



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Modificación de sustratos orgánicos por molienda mecánica  
para la obtención de biomasa de una cepa productora de biohidrógeno

T E S I S

Para obtener el grado de:

Maestra en Biotecnología

Presenta:

Valeria Martínez López

Director de tesis

Dra. Ana Karin Navarro Martinez

Co-director de tesis

Dr. Erick Adrián Juárez Arellano

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México

2018



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2018/MB/0105
ASUNTO	Revisión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., a 11 de octubre de 2018

**C. VALERIA MARTÍNEZ LÓPEZ**  
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA  
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.

Dra. Ana Karin Navarro Martínez	UNPA	Presidente
Dra. María de Jesús García Gómez	UNPA	Vocal
Dr. Alejandro Aparicio Saguilán	UNPA	Secretario
Dra. Nelda Xanath Martínez Galero	UNPA	1er Suplente
Dra. Alma Xóchitl Ávila Alejandré	UNPA	2º Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

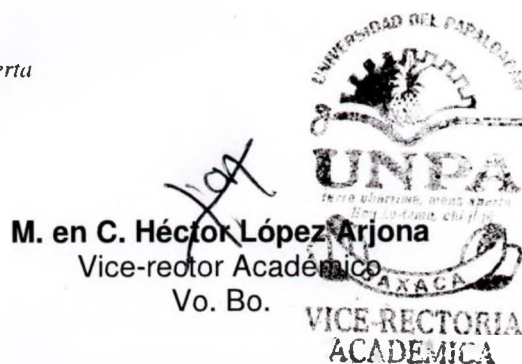
Atentamente

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



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

C.c.p. Dr. Ana Karin Navarro Martínez – Director de tesis.  
C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa de Servicios Escolares.  
C.c.p. Archivo



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

**VICE-RECTORIA  
ACADEMICA**

**CAMPUS TUXTEPEC**  
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.  
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.  
Tel. 01(287)8759240

[www.unpa.edu.mx](http://www.unpa.edu.mx)

**CAMPUS LOMA BONITA**  
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.  
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.  
Tel. 01(281)8729230



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2018/086
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

*San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 11 de octubre 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 Maestro(a) en Biotecnología de **C. Valeria Martínez López**, matrícula 14140017, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Modificación de sustratos orgánicos por molienda mecánica para la obtención de biomasa de una cepa productora de biohidrógeno**" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

De antemano agradezco su atención, sin más que agregar, quedo a sus órdenes.

Atentamente

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

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



C.c.p. C. Valeria Martínez López  
C.c.p. Archivo

---

### CAMPUS TUXTEPEC

C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.  
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.  
Tel. 01(287)8759240

[www.unpa.cdu.mx](http://www.unpa.cdu.mx)

### CAMPUS LOMA BONITA

Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.  
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.  
Tel. 01(281)8729230

El presente trabajo fue desarrollado bajo la dirección de la Dra. Ana Karin Navarro Martinez y la co- dirección del Dr. Erick Adrián Juárez Arellano en los laboratorios de Fisicoquímica, Bioprocesos, Químico- Biológico, Taller de Alimentos y LINAN-Tuxtepec (LN-2015-01-252013, INFRA- 2015-01-252013 Y LN- 2016-271911) en la Universidad del Papaloapan, *campus* Tuxtepec.

Se agradece a Conacyt por la beca otorgada (CVU: 724472). A los fondos otorgados por Conacyt (PN-2015-01-1847).

## AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, quiero agradecer a mis padres Guadalupe y Edmundo por apoyarme en cada una de mis decisiones, valoro tanto el esfuerzo que hasta el día de hoy han hecho por verme cumplir mis propósitos. A mi hermano Edmundo porque a pesar de ser menor he aprendido bastante de él.

A mi tía Estela, por ser como una segunda madre y por enorgullecerse con mis logros.

A mi abuelita Victoria, porque sé que estarías muy orgullosa y por el recuerdo de tu fortaleza durante esos días complicados (cada que veo tu foto en mi cartera, sonrío).

A ti Yureli, la persona que durante este tiempo de formación ha estado a mi lado diciendo ¡vamos tu puedes amor!, gracias por acompañarme en esas noches de trabajo y hacerme sentir que las cosas pueden ser menos difíciles con un poquito de paciencia y dedicación.

A mi directora y co- director de tesis Dra. Karin y Dr. Erick, por el tiempo dedicado y sobre todo la paciencia. A mis compañeros, Lizzette, Alfredo, Michell, por todos esos días que compartimos actividades en el laboratorio.

A mis sinodales, Dr. Alejandro, Dra. María de Jesús, Dra. Nelda, Dra. Xóchil, por sus observaciones y aportaciones.

Y a todas las personas que han formado parte de mi vida y que de una u otra forma han sido clave para llegar hasta donde el día de hoy me he propuesto.

## DEDICATORIA

*A mis padres, a quienes amo profundamente.*

*No es grande el que siempre triunfa, sino el que jamás se desalienta*

*(José Luis Martín Descalzo)*

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>1. Introducción</b>	<b>3</b>
<b>2. Marco teórico</b>	<b>5</b>
2.1. Generalidades de medios de cultivo	5
2.2. Fermentación	6
2.3. Producción de hidrógeno en <i>Escherichia coli</i>	8
2.4. Naturaleza y composición bioquímica de las materias primas	9
2.5. La yuca como materia prima	10
2.5.1. Almidón	13
2.6. El betabel como materia prima	14
2.7. Pretratamiento para la materia prima	16
2.8. Molienda mecánica de alta energía	16
2.9. Uso de molienda mecánica y su efecto en almidones	17
<b>3. Justificación</b>	<b>19</b>
<b>4. Hipótesis</b>	<b>20</b>
<b>5. Objetivos</b>	<b>21</b>
<b>6. Materiales y métodos</b>	<b>22</b>
6.1. Preparación de la materia orgánica	22
6.2. Molienda mecánica de alta energía	22
6.3. Caracterización morfológica y estructural de los sustratos	23
6.3.1. Análisis termogravimétrico y análisis térmico diferencial	24
6.3.2. Calorimetría diferencial de barrido	24
6.3.3. Difracción de rayos X	25
6.3.4. Espectrometría infraroja	25
6.4. Prueba de solubilidad y poder de hinchamiento	25
6.5. Determinación de azúcares reductores mediante la técnica de ácido 3,5 dinitrosalicílico	27
6.6. Fermentaciones con <i>Escherichia coli</i>	27
6.6.1. Obtención del inóculo	28
6.6.2. Sistemas de microcosmos para fermentación	28
6.6.3. Cuantificación de la biomasa	30
6.6.4. Análisis estadístico	30

<b>7. Resultados</b>	<b>31</b>
7.1. Preparación de la materia orgánica	31
7.2. Molienda mecánica de alta energía	31
7.3. Caracterización fisicoquímica de los sustratos	33
7.3.1. Análisis térmogravimétrico y análisis térmico diferencial	33
7.3.2. Calorimetría diferencial de barrido	40
7.3.3. Difracción de rayos X	43
7.3.4. Espectrometría infrarroja	45
7.4. Prueba de solubilidad y poder de hinchamiento	48
7.5. Determinación de azúcares reductores mediante la técnica de ácido 3,5 dinitrosalicílico	52
7.6. Obtención del inóculo	54
7.7. Fermentaciones con <i>E. coli</i>	56
7.7.1. Fermentación control con dextrosa como fuente de carbono	56
7.7.2. Fermentación en medio mineral con betabel como fuente de carbono	57
7.7.3. Fermentación en medio mineral con yuca como fuente de carbono	58
7.7.4. Rendimiento de biomasa con respecto a sustrato	59
<b>8. Conclusiones</b>	<b>62</b>
<b>9. Perspectivas</b>	<b>63</b>
<b>10. Bibliografía</b>	<b>64</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ruta metabólica de <i>E. coli</i> _____	9
<b>Figura 2.</b> Segmentos de una molécula de amilosa _____	13
<b>Figura 3.</b> Segmento de una molécula de amilopectina _____	14
<b>Figura 4.</b> Secado de la materia prima _____	22
<b>Figura 5.</b> Molino microplanetario de bolas Pulverisette 7 premium line marca Fritsch _____	23
<b>Figura 6.</b> Muestras de la molienda de betabel _____	32
<b>Figura 7.</b> Muestras de la molienda de yuca _____	33
<b>Figura 8.</b> Termograma de las muestras de cáscara, pulpa y de molienda de betabel _____	34
<b>Figura 9.</b> Derivadas de la curva del análisis termogravimétrico de las muestras de cáscara, pulpa y molienda de betabel _____	35
<b>Figura 10.</b> Curvas del análisis térmico diferencial de las muestras de cáscara, pulpa y de molienda de betabel _____	35
<b>Figura 11.</b> Termograma de las muestras de cáscara, pulpa y de molienda de yuca _____	36
<b>Figura 12.</b> Derivadas del análisis termogravimétrico de las muestras de cáscara, pulpa y molienda de yuca _____	37
<b>Figura 13.</b> Curvas del análisis térmico diferencial de las muestras de cáscara, pulpa y de molienda de yuca _____	37
<b>Figura 14.</b> Termograma de los estándares de referencia _____	38
<b>Figura 15.</b> Derivadas del análisis termogravimétrico de los estándares de referencia _____	39
<b>Figura 16.</b> Curvas del análisis térmico diferencial de los estándares de referencia _____	39
<b>Figura 17.</b> Termograma de las muestras de betabel _____	40
<b>Figura 18.</b> Termograma de las muestras de yuca _____	41
<b>Figura 19.</b> Termograma de los estándares de referencia _____	42
<b>Figura 20.</b> Difractograma de las muestras de molienda de betabel y estándares de referencia _____	44
<b>Figura 21.</b> Difractograma de las muestras de molienda de yuca y estándares de referencia _____	45
<b>Figura 22.</b> Espectros infrarrojo de las muestras de molienda de betabel y estándares de referencia _____	46
<b>Figura 23.</b> Espectro infrarrojo de la muestra de betabel con 40 min de molienda _____	47
<b>Figura 24.</b> Espectros infrarrojo de las muestras de molienda de yuca y estándares de referencia _____	47
<b>Figura 25.</b> Espectro infrarrojo de la muestra de yuca con 40 min de molienda _____	48
<b>Figura 26.</b> Solubilidad de las muestras de betabel _____	50
<b>Figura 27.</b> Solubilidad de las muestras de yuca _____	50
<b>Figura 28.</b> Poder de hinchamiento de las muestras de betabel _____	51
<b>Figura 29.</b> Poder de hinchamiento de las muestras de yuca _____	51
<b>Figura 30.</b> Curva patrón de glucosa _____	52
<b>Figura 31.</b> Concentración de azúcares reductores en las muestras de betabel _____	53
<b>Figura 32.</b> Concentración de azúcares reductores en las muestras de yuca _____	54

<b>Figura 33.</b> Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> en medio LB usando técnicas de turbidimetría y cuenta en placa (UFC/ml) _____	55
<b>Figura 34.</b> Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> usando dextrosa como fuente de carbono en medio mineral _____	56
<b>Figura 35.</b> Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> usando betabel con y sin molienda como fuente de carbono en medio mineral _____	57
<b>Figura 36.</b> Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> usando yuca con y sin molienda como fuente de carbono en medio mineral _____	58
<b>Figura 37.</b> Rendimiento de producción de biomasa usando dextrosa, betabel y yuca como fuentes de carbono ____	60

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Composición química de la yuca _____	12
<b>Tabla 2.</b> Composición química del betabel _____	15
<b>Tabla 3.</b> Composición del medio mineral _____	29
<b>Tabla 4.</b> Sustratos orgánicos no convencionales como fuente de carbono para el crecimiento de <i>E. coli</i> _____	29
<b>Tabla 5.</b> Características macroscópicas de las muestras de betabel después de la molienda _____	31
<b>Tabla 6.</b> Características macroscópicas de las muestras de yuca después de la molienda _____	32
<b>Tabla 7.</b> Intervalos de temperatura observados en las curvas termogravimétricas de los estándares _____	38
<b>Tabla 8.</b> Caracterización de la temperatura de fusión y temperatura de degradación térmica de los estándares de referencia _____	38

## RESUMEN

En las industrias que utilizan fermentaciones se requieren sustratos orgánicos abundantes con altas concentraciones de carbohidratos y proteínas, de baja demanda y bajos costos. Para la generación de los azúcares reductores, necesarios en los procesos fermentativos a partir de sustratos orgánicos, es indispensable someter a diversos pretratamientos los sustratos; por ejemplo, la hidrólisis ácida o enzimática. Sin embargo, es necesaria la búsqueda permanente de alternativas en los métodos de pretratamiento que permitan minimizar tiempos y costos. En este trabajo se propone el uso de la molienda mecánica de alta energía como un pretratamiento alternativo al proceso de hidrólisis para la generación de azúcares reductores a partir de sustratos orgánicos de baja demanda como son betabel (*Beta vulgaris ssp. vulgaris*) y la yuca (*Manihot esculenta*). Lo anterior se basó en la hipótesis de que la molienda mecánica genera cambios fisicoquímicos en la estructura de los sustratos orgánicos modificando el contenido de azúcares reductores. Los sustratos tratados fueron caracterizados fisicoquímicamente mediante las técnicas de análisis termogravimétrico, análisis térmico diferencial, calorimetría diferencial de barrido, difracción de rayos X, espectrometría infrarroja, solubilidad, poder de hinchamiento y se determinó la concentración de azúcares reductores mediante la técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Con los sustratos con mayor cantidad de azúcares reductores se realizaron cinéticas de crecimiento de *E. coli*, en botellas serológicas con medio mineral. Los resultados obtenidos demuestran que la molienda mecánica de alta energía genera cambios en las propiedades fisicoquímicas de los sustratos estudiados, generando cambios en la cristalinidad, solubilidad y concentración de azúcares reductores de las muestras de betabel y yuca a los diferentes tiempos de molienda. Se observó que dichos sustratos favorecen la producción de biomasa de *E. coli* mostrando un rendimiento mayor al compararlo con el control de 10 g/L de dextrosa en medio mineral. Lo que hace a la yuca y al betabel pretratados con molienda mecánica de alta energía, buenos candidatos para la producción de biohidrógeno.

## ABSTRACT

In the industries that use fermentative processes, the use of abundant organic substrates with high concentrations of carbohydrates and proteins, low demand and low costs are required. For the generation of reducing sugars, necessary in fermentative processes, it is essential to pretreat the substrates in order to release the reducing sugar; for example, acid or enzymatic hydrolysis. However, a permanent search for new pretreatment methods that minimize time and costs is necessary. In this study, the use of high energy ball milling as an alternative pretreatment to the hydrolysis process for the generation of reducing sugars from low demand organic substrates such as beet (*Beta vulgaris* ssp.) and cassava (*Manihot esculenta*) is proposed. This study is based on the hypothesis that high energy ball milling generates physicochemical changes in the structure of organic substrates by modifying the content of reducing sugars. The treated substrates were characterized physicochemically by thermogravimetric analysis, differential thermal analysis, differential scanning calorimetry, X-ray diffraction, infrared spectrometry, solubility and swelling power. The concentration of reducing sugars was determined by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) technique. The substrates with the highest amount of reducing sugars were used as carbon source in the kinetics of *E. coli* growth in serological bottles with mineral medium. The results have shown that high energy ball milling generate changes in the physicochemical properties of the studied substrates, producing changes in the crystallinity, solubility and concentration of reducing sugars of beet and cassava samples at different milling times. It was observed that these substrates favor the production of *E. coli* biomass showing a higher yield compared to the control of 10 g / L of dextrose in mineral medium. Cassava and beet, pretreated with high energy ball milling are good candidates for biohydrogen production.

## 1. INTRODUCCIÓN

El sector energético es uno de los campos en los que se requiere desarrollar sistemas eficientes de nuevas fuentes energéticas efectuando cambios y mejoras reduciendo los tiempos de producción y costos, (Amador, 2008). Dentro de estos sistemas están los biocombustibles, producidos directa o indirectamente a partir de carbohidratos provenientes de biomasa, particularmente productos ricos en almidón, celulosa, sacarosa o glucosa (Somerville, 2007). Sin embargo, para que los biocombustibles sean considerados como una alternativa energética es necesario que estos productos tengan un equilibrio energético positivo y un costo redituable (Hernández *et al.*, 2008).

Existen diferentes fuentes de energía con las cuales se puede cubrir la demanda energética mundial. Sin embargo, no todas son fuentes renovables ni sustentables para las necesidades que se presentan en la actualidad (Dincer, 2000).

Algunos de los combustibles no convencionales explorados son: la gasolina sintética, el gas natural, el metano, el metanol, el etanol y el hidrógeno (Dincer, 2000). Algunas de estas fuentes de energía presentan ciertas restricciones para su utilización (Wünschiers *et al.*, 2002). Sin embargo, actualmente se están realizando trabajos para mejorar el almacenamiento y transporte del H<sub>2</sub> (Martinelli *et al.* 2018), otra parte de la investigación de H<sub>2</sub> es su producción a bajo costo. El interés por la producción de H<sub>2</sub> es debido a su alto contenido energético 120 MJ/kg (33kWh/kg) que es mayor comparado con el de la gasolina 44.4 MJ/kg (12.4 kWh/kg). Además, es un gas no tóxico y ligero. La elección de la mejor fuente de energía estará basada en su seguridad, versatilidad, facilidad de transporte, almacenamiento y costo de producción (Newell, 2008).

En términos de reducir los gastos de producción en combustibles como hidrógeno, metano o etanol generados por procesos fermentativos se buscan fuentes de carbono provenientes de sustratos no convencionales más económicos, como son los

subproductos, desechos de los procesos o productos de baja demanda. Por ejemplo, la melaza de caña o remolacha, el bagazo de caña, aceites comerciales, etc., (Hernández, 2008). Los materiales lignocelulósicos y los almidones se han propuesto como materia prima abundante y renovable en la producción de biocombustibles (Dien *et al.*, 2001). Sin embargo, resulta necesario el desarrollo de pretratamientos para maximizar el aprovechamiento de estas fuentes de carbono, transformándolas a compuestos fermentables de fácil disponibilidad (Stanbury *et al.*, 2003). La hidrólisis química es uno de los procesos más utilizados en los últimos años. Sin embargo, este proceso tiene desventajas como son los tiempos largos y alto gasto energético utilizados, además de los desechos generados (Flores-Farías, 2004).

En respuesta a la necesidad de alternativas que permitan minimizar tiempo y costos en la generación de azúcares reductores se propone a la molienda mecánica de alta energía como procedimiento alternativo al proceso de hidrólisis; además se propone el uso de sustratos orgánicos de baja demanda como son betabel (*Beta vulgaris ssp. vulgaris*) y yuca (*Manihot esculenta*).

## 2. MARCO TEÓRICO

En la actualidad, se está trabajando en la transformación de sustratos orgánicos por fermentación para la producción de biocombustibles como el metano, etanol y biohidrógeno. Con el objetivo de reducir los costos de producción se busca de manera continua la formulación de nuevos medios de cultivo de alta disponibilidad y baja demanda, así como la búsqueda de nuevos pretratamientos de los sustratos más económicos, que no contaminen y generen azúcares simples (p. ej., glucosa) para su uso como fuente de carbono (Hernández *et al.*, 2008).

### 2.1. Generalidades de los medios de cultivo

Son una mezcla equilibrada de nutrientes (fuente de carbono, nitrógeno, azufre y factores de crecimiento) que en concentraciones adecuadas y condiciones físicas óptimas permiten un buen crecimiento de los microorganismos (Camacho, 2005). En estas mezclas se deben encontrar presentes macronutrientes, vitaminas y suplementos o los denominados factores de crecimiento. Se trata de un medio de cultivo definido cuando se encuentra establecida la composición química y las concentraciones de los sustratos. Pero cuando el medio está constituido por una gran variedad de componentes se le denomina medio complejo (Schlegel, 1997). Camacho (2005) señala que los medios pueden ser definidos o complejos en función de que se conozca o no la composición química de los nutrientes que los componen.

Los medios de cultivo también pueden clasificarse dependiendo de distintos factores como el tipo de microorganismo, los requerimientos nutricionales, las interacciones de cada componente en el medio, las condiciones ambientales (temperatura, humedad y atmósfera) o la presencia de factores tóxicos que puedan inhibir el crecimiento bacteriano. Los medios selectivos sólo permiten el crecimiento de un grupo de microorganismos inhibiendo el desarrollo de los demás. Los medios diferenciales son

medios que permiten revelar características fisiológicas de los microorganismos. Los medios enriquecidos son medios que tienen un exceso de nutrientes y que se utilizan para microorganismos que tienen grandes exigencias nutricionales (Camacho, 2005).

Las principales fuentes de carbono para los organismos vivos son los carbohidratos. La fuente natural de carbohidratos más abundante para los microorganismos lo constituye la biomasa vegetal. Las plantas producen una gran cantidad de polisacáridos, los cuales sirven como sustratos a los hongos y bacterias del suelo. (Stülken y Hillen, 2000; Rodionov *et al.*, 2001). En el laboratorio, los carbohidratos comúnmente utilizados para el crecimiento bacteriano son la glucosa, sacarosa, fructosa, maltosa, lactosa, entre otras fuentes de carbono (Stanier, 1992; Hernández-Montalvo, 2001; Steinmetz, 1993.).

Para las fermentaciones industriales se utilizan medios de cultivo complejos, los cuales son formulados con productos de desecho de diversas industrias para así optimizar y reducir costos de producción (Ferrer, 2014). Por ejemplo, la melaza es un subproducto de bajo costo en el proceso de extracción de azúcar. Nutricionalmente la melaza tiene un alto contenido de azúcares, como la sacarosa que se encuentra presente entre un 40 y 50% del peso total. Además, posee otros componentes como minerales, tiamina, ácido fólico y biotina, que se pueden utilizar como fuente de carbono para microorganismos con metabolismo fermentativo (Shuler y Kargi, 2002).

## 2.2. Fermentación

La fermentación es un proceso donde carbohidratos o compuestos relacionados son oxidados durante el metabolismo de microorganismos para producir energía, esto puede suceder en condiciones anaeróbicas o parcialmente anaeróbicas (Hernández-Rojas, 2012).

