



**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN**

*Terra uberrima, mens aperta.*

Bou Lo-tama, chí jí jú

CAMPUS TUXTEPEC

## **INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

### **TESIS**

# **TRANSFORMACIÓN MECÁNICA DE ALTA ENERGÍA DE SUSTRATOS ORGÁNICOS CON POSIBLE USO EN MEDIOS DE CULTIVO**

Para obtener el título:

Ingeniero en Biotecnología

Presenta:

Michell Urzúa Valenzuela

Director de Tesis

Co-Director de Tesis

Dra. Ana Karin Navarro Martinez

Dr. Erick Adrián Juárez Arellano



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 23 de Junio del 2017 a las 12:00 hr, se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la jefatura de la carrera de **Ingeniería en Biotecnología** de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada **Transformación mecánica de alta energía de sustratos orgánicos con posible uso en medios de cultivo** presentado por la alumna **Michell Urzúa Valenzuela**, con número de matrícula **11090026**, aspirante al título de **Licenciatura**.

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron **QUE LA TESIS SATISFACE LOS REQUISITOS SEÑALADOS POR LAS DISPOSICIONES REGLAMENTARIAS VIGENTES, OTORGANDO SU APROBACIÓN PARA QUE EL ASPIRANTE PUEDA PROCEDER CON EL PROCESO DE TITULACIÓN.**

Tuxtepec, Oax., a 23 de Junio del 2017.

### ATENTAMENTE. LA COMISIÓN REVISORA

Director de Tesis

Dra. Ana Karin Navarro Martinez  
Profesor- Investigador

Co-Director de Tesis

Dr. Erick Adrián Juárez Arellano  
Profesor- Investigador

Presidente

Dr. Omar Viñas Bravo  
Profesor- Investigador

Secretario

Dra. Rubí Guadalupe Utrilla Coello  
Profesor-Investigador

Vocal

Dr. Adolfo López Torres  
Profesor- Investigador



# Universidad del Papaloapan

ÁREA:	VICE RECTORIA ACADEMICA
OFICIO NÚMERO:	UNPA/VRA/267/2017
ASUNTO:	IMPRESIÓN DE TRABAJO DE TESIS

Tuxtepec, Oax., a 26 de junio del 2017.

**M.E. YESENIA BARRIENTOS ARENAL**  
 JEFA DEL DEPARTAMENTO DE  
 SERVICIOS ESCOLARES.  
 UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN  
 PRESENTE

Con base al dictamen de la comisión revisora se autoriza la impresión del trabajo de tesis de la alumna C. Michell Urzúa Valenzuela con número de matrícula 11090026 de la carrera de Ingeniería en Biotecnología titulado "Transformación mecánica de alta energía de sustratos orgánicos con posible uso en medios de cultivo". Para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación para tal fin.

Esperando contar con su valioso apoyo, sin más por el momento le envío un cordial saludo.



Atentamente  
*terra uberrima, mens aperta*  
*Bou lo tama, chi ji jú*

M. EN C. HÉCTOR LÓPEZ ARIONA  
 VICE-RECTOR ACADÉMICO  
 UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN



JEFATURA DE INGENIERIA  
 EN BIOTECNOLOGIA  
 CAMPUS TUXTEPEC

*Keabi*  
*26 Jun 17*  
*13:32*

C.c.p. Archivo.

## AGRADECIMIENTOS

*La vida comienza donde termina el miedo.*  
**Osho**

A mis directores de tesis la Dra. **A. Karin Navarro** y al Dr. **Erick A. Juárez** por confiar en mí y brindarme la oportunidad de realizar este trabajo junto a ustedes, y más que nada por ser mis jefes y amigos.

A mis padres **Mercedes Valenzuela** y **Plutarco Urzúa** porque sin su apoyo, amor y regaños no sería lo que soy hoy. Gracias por estar ahí siempre.

A **Dafne, Grecia** y **Hannia** porque sin ellas nada de esto sería posible, por soportarme en los días que ni yo lo hacía. No me queda más que agradecerles por tantos momentos.

A mis sinodales por todos esos buenos consejos y accesibilidad. Al Dr. **Omar Viñas** gracias por rescatarme en esos momentos cuando la frustración me invadía y por las golosinas. Dr. **Adolfo López** por todas las enseñanzas y Dra. **Rubí Utrilla** por volverme almidonera.

