



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## CAMPUS TUXTEPEC

---

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Efecto de la molienda mecánica en las propiedades fisicoquímicas de fuentes de carbono con posible uso en producción de hidrógeno por fermentación.

## T E S I S

Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias Químicas**

Presenta:

**Lizzette Ivette Morales Toledo**

Director de tesis

**Dr. Erick Adrián Juárez Arellano**

Co-directora

**Dra. Ana Karin Navarro Martínez**

**San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México.  
2018**



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

OFICIO	DEP/2018/MCQ/004
ASUNTO	Revisión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., a 9 de marzo de 2018

**C. LIZZETTE IVETTE MORALES TOLEDO**  
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS  
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores.

Dr. Omar Viñas Bravo	UNPA	Presidente
Dr. Alejandro Aparicio Saguilán	UNPA	Secretario
Dr. Rubí G. Utrilla Coello	UNPA	1er Suplente
Dr. Adolfo López Torres	UNPA	2º Suplente
Dra. Nelda Xanath Martínez Galero	UNPA	Vocal

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

*terra uberrima, mens aperta*  
Bou Lo-tama, chí jí jú



DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**Dra. Sandra T. del Moral Ventura**  
Jefe de la División de Estudios de Posgrado



**M. en C. Héctor López Arjona**  
Vice-rector Académico

Vo. Bo.

VICE-RECTORIA ACADÉMICA

C.c.p. Dr. Erick A. Juárez Arellano – Director de tesis.  
C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefe de Servicios Escolares.  
C.c.p. Archivo



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2018/022
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 24 de abril de 2018

**L. P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL**  
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES  
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestra en Ciencias Químicas de la **C. Lizzette Ivette Morales Toledo**, matrícula 15130007, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Efecto de la molienda mecánica en las propiedades fisicoquímicas de fuentes de carbono con posible uso en producción de hidrógeno por fermentación**" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

Sin otro asunto en particular, me despido quedando atento ante cualquier duda y deseándole suerte en todas sus actividades.

Atentamente

*terra uberrima, mens aperta*  
Bou Lo-tama, chí jí jú

**Dra. Sandra T. del Moral Ventura**  
Jefe de la División de Estudios de Posgrado



C.c.p. C. Lizzette Ivette Morales Toledo  
C.c.p. Archivo

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec por abrirme las puertas como un estudiante más de sus filas, por darnos la oportunidad a muchos de conseguir un peldaño más tanto personal como profesional.

A mis asesores el Dr. Erick y la Dra. Karin, primero por crear un tema de investigación del cual aceptaron hacerme participe, por las enseñanzas en clase y fuera de ellas, por tener paciencia y no desesperarse cuando andaba perdida con respecto al tema, incluso en su momento por los consejos personales.

A los doctores que fueron mis docentes en clases: Lemuel, Fabricio, Aurelio, Mario, Paul, Nelda, Roxana. Por compartir todos sus conocimientos, pero sobre todo por reafirmar o incluso enseñarme cosas nuevas en este camino. Gracias por hacer de esta etapa de estudiante para mí, la mejor.

Al Dr. Adolfo y la Dra. Karla, por sus aportaciones al trabajo, por sus enseñanzas muy independiente de si eran parte o no de este trabajo de investigación, por la paciencia para trabajar a nuestro ritmo.

A los revisores de la tesis: Dr. Omar, Dr. Alejandro, Dra. Rubí, Dr. Adolfo, Dra. Nelda. Por tomarse un rato de su valioso tiempo para revisar y sugerir cambios a mi trabajo. Por contribuir a cerrar este ciclo de mi vida.

A los laboratorios de la institución: Físicoquímica, Bioprocesos, Químico-Biológico, Taller de Alimentos. A la química Lety y el Ing. Juan por todas sus atenciones, su apoyo, que aun cuando es parte de su trabajo lo llevan más allá, facilitándonos las cosas.

Finalmente, y no menos agradecida, por el contrario. A la asignación de la beca otorgada por CONACyT (CVU: 724285; Becario: 593425). Los fondos otorgados por CONACyT (PN-2015-01-1847). Las instalaciones de análisis del LINAN (Tuxtepec) (LN-2015-01-252013, INFRA-2015-01-252013 Y LN-2016-271911). A CICATA-Legaria (M. Urzua-Valenzuela, E. Reguera y J. Galicia-Apolinar) por su aportación con las microscopias de SEM.

## DEDICATORIA

No es fácil cerrar etapas o cumplir metas sin el apoyo incondicional de las personas que te quieren.

No puedo vivir una vida sin la gratitud hacia mis padres (Olga y Lorenzo) por habérmela otorgado; sin la persona que con el paso del tiempo se volvió un padre más para mí (mi tío Rufino); sin la persona que ha estado conmigo desde que nací, que a su manera me ha apoyado, que a pesar de todo es una excelente hermana mayor (Yerania). Sin la persona que estuvo a mi lado por muchos años de forma incondicional (Edgard), desvelándose, sufriendo, y festejando conmigo, alentándome a seguir adelante, y que, aunque hoy no esté le agradeceré por siempre.

En el camino de la vida te encuentras con personas que la dejan marcada, que con su amistad marcan una diferencia, que te apoyan te animan te hacen crecer y te enriquecen. Que su amistad se vuelve invaluable y a las que solo resta decirles GRACIAS. Mich (mi enojona) por todo, por compartir conmigo por ayudarme en este trabajo, por siempre estar para mí. Jair por compartir lo que sabes, por volverte un amigo entrañable. Vale por la compañía, por el apoyo, porque al final de cuentas este camino fue compartido por las dos. A Crisanto por siempre creer en mí, sin importar que yo no hiciera. Lupita por tenerme paciencia con los equipos y ofrecer su ayuda desinteresada. Karina y Sadia las mejores compañeras que pude tener. Erick, Lupita y Alain, porque junto con otras personas ya mencionadas me han hecho vivir momentos inolvidables. A Ary por sin ti jamás hubiera llegado a la UNPA, ni tomado una decisión de estudiar la maestría, tú no te quedaste, pero creo que tú fuiste enviada para llevarme hasta ahí.

Para todas esas personas que mencioné, para las personas que se van y las que llegan a mi vida, está dedicado el trabajo. Porque sin ellos creo que jamás hubiera tenido el valor de empezar, continuar y sobre todo terminar esta etapa.

## RESUMEN

En esta tesis se estudia los efectos de la molienda mecánica en las propiedades fisicoquímicas de fuentes de carbono (malanga – *Colocasia esculenta* y *Colocasia antiquorum*- y el raquis de plátano macho - *Musa balbisiana*-) con posible uso en la producción de hidrógeno por fermentación.

El tratamiento de las muestras se realizó después del secado y triturado de las mismas. Posteriormente se realizaron las moliendas en un molino planetario de bolas, a distintos tiempos (5, 10, 20, 30 y 40 min), a una velocidad de 600 rpm, utilizando como material de molienda 15 bolas de acero templado.

Se utilizó la técnica de DNS para determinar el aumento máximo de las concentraciones de azúcares reductores, con respecto a las muestras sin molienda. Para las muestras de malanga la máxima concentración de azúcares reductores se obtuvo con 20 min de molienda, mientras que para el raquis fueron requeridos 40 min de molienda. Para la malanga el índice de solubilidad incrementa con el aumento del tiempo de molienda; mientras que para el raquis de plátano no se observa cambio en la solubilidad debido a que su componente principal es la celulosa.

En el TGA se observan cambios claros en las transiciones correspondientes a la descomposición de la muestra. Los patrones de DRX muestran, para el caso de la malanga, la amorfización por efecto de la molienda mecánica; sin embargo, en el caso del raquis no se observa dicha amorfización de las muestras. Hecho que se observa en la técnica de FTIR donde las bandas correspondientes en los almidones, en el caso de la malanga, sufren modificaciones con los tiempos de molienda, mientras que para el raquis la banda cristalina para los materiales lignocelulósicos queda sin modificación.

Finalmente se realizó la cuantificación de la biomasa obtenida de un medio fermentativo. Se utilizaron muestras sin tratamiento y con el máximo de azúcares reductores como fuente de carbono, adicionada de un medio mineral. Se determinó la cinética de crecimiento de *E. coli* en dicho medio de cultivo para determinar su viabilidad de crecimiento. La muestra que presentó un mayor rendimiento fue la de malanga isleña con tratamiento mecánico de 20 min.

## ABSTRACT

This thesis shows the effects of mechanical milling on the physicochemical properties of different carbon sources (*Colocasia esculenta*, *Colocasia antiquorum* and *Musa balbisiana* male banana rachis) with possible use in the production of hydrogen by fermentation.

The treatment of the samples was carried out after drying and crushing the carbon sources. Subsequently, the grinding of the samples were carried out in a planetary ball mill at different times (5, 10, 20, 30 and 40 min), using a speed of 600 rpm and 15 hardened steel balls as grinding material.

The DNS technique was used to determine the concentrations of reducing sugars in all the samples. For taro samples, the maximum concentration of reducing sugars was obtained after 20 min of grinding, while for rachis 40 min of grinding were required. The solubility index of taro increases with the increase of the grinding time; while for the banana rachis no change in solubility was observed because its main component is cellulose.

By TGA, clear changes in the transitions corresponding to the decomposition of the sample were observed. Taro XRD patterns show amorphization by the effect of mechanical grinding, while in the case of the rachis no such amorphization was observed. This phenomenon was also observed in the FTIR spectra where the corresponding starch bands of taro undergo modifications with the milling times, while for the rachis the crystalline band for the lignocellulosic materials remains unchanged.

Finally, the quantification of the biomass obtained from a fermentative medium was carried out. The samples that were used as a carbon source were the samples without treatment and with the treatment of maximum reducing sugars concentration. The carbon source was added with a mineral medium. The growth kinetics of *E. coli* was determined to determine its growth viability. The sample that showed the highest performance was that of island with mechanical treatment of 20 min.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

1. Introducción	1
2. Antecedentes	1
2.1 La energía	1
2.2 Hidrógeno	2
2.3 Producción de hidrógeno por fermentación	4
2.3.1 Producción de hidrógeno por fermentación oscura	5
2.3.1.1 <i>Escherichia coli</i>	6
2.3.2. Medios de cultivo	8
2.3.2.1 Fuentes de carbono para la producción de hidrógeno	9
2.4 Materia prima	13
2.4.1 Malanga	13
2.4.2 Raquis de plátano macho	15
2.5 Molienda mecánica	17
2.5.1 Molino planetario de bolas	18
2.5.2 Variables del proceso de molienda	19
2.5.3 Efectos de la molienda mecánica en sustratos orgánicos	20
3. Justificación	21
4. Hipótesis	21
5. Objetivo	21
5.1 Objetivos generales	21
5.2 Objetivos específicos	22
6. Desarrollo experimental	22
6.1 Tratamiento de los sustratos	22
6.2 Técnicas analíticas	23
6.2.1 Azúcares reductores	23
6.2.2 Índice de solubilidad en agua y poder de hinchamiento	24
6.3 Caracterización de los sustratos	25
6.3.1 Análisis térmicos	25
6.3.2 Difracción de rayos X	25
6.3.3 Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier	25
6.3.4 Microscopia electrónica de barrido	26
6.4 Fermentaciones	26
6.4.1 Microorganismo	26
6.4.2 Medios de cultivo	26
6.4.3 Inóculo	27
6.4.4 Fermentaciones	27
6.4.5 Cuantificación de la biomasa	27

6.4.5.1 Turbidimetría	27
6.4.5.2 Unidades Formadoras de Colonias	27
7. Resultados y discusión	28
7.1 Tratamiento de los sustratos	28
7.2 Técnicas analíticas	34
7.2.1 Azúcares Reductores	34
7.2.2 Índice de solubilidad en agua y poder de hinchamiento	37
7.3 Caracterización de los sustratos	40
7.3.1 Análisis térmicos	40
7.3.2 Difracción de rayos X	47
7.3.3 Espectroscopia de infrarrojo por transformadas de Fourier	49
7.3.4 Microscopia electrónica de barrido	53
7.4 Fermentaciones	54
7.4.1 Cuantificación de la biomasa	54
8. Conclusiones	60
9. Perspectivas	60
10. Participaciones en Congresos	61
11. Artículos	61
12. Referencias	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1 Energías renovables.	2
Figura 2 Fuentes de obtención del hidrógeno.	3
Figura 3 Comparación de los procesos de producción de biohidrógeno	4
Figura 4 Microscopia electrónica de <i>Escherichia coli</i> .	6
Figura 5 Flujo de carbono en E. coli durante el metabolismo aerobio y anaerobio.	7
Figura 6 Estructuras de la amilosa y amilopectina.	10
Figura 7 Organización de múltiples escalas del granulo de almidón a múltiples escalas.	10
Figura 8 Estructura molecular de la celulosa.	11
Figura 9 Estructura de material lignocelulósicos.	12
Figura 10 Análisis de energía neta de una refinería de biohidrógeno integrado mediante tratamiento previo por agua caliente comprimida y la fermentación extractiva.	13
Figura 11 Planta de malanga.	14
Figura 12 <i>Colocasia antiquorum</i> .	15
Figura 13 <i>Colocasia esculenta</i> .	15
Figura 14 Planta de plátano macho ( <i>Musa balbisiana</i> ).	16
Figura 15 Estructura del raquis de plátano.	17

Figura 16	Molino planetario de bolas de alta energía y movimiento de las bolas dentro del molino planetario.	18
Figura 17	Curva de calibración del reactivo DNS.	24
Figura 18	Taro chino (TC) y taro chino con molienda mecánica.	30
Figura 19	Malanga isleña (Is) y malanga isleña con molienda mecánica.	32
Figura 20	Raquis de plátano (Ra) y raquis de plátano con molienda mecánica.	34
Figura 21	Contenido de azúcares reductores del Taro Chino.	35
Figura 22	Contenido de azúcares reductores de la Malanga Isleña.	35
Figura 23	Contenido de azúcares reductores del raquis de plátano macho.	36
Figura 24	Índice de solubilidad de agua y poder de hinchamiento de la Malanga Isleña.	37
Figura 25	Índice de solubilidad de agua y poder de hinchamiento del Taro Chino.	39
Figura 26	Índice de solubilidad de agua del raquis de plátano macho.	39
Figura 27	Análisis termogravimétrico de las muestras de taro chino, malanga isleña y los blancos.	41
Figura 28	Análisis térmico diferencial de las muestras de malanga isleña, taro chino y los blancos.	42
Figura 29	Análisis termogravimétrico de las muestras de raquis de plátano.	43
Figura 30	Análisis térmico diferencial las muestras de raquis de plátano.	44
Figura 31	Calorimetría diferencial de barrido de taro chino, malanga isleña y blancos.	45
Figura 32	Calorimetría diferencial de barrido de las muestras de Raquis de plátano y blancos.	46
Figura 33	Patrones de difracción de rayos X de Malanga Isleña, Taro Chino y blancos.	47
Figura 34	Patrones de difracción de rayos X del Raquis de plátano y blancos.	48
Figura 35	Espectros de Infrarrojo de Taro Chino, Malanga Isleña y blancos.	50
Figura 36	Espectros de Infrarrojo en la ventana de 1200-900 $\text{cm}^{-1}$ de Taro Chino y Malanga Isleña.	51
Figura 37	Espectros de Infrarrojo del Raquis de Plátano y blancos.	52
Figura 38	Espectros de Infrarrojo del raquis de plátano en la ventana de 1550-1200 $\text{cm}^{-1}$ .	52
Figura 39	Espectros de Infrarrojo del raquis de plátano en la ventana de 1200-850 $\text{cm}^{-1}$ .	53
Figura 40	Micrografías electrónicas de barrido de Taro Chino sin y con molienda mecánica de 20 min con bolas de Fe.	53
Figura 41	Micrografías electrónicas de barrido del raquis de plátano sin y con molienda mecánica de 8 min con bolas de WC.	54
Figura 42	Cinética microbiana de <i>E. coli</i> en medio LB por turbidimetría.	55
Figura 43	Cinética microbiana de <i>E. coli</i> en medio LB por Unidades Formadoras de Colonias.	56
Figura 44	Crecimiento de <i>E. coli</i> con Malanga Isleña con y sin tratamiento como fuente de carbono en el medio mineral.	57
Figura 45	Crecimiento de <i>E. coli</i> con Taro Chino con y sin tratamiento como fuente de carbono en el medio mineral.	58

Figura 46 Crecimiento de *E. coli* con Raquis de plátano con y sin tratamiento como fuente de carbono en el medio mineral. 58

## ÍNDICE DE TABLAS

		Pag.
Tabla 1	Comparación del rendimiento de hidrógeno obtenido por fermentaciones oscura con diferentes especies de <i>E. coli</i> y diferentes sustratos.	6
Tabla 2	Comparación de los medios de cultivos y las vías de respiración en diferentes usos de <i>E. coli</i> .	9
Tabla 3	Proporciones de azúcares reductores por sustrato con y sin molienda mecánica.	26
Tabla 4	Cantidad de materia prima obtenida del secado de malanga isleña, taro chino y del raquis de plátano.	28
Tabla 5	Descripción de los polvos obtenidos por la molienda del Taro chino.	29
Tabla 6	Descripción de los polvos obtenidos por la molienda de la malanga isleña	31
Tabla 7	Descripción de los polvos obtenidos por la molienda del raquis de plátano macho.	33
Tabla 8	Concentraciones máximas de azúcares reductores de la malanga isleña, del taro chino y el raquis de plátano macho.	37
Tabla 9	Conteo de biomasa y rendimiento de <i>E. coli</i> con respecto a las diferentes fuentes de carbono.	59

## **1. INTRODUCCIÓN**

El uso de energías no renovables (petróleo, carbón, gas natural) ha causado graves daños al ambiente. Sin embargo, el empleo de combustibles fósiles está integrado en todos los tipos de bienes y servicios [1].

La alternativa para sostener la demanda energética sin generar contaminantes son las energías renovables. Es decir, aquellas que de manera natural son potencialmente inagotables, y que generalmente son sometidas a ciclos de forma más o menos constante en la naturaleza. Entre estas se encuentran: la eólica, la mareomotriz, la hidráulica, la solar y la generada por el hidrógeno.

El hidrógeno es una fuente de energía costosa en comparación con otras fuentes de energía convencionales. Sin embargo, el uso de desechos para generarlo podría disminuir los costos de producción haciéndolo más accesibles. Existen muchas metodologías empleadas en la generación de hidrógeno, una de ellas es por medio de fermentaciones en ausencia de luz (fermentaciones oscuras). Estas fermentaciones requieren bacterias anaerobias y grandes cantidades de sustratos ricos en glucosa [2]. Para obtener dichos sustratos se utiliza principalmente la hidrólisis, que representa el mayor gasto energético del proceso [3]. Trabajos previos proponen el uso de la molienda mecánica de alta energía como método alternativo para la hidrólisis. Este método no genera contaminantes ni residuos y es rápido. Debido a lo anterior, se propone el uso de la molienda mecánica de alta energía como un proceso alterno a la hidrólisis para la obtención de azúcares simples y su posible uso en la producción de hidrógeno por fermentación oscura.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 LA ENERGÍA**

A pesar de representar un concepto muy abstracto, la “energía” es un término bastante utilizado. A diferencia de la materia la energía no puede verse, tocarse, olerse o pesarse; por lo que únicamente se reconoce por sus efectos.

Desde el punto de vista químico, la energía generalmente se define como la capacidad para realizar un trabajo [4]. En tecnología y economía se refiere a un recurso natural que se extrae, se transforma y se le da uso industrial o económico. También se atribuye a la propiedad asociada a los objetos y sustancias que se

manifiestan en las transformaciones que ocurren en la naturaleza, es decir, en los cambios físicos y químicos.

La energía según su origen se puede clasificar en dos grupos: no renovables (recursos limitados) y renovables (recursos ilimitados).

Los recursos no renovables son aquellos que se encuentran en forma limitada en el planeta. Se obtienen principalmente de combustibles fósiles (gas natural, carbón y petróleo) y de la energía nuclear (fisión y fusión nuclear). La principal desventaja de estos recursos es que su velocidad de consumo es mayor a su velocidad de regeneración.

Las energías renovables son aquellas que tras ser utilizadas se regeneran de manera natural o artificial, ya que utilizan recursos ilimitados de la naturaleza. Además de que son limpias y contribuyen a cuidar el ambiente. Entre ellas tenemos a las energías: geotérmica, hidráulica, eólica, solar, producida por biomasa, y la generada por medio del hidrógeno, entre otras (Fig. 1).

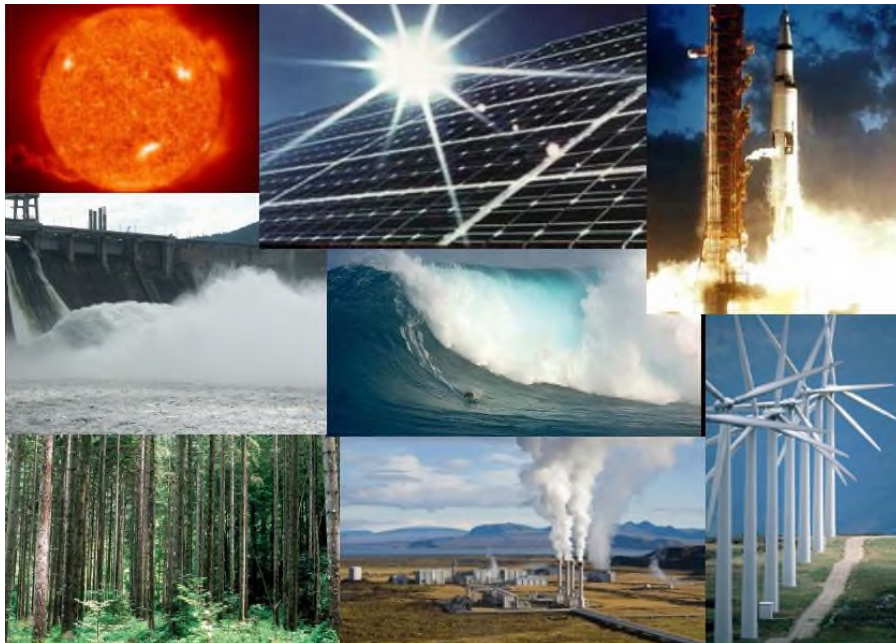


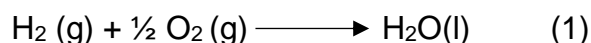
Figura 1.- Energías renovables.

## 2.2 HIDRÓGENO

El hidrógeno es el elemento más abundante en el universo y constituye el 75% masa de la masa total. Bajo condiciones ordinarias en la Tierra, el hidrógeno elemental es una molécula diatómica  $H_2$ , en estado gaseoso es invisible, no tóxico y ligero. Debido a su alta reactividad, el hidrógeno en la naturaleza casi siempre se combina con otros elementos. Está presente en el agua y por lo tanto en todos los organismos

vivos. También está presente en hidrocarburos y en varios otros compuestos naturales y artificiales [5].

El H<sub>2</sub> tiene un alto contenido energético, 120 MJKg<sup>-1</sup> (33.3 KwhKg<sup>-1</sup>), comparado con la gasolina 44.4 MJKg<sup>-1</sup> (12.4 KwhKg<sup>-1</sup>). La combustión de hidrógeno con oxígeno puro sólo genera agua como subproducto:



La industria aeroespacial ha sido pionera y precursora del empleo de hidrógeno como combustible de los cohetes espaciales. Es por ello que se conoce como comprimirlo y almacenarlo en una célula o pila de combustible [6]. Dicha pila aprovecha la energía química cuando el hidrógeno reacciona con el oxígeno, no como energía mecánica o térmica si no almacenándola como energía eléctrica. Existen diversos métodos para el almacenamiento del H<sub>2</sub>, las posibilidades dependen de la aplicación y la complejidad de ejecución. Algunos de los métodos convencionales de almacenadores son: cilindros de gas a alta presión y recipientes para hidrógeno líquido. Adicionalmente a estos métodos se tienen otros que son en estado sólido como los hidruros metálicos, las estructuras metalorgánicas (MOF), los hidruros complejos y los compuestos orgánicos.

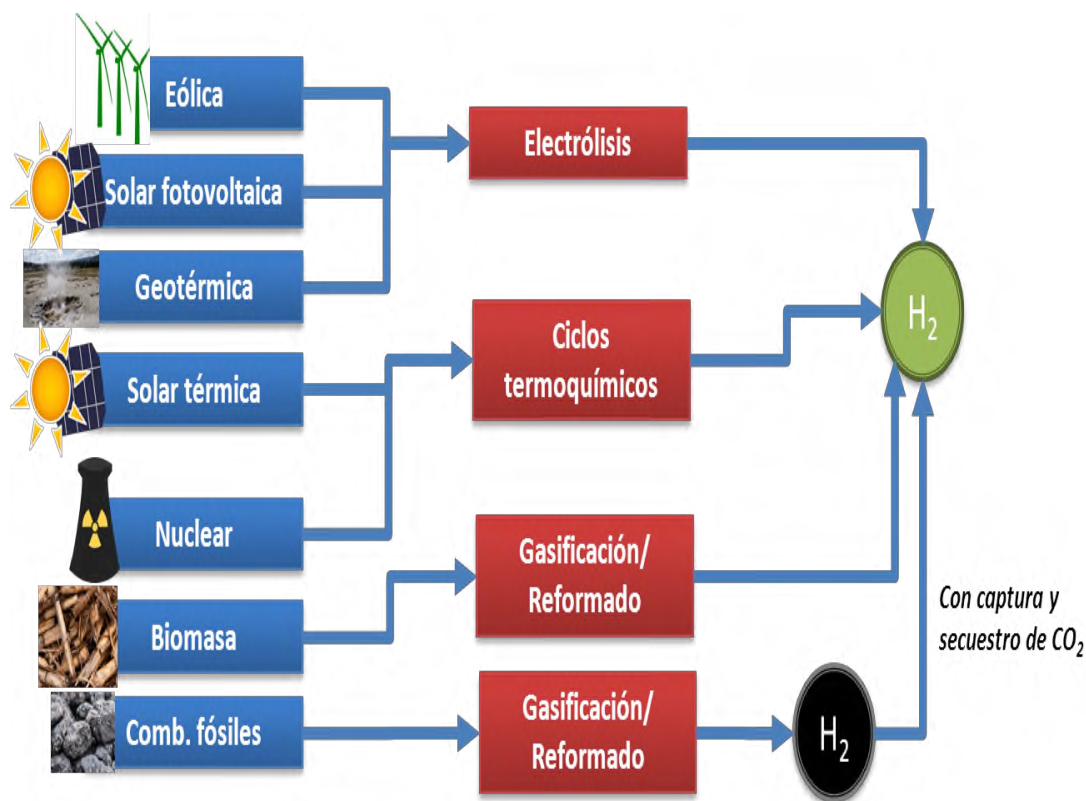


Figura 2.- Fuentes de obtención de hidrógeno

La producción de H<sub>2</sub> se realiza mediante diversos métodos (Fig. 2) que requieren la separación del hidrógeno de otros elementos químicos [6]. Aunque, tradicionalmente se extrae de los combustibles fósiles, el H<sub>2</sub> puede ser obtenido de agua, reacciones químicas y reacciones biológicas. Actualmente el 40% del hidrógeno gaseoso se obtiene de la oxidación catalítica de gases naturales, el 30% de metales pesados y nafta, el 18% de carbón, el 4% mediante electrólisis y cerca del 1% mediante biomasa [6].

### 2.3 PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO POR FERMENTACIÓN

La producción de hidrógeno biológico se ha enfocado principalmente en tres métodos: la biofotólisis del agua empleando algas y cianobacterias; la fotofermentación de compuestos orgánicos por bacterias fotosintéticas; y la fermentación oscura de compuestos orgánicos ricos en carbohidratos mediante bacterias anaerobias (Fig. 3) [2].