La disponibilidad de nutrientes, oxígeno, el pH, la temperatura y la humedad, son los requerimientos más importantes para el crecimiento de los microorganismos (Junco,

2001). Las fluctuaciones entre estos traen consigo cambios en el metabolismo celular del microorganismo, tales como ajustes en las rutas metabólicas y en las velocidades de utilización de las fuentes de carbono, en el flujo de electrones para el mantenimiento del balance redox, en los mecanismos para la producción de energía y en ciertas reacciones biosintéticas (Nakano y Zuber, 1998).

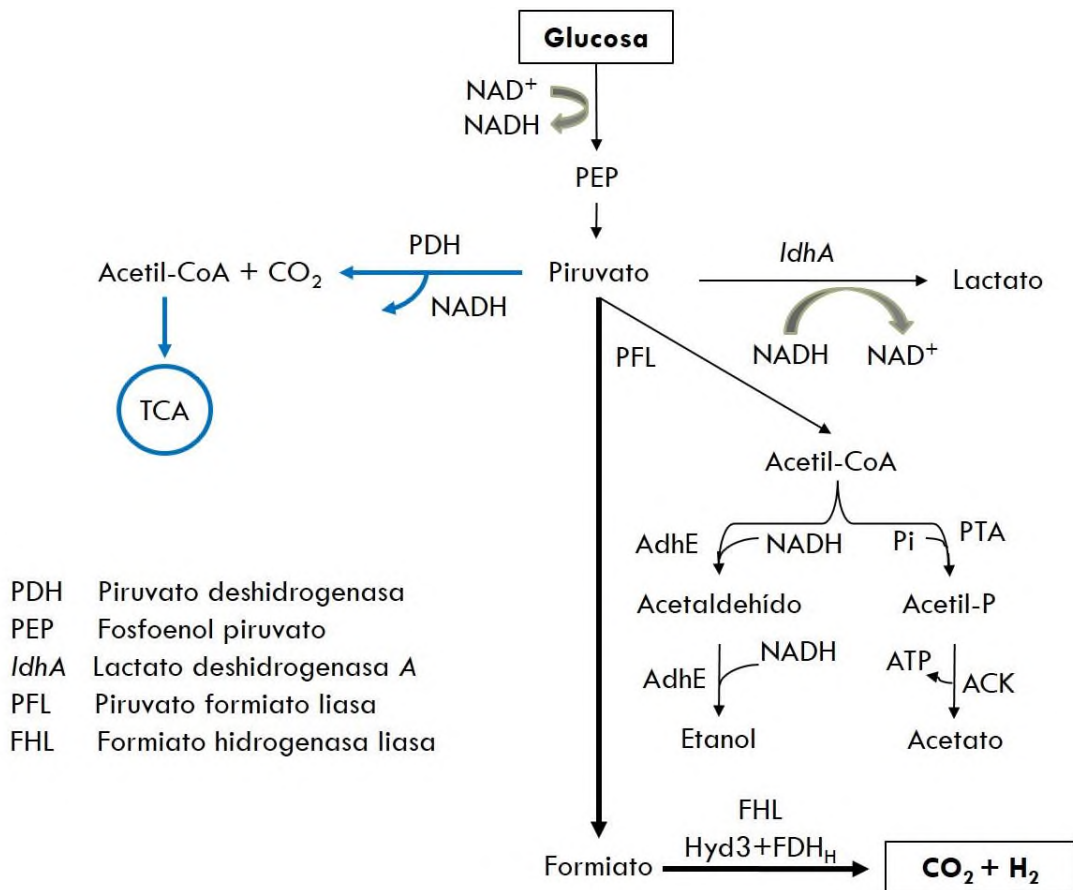
El principal cambio en el metabolismo ocurrido debido a la presencia o ausencia de oxígeno, está dado a nivel de la glucólisis, fundamentalmente en el destino de los dos productos de esta vía: el piruvato y el NADH. La glucólisis juega un papel clave dentro del metabolismo energético de los microorganismos. Sin embargo, con esta vía solo se puede aprovechar una pequeña fracción de la energía, 2 moléculas de ATP por cada molécula oxidada de glucosa, ya que la mayor parte de la energía permanece almacenada en forma de piruvato y  $\text{NADH} + \text{H}^+$ . Éste último debe ser continuamente regenerado para el mantenimiento del flujo glucolítico. En presencia de oxígeno, el  $\text{NADH} + \text{H}^+$  es reoxidado por medio de la cadena respiratoria con la formación de una fuerza protón motriz la cual permite generar ATP. Por otro lado, el piruvato es convertido a  $\text{CO}_2$  y acetil CoA, éste último es subsecuentemente oxidado a dióxido de carbono, generando ATP, GTP y poder reductor ( $\text{NADH} + \text{H}^+$  y  $\text{FADH} + \text{H}^+$ ) mediante el ciclo de Krebs. En ausencia de un aceptor de electrones, por ejemplo, el oxígeno (en respiración aerobia) o nitratos (en respiración anaerobia), el  $\text{NADH} + \text{H}^+$  es regenerado por fermentación mediante la conversión del piruvato en varios productos finales (ácidos orgánicos y disolventes como el etanol) mientras que el ATP es generado a nivel de fosforilación de sustrato. Los productos finales generados a partir del piruvato son específicos para cada microorganismo, característicos de cada género y especie, de las condiciones del cultivo y de la fase de crecimiento (Böck y Sawers, 1996).

### 2.3. Generalidades de *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo, no esporulante, con un tamaño aproximado de  $1 \times 2 \mu\text{m}$  (Madigan *et al.*, 2009). Anaerobio facultativo perteneciente a la familia de las enterobacterias, en condiciones anaeróbicas presenta una fermentación mixta de ácidos orgánicos a partir del metabolismo de glucosa con la formación de etanol, succinato, D-lactato, acetato, ácido fórmico, hidrógeno y dióxido de carbono como productos finales (Chang *et al.*, 1999, Cruz Ramos *et al.*, 2000).

La producción de hidrógeno por medio de *E. coli* es de las más estudiadas dado que sus rutas metabólicas y su secuencia genómica son conocidas. La figura 1 muestra la ruta metabólica de producción de hidrógeno por *E. coli* a partir de glucosa (Sawers, 2005). Bajo condiciones anaerobias, una fracción de piruvato puede ser transformado a lactato por la lactato deshidrogenasa (LDH), pero la mayoría de éste es hidrolizado por la piruvato formiato liasa (PFL) en acetil-CoA y formiato. El acetil-CoA es parcialmente convertido en etanol y acetato. El formiato es el donador de electrones en el metabolismo anaerobio para la reducción de nitrato o puede ser transformado en hidrógeno por el complejo formiato-hidrógeno liasa (FHL) (Dávila-Vázquez *et al.*, 2007). Esto ocurre para mantener el pH de la fermentación y para disminuir la concentración de formiato en la célula (Mathews y Wang, 2009). El complejo multienzimático FHL es el responsable de la producción molecular de hidrógeno a partir de formiato bajo condiciones anaerobias y en ausencia de aceptores de electrones como el oxígeno y el nitrato (Vardar-Schara y Wood, 2007).

Los microorganismos anaerobios facultativos generalmente tienen un rendimiento teórico máximo de 2 mol de hidrógeno por mol de glucosa dado, porque 2 moléculas de formiato son producidas a partir de 2 moléculas de piruvato. Existen factores que pueden influenciar este rendimiento, entre ellos está que cierta cantidad de piruvato se convierta a lactato (Vardar-Schara y Wood, 2007).



**Figura 1.** Ruta metabólica de *E. coli* (Sawers, 2005). Las flechas en color azul indican la presencia de oxígeno.

## 2.4. Naturaleza y composición bioquímica de las materias primas

Los sustratos que se pueden utilizar en la fermentación para la producción de hidrógeno pueden ser de origen vegetal, animal, agroindustrial, forestal, doméstico u otros. Las características bioquímicas, en cuanto a su composición, que presenten estos residuos deben permitir el desarrollo y la actividad microbiana del sistema anaeróbico. Además de las fuentes de carbono y nitrógeno también se requiere de un cierto equilibrio de sales minerales.

Las fuentes de carbono y energía más importantes en los procesos de producción de hidrógeno son sustratos renovables que contienen azúcar, almidón y en menor

proporción grasas y aceites (Ward, 1991). Se han explorado cultivos amiláceos con alto contenido de almidón, tales como los cereales (maíz, sorgo granífero, trigo, cebada, entre otros), las raíces y tubérculos (mandioca, papa, batata, entre otros), y la inulina (topinambur, agave, ñame, entre otros). Así como cultivos lignocelulósicos (madera, residuos agrícolas y forestales, material herbáceo, entre otros), cuyos carbohidratos se encuentran en formas más complejas. Además, se han explorado sustratos con alto contenido de sacarosa, como la caña de azúcar, la remolacha azucarera, el sorgo dulce y las melazas, entre otros (Ascher, 2010).

## 2.5. La yuca como materia prima

El nombre científico de la yuca es *Manihot esculenta*, la raíz de la yuca es cilíndrica y oblonga, alcanza el metro de largo y los 10 cm de diámetro. La planta de yuca tiene tamaño y forma variables de acuerdo al tipo de ramificación. En la mayoría de las plantas propagadas vegetativamente el tronco se divide en dos o tres ramas, las que a su vez se dividen en otras tantas (Aristizábal *et al.*, 2007). Su clasificación científica es:

Reino:        Plantae  
División:    Magnoliophyta  
Clase:        Magnoliopsida  
Orden:        Euphorbiales  
Familia:     Euphorbiaceae  
Género:      *Manihot*  
Especie:     *esculenta*

Tomado de: Aristizábal *et al.*, 2007

La planta de yuca crece en una variada gama de condiciones tropicales: en los trópicos húmedos y cálidos de tierras bajas, en los trópicos de altitud media y en los subtrópicos con inviernos fríos y lluvias de verano. Aunque la yuca prospera en suelos fértiles, su ventaja comparativa con otros cultivos más rentables es su capacidad para crecer en

suelos ácidos, de escasa fertilidad, con precipitaciones esporádicas o largos periodos de sequía. Sin embargo, no tolera encharcamientos, ni condiciones salinas del suelo (Alban, 2004).

Es un cultivo de amplia adaptación ya que se siembra desde el nivel del mar hasta los 1800 msnm, a temperaturas comprendidas entre 20 y 30°C con una óptima de 24 °C, una humedad relativa entre 50 y 90% con una óptima de 72% y una precipitación anual entre 600 y 3000 mm con una óptima de 1500 mm. Su ciclo de crecimiento desde la siembra a la cosecha, depende de las condiciones ambientales: es más corto de 7 a 12 meses en áreas más cálidas y es más largo de 12 meses o más, en regiones con alturas de 1300 a 1800 msnm (Aristizábal *et al.*, 2007).

La cáscara de la yuca es dura y leñosa, no es comestible. La pulpa es firme, surcada por fibras longitudinales rígidas ricas en carbohidratos, y se oxida una vez desprovista de la corteza. Según la variedad, la yuca puede ser blanca o amarillenta (Cock, 1989).

En el corte transversal de la raíz adulta de yuca se aprecian dos partes bien definidas que son la corteza y el núcleo. La corteza posee 2 capas: una exterior, que es delgada y se encuentra constituida de tejido suberoso, y una capa interior de mayor espesor, que es fibrosa y posee gránulos de almidón. El núcleo es menos fibroso que la corteza y es rico en almidón; los gránulos de almidón del núcleo son de mayor tamaño que los del almidón de la corteza. Las raíces de yuca son ricas en calorías, pero son deficientes en proteínas, grasa, minerales y vitaminas (Aristizábal *et al.*, 2007).

**Tabla 1.** Análisis proximal de la yuca (Buitrago, 1990).

Componentes	Contenido (%)			
	En corteza		En pulpa	
	Base húmeda	Base seca	Base húmeda	Base seca
Materia seca	28	100	41	100
Proteína	1.5	5.4	1	2.4
Grasa	0.6	2.1	0.4	1
Carbohidratos	21.7	77.5	37.5	91
Fibra	2.5	9	1.1	2.7
Cenizas	1.7	6.1	1.2	2.9

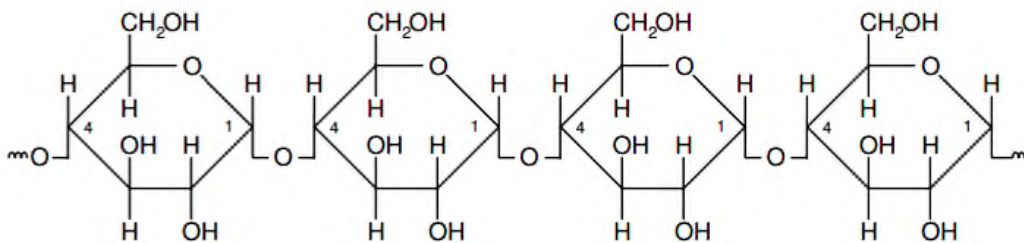
Las características mencionadas en la tabla 1 pueden variar según la variedad y algunos factores edafoclimáticos, como edad del cultivo, tipo de suelo, fertilización y época de cosecha (Ceballos, 2002).

La yuca se cataloga dentro del grupo de plantas de interés económico referente a raíces y tubérculos como una de las más importante, tiene su principal valor económico en su órgano de reserva o almacenamiento de energía, las raíces. Su uso se dirige a diferentes mercados: como raíz fresca y procesada para consumo humano, como insumo en la industria alimenticia procesada para producir harina, como materia prima en la industria productora de alimentos balanceados para animales y como producto intermedio en la industria no alimenticia para la producción de almidón usada en la industria textil y para la fabricación de papeles y adhesivos (Suárez y Mederos, 2011).

La producción nacional de yuca reportada por el Servicio de Información, Agroalimentaria y Pesquera ("Anuario Estadístico de la Producción Agrícola," 2004) fue de 18,928.80 toneladas con una superficie cosechada de 1,335.90 Has.

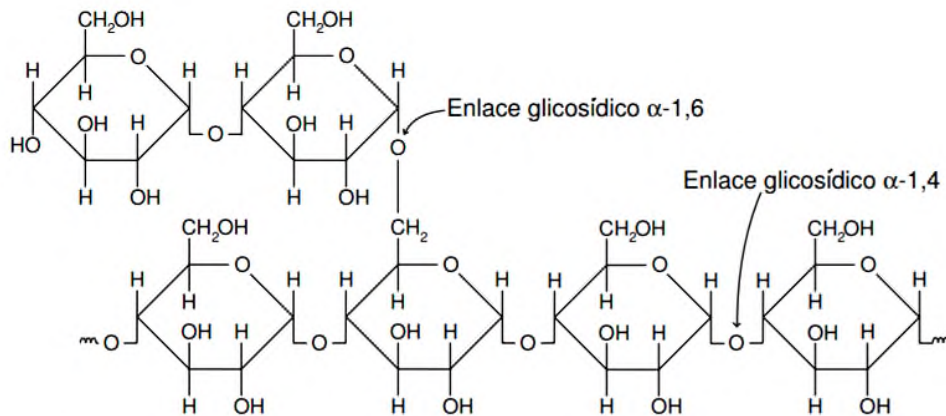
### 2.5.1. Almidón

Los granos de almidón están formados por macromoléculas organizadas en capas que contienen dos estructuras poliméricas diferentes: la amilosa y la amilopectina. Cerca del 20% de la mayoría de los almidones es amilosa y el 80 % es amilopectina. Las moléculas de amilosa, situadas en las capas interiores, están compuestas de aproximadamente 200 a 20,000 moléculas de glucosa unidas por enlaces glicosídicos  $\alpha$ -1,4 (figura 2) en cadenas no ramificadas o enrolladas en forma de hélice. Muchas moléculas de amilosa tienen algunas ramificaciones  $\alpha$ -D-(1,6), aproximadamente entre 0.3 a 0.5 % del total de los enlaces. Estas generalmente no son ni muy largas ni muy cortas y están separadas por grandes distancias permitiendo a las moléculas actuar esencialmente como un polímero lineal, formando películas, fibras fuertes y retrogradando fácilmente. La amilosa es soluble en agua caliente lo cual se debe a la formación de una suspensión coloidal (Oliva, 2003).



**Figura 2.** Segmentos de una molécula de amilosa (Oliva, 2003).

La semicristalinidad del almidón es debido a la amilopectina (figura 3). La parte amorfa está formada por regiones ramificadas de amilopectina y amilosa. Las propiedades comercialmente significativas del almidón, tales como su resistencia mecánica y flexibilidad, dependen de la resistencia y carácter de la región cristalina. La región cristalina depende de la relación de amilosa y amilopectina la cual varía según tipo de planta, de la distribución del peso molecular, del grado de ramificación y del proceso de conformación de cada componente del polímero (Oliva, 2003).



**Figura 3.** Segmento de una molécula de amilopectina (Oliva, 2003).

## 2.6. El betabel como materia prima

El betabel (*Beta vulgaris spp. vulgaris*) es una planta bianual que tiene un sistema de raíces muy profundo y ramificado. Presenta un mejor crecimiento en climas fríos y templados. Biggs *et al.* (1997) reportan un rango de 15-19 °C en el cual el betabel desarrolla mejor coloración y un contenido de azúcares más alto. Esta hortaliza puede tolerar heladas hasta por más de dos semanas, después de este periodo presenta deterioro fisiológico. A temperaturas mayores a la óptima el almacenamiento de nutrientes en las raíces es reducida y como consecuencia resultan raíces de menor tamaño, con pérdida de coloración además de textura y sabor desagradable (Biggs *et al.*, 1997).

La raíz es espesa, carnosa y pivotante, un corte transversal muestra bandas circulares alternas de tejidos almacenadores y conductores de nutrimentos (Guenko, 1983). Posee una forma fusiforme globosa, más o menos aplastado en los polos, con pulpa crujiente y carnosa, su color puede ser rojo o morado, debido al pigmento denominado betanina o betacianina que es un compuesto que posee nitrógeno (Mainardi, 1978).

## Clasificación científica:

Reino: Plantae  
División: Magnoliophyta  
Clase: Magnoliopsida  
Orden: Caryophyllales  
Familia: Chenopodiaceae  
Género: *Beta*  
Especie: *vulgaris*

(United States Department of Agriculture, 2005)

El betabel es una fuente de carbohidratos, proteínas y además posee en su composición vitaminas, minerales y micronutrientes (Nottingham, 2004). En la tabla 2 se proporciona su composición tomada con base en 100 g de pulpa.

**Tabla 2.** Análisis proximal del betabel (Tablas de Composición de Alimentos. Moreiras *et al.*, 2013).

Componentes	Contenido
Agua	89 %
Carbohidratos	6.4 %
Proteínas	1.3 %
Grasas	0.17 %
Fibra	2.8 %
Calcio	23 mg
Fósforo	31 mg
Sodio	84 mg
Potasio	300 mg
Hierro	0.8 mg
Magnesio	15 mg
Vitamina C	10 mg
Vitamina B <sub>6</sub>	0.05 mg
Tiamina	0.03 mg
Riboflavina	0.05 mg

## 2.7. Pretratamiento para la materia prima

La producción de biocombustibles requiere de la conversión de biomasa en azúcares fermentables (Ischizawa *et al.*, 2007). Los pretratamientos para producir esta transformación pueden ser físicos, químicos, biológicos, o una combinación de ellos. Un pretratamiento eficaz debe reunir ciertas características como: bajo costo, bajo consumo energético, utilización de reactivos fácilmente recuperables y debe ser fácilmente aplicable a diversos sustratos (Kumar *et al.*, 2009).

Dentro de los pretratamientos más empleados se encuentran la hidrólisis ácida y la hidrólisis enzimática. La hidrólisis ácida es un proceso químico que, mediante el empleo de catalizadores ácidos, transforma las cadenas de polisacáridos en monómeros elementales; sin embargo, produce efluentes químicamente agresivos. La hidrólisis enzimática es un proceso catalizado por un grupo de enzimas cuya acción conjunta produce la degradación de la biomasa. La hidrólisis enzimática requiere de una optimización para poder obtener la mejor combinación de enzimas específicas para cada materia prima y estas enzimas regularmente no pueden adaptarse rápidamente al sustrato de alimentación (Sun y Cheng, 2002).

## 2.8. Molienda mecánica de alta energía

La molienda mecánica de alta energía es un proceso que se realiza en molinos de bolas donde el polvo que se deposita reduce su tamaño de la partícula, cambia su forma o se crean procesos de mezcla y soldadura; obteniendo una microestructura fina y controlada. El proceso se basa en la relación que existe entre el tiempo de molienda y la reducción de tamaño de la partícula (Córdoba, 2007). Sin embargo, la molienda mecánica de alta energía también es usada para promover reacciones químicas (mecanosíntesis) (Juárez-Arellano, 2010). La mecano-síntesis es un proceso en el cual se induce una reacción química debido únicamente a la energía transmitida y generada por la acción de transferencia de energía mecánica (Balaz, 2005). Previamente se ha observado que la

energía transferida durante la molienda mecánica de alta energía (que puede promover reacciones químicas) aumenta los contenidos de azúcares reductores de los almidones (Urzúa, 2017). Como se obtiene con la hidrólisis ácida, lo que posiblemente se deba a la ruptura de los enlaces  $\alpha(1,4)$  y  $\alpha(1,6)$ .

Las variables que influyen en el proceso de molienda mecánica de alta energía son el tipo de molino, velocidad, tiempo, densidad del material de molienda, relación masa de las bolas/masa de la muestra, número y tamaño de bolas, volumen del tazón o densidad del material de molienda (Campos, 2011).

### **2.9. Uso de molienda mecánica y su efecto en almidones**

Las propiedades de los polisacáridos pueden ser cambiadas por modificación de sus estructuras, para eliminar características no deseadas y ampliar sus aplicaciones. En estudios previos se ha reportado el uso de la molienda mecánica para evaluar el efecto de ésta sobre los almidones de diferentes variedades vegetales. Huang *et al.* (2008) reporta que a mayor tiempo de molienda existe mayor solubilidad en agua fría, mayor transparencia de los almidones de yuca y maíz, así como cambios en las propiedades fisicoquímicas de gelatinización y cristalinidad. Diop *et al.* (2012) y He *et al.* (2014) realizaron estudios con el almidón de maíz y reportan un aumento en el contenido de amilosa y de solubilidad con un aumento en el tiempo de molienda. Loubes *et al.* (2014) realizó estudios empleando un molino de bolas planetario, teniendo como variables la velocidad (450, 550 y 650 rpm) y el tiempo de molienda (10, 15 y 20 minutos) reportando que con el aumento de la velocidad de molienda se tiene mayor absorción de agua y solubilidad en el almidón de arroz.