Aquellos amigos entrañables sin los cuales mis días de universidad no hubieran sido lo mismo; a mis gordas **Perla Cruz, Goretty del Carmen** y **Anita Gómez**, por enseñarme a guardar distancia cuando es necesario y que lo primero es lo primero y lo segundo es lo segundo, bueno y uno que otro NO PUEDE JER.

A la Dra. **Sandra del Moral** (Evil) porque con usted aprendí que no importa la edad si realmente eres mala, lo eres desde pequeña. Gracias por ser una gran amiga y consejera. Al Dr. **Mario Valera** por siempre animarme a hacer más, seguir adelante y luchar por mis metas.

A la súper chiquibanda **Crisanto Roldan, Alain Nolasco, Erick Manzano, Alán Gómez, Daniel Sosa** (apache), **Luis Uribe, Guadalupe Sánchez** y **Lizzette Morales** por escucharme y ser grandes amigos que espero duren toda TODA la vida, aunque se coticen son y serán siempre mis amigos de patoaventuras y desvelos.

**Miguel Ángel Peña** por tus sabios consejos y gran apoyo en momentos difíciles, así como animarme cuando ya no quería nada.

A mis compañeros por que todo es un trabajo en equipo gracias Generación 2011-2016 así como a todos los profesores que aportaron un poquito de su conocimiento para mi desarrollo.

# Índice

RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	4
2.1. Generalidades de los medios de cultivo.....	4
2.2. Sustratos orgánicos no convencionales.....	5
2.3. Almidón.....	7
2.3.1. Amilosa.....	8
2.3.2. Amilopectina.....	9
2.4. Pretratamientos para los sustratos no convencionales.....	10
2.4.1. Métodos químicos.....	11
2.4.1.1. Oxidación.....	11
2.4.1.2. Acetilación.....	11
2.4.1.3. Hidrólisis ácida.....	11
2.4.1.4. Ozono.....	12
2.4.2. Método enzimático.....	12
2.4.3. Métodos físicos.....	12
2.4.3.1. Microondas.....	12
2.4.3.2. Altas presiones.....	13
2.5. Molienda mecánica de alta energía.....	13
2.5.1. Molino planetario de bolas.....	13
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
IV. JUSTIFICACIÓN.....	16
V. HIPÓTESIS.....	17
VI. OBJETIVOS.....	18
6.1. Objetivo general.....	18
6.2. Objetivos específicos.....	18
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19

7.1.	Obtención de los sustratos orgánicos.....	19
7.1.1.	Soya ( <i>Glycine max</i> ).....	19
7.1.2.	Harina de yuca ( <i>Manihot esculenta</i> ).....	19
7.1.3.	Almidón de plátano ( <i>Musa paradisiaca L.</i> ).....	19
7.1.4.	Almidón de frijol ( <i>Phaseolus vulgaris L.</i> ).....	20
7.1.5.	Almidón de jinicuil ( <i>Inga jinicuil</i> ).....	20
7.2.	Molienda mecánica de alta energía.....	21
7.2.1.	Molino Pulverisette 7 premium line marca Fritsch .....	21
7.2.2.	Molino PM 400/2 marca Retsch .....	22
7.3.	Técnicas analíticas .....	23
7.3.1.	Determinación de azúcares reductores .....	23
7.3.1.1.	Hidrólisis ácida.....	24
7.3.2.	Índice de solubilidad y perfil de hinchamiento.....	24
7.4.	Caracterización de los sustratos .....	25
7.4.1.	Microscopia electrónica de barrido.....	25
7.4.2.	Difracción de rayos X.....	25
7.4.3.	Análisis termogravimétrico y análisis térmico diferencial .....	25
VIII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	26
8.1.	Determinación de azúcares reductores.....	26
8.1.1.	Soya.....	26
8.1.1.1.	Molienda mecánica de alta energía con molino Pulverisette 7 .....	27
8.1.1.2.	Molienda mecánica de alta energía con el molino PM 400/2 .....	32
8.1.2.	Harina de yuca (HY).....	34
8.1.3.	Almidón de plátano (AP).....	35
8.1.4.	Almidón de frijol (AF).....	36
8.1.5.	Almidón de jinicuil (AJ).....	37
8.2.	Índice de solubilidad y perfil de hinchamiento.....	39
8.2.1.	Harina de yuca (HY).....	39
8.2.2.	Almidón de plátano (AP).....	40
8.2.3.	Almidón de frijol (AF).....	41
8.2.4.	Almidón de jinicuil (AJ).....	42
8.3.	Microscopia electrónica de barrido (MEB) .....	44