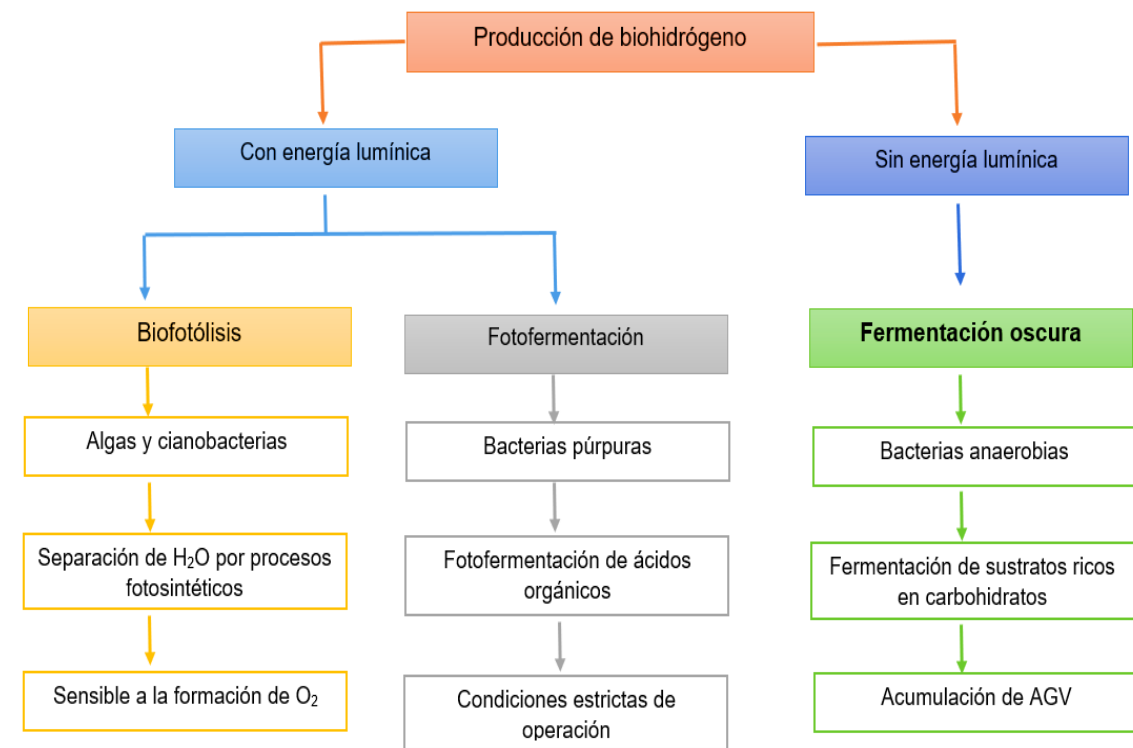


Figura 3.- Comparación de los procesos de producción de biohidrógeno [2].

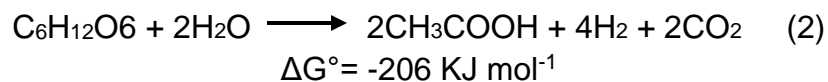
Los microorganismos fotosintéticos, usados en la biofotólisis, básicamente requieren dióxido de carbono y agua para la producción de hidrógeno. Mientras que los microorganismos fotoheterótrofos usados en la fotofermentación requieren hidratos de carbono o ácidos orgánicos para producir H<sub>2</sub> junto con dióxido de

carbono y luz como fuente de energía. A pesar de que la producción de hidrógeno a través de este proceso es alta, no es viable, ya que necesita de energía luminosa y es difícil diseñar el fotorreactor [5].

La fermentación oscura parece ser la mejor promesa para la producción de hidrógeno, debido a su bajo costo, tasas de producción rápidas, y al uso de enzimas estables que producen hidrógeno. Además, los desechos orgánicos procedentes de la agricultura o las aguas residuales se pueden utilizar en biorreactores anaeróbicos, logrando la utilización de residuos y la producción de hidrógeno [7].

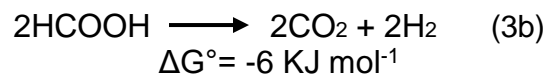
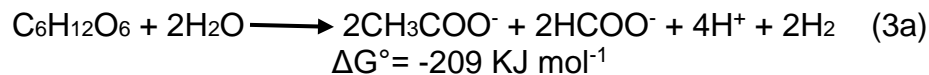
### 2.3.1 PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO POR FERMENTACIÓN OSCURA

La formación de la glucosa a ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono (reacción 2) es ampliamente aceptada como referencia para la estimación de la producción teórica del hidrógeno fermentativo [8, 9].



De acuerdo a esta reacción la producción máxima teórica de biohidrógeno a partir de fermentación es de 4 moles de H<sub>2</sub> por mol de glucosa consumida cuando el ácido acético es el único ácido graso volátil (AGV) producido [2]. La energía libre negativa indica que la reacción transcurre hacia la formación de productos espontáneamente sin necesidad de energía externa [10].

La máxima producción teórica de hidrógeno también se puede lograr en un proceso de dos etapas mediante la fermentación de la glucosa a acetato y formiato de acuerdo a las reacciones 3a y 3b [10]:



Sin embargo, en la práctica se obtienen bajas producciones de hidrógeno debido a que parte de la glucosa es empleada por los microorganismos para su sustento y crecimiento. La producción de hidrógeno depende de varios factores asociados con condiciones: ambientales (temperatura e inóculo), operacionales (presión parcial de hidrógeno) y químicas (pH del cultivo, nutrientes y sustratos) [2].

La generación de hidrógeno a través de fermentación oscura se logra principalmente por bacterias anaerobias estrictas o anaerobias facultativas. Las

bacterias anaerobias estrictas son aquellas que para crecer en un medio de cultivo necesitan una atmósfera sin oxígeno, ya que este elemento es tóxico para ellas. En general se utilizan especies del género *Clostridium* y las acidogénicas anaerobias provenientes de lodos [11]. Las bacterias anaerobias facultativas son capaces de crecer en atmósferas sin oxígeno (anaerobiosis) y luego son capaces de crecer en atmósferas con oxígeno (aerobiosis) dependiendo de la cantidad de oxígeno y del material fermentable en el medio ambiente. En general las bacterias facultativas utilizadas son de los géneros *Enterobacter* (*Escherichia*), *Bacillus* y algunas bacterias termofílicas [11,12].

Los anaerobios facultativos como *Escherichia coli* producen un rendimiento máximo de 2 moles de hidrógeno por cada mol de glucosa consumida. La producción de hidrógeno es a partir del formiato por acción de la fermentación de azúcares o glicerol (Tabla 1) [13].

Tabla 1.- Comparación del rendimiento de hidrógeno obtenido por fermentación oscura con diferentes especies de *E. coli* y diferentes sustratos.

Microorganismo	Sustrato	Rendimiento (mol H <sub>2</sub> mol glucosa <sup>-1</sup> )
<i>E. coli</i> W3110	Glucosa	0.54
<i>E. coli</i> ZF3	Glucosa	0.96
<i>E. coli</i> S3	Glucosa	0.85
<i>E. coli</i>	Glucosa	0.17
<i>E. coli</i> Δ1dn	Glucosa	0.23
<i>E. coli</i> HD701	Melaza hidrolizada con ácido	0.458
<i>E. coli</i> HD701	Residuos de almidón de papa hidrolizada con ácido	0.448

Tomada de "Feasibility of installing and maintaining anaerobiosis using *Escherichia coli* HD701 as facultative anaerobe for hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 from various carbohydrates" [14].

### 2.3.1.1 *Escherichia coli*

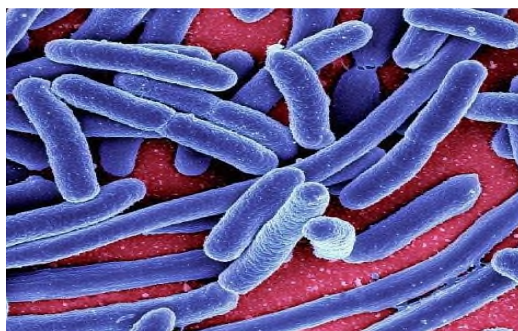


Figura 4.- Microscopia electrónica de *Escherichia coli*.

*Escherichia coli* (*E. Coli*) fue descrita por Theodore von Escherich en 1885, quien la denominó *Bacterium coli commune* (Fig. 4), pero en 1919 fue renombrada con el nombre actual en honor a su descubridor.

*E. coli* son bacilos gram negativos, oxidasa negativos, con un tamaño promedio de 1.1 - 1.5  $\mu\text{m}$  de ancho y 2.0 - 6.0  $\mu\text{m}$  de largo. Pertenece a la familia de las bacterias entéricas y es un anero bio facultativo que le permite sobrevivir ya sea en presencia de oxígeno (a través de la respiración aeróbica) o en ausencia de oxígeno (a través de la respiración o fermentación anaeróbica) (Fig. 5 a, b) [15].

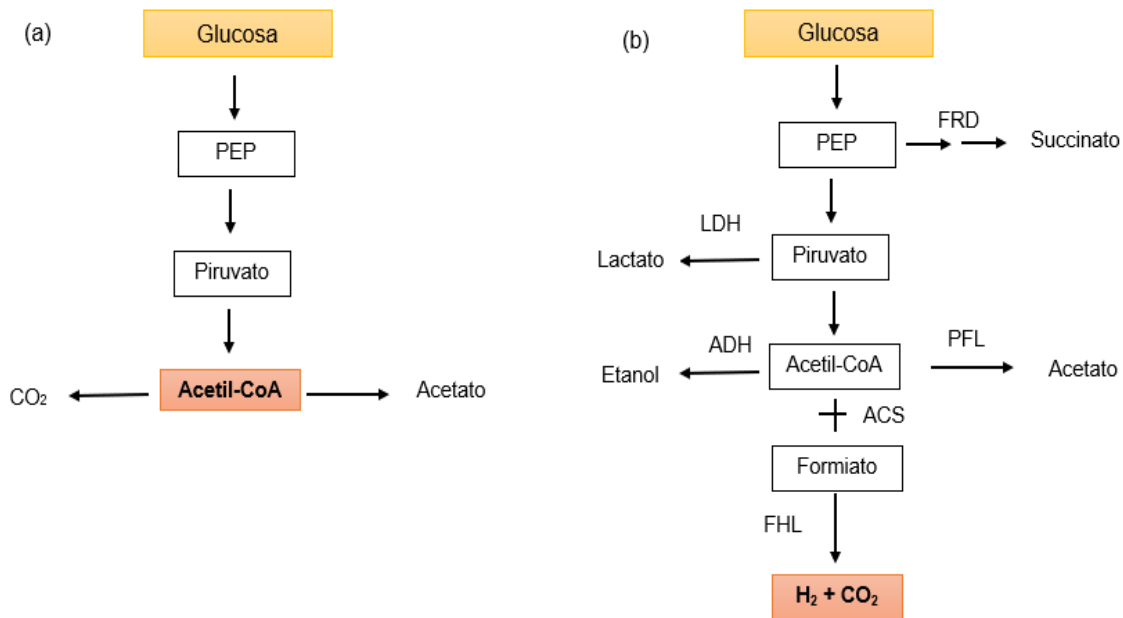


Figura 5. Flujo de carbono en *E. coli* durante el metabolismo (a) aerobio, PEP: fosfoenolpiruvato (b) anaerobio. FRD: Fumarato reductasa, LDH: Lactato deshidrogenasa, ADH: Alcohol deshidrogenasa, PFL: Piruvato formiato-liasa, FHL: Formiato hidrógeno-liasa, ACS: Acetil CoA sintetasa.

*E. coli* forma parte de la microbiota normal del tracto digestivo gastrointestinal de ser humano, otros mamíferos y aves. Además, constituye una de las especies bacterianas más abundantes. Es un organismo modelo utilizado para investigación e ingeniería genética, a menudo como anfitrión para expresar genes pertenecientes a otras especies. La razón de esto es que es de crecimiento rápido, capaz de sobrevivir con diferentes tipos de nutrientes y se puede cultivar a diferentes condiciones de temperatura que contribuyen a hacer que *E. coli* sea adecuada para un entorno de laboratorio [15].

*E. coli* es capaz de utilizar un amplio espectro de fuentes de carbono orgánico. Su disponibilidad de aceptores de electrones desencadena las estrategias utilizadas para producción de energía: respiración o fermentación. En la mayoría de los

estudios utilizan *E. coli* para los procesos aplicados, los azúcares se utilizan como fuente de carbono y electrones [16]. La importación de la fuente de carbono se puede lograr a través de mecanismos de absorción. La glucosa, por ejemplo, se importa principalmente y se fosforila simultáneamente a glucosa-6-fosfato usando el sistema fosfotransferasa. La vía de la glucólisis procesa el azúcar fosforilado en dos moléculas de piruvato que se acompañan de la liberación de 2 moléculas de ATP y dos de NADH. En condiciones de oxicidad, el piruvato se convierte en Acetil CoA y dióxido de carbono por el complejo piruvato deshidrogenasa. Esta enzima está regulada negativamente en condiciones anaeróbicas y está controlada por la relación NADH/NAD<sup>+</sup>, así como la concentración de piruvato. En condiciones de oxicidad, el Acetil CoA se procesa adicionalmente dentro del ciclo del ácido cítrico [16].

*E. coli* también puede respirar bajo condiciones anotóxicas (en ausencia de oxígeno puro) y puede usar una variedad de sustancias en ausencia de oxígeno como aceptor de electrones. Sin embargo, la ausencia de oxígeno provoca una regulación a la baja del ciclo del ácido cítrico, que conduce a una oxidación incompleta de azúcares. En estas condiciones el acetato se forma como el producto final. La piruvato deshidrogenasa es reemplazada por la piruvato-formiato-liasa la cual cataliza la formación de formiato y Acetil CoA. En condiciones fermentativas se produce una mezcla de succinato, formiato, acetato, lactato y etanol para mantener el equilibrio redox [16].

La ruta fermentativa de la producción de hidrógeno por *E. coli* comienza con la conversión de la glucosa en piruvato y NADH a través de la glucólisis (Fig. 5b). El piruvato se convierte entonces en acetil-CoA y formiato, que es catalizado por piruvato formiato-liasa (PFL). El hidrógeno se produce a partir de formiato por el complejo formiato hidrogeno-liasa (FHL). Debido a que se producen un máximo de dos moléculas de formiato a partir de dos moléculas de piruvato, las bacterias anaerobias facultativas tienen un rendimiento máximo teórico de 2 mol de H<sub>2</sub> por mol de glucosa [17].

### **2.3.2 MEDIOS DE CULTIVO.**

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes que permiten el crecimiento del microorganismo [18]. Se clasifican por su origen o composición nutricional en químicamente definidos y complejos o no definidos [15]. Los medios definidos son aquellos cuya composición química se sabe con exactitud y están constituidos por compuestos orgánicos y/o inorgánicos. Mientras que los medios complejos o no definidos utilizan sustancias muy nutritivas cuya composición químicamente se

desconoce o cambia en función de su origen, a menudo este tipo de medios necesita de un pretratamiento [15].

Un medio de cultivo debe ser balanceado para producir biomasa, para ello debe tomarse en cuenta la composición de la misma, los principales componentes incluyen la fuente de carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, potasio y magnesio. Es necesario también incluir cofactores enzimáticos como Mo, Co, Ni, Fe, Ca, Cu, Mn entre otros [19].

Los medios de cultivo utilizados para *E. coli* son principalmente Medio M9 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , NaCl,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) [20], y el medio Luria Bertani (NaCl, extracto de levadura, peptona de caseína) [21]. Estos medios son utilizados tanto para la vía aeróbica (con agitación u oxigenación) como para la vía anaeróbica (aplicando corriente de gases inertes o nitrógeno), dependiendo del uso o del producto final que se desea obtener (Tabla 2). *E. coli* también se ha utilizado para evaluar la capacidad de crecimiento microbianos en medios de cultivo simples (NaCl,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) que contienen extractos vegetales como bases nutritivas [22].

Tabla 2.- Comparación de los medios de cultivo y vía de respiración en diferentes usos de *E. coli*

Cepa	Vía de respiración	Medio de cultivo	Producto final.
<i>E. coli</i> BW535	Aeróbica	Medio M9 (con agitación)	Producción de Hidrógeno [20]
<i>E. coli</i> JW135	Anaeróbica	Medio M9 (arrastre de Ar)	
<i>E. coli</i> silvestre	Aeróbica	Medio Luria Bertani	Aumento en la producción de biomasa y proteínas [21]
<i>E. coli</i> Q21110	Aeróbica	Medio M9	
<i>E. coli</i> WDHL	Anaeróbica	Glucosa, Triptona, extracto de levadura, $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , $\text{MgSO}_4$ .	Producción de Hidrógeno [23]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Aeróbica	Medio modificado de Lauril Sulfato Triptona	Proteínas de choque térmico. [24]
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Aeróbica	Extracto vegetal ( <i>Ipomoea batatas</i> ), NaCl, $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .	Prueba de base nutritiva. [22]

### 2.3.2.1 FUENTES DE CARBONO PARA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO

Los monosacáridos son la principal fuente de carbono donde se destaca la glucosa seguido de la xilosa; también se pueden utilizar polisacáridos como el almidón y la celulosa. Además de otras fuentes que pueden ser generadas a partir de hidrólisis de polisacáridos, proteínas y lípidos [8, 9].

- **ALMIDÓN**

Los gránulos de almidón se componen de dos polímeros de glucosa, amilosa y amilopectina. La amilosa (Fig. 6a) es un polímero lineal compuesto de residuos de anhidroglucosa unidos por enlaces  $\alpha$ -1,4. Mientras que la amilopectina (Fig. 6b) es polímero de cadenas cortas de residuos de  $\alpha$ -1,4 anhidroglucosa enlazados cada 5 o 6% en puntos de ramificación de  $\alpha$ -1,6 [25].

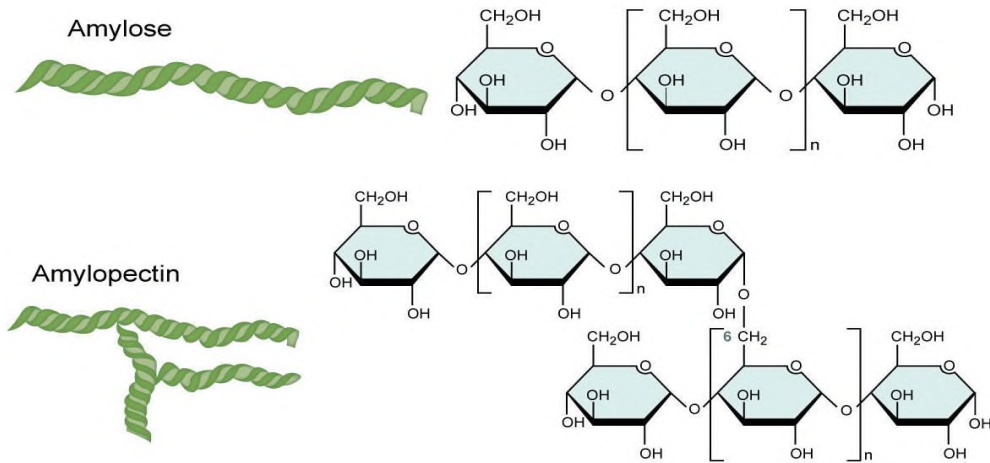


Figura 6. Estructuras de la amilosa (a) y amilopectina (b)

La estructura del almidón se considera en cinco escalas de longitudes diferentes (Fig. 7):

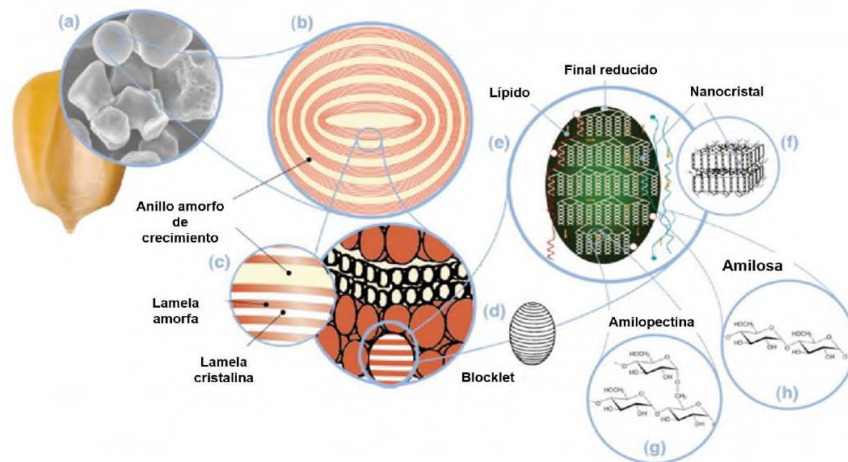


Figura 7.- Organización de múltiples escalas del granulo de almidón. Toda la arquitectura de gránulos (2-100  $\mu$ m) (a), anillos de crecimiento (120-500 nm) (b), blocklets (20-500 nm) (d), laminas amorfas y cristalinas (9 nm) (e, f), cadenas de amilopectina y amilosa (0.1-1.0 nm) (g, h) [26].

La estructura rígida de los gránulos está integrada por capas concéntricas de amilosa y de amilopectina (distribuidas radialmente). Estos cuerpos son

birrefringentes. Es decir, tienen dos índices de refracción, por lo cual cuando se irradian con luz polarizada desarrollan la típica “cruz de malta”. Esto se debe a que dentro del gránulo se localizan zonas cristalinas de moléculas de amilosa ordenadas paralelamente a través de puentes de hidrógeno, así como zonas amorfas causadas principalmente por la amilopectina, que no tienen la posibilidad de asociarse entre sí o con la amilosa [27].

- **CELULOSA**

La fórmula química de la celulosa es  $C_6H_{10}O_5$ . Las unidades básicas de glucosa están unidas entre sí por enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos, formados entre los átomos de carbono C-1 y C-4 de unidades de glucosa adyacentes (Fig. 8) [28, 29].

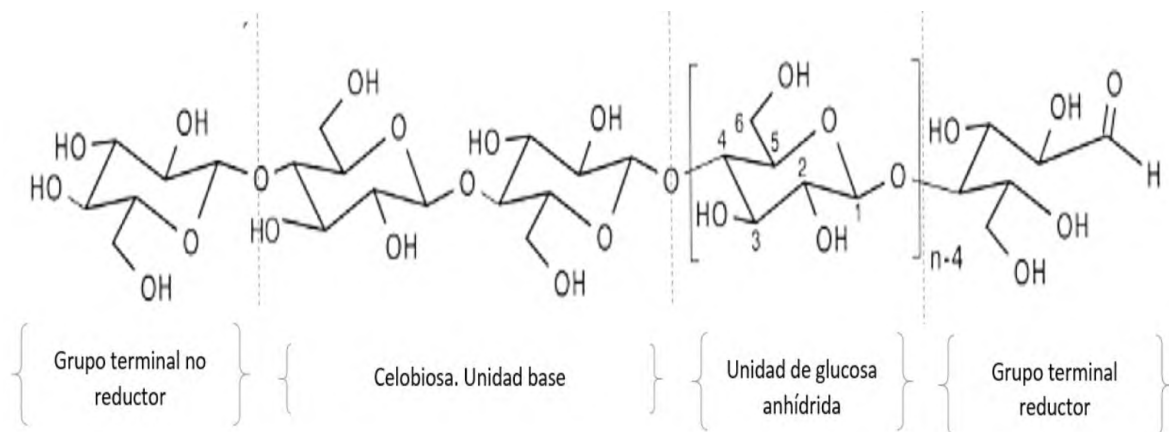


Figura 8.- Estructura molecular de la celulosa [29].

La celulosa es el polisacárido más ampliamente distribuido en la naturaleza. Es el principal constituyente de la materia vegetal y es sintetizado por plantas, algas, bacterias y animales marinos. Se encuentra en plantas, madera y fibras naturales y por lo general, combinada con otras sustancias (lignina, hemicelulosas, pectinas, etc.) [30].

La celulosa presenta diferentes formas cristalinas, o polimorfismos, dependiendo de su origen natural o de los tratamientos artificiales a que es sometida. En las plantas superiores, por lo general la celulosa juega un papel esencial como elemento reforzante de la pared celular junto con la lignina (macromolécula constituida por unidades de fenilpropano) y la hemicelulosa (constituida estructuralmente por pentosas y hexosas). Estos tres polímeros están asociados como principales componentes de la biomasa lignocelulósica (Fig. 9) [31].

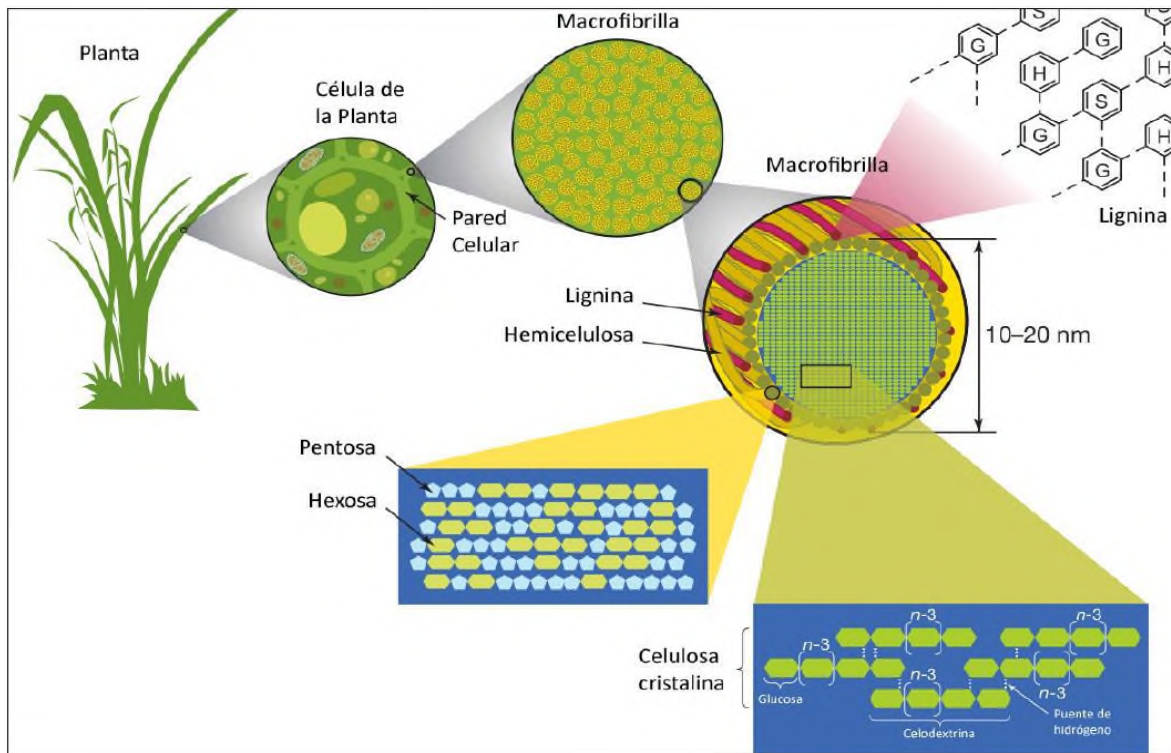


Figura 9.- Estructura del material lignocelulósicos.

### • RESIDUOS SÓLIDOS

Se han utilizado materia prima rica en carbohidratos y celulosa pero deficientes en nitrógeno para la producción de hidrógeno a partir de biomasa. Por ejemplo, los residuos sólidos que contienen los desechos agrícolas, los desechos de la industria alimentaria presentes en aguas residuales (sueros de quesos, aceites de molinos y levaduras de panaderías), la biomasa renovable y materiales lignocelulósicos [32]. Además, residuos ganaderos como desechos urinarios, estiércol de aves de corral, abonos orgánicos, entre otros [33].

Normalmente, los alimentos y los residuos agrícolas contienen polisacáridos complejos que requieren de hidrólisis para su utilización como sustratos de fermentación [34]. La hidrólisis es la destrucción, descomposición o alteración de una sustancia química por el agua. Ésta también se puede lograr por métodos químicos, enzimáticos e hidrotermales. La hidrólisis enzimática requiere la optimización para obtener la mejor combinación de enzimas para cada materia prima y no puede adaptarse rápidamente al material de alimentación. Mientras que la hidrólisis química consume productos químicos y produce efluentes químicamente agresivos. La hidrólisis hidrotérmica es benigna con el ambiente [34] pero requiere al igual que las anteriores un gasto energético significativo, representando el 56% del gasto energético total del proceso de fermentación (Fig. 10).