Urzúa (2017) reportó el efecto de la molienda mecánica en el contenido de azúcares reductores de diferentes sustratos (soya, harina de yuca y almidones de plátano, frijol y jinicuil) utilizando dos molinos planetarios de bolas (Pulverisette 7 premium line y PM 400/2). Para el molino Pulverisette 7 premium line marca Fritsch se mantuvo la velocidad

constante de 600 rpm y una muestra inicial de 5 g. Las variables fueron 15 bolas de 10 mm o 4 bolas de 20 mm de carburo de tungsteno (WC), nitruro de silicio ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) y hierro (Fe), con tiempos de molienda de 5, 10, 20 y 40 minutos. Para el molino PM 400/2 marca Retsch la velocidad se mantuvo constante a 400 rpm, con una muestra inicial de 5.5 g, se usó 9 bolas de 20 mm de hierro (Fe), con tiempos de molienda de 2, 5, 8, 10 y 20 minutos. Se reportó un aumento en la concentración de azúcares reductores y solubilidad respecto al tiempo de molienda. En soya la concentración de azúcares reductores se incrementó tras la molienda mecánica, observándose una variación en los resultados dependiendo del molino utilizado. Esta variación está directamente relacionada con las energías que cada molino libera. Con el almidón de jinicuil se obtuvieron mayores concentraciones de azúcares reductores después de tiempos cortos de molienda mecánica.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de sistemas eficientes de fuentes energéticas como son los biocombustibles son cada vez más necesarios en la actualidad. Por lo que se busca producir energía a un bajo costo y hacerlo de forma competitiva considerando los combustibles que se utilizan actualmente. El hidrógeno es una alternativa sustentable, que posee un alto rendimiento energético de 120 MJ/kg (33kWh/kg) comparado con la gasolina de 44.4 MJ/kg (12.4 kWh/kg), además es un gas no tóxico, ligero y que se puede producir mediante procesos fermentativos. Sin embargo, para que se lleve a cabo este proceso son necesarios azúcares reductores, pero en los sustratos complejos normalmente los carbohidratos son polisacáridos que no son fácilmente asimilables para todos los microorganismos, Para hacer disponibles los azúcares reductores es indispensable someter los sustratos a pretratamiento, lo que conlleva a la búsqueda constante de nuevos pretratamientos que permitan minimizar tiempos y costos.

En trabajos realizados previamente en el grupo de trabajo se han obtenido resultados favorables (aumentando el contenido de azúcares reductores desde 1.98 hasta 11.48 veces) con el uso de la molienda mecánica de alta energía para el pretratamiento de diferentes sustratos orgánicos. Este procedimiento puede generar cambios fisicoquímicos en el sustrato y el rompimiento de enlaces químicos que generan azúcares reductores. Lo anterior convierte a la molienda mecánica en un pretratamiento alternativo al proceso de hidrólisis para generar azúcares reductores a partir de sustratos orgánicos que sean de bajo consumo en la región.

## 4. HIPÓTESIS

Mediante la molienda mecánica de alta energía se modificarán las concentraciones de azúcares reductores y las propiedades fisicoquímicas de sustratos orgánicos de baja demanda.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Obtener sustratos orgánicos con alto contenido de azúcares reductores mediante molienda mecánica y reformular el medio mineral para el crecimiento de *E. coli*.

### 5.2. Objetivos particulares

- Modificar sustratos orgánicos por molienda mecánica de alta energía.
- Caracterizar fisicoquímicamente los sustratos y cuantificar su contenido de azúcares reductores.
- Modificar la formulación del medio mineral con los sustratos modificados como fuente de carbono para el crecimiento de *E. coli*.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Preparación de la materia orgánica

El secado de la materia prima se realizó de dos formas: secado al sol y en horno de secado. Para el secado al sol la materia prima se colocó en charolas elaboradas con malla sombra utilizadas en condiciones de temperatura ambiente durante los meses abril-junio dentro de las instalaciones de la Universidad del Papaloapan *campus* Tuxtepec. El secado de la yuca se realizó en un horno (marca Scorpion Scientific modelo A-52040) durante 6-8 horas a 60°C (figura 4). El betabel se secó al sol a temperatura ambiente (figura 4) y posteriormente se llevó al horno de secado durante 10 – 12 h a 60°C para eliminar el agua residual. Después de esto el material se conservó en bolsas herméticas en condiciones libres de humedad y a temperatura ambiente hasta su uso.



**Figura 4.** Secado de la materia prima.

### 6.2. Molienda mecánica de alta energía

Para pretratamiento de molienda mecánica de alta energía se utilizó un molino planetario de bolas (Pulverisette 7 premium line marca Fritsch) (figura 5). Se utilizaron 5 g de muestra en cada tazón, 15 bolas de Fe de 10 mm, con una velocidad fija de 600 rpm, a tiempos de 5, 10, 20, 30 y 40 minutos. La molienda se realizó en ciclos de 5 min de

molienda y 5 min de enfriamiento para evitar el calentamiento de los tazones y así evitar modificaciones del sustrato por sobrecalentamiento.



**Figura 5.** Molino microplanetario de bolas Pulverisette 7 premium line marca Fritsch.

### **6.3. Caracterización morfológica y estructural de los sustratos**

Las técnicas que se utilizaron para la caracterización fisicoquímica de los sustratos son: análisis termogravimétrico (TGA), análisis térmico diferencial (DTA), calorimetría diferencial de barrido (DSC), difracción de rayos X (DRX) y espectrometría infrarroja (IR). Los sustratos caracterizados con estas técnicas fueron las muestras de betabel y yuca con y sin molienda y se usaron como estándares de referencia: fructosa comercial de Sigma, glucosa comercial marca Meyer, sacarosa comercial marca Meyer, celulosa comercial de Sigma y almidón de yuca donado por el grupo de trabajo del Dr. Alejandro Aparicio Saguilán.

### **6.3.1. Análisis termogravimétrico (TGA) y análisis térmico diferencial (DTA)**

Con la técnica del análisis termogravimétrico (TGA) se detecta el cambio de peso de la muestra al variar la temperatura a una velocidad constante. También puede medirse el gradiente de la variación del peso con la temperatura o el tiempo, constituyendo el análisis térmico diferencial (DTA) (Skoog y Leary, 2001).

En este trabajo los análisis TGA y DTA se realizaron empleando un analizador Perkin Elmer STA 6000. Las cantidades de muestra utilizadas para cada análisis fueron entre 10-20 mg. Los barridos dinámicos de calentamiento se efectuaron a 10 °C/min y el intervalo de temperatura de estudio fue de 30 °C a 700 °C, bajo un flujo de nitrógeno de 20 mL/min.

Para este trabajo, además del termograma de TGA se recurrió a la primera derivada del termograma (dTGA) para identificar mejor los cambios o transiciones.

### **6.3.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica térmica en la cual 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. Permite medir las transiciones térmicas de una sustancia en presencia de un material de referencia. Con esta técnica se pueden obtener temperaturas y entalpías de transición o de reacción (Mathot, 1994).

Al ocurrir una transición térmica (es decir un cambio físico que provoca una emisión o absorción de calor en la muestra) el equipo añade o retira energía térmica para mantener la misma temperatura. La energía transferida es exactamente igual a la energía absorbida o liberada en la transición (Mathot, 1994).

Las propiedades térmicas de las muestras con molienda y los estándares de referencia fueron evaluadas en un calorímetro de barrido diferencial (DSC, TA Instrument, modelo 2500) usando  $15 \pm 4$  mg de cada muestra para realizar la técnica. El equipo fue sometido a un programa de calentamiento de 30 a 400°C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Como referencia fue usada una charola de aluminio vacía.

### **6.3.3. Difracción de rayos X (DRX)**

La difracción de rayos X es una técnica que se utiliza para el estudio de la cristalinidad de los compuestos (Van Holde *et al.*, 2006). Para la realización de esta técnica se utilizó un difractómetro de rayos X de polvos (Bruker D8-Advance), que se operó a un voltaje de 40 kV y una corriente de 30 mA, con ánodo de Cu que produce una radiación con una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 1.54056 Å. Las mediciones se realizaron entre 5°– 55° en  $2\theta$ , con un barrido de 0.1° por 5 s.

### **6.3.4. Espectrometría infrarroja (IR)**

La espectrometría infrarroja es uno de los métodos utilizado mayormente para la identificación de grupos funcionales y de esa manera identificar cambios estructurales. La región infrarroja corresponde a frecuencias que se encuentran justo por debajo del espectro visible, en el intervalo de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$  (Skoog y Leary, 2001). Para esta técnica se utilizó un espectrómetro de infrarrojo con transformada de Fourier e interferómetro (Dynascan Perkin Elmer Spectrum 100). Los datos se expresan en números de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ). Los distintos espectros se realizaron en el infrarrojo medio, entre 4000 y 600  $\text{cm}^{-1}$ .

## **6.4. Prueba de solubilidad y poder de hinchamiento**

La prueba de solubilidad y poder de hinchamiento se basa en la insolubilidad del almidón en agua fría, únicamente puede incrementar el volumen de sus gránulos o hincharse. Los

grupos hidroxilo son abundantes en la molécula del almidón haciendo que absorba agua. Si el almidón es sometido a temperaturas elevadas en presencia de agua es posible el rompimiento de los puentes de hidrógeno de las zonas amorfas y el hinchamiento de los gránulos mediante absorción progresiva de agua hasta gelatinizar. Si se continúa calentando se destruyen los gránulos dando lugar a una dispersión coloidal viscosa de fragmentos de gránulos hinchados (Galliard y Bowler, 1987).

Se realizó la prueba de solubilidad y poder de hinchamiento a las muestras de molienda de yuca y betabel usando el método modificado de Schoch (1964) reportado por Sathe *et al.* (1981); para lo cual tubos, tapas y charolas de aluminio se mantuvieron en un horno de secado durante 12 horas a 90 °C para mantenerlos a peso constante, el material se manipuló en un desecador. Posteriormente en tubos de 50 ml se adicionaron 0.4 g de muestra y 40 mL de agua destilada. Se colocaron los tubos en vasos de precipitado y se rellenaron con agua para posteriormente llevarlos a la plancha de calentamiento con agitación. Constantemente se midió la temperatura en el agua de los vasos, fuera de los tubos. Los tubos se calentaron a 60, 70, 80 y 90 °C durante 30 min. Transcurrido ese tiempo los tubos se retiraron y se centrifugaron a 2,500 rpm durante 15 min. El sobrenadante se decantó y se pesaron los gránulos hinchados. Del sobrenadante se tomaron 10 mL y se colocaron en charolas de aluminio y se secaron en un horno de convección a 120 °C durante 4 horas. Finalmente, las muestras se colocaron en el desecador, se pesaron y se realizaron los cálculos correspondientes usando las ecuaciones 1 y 2.

$$\% \text{ Solubilidad} = \frac{\text{Peso del almidón soluble} \times 400}{\text{Peso de la muestra}} \quad \text{Ec. (1)}$$

$$\text{Poder de hinchamiento} = \frac{\text{Peso del sedimento} \times 100}{\text{Peso de la muestra} - (100 - \% \text{ de solubilidad})} \quad \text{Ec. (2)}$$

### **6.5. Determinación de azúcares reductores mediante la técnica de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS)**

El método determina la presencia del grupo carbonilo libre (C=O) de los llamados azúcares reductores. Esto implica la oxidación del grupo funcional aldehído presentes en la glucosa, al mismo tiempo el ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) se reduce a 3 amino, 5 ácido nitrosalicílico en condiciones alcalinas (Fajardo y Sarmiento, 2007).

Para la preparación del reactivo DNS se disolvieron 1.6 g de NaOH en agua destilada y se adicionaron 30 g de tartrato de sodio y potasio y 1 g del reactivo DNS, se aforó a 100 mL con agua destilada y se guardó en un frasco ámbar.

Se preparó una disolución añadiendo 0.1 g de las muestras a 10 mL de agua destilada, de esta solución se tomaron 0.5 mL y se añadieron 4.5 mL de agua destilada. Se adicionaron 1.5 mL del reactivo de DNS a 1 mL de la dilución de la muestra. Se calentó la mezcla durante 5 minutos, transcurrido el tiempo se llevó a enfriar en un baño de hielo para detener la reacción. Se adicionaron 7.5 mL de agua destilada, se agitó y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm. Se realizó una curva de calibración de glucosa en concentraciones de 0 a 1 g/L. Las mediciones para esta técnica se realizaron por triplicado, reportándose los resultados como concentración de azúcares reductores (g/L) en las muestras.

### **6.6. Fermentaciones con *Escherichia coli***

La cepa de *E. coli* fue donada por el Laboratorio de Análisis Clínicos de Servicio a la Comunidad de la facultad de química del campus de ciencias de la salud de la Universidad Autónoma de Yucatán.

Para la reactivación de la cepa se utilizó una metodología propuesta en el grupo de trabajo. Bajo condiciones estériles la cepa liofilizada se reactivó en un matraz de 500 mL

con 125 mL de medio LB (Luria Bertani) y se incubó a 37 °C a 180 rpm en una incubadora con agitación orbital durante 24 horas. Posteriormente se colectó el medio de cultivo en tubos de 50 mL y se sometieron a centrifugación durante 15 minutos a 5,500 rpm, posteriormente se decantaron los tubos y el pellet se resuspendió en 2 ml de agua destilada estéril. Para conservar la cepa se colocaron 0.5 mL de la resuspensión en tubos eppendorf, se le agregaron 0.5 mL de glicerol al 30 % y se conservaron en congelación. la morfología celular del microorganismo se verificó por tinción de Gram (Gram, C., 1884).

### **6.6.1. Obtención del inóculo**

Se realizó una cinética de crecimiento de *E. coli* mediante el método de turbidimetría con la finalidad de establecer el tiempo en que serían tomadas las muestras para obtener el inóculo para las fermentaciones.

En un matraz de 500 mL con 125 mL de medio LB se adicionaron 500 µL de la cepa conservada en glicerol al 30 %, se incubó a 37 °C a 180 rpm y se tomó 1 mL de muestra cada hora durante 12 h. Se hizo la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro UV a 540 nm y posteriormente se graficaron los datos para obtener la cinética de crecimiento de *E. coli*.

### **6.6.2. Fermentación líquida para la producción de biomasa de *E. coli***

Los cultivos de *E. coli* se realizaron por fermentación líquida, utilizando medio mineral como referencia, cuya composición se muestra en la tabla 3. Se eligió este medio debido a que solo contiene una fuente de carbono y sales minerales, de tal manera que se podría evaluar el crecimiento sólo sobre un sustrato limitante. También se realizaron cultivos de *E. coli* utilizando betabel y yuca con y sin molienda como fuente de carbono en el mismo medio. Para las muestras con molienda se eligieron aquellas que presentaron la mayor concentración de azúcares reductores. Para no cambiar la relación entre la fuente de carbono y las sales minerales del medio se adicionó la cantidad de sustrato que

corresponde a 10 g/L de azúcares reductores (Tabla 4). Las botellas serológicas que se usaron para las fermentaciones fueron de 125 mL con tapones herméticos en los que se colocaron 54 mL de medio de cultivo y 6 mL de inóculo (obteniendo un volumen total de 60 mL), se incubaron a 37°C y 180 rpm durante 12 horas. Se tomaron muestras del medio de fermentación cada hora.

**Tabla 3.** Composición del medio mineral (García-Peña *et al.*, 2009).

Componente		g/L	Función
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Glucosa	10	Fuente de Carbono
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de amonio	3	Buffer
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de potasio monobásico	0.6	Buffer
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de potasio dibásico	2.4	Buffer
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	Sulfato de magnesio heptahidratado	1.5	Fuente de Mg
CaSO <sub>4</sub>	Sulfato de calcio	0.15	Fuente de Ca
FeSO <sub>4</sub>	Sulfato ferroso	0.03	Fuente de Fe

**Tabla 4.** Sustratos orgánicos no convencionales como fuente de carbono para el crecimiento de *E. coli*.

Sustrato	g azúcares reductores/ g sustrato	g sustrato inicial/L	Azúcares reductores (g/L)
Dextrosa (Referencia)	1	10	10
Betabel sin molienda	1.7	5.88	9.99
Betabel con 30 minutos de molienda	2.16	4.60	9.93
Yuca sin molienda	1.82	5.48	9.97
Yuca con 30 minutos de molienda	2.77	3.60	9.97

### 6.6.3. Cuantificación de la biomasa

Para los cultivos en medio LB y en medio mineral se cuantificó la biomasa con la técnica de turbidimetría en un espectrofotómetro (JENWAY modelo 6700) a 540 nm.

Debido a que el medio de cultivo con la yuca y el betabel presentan sólidos en suspensión no fue posible hacer la cuantificación de la biomasa con esta técnica. Por lo tanto, para estos cultivos se optó por realizar la cuantificación con la técnica de unidades formadoras de colonias (UFC). Para lo cual se realizaron diluciones seriales hasta  $1 \times 10^{-6}$ . Se tomaron 0.1 mL de las diluciones y se inocularon por extensión en placa en agar nutritivo (peptona de gelatina 5 g/L, extracto de carne 3 g/L, agar bacteriológico 15 g/L) por duplicado. Las placas se incubaron a 37 °C, durante 12 horas. Posteriormente se realizó el conteo en las placas y se obtuvo la concentración de biomasa con la ecuación 3.

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{No. de colonias por placa} \times \text{factor de dilución}}{\text{Volumen inoculado}} \quad \text{Ec. (3)}$$

### 6.6.4. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos con las diferentes metodologías de caracterización de las muestras de yuca y betabel se utilizó el programa Origin 8.6 en el cual se determinaron las medias (con un nivel de confianza de 95%), para definir las diferencias significativas se empleó la prueba de medias (Tukey,  $p < 0.05$ ).

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Preparación de la materia orgánica

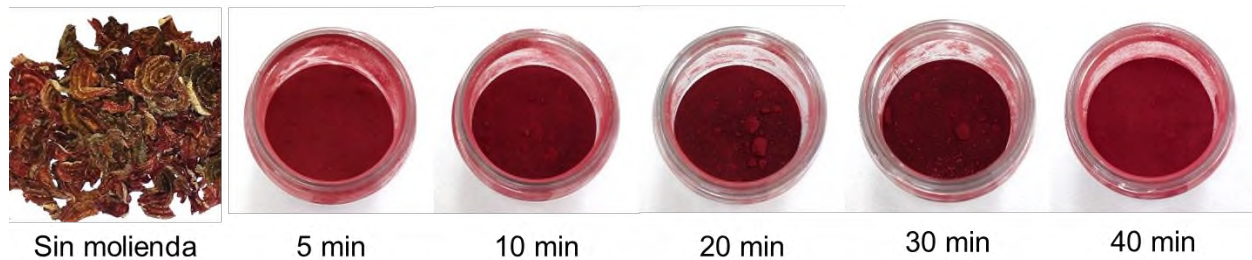
Durante el proceso de secado, el peso de la yuca se redujo de 1,000 g a 400 g. Esto indica que aproximadamente un 60% de su peso es agua y aproximadamente el 40% es materia seca, lo cual coincide con lo reportado en la literatura. Ceballos *et al.*, 2002 reportaron que el contenido de materia seca de la yuca fluctúa entre el 30 y 40%, aunque ocasionalmente se observan casos que exceden este rango de variación.

### 7.2. Molienda mecánica de alta energía

En la tabla 5 se presentan las características macroscópicas de las muestras de betabel después de la molienda mecánica de alta energía.

**Tabla 5.** Características macroscópicas de las muestras de betabel después de la molienda.

Propiedad	Descripción
<b>Color</b>	El color de las muestras se intensificó gradualmente conforme aumentó el tiempo de molienda. Esto fue más evidente en las muestras sometidas a molienda de 5 a 30 min. Sin embargo, en las de 40 min se observó un color más claro. La coloración más intensa se observó en la muestra de 30 min (figura 6).
<b>Homogeneidad</b>	El polvo obtenido de las moliendas es fino, sin embargo, se observó que durante el almacenamiento se presentó la formación de grumos endurecidos. Esto se pudo apreciar mayormente en las muestras de 10, 20 y 30 minutos (figura 6).
<b>Olor</b>	Las muestras después de la molienda tuvieron un olor dulce. Este olor se intensificó en las muestras de los tiempos de 20 y 30 minutos.



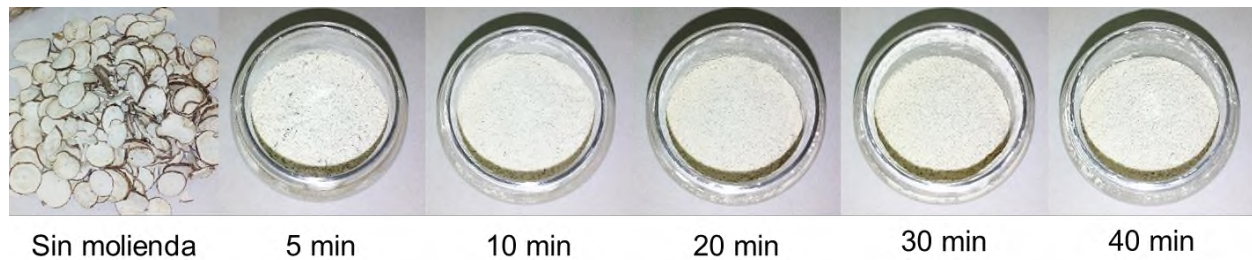
**Figura 6.** Muestras de la molienda de betabel.

Durante el proceso de molienda las muestras de betabel se caramelizaron. Se observó que a mayor tiempo de molienda hubo una mayor caramelización, la cual es una reacción de oscurecimiento que ocurre cuando los azúcares se calientan por encima de su punto de fusión (Clotet ,1995). Esto afectó la cantidad de muestra obtenida al final de la molienda ya que el betabel caramelizado se adhirió a las paredes del tazón y no fue posible recuperarlo. En las muestras de yuca no se presentó caramelización.