8.3.1. Soya.....	44
8.3.2. Harina de yuca (HY).....	49
8.3.3. Almidón de plátano (AP).....	50
8.3.4. Almidón de frijol (AF).....	51
8.3.5 Almidón de jinicuil (AJ).....	52
8.4. Difracción de rayos-X (DRX).....	53
8.4.1. Soya.....	53
8.4.2. Harina de yuca (HY).....	56
8.4.3. Almidón de plátano (AP).....	57
8.4.4. Almidón de frijol (AF).....	58
8.4.5. Almidón de jinicuil (AJ).....	59
8.5. Análisis termogravimétrico (TGA) y térmico diferencial (DTA).....	61
8.5.1. Soya.....	61
8.5.2. Harina de yuca (HY).....	62
8.5.3. Almidón de plátano (AP).....	63
8.5.4. Almidón de frijol (AF).....	64
8.5.5. Almidón de jinicuil (AJ).....	65
IX. CONCLUSIONES .....	68
X. PERSPECTIVAS DE TRABAJO .....	69
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura química de la amilosa.....	9
<b>Figura 2.</b> Estructura química de la amilopectina. ....	10
<b>Figura 3.</b> Mecanismo del molino planetario de bolas.....	14
<b>Figura 4.</b> Molino planetario de bolas Pulverisette 7 premium line marca Fritsch.....	22
<b>Figura 5.</b> Molino planetario de bolas PM 400/2 marca Retsch. ....	23
<b>Figura 6.</b> Concentración de azúcares reductores de soya antes y después de la hidrólisis ácida. 26	
<b>Figura 7.</b> Concentración de azúcares reductores de soya entera y soya triturada a diferentes tiempos de molienda utilizando carburo de tungsteno como material de molienda.....	28
<b>Figura 8.</b> Concentración de azúcares reductores de soya entera y soya triturada a diferentes tiempos de molienda utilizando hierro como material de molienda.....	29
<b>Figura 9.</b> Concentración de azúcares reductores de soya entera y soya triturada a diferentes tiempos de molienda utilizando nitruro de silicio como material de molienda.....	30
<b>Figura 10.</b> Concentración de azúcares reductores de soya entera con molino PM 400/2 a diferentes tiempos con 9 bolas de 20 mm de hierro .....	32
<b>Figura 11.</b> Concentración de azúcares reductores en soya entera con diferentes tiempos de molienda en dos tipos de molinos planetarios de bolas. ....	33
<b>Figura 12.</b> Concentración de azúcares reductores en harina de yuca a diferentes tiempos de molienda.....	34
<b>Figura 13.</b> Concentración de azúcares reductores en almidón de plátano a diferentes tiempos de molienda.....	35
<b>Figura 14.</b> Concentración de azúcares reductores en almidón de frijol a diferentes tiempos de molienda.....	36
<b>Figura 15.</b> Concentración de azúcares reductores en almidón de jinicuil a diferentes tiempos de molienda.....	37
<b>Figura 16.</b> Patrones de solubilidad e hinchamiento de la harina de yuca. ....	40
<b>Figura 17.</b> Patrones de solubilidad e hinchamiento del almidón de plátano.....	41
<b>Figura 18.</b> Patrones de solubilidad e hinchamiento del almidón de frijol. ....	42
<b>Figura 19.</b> Patrones de solubilidad e hinchamiento del almidón de jinicuil. ....	43
<b>Figura 20.</b> Microscopia electrónica de barrido de la soya. ....	44