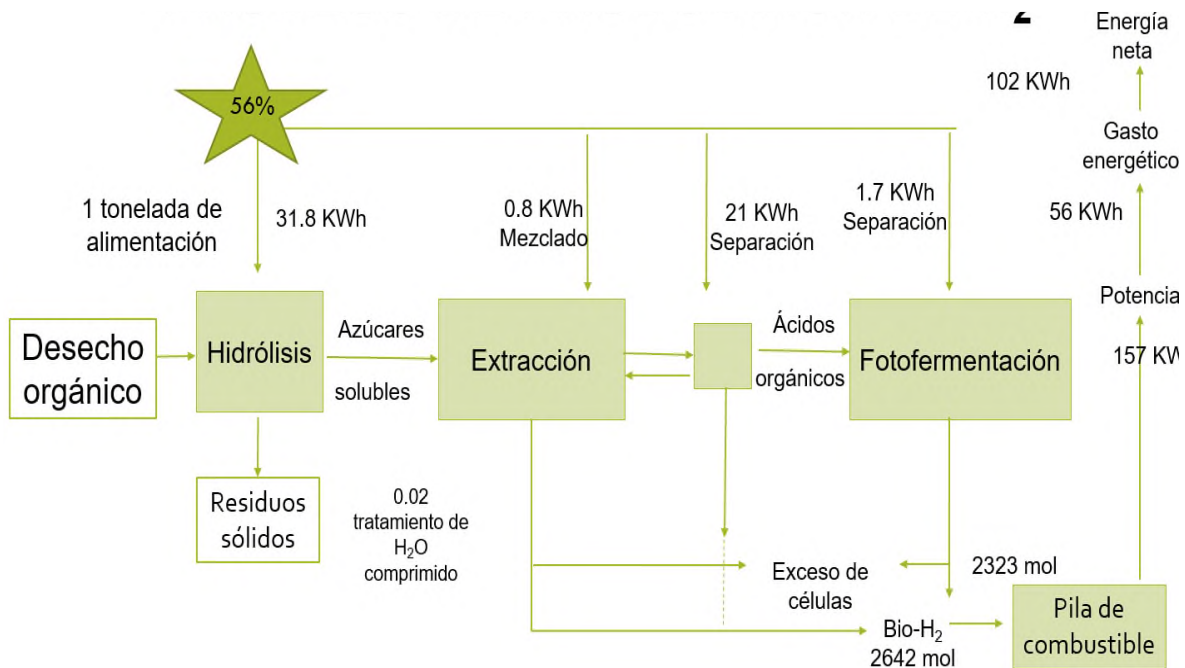


Figura 10- Análisis de energía neta de una refinera de biohidrógeno integrado (IBHR) mediante tratamiento previo por el HCW (agua caliente comprimida) y la fermentación extractiva [Modificado 34].

En la producción de hidrógeno no es ideal emplear sustratos con estructuras moleculares complejas debido a que estos son difíciles de asimilar por los microorganismos. Sin embargo, después de emplear un pretratamiento pueden ser asimilables. Los pretratamientos más conocidos son la ultrasonificación, acidificación, congelamiento y descongelamiento, esterilización y microondas [2]. Una alternativa a los tipos de hidrólisis son los tratamientos de tipo mecánico. Por ejemplo, se tienen reportes que un paso de trituración mecánica es esencial para reducir el tamaño de partículas e incrementar el área de superficie de los residuos orgánicos lignocelulósicos antes de la fermentación [35].

## 2.4 MATERIA PRIMA

En los requerimientos principales de un medio de cultivo se encuentran los compuestos de carbono, los cuales provienen de sustratos orgánicos. Este representa la fuente principal de nutrición y obtención de energía para los microorganismos a partir de la metabolización de los mismos [15,35].

### 2.4.1 MALANGA

La mayoría de las plantas tropicales producen órganos subterráneos de almacenamiento clasificado como raíces o tallos modificados o tubérculos. Ejemplo de una planta que produce tubérculos como órganos de almacenamiento es la

*Colocasia esculenta* (taro, ocumo chino) y la *Colocasia antiquorum* (isleña). Los tubérculos de esta planta tropical perteneciente a la familia Araceae, almacenan un alto contenido de almidón, (22 y el 40% peso seco) [36] y por esta razón se consideran alimentos amiláceos.

La malanga es una planta herbácea, perenne, suculenta, que se desarrolla entre 1-2 m de altura. Produce un cormo central comestible, grande, esférico, cubierto exteriormente por escamas fibrosas o lisas [30]. Del cormo central se desarrollan cormelos laterales recubiertos con escamas fibrosas (Fig. 11). El color de la pulpa por lo general es blanco, pero también se presentan clones coloreados hasta llegar al violáceo. Según el clon, la forma varía de cilíndrica hasta casi esférica y el tipo de ramificación desde simple a muy ramificada. Presenta marcas transversales que son las cicatrices de la hoja, con frecuencia con fibras, y está cubierta por una capa corchosa delgada y suelta [37].

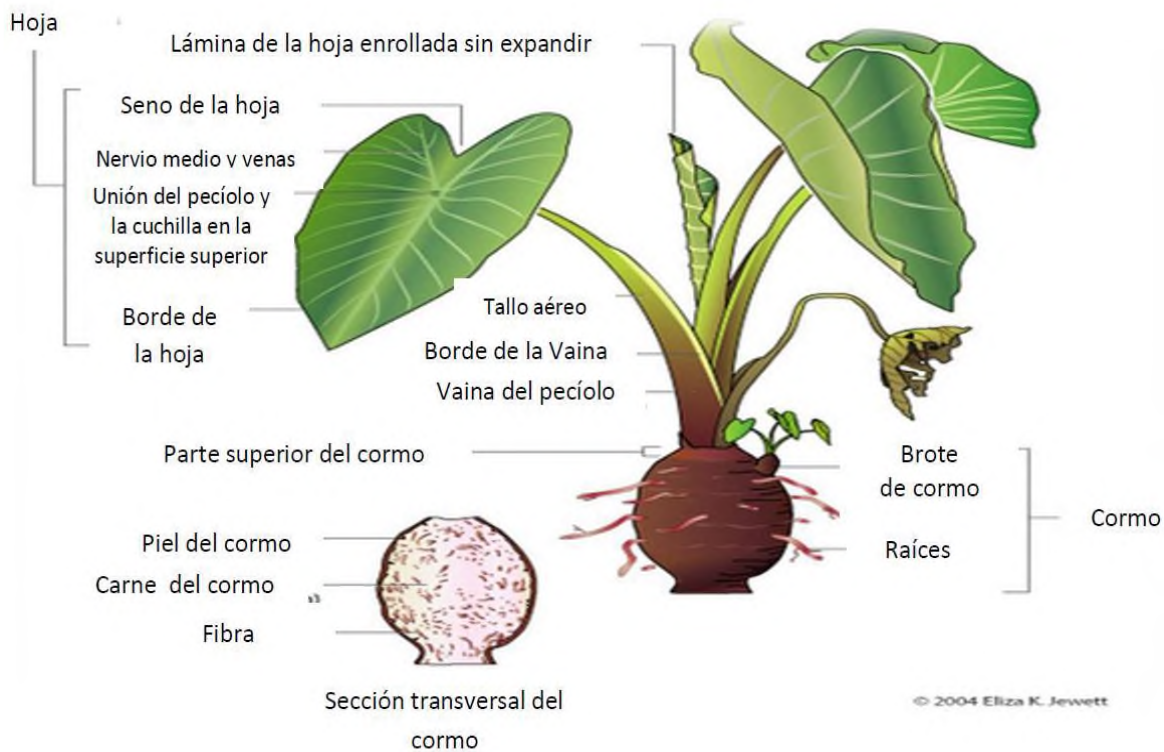


Figura 11.- Planta de malanga.

- ***C. antiquorum***

Comúnmente alcanzan una altura de hasta 2.5 metros y producen en su base un cormo alargado de forma ovoide, similares a un balón de fútbol americano. En su parte superior se ubica la corona y está vinculada al origen de los tallos o peciolo.

Mientras tanto, la parte inferior es la base del cormo y está asociada a la raíz. La cutícula o cáscara es de color café y en ella se aprecian anillos, que son las marcas de cada una de las hojas formadas en su ciclo. El color de su pulpa es blanco con vetas lilas o violetas (Fig. 12).



Figura 12.- *Colocasia antiquorum*.

- ***C. esculenta***

Produce cormos que son el producto más grande pesando entre 0.7 y 2.5 kg, además de cormelos los cuales se encuentran en un intervalo de peso de 50 a 250 g, (Fig. 13).



Figura 13.- *Colocasia esculenta*.

#### **2.4.2 RAQUIS DE PLÁTANO MACHO**

El raquis o pinzote es la fracción de la planta del plátano que soporta el conjunto de los mismos y está constituido por fibras lignocelulósicas de característica semileñosa [38]. La estructura de las fibras del raquis (Fig. 15) pueden ser agrupadas en dos niveles: el nivel microscópico, formado por haces vasculares y fibras elementales. El nivel nanoscópico o nivel ultraestructural, formado por microfibrilas, haces de microfibrilas y microfibrilas de celulosa [39].

En el cultivo de plátano macho o *Musa balbisiana* (Fig. 14) durante las etapas de cosecha y postcosecha se generan grandes cantidades de residuos fóliales, pseudotallos, bellotas, raquis, calidades de segunda y tercera, así como cascara de fruto. Al carecer de un tratamiento o disposición adecuada de estos desechos se convierten en contaminantes para el ambiente [38].

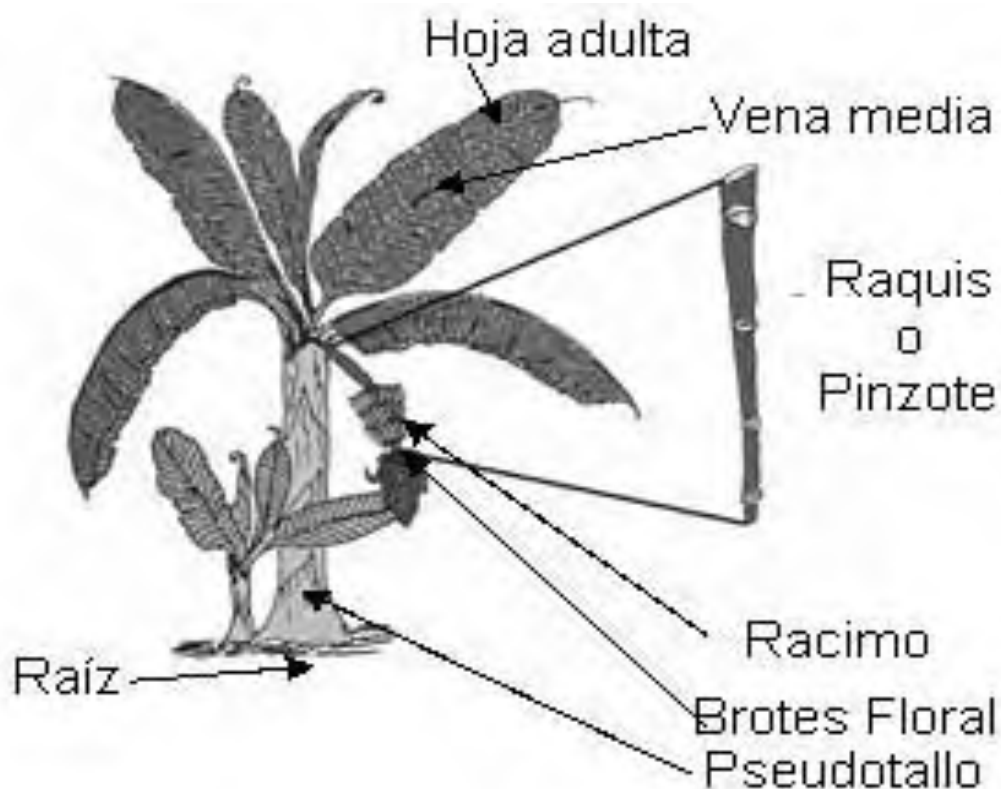


Figura 14.- Planta de plátano macho (*Musa balbisiana*).

El raquis comúnmente se utiliza como alimento para ganado, pero también se ha utilizado en forma de harinas con el mismo fin. Recientemente se han desarrollado productos para alimentación humana, material fibroso para papel, materiales de construcción y artesanías a partir de raquis [40].

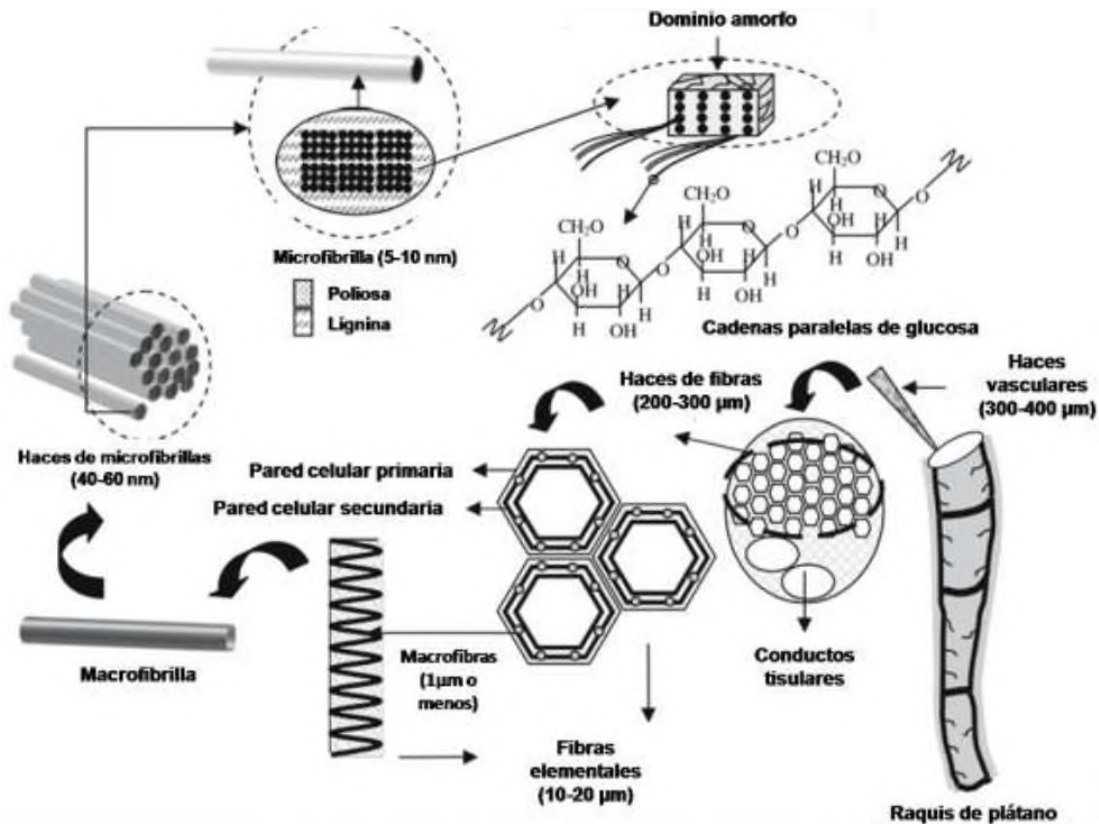


Figura 15.- Estructura del raquis de Plátano [39].

## 2.5 MOLIENDA MECÁNICA

Es una técnica de procesamiento de polvos que involucra la deformación, fractura y soldadura en frío de partículas provocadas por la energía intercambiada durante las colisiones repetidas de las bolas durante la molienda [41]. La molienda permite la obtención de polvos con estructuras cristalinas difíciles de alcanzar con otras técnicas, lo que puede derivar en el mejoramiento de sus propiedades físicas [42]. Como proceso tecnológico ha sido utilizado desde hace muchos años para intentar mejorar el afino y la homogenización de los polvos o materiales de partida. Esto en materiales como metales, cerámicos, compuestos intermetálicos o polvos prealeados, sin que sea necesaria la transferencia de material para alcanzar dicha homogenización [43].

En el proceso de la molienda mecánica se producen impactos continuos debido al movimiento continuo de bolas o cuerpos molidores que inducen la fractura de las partículas de polvo. Normalmente hay una etapa en el proceso en la que se produce un equilibrio en la fractura, obteniéndose polvos con una microestructura muy

homogénea [43]. De este modo las partículas de polvo se refinan obteniéndose polvos a escala muy pequeña con una cierta distribución de tamaño de partícula. El uso de molinos de alta energía permite ir más allá y reducir el tamaño de las partículas a dimensiones micrométricas, e incluso nanométricas. Lo anterior es debido a que la energía involucrada en las colisiones es mucho mayor [44].

Existen diferentes tipos de molinos que están disponibles para la molienda mecánica. Estos molinos difieren principalmente en su capacidad, velocidad y temperatura de operación; así como de algunas otras características de control. Se ha demostrado recientemente que el grado de contaminación (asociado con el desgaste o fractura de las bolas o contenedores de molienda) y el grado de amortización de la muestra dependen del tipo de molino utilizado [44].

### 2.5.1 MOLINO PLANETARIO DE BOLAS

Los molinos planetarios de bolas pueden usarse para todas aquellas aplicaciones en las que se deben obtener granulometrías finas. Además de realizar los procesos clásicos de trituración y mezcla. Estos molinos cumplen técnicamente con todos los requisitos para la molienda coloidal y cuentan con el rendimiento energético necesario para efectuar aleaciones mecánicas [45].

Dentro de un molino planetario de bolas los contenedores giran simultáneamente sobre su propio eje sobre un disco rotatorio que gira en sentido contrario (Fig. 16a). El efecto producido por las fuerzas centrífugas opuestas provoca que el medio impacte desde un extremo lateral del contenedor hacia otro (Fig. 16b) [46].

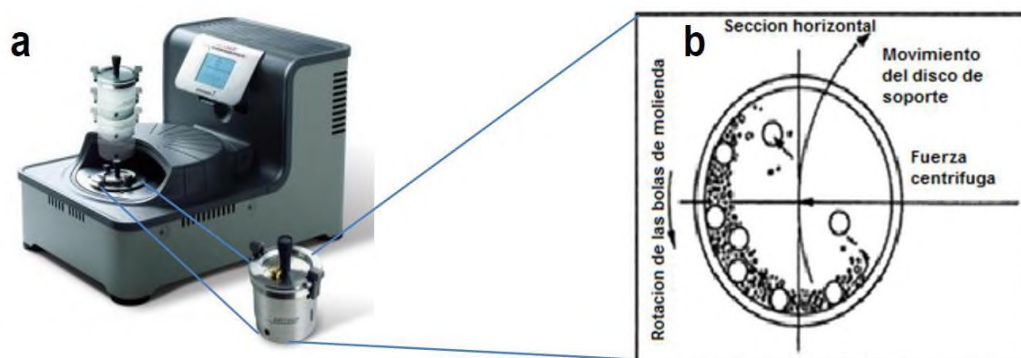


Figura 16.- a) Molino planetario de bolas de alta energía. b) Movimiento de las bolas dentro del molino planetario.

## 2.5.2 VARIABLES DEL PROCESO DE MOLIENDA

Las variables que influyen en el proceso de molienda mecánica de alta energía son muy diversas, tales como [47]:

- **TIPO DE MOLINO**

La selección del molino es un factor importante en los resultados que se obtendrán y para ello se necesita comprobar su capacidad, el costo, el tiempo de ciclo al que se someterá, el tipo de material y la distribución de tamaño de partícula.

- **TIPOS DE BOLAS**

El tamaño de las bolas utilizadas debe ser el adecuado para el molino empleado, ya que la energía cinética que se crea depende de la masa y velocidad del disco. Por ello, la utilización de bolas de materiales densos como el acero, el carburo de tungsteno son los más utilizados. Aunque se debe tener en cuenta que una densidad elevada puede reducir la frecuencia de los choques e impedir un movimiento continuo. La relación bola/carga es uno de los parámetros más importantes en molienda mecánica, suele oscilar normalmente entre 10:1 y 20:1 pero depende del tipo de molino.

- **FRECUENCIA E INTENSIDAD DE MOLIENDA**

En cuanto más rápido gira el disco del molino mayor será la transferencia de energía en la muestra. Pero, en función del diseño del molino hay ciertas limitaciones a la velocidad máxima que se podría emplear. Por ejemplo, en un molino de bolas convencional el aumento de la velocidad de rotación aumenta la velocidad con la que las bolas se mueven. Por encima de una velocidad crítica, las bolas se pegan a las paredes internas del vial y no ejercen ninguna fuerza de impacto. Por lo tanto, la velocidad máxima debería ser justo debajo de este valor crítico para que las bolas ejerzan la máxima energía de colisión.

La intensidad de molienda, es proporcional a las características y propiedades de la muestra de interés durante el proceso. Cuando se incrementa este parámetro, al introducir mayor cantidad de bolas, mayor densidad o mayores velocidades de colisión, la energía transferida a las partículas en cada colisión y la energía a disipar aumentan.

- **FRACTURA DE LAS PARTÍCULAS**

Las fracturas de partículas se producen cuando la presión de molienda es alta y la resistencia de las partículas es baja. Esto se logra en un entorno de velocidades elevadas lo que incrementa la energía de las colisiones.

- **ATMÓSFERA**

Cuando se trabaja con atmosfera controlada se consigue una reducción de la contaminación. Para lo cual se coloca el molino dentro de un recinto, donde se controle la atmosfera o bien se sella el contenedor. Las atmosferas controladas suelen ser de gases nobles como el argón (Ar) o el helio (He).

En cambio, los procesos sin control de la atmosfera producen mayores contaminaciones por la formación de compuestos volátiles o no volátiles y por la absorción de gases por los polvos sin procesar. Con este proceso se sintetizan nitruros o hidruros de metal debido a las reacciones sólido – gas.

### **2.5.3 EFECTO DE LA MOLIENDA MECÁNICA EN SUSTRATOS ORGÁNICOS**

Se tiene reportes del uso de la molienda de alta energía para reducir el tamaño de partículas de almidón de maíz trigo y arroz [9]. Cuando el almidón de trigo se muele en un molino de bolas se observan varios niveles de almidón dañado. La amilosa se ve afectada solo después de la molienda severa, presentando una ligera despolimerización. La amilopectina se convierte en fragmentos de bajo peso molecular y el tamaño molecular disminuyó con el aumento del tiempo de molienda. En otros estudios se ha observado que el daño causado por el molino de bolas induce a la pérdida progresiva de la cristalinidad y la conversión de grandes regiones en material amorfo que lo vuelven accesible a agentes externos como el agua y enzimas amilolíticas [48].

Los efectos del tratamiento del molino de bolas en almidón de yuca y maíz muestran que entre más prolongado es el tiempo de molienda, mayor es el contenido aparente de amilosa. La cantidad de amilosa aumenta a expensas de la destrucción de la amilopectina [49].

El tratamiento con molino planetario de la biomasa vegetal aumenta el área superficial al reducir el tamaño de la biomasa al nivel de fibras y haces de fibras, aumentando la accesibilidad enzimática y bacteriana de la celulosa. El tratamiento también cambia las propiedades superficiales alterando las superficies rígidas y disminuye la cristalinidad [50]. Lo anterior ha sido reportado en paja de arroz [51] y bagazo de caña [45], agregando la obtención de azúcares simples.

Dependiendo del tipo y la cantidad de material a ser procesada se deben elegir los medios de molienda [42].

En la Universidad del Papaloapan se ha utilizado la molienda mecánica para la obtención de azúcares reductores. Se realizó una comparación con los contenidos de azúcares reductores obtenidos a partir de hidrólisis ácida de harina de soya. Los resultados demuestran que a partir de soya comercial con 10 min de molienda utilizando tazones (80 mL) y bolas (10 mm) de acero templado se obtiene aproximadamente el 90 % de los azúcares reductores obtenidos mediante hidrólisis ácida [52].

### **3. JUSTIFICACION**

El deterioro del medio ambiente y la crisis energética son dos problemas a resolver a corto plazo. El uso del hidrógeno es considerado de lo más prometedor como sustituto de los combustibles fósiles. Sin embargo, los costos para su obtención son elevados. Se puede obtener hidrógeno a partir de combustibles fósiles, el agua y las reacciones biológicas. De los cuales los procesos biológicos, específicamente las fermentaciones, son una alternativa viable. En particular, la fermentación de desechos para la producción de hidrógeno es muy ventajosa, ya que estos son abundantes, baratos y altamente biodegradables. La desventaja del proceso radica en la conversión de los carbohidratos a azúcares simples. Típicamente, el proceso de conversión se lleva a cabo por medio de hidrólisis ácida o hidrólisis enzimática. Sin embargo, la hidrólisis es la etapa de mayor gasto energético en el proceso de producción. En este trabajo se propone el uso de la molienda mecánica de alta energía como un proceso alternativo a la hidrólisis para la obtención de azúcares simples y su posterior uso en la producción de hidrógeno por fermentación oscura.

### **4. HIPÓTESIS**

La molienda mecánica de alta energía aumentará la cantidad de azúcares reductores de la malanga (*Colocasia esculenta* y *Colocasia antiquorum*) y el raquis de plátano macho (*Musa balbisiana*) para un posible uso en la producción de hidrógeno por fermentación.

### **5. OBJETIVO**

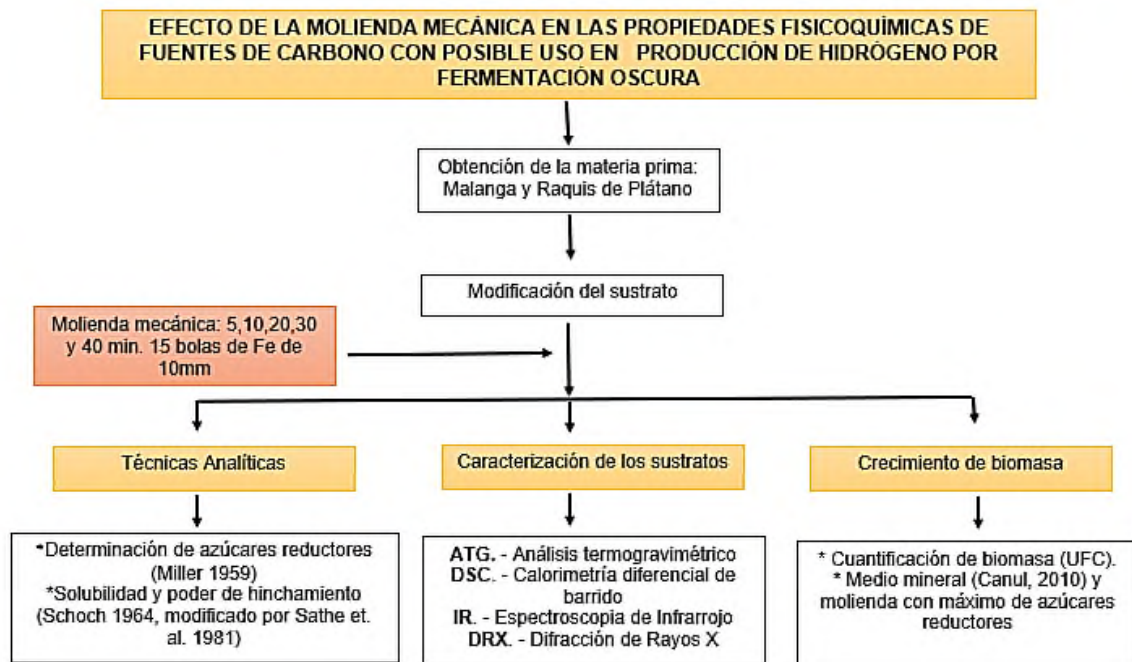
#### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la molienda mecánica sobre el contenido de azúcares reductores y las propiedades fisicoquímicas de la malanga y el raquis de plátano macho, así como su efecto como fuente de carbono en el crecimiento de *E. coli*.