En la tabla 6 se presentan las características macroscópicas de las muestras de yuca después de la molienda mecánica de alta energía.

**Tabla 6.** Características macroscópicas de las muestras de yuca después de la molienda.

Propiedad	Descripción
<b>Color</b>	El color de las muestras se intensificó conforme aumentó el tiempo de molienda. Este aumento de coloración fue gradual (figura 7).
<b>Homogeneidad</b>	El polvo obtenido de las moliendas era fino, sin embargo, se observó que durante el almacenamiento se presentó la ligera formación de pequeños grumos, esto se pudo apreciar en todas muestras. La consistencia del polvo de todas las muestras fue ligeramente pegajosa. En la muestra de 5 minutos aun pudieron notarse pequeños fragmentos de la yuca triturada (figura 7).
<b>Olor</b>	Todas las muestras de molienda tienen un olor dulce agradable, no se percibe cambios en la intensidad del olor.



**Figura 7.** Muestras de la molienda de yuca.

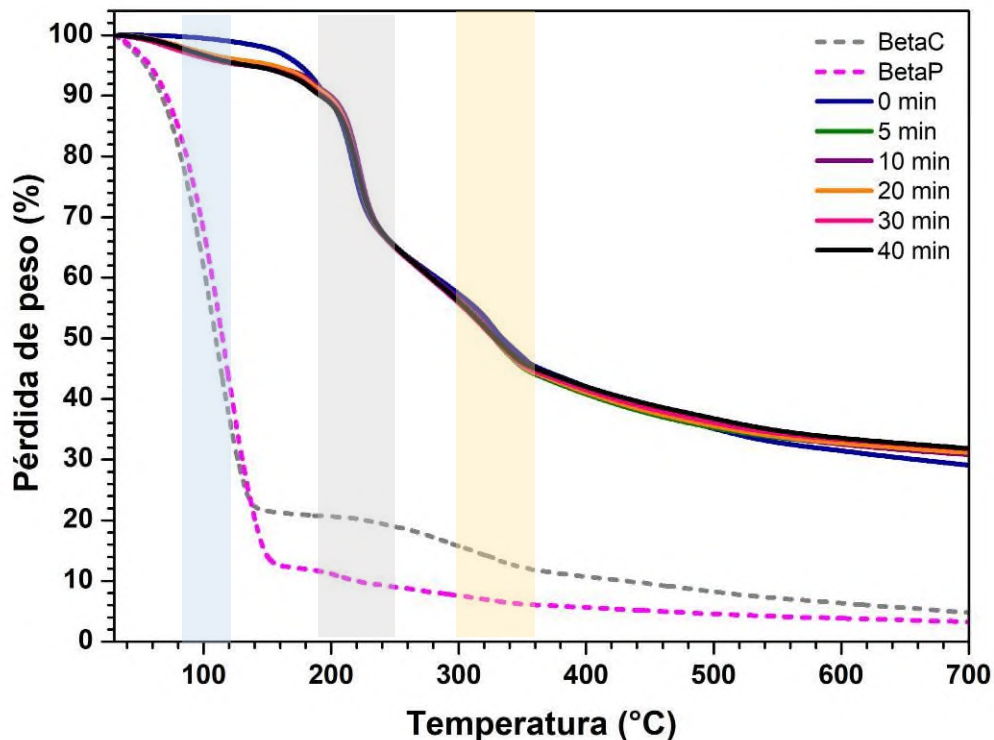
La temperatura que se alcanza durante el proceso de molienda mecánica de alta energía podría estar relacionada con los cambios en la intensidad del color considerando que ambas materias primas contienen carbohidratos. Pritchard y Adam (1994) reportaron que la presencia de azúcares reductores se correlaciona con el grado de oscurecimiento no enzimático que se desarrolla durante el calentamiento. Por otro lado, Márquez (1986) reporta que la fructosa (uno de los azúcares reductores) es la que proporciona coloraciones más castañas en la harina de yuca seguido de la glucosa.

### **7.3. Caracterización fisicoquímica de los sustratos**

#### **7.3.1. Análisis termogravimétrico (TGA) y análisis térmico diferencial (DTA)**

En la figura 8 se muestran los termogramas de las muestras de betabel con diferentes tiempos de molienda, así como de la cáscara de betabel (BetaC) y de la pulpa de betabel fresco (BetaP). Las muestras BetaC y BetaP presentaron una primera pérdida de peso a una temperatura cercana a los 100 °C (figura 8) perdiendo entre el 75 y 90 % de su peso total, esto se debe a la evaporación de agua contenida en las muestras. En la muestra seca (0 min) no se observó la pérdida de peso a esa misma temperatura. Sin embargo, en las muestras de molienda de betabel se observa una primera pérdida de peso de alrededor del 6 al 8 % a los 100 °C, la cual es atribuida a la evaporación del agua que pudo haberse incorporado durante la manipulación (figura 8).

La segunda pérdida de peso en las muestras de molienda de betabel inicia aproximadamente a los 190 °C y finaliza a los 250 °C con un porcentaje de pérdida de peso de entre 22-25 %. Esta pérdida de peso se puede deber a la degradación de la hemicelulosa (Andrade, 2017). Se observa una tercera pérdida de peso de entre el 20 y 25 % en las muestras de molienda a los 300-360 °C. Esta pérdida de peso se puede deber a la degradación de la celulosa (Bolio-Lopez, 2011). La primera derivada de la curva DTG (figura 9) permite ver el inicio y el final de cada evento de pérdida de masa, indicando el intervalo de temperatura donde la reacción de descomposición ocurre. En la figura 10 se muestran los resultados de calorimetría diferencial de barrido (DTA). En estos termogramas dominan las regiones endotérmicas que reflejan el flujo de calor necesario para degradar las muestras (figura10).



**Figura 8.** Termograma (TGA) de las muestras de cáscara, pulpa y de molienda de betabel.

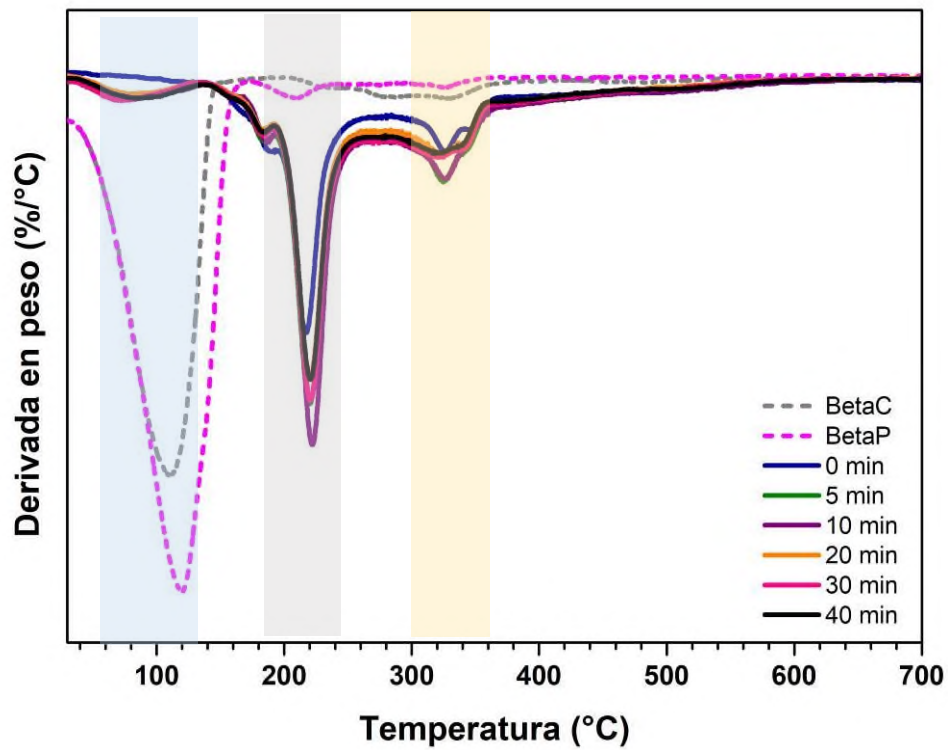


Figura 9. Derivadas de la curva del análisis termogravimétrico (dTGA) de las muestras de cáscara, pulpa y molienda de betabel.

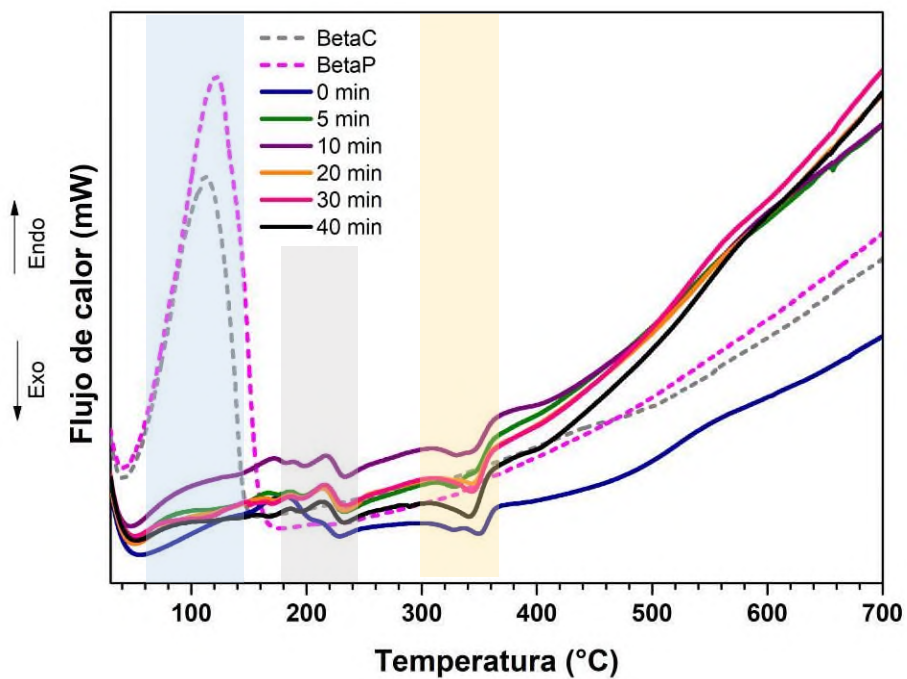
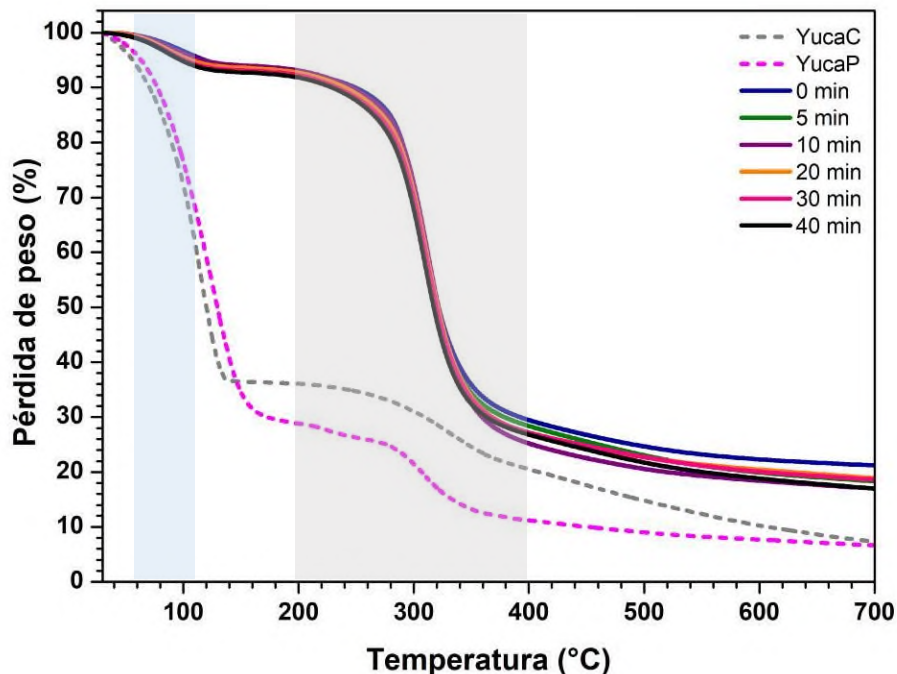


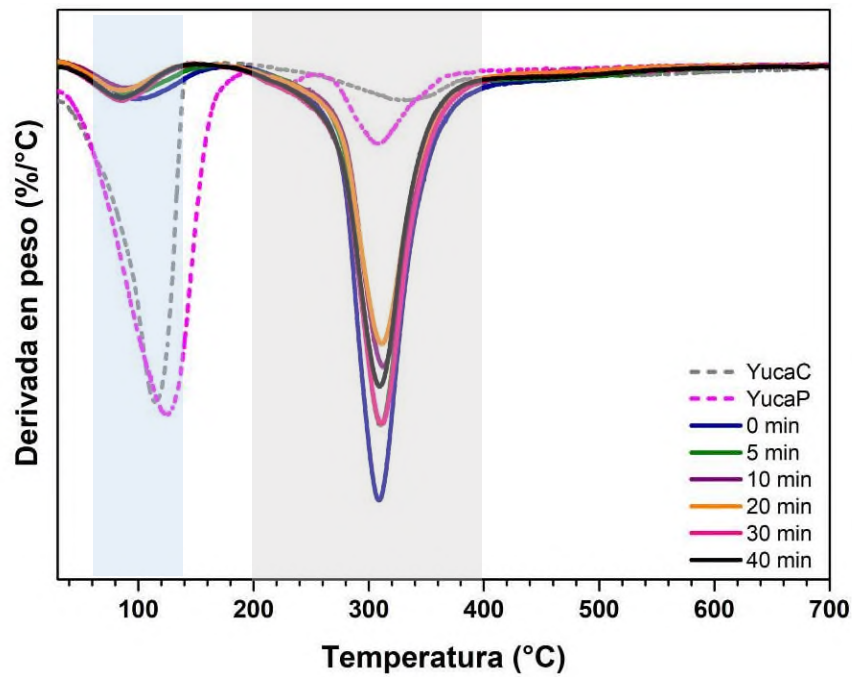
Figura 10. Curvas DTA de las muestras de cáscara, pulpa y de molienda de betabel.

Las muestras de pulpa de yuca en fresco (YucaP) y cáscara de yuca (YucaC) presentaron una primera pérdida de peso a una temperatura cercana a los 100 °C (figura 11) perdiendo alrededor del 60-70 % de su peso total. Esta pérdida está asociada a la evaporación del agua. Estas pérdidas de peso pueden observarse mejor en las curvas de la primera derivada (figura 12) y en las señales endotérmicas de la calorimetría diferencial de barrido (figura 13). Dicho porcentaje de pérdida de agua coincide con la pérdida de peso observada durante el secado de la yuca.

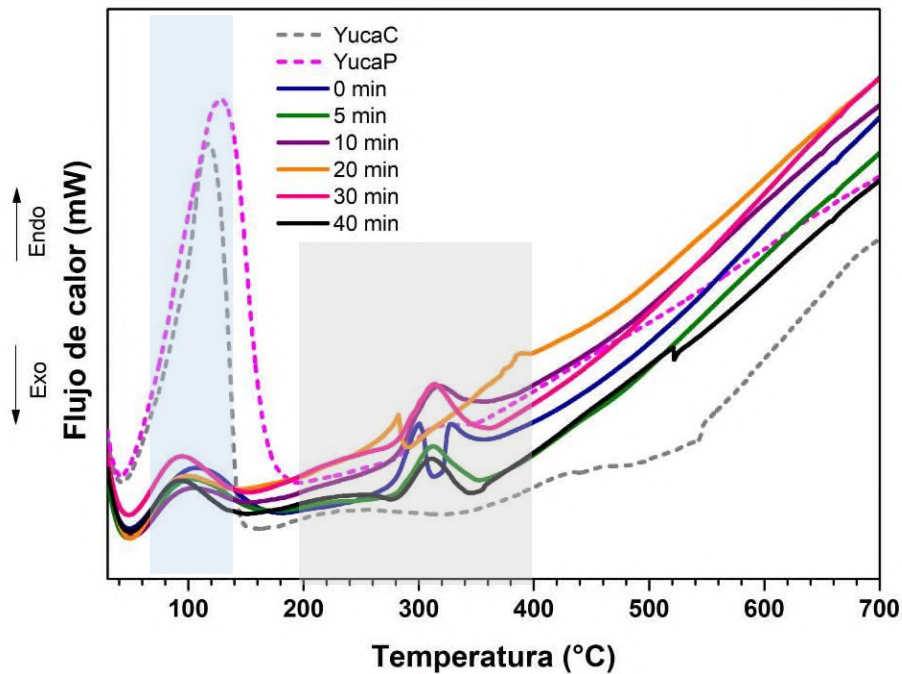
Todas las muestras de molienda de yuca presentaron degradación de la materia a temperaturas entre 200 y 400 °C (figura 11), esto se atribuye a la degradación del material orgánico (polisacáridos, celulosa, hemicelulosa, etc.) con alrededor de 55-60 % de pérdida de peso. Después del proceso de degradación del material orgánico quedan restos de residuos carbonosos inertes los cuales necesitan una mayor energía para degradarse (Andrade *et al.*, 2017); Kim *et al.*, 2012)).



**Figura 11.** Termogrrama (TGA) de las muestras de cáscara, pulpa y de molienda de yuca.



**Figura 12.** Derivadas del análisis termogravimétrico (dTGA) de las muestras de cáscara, pulpa y molienda de yuca.



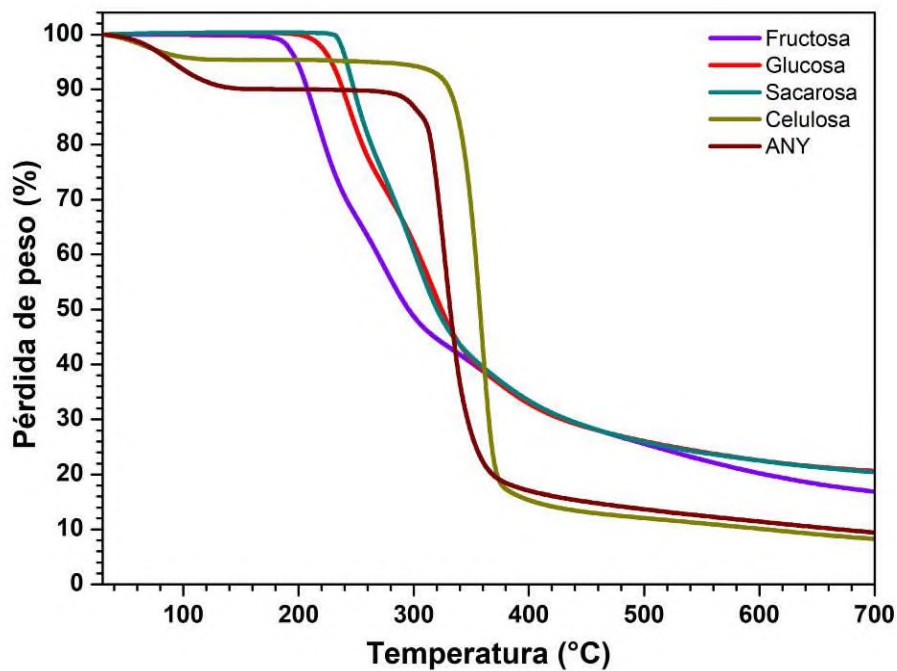
**Figura 13.** Curvas DTA de las muestras de cáscara, pulpa y de molienda de yuca.

En la figura 14 se pueden observar los termogramas de los estándares y en la tabla 5 se detalla la información.

**Tabla 7.** Intervalos de temperatura observados en las curvas termogravimétricas de los estándares.

Estándar de referencia	Temperaturas de pérdida de peso (°C)	
Fructosa	190- 220	280- 310
Glucosa	220- 260	290- 350
Sacarosa	230- 250	280- 330
Celulosa	70- 100	330- 380
Almidón nativo de yuca (ANY)	90- 120	300- 360

La primera derivada de la curva dTGA (figura 15) indica el intervalo de temperatura donde ocurre una transición y permite ver el inicio y el final de cada evento de pérdida de masa. Las transiciones que presentan los estándares son endotérmicos (figura 16), por lo que se asocian con la descomposición de los estándares.



**Figura 14.** Termograma (TGA) de los estándares de referencia.

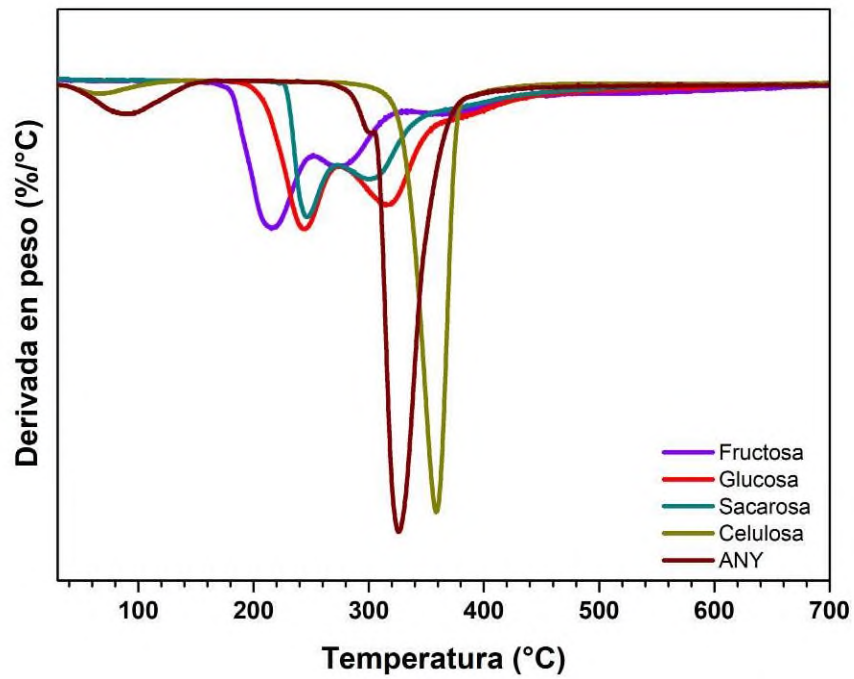


Figura 15. Derivadas del análisis termogravimétrico (dTGA) de los estándares de referencia.

