total de mutantes y los genotipos silvestres se encuentran en el Anexo 1.

Cuadro 2. Valores promedio en mg glucosa/g biomasa de los grupos de los mutantes *bmr* superiores y élite.

Identificación de los Superiores	Glucosa	Identificación de los Élite	Glucosa
1619	86.37	562 BMR	94.63
1277	87.08	1606	97.90
1223-11	88.29	925	97.90
917	88.29	6	99.36
1223-13	88.29	761	99.65
240	88.43	741	113.50
Promedio	87.79		100.49

Valor P= 0.001

#### **4. CONCLUSIONES**

- El promedio del contenido de glucosa en los genotipos silvestres fue de 71.69 mg glucosa/g biomasa, mientras que el de los mutantes élite fue de 100.49 mg.
- El contenido de glucosa de los mutantes élite fue superior al de los genotipos silvestres en 28.80 mg glucosa/g biomasa (40.2%).
- Se seleccionaron 23 genotipos superiores con rendimientos mayores a 86 mg glucosa/g biomasa, que representan el 15% de la población total de mutantes.
- De los 23 genotipos superiores seleccionados se escogieron seis genotipos élite. El genotipo élite de menor rendimiento tiene un rendimiento de 94.6 mg glucosa/g biomasa.

## **5. RECOMENDACIONES**

- Evaluar la producción de biomasa de campo de las líneas mutantes superiores.
- Determinar el potencial de los mutantes élite en programas de mejoramiento genético.

## 6. LITERATURA CITADA

Bout, S. Vermerris, W. 2003. A candidate-gene approach to clone the sorghum Brown midrib gene encoding caffeic acid O –methyltransferase. *Genetics and Genomics*. 10 p.

Pinguelli Rosa, L. Kahn Ribeiro, S. 2001. The present, past, and future contributions to global warming of CO2 emissions from fuels. *Contributions to global warming of CO2 emissions from fuels*. Kluwer Academic Publishers. 293 p.

Sigma- Aldrich. Cellobiase from *Aspergillus niger* (en línea). Consultado 7 ago. 2009. Disponible en:  
[http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=Product%20No.%7CBRAND\\_KEY&N4=C6105%7CSIGMA&N25=0&QS=ON&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=Product%20No.%7CBRAND_KEY&N4=C6105%7CSIGMA&N25=0&QS=ON&F=SPEC)

Sigma- Aldrich. Cellulase from *Trichoderma reesei* ATCC (en línea). Consultado 7 ago. 2009. Disponible en:  
[http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO%7CBRAND\\_KEY&N4=C2730%7CSIGMA&N25=0&QS=ON&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=SEARCH_CONCAT_PNO%7CBRAND_KEY&N4=C2730%7CSIGMA&N25=0&QS=ON&F=SPEC)

Spada, M. 1993. Estudio de la relación entre el contenido de lignina y digestibilidad en sorgos de nervadura marrón (en línea). Consultado 23 oct. 2009. Disponible en <http://www.aapa.org.ar/congresos/2003/PpPdf/Pp69.PDF>

Taylor, P. Eley, L. Martin, S. Tuffin, I. Burton, G. Cowan, A. s.f. Thermophilic ethanogenesis: future prospects for second-generation bioethanol production. *Trends in Biotechnology*. 27: 300

Vermerris, W. Saballos, A. Ejeta, G. Mosier, S. Ladisch, R. Carpita, C. 2007. Molecular breeding to enhance ethanol production from corn and sorghum stover. *International Plant Breeding Symposium*. 12 p.

Xin, Z. 2008. Applying genotyping (TILLING) and phenotyping analyses to elucidate gene function in a chemically induced sorghum mutant population. *BMC Plant Biology*. 14 p.

## 7. ANEXOS

Anexo 1. Contenido de glucosa en la población total de los individuos mutantes y silvestres de los genotipos evaluados.