<b>Figura 21.</b> Micrografías de soya entera modificada en el molino Pulverisette 7 con 15 bolas de 10 mm de hierro a diferentes tiempos: 5, 10 y 20 min. ....	46
<b>Figura 22.</b> Micrografías de soya entera modificada en el molino Pulverisette 7 con 15 bolas de 10 mm de hierro durante 10 min.....	47
<b>Figura 23.</b> Micrografías de soya entera modificada en el molino PM 400/2 con 9 bolas de 20 mm de hierro a diferentes tiempos: 2, 4, 8 y 10 min.....	48
<b>Figura 24.</b> Micrografías de almidón y harina de yuca. ....	50
<b>Figura 25.</b> Micrografías de almidón de plátano antes y después de modificar en el molino PM 400/2 a diferentes tiempos: 2, 8 y 20 min. ....	51
<b>Figura 26.</b> Micrografías de almidón de frijol sin molienda . ....	52
<b>Figura 27.</b> Micrografías de almidón de jinicuil sin molienda mecánica.....	52
<b>Figura 28.</b> Micrografías de almidón de jinicuil con 20 min de molienda en el molino PM 400/2 con 9 bolas de 20 mm de hierro. ....	53
<b>Figura 29.</b> Difractogramas de rayos X de soya antes y después de modificar en el molino Pulverisette 7 a diferentes tiempos con carburo de tungsteno como material de molienda. ....	54
<b>Figura 30.</b> Difractogramas de rayos X de soya antes y después de modificar en el molino Pulverisette 7 a diferentes tiempos con 4 bolas de 20 mm de hierro como material de molienda.	54
<b>Figura 31.</b> Difractogramas de rayos X de soya antes y después de modificar en el molino PM 400/2 a diferentes tiempos con 9 bolas de 20 mm de hierro como material de molienda .....	55
<b>Figura 32.</b> Difractogramas de rayos X de harina de yuca antes y después de modificar en el molino PM 400/2 a diferentes tiempos .....	57
<b>Figura 33.</b> Difractogramas de rayos X de almidón de plátano antes y después de modificar en el molino PM 400/2 a diferentes tiempos .....	58
<b>Figura 34.</b> Difractogramas de rayos X de almidón de frijol antes y después de modificar en el molino PM 400/2 a diferentes tiempos .....	59
<b>Figura 35.</b> Difractogramas de rayos X de almidón de jinicuil antes y después de modificar en el molino PM 400/2 a diferentes tiempos .....	60
<b>Figura 36.</b> Termogramas de soya antes y después de modificar en el molino PM 400/2 a diferentes tiempos.....	62
<b>Figura 37.</b> Termogramas de harina de yuca antes y después de modificar en el molino PM 400/2 a diferentes tiempos. ....	63

<b>Figura 38.</b> Termogramas de almidón de plátano antes y después de modificar en el molino PM 400/2 a diferentes tiempos. ....	64
<b>Figura 39.</b> Termogramas de almidón de frijol antes y después de modificar en el molino PM 400/2 a diferentes tiempos. ....	65
<b>Figura 40.</b> Termogramas de almidón de jinicuil antes y después de modificar en el molino PM 400/2 a diferentes tiempos con 9 bolas de 20 mm de hierro. ....	66

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de medios de cultivo en función de composición nutricional. ....	4
<b>Tabla 2.</b> Sustratos constituyentes de medios de cultivo utilizados industrialmente. ....	7
<b>Tabla 3.</b> Diferencias entre los molinos planetarios de bolas utilizados. ....	21
<b>Tabla 4.</b> Muestras con mayor contenido de azúcares reductores después de hidrólisis ácida y de molienda mecánica a diferentes tiempos. ....	31
<b>Tabla 5.</b> Máxima concentración de azúcares reductores obtenidas por molienda mecánica de alta energía de los sustratos orgánicos analizados en este trabajo. ....	39
<b>Tabla 6.</b> Índice de solubilidad a diferentes temperaturas de las muestras sin molienda y con el tiempo de molienda mecánica que alcanzó la mayor concentración de azúcares reductores. ....	43

## ABREVIATURAS

<b>AF</b>	Almidón de frijol
<b>AF2</b>	Almidón de frijol con molienda mecánica de 2 minutos
<b>AF5</b>	Almidón de frijol con molienda mecánica de 5 minutos
<b>AF8</b>	Almidón de frijol con molienda mecánica de 8 minutos
<b>AF10</b>	Almidón de frijol con molienda mecánica de 10 minutos
<b>AF20</b>	Almidón de frijol con molienda mecánica de 20 minutos
<b>AJ</b>	Almidón de jinicuil
<b>AJ2</b>	Almidón de jinicuil con molienda mecánica de 2 minutos
<b>AJ5</b>	Almidón de jinicuil con molienda mecánica de 5 minutos
<b>AJ8</b>	Almidón de jinicuil con molienda mecánica de 8 minutos
<b>AJ10</b>	Almidón de jinicuil con molienda mecánica de 10 minutos
<b>AJ20</b>	Almidón de jinicuil con molienda mecánica de 20 minutos
<b>AJ20</b>	Almidón de jinicuil con molienda mecánica de 20 minutos
<b>AP</b>	Almidón de plátano
<b>AP2</b>	Almidón de plátano con molienda mecánica de 2 minutos
<b>AP5</b>	Almidón de plátano con molienda mecánica de 5 minutos
<b>AP8</b>	Almidón de plátano con molienda mecánica de 8 minutos
<b>AP10</b>	Almidón de plátano con molienda mecánica de 10 minutos
<b>AP20</b>	Almidón de plátano con molienda mecánica de 20 minutos
<b>AY</b>	Almidón de yuca
<b>°C</b>	Grado Celsius
<b>cm<sup>3</sup></b>	Centímetro cubico