## 5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ✓ Establecer el efecto de la molienda mecánica en el contenido de azúcares reductores y en las propiedades fisicoquímicas de los sustratos orgánicos.
- ✓ Caracterizar los sustratos orgánicos antes y después de la molienda mecánica.
- ✓ Evaluar los sustratos orgánicos modificados (que presentaron mayor concentración de azúcares reductores como fuente de carbono) en el crecimiento de *E. coli*.

## 6. DESARROLLO EXPERIMENTAL



### 6.1 MOLIENDA MECÁNICA DE LOS SUSTRATOS

La malanga (*Colocasia esculenta* y *Colocasia antiquorum*) se obtuvo en el Ejido Sebastopol, Tuxtepec, Oaxaca. El raquis de plátano macho (*Musa balbisiana*) se adquirió en la comunidad de Camelia Roja, Tuxtepec, Oaxaca.

La malanga se lavó para quitar los excesos de tierra y se escurrió. Posteriormente se realizaron cortes en rodajas de aproximadamente 0.5 cm y se colocaron en charolas para secarlas usando la temperatura del medio ambiente (35-40°C).

Al raquis de plátano se le realizaron cortes de forma vertical de aproximadamente 0.5 cm de grosor. Se colocaron en charolas para posteriormente llevarlas a secar al horno (modelo BINDER GmbH, modelo: FD 115) a una temperatura de 60°C durante 24 horas. Teniendo seco el raquis se trituró en una licuadora domestica (marca Osterizer Blender) durante 1 min. Se depositaron las muestras secas en botes cerrados para su uso posterior.

Para la molienda mecánica de alta energía se colocaron 5.0 g de muestra en un tazón de acero templado de 80 mL y se añadieron 15 bolas de acero templado de 10 mm de diámetro. La molienda se llevó a cabo utilizando un Pulverisette 7 marca Fritsch Premium line, en tiempos de molienda de 5, 10, 20, 30 y 40 min. El tazón se hizo girar a una velocidad de 600 rpm. Se realizaron ciclos de 5 min de molienda y 5 min de enfriamiento para evitar el calentamiento de los tazones y por lo tanto evitar alguna modificación del sustrato por sobrecalentamiento.

## **6.2 TÉCNICAS ANÁLITICAS**

### **6.2.1 AZÚCARES REDUCTORES (DNS)**

Para llevar a cabo la determinación de azúcares reductores se utilizó el método DNS [53]. Determina la presencia del grupo carbonilo libre (C=O), de los llamados azúcares reductores.

Para prepara el reactivo DNS, se pesó 1 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico, 30 g de tartrato de sodio y potasio y 1.6 g de NaOH. Se disolvió el NaOH en 10 mL de agua y se añadió lentamente en agitación el tartrato de sodio y potasio. Se agregó agua, se virtió el ácido 3,5 dinitrosalicílico y se aforó a 100 mL. El reactivo se guardó en frasco ámbar y se etiqueto.

Las concentraciones de azúcares reductores se obtuvieron sustituyendo las absorbancias obtenidas en la ecuación lineal obtenida por la curva patrón de glucosa (Fig. 17) en las concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 g. L<sup>-1</sup>.

Se prepararon las muestras a una concentración de 1 g. L<sup>-1</sup>. En tubos de cristal de 10 ml se adicionaron 0.25 ml de muestra y 1.5 ml de reactivo de DNS. Los tubos se colocaron en baño de agua a 100 °C por 5 min. Se enfriaron en baño de hielo hasta temperatura ambiente, se les añadió agua destilada hasta complementar 10 mL [53]. Se agitaron y se realizaron las lecturas a 535 nm en un espectrofotómetro marca Jenway, modelo 6700.

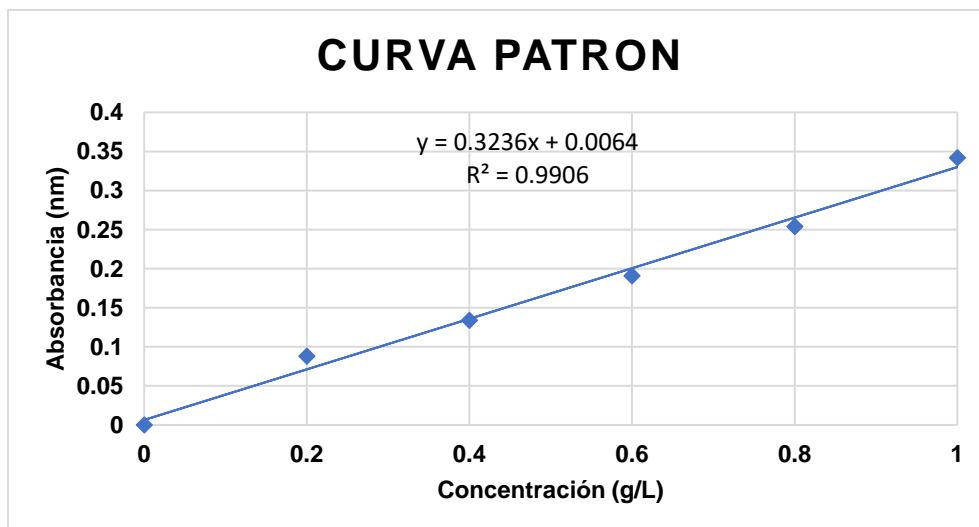


Figura 17.- curva de calibración para reactivo de DNS.

### 6.2.2 ÍNDICE DE SOLUBILIDAD EN AGUA (ISA) Y PODER DE HINCHAMIENTO (PH)

El índice de solubilidad en agua (ISA) y el poder de hinchamiento (PH) determinan la solubilidad y el hinchamiento de los sustratos tras la molienda mecánica [54]. La solubilidad y el poder de hinchamiento se determinaron a 60, 70, 80 y 90 °C. Para la cual se pesaron muestras de 0.4 g (base seca) en tubos de centrifuga cónicos de 50 mL. A continuación, se añadieron 40 mL de agua destilada y los tubos se pusieron en un baño de agua bajo agitación mecánica. Después de 30 min de incubación los tubos se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 min. Del sobrenadante se recogieron 10 mL y se secaron en estufa a 120°C durante 4 h para cuantificar la fracción soluble. Los tubos que contenían el material residual se pesaron para determinar el poder de hinchamiento. Los resultados se calcularon de las ecuaciones siguientes:

$$\text{Índice de solubilidad} = \frac{\text{peso del almidón soluble} * 400}{\text{peso de la muestra seca}}$$

$$\text{Poder de Hinchamiento} = \frac{\text{peso del sedimento}}{\text{peso de la muestra seca} * (100 - \text{solubilidad})} * 100$$

## **6.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS SUSTRATOS**

### **6.3.1 ANÁLISIS TÉRMICOS**

- **ANÁLISIS TERMOGRAVIMETRICO (AT)**

La técnica evalúa los cambios durante la descomposición térmica de los sustratos orgánicos. Para el análisis termogravimétrico se utilizó un analizador térmico simultaneo STA 6000 de Perkin Elmer. Se tomó de cada muestra  $10 \pm 0.5$  mg y se sometieron a calentamiento de 30 a 700°C, a una velocidad de 10°C.min<sup>-1</sup>, bajo una atmosfera inerte de N<sub>2</sub>, con un flujo de 20 ml.min<sup>-1</sup>.

- **CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (CDB)**

Es una técnica térmica en la que se miden las diferencias en la cantidad de calor entre una sustancia y una referencia en función de la temperatura de la muestra cuando las dos están sometidas a un programa de temperatura controlado. Las curvas de DSC se midieron usando el Calorímetro de Barrido Diferencial DSC 250, TA Instrument. Las calibraciones se realizaron utilizando indio puro con un calor de fusión de 28.4 J.g<sup>-1</sup> y una temperatura de fusión de 56.66 °C. Se prepararon muestras de  $3.0 \pm 0.1$  mg. Las charolas se cerraron herméticamente y se escanearon las muestras de 30 °C a 400 °C a 10 °C.min<sup>-1</sup>. Se utilizó como referencia una bandeja de aluminio vacía y se utilizó una atmósfera inerte de N<sub>2</sub>.

### **6.3.2 DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX)**

Esta técnica comprueba los cambios en la organización de la estructura cristalina de la muestra, identificando los picos característicos en  $2\theta$  para la región amorfa y cristalina. Los patrones de difracción se obtuvieron con un difractómetro de rayos-X marca BrukerAxs, modelo D8 Advance, con un generador de radiación de Cu-K $\alpha$  con filtro de Ni y rejilla de 2 mm, se corrieron las muestras en  $2\theta$  de 5 a 55° con una corriente de 30 mA y un voltaje de 40 kV.

### **6.3.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)**

Determina los grupos funcionales presentes en los sustratos y sus posibles enlaces. El análisis de FTIR se llevó a cabo en un espectrofotómetro e interferómetro con reflectancia total atenuada (ATR por sus siglas en inglés) marca DYNASCAN spectrum 100, Perkin Elmer. Los espectros se obtuvieron con una resolución de 4 cm<sup>-1</sup>, en un rango de 4000-515 cm<sup>-1</sup> y un total de 16 barridos por muestra.

## 6.2.4 MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (MEB)

La microscopia electrónica de barrido (MEB) nos permite ver la morfología y observarla en tres dimensiones. La morfología de los sustratos analizados se observó en un microscopio marca Jeol JSM-6390 LV. Las muestras se recubrieron con una capa de carbón de 30 nm.

## 6.4 FERMENTACIONES

### 6.4.1 MICROORGANISMO

Se obtuvieron muestras liofilizadas en papel de *E. coli* en el Laboratorio de análisis clínicos de Servicio a la Comunidad de Mérida, Yucatán.

La cepa de *E. coli* se depositó en 300 mL de medio Lauria-Bertani (LB) que contiene 10 g.L<sup>-1</sup> peptona de caseína, 5 g.L<sup>-1</sup> extracto de levadura y 5 g.L<sup>-1</sup> cloruro de sodio. Se incubó a 37 °C, con una agitación de 180 rpm durante 24 horas. El medio de cultivo se depositó en tubos de 50 mL y se centrifugaron a 5500 rpm durante 10 min. Se decantó el sobrenadante y el sedimento fue conservado en glicerol al 30%. Se almacenó en tubos eppendorf a 4°C, para su uso posterior.

### 6.4.2 MEDIO DE CULTIVO

Como medio de cultivo se agregó una fuente de carbono al medio mineral. Para la fuente de carbono se utilizaron 10 g.L<sup>-1</sup> de azúcares reductores obtenidos de los sustratos sin molienda, de las concentraciones máximas de azúcares reductores alcanzados con la molienda y de dextrosa como blanco. El medio mineral contiene: 3.0 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.6 g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.4 g.L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.15 g.L<sup>-1</sup> de CaSO<sub>4</sub> y 0.03 g.L<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub> [55].

Para mantener la proporción de la cantidad de carbono con el medio mineral, se calcularon las proporciones de azúcares reductores para cada sustrato (tabla 3).

Tabla 3. Proporciones de azúcares reductores por sustrato con y sin tratamiento.

Sustrato	$\frac{g \text{ de sustrato}}{g \text{ azúcar reductor}}$	Concentración en los medios g/L
Dextrosa	1	10
Is 0 min	0.77	8

<b>Is 20 min</b>	0.17	2
<b>Tc 0 min</b>	1.32	12
<b>Tc 20 min</b>	2.5	2.5
<b>Ra 0 min</b>	0.9	9
<b>Ra 40 min</b>	0.23	2.3

### 6.4.3 INÓCULO

Para la preparación del inóculo a 125 mL de medio Lauria Bertani (LB) se le agregó 0.5 mL de *E. coli* (conservado en glicerol). Se incubó con agitación orbital y control de temperatura a 37 °C, 180 rpm por 24 horas.

### 6.4.4 FERMENTACIONES

Se realizaron en botellas serológicas transparentes de 120 mL. Donde se colocaron 54 mL de medio mineral y 6 mL de inóculo, hasta un volumen de 60 mL. Las botellas se colocaron en una incubadora con agitación orbital y control de temperatura, en condiciones fijas de 37°C y 180 rpm. Se tomaron muestras cada dos horas.

Para determinar las etapas de la cinética de *E. coli* por turbidimetría las fermentaciones se realizaron en matraces de 250 ml agregando 0.5 ml del inóculo y 125 mL de medio Lauria Bertani (LB). Se incubó con agitación orbital y control de temperatura a 37°C, 180 rpm por 12 horas. Las muestras fueron recolectadas cada dos horas.

### 6.4.5 CUANTIFICACIÓN DE LA BIOMASA

#### 6.4.5.1 TURBIDIMETRIA

La cuantificación se determinó por turbidimetría realizando lecturas en un espectrofotómetro JENWAY modelo 6700 a 540 nm.

#### 6.4.5.2 UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC)

Debido a que las fuentes de carbono propuestas generaban sólidos en suspensión que no permiten la cuantificación por turbidimetría se realizó la cuenta en unidades formadoras de colonias para el seguimiento de la cinética de crecimiento de *E. coli*. A las muestras obtenidas se les realizaron diluciones seriadas hasta llegar a  $1:1 \times 10^6$ . Las diluciones finales se inocularon por extensión en placa en agar nutritivo

(Peptona de gelatina 5 g.L<sup>-1</sup>, Extracto de carne 3 g.L<sup>-1</sup>, Agar bacteriológico 15 g.L<sup>-1</sup>) depositando 0.1 ml de muestra. Todas las muestras se inocularon por duplicado.

Se incubaron las placas a 37 °C, durante 12 horas, después de este tiempo se realizó el conteo de colonias de las placas. Para obtener el crecimiento de la biomasa se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Crecimiento de biomasa} = \frac{\text{número de colonias} * \text{factor de dilución}}{0.1 \text{ mL}}$$

Para obtener el rendimiento de la biomasa con respecto a sustrato (Y<sub>CFU/S</sub>) utilizados en los cultivos se aplicó la siguiente fórmula:

$$Y_{\text{CFU/S}} = \frac{\text{crecimiento de la biomasa (CFU)}}{\text{g desustrato}}$$

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 TRATAMIENTO DE LOS SUSTRATOS

Después del secado de los sustratos se procedió al pesado para comprobar la pérdida de humedad. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4.- Cantidad de materia prima obtenida del secado de malanga isleña, taro chino y raquis de plátano macho y porcentaje de humedad de las muestras.

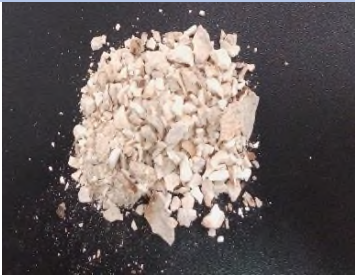

Muestra	Peso inicial	Peso final	Humedad
Malanga isleña	10 kg	1.281 kg	87.15 %
Taro chino	10 kg	1.634 kg	83.66 %
Raquis	20 kg	1.510 kg	92 %

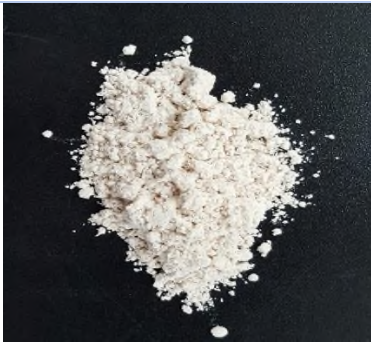


Las dos variedades de malanga presentan humedad superior al 80%. Esta cantidad es mayor a la reportada por la Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria que es del 71.9% de humedad por cada 100 g de malanga comestible en base húmeda [37]. El valor de la humedad solo es una aproximación por diferencia de pesos.

Se tomó una muestra de 1 Kg de raquis fresco para determinar la humedad del mismo, obteniendo como resultado 0.08 Kg de raquis seco. Lo cual indica que el raquis presenta una humedad de 92%. Este contenido se aproxima al reportado para el raquis de *Musa acuminata* Colla, var. *Cavendish*, que es del 93.5 % [56]. Se observó que el raquis minutos después de su corte presento una coloración oscura, conforme se fue secando se tornó más oscuro, debido a que no se dio un tratamiento de blanqueado antes de su uso. Por otro lado, después de ser triturado en la licuadora se observan solo estructuras fibrosas.

Después del pesado para el uso en el molino planetario se trituraron las muestras de malanga y raquis en un mortero para disminuir más el tamaño de partícula. Las Tablas 5, 6 y 7 muestran los resultados obtenidos en los tiempos de molienda del taro chino, malanga isleña y raquis de plátano macho, respectivamente.

Tabla 5.- Descripción de los polvos obtenidos del taro chino (*C. esculenta*) en tiempos de molienda de 0, 5, 10, 20, 30 y 40 minutos.

<b>Taro Chino (<i>C. esculenta</i>)</b>		
<b>TIEMPO MOLIENDA</b>	<b>IMAGEN</b>	<b>DESCRIPCIÓN FÍSICA</b>
<b>0 min</b>		Presenta partes duras dependiendo de grosor del corte del cual fue obtenido. Hay presencia de polvos que se formaron después de disminuir su tamaño con el mortero.
<b>5 min</b>		Expone una apariencia parecida a la fécula de maíz comercial, se aglomera en la superficie de los botes.

<p><b>10 min</b></p>		<p>Se observan grumos o aglomerados en los polvos. Presenta pequeños gránulos duros que dan la apariencia de ser piedra. Disminuye la adhesión a la superficie del bote.</p>
<p><b>20 min</b></p>		<p>Tiene una textura parecida al talco. Desaparecen lo aglomerados. Se pierde por completo la adhesión de polvo a la superficie del bote.</p>
<p><b>30 min</b></p>		<p>El polvo se vuelve más fino. No presenta adhesión al bote ni aglomerados en el polvo</p>

Conforme aumenta el tiempo de molienda para las dos variedades de malanga (Fig. 18 y 19) los polvos presentan cambios en la textura, homogeneidad, presencia de aglomerados en algunos tiempos de molienda e incluso adhesión del polvo a los recipientes de almacenamiento.

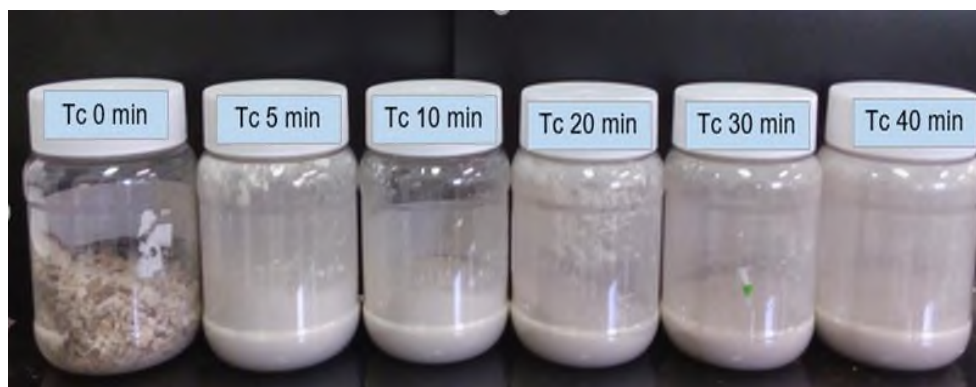


Figura 18.- Taro chino (TC) y taro chino con molienda mecánica de 5, 10, 20, 30 y 40 minutos (TC 5 min, TC 10 min, TC 20 min, TC 30 mm y TC 40 min, respectivamente).

Tabla 6.- Descripción de los polvos obtenidos de la malanga isleña (*C. antiquorum*) en tiempos de molienda de 0, 5, 10, 20, 30 y 40 minutos.

<b>Malanga Isleña (<i>C. antiquorum</i>)</b>		
<b>TIEMPO DE MOLIENDA</b>	<b>IMAGEN</b>	<b>DESCRIPCIÓN FÍSICA</b>
<b>0 min</b>		Presenta formas de láminas en los lugares donde los cortes fueron más delgados. Hay presencia de polvos debido a la trituration con el mortero.
<b>5 min</b>		Se observa una superficie grumosa. El polvo se adhiere a la superficie del frasco. Se hacen aglomerados de los polvos.
<b>10 min</b>		El polvo presenta mayor acumulación de aglomerados. Se adhiere al frasco más que la molienda anterior.
<b>20 min</b>		El polvo se vuelve más uniforme. Pierde la adhesión a las superficies del frasco y las acumulaciones.



30 min		<p>Mayor homogeneidad en el polvo. Ya no presenta aglomerados, no se adhiere al frasco.</p>
40 min		<p>Polvo completamente fino. Al colocarse en el bote se observa una superficie completamente lisa.</p>




Figura 19.- Malanga isleña (Is) y malanga Isleña con molienda mecánica de 5, 10, 20, 30 y 40 minutos (Is 5 min, Is 10 min, Is 20 min, Is 30 min y Is 40 min, respectivamente).

A diferencia de la malanga el raquis de plátano macho presenta principalmente una estructura fibrosa (debido a su alto contenido de celulosa), que disminuye con el tiempo de molienda (Fig. 20).

Tabla 7.- Descripción de los polvos obtenidos del raquis de plátano macho (*M. balbisiana*) en tiempos de molienda de 0, 5, 10, 20, 30 y 40 minutos.

<b>Raquis de Plátano macho (<i>Musa balbisiana</i>)</b>		
<b>TIEMPO DE MOLIENDA</b>	<b>IMAGEN</b>	<b>DESCRIPCIÓN FÍSICA</b>
<b>0 min</b>		Presenta una estructura fibrosa de gran tamaño en comparación con los tiempos de molienda. Se observan polvos en el fondo del bote.
<b>5 min</b>		No presenta cambio significativo con respecto a la molienda realizada en la licuadora casera. Solo disminuye el tamaño de la fibra.
<b>10 min</b>		Se detecta presencia de polvo, sin embargo, aun contiene fibras de tamaño considerable. Al depositarse en los botes, el polvo se va al fondo del mismo, y las fibras se quedan en la superficie.
<b>20 min</b>		Se hacen acumulaciones de polvo. No se adhiere al bote. Disminuye considerablemente la presencia de las fibras.
<b>30 min</b>		Ya no se observan las fibras, Se pierden los aglomerados.

40 min		El polvo es homogéneo. No hay presencia de fibras.
--------	---	--

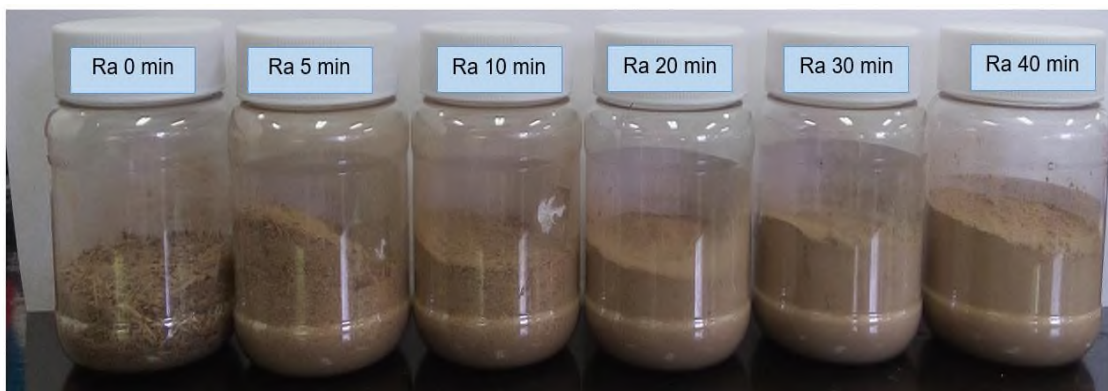


Figura 20.- Raquis de plátano macho (Ra) y molienda mecánica de raquis de plátano por 5, 10, 20, 30 y 40 minutos (Ra 5 min, Ra 10 min, Ra 20 min, Ra 30 mm y Ra 40 min).

## 7.2 TÉCNICAS ANALÍTICAS

### 7.2.1 AZÚCARES REDUCTORES

Los resultados de las concentraciones de azúcares reductores en las muestras sin y con molienda se obtuvieron a partir de los datos obtenidos en la curva de patrón de diferentes concentraciones de glucosas (Fig. 17).

Los resultados de las concentraciones de azúcares reductores del taro chino (Fig. 21) y malanga isleña (fig. 22) muestran un aumento con respecto a las muestras sin tratamiento. Los primeros tiempos de molienda (5 y 10 min) muestran un incremento de la concentración; alcanzando una concentración máxima de azúcares reductores con 20 minutos de molienda mecánica en las dos muestras, y disminuyendo en los tiempos posteriores.

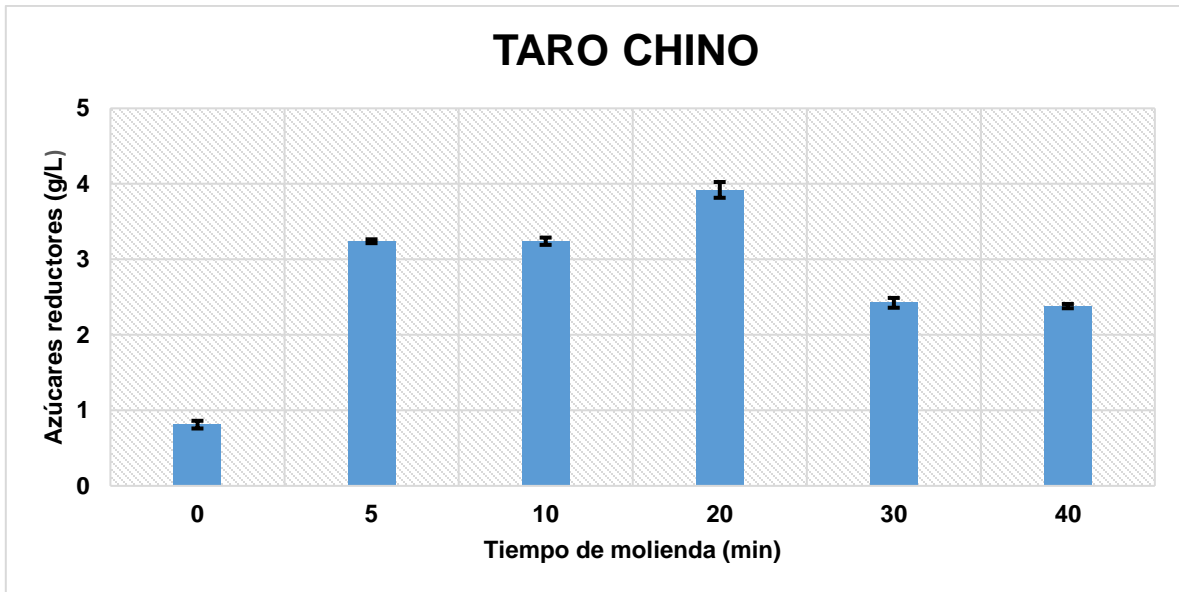


Figura 21.- Contenido de azúcares reductores de taro chino en los diferentes tiempos de molienda.

Las concentraciones máximas de taro chino ( $3.91 \text{ g. L}^{-1}$ ) aumenta 4.8 veces con respecto a la muestra sin tratamiento ( $0.81 \text{ g. L}^{-1}$ ) de la misma. La malanga isleña aumenta de  $1.21 \text{ g. L}^{-1}$  en la muestra sin tratamiento a su concentración máxima de  $5.80 \text{ g. L}^{-1}$ , es decir, 4.5 veces.