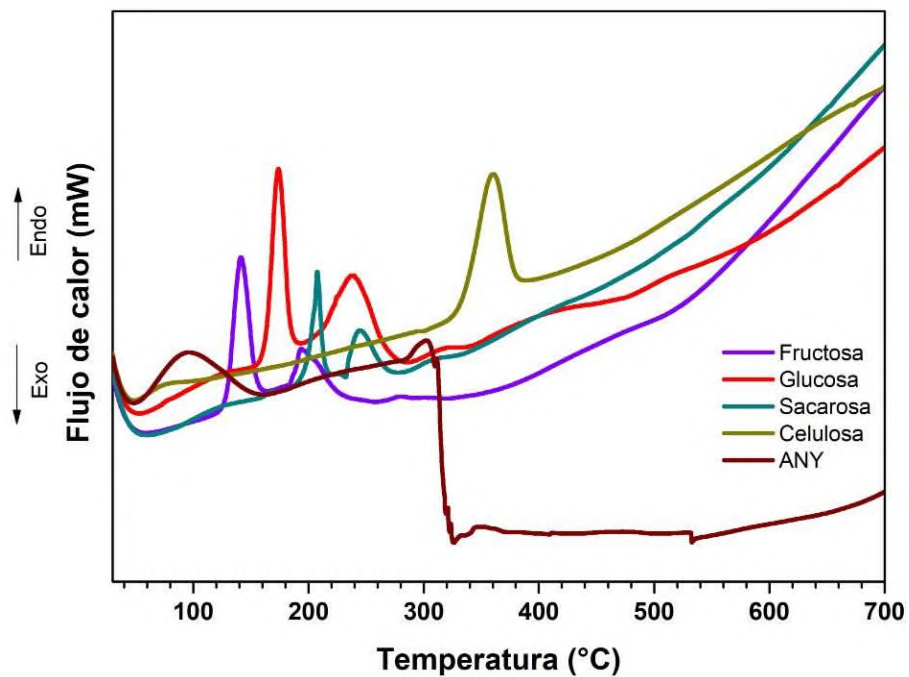


Figura 16. Curvas DTA de los estándares de referencia.

Los resultados de TGA y DTG de los estándares (Tabla 7, Figuras 14-16) coinciden con lo reportado en la literatura (Saavedra-Leos, Alvarez- Salas, *et al.*, 2012; Saavedra-Leos, Grajales- Lagunes, *et al.*, 2012). Aunque hasta el momento no se han encontrado reportes de estos análisis ni para la yuca ni para el betabel tratados con molienda mecánica. Por lo tanto, se compararon los resultados de TGA y DTG de las muestras con molienda mecánica con los estándares de la Tabla 5 para determinar si durante la molienda mecánica se genera alguno de ellos. Sin embargo, con base en los resultados obtenidos no se observaron coincidencia entre los termogramas de los estándares con las muestras de molienda. Lo que indica que estos azúcares no están, al menos de forma abundante, en las muestras de molienda ni en las muestras de yuca y betabel fresco.

### 7.3.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En las figuras 17, 18 y 19 se observan los termogramas de calorimetría de barrido diferencial (DSC) para las muestras de molienda de betabel, yuca y los estándares de referencia.

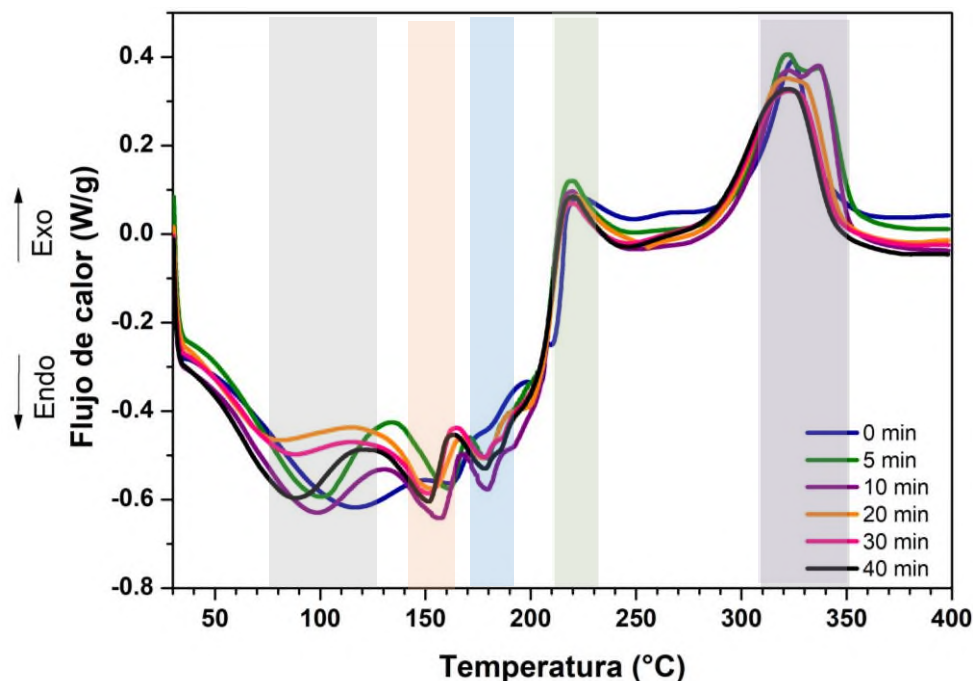
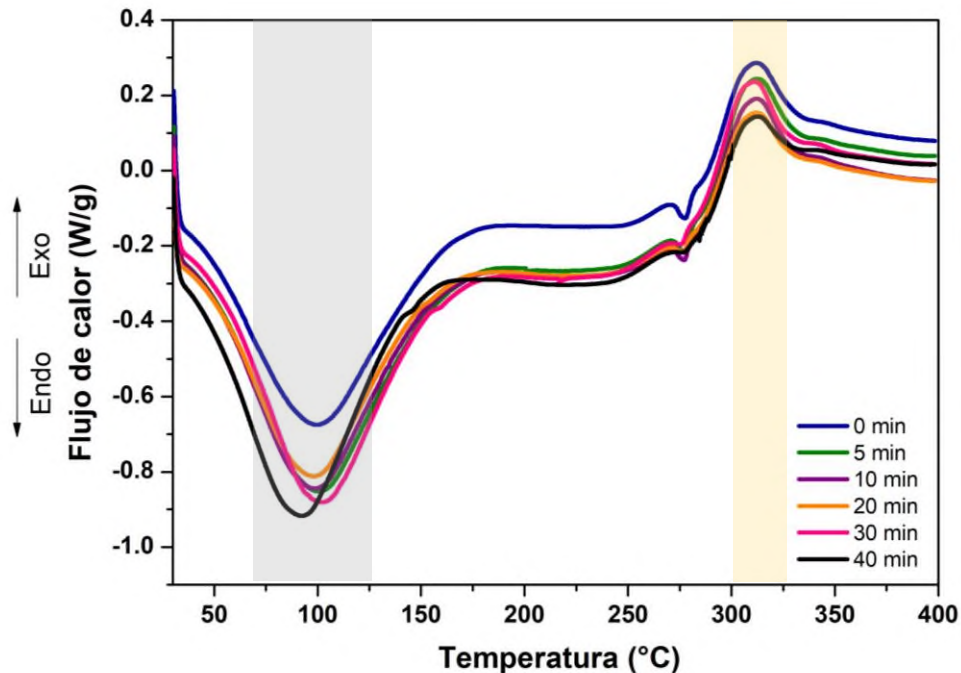


Figura 17. Termograma (DSC) de las muestras de betabel.

En las muestras de betabel (figura 17) se observan cinco zonas o transiciones, la primera (100°C) puede estar asociado a la eliminación de agua absorbida. La segunda (140-160°C) y tercera (170-190°C) pueden estar asociadas a la temperatura de fusión de las muestras, la cual coincide con la temperatura de fusión de la glucosa y la sacarosa (figura 19 y tabla 8). Lo que indicaría la presencia de glucosa y sacarosa en las muestras de molienda de betabel. Cabe resaltar que la técnica de DSC, a diferencia que TGA y DTA, es más sensible a pequeñas variaciones de calor. La cuarta (210-230°C) y quinta zona (310-350°C) se pueden asociar a la degradación de la hemicelulosa y la celulosa, respectivamente (Andrade, 2017; Bolio-Lopez, 2011).

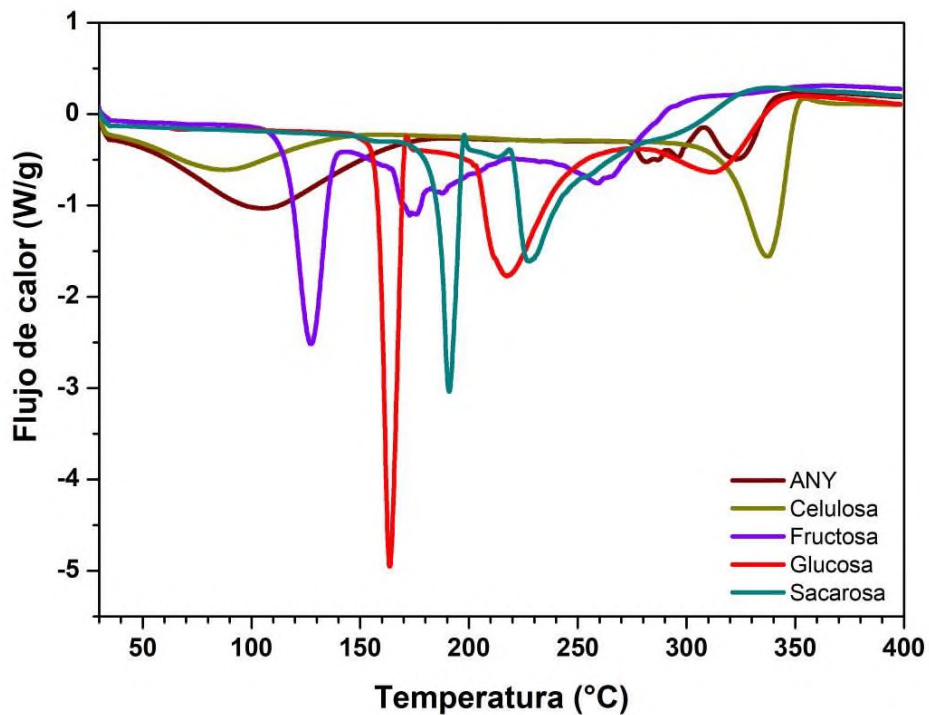


**Figura 18.** Termograma (DSC) de las muestras de yuca.

Las muestras de molienda de yuca (figura 18) muestran dos zonas de transición. La primera (100°C) está asociada con la eliminación de agua. Mientras que el máximo de la segunda zona (325°C) coincide con la degradación del material orgánico (polisacáridos, celulosa, hemicelulosa, etc.) y con el valor observado en la primera derivada de las curvas DTG. En estas muestras no se logró la pirolisis, solo la ruptura de enlaces en la estructura

del almidón. Esto coincide con lo observado en otras fuentes de almidón como la papa (Andrade *et al.*, 2015; Worzakowska *et al.*, 2015; Worzakowska *et al.*, 2017).

En la tabla 8 se presentan los resultados obtenidos de las temperaturas de fusión y degradación de los estándares de referencia y en la figura 19 se muestran sus termogramas. Estos resultados coinciden con lo reportado por Saavedra-Leos (2012).



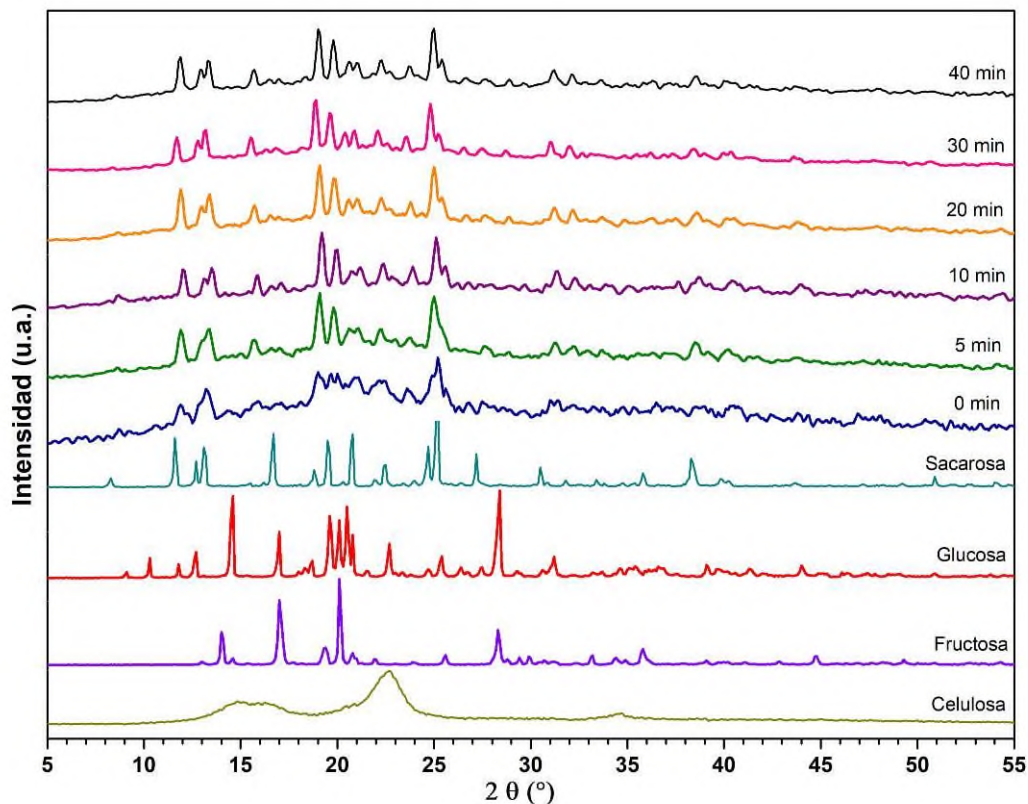
**Figura 19.** Termograma (DSC) de los estándares de referencia.

**Tabla 8.** Caracterización de la temperatura de fusión y temperatura de degradación térmica de los estándares de referencia.

Estándares de referencia	Temperatura de fusión (°C)	Temperatura de degradación (°C)
	Pico (T <sub>m</sub> )	Pico (T <sub>m</sub> )
<b>Fructosa</b>	130	175
<b>Glucosa</b>	160	220
<b>Sacarosa</b>	190	230
<b>Celulosa</b>	90	340
<b>Almidón nativo de yuca (ANY)</b>	105	325

### 7.3.3. Difracción de rayos X (DRX)

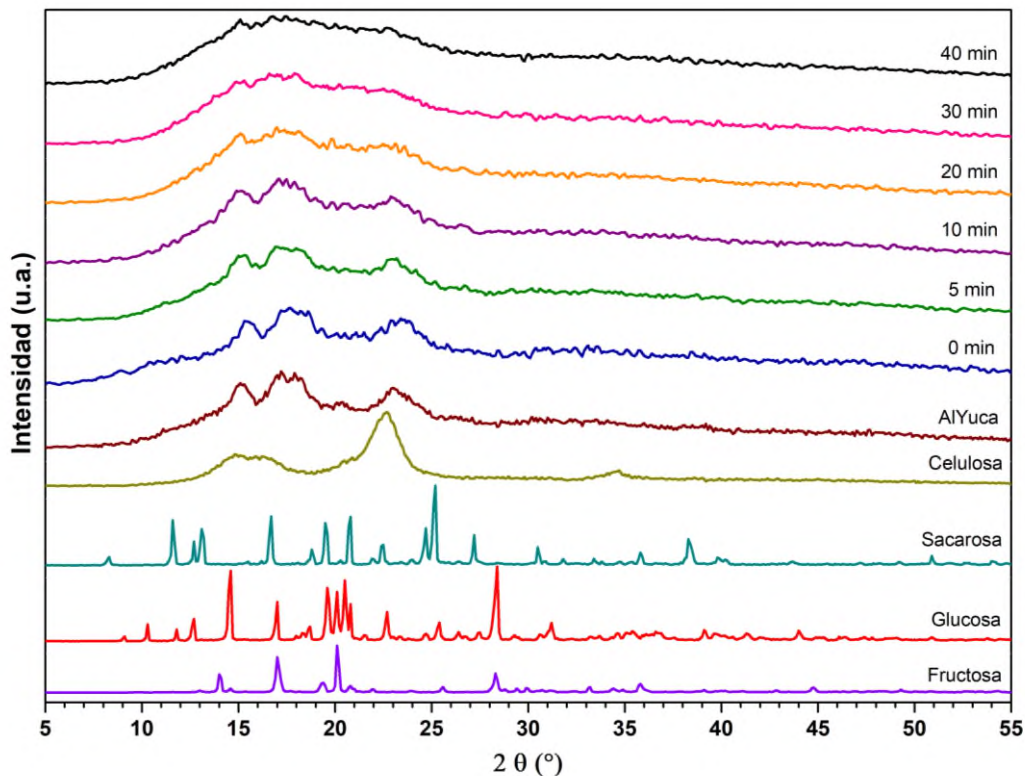
En la figura 20 se presentan los difractogramas de las muestras de betabel sin molienda y a los diferentes tiempos de molienda, así como de los estándares. Las muestras de molienda de betabel a los diferentes tiempos presentan una estructura cristalina y aumenta conforme se incrementa el tiempo de molienda. Santos (2012) reportó que la sacarosa es la especie química mayoritariamente presente en la composición del betabel, pudiendo asociarse a ello la naturaleza cristalina de las muestras. No se han encontrado reportes de difracción de rayos X en muestras de betabel sometidas a molienda mecánica por lo que se requiere un estudio más detallado para identificar el mecanismo responsable de este comportamiento. Sin embargo, se puede observar la presencia de picos característicos de la sacarosa en las muestras de molienda de betabel, lo cual puede asociarse a la presencia de ésta en su composición, fortaleciendo así lo observado en los resultados de DSC.



**Figura 20.** Diffractograma de las muestras de molienda de betabel y estándares de referencia.

\*AlYuca: Almidón de yuca

En la figura 21 puede observarse que las muestras de molienda de yuca disminuyen su cristalinidad conforme aumenta el tiempo de molienda, esto coincide con reportes encontrados donde uno de los efectos de la molienda mecánica en almidones es la reducción de la cristalinidad en las muestras (Huang *et al.*, 2008). El almidón es el principal carbohidrato presente en la yuca (Buitrago, 1990). El patrón de difracción de las muestras de molienda de yuca corresponde a un patrón de difracción tipo A, ya que las señales en el difractograma, concuerdan con el modelo de este tipo de patrón (Gunaratne, 2002).



**Figura 21.** Difractograma de las muestras de molienda de yuca y estándares de referencia.

\*AlYuca: Almidón de yuca

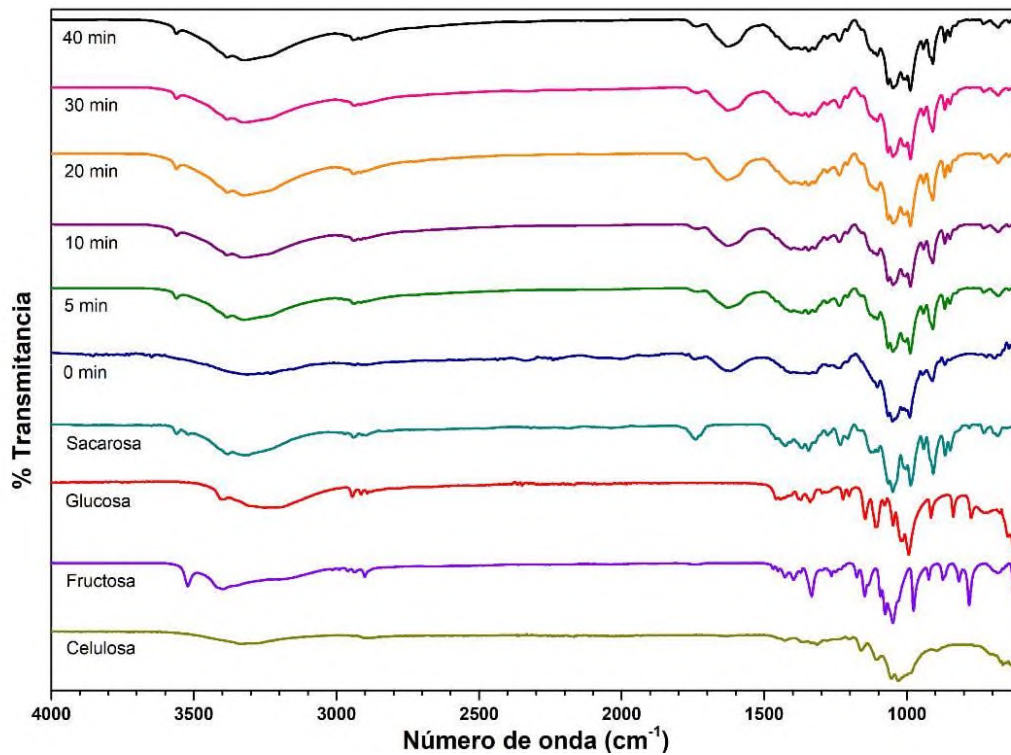
#### 7.3.4. Espectrometría infrarroja (IR)

En la figura 22 se observa la comparación de los espectros de las muestras analizadas de betabel y los estándares de referencia. La figura 23 presenta el espectro de la muestra de betabel a los 40 minutos de molienda para realizar la identificación de las bandas de absorción.

La sacarosa que es la principal especie química presente en el betabel tiene vibraciones de los enlaces C-H, O-H y C-O, con bandas de absorción pequeños (Pan *et al.*, 2015).