<b>DNS</b>	Ácido dinitrosalisílico
<b>DRX</b>	Difracción de rayos-X
<b>DTA</b>	Análisis térmico diferencial
<b>DTGA</b>	Derivada de las curvas de pérdida de pesos con temperatura
<b>Fe</b>	Hierro
<b>g</b>	Gramos
<b>h</b>	Hora
<b>HS</b>	Harina de soya
<b>HY</b>	Harina de yuca
<b>HY2</b>	Harina de yuca con molienda mecánica de 2 minutos
<b>HY5</b>	Harina de yuca con molienda mecánica de 5 minutos
<b>HY8</b>	Harina de yuca con molienda mecánica de 8 minutos
<b>HY10</b>	Harina de yuca con molienda mecánica de 10 minutos
<b>HY20</b>	Harina de yuca con molienda mecánica de 20 minutos
<b>kg</b>	Kilogramo
<b>kV</b>	Kilo voltios
<b>mA</b>	Miliamperios
<b>MEB</b>	Microscopia electrónica de barrido
<b>min</b>	Minuto (s)
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>PH</b>	Perfil de hinchamiento
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno

<b>p/v</b>	Peso/Volumen
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>%S</b>	Porcentaje solubilidad
<b>SD</b>	Desviación estándar
<b>SE</b>	Soya entera
<b>SE2</b>	Soya entera con molienda mecánica de 2 minutos
<b>SE3</b>	Soya entera con molienda mecánica de 3 minutos
<b>SE4</b>	Soya entera con molienda mecánica de 4 minutos
<b>SE5</b>	Soya entera con molienda mecánica de 5 minutos
<b>SE8</b>	Soya entera con molienda mecánica de 8 minutos
<b>SE10</b>	Soya entera con molienda mecánica de 10 minutos
<b>SE20</b>	Soya entera con molienda mecánica de 20 minutos
<b>Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub></b>	Nitruro de silicio
<b>ST</b>	Soya triturada
<b>TGA</b>	Análisis termogravimétrico
<b>μL</b>	Microlitros
<b>WC</b>	Carburo de tungsteno
<b>ø</b>	Diámetro

## RESUMEN

Los sustratos no convencionales son definidos como subproductos o desechos industriales ricos en carbohidratos. Estos hoy en día son fuentes de carbono para medios de cultivo alternativos baratos y de fácil acceso. Sin embargo, algunos de estos requieren de pretratamientos para su uso, que resultan costosos, de difícil recuperación y dañinos con el medio ambiente. En este trabajo se propuso a la molienda mecánica de alta energía como método de pretratamiento de bajo costo, rápido, de fácil recuperación y sin daños al medio ambiente. Con el fin de modificar las propiedades fisicoquímicas de diferentes sustratos orgánicos, como lo son la soya, harina de yuca y los almidones de plátano, frijol y jinicuilfhi. Los resultados demostraron que la molienda mecánica de alta energía incrementó la concentración de azúcares reductores, así como en el porcentaje de solubilidad y perfil de hinchamiento en todos los sustratos analizados. El análisis por microscopia electrónica de barrido mostró que hubo reducción del tamaño de partícula, aglomeración y fracturas en la superficie. En la soya se encontró la formación de estructuras tipo cristal, las cuales dependieron del molino utilizado, los estudios por difracción de rayos X corroboraron un reordenamiento estructural sin alcanzar la cristalinidad. En contraste, las muestras con contenido de almidón tienen pérdida de la semicristalinidad tras los diferentes tiempos de molienda. La termogravimetría describió que tanto antes como después de la molienda mecánica, todas las muestras analizadas tuvieron tres fases de descomposición. La primera atribuida al agua, la segunda a los componentes orgánicos y la tercera correspondiente a la parte inorgánica. En conjunto los resultados demostraron que la molienda mecánica de alta energía sí modifica las propiedades fisicoquímicas de los sustratos estudiados. Así como también a cambios morfológicos y estructurales. Los cuales varían dependiendo del tipo de molino, las condiciones de molienda, del origen del sustrato y composición del mismo.