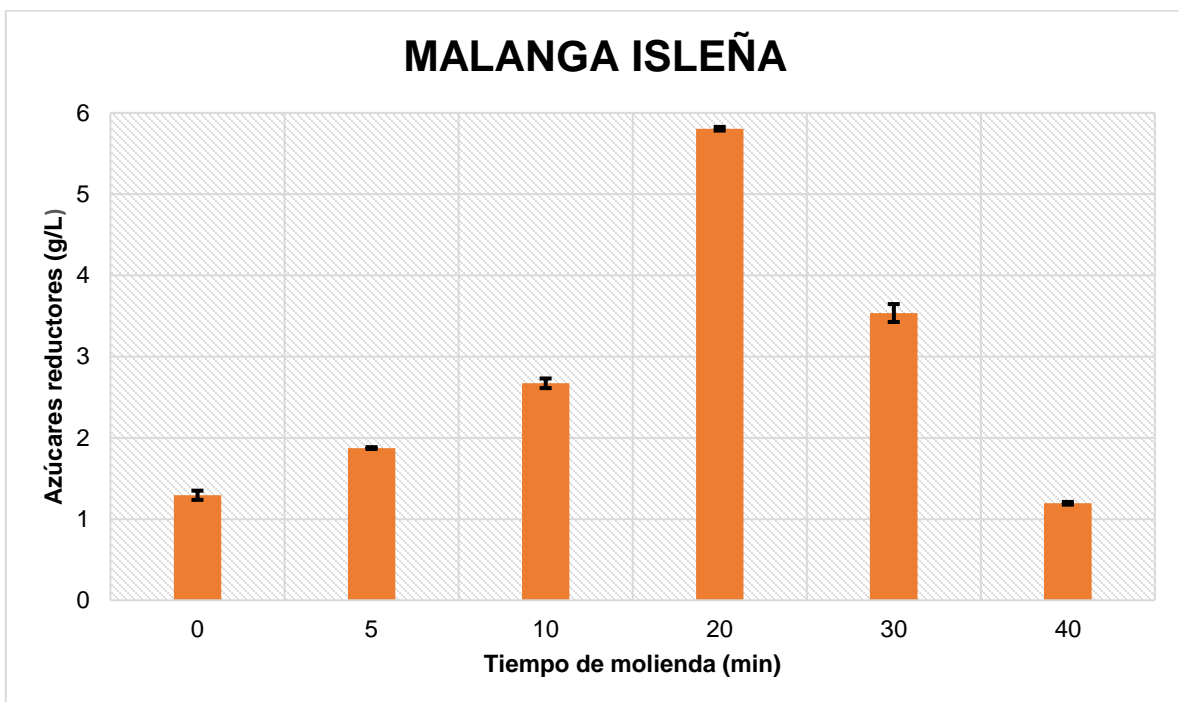


Figura 22.- Contenido de azúcares reductores de la Malanga Isleña en los diferentes tiempos de molienda.

En la literatura se reporta que para hojas de taro pretratada con enzimas hemicelulósicas, la concentración de azúcares reductores se aumenta de 0.006 g. L<sup>-1</sup> a 0.029 g. L<sup>-1</sup> (4.8 veces) [57]. También se ha reportado la obtención de azúcares reductores a partir de tubérculos ricos en almidón como la yuca. Se informó la obtención de azúcares reductores a partir de desechos de yuca mediante ultrasonidos simultáneos e hidrólisis ácida. Su máximo resultado fue de 0.8 g. L<sup>-1</sup> (usando 40 kHz, pH de 2.0, 90 min de hidrólisis a 90 °C) [58]. Residuos de yuca tratados por hidrólisis ácida diluida (0.1 M de ácido sulfúrico, 60 min de hidrólisis y 135 °) alcanzaron un máximo de 0.199 g. L<sup>-1</sup> de azúcares reductores [59].

Contrastando nuestros resultados con la literatura podemos determinar que las concentraciones de azúcares reductores con molienda mecánica son superiores a los reportados con otros tipos de hidrólisis. Sin embargo, el incremento es similar al obtenido por hidrólisis enzimática. Por otro lado, se observa que los tiempos utilizados para la obtención de los azúcares en este trabajo son menor que los reportados en la hidrólisis ácida y en la sonicación.

El raquis de plátano macho presenta concentraciones similares en los primeros tiempos de molienda (5, 10, 20, 30 min) con respecto a la muestra sin tratamiento. Sin embargo, a los 40 min de tratamiento la concentración de azúcares reductores (4.4 g. L<sup>-1</sup>) aumentó 3 veces con respecto a la muestra sin molienda (1.11 g. L<sup>-1</sup>) (Fig. 23). Mientras que en la literatura se reportan concentraciones de azúcares reductores para materiales lignocelulósicos como *Jatropha curcas* y *Penisetum sp.* de 4.06 g. L<sup>-1</sup> y 7.7 g. L<sup>-1</sup> respectivamente obtenidos por hidrólisis enzimática [60].

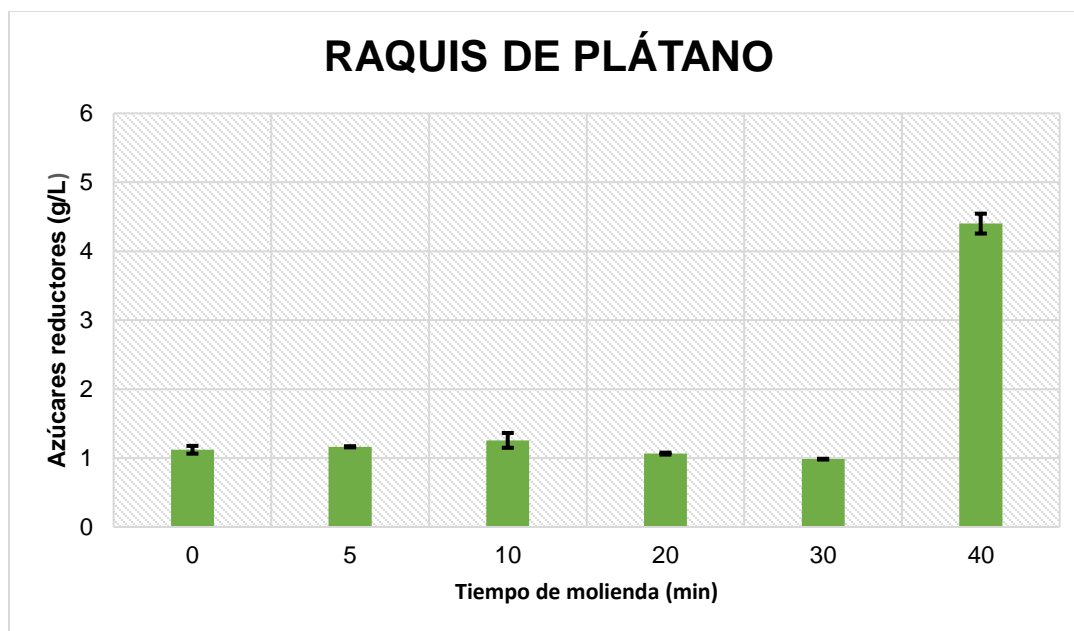


Figura 23. Concentraciones de azúcares reductores para raquis de plátano macho en los diferentes tiempos de molienda.

De acuerdo con los resultados obtenidos se tomaron las muestras con las mayores concentraciones de azúcares reductores de cada una (Tabla 8) para determinar el crecimiento de *E. coli*.

Tabla 8. Concentraciones máximas de azúcares de reductores por muestra con molienda.

Muestra	Tiempo de molienda (min)	Concentración de azúcares reductores (g/L)
Taro chino	20	5.80
Malanga isleña	20	3.91
Raquis de plátano	40	4.40

### 7.2.2 ÍNDICE DE SOLUBILIDAD EN AGUA Y PODER DE HINCHAMIENTO

Los resultados del índice de solubilidad en agua (ISA) para la malanga isleña (Fig. 24a) muestra que sin tratamiento (Is 0 min) el ISA aún con el aumento de la temperatura es menor del 20%, mientras que las muestras tratadas con la molienda mecánica presentan un incremento.

En los primeros tiempos de molienda (Is 5, Is 10 y Is 20 min) muestran una solubilidad de entre el 15-25%. Mientras que los tiempos de 30 y 40 min de molienda el porcentaje es superior a las anteriores (entre 35-45%). Alcanzando un máximo con el incremento de los tiempos de molienda y de temperatura del 60%; 50% más con respecto a la muestra sin tratamiento. El que cada muestra presente solubilidades diferentes a 60 °C se podría atribuir al rompimiento de los gránulos y a la liberación de los componentes durante el tratamiento de molienda mecánica. El incremento de solubilidad a altas temperaturas se asocia con la lixiviación de las cadenas de almidón, principalmente amilosa, y algunas de amilopectina [61].

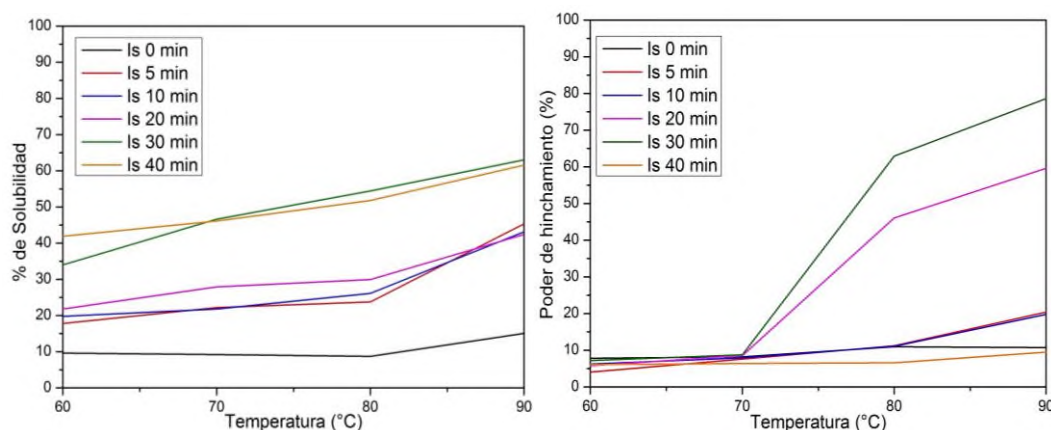


Figura 24.- a) Índice de solubilidad de agua y b) poder de hinchamiento de la malanga isleña

El poder de hinchamiento (PH) de la malanga isleña (Fig. 24 b) presenta un valor inicial menor al 10% para todas las muestras. Las muestras sin tratamiento (Is 0 min) y con tiempos de molienda de 5 y 10 minutos (Is 5 min - Is 10 min) presentan un comportamiento de PH bajo en comparación a los otros tiempos de molienda. Lo anterior se puede justificar considerando que estas tres muestras presentan mayores zonas cristalinas, evitando la absorción elevada de agua; ya que el porcentaje amorfo (amilosa) de los gránulos de almidón permiten la penetración del agua [62]. Las muestras con tiempos de moliendas de 20 y 30 minutos (Is 20 min - Is 30 min) presentando un incremento a partir de los 70°C, considerando un mayor PH para Is 30 min a 90°C presenta cerca del 80% de hinchamiento. Esto puede deberse a la pérdida de cristalinidad del gránulo. El último tiempo de molienda de 40 min (Is 40 min) presenta una caída en el PH presentando un comportamiento similar a la muestra sin tratamiento. El comportamiento del PH de la molienda de 40 min podría estar influenciado por el grado de desintegración del gránulo, lo que sugiere que el gránulo dañado tiene un menor potencial de capacidad de absorción.

El índice de solubilidad en agua para el taro chino (Fig. 25a) muestra un comportamiento diferente a la malanga isleña. Se puede observar que el incremento del porcentaje de inicio y final aumenta con el incremento de los tiempos de molienda. Por otro lado, el poder de hinchamiento (PH) (Fig. 35b) presenta un comportamiento que no concuerda con lo observado con la malanga isleña. El PH inicia para la muestra sin tratar y con tratamiento por debajo del 10% y termina cerca del 20%. No presentan una variación significativa ni aun con el aumento del tiempo de molienda ni con el aumento de la temperatura. Lo anterior puede corresponder a dos posibilidades: 1) que el estado de maduración avanzado de la muestra durante su obtención, provoca la activación de enzimas que catalizan la síntesis de azúcares a partir de almidón [27], 2) que la destrucción del gránulo sea tan severa, que los enlaces de hidrógeno se destruyan. Motivo por el cual el gránulo se hidrata completamente y finalmente la malla micelar se separa y difunde dentro del medio acuoso [61].

Se ha reportado que el taro en presencia de agua gelatiniza de 60 °C a 80 °C, por lo que muestra una baja solubilidad (20%) [62]. El taro y la isleña aumentan su solubilidad con el tiempo de molienda 40% y 50%, respectivamente con respecto a las muestras sin tratamiento. Estas solubilidades son mayores a cualquiera de las solubilidades reportadas para el almidón de *C. antiquorum* que tiene un máximo del 40% [63]. Por lo tanto, la molienda de alta energía modifica favorablemente la solubilidad de las muestras.

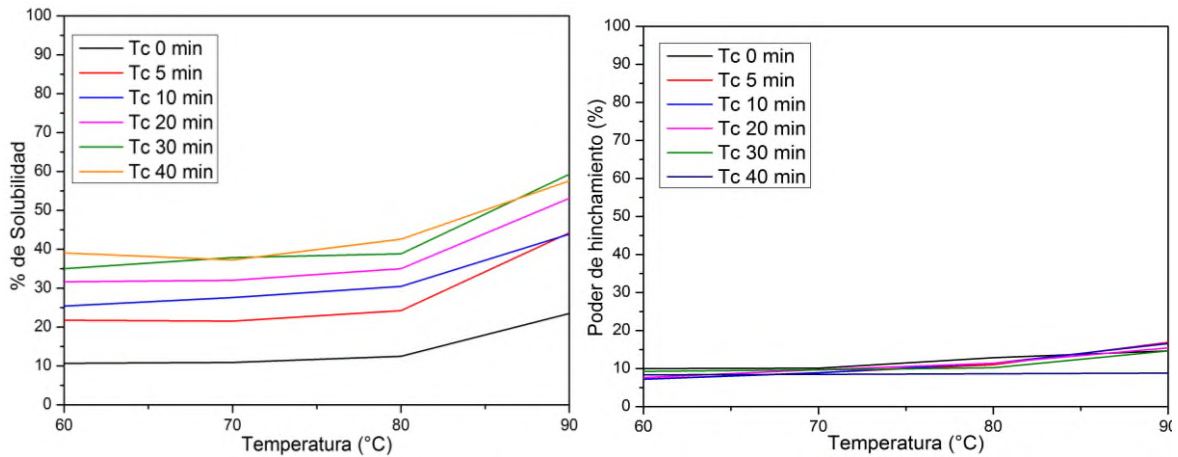


Figura 25.- a) Índice de solubilidad de agua (ISA) y b) poder de hinchamiento (PH) del taro chino.

Se aplicó el índice de solubilidad en agua a las muestras de raquis con y sin tratamiento de molienda (Fig. 26). En las figuras podemos observar que aun cuando empieza con un índice de solubilidad elevado (superior al 35%) no hay un incremento significativo ni con el aumento del tiempo de molienda, ni con el aumento de temperatura. Esto a causa de que no se presenta una amorfización significativa de las muestras con el aumento del tiempo de molienda. Posiblemente la parte que se esté solubilizando en el agua sean la hemicelulosa y lignina del raquis.

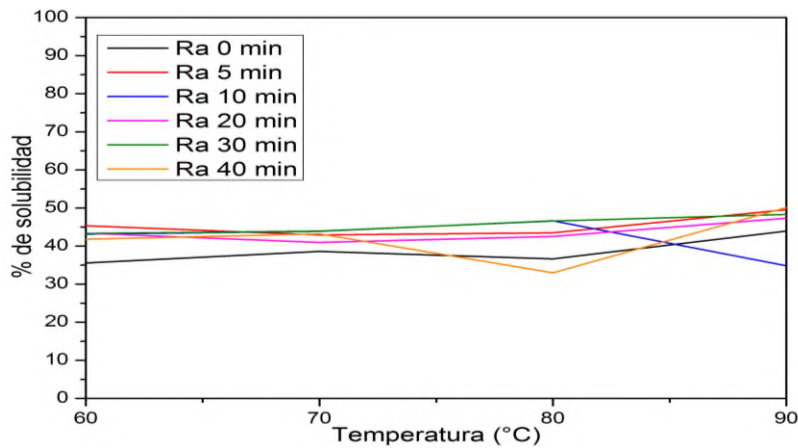


Figura 26.- índice de solubilidad de agua (ISA) del raquis de plátano macho

## 7.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS SUSTRATOS

### 7.3.1 ANÁLISIS TÉRMICOS

Se determinó el comportamiento térmico de la malanga isleña, el taro chino y el raquis de plátano macho con el análisis termogravimétrico (ATG) y con calorimetría diferencial de barrido (CDB).

- **ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO**

De acuerdo a los termogramas de la Fig. 27 se observa que para las muestras de malanga (taro chino, isleña) la descomposición térmica se desarrolló en tres etapas. Una primera etapa corresponde a una reducción de la masa ( $T < 120\text{ °C}$ ) atribuida a la pérdida de agua de las muestras. La segunda etapa ( $210 \pm 10\text{ °C} - 370\text{ °C} \pm 10\text{ °C}$ ) se presenta como consecuencia de los principales procesos de descomposición de las macromoléculas de las muestras. Por último, la tercera etapa ( $T > 400\text{ °C}$ ) se debe a la formación de residuos inertes. El proceso comienza con una rápida deshidratación y descomposición del hidroxilo en los anillos de glucosa para formar la molécula de agua. Posteriormente se produce la ruptura de la cadena principal cuando los enlaces de C-C-H, C-O, and C-C se rompen [64]. Por otro lado, los productos de la descomposición gaseosa consisten principalmente en  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}$  y  $\text{CO}_2$  [65].

Los blancos -glucosa, fructuosa y sacarosa- (Fig. 27 c) solo presentan una etapa de descomposición térmica que corresponde al igual que en las muestras de malanga a la descomposición de los anillos de glucosa.

Las curvas de DTGA derivadas de la etapa principal (Fig. 28a y b) exhibe un pico principal que indica un mecanismo de reacción causado por la degradación de los polímeros presentes en la muestra y un pico a baja temperatura correspondiente a la pérdida de humedad. Los blancos (Fig. 28c) no muestran coincidencia con las muestras.

Los valores obtenidos para las etapas de pérdida de peso de los termogramas y la derivada de los mismos son comparables con la variedad de malanga *Xanthosoma robustum*. Primera etapa en valores,  $< 120\text{ °C}$ , segunda etapa entre  $250 \pm (10)\text{ °C} \leq y \leq 360 \pm (10)\text{ °C}$  y una última etapa en valores  $> 400\text{ °C}$  [65].

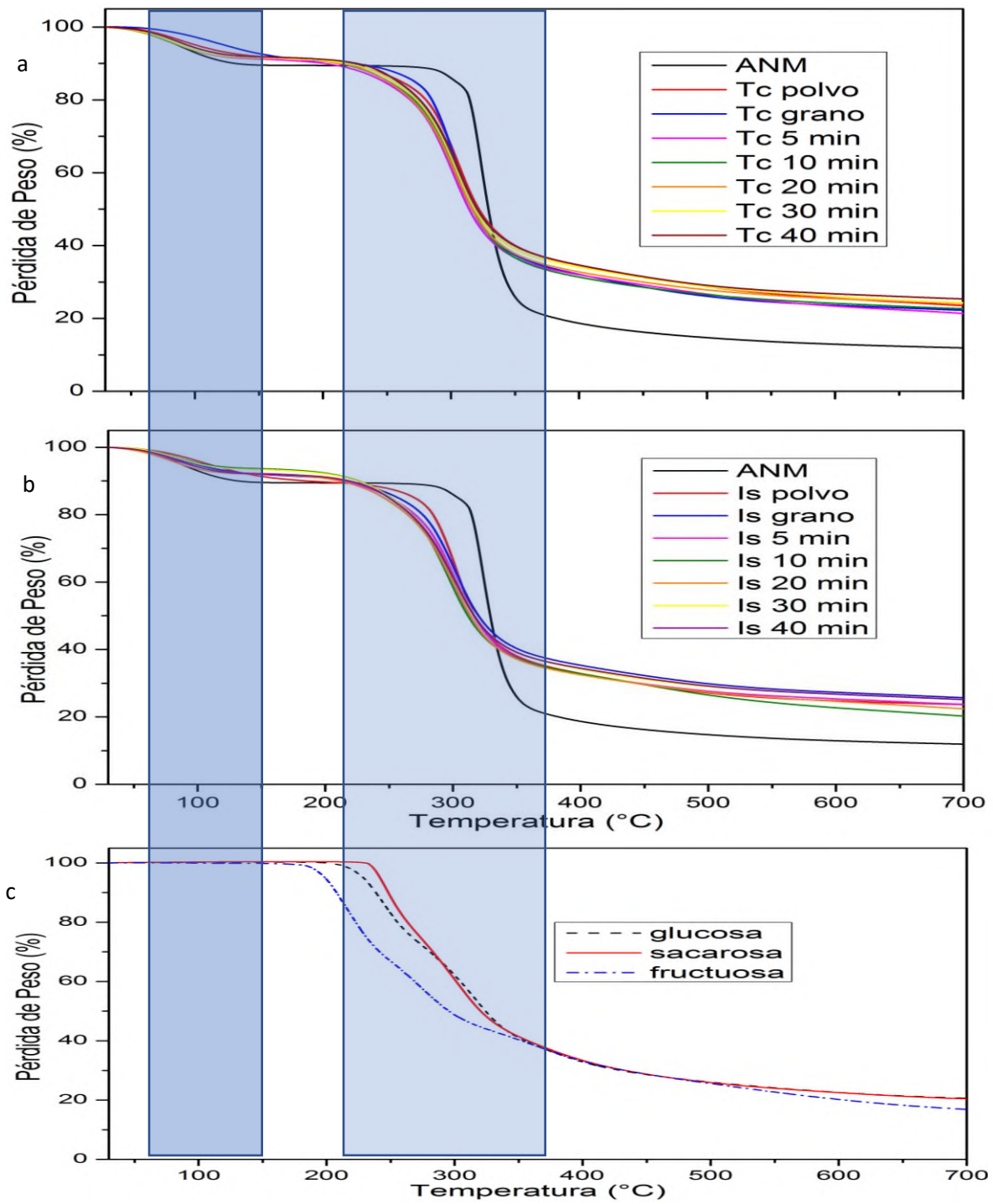


Figura 27.- TGA correspondientes al proceso de descomposición de todas las muestras a 10 ° C / min. a) taro chino, b) malanga isleña c) blancos.

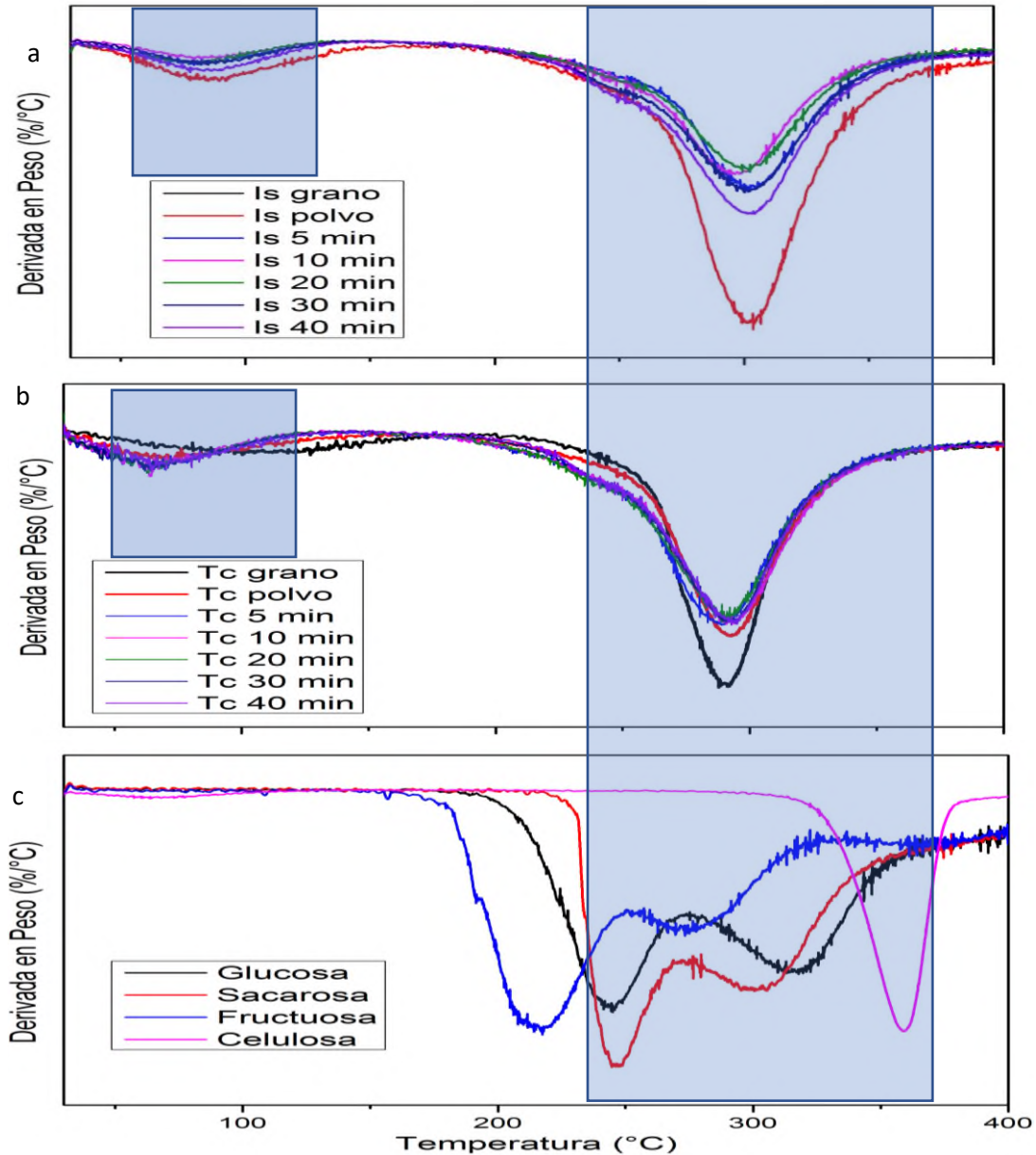


Figura 28.- DTGA correspondientes a la etapa principal del proceso de descomposición para todas las muestras a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . a) malanga isleña, b) taro chino c) blancos.

En los termogramas correspondientes a las muestras del raquis de plátano macho (Fig. 29) con y sin tratamiento de molienda se observan dos etapas diferenciadas. En la primera, la masa desciende rápidamente ( $T \leq 150\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a causa de la deshidratación de la muestra. En una segunda etapa se presentan dos caídas ( $200\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C} - 400\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) atribuidas a la degradación de los polímeros que forman la muestra. La presencia de estas dos caídas se debe a las diferentes proporciones de hemicelulosa, celulosa y lignina [66]. La segunda etapa de degradación coincide

con los blancos debido a la descomposición de los compuestos carbonados presentes.

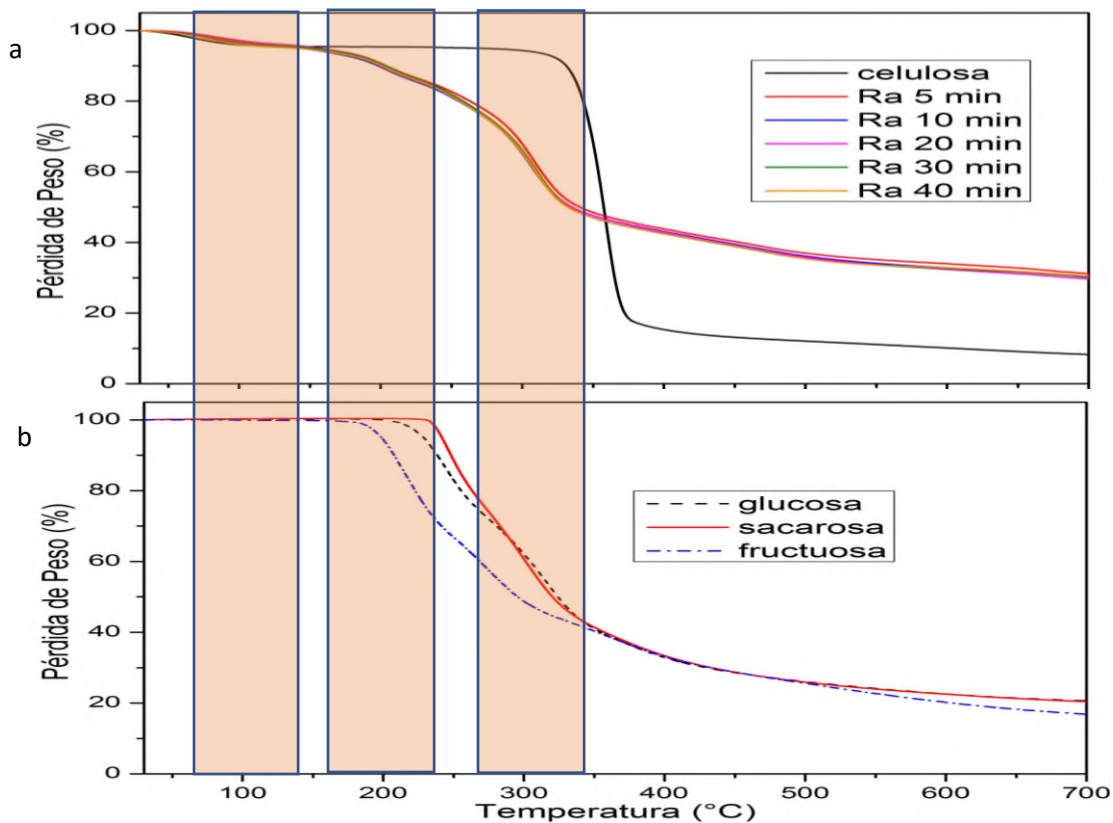


Figura 29.- TGA correspondientes al proceso de descomposición de todas las muestras a  $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . a) raquis de plátano y b) blancos.