Haciendo uso de las tablas 10B.1. y 10B.2. reportadas por Rubinson (2001) se identificaron las bandas del espectro de la figura 23. Se observa una banda a  $3325\text{ cm}^{-1}$

que corresponde al grupo OH, presente en el betabel. A  $1630\text{ cm}^{-1}$  se localiza una banda de absorción, la cual está dentro del rango de los C=O. Se observa una banda ubicada a  $1343\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al enlace C-H. La banda a  $1046\text{ cm}^{-1}$  corresponde al enlace C-O.



**Figura 22.** Espectros IR de las muestras de molienda de betabel y estándares de referencia.

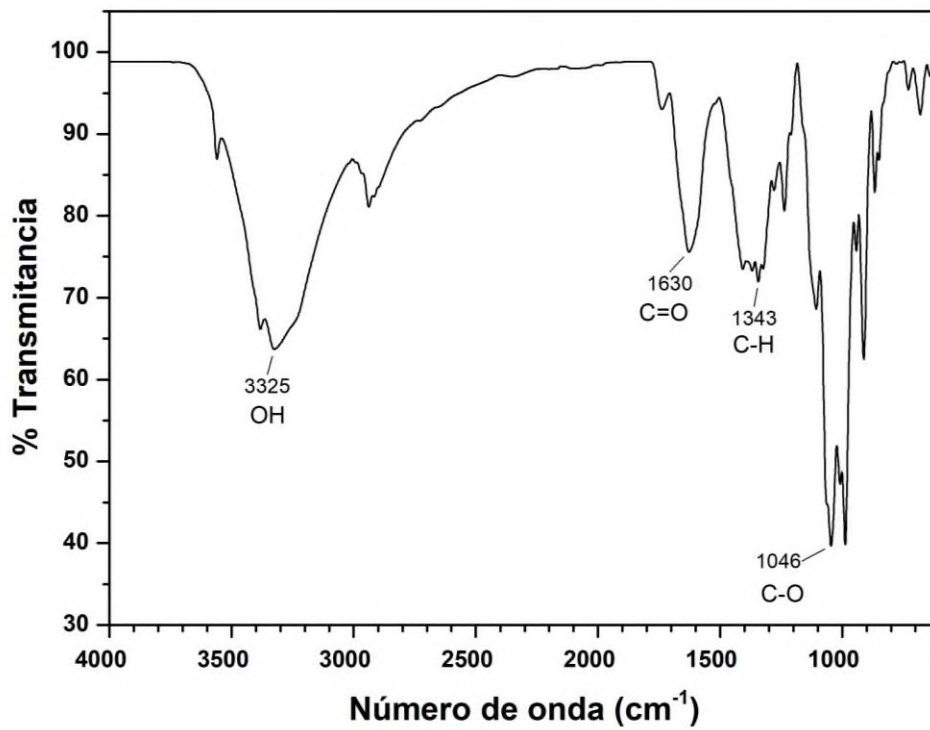


Figura 23. Espectro IR de la muestra de betabel con 40 min de molienda.

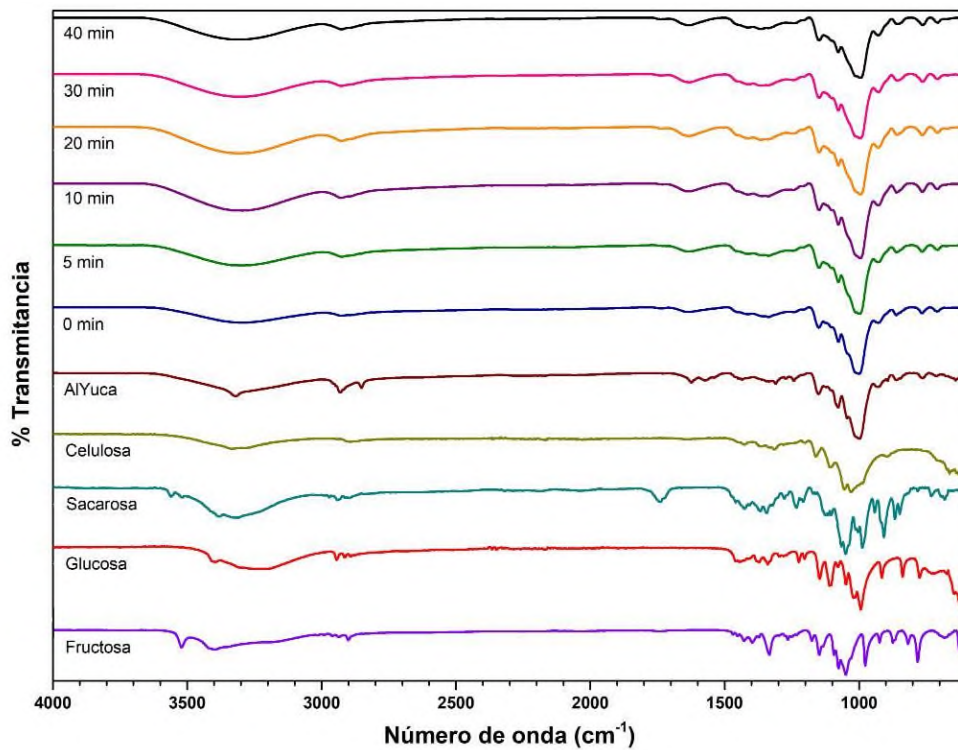
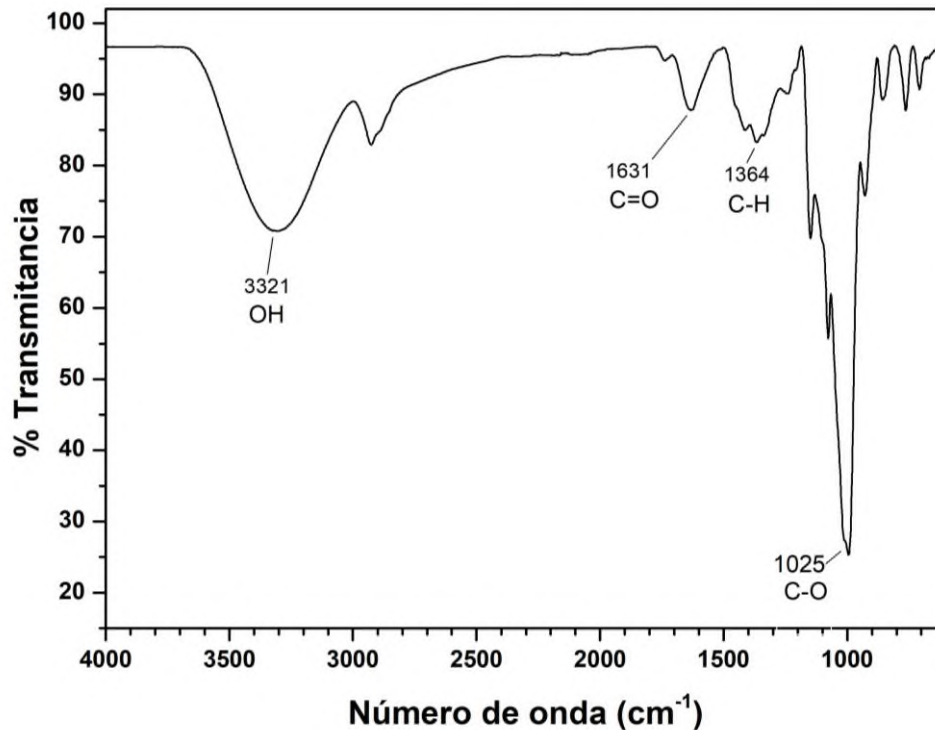


Figura 24. Espectros IR de las muestras de molienda de yuca y estándares de referencia.

Haciendo uso de las tablas las tablas 10B.1. y 10B.2. reportadas por Rubinson (2001) se identificaron las bandas del espectro de la figura 25. Se observa una banda ancha a  $3321\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a los estiramientos de los grupos OH. A  $1631\text{ cm}^{-1}$  se encuentra la banda correspondiente al enlace C=O. En  $1364\text{ cm}^{-1}$  están las vibraciones de flexión C-H. Se observa una banda del enlace C-O ubicada en  $1025\text{ cm}^{-1}$ .

El espectro IR de las muestras de yuca, coincide con el espectro del almidón de yuca (figura 24) asociándose esto a que en la composición química de la yuca el almidón es el polisacárido más abundante.



**Figura 25.** Espectro IR de la muestra de yuca con 40 min de molienda.

#### 7.4. Prueba de solubilidad y poder de hinchamiento

En la figura 26 puede observarse que el porcentaje de solubilidad de las muestras de betabel aumentó cuando fueron sometidas a mayores tiempos de molienda. La mayor

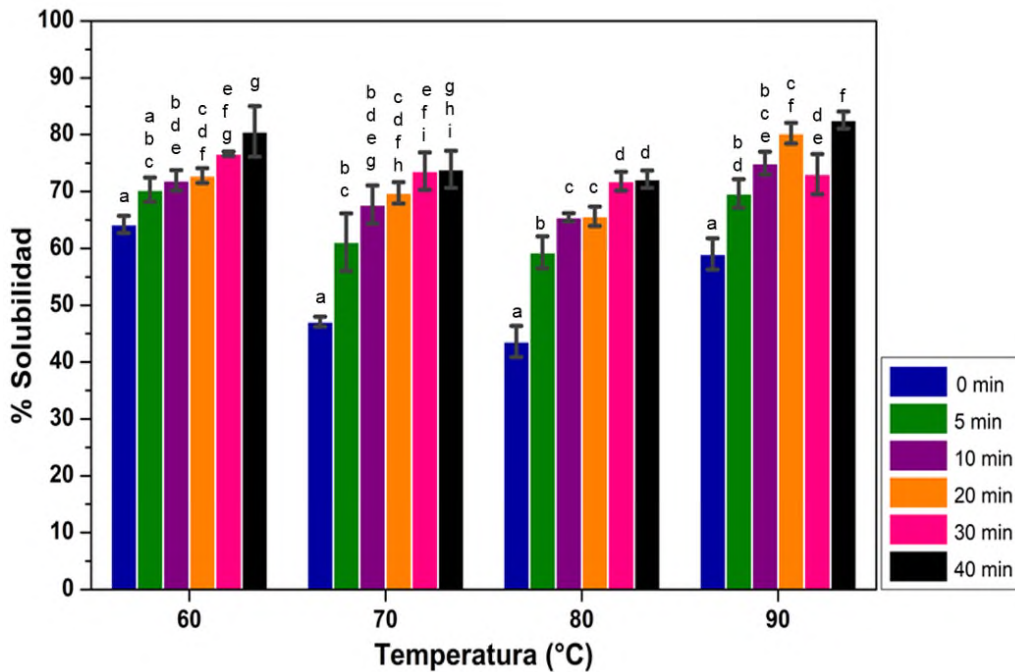
solubilidad se obtuvo a temperaturas de 60 °C para 30 y 40 min y a 90°C para 20 y 40 min, mostrando diferencias significativas con respecto a la muestra sin molienda. Sin embargo, el mayor aumento en la solubilidad del betabel se observó a 70 y 80°C con respecto a la muestra de 0 min en comparación con los demás tiempos de molienda, observándose diferencias significativas con un  $\alpha$  de 0.05. Cabe mencionar que la técnica de solubilidad y poder de hinchamiento es para almidones y el principal carbohidrato del betabel es la sacarosa. Por lo tanto, no se encontraron reportes en la literatura sobre la medición de la solubilidad y poder de hinchamiento del betabel.

Mientras que para yuca (figura 27) el mayor porcentaje de solubilidad se alcanzó a los 40 minutos para todas las temperaturas, observándose diferencias significativas con respecto a la muestra de 0 min con un  $\alpha$  de 0.05. Se observó que el mayor aumento en la solubilidad de la yuca fue entre 70 y 80 °C con respecto a la muestra de 0 min comparándolo con los demás tiempos de molienda, observándose diferencias significativas  $\alpha=0.05$ .

Respecto al poder de hinchamiento en las muestras de betabel (figura 28) obtenidas a diferentes tiempos de molienda, aparentemente a menores temperaturas se obtuvo un mayor poder de hinchamiento. Sin embargo, la prueba de Tukey indica que no hay diferencia significativa entre todas las mediciones. Esto se debe a que la técnica mide el poder de hinchamiento de los almidones y el principal carbohidrato del betabel es la sacarosa (Santos, 2016) y no se ha reportado contenido de almidón en él. De manera contraria, en las muestras de molienda de yuca (figura 29) a mayor temperatura se incrementó el poder de hinchamiento de los gránulos del almidón contenido en la muestra. El poder hinchamiento es la capacidad de adsorción de agua del granulo de almidón (Granados, 2014) y en las muestras de yuca se observó que la solubilidad se relaciona de manera directa con la solubilidad.

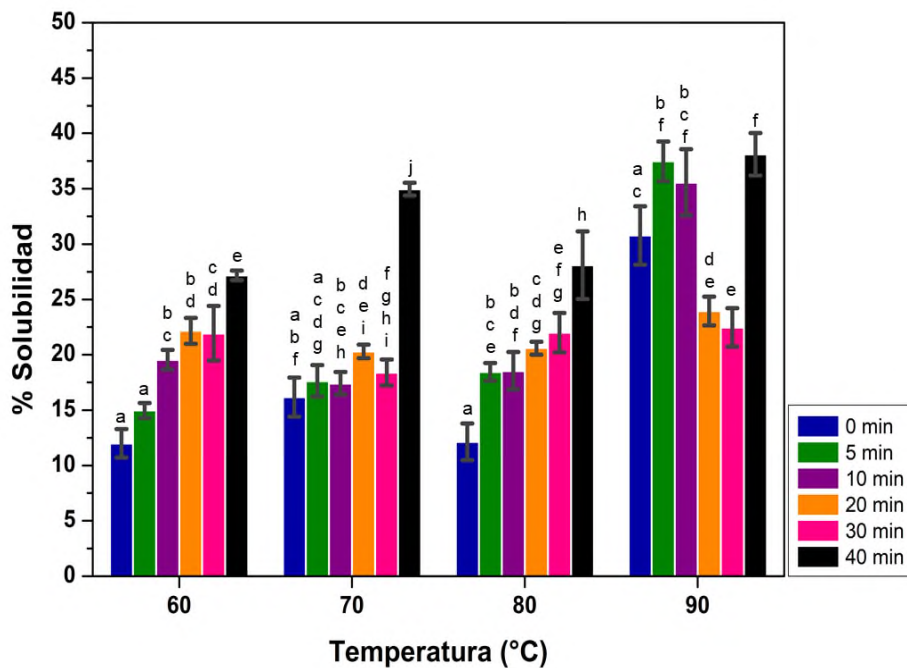
Estos resultados indican que la molienda mecánica de alta energía tiene efectos positivos en la solubilidad y el poder de hinchamiento de los sustratos tratados. Estos aumentos

podrían mejorar su disponibilidad. Es decir, al aumentar la solubilidad, los sustratos en el medio de cultivo estarán disponibles para el microorganismo durante la fermentación.



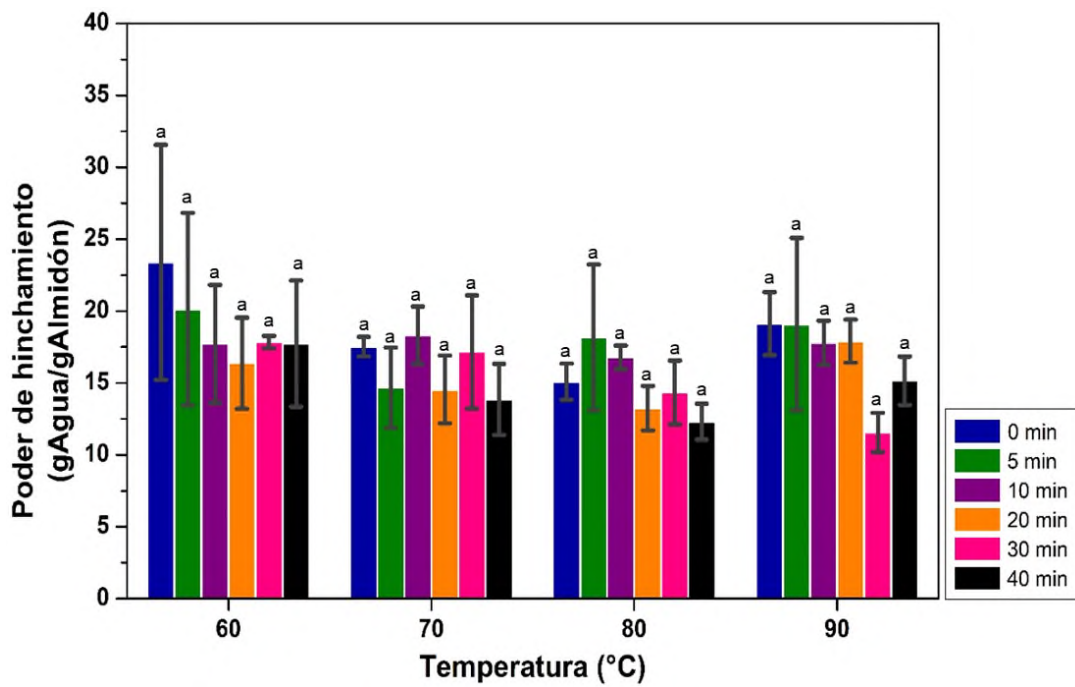
**Figura 26.** Solubilidad de las muestras de betabel.

\*Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey (p=0.05).



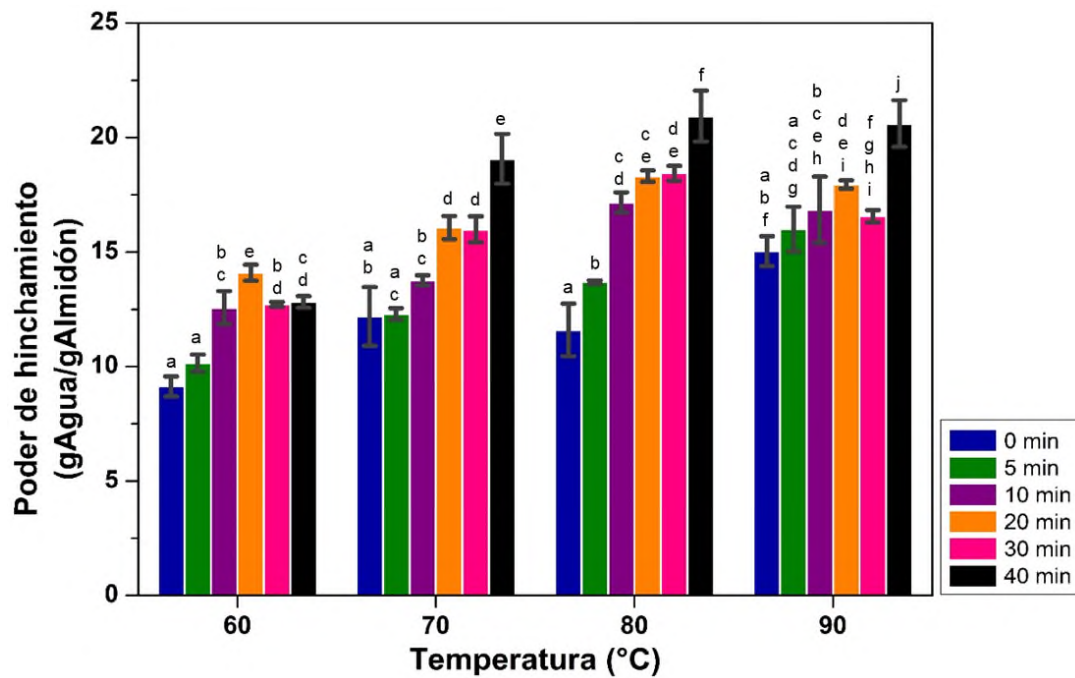
**Figura 27.** Solubilidad de las muestras de yuca.

\*Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey (p=0.05).



**Figura 28.** Poder de hinchamiento de las muestras de betabel.

\*Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey (p=0.05).

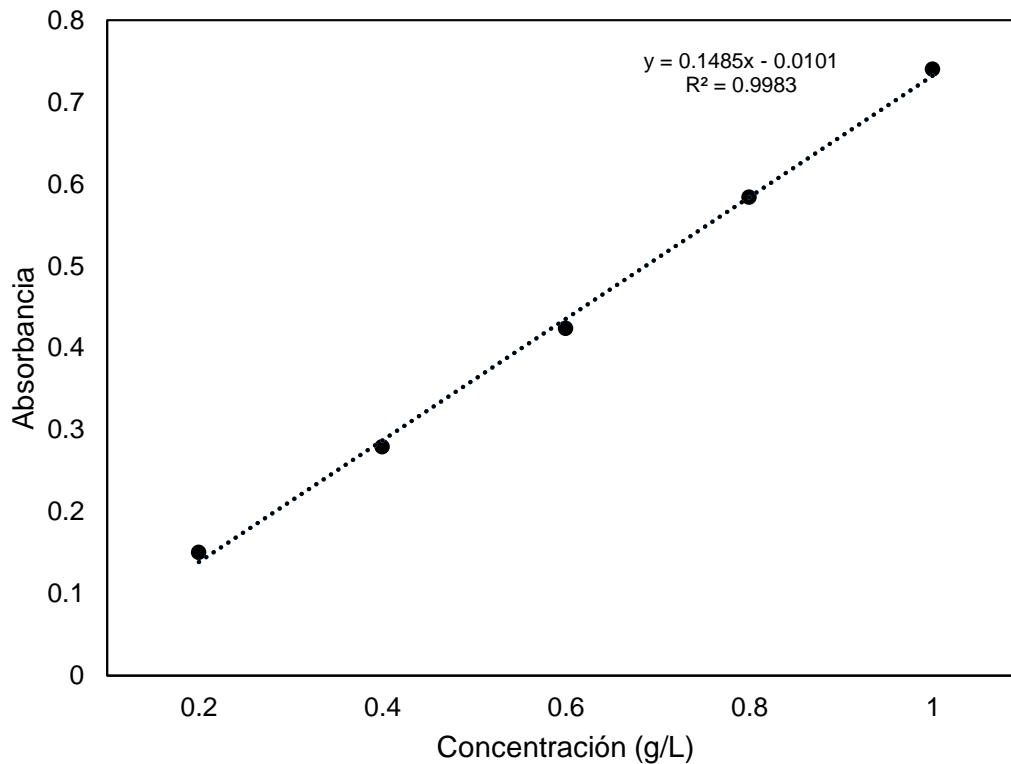


**Figura 29.** Poder de hinchamiento de las muestras de yuca.

\*Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey (p=0.05).