ID	Genotipo	Concentración de Glucosa	ID	Genotipo	Concentración de Glucosa
1	761-4	29.89338	83	223-8	68.587926
2	40	35.635908	84	223-12	68.994024
3	761-5	38.659236	85	btx 623-5	69.138432
4	934	40.600296	86	1245-9	69.437676
5	706	41.78394	87	223-5	69.561558
6	1387-9	43.586136	88	666	70.680456
7	1606-2	44.601216	89	197-1	70.680456
8	204	46.453308	90	100 BMR	70.9302
9	1223-1	47.0778	91	538-1	71.18034
10	1634	47.286756	92	1606-10	71.430876
11	1548-11	48.12654	93	1074	71.430876
12	1945	48.337476	94	372	71.681808
13	1606-11	48.548808	95	1138-3	71.681808
14	421-5	49.18518	96	1601	71.681808
15	1245-10	49.611408	97	761-11	71.933136
16	1138-12	50.03922	98	979	72.43698
17	122	50.899596	99	8	72.689496
18	1399 BMR	51.128352	100	397-7	72.942408
19	1107	52.4205	101	223-1	73.323756
20	1606-12	52.858608	102	921-2	73.44942
21	921-11	52.858608	103	562-12	73.44942
22	921-9	52.858608	104	223-13	73.450212
23	446	53.078256	105	1245-2	73.70352
24	782-4	54.62688	106	597	73.958016
25	1006-2	54.62688	107	23	73.958016
26	575-5	55.072908	108	247	73.958016
27	761-6	55.74492	109	1006-13	74.468196
28	921-10	55.969716	110	240-5	74.501658
29	163	55.969716	111	1245-1	74.72388
30	1245-13	57.326808	112	756-7	74.97996
31	538-5	57.326808	113	14	74.97996
32	1057 BMR	57.559326	114	1606-3	75.236436
33	879	57.78234	115	397-8	75.236436
34	921-7	58.0107	116	1492	75.236436
35	836	58.0107	117	781-5	75.750576
36	397-6	58.239456	118	925-13	75.750576
37	1138-2	58.239456	119	371	76.00824

38	557	58.468608	120	924	76.2663
39	1606-8	58.698156	121	781-8	76.524756
40	538-4	58.698156	122	btx 623-3	76.8901815
41	1748	58.698156	123	1006-1	77.56254
42	197-10	59.15844	124	10	77.56254
43	782-2	59.851836	125	761-7	78.083808
44	1598-3	59.851836	126	1129 BMR	78.14796
45	1827	59.851836	127	btx 623-1	78.998766
46	397-2	60.31608	128	782-7	79.657116
47	1138-1	60.31608	129	485	80.18472
48	223-9	60.458574	130	781-4	80.449116
49	761-12	60.548796	131	820	80.979096
50	1614	60.781908	132	912	80.979096
51	223-6	60.797946	133	782-3	81.51066
52	1138-9	61.953408	134	568-5	82.043808
53	1598-1	61.953408	135	756-10	82.8465
54	921-13	62.188896	136	1083	82.8465
55	95 BMR	62.188896	137	7	82.8465
56	1387-1	62.42478	138	781-10	83.114856
57	1606-9	62.42478	139	562-10	83.383608
58	1668	62.66106	140	307	84.462576
59	761-1	62.897736	141	781-1	85.004436
60	782-1	63.134808	142	9	85.27596
61	781-12	63.134808	143	1387-4	85.54788
62	12	63.134808	144	1619	86.366016
63	575-11	63.61014	145	1277 BMR	87.081456
64	538-7	63.61014	146	1223-11	88.28886
65	223-2	63.610338	147	917	88.28886
66	1402	63.8484	148	1223-12	88.28886
67	1593	63.8484	149	240-4	88.429374
68	782-11	64.326108	150	1387-11	88.565136
69	1387-12	64.565556	151	1606-4	89.6742
70	4	64.565556	152	568-8	89.952456
71	197-11	65.04564	153	1606-1	90.231108
72	btx 623-4	65.512282	154	759	90.510156
73	1245-8	65.768736	155	1103	91.349676
74	1223-13	65.768736	156	240-3	92.336046
75	397-5	66.738408	157	13	92.47458
76	562-9	67.227402	158	25	92.756796
77	223-3	67.671054	159	895	93.60582
78	921-1	67.714416	160	240-1	93.606018
79	11	67.714416	161	562 BMR	94.627038
80	btx 623-2	67.917333	162	1606-13	97.9044
81	880	68.204796	163	925-9	97.9044
82	1605	68.45058	164	6	99.35706
			165	761-9	99.64878
			166	741	113.495976

---

Anexo 2. Flujograma de procesos para la extracción de glucosa de las muestras de sorgo estudiadas.