En las curvas de DTGA (Fig. 30) se observa en primer lugar un pico asociado a la humedad cerca de los  $100^{\circ}\text{C}$ . En la etapa de la descomposición hay un pico cerca de los  $200^{\circ}\text{C}$ , se exhibe debido a la descomposición de la hemicelulosa y pasando de los  $300^{\circ}\text{C}$  se encuentra el pico más, prominente atribuido a la celulosa y a la lignina [67]. Lo anterior también se puede atribuir a que la descomposición de la celulosa sigue dos comportamientos: a bajas temperaturas en las que se presenta una descomposición del enlace glucosídico para formar residuos carbonosos y a altas temperaturas en las que se presenta una despolimerización, dando lugar a productos volátiles [68]. El pico correspondiente a la descomposición de los enlaces glucosídicos coincide con la temperatura de degradación de la glucosa.

Los valores de los termogramas y sus derivadas concuerdan con las degradaciones reportadas en los análisis de pellet de madera [66] y residuos agroindustriales de

plátano [68]. Lo cual indica que la molienda mecánica de alta energía no cambia la estructura química de los componentes de la muestra.

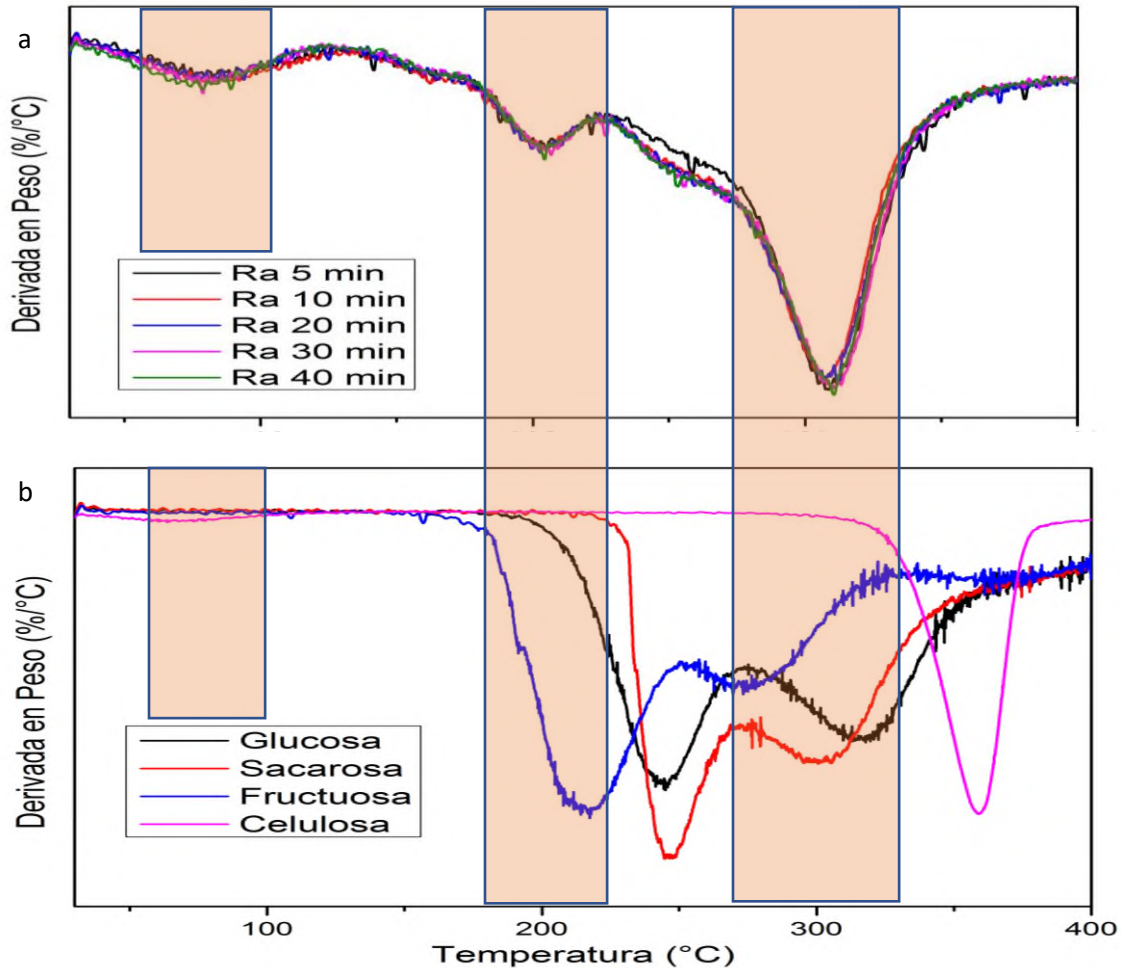


Figura 30.- DTGA correspondientes a la etapa principal del proceso de descomposición para todas las muestras a 10 °C.min<sup>-1</sup>. a) raquis de plátano y b) blancos.

- **CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE BARRIDO**

Las curvas de Calorimetría Diferencial de Barrido (Fig. 31) muestran el flujo de calor correspondiente a las muestras de malanga isleña y taro chino respectivamente. El almidón nativo y los blancos (glucosa, fructuosa y sacarosa) presenta dos picos endotérmicos, el primer pico se asocia con la fusión de las muestras y el segundo con el proceso de degradación térmica [69].

Se observan dos picos principales en las muestras de taro chino e isleña. El primer pico de tipo exotérmico está asociado a la eliminación de agua absorbida/adsorbida. El segundo, está asociado a la pirólisis de los materiales orgánicos (polisacáridos, fibras, hemicelulosas, etc.), los cuales corresponden a la descomposición de la biomasa [70]. El máximo del pico exotérmico se observa alrededor de 305°C, cercano a lo observado en las curvas de DTG. Las entalpías de la pirólisis no cambian con el tiempo de molienda y corresponde a aproximadamente  $-100 \text{ J.g}^{-1}$ .

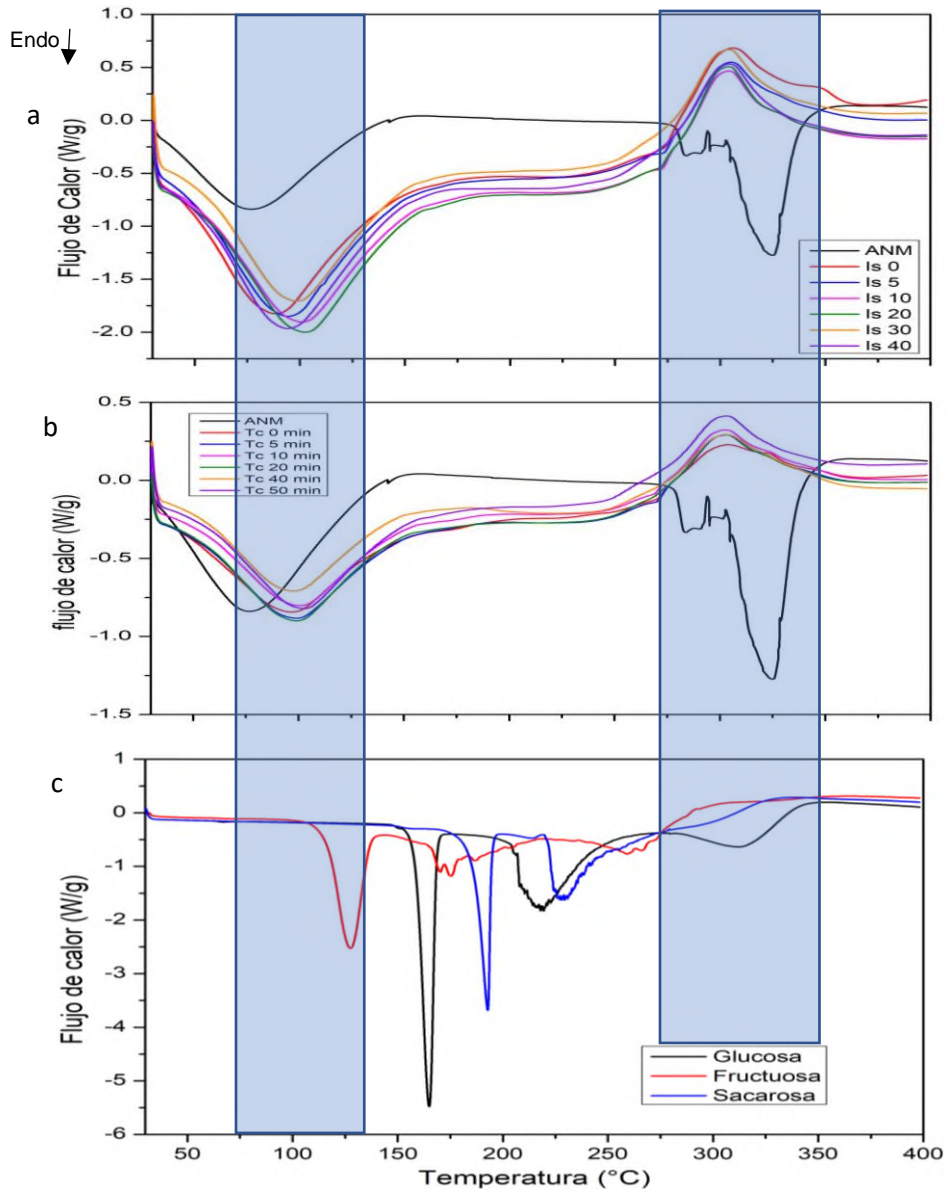


Figura 31.- DSC correspondientes al proceso de descomposición de todas las muestras a  $10^\circ \text{ C.min}^{-1}$ . a) taro chino, b) malanga isleña y c) blancos.

El almidón nativo de malanga (ANM) también muestra dos picos principales, pero se diferencia de las muestras al presentar los picos de tipo endotérmico. El máximo del segundo pico se encuentra a 325 °C, que también es cercano a lo observado en la primera derivada. En esta muestra no se presenta la pirólisis, solo se observa la ruptura de la estructura del almidón. Lo anterior es concordante con lo observado para el almidón de taro y otras fuentes de almidón como la papa [71]. La entalpia observada para el almidón de taro chino e isleña es de 140 J.g<sup>-1</sup>.

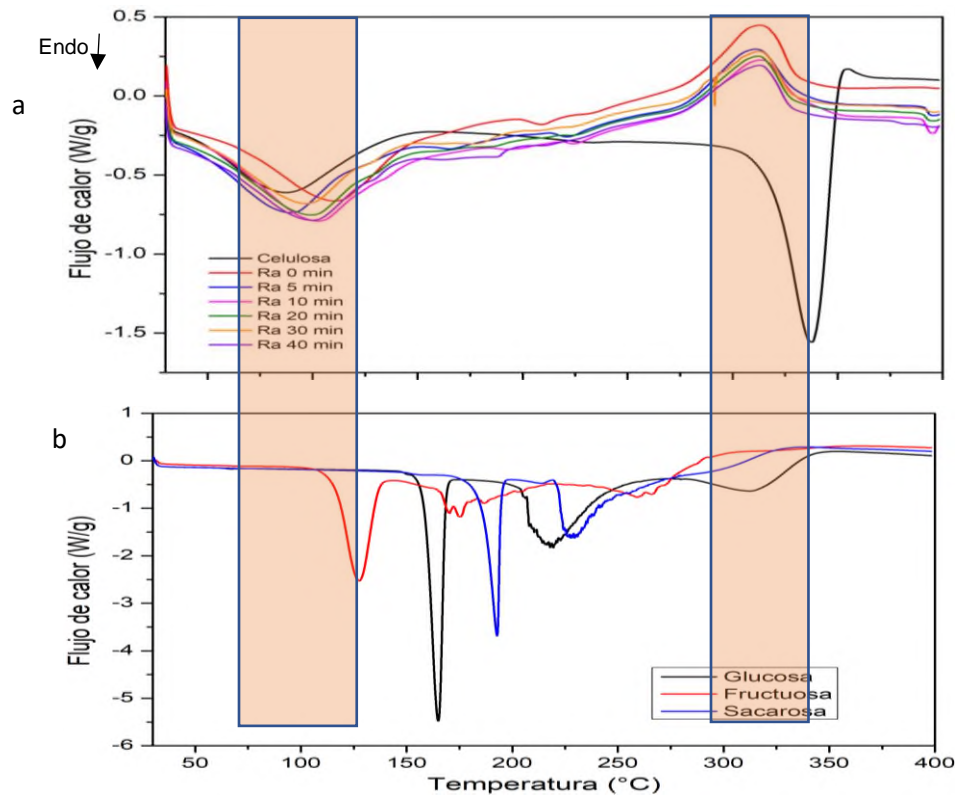


Figura 32.- DSC correspondientes al proceso de descomposición de todas las muestras a 10 ° C / min. a) raquis de plátano y b) blancos.

En las curvas correspondientes al raquis de plátano (Fig. 32) se presentan dos picos característicos. El primero de tipo endotérmico cerca de los 100 °C correspondiente a la liberación de humedad en las muestras con y sin molienda; también se encuentra presente en la muestra de celulosa. El segundo pico de tipo exotérmico se presenta por arriba de los 300 °C atribuido a la formación de carbón, causado por la descomposición de la hemicelulosa y lignina las cuales presentan una alta naturaleza de carbonización [72]. Aunque normalmente la lignina presentara un efecto exotérmico cerca de los 400°C, en materiales lignocelulósicos puede reaccionar y descomponerse a diversas temperaturas dependiendo del tratamiento

ya que presenta estructuras complejas [73]. En contraste la celulosa presenta a dicha temperatura un proceso endotérmico típico de una volatilización completa [72].

### 7.3.2 DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Con el fin de evaluar la cristalinidad de las muestras durante el proceso de molienda, se recogieron los patrones de difracción de rayos en polvo.

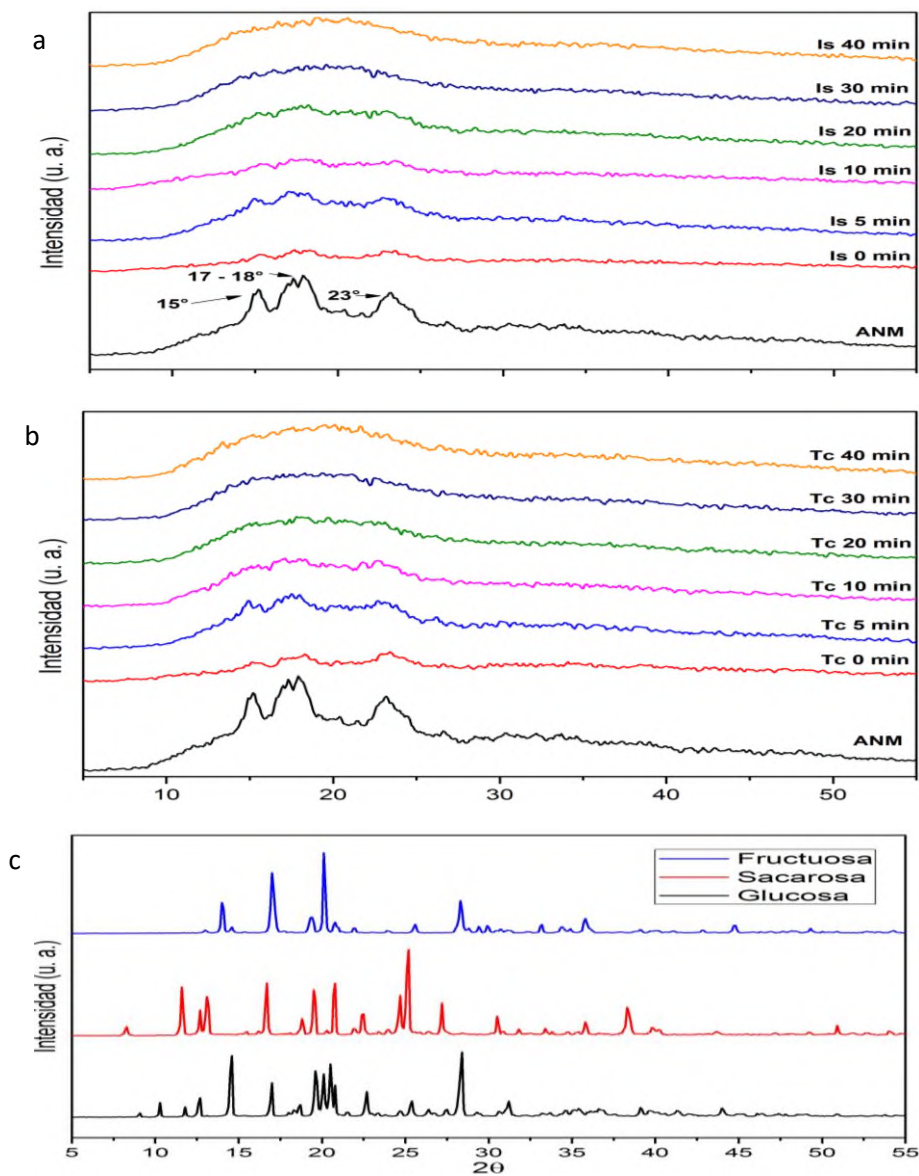


Figura 33.- Patrones de difracción de rayos X de a) malanga isleña, b) taro chino y c) blancos

La muestra de almidón nativo de malanga usado como referencia para las muestras de taro chino e isleña, muestran un patrón de difracción tipo A, correspondiente con lo reportado para *C. antiquorum* [63]. En el difractograma se observan dos picos anchos en  $2\theta = 15^\circ$  y  $23^\circ$ , un pico doble en  $2\theta = 17^\circ$  y  $18^\circ$  y una intensidad máxima inferior a  $2\theta = 20^\circ$ . Los patrones de difracción para las dos variedades de malanga (Fig. 33) muestran un comportamiento parecido con el proceso de la molienda. La cristalinidad de las muestras disminuye con el aumento del tiempo de molienda hasta 20 min, donde las muestras se vuelven amorfas. Los cambios de amorfización se observan cuando se disminuye el tamaño de partícula, la intensidad de los picos también disminuye, sin embargo, la anchura a media altura del pico aumenta. La reducción del grado de cristalinidad (de acuerdo al patrón de difracción de rayos X) de una muestra podría atribuirse a un bajo grado de orden cristalino o a la presencia excesiva de pequeños cristalitas suscitados a partir de la reducción de tamaño de partícula. También se puede adjudicar a que los dominios amorfos (amilosa) que radican en las partículas de almidón de las muestras son fragmentados más fácilmente que su área homologa cristalina (amilopectina) [64]. Los difractogramas de las muestras de malanga isleña y taro chino no guardan relación con los blancos.

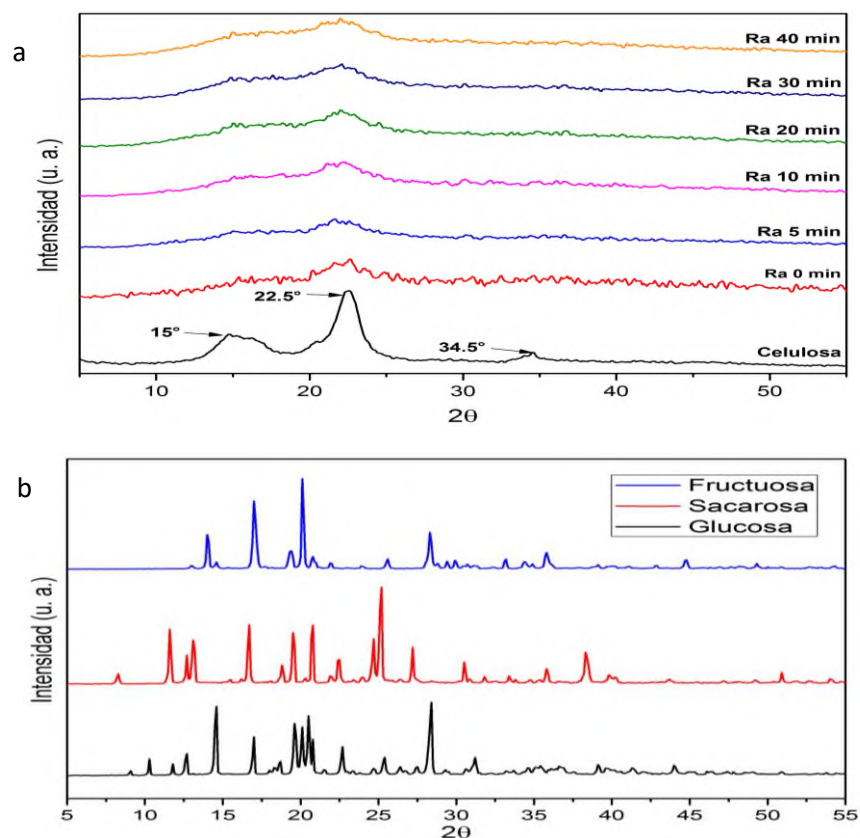


Figura 34.- Patrones de difracción de rayos X de a) raquis y b) blancos

En el patrón de difracción para el raquis de plátano sin tratamiento y con sus respectivos tiempos de molienda se puede observar la presencia de tres señales características. Un pico ancho en  $2\theta = 15^\circ$  perteneciente a la parte amorfa de la celulosa, un segundo pico ancho en  $2\theta = 22.5^\circ$  perteneciente a la parte cristalina y un tercer pico en  $2\theta = 34.5^\circ$ . Esto representa un patrón típico del polimorfo de la celulosa tipo I $\beta$  comúnmente encontrada en las fibras vegetales naturales [68]. En el patrón de difracción (Fig. 34) se observan los cambios en las intensidades de forma proporcional a los tiempos de molienda. Lo anterior se ha presentado en celulosa comercial tratada en tazones de acero con diferentes tiempos de molienda. En dicho proceso se obtuvo como resultado la amorfización parcial con el aumento del tiempo de molienda. Lo cual se observa a partir de la unificación de los picos de las regiones amorfas y cristalinas en el difractograma de rayos X [74]. Por otro lado, al no ver una completa amorfización o una pérdida significativa de la cristalinidad, podemos deducir que no se está debilitando por completo la red de los enlaces cristalinos de la celulosa.

### **7.3.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO POR TRANSFORMADA DE FOURIER**

Los espectrofotómetros de FTIR de taro chino e isleña (Fig. 35a y b) presentan las bandas características de la base estructural del almidón (glucosa). A  $3290\text{ cm}^{-1}$  presenta los enlaces libres inter- e intramoleculares de los grupos hidroxilos (-OH). El pico perteneciente a los  $2922\text{ cm}^{-1}$  se atribuye a los enlaces C-H asociados con el anillo de glucosa. En  $1426\text{ cm}^{-1}$  se encuentran las vibraciones de flexión del metileno (-CH<sub>2</sub>). En  $1421\text{ cm}^{-1}$  las flexiones de los enlaces C-H. Dentro de la huella dactilar del almidón ( $400\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$ ) se encuentran en  $1149\text{ cm}^{-1}$ , las vibraciones de estiramiento C-O-C y C-O-H en los enlaces glucosídicos de los polisacáridos [75].

En  $922\text{ cm}^{-1}$  se encuentra las vibraciones de estiramiento de anillo de anhidroglucosa [76]. Se reporta que no es posible asignar bandas sin ambigüedad, ya que las bandas de absorbancias están superpuestas [77]. Sin embargo, se ha demostrado que las bandas de las regiones  $1100\text{-}900\text{ cm}^{-1}$  (Fig. 36) son sensibles a los cambios en la estructura del almidón, en particular las bandas a  $1022\text{ cm}^{-1}$  (donde se identifica la región amorfa) y  $1047\text{ cm}^{-1}$  (región cristalina). Los estudios incluyen almidones retrogradados, mezclas de almidón y maltrodextrinas amorfas, almidones con hidrolizados enzimáticos y residuos de hidrólisis ácida. A partir de los estudios, estas bandas a  $1022\text{ cm}^{-1}$  parece aumentar en muestras amorfas, mientras que las bandas  $1047\text{ cm}^{-1}$  se han definido en muestras cristalinas [78]. Hecho que concuerda con los resultados obtenidos de las moliendas de malanga en sus dos variedades y que se encuentran indicados en los espectros de infrarrojo.