### 7.5. Determinación de azúcares reductores mediante la técnica de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS)

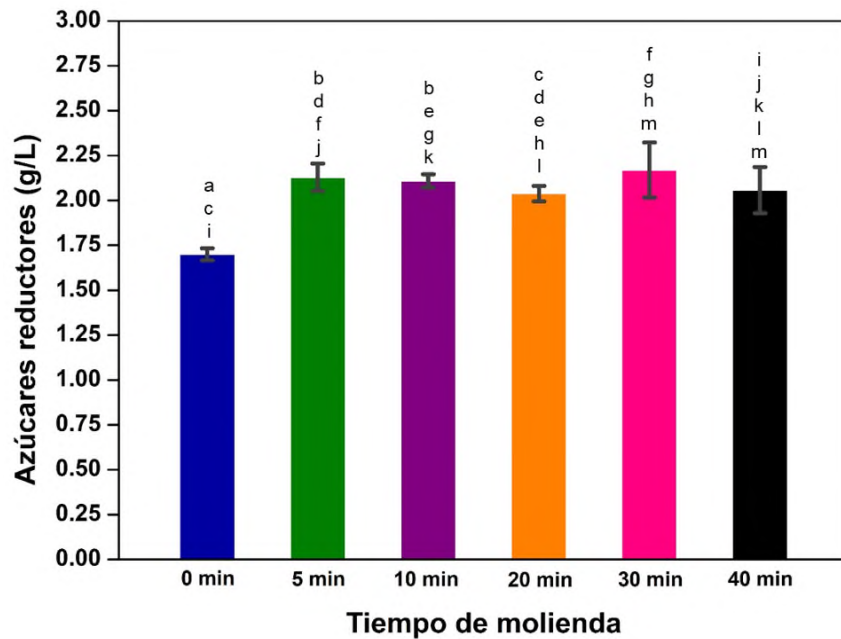
En la figura 30 se presenta la curva patrón de glucosa, se puede observar que la relación de los datos y la línea de regresión es muy cercana ( $R^2=0.9983$ ).



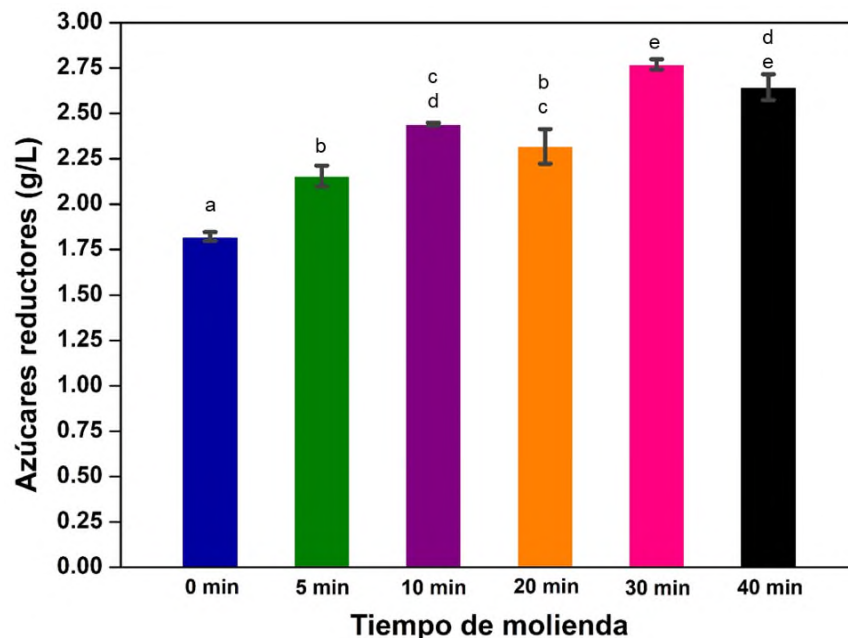
**Figura 30.** Curva patrón de glucosa.

En las figuras 31 y 32 se muestra la concentración de azúcares reductores obtenidos de las muestras de molienda mecánica de betabel y yuca. Se observa que la concentración de azúcares reductores de las muestras varió con el tiempo de molienda. Para ambos sustratos la mayor concentración de azúcares reductores se obtuvo con 30 minutos de molienda.

El máximo incremento de azúcares reductores de las muestras de betabel fue de 28 % con respecto a la muestra sin molienda, es decir, la concentración aumentó de 1.7 a 2.16 g/L. Mientras que para la yuca el incremento fue de 52 %, aumentando de 1.82 a 2.77 g/L. Por lo tanto, para las fermentaciones se utilizaron las muestras con mayor concentración de azúcares reductores, es decir betabel y yuca con 30 minutos de molienda.



**Figura 31.** Concentración de azúcares reductores en las muestras de betabel.  
\*Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey ( $p=0.05$ ).



**Figura 32.** Concentración de azúcares reductores en las muestras de yuca.

\*Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey ( $p=0.05$ )

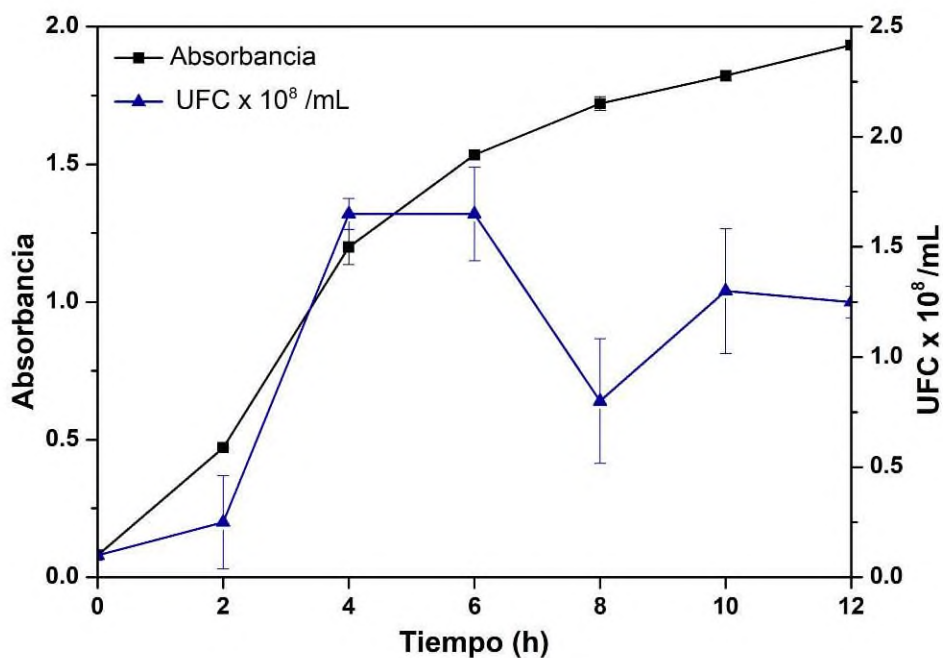
En ambas muestras se observó un incremento de la concentración de azúcares reductores a los pocos minutos de molienda y después el comportamiento varió con respecto al tiempo (Fig. 31 y 32). Este comportamiento puede estar asociado a la cantidad de energía que se libera durante la molienda mecánica. Posiblemente, al principio se presenta una modificación y posteriormente ocurre un proceso de polimerización y/o degradación de los componentes de los sustratos (Leonel *et al.*, 2014; Morrison *et al.*, 1994). Sin embargo, se requiere de más experimentos para definir correctamente el mecanismo.

## 7.6. Obtención del inóculo

Se realizó el seguimiento del crecimiento de *E. coli* en medio Luria Bertani (LB) mediante dos técnicas: por turbidimetría y por cuenta en placa (UFC/ml). Esto para determinar aumento o disminución del número de células a lo largo de tiempo. Las curvas de crecimiento de *E. coli* por ambas técnicas (figura 33) mostraron un comportamiento típico. Para la cinética seguida por turbidimetría la fase de crecimiento exponencial fue de las 0

hasta las 6 h, observando que a partir de las 6 y hasta las 8 h la pendiente disminuyó. Por otro lado, el seguimiento por cuenta en placa mostró una fase lag de 2 h, una fase exponencial de las 2 a las 4 h, una fase estacionaria de las 4 a las 6 h para después la fase de muerte. La máxima concentración obtenida fue de  $1.65 \times 10^8$  UFC/mL y se alcanzó a las 4 h (la concentración inicial fue de  $1 \times 10^8$  UFC/mL).

La diferencia entre las cinéticas seguidas por ambas técnicas se debe a que el conteo en placa mide microorganismos viables mientras que por turbidimetría se mide la acumulación de células vivas y muertas. Debido a que con ambas técnicas se observa que a las 6 h la fase de crecimiento exponencial ha finalizado se determinó este momento para la toma del inóculo. De manera general se ha observado que se debe agregar el 10% de inóculo del volumen total, de preferencia en crecimiento exponencial (Hernández, 2003).

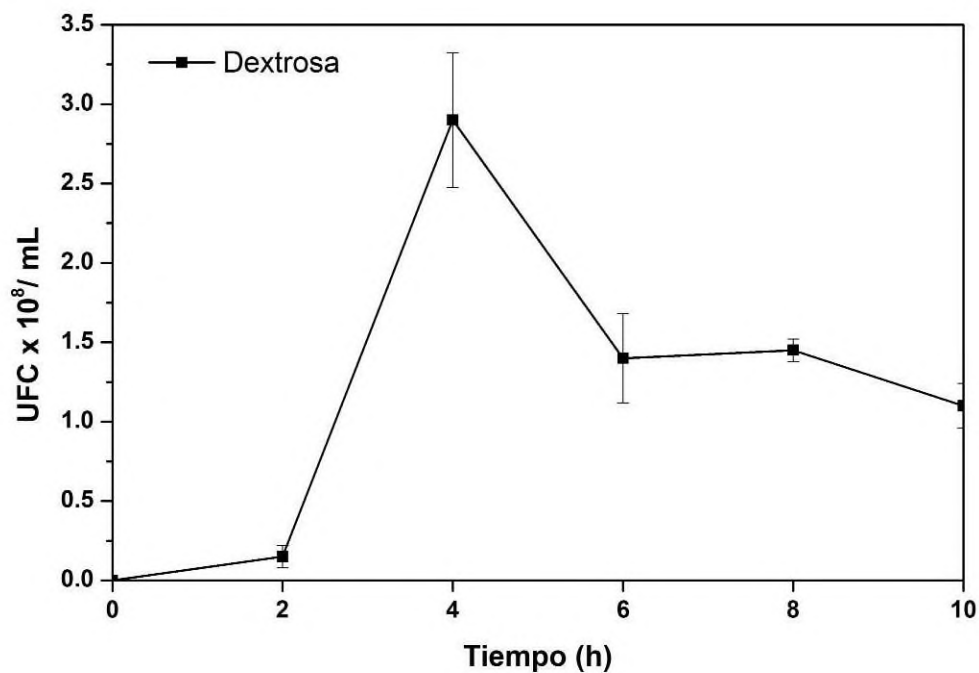


**Figura 33.** Cinética de crecimiento de *E. coli* en medio LB usando técnicas de turbidimetría y cuenta en placa (UFC/ml).

## 7.7. Fermentaciones con *E. coli*

### 7.7.1. Fermentación control en medio mineral con dextrosa como fuente de carbono

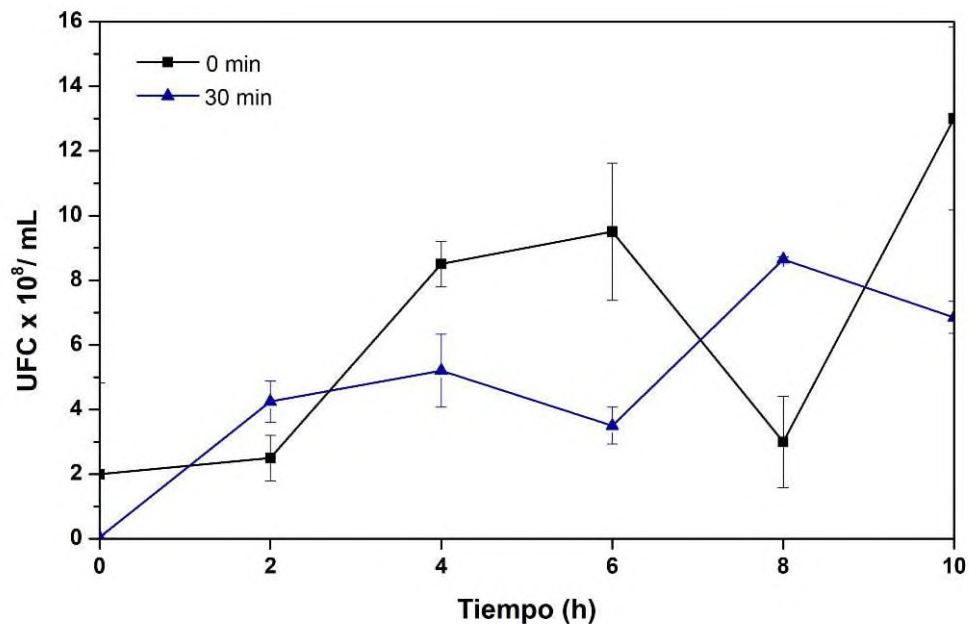
En la figura 34 se muestra la cinética de crecimiento de *E. coli* usando dextrosa como fuente de carbono. En esta fermentación se presentó una fase de latencia de las 0 a 2 h, una fase exponencial de las 2 hasta las 4 horas y a partir de las 4 horas el crecimiento comenzó a declinar. Se observó que el crecimiento máximo se obtuvo a las 4 h ( $2.9 \times 10^8$  UFC/mL). Como se puede observar el crecimiento máximo obtenido con el medio mineral con dextrosa es menor que el obtenido con el medio LB (fig. 33) Esto se debe a las diferencias en la composición de los medios.



**Figura 34.** Cinética de crecimiento de *E. coli* usando dextrosa como fuente de carbono en medio mineral.

### 7.7.2. Fermentación en medio mineral con betabel como fuente de carbono

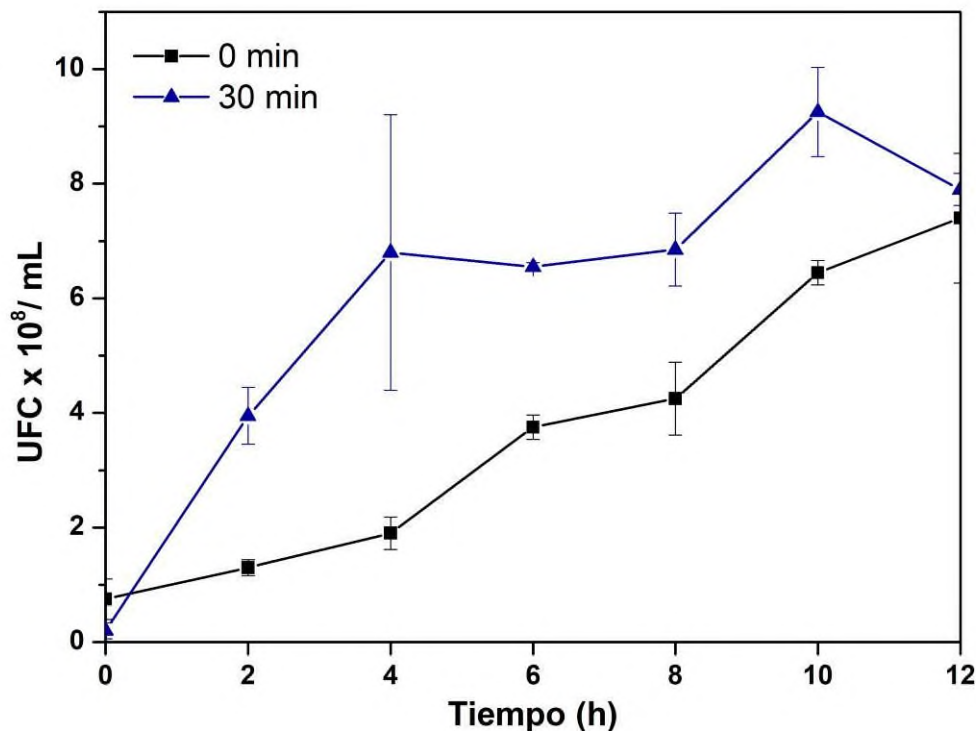
En la figura 35 se muestra la cinética de crecimiento de *E. coli* usando betabel con y sin molienda como fuente de carbono. En la fermentación con betabel sin molienda se presentó una fase de latencia de las 0 a 2 h; una fase exponencial de las 2 a las 4 h; entre las 4 y 6 h una fase de adaptación; entre las 6 y 8 h se observa una fase de muerte, y entre las 8 y 10 h se presentó una segunda fase exponencial. La máxima concentración de UFC/mL se alcanzó a las 10 h ( $13 \times 10^8$  UFC/mL). Mientras que en la fermentación usando betabel con 30 minutos de molienda como fuente de carbono (figura 35) no se presentó una fase de latencia. Se observó una fase exponencial entre las 0 y 2 h; una fase de adaptación entre las 2 y 4 h; entre las 4 y 6 h el crecimiento comienza a decaer; y entre las 6 y 8 h se presentó una segunda fase exponencial la cual comienza a decaer a partir de las 8 h. La concentración máxima de UFC se alcanzó a las 8 h ( $8.65 \times 10^8$  UFC/mL).



**Figura 35.** Cinética de crecimiento de *E. coli* usando betabel con y sin molienda como fuente de carbono en medio mineral.

### 7.7.3. Fermentación en medio mineral con yuca como fuente de carbono

En la figura 36 se muestra la cinética de crecimiento de *E. coli* usando yuca sin y con molienda como fuente de carbono. En la fermentación usando yuca sin molienda se puede observar una fase de latencia entre las 0 y 2 horas; una primera fase exponencial de las 4 a las 6 horas; entre las 6 y 8 horas una fase de adaptación; y finalmente una segunda fase exponencial entre las 8 y las 10 horas. La concentración celular máxima se alcanzó a las 10 h ( $7.4 \times 10^8$  UFC/mL). Mientras que la cinética de crecimiento usando yuca con 30 minutos no se presentó una fase de latencia. La fase exponencial se observó de las 0 hasta las 4 h, entre las 4 y 8 h se observó una fase de adaptación, entre las 8 y 10 h se presentó una segunda fase exponencial, el crecimiento disminuyó a partir de las 10 h. La concentración celular máxima se alcanzó a las 10 h ( $9.27 \times 10^8$  UFC/mL).



**Figura 36.** Cinética de crecimiento de *E. coli* usando yuca con y sin molienda como fuente de carbono en medio mineral

Como se observa en las figuras 34, 35 y 36 la fermentación utilizando dextrosa como fuente de carbono es más corta que usando betabel y yuca con y sin molienda. Esto indirectamente implica que después de las 4 h ya no hay suficiente dextrosa para que *E. coli* continúe creciendo. Por otro lado, las fermentaciones usando betabel y yuca con 30 min de molienda no presentan una fase de latencia, lo que indica que dichos sustratos son de más fácil asimilación para el microorganismo (Ramirez y Ferrat, 2005).

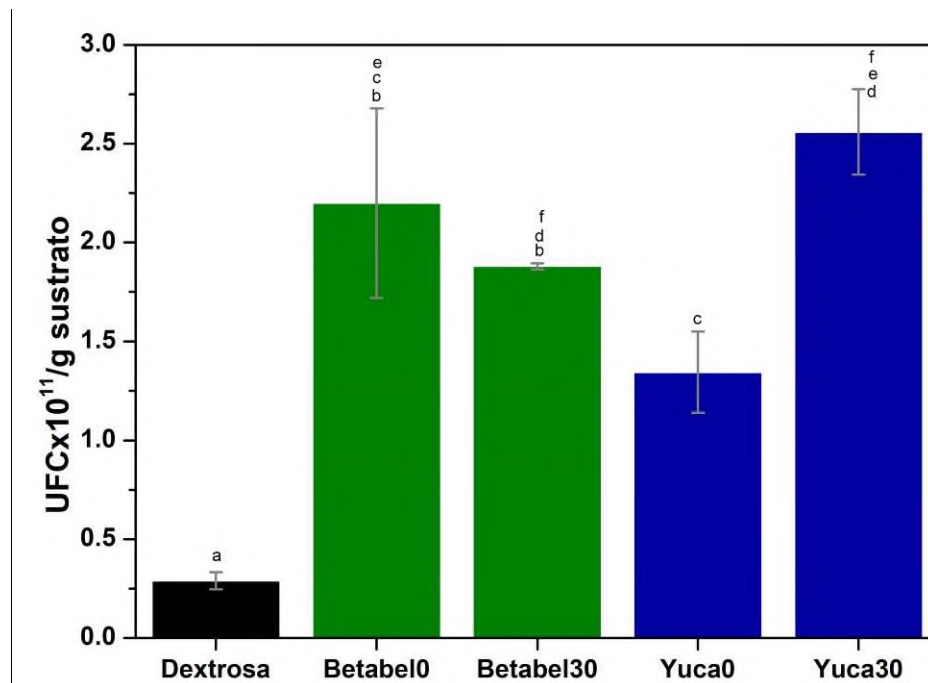
Se ha reportado que cuando están presentes dos o más sustratos limitantes (generalmente dos fuentes de carbono) estos son consumidos subsecuentemente. Por lo tanto, en la cinética de crecimiento se presentan varias fases de crecimiento exponencial separadas por fases de adaptación. A este fenómeno se le denomina crecimiento diáuxico (Görke, 2008). Es decir, el consumo de cada una de las fuentes de carbono presentes está generalmente sujeto a represión catabólica por glucosa. Esto quiere decir que la glucosa se metaboliza primero y cualquier otro azúcar que se encuentre presente será metabolizado una vez que la glucosa se agote (Hernández-Montalvo *et al.*, 2001). En las figuras 35 y 36 se observa un comportamiento diáuxico, esto puede ser un indicador que en los sustratos orgánicos betabel y yuca hay presente más de una fuente de carbono que puede ser metabolizada por *E. coli* para su crecimiento.