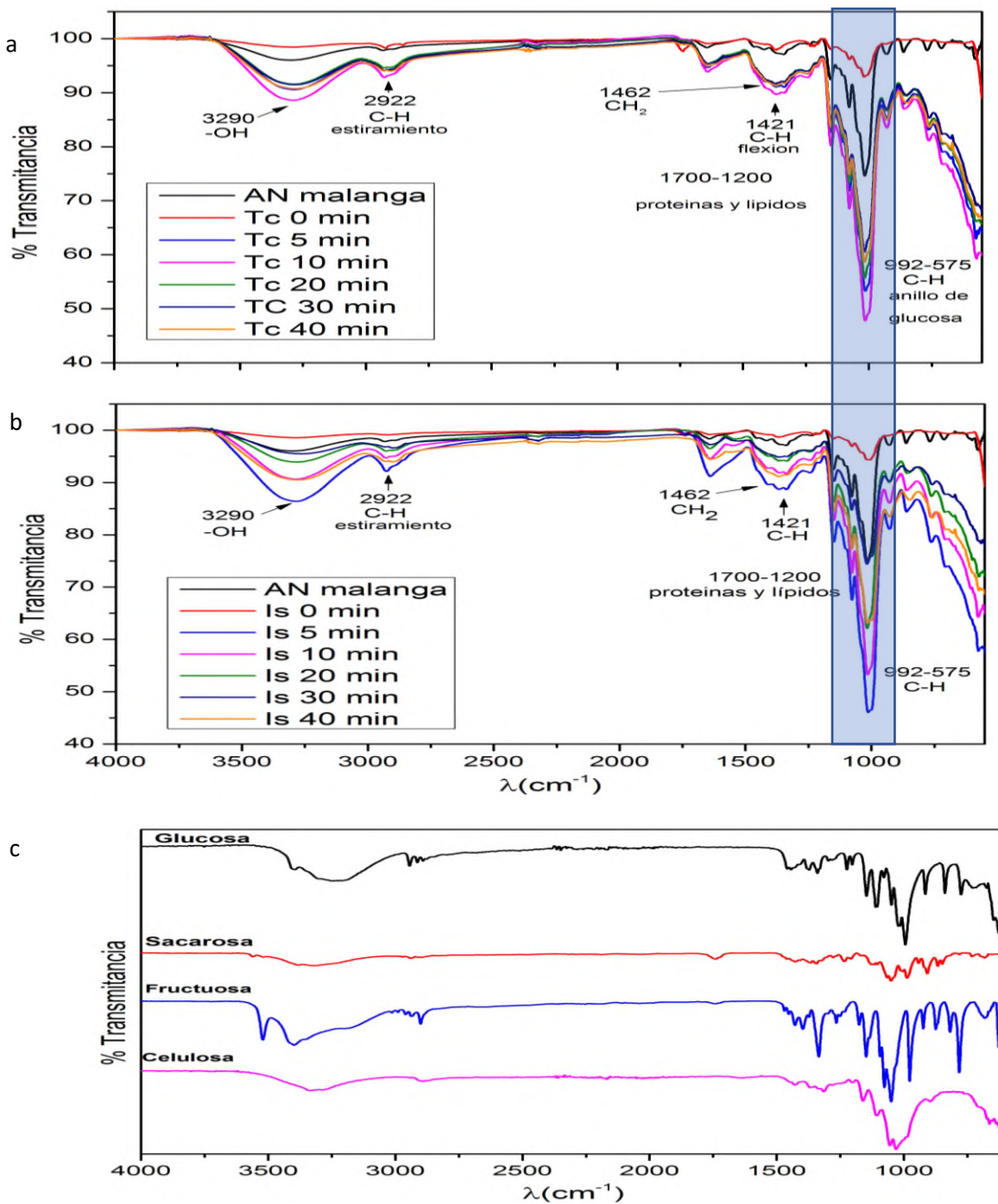


Figura 35.- Espectros de Infrarrojo. A) taro chino, b) malanga isleña y c) blancos.

a

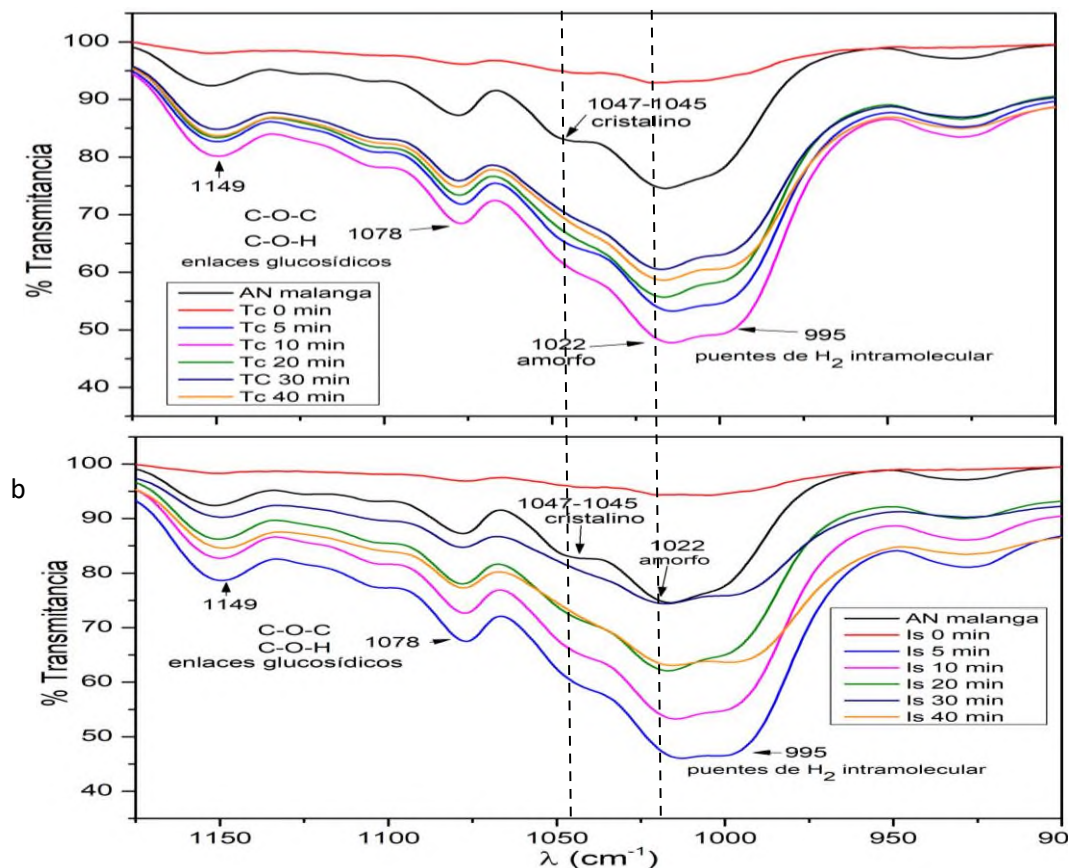


Figura 36.- Espectros de Infrarrojo ampliados ( $1200-900\text{ cm}^{-1}$ ). a) taro chino, b) malanga isleña.

En los espectros de FTIR del raquis de plátano macho (Fig. 37) se observa el pico correspondiente a  $3384\text{ cm}^{-1}$  se debe a las vibraciones de estiramiento característicos de los grupos  $-\text{OH}$  de la celulosa. La intensidad a  $2900\text{ cm}^{-1}$  es atribuible a las vibraciones del enlace  $\text{C-H}$ . El pico de  $1731\text{ cm}^{-1}$  se relaciona con los enlaces  $\text{C=O}$  de las cetonas no conjugadas presentes en la hemicelulosa. Se encuentran bandas cercanas a  $3270\text{ cm}^{-1}$  y  $710\text{ cm}^{-1}$  corresponden a contribuciones de celulosa tipo  $\text{I}\beta$ , pertenecientes a las bandas de estiramiento del enlace  $\text{O-H}$  y a las flexiones fuera del plano respectivamente. El pico  $1731\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la hemicelulosa [68].

A  $2893\text{ cm}^{-1}$  se observa una pequeña banda correspondiente a las vibraciones de estrechamiento de los enlaces  $-\text{CH}$  presentes en la lignina. Las vibraciones correspondientes al esqueleto de la estructura aromática de la lignina, se observan en un rango de  $1495-1216\text{ cm}^{-1}$  con una forma característica de banda de tres picos. Las señales presentes a  $896\text{ cm}^{-1}$  se originan con las vibraciones de los enlaces  $\beta$ -glucosídicos en la molécula de celulosa. Estudios demuestran que la banda de  $1375\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a la flexión del enlace  $\text{C-H}$  (Fig. 38) no debe cambiar

con la degradación ni con la amorfización de la muestra, efecto que queda demostrado en el espectro de las moliendas [74].

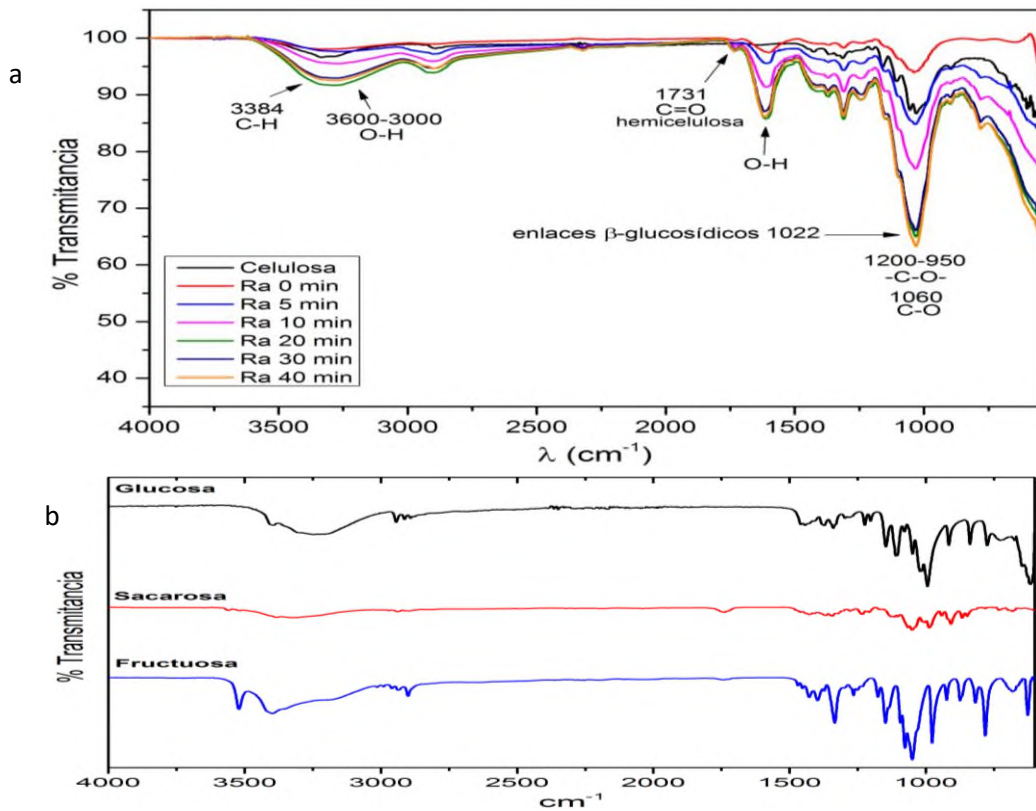


Figura 37.- Espectros de Infrarrojo. a) Raquis de Plátano, b) Blancos

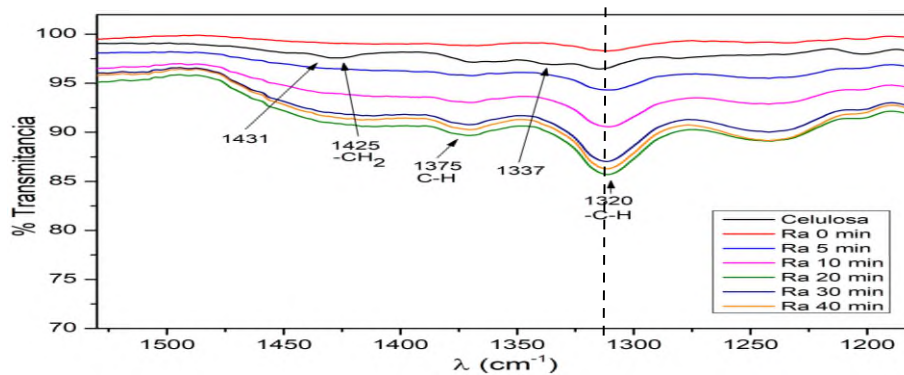


Figura 38.- Espectros de Infrarrojo del raquis de plátano ampliado (1550-1200  $\text{cm}^{-1}$ ).

En cambio, las bandas correspondientes a 1112  $\text{cm}^{-1}$ , 1320  $\text{cm}^{-1}$ , 1337  $\text{cm}^{-1}$  y 1431  $\text{cm}^{-1}$  son sensibles a la molienda y a la reducción de la cristalinidad (Fig. 38 y 39) [74].

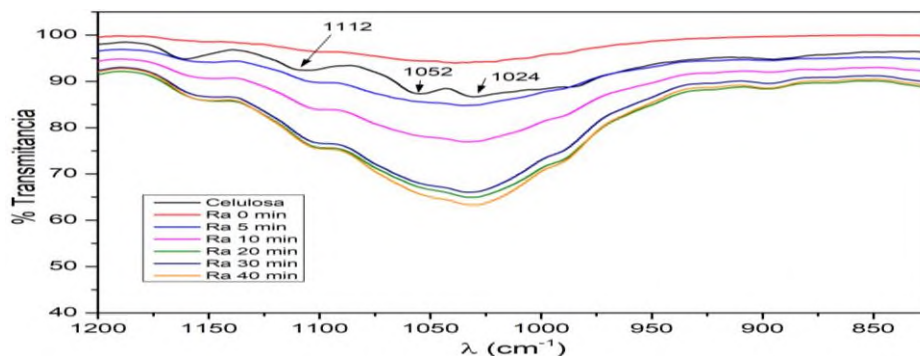


Figura 39.- Espectros de Infrarrojo del raquis de plátano ampliado (1200-850  $\text{cm}^{-1}$ ).

### 7.3.4 MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO

En trabajos previos del grupo de trabajo se realizó las Microscopías Electrónicas de Barrido de taro chino [52], y raquis de plátano macho [79], en las cuales se observan las modificaciones en la morfología que causa la molienda en los sustratos.

En la microscopia del taro chino sin molienda (Fig. 40a) se muestra la estructura del gránulo de almidón de forma poliédrica [30]. Después de someterse a las fuerzas causadas por la molienda, la estructura física del gránulo se rompió. Con 20 min de molienda con bolas de Fe (Fig. 40b) se observa la destrucción del gránulo y la formación de aglomerados de taro. Los gránulos de almidón de malanga isleña tienen el mismo comportamiento que los gránulos de almidón de taro.

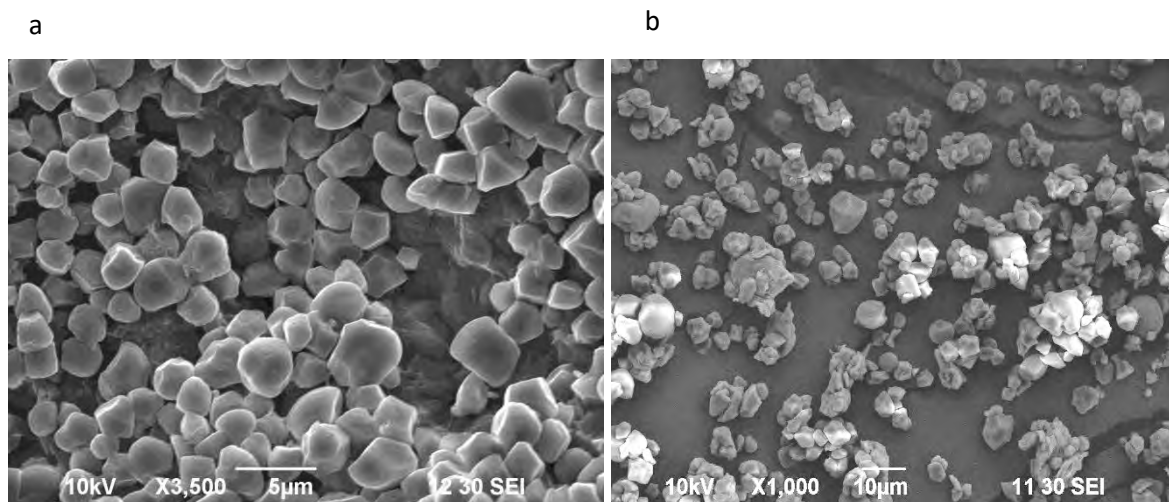


Figura 40.- Microscopías Electrónicas de Barrido (SEM) de taro chino: a) sin molienda y b) 20 min de molienda con bolas de Fe [52]

Los cambios observados por la microscopia electrónica en las estructuras del almidón de taro, concuerdan con los resultados obtenidos en otras técnicas como el DRX donde se observa la pérdida de cristalinidad de la muestra con el aumento

del tiempo de molienda; o los cambios obtenidos en los espectros de FTIR, donde las bandas asociadas a parte cristalina del almidón ( $1047\text{ cm}^{-1}$ ) disminuye y la banda de la región amorfa ( $1022\text{ cm}^{-1}$ ) aumenta.

El análisis de SEM de las muestras sin tratamiento y con molienda en el raquis de plátano macho (Fig. 41) revelaron el efecto del proceso de molienda en las fibras. Tomando como referencia la molienda de 8 min con Carburo de Tungsteno (WC) en el raquis de plátano macho [79], observamos la pérdida de la estructura fibrosa del mismo [74]. Sin embargo, aunque el material de molienda utilizado en dicho trabajo es de mayor densidad, se observó un menor cambio morfológico del raquis y no se observa daño completo de la estructura cristalina. Lo anterior se debe a que la estructura de la celulosa es mucho más resistente que la del almidón. Lo anterior es observado en DRX donde aun con 40 min de molienda no se observa una completa amorfización de la muestra; así como en los espectros de FTIR que son sensibles a la reducción de cristalinidad quedaron intactos.

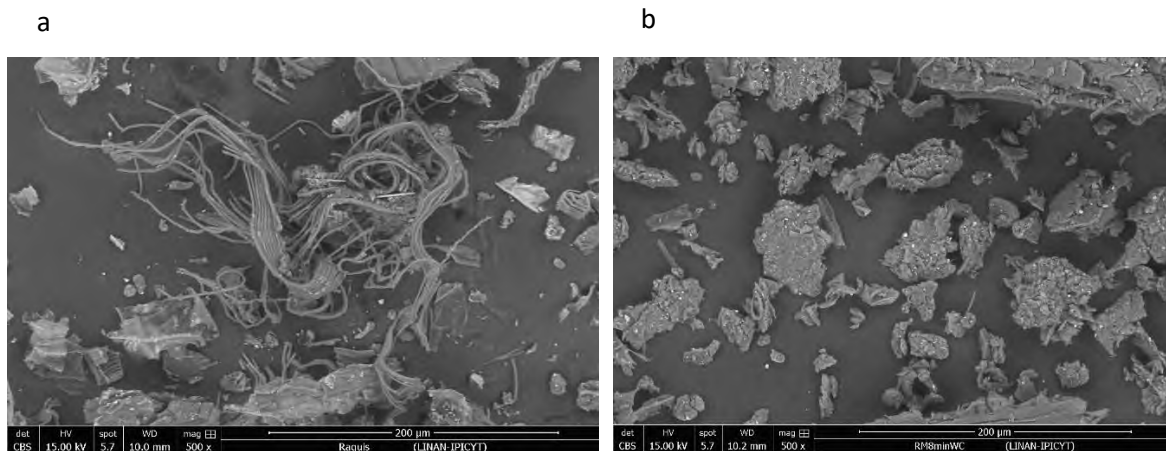


Figura 41.- Microscopías Electrónicas de Barrido (SEM) de raquis de plátano macho: a) sin molienda y b) 8 min de molienda con bolas de WC [79]

## 7.4 FERMENTACIONES

### 7.4.1 CUANTIFICACIÓN DE LA BIOMASA

- **TURBIDIMETRÍA**

La cinética de crecimiento de *E. coli* seguida por turbidimetría utilizando dextrosa como fuente de carbono se presenta en la figura 42. La cinética presenta las típicas fases de crecimiento: una fase de latencia de 0 a 2 horas, una fase exponencial de 2 a 6 horas, y una fase estacionaria de 6-10 horas. Considerando esta última como

fase estacionaria debido al cambio que se produce en la pendiente a partir de las 6 horas es menor que la pendiente que da comienzo de la fase exponencial.

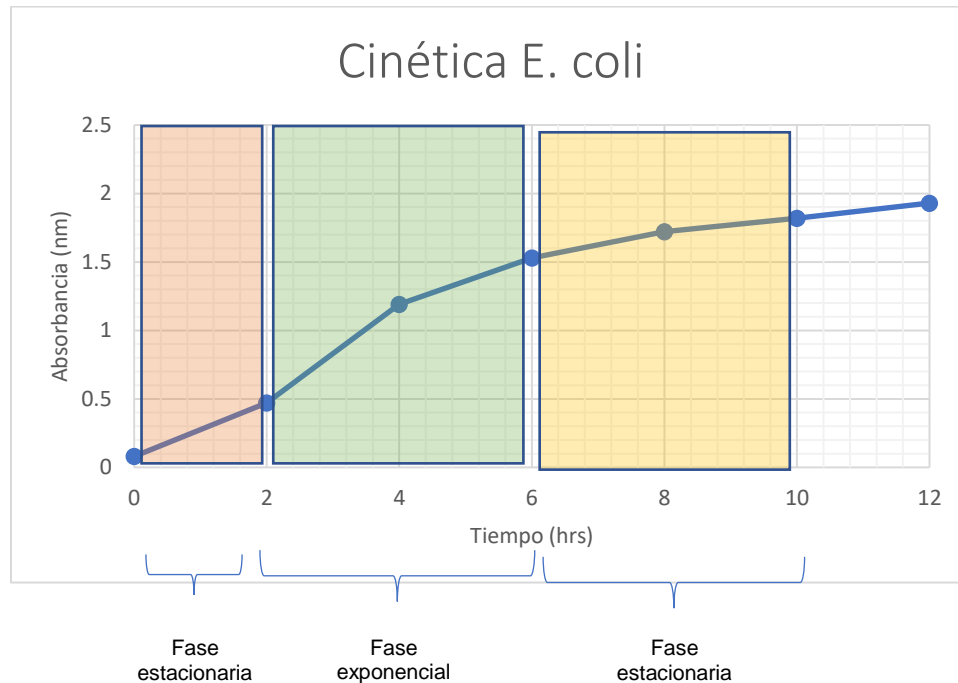


Figura 42. Cinética microbiana de *E. coli* en medio LB por turbidimetría.

- **UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC)**

Debido a que la presencia de sólidos en suspensión de los medios de cultivo utilizando como fuente carbono el taro chino, la malanga isleña y el raquis de plátano interfieren con el seguimiento del crecimiento por turbidimetría se realizó el conteo por Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en placas de agar nutritivo.

La figura 43 muestra la comparación de las dos técnicas para la cuantificación del crecimiento de *E. coli*. Se observa que de 0 a 2 horas existe una fase de latencia o adaptación. De 2 a 4 horas una fase exponencial o de crecimiento. De 4 a 6 horas una fase estacionaria. De 6 a 12 horas. Sin embargo, de 8 a 10 horas se presenta una segunda fase exponencial y de 10 a 12 hora una segunda fase estacionaria. Dicho comportamiento se le puede atribuir a un crecimiento diaúxico, es decir, que presenta un crecimiento en dos fases. En la primera fase, el microorganismo consume aquel nutriente para el cual su metabolismo le permite crecer a una mayor velocidad, dejando una segunda fase de crecimiento más lento. De 6 a 12 horas, la fase de muerte. Como se observa, la técnica de turbidimetría no permite determinar la etapa de muerte del microorganismo. Aunque sí las etapas de latencia y exponencial. Los cual es de esperarse debido a que las UFC mide células viables.

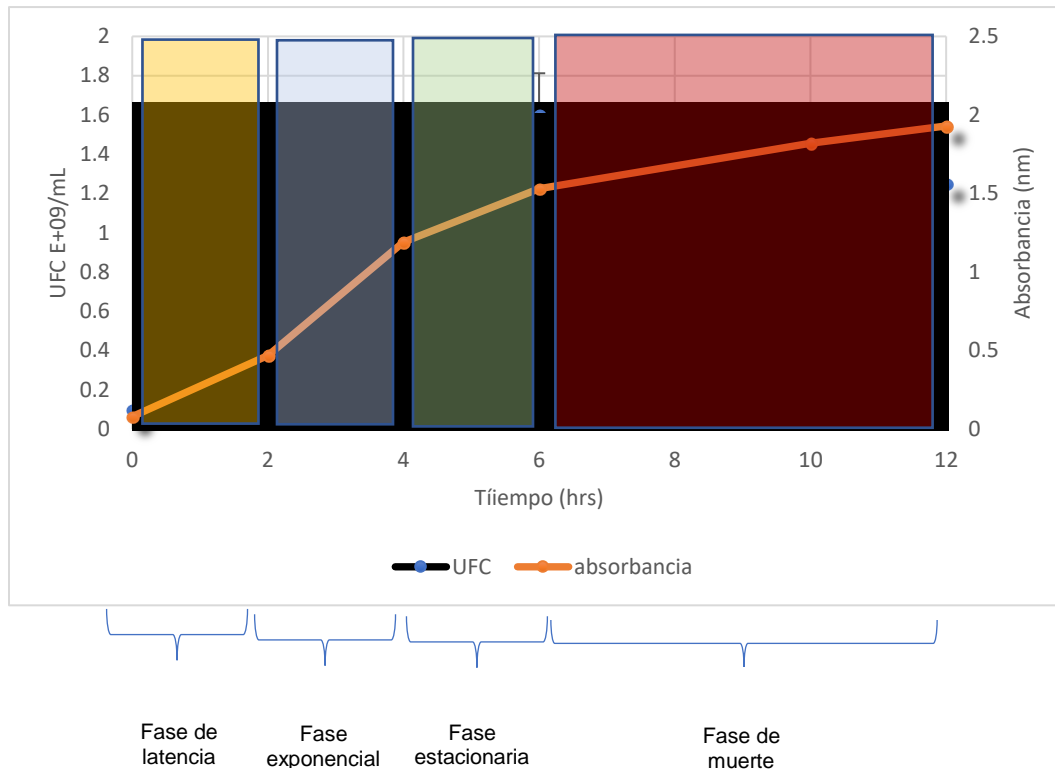


Figura 43.- Comparación de las técnicas usadas para cuantificación del crecimiento de *E. coli*.

La cinética de crecimiento de *E. coli* utilizando malanga isleña (Fig. 44) presenta para muestra sin tratamiento una fase estacionaria de 0 a 2 horas, la fase exponencial de 2 a 6 horas, no se observa una fase estacionaria como tal, pasando de las 6 horas se observa una fase de muerte hasta las 8 horas, donde nuevamente se inicia una etapa exponencial. Para la muestra con 20 min de molienda presenta de 0 a 2 horas una fase de latencia. De 2 a 4 horas una fase en la cual se disminuye el crecimiento del microorganismo. De 4 a 6 horas un crecimiento exponencial, de 6 a 8 horas una segunda fase de muerte y de 8 a 10 horas nuevamente una fase exponencial. El máximo crecimiento de *E. coli* se alcanza en la primera fase exponencial a las 6 horas.

Con respecto al banco utilizado, la dextrosa presenta una fase de latencia de 0 a 2 horas, una fase exponencial de 2 a 4 horas, de 4 a 6 horas una fase de muerte, de 6 a 8 horas una fase estacionaria y finalmente de 8 a 10 horas una segunda fase de muerte.

Al comparar el comportamiento de la malanga isleña con y sin tratamiento con la dextrosa podemos determinar que, aunque presenta dos fases en los tres casos, la

dextrosa presenta su máximo crecimiento a las 4 horas, mientras que la malanga isleña lo presenta a las 6 horas con y sin el tratamiento de molienda mecánica.

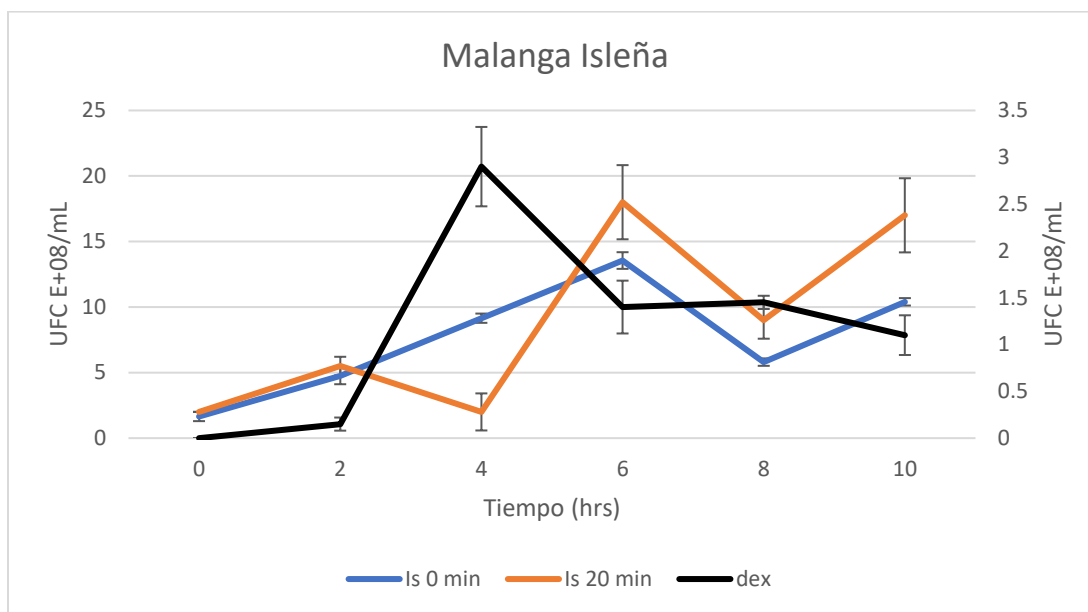


Figura 44.- Crecimiento de *E. coli* en malanga isleña con y sin tratamiento como fuente de carbono más medio mineral y dextrosa como blanco.