Cabe mencionar que estos resultados indican que el tratamiento por molienda mecánica de alta energía permitió el crecimiento de *E. coli*, generando mayor crecimiento que utilizando dextrosa para todos los casos.

#### 7.7.4. Rendimiento $Y_{x/s}$

El rendimiento ( $Y_{x/s}$ ) expresa la cantidad máxima de biomasa producida a partir del sustrato inicial. Los sustratos fermentables obtenidos de betabel y yuca (figura 37) favorecen la producción de biomasa de *E. coli* presentando un rendimiento mayor al compararlo con el control de 10 g/L de dextrosa en medio mineral.

En la gráfica 37 las letras indican diferencias significativas entre yuca 0 y yuca 30, mientras que en betabel 0 y beta 30 no se observan diferencias significativas.



**Figura 37.** Rendimiento de producción de biomasa usando dextrosa, betabel y yuca como fuentes de carbono. \*Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey ( $p=0.05$ ).

Como se observa en la figura 37, la yuca con 30 min de molienda presenta el mayor rendimiento. Esto quiere decir que por cada gramo por litro de este sustrato se obtienen  $2.56 \times 10^{11}$  UFC/L. Siendo mayor también que el rendimiento obtenido con la yuca sin molienda y con la dextrosa. Lo que indica que con el tratamiento de molienda mecánica se duplicara la cantidad de biomasa producida por gramo de sustrato. Esto podría deberse a que la molienda mecánica de alta energía rompe la estructura del almidón en oligómeros de glucosas de mayor asimilación para *E. coli*. Lo que coincide con el aumento del 53% de azúcares reductores, la presencia de glucosa y sacarosa detectada por DSC y un aumento en la solubilidad. Además de la pérdida de cristalinidad de la muestra con molienda lo que puede deberse a la disminución de la amilopectina en el almidón. Entonces, la molienda mecánica de alta energía podría estar rompiendo las cadenas de amilopectina generando cadenas de azúcares más sencillos (Urzúa, 2017).

En el betabel el rendimiento para la muestra sin molienda fue mayor en comparación con la muestra con molienda. Por lo que, aunque la molienda aumentó la concentración de azúcares reductores (28%), la solubilidad y la cristalinidad del betabel; el crecimiento de *E. coli* no fue favorecido.

De manera general los rendimientos obtenidos con betabel y yuca son mejores que los obtenidos con dextrosa. De esta manera se puede decir que la adición de estos nutrientes de bajo costo al medio provee a *E. coli* de los requerimientos necesarios para su crecimiento y para llevar a cabo sus actividades metabólicas.

Cabe mencionar que, hasta el momento, no se ha encontrado en la literatura trabajos sobre el efecto de la molienda mecánica de alta energía en la generación de azúcares reductores y evaluado su efecto como medio de cultivo en el crecimiento de algún microorganismo, tampoco se han encontrado reportes sobre el efecto de la molienda mecánica sobre el betabel, por lo cual, no es posible comparar nuestros resultados con lo reportado en la literatura.

## 8. CONCLUSIONES

La molienda mecánica de alta energía es un pretratamiento adecuado para la obtención de azúcares reductores a partir de yuca y betabel.

La molienda mecánica aumenta la solubilidad de la yuca y el betabel.

El uso de betabel y yuca, con y sin molienda como fuente de carbono en el medio de cultivo da mejores rendimientos en la producción de *E. coli*.

La molienda mecánica de alta energía de la yuca favoreció la producción de biomasa de *E. coli* mostrando un rendimiento mayor al compararlo con la dextrosa y el betabel en medio mineral.

## 9. PERSPECTIVAS

De acuerdo con los resultados obtenidos de este trabajo se proponen las siguientes recomendaciones y perspectivas:

Identificar los carbohidratos generados con los sustratos sometidos a los diferentes tiempos de molienda, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

Cuantificar la producción de hidrógeno generado durante el cultivo *E. coli* por cromatografía de gases.

Optimizar la fermentación de yuca.

Formular nuevos medios de cultivo con los sustratos obtenidos con la molienda para la producción de otros biocombustibles como el bioetanol.

Estudiar la producción de azúcares reductores mediante la molienda mecánica de alta energía de otros sustratos orgánicos y/o desechos orgánicos.

## 10. BIBLIOGRAFIA

- Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. (2004). Producción Agrícola. Recuperado Octubre 2, 2018, de [http://infosiap.siap.gob.mx/agricola\\_siap\\_gb/identidad/index.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/agricola_siap_gb/identidad/index.jsp)
- Alban A., Narvaez R., Madriñan R., Cadavid F., Y Ospina B. (2004). Efecto del uso de fertilizantes órgano-minerales y minerales en la producción sostenible de yuca. VOL. 53 Acta Agro económica. [www.ciat.cgiar.org](http://www.ciat.cgiar.org).
- Álvarez, J. A., Otero, L., & Lema, J. M. (2010). A methodology for optimising feed composition for anaerobic co-digestion of agro-industrial wastes. *Bioresource Technology*, 101(4), 1153–1158.
- Andrade, L., Barbosa, N., Pereira, J. (2017). Extraction and properties of starches from the non-traditional vegetables yam and taro. *Polímeros*. 27, 151-157.
- Aristizábal, J., & Sánchez, T. (2007). Guía técnica para producción y análisis de almidón de yuca. Fao, 163, 134.
- Ascher, M., Vega, O., Ganduglia, F., Jamil, M., & Abreu, F. (2010). América Latina y el Caribe. Mapeo político-institucional y análisis de la competencia entre producción de alimentos y bioenergía. IICA.
- Baláž, P., Dutková(Godočíková, E., Takacs, L., & Gock, E. (2005). Mechanochemical preparation of metal/sulphide nanocomposite particles. *International Journal of Materials and Product Technology* (Vol. 23).
- Bolio-López, G. I., Valadez-González, A., Veleza, L., & Andreeva, A. (2011). Whiskers de celulosa a partir de residuos agroindustriales de banano: Obtención y caracterización. *Revista Mexicana de Ingeniera Química*, 10(2), 291–299.
- Böck A., Sawers G. (1996). Fermentation: En *Escherichia coli* and Salmonella. Celular and molecular biology. Eds. Neidhardt et al., *American Society for Microbiology*. Press Washington D.C. I: 262-282.
- Buitrago, A.J.A. (1990). La yuca en la alimentación animal. Centro Internacional de Agricultural Tropical (CIAT), Cali, Colombia p. 446.
- Carlos, J. (2010). *Instituto Politécnico Nacional*. <http://tesis.ipn.mx:8080/xmlui/handle/123456789/19713>
- Carrillo, L. (2004). *Energía de Biomasa*. S.S Jujuy. [http://www.ingeborda.com.ar/biblioteca/Biblioteca Internet/Articulos Tecnicos de Consulta/Plantas de Tratamientos/Energia de biomasa.pdf](http://www.ingeborda.com.ar/biblioteca/Biblioteca%20Internet/Articulos%20Tecnicos%20de%20Consulta/Plantas%20de%20Tratamientos/Energia%20de%20biomasa.pdf)

- Castillo Rodríguez, F., Roldán, M., Blasco Plá, R., Huertas, M., Caballero, F., Conrado Moreno, V., & Martínez Luque, M. (2005). *Biotecnología ambiental*. Madrid: Tébar. pp. 123–150.
- Ceballos, H., & De La Cruz, G. (2002). Taxonomía y morfología de la yuca. *La yuca en el tercer mundo*, 15–32.
- Chang, D. E., Jung, H. C., Rhee, J. S., & Pan, J. G. (1999). Homofermentative production of D- or L-lactate in metabolically engineered *Escherichia coli* RR1. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4), 1384–1389.
- Clotet R, Díaz N. (1995). Cinética de la caramelización en soluciones azucaradas simples. *Alimentaria*. 259(1):35-38.
- Cock, J. (1989). *Cassava: New Potential for a Neglected Crop*. Westview Press, Boulder.
- Córdoba, J., Sayagues, M., M.D, A., & J. Gotor, F. (2007). Monophasic Nanostructured Powders of Niobium, Tantalum, and Hafnium Carbonitrides Synthesized by a Mechanically Induced Self-Propagating Reaction. *Journal of the American Ceramic Society* (Vol. 90).
- Covert, M. W., Xiao, N., Chen, T. J., & Karr, J. R. (2008). Integrating metabolic, transcriptional regulatory and signal transduction models in *Escherichia coli*. *Bioinformatics*, 24(18), 2044–2050.
- Davila-Vazquez, G., Arriaga, S., Alatraste-Mondragón, F., De León-Rodríguez, A., Rosales-Colunga, L. M., & Razo-Flores, E. (2008). Fermentative biohydrogen production: Trends and perspectives. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 7(1), 27-45.
- Dincer, I. (2000). Renewable energy and sustainable development: a crucial review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 4(2), 157–175.
- Diop, C. I. K., Li, H. L., Chen, P., & Xie, B. J. (2012). Properties of maize starch modified by ball milling in ethanol medium and low field NMR determination of the water molecular mobility in their gels. *Journal of Cereal Science*, 56(2), 321–331.
- Elbeshbishy, E., Nakhla, G., & Hafez, H. (2012). Biochemical methane potential (BMP) of food waste and primary sludge: Influence of inoculum pre-incubation and inoculum source. *Bioresource Technology*, 110, 18–25.
- Fajardo E. & Sarmiento, S. (2007). Evaluación de Melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae* (tesis de licenciatura). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C.
- Ferrer, J. R. & José L. (2014). Fermentación en estado sólido: una alternativa biotecnológica

para el aprovechamiento de desechos agroindustriales. Revista tecno científica URU – Universidad Rafael Urdaneta, Facultad de Ingeniería.

- Flores Farías, R. (2004). Efecto de la incorporación de fibra dietética de diferentes fuentes sobre propiedades de textura y sensoriales en tortillas de maíz (*Zea mays L.*). 13(6), 20–26.
- Galliard, T. & Bowler, P. (1987). Morphology and composition of starch, in *Starch Properties and Potential*. 55–78.
- García-Peña, E. I., Guerrero-Barajas, C., Ramirez, D., & Arriaga-Hurtado, L. G. (2009). Semi-continuous biohydrogen production as an approach to generate electricity. *Bioresource Technology*, 100(24), 6369–6377.
- Gram, C. (1884). The differential staining of Schizomycetes in tissue sections and in dried preparations. *Fortschritte der Medizin*, 2, 185-9.
- Granados C, Clemente et al. (2014). Propiedades funcionales del almidón de Sagu (*Maranta arundinacea*). *Rev.Bio.Agro* [online]. vol.12, n.2 pp.90-96.
- Gómez, X., Fernández, C., Fierro, J., Sánchez, M. E., Escapa, A., & Morán, A. (2011). Hydrogen production: Two stage processes for waste degradation. *Bioresource Technology*, 102(18), 8621–8627.
- Görke, B., & Stülke, J. (2008). Carbon catabolite repression in bacteria: Many ways to make the most out of nutrients. *Nature Reviews Microbiology*.
- Gunaratne, A., & Hoover, R. (2002). Effect of heat-moisture treatment on the structure and physicochemical properties of tuber and root starches. *Carbohydrate Polymers*, 49(4), 425–437.
- He, S., Qin, Y., Walid, E., Li, L., Cui, J., & Ma, Y. (2014). Effect of ball-milling on the physicochemical properties of maize starch. *Biotechnology Reports*, 3, 54–59.
- Hernández, A.; Alfaro, I. & Arrieta, R. (2003). Microbiología industrial. Ed. Universidad Estatal a Distancia.
- Hernández, E., Heyden, D. vander, Bron, W., & Elvir, C. (2008). Estudio comparativo de la legislación latinoamericana sobre biocombustibles. 1a Ed. Servicio holandés de cooperación al desarrollo SNV.
- Hernández-Montalvo V., Valle F., Bolívar F., Gosset G. (2001). Characterization of sugar mixtures utilization by an *Escherichia coli* mutant devoid of the phosphotransferase system. *Microbiol Biotechnol*. 57:186-191.
- Hernández-Rojas, María Elena; Vázquez-Huerta, Gerardo; Dávila-Gómez, José Ángel. (2012). Fermentación anaerobia para la producción de biohidrógeno en un reactor

- UASB mediante la ruta del etanol. *Revista Cubana de Química*, vol. XXIV, núm. 3, 207-211.
- Huang, Z.-Q., Xie, X., Chen, Y., Lu, J., & Tong, Z.-F. (2008). Ball-milling treatment effect on physicochemical properties and features for cassava and maize starches. *Comptes Rendus Chimie*, 11(1), 73–79.
- Ishizawa, C. I., Davis, M. F., Schell, D. F., & Johnson, D. K. (2007). Porosity and its effect on the digestibility of dilute sulfuric acid pretreated corn stover. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(7), 2575–2581.
- Juarez-Arellano, E. A., Kakazey, M., Vlasova, M., Urquiza-Beltran, G., Aguilar-Franco, M., Bokimi, X., Martinez, E., *et al.* (2010). Microstructural evolution in BaO–Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>–Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> mixtures during high-energy milling and its role in the formation of Y<sub>x</sub>Ba<sub>1-x</sub>CoO<sub>3-δ</sub> and YBaCo<sub>4</sub>O<sub>7</sub>. *Journal of Alloys and Compounds*, 492(1), 368–372.
- Junco- Díaz R. (2001). Cultivo y crecimiento de los microorganismos. In book: *Microbiología y Parasitología Médicas*, Edition: 1, Chapter: 7, Publisher: Ciencias Médicas, 45-54.
- Kim, K. W., Lee, B. H., Kim, H. J., Sriroth, K., & Dorgan, J. R. (2012). Thermal and mechanical properties of cassava and pineapple flours-filled PLA bio-composites. *In Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 108, 1131–1139.
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial and Engineering Chemistry Research*.
- Loubes, M. A., & Tolaba, M. P. (2014). Thermo-mechanical rice flour modification by planetary ball milling. *LWT - Food Science and Technology*, 57(1), 320–328.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P. (2009). *Brock Biology of Microorganisms*. 12a Ed. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco.
- Martinelli, Hernán; Riglos, Victoria & Puszkiele, Julián. (2018). Estudio y caracterización del efecto de compuestos con titanio sobre el sistema hidruro Li-B-Mg-H con alta capacidad de almacenamiento de hidrógeno. *Matéria (Rio J.)* [online]. 2018, vol.23, n.2.
- Marquez, G., & Añon, M. C. (1986). Influence of Reducing Sugars and Amino Acids in the Color Development of Fried Potatoes. *Journal of Food Science*, 51(1), 157–160.
- Mathews, J., & Wang, G. (2009). Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(17), 7404–7416.
- Mathot, V. (1994). *Calorimetry and Thermal Analysis of polimers*. Ed. Hanser/Gardner.
- Muñoz, F. E. C. (2005). Importancia de la Proteosa Peptona No 3 en la Producción de

Pigmento por *Streptococcus agalactiae* en el Medio.

- Nakano, M. M., & Zuber, P. (1998). Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). *Annual review of microbiology*, 52, 165–190.
- Newell, R.G., Fischer, C. (2008) Environmental and technology policies for climate mitigation, *Journal of Environmental Economics and Management*. 142–162.
- Nottingham S. (2004). Beetroot. 2a. ed. Ed. Quarterman, EUA. 148 p.
- Oliva, J.M. (2003). Efectos de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Ospina, B.; Ceballos, H.; Alvarez, E.; Bellotti, A.C.; Calvert, L.A.; Arias V.; Cadavid, L.F; Pineda, B.; Llano, G.A.; Cuervo, M. (2002). La yuca en el Tercer Milenio: Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT); Consorcio Latinoamericano para la Investigación y el Desarrollo de la Yuca; Proyecto IP-3 de Mejoramiento de Yuca, Cali, CO. 586 p. (Publicación CIAT no. 327)
- Pritchard, M. K., & Adam, L. R. (1994). Relationships between fry color and sugar concentration in stored Russet Burbank and Shepody potatoes. *American Potato Journal*, 71(1), 59–68.
- Rodionov, D. A., Mironov, A. A., & Gelfand, M. S. (2001). Transcriptional regulation of pentose utilisation systems in the *Bacillus/Clostridium* group of bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 205(2), 305–314.
- Ramírez Santos, J., Contreras Ferrat, G., & Gómez Eichelmann, M. C. (2005). La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*.
- Ramos, H. C., Hoffmann, T., Marco Marino, Hafed Nedjari, E. P.-S., Dreesen, O., Philippe Glaser, D. J., & Hoffmann, T. (2000). Fermentative Metabolism of *Bacillus subtilis*: Physiology and Regulation of Gene Expression. *Journal of Bacteriology*, 182(11), 3072–3080.
- Raposo, F., De La Rubia, M. A., Fernández-Cegrí, V., & Borja, R. (2012). Anaerobic digestion of solid organic substrates in batch mode: An overview relating to methane yields and experimental procedures. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(1), 861–877.
- Raposo, F., Fernández-Cegrí, V., De la Rubia, M., Borja, R., Béline, F., Cavinato, C., Demirer, G., Fernández, B., Fernández-Polanco, M., Frigon, J., Ganesh, R., Kaparaju, P., Koubova, J., Méndez, R., Menin, G., Peene, A., Scherer, P., Torrijos, M.,

- Uellendahl, H., Wierinck, I. and de Wilde, V. (2011). Biochemical methane potential (BMP) of solid organic substrates: Evaluation of anaerobic biodegradability using data from an international interlaboratory study. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 86(8), 1088–1098.
- Saavedra-Leos, M. Z., Alvarez-Salas, C., Esneider-Alcalá, M. A., Toxqui-Terán, A., Pérez-García, S. A., & Ruiz-Cabrera, M. A. (2012). Towards an improved calorimetric methodology for glass transition temperature determination in amorphous sugars. *CYTA - Journal of Food*, 10(4), 258–267.
- Saavedra-Leos, M. Z., Grajales-Lagunes, A., González-García, R., Toxqui-Terán, A., Pérez-García, S. A., Abud-Archila, M. A., & Ruiz-Cabrera, M. A. (2012). Glass Transition Study in Model Food Systems Prepared with Mixtures of Fructose, Glucose, and Sucrose. *Journal of Food Science*, 77(5).
- Salcedo Mendoza, J., Mercado B, J. L., Vanegas B, M., Fernández Q, A., & Vertel M, M. L. (2014). Cinética de secado de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) variedad CORPOICA M-tai en función de la temperatura y de la velocidad de aire. *Revista ION [S.l.]*, 27(2):29–42.
- Sathe, S. K., & Salunkhe, D. K. (1981). Isolation, Partial Characterization and Modification of the Great Northern Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Starch. *Journal of Food Science*, 46(2), 617–621.
- Sawers, R. G. (2005). Formate and its role in hydrogen production in *Escherichia coli*. *Biochemical Society transactions*, 33(Pt 1), 42–46.
- Schlegel, H. (1997). Microbiología general. General pharmacology (Vol. 27).
- Shuler, M. L., & Kargi, F. (2002a). Bioprocess engineering: Basic concepts. Prentice Hall.
- Somerville, Chris. (2006). The Billion-Ton Biofuels Vision. *Science* (New York, N.Y.). 312. 1277. 10.1126/science.1130034.
- Skoog, D. & Leary J. (2001). Fundamentos de análisis instrumental. Ed. McGraw-Hill. Quinta Edición, México.
- Stanier, R.Y., Ingraham, J.L., Wheelis, M.L., Painter, P.R. (1992). Microbiología 2. Ed. Reverté S.A., Barcelona.
- Steinmetz M. (1993). Carbohydrate catabolism: pathways, enzymes, genetic regulation, and evolution. In *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics. 157–70. Washington.
- Strezov, V., Moghtaderi, B., & Lucas, J. A. (2003). Thermal study of decomposition of selected biomass samples. In *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 72, pp.

1041–1048.

- Stülke, J., & Hillen, W. (2000). Regulation of Carbon Catabolism in *Bacillus* Species. *Annual Review of Microbiology*, 54(1), 849–880.
- Suárez L. & V. Mederos. (2011). Apuntes sobre el cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Tendencias actuales. Cultivos tropicales. 32 (3). Pp. 27-35.
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83(1), 1–11.
- Tran, K. T., Maeda, T., & Wood, T. K. (2014). Metabolic engineering of *Escherichia coli* to enhance hydrogen production from glycerol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(10), 4757–4770.
- Urzúa, V. M. (2017). Transformación mecánica de alta energía de sustratos orgánicos con posible uso en medios de cultivo (tesis de licenciatura). Universidad del Papaloapan, Tuxtepec, Oaxaca.
- Van Holde, K. E.; Johnson, W. C.; Ho, P. S. (2006). Principles of physical biochemistry.
- Van Niel, E. W. J., Budde, M. A. W., de Haas, G. G., van der Wal, F. J., Claassen, P. A., & Stams, A. J. M. (2002). Distinctive properties of high hydrogen producing extreme thermophiles, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga elfii*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11), 1391–1398.
- Vardar-Schara, G., Maeda, T., & Wood, T. K. (2008). Metabolically engineered bacteria for producing hydrogen via fermentation. *Microbial Biotechnology*.
- Villalpando, O. A. A. (2008). Biocombustibles: una mirada a la coyuntura de 2007, 100–105.
- Worzakowska, M., & Torres-García, E. (2017). The effect of the grafting percentage of starch-g-poly(phenyl acrylate) copolymers on their pyrolysis and kinetics studied by the TG/DSC/FTIR/QMS-coupled method. *Polymer Degradation and Stability*, 139.
- Worzakowska, M., Torres-García, E., & Grochowicz, M. (2015). Degradation kinetics of starch-g-poly(phenyl methacrylate) copolymers. *Thermochimica Acta*, 619, 8–15.
- Wünschiers, R., & Lindblad, P. (2002). Hydrogen in education-a biological approach. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11–12), 1131–1140.
- Yadvika, Santosh, Sreekrishnan, T. R., Kohli, S., & Rana, V. (2004). Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques-A review. *Bioresource Technology*. 95(1):1-10.