La cinética de crecimiento para taro chino (fig. 45) presenta: sin molienda una fase de exponencial de 0 a 2 horas, una fase estacionaria de 2 a 4 horas, una fase exponencial de 6 a 8 horas y finalmente una segunda fase exponencial de 8 a 10 horas. La muestra de taro chino con 20 min de molienda mecánica presenta una fase estacionaria de 0 a 2 horas, una fase exponencial de 2 a 8 horas y una fase estacionaria de 8 a 10 horas. Al comparar con el comportamiento de la dextrosa como blanco, observamos que mientras que en dextrosa el máximo crecimiento es en 4 horas, en el taro chino se registra en las 8 horas. Dicho comportamiento del crecimiento máximo también difiere del crecimiento de la malanga isleña.

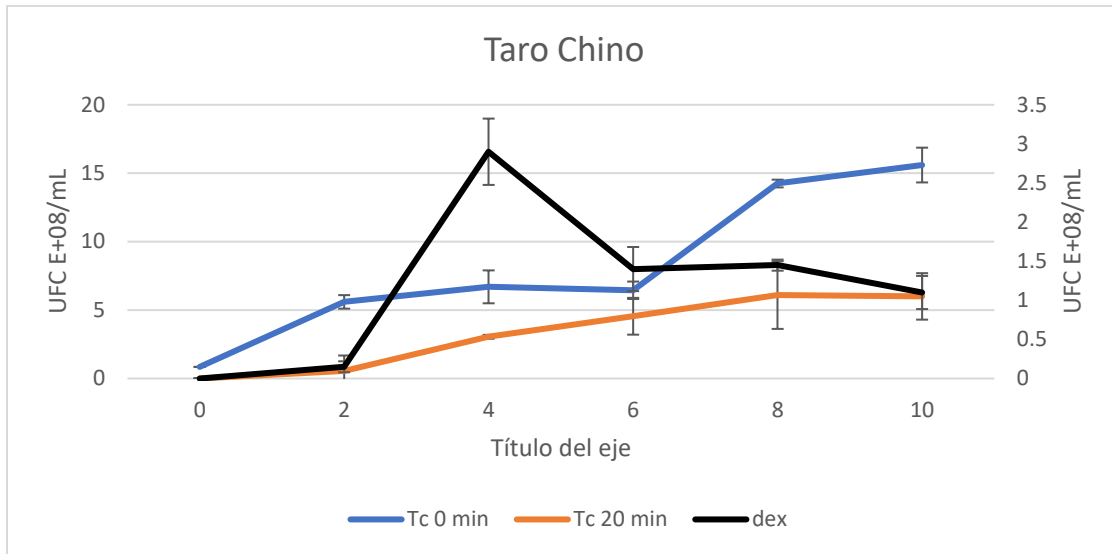


Figura 45.- Crecimiento de *E. coli* en Taro chino con y sin tratamiento como fuente de carbono más medio mineral y dextrosa como blanco.

La cinética de crecimiento de *E. coli* utilizando raquis de plátano (Fig. 46) presenta; para la muestra sin tratamiento una fase de latencia de 0 a 4 horas, una fase exponencial de 4 a 6 horas, una fase de muerte de 6 a 8 horas y una segunda fase exponencial de 8 a 10 horas. La muestra con 40 min de molienda mecánica una fase de latencia de 0 a 2 horas, una fase exponencial de 2 a 6 horas, una fase de muerte de 6 a 8 horas y por último una segunda fase exponencial de 8 a 10 horas.

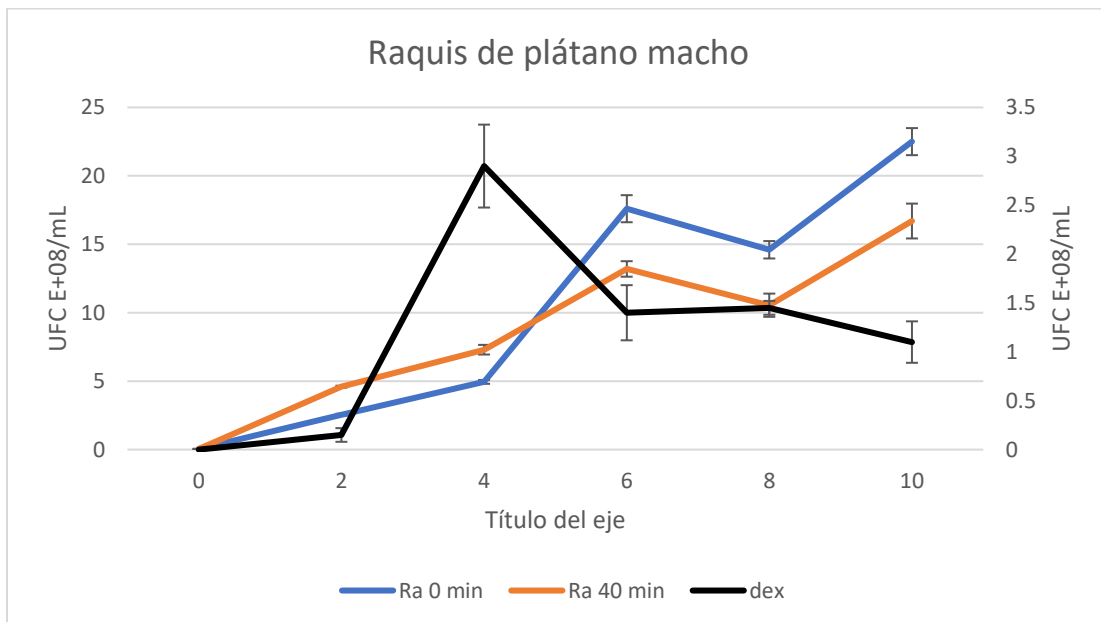


Figura 46.- Crecimiento de *E. coli* en raquis de plátano macho con y sin tratamiento como fuente de carbono más medio mineral y dextrosa como blanco

En las cinéticas de crecimiento de *E. coli* utilizando como fuentes de carbono los sustratos con y sin molienda más el medio mineral, se observa un crecimiento diaúxico. Es decir, un crecimiento en dos etapas. Este fenómeno se observa cuando un microorganismo tiene a su alcance más de un sustrato o nutriente limitante, y en lugar de metabolizarlos simultáneamente los consume de forma secuencial, obteniéndose así dos fases de crecimiento [80]. Se tiene reportes de *E. coli* en cultivos con diversas fuentes de carbono donde se presenta un crecimiento diaúxico [81]. Dicho comportamiento dentro de nuestras muestras se le puede atribuir a la presencia de distintos tipos de azúcares que son obtenidos mediante la molienda mecánica.

Para determinar la cuantificación de la biomasa y el rendimiento de *E. coli* con respecto al sustrato se hizo uso de las ecuaciones mencionadas en la metodología. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9.

Los resultados indican que *E. coli* no solo crece utilizando como fuente de carbono la malanga isleña, el taro chino y el raquis. Sino que también crece mejor que con la dextrosa. La malanga isleña tiene el mejor rendimiento de las tres muestras con respecto al blanco. El  $Y_{UFC/S}$  para la malanga isleña con 20 min de molienda aumenta 31 veces con respecto a la dextrosa, y 5.3 veces con respecto a la malanga isleña sin tratamiento. El  $Y_{UFC/S}$  del taro chino aumenta 8.4 veces con respecto a la dextrosa y 1.8 veces con respecto a la muestra sin molienda. Finalmente, el raquis tuvo un  $Y_{UFC/S}$  25 veces mayor que la dextrosa, y 2.9 veces más que el raquis sin tratamiento.

Tabla 9.- Conteo de biomasa y rendimiento de *E. coli* con respecto al sustrato.

Sustrato	Conteo de biomasa (UFC x $10^8$ /mL)	Cantidad de sustrato (g/L)	$Y_{CFU/S} \left( \frac{UFC \times 10^{11}}{g_{sustrato}} \right)$
Dextrosa	2.9	10	0.29
Is 0 min	13.55	8	1.69
Is 20 min	18	2	9
Tc 0 min	14.25	12	1.3
Tc 20 min	6.1	2.5	2.44
Ra 0 min	22.5	9	2.5
Ra 40 min	16.7	2.3	7.26

## 8. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo permiten concluir:

- La molienda mecánica de alta energía aumento la cantidad de azúcares reductores de las muestras. Las mayores concentraciones se presentaron en la malanga isleña (20 min), el taro chino (20 min) y el raquis de plátano (40 min), aumentando 4.8 veces, 4.5 veces y 3 veces respectivamente comparando con las muestras sin tratamiento. El incremento de las concentraciones en algunos casos es parecido o incluso más elevado que los azúcares obtenidos por hidrólisis ácida, enzimática o por ultrasonido.
- La malanga isleña presenta un mayor aumento de azúcares reductores en comparación de las otras dos muestras, aunque el comportamiento de las concentraciones es igual al de taro chino. Por otro lado, es de esperarse que el aumento de los azúcares reductores en el raquis no sea el esperado debido a su composición y a que se determinó que la energía generada durante la molienda con acero templado no afecta la parte celulósica de su estructura.
- Los azúcares reductores (con mayor concentración de cada muestra) generados por la molienda mecánica de alta energía fueron asimilados por *E. coli* en los medios propuestos en este trabajo.
- Los rendimientos de biomasa de las muestras contra el blanco utilizado (dextrosa) aumentan para malanga isleña 31 veces, taro chino 8.4 veces y raquis de plátano 25 veces. El aumento con respecto a sus muestras sin molienda es de 5.3 veces para la malanga isleña, 1.8 veces para el taro chino y 2.9 veces para el raquis. No existe literatura donde se utilicen estos sustratos como fuentes de carbono para medios de cultivo o para la generación de hidrógeno por fermentación.

## 9. PERSPECTIVAS

En este trabajo se demostró que la molienda mecánica de alta energía generará los azúcares reductores necesarios para el crecimiento de *E. coli* por vía fermentativa.

- Como perspectiva del trabajo se propone:
- Realizar las fermentaciones vía anaeróbica de *E. coli*.
- Determinar la producción de hidrógeno de *E. coli* por fermentación oscura.
- Cuantificar la producción de hidrógeno por cromatografía de gases.

## 10. PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

“Efecto de la molienda mecánica en Malanga (*Colocasia esculenta*) y Raquis de plátano macho (*Musa balbisiana*) como fuente de carbono para producción de hidrógeno por fermentación oscura.”

**Lizzette Ivette Morales Toledo**, Ana Karin Navarro Martínez, Erick A. Juárez-Arellano.

4ª Reunión de Materiales, Nanotecnología y Ciencias Aplicadas (Cartel) pp 117. Tuxtepec, Oaxaca, 30 de junio y 1 de julio 2016.

“Obtención de azúcares simples a partir de malanga (*Colocasia esculenta*) y raquis de plátano macho (*Musa balbisiana*) por molienda mecánica”.

**L.I. Morales-Toledo**, A.K. Navarro-Mtz., E.A. Juárez-Arellano.

6º Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía (Cartel).

Zapopan, Jalisco, 27 al 29 de septiembre del 2017.

“Obtención de azúcares reductores a partir de malanga (*Colocasia esculenta*) y raquis de plátano macho (*Musa balbisiana*) por molienda mecánica.”

**Lizzette I. Morales-Toledo**, Karla Viridiana Castro-Cerritos, Adolfo López-Torres, Ana Karin Navarro-Mtz., Erick A. Juárez-Arellano.

5ª Reunión de Materiales, Nanotecnología y Ciencias Aplicadas (Oral)

Tuxtepec, Oaxaca, 6-8 de Diciembre de 2017.

## 11. ARTÍCULO

“Fast production of reducing sugar of tubercles (*Manihot esculenta* (Cassava), *Colocasia esculenta* (taro) and *Colocasia antiquorum* (isleña)) by high-energy ball milling for biofuel production”

Powder Technology (2018) enviado.

## 12. REFERENCIAS

1. Graetz J. New approaches to hydrogen storage. *Chem Soc. Rev.* August **2010**.
2. Blanco S.; Rodríguez T. Biohydrogen production from wastes via dark fermentation: A critical review; (1993-2011). *Ingeniare, Revista chilena de Ingeniería.* **2012**, 3, 398-411.
3. Deadwood M.; Orozco R.; Majewski A.; Macaskie L. An integrate biohydrogen refinery. Sinergy of photofermentation, extractive fermentation and hydrothermal hydrolysis of food wastes. *Bioresor Techn.* **2012**, 199, 384-392.

4. Chang R. Química. Mc Graw Hill. 2010.
5. Show Y.; Lee J.; Chang S. Bioreactor and process desing for biohydrogen production. *Bioresour. Techn.* **2011**, 102, 8524-8533.
6. Shia P.; Pandey A. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. *Hydrogen Energy.* **2011**, 36, 7460-7478.
7. Chittibabu G.; Nath K.; Das D. Feasibility study of the fermentative hydrogen production by recombinant Escherichia coli BL-21. *Process Biochem.* **2006**, 41, 682-688.
8. Ntaikoun I.; Antonopoulos G.; Lyberatos G. Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation: A review. *Wastes Biomass Valorization.* **2010**, 1, 21-39.
9. Argun H.; Kargi F.; Biohydrogen production by different operational modes of dark and photofermentation: An overview. *Int. J. Hydrogen Energy.* **2011**, 36, 7443-7459.
10. Valentine L.; Blanton C.; Reebugh S. Hydrogen production methanogen sunder low-hydrogen conditions. *Arch. Microbiol.* **2000**, 174, 415-421.
11. Chen N.; Tseng J., Lee S.; Chang S. Fermentation hydrogen production with Clostridium butyricumCGS5 isolate froman aerobic sewages lung. *Int. J. Hydrogen.* **2005**, 30, 1063-1070.
12. Long C., Cui J., Liu Z., Long M., Hu Z. Statistical Optimization of fermentative hydrogen production from xylose by newly isolate Enterobacter spp. CN1. *Int. J. Hydrogen Energy.* **2010**.35, 6657-6664.
13. Redwood M., Macaskie L. A two-stage, two-organism process for biohydrogen from glucose. *Int. J. Hydrogen Energy.* **2006**, 31, 1514-1521.
14. Hassan S. H., Morsy F. M., Feasibility of installing and maintaining anaerobiosis using Escherichia coli HD701 as facultative anaerobe for hydrogen production by Clostridium acetobutylicum ATCC 824 from varius carbohydrates. *Enzyme Microbial Technol.* **2015**, 81, 56-62.
15. Madigan M. T.; Martinko J. M.; Dunlap P. V.; Clark D. P. Brock biology of microorganisms. Pearson. Benjamin Cummings, San Francisco, 2003.
16. Forster A. H., Gescher J. Metabolic engineering of Escherichia coli for production of mixed-acid fermentation and products. *Bioengineering and Biotechnology.* **2014**, 2, 1-12.
17. Vadar-Schara G.; Madea T.; Wood T. K. Metabolically engineered bacteria for producing hydrogen via fermentation. *Microbial Biotechnol.* **2008**, 1, 107-125.

18. Froni L. Microbiología Básica, Ambiental y agrícola. L. Froni Ed. 1° edición. Uruguay, 2005.
19. Lara R. A. recombinant protein production *Escherichia coli*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. **2011**. 10, 209-223.
20. Bisailon A.; Turcot J.; Hallenbeck P. The effect of nutrient limitation of hydrogen production by batch cultures of *Escherichia coli*. *Int. J. Hydrogen Energy*. **2006**, 31, 1504-1508.
21. Kang J.; Gen Y.; Xia Y.; Kang J.; Qi Q. Engineering *Escherichia coli* for an efficient aerobic fermentation platform. *J. Biotechnol.* **2009**, 144, 58-63.
22. Lobaina R. T.; Rodríguez M. C.; Zhuerbenko R. Caracterización de un extracto de *Ipomoea batatas* para ser utilizado en calidad de base nutritiva en medios de cultivo. *Rev. Cubana Med. Trop.* **2007**, 59, 218-126.
23. Rosales-Colunga L; M., De León R. A. *Escherichia coli* and application to biohydrogen production. *Rev. Environ Sci Biotechnol.* **2014**, 1-13.
24. Castro C. R.; Diaz G. J.; Pulido D.; Acosta O.; Guerrero F. C. Production of recombinant heat shock protein HSC70 in *Escherichia coli* BL21(DE3) to obtain polyclonal antibodies. *Revista de la Facultad Médica de la Universidad Nacional de Colombia*. **2006**, 54, 156-168.
25. Gidley M. J.; Hanashiro I.; Hani N. M.; Hill S. E.; Huber A. Reliable measurements of the size distributions of starch molecules in solution: Current dilemmas and recommendations. *Carbohydr. Polym.* **2010**, 79, 255-261.
26. Wang S.; Yu J.; The semi-crystalline growth rings of C-type pea granule revealed by SEM and HR-TEM during acid hydrolysis. *Carbohydr. Polym.* **2008**, 74, 7431-739.
27. Badui Tergal Salvador. Química de los alimentos. Pearson Educación. México, 2006.
28. Klemm D.; Philipp B.; Heinze T.; Heinze U.; Wagenknecht W. Comprehensive Cellulose Chemistry. Vol 1. Wiley-VCH. Weinheim 1998.
29. David S. Chimie moléculaire et supramoléculaire des sucres. Introduction chimique aux glyco sciences. InterEditions et CNRS éditions, Paris 1995.
30. Aguilar Monge Efraín. Evaluación de alternativas sustentables como biofertilizante en Malanga (*Colocasia esculenta*) en el municipio de Actopan, Veracruz. Tesis de licenciatura. Universidad Veracruzana. 2011.
31. Hon D.; Shiraishi N. Weathering and photochemistry of wood. In wood and cellulosic chemistry. Eds. Marcel Dekker. USA 2001.

32. Karapinar K.; Kargi F. Biohydrogen production from wastes materials. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, 38, 569-582.
33. Gou X.; Trably E.; Latrille E.; Carrere H.; Steyer P. Hydrogen production from agricultural wastes by dark fermentation: A review. *Int. J. Hydrogen Energy.* **2010**, 35, 10660-10673.
34. Deadwood M.; Orozco R.; Majewski A.; Macaskie L. An integrate biohydrogen refinery. Sinergy of photofermentation, extractive fermentation and hydrothermal hydrolysis of food wastes. *Bioresour. Technol.* **2012**, 199, 384-392.
35. Hernández A. Microbiología Industrial. EUNED. Costa Rica, 2003.
36. Pérez E.; Schultz F.; Pacheco E. Characterization of some properties of starches isolated from *Xanthosoma sagittifolium (tennia)* and *Colocasia esculenta (taro)*. *Carbohydr. Polym.* **2005**, 60, 139-145.
37. COVECA (Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria). Monografía de la Malanga (*Colocasia esculenta* L. Scott) Gobierno del Estado de Veracruz, 2010.
38. Turrado J.; Saucedo A.; San Juan R.; Sulbaran B. Rachis of *Musa balbisiana* and *Musa acuminata* as source of fibers for paper structure. *Information Tecnológica. Research Gate.* **2009**, 20, 117-122.
39. Gañan P.; Zuluaga R.; Cruz J.; Vélez J.; Retegi A.; Mondragón I. Elucidation of the fibrous structure of *Musaceae* matured rachis. *Cellul.* **2008**, 15, 131-139.
40. Mazzeo M.; León L.; Mejía L.; Guerrero L.; Boreto J. Aprovechamiento industrial de residuos de cosecha y postcosecha del plátano en el departamento de Caldas. *Revista Educación en Ingeniería.* **2010**, 9, 128-139.
41. Sopicka-Lizer M. High-energy ball milling. Mechano chemical processing of nanopowders. Wood head Publishing Limited. 2010.
42. Benjamin J. Dispersion streng the ned superalloys by mechanical alloying. *Materials Transactions.* **1970**, 1, 2943-295.
43. Davis R.; McDermott B.; Koch C. Metall. *Mechanical Alloying.* **1994**, 19, 2869-2879.
44. Surayanarayana C. Mechanical Alloying and Milling. *Process in Materials Science.* **2001**, 46, 1-184.
45. Sant'Ana da Silva A.; Inoue H.; Endo T.; Yano S.; Bon E. P. S. Milling pretreatment of sugar cane bagasse and Straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Bioresour. Technol.* **2010**, 101, 7402-7409.

46. Operating manual. Fritsch. Planetary mills. Pulverisette 7 premium line. 2008.
47. Campos B. Síntesis y caracterización de los sistemas  $\text{Eu}_2\text{O}_3$  y  $\text{Gd}_2\text{O}_3$  por molienda mecánica. Universidad Calos III de Madrid. 2011.
48. Khalil C. F.; Long L. H.; Chen P.; Jun X. B. Properties of maize starch modified by ball milling in etanol médium and lowfield NMR determination of the wáter molecular mobility in theiregels. *J. Ceral Sci.* **2012**, 56, 321-331.
49. He S.; Qin Y.; Walid E.; Li L.; Cui J.; Ma Y. Effect of ball-milling on the physicochemical properties of maize starch. *Biotechnol. Rep.* **2014**, 3, 54-59.
50. Kwon J. H.; Kang H.; Sang B.; Kim Y.; Min J.; Michelle R. J.; Lee J. H. Feasibility of a butanol bioproduction using planetary mill pretreatment. *Bioresour. Technol.* **2016**, 199, 283-387.
51. Kim H. J.; Lee S.; Kim J.; Michell R. J.; Lee J. H. Envirinmentally friendly pretreatment of plant biomass by planetary and attrition milling. *Bioresour. Technol.* **2013**, 144, 50-56.
52. Urzúa V. M. Transformación mecánica de alta energía de sustratos orgánicos con posible uso en medios de cultivo. Tesis de licenciatura. Universidad del Papaloapan 2017.
53. Miller G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **1959**, 31, 426-428.
54. Schmiele M.; Sech G.; Da Silva S. V.; De Souza R. T.; López A. E.; Nabeshima E. H.; Chang Y. K.; Steel C. J. Physicochemical, structural and rheological properties of chestnut (*Castanea sativa*) starch. *Am. J. Food Sci. Technol.* **2015**, 3, 1-7.
55. Canul C. M. Estudios de parámetros de operación de un reactor anaerobio para la producción de hidrógeno a partir de residuos orgánicos. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. 2010.
56. Oliveira L.; Cordeiro N.; Ergutuguin D.; Silvestre A. Chemical composition of different morphological parts from Dwarf Cavendish banana plant and their potential as non-wood renewable sourse of natural products. *Industrial Crops and Productts.* **2007**, 26, 163-172.
57. Saenphoom, P.; Chimtong, S.; Phiphatkiphaisan, S.; Somsri, S. Improvement of taro leaves using pre-treated enzymes as prebiotics in animal feed. *Agriculture and Agricultural Science Procedia.* **2016**, 11, 65-70.
58. Kongkiattikajorn, J.; Yoonan, K.; Conversion of cassava industry waste to fermentable sugars, in: The 2nd Joint International Conference on "Sustainable energy and enviroment (SEE 2006). 2006.

59. Simanjuntak, W.; Satria, H.; Utami, N.; Production of reducing sugar from cassava solid waste by simultaneous ultrasonication and acid hydrolysis. *Indonesian Journal of Chemistry*. **2014**, 14, 233-238.
60. Arellano P. C. Obtención de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos sometidos a hidrolisis enzimática. Tesis de Maestría. Universidad Veracruzana. 2015.
61. Liu J.; Wang F.; Wang L.; Xiao S.; Tong C.; Tang D. Preparation of fluorescence starch-nanoparticle and its application as plant transgenic vehicle. *Journal of Central South University of Technology*. **2008**, 15, 768-773.
62. Tattiyakul, J.; Pradipasena, P.; Asavasaksakul, S. Taro *Colocasia esculenta* (L.) Schott Amylopectin Structure and its effect on starch functional properties. *Starch/Starke*. **2007**, 59, 342-347.
63. Ríos-Ríos, K.; González-Mondragón, E.; Segura-Campos M.; Ramírez-Jiménez M.; López-Luna, J.; López-Martínez, I.; Betancur-Ancona D. Physicochemical and nutritional characterization of starch isolated from *Colocasia antiquorum* cultivated in Oaxaca, México. *J. Chem*. **2016**, 1-7.
64. Liu D., Wu Q.; Chen H.; Chang P. Transitional properties of starch colloid with particle size reduction from micro to nanometer. *Journal of Colloid and Interface Science*. **2009**, 117-124.
65. Londoño-Restrepo S.; Ricon-Londoño N.; Contreras-Padilla M.; Acosta-Osorio A.; Bello-Pérez L.; Lucas-Aguirre J.; Quintero, V.; Pineda-Gómez P.; Real-López A., Rodríguez-García M. Physicochemical, morphological and rheological characterization of *Xanthosoma robustum* Lego-like starch. *Int. J. Biol. Macromol*. **2004**, 65, 222-228.
66. Crespo F. N., Folgueras D. M. Estudio de la degradación térmica de los pellets de madera. Departamento de energía. Universidad de Oviedo. 2011.
67. Andrade C. Efecto de las condiciones del proceso de la obtención de la celulosa sobre sus propiedades fisicoquímicas. Tesis de licenciatura. Facultad de ingeniería Química. Yucatán, México. 1998.
68. Bolio-López G.; Valadez-González A.; Veleza L.; Andreeva A. Whiskers de celulosa a partir de residuos agroindustriales de banano: obtención y caracterización. *Rev. Mex. Ing. Quím*. **2011**, 10, 291-299.
69. Saavedra-Leos M. Z.; Álvarez-Salas C.; Esneider-Alcalá M. A. Towards an improved calorimetric methodology for glass transition temperatura determination in amorphous sugar. *J. Food*. **2012**, 10, 258-267.

70. Strezov, V.; Moghtaderi, B.; Lucas, J. Thermal study of decomposition of selected biomass samples. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2003**, *72*, 1041-1048.
71. Andrade, L.; Barbosa, N.; Pereira, J. Extraction and properties of starches from the non-traditional vegetables yam and taro. *Polym.* **2017**, *27*, 151-157.
72. Dhyani V., Bhaskar T., Acomprehensive review on the pirolisis of lignocellulosic biomass. *Renewable Energy.* **2017**, *30*, 1-22.
73. Wulfhorst, H.; Duwe, A.; Merseburg J.; Tippikotter, N. Compositional analysis of pretrated (beech) Wood differential scanning calorimetry and multivariate data analysis. *Tetrahedrom.* **2016.**, *72*, 7329-7334.
74. Avolio R.; Bonadies I.; Capitani D.; Errico M. E.; Gentile G.; Avella, A. A multitechnique approach to assess the effect of ball milling on cellulose. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87*, 265-273.
75. Tirado-Gallegos J. M.; Zamudio-Flores P. B.; Ríos-Velasco C.; Acosta-Muñiz C. H.; Gutiérrez-Meraz F.; Islas-Hernández J. J.; Salgado-Delgado R. Effect of the method of isolation and the degree of ripeness on the physicochemical, structural and rheological properties of apple starch. *Rev. Mex. Ing. Quím.* **2016**, *15*, 391-403.
76. Torres B. M., Carmona G. R., Aguirre C. A. Obtaining and structural characterization and funtional of acetylated starch of taro (*Colocasia esculenta* Schott). *Rev. Mex. Ciencias Agric.* **2015**, *6*, 905-912.
77. Van Soest J. J., Tournois H.; de Wit D.; Vliegenthart J. F. Short-range structure in (partially) crystalline potato starch determined with attenuated total reflectance Fourier-transform IR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **1995**, *279*, 201-214.
78. Warren F. J.; Gidley M. J.; Flangan M. Infrared spectroscopy as a tool to characterize starch ordered structure- a joint FTIR-ATR, NMR, XRD and DSC study. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *139*, 35-42.
79. García R. J. A. Caracterización de biopelículas elaboradas a partir de almidón de plátano (*Musa paradisiaca* L) reforzadas con nanopartículas de celulosa obtenidas por molienda mecánica y ultrasonido. Tesis de maestría. Universidad del Papaloapan. 2017.
80. Canales C. J. A. Modelo continuo de flujos metabólicos y regulación génica: aplicaciones. Tesis de licenciatura. Universidad de Chile. 2014.
81. 77. Monod J. Recherches sur la criissance des cultures bacteriennes. Hermann Ed. Paris 1941.