## ABSTRACT

The unconventional substrates are subproducts or industrial trash. These represents an alternative as a new source of carbohydrate, cheaper and easily accessible. However, some of them need pretreatment for it use. Which are expensive, difficult to recover and toxic for environment. The aim of this study was proposed the mechanical milling of high energy as a device of low cost, fast, easy recovery and environmentally friendly as a pre-treatment method to modify the physicochemical properties of different organic substrates as soybean, cassava flour, starches of banana, bean and jinicuil. The results show that the mechanical milling of high energy increased the reducing sugar concentrations, percentage of solubility and swelling profile in all the samples analyzed. The scanning electron microscopy demonstrated that there was a reduction in the particle size, agglomeration and damage in the surface. In soybean is observed a formation of structure like crystal this parameters is depended on the type of mill. The X-ray diffraction studies demonstrated a structural rearrangement but did not reach crystallinity. In contrast, the samples with starch content, there were loss of relative crystallinity after at different milling times. The thermogravimetry described that both before and after milling, all samples analyzed have three decomposition phases. First one attributed to loss water, second the organic components and third part corresponding to the inorganic components. Altogether, the results showed that the mechanical milling of high energy if they modify the physicochemical properties of the samples analyzed. Exist morphologic changes and structurals in all analyzed samples, which vary depending on the type of mill, the grinding conditions, the origin of the substrate and the composition of this.

## I. INTRODUCCIÓN

Para desarrollarse los microorganismos deben tomar del medio ambiente todas las sustancias que requieren para la síntesis de sus componentes celulares y para la generación de energía, estas sustancias se denominan nutrientes (Frioni, 2005). Por lo tanto, para que los microorganismos puedan crecer en condiciones controladas es necesario un medio de cultivo que les brinde los nutrientes adecuados o necesarios para su desarrollo (Aquihuatl and Pérez, 2004; Madigan *et al.*, 2003). Los medios de cultivo varían en su composición según los requerimientos nutricionales de los microorganismos y a sus usos o aplicaciones. Se deben tomar en cuenta el aislamiento, la caracterización, la identificación y la determinación de las actividades metabólicas, entre otras (Aquihuatl and Pérez, 2004).

Debido a que el metabolismo de cada microorganismo es muy complejo, las formulaciones de los medios de cultivo son variadas. Aunque hay compuestos que la mayoría requieren para generar los procesos bioquímicos que le permitan desarrollar su ciclo celular (Madigan *et al.*, 2003). Estos nutrientes son requeridos en diferentes cantidades y de acuerdo a ello, pueden clasificarse en macro y micronutrientes. Los primeros son aquellos compuestos que la célula necesita en gran cantidad. Por otra parte, los micronutrientes son los que se suministran en menor proporción y suelen considerarse requerimientos trazas (Frioni, 2005; Varela and Grotiuz, 2002).

Los nutrientes requeridos en mayor cantidad son también los que proporcionan la mayor parte de la energía metabólica en los microorganismos, tales como, hidratos de carbono, lípidos y proteínas (Hernández, 2003). Los carbohidratos a su vez pueden clasificarse en monosacáridos, disacáridos y polisacáridos según su composición estructural en cuanto al número de azúcares. Los monosacáridos son la primera fuente de disposición nutricional para el microorganismo por su fácil digestibilidad (Madigan *et al.*, 2003). También existen macroelementos que se consumen en grandes cantidades, los cuales tienen diversas funciones en la célula; por ejemplo, fósforo, azufre, potasio, manganeso, calcio y sodio (Madigan *et al.*, 2003). Los microorganismos también necesitan de oligoelementos o micronutrientes, los cuales se requieren en concentraciones menores y su importancia se debe a que muchos de ellos tienen función estructural en las enzimas. Entre ellos están el cromo trivalente, cobalto, cobre, manganeso, molibdeno, níquel, selenio, tungsteno, vanadio, etc., (Madigan *et al.*, 2003).

A nivel industrial se aprovecha la capacidad de los microorganismos para producir compuestos metabólicos de alto valor agregado. Para lo cual, se genera el escalamiento de los procesos de cultivo, lo que implica una reformulación del medio de cultivo (Hernández, 2003). Las condiciones de incubación son fundamentales en la optimización de los medios de cultivo, entre ellas están: la temperatura, la presión osmótica, el pH, la oxigenación, entre otras. De estas condiciones depende que los microorganismos se dupliquen y produzcan los metabolitos de interés (Gómez and Bastian, 2006).

En las fermentaciones a nivel industrial la adquisición y procesamiento de las materias primas representa un porcentaje significativo de los costos generales de producción (> 50%) (Walker, 2014). Por lo que actualmente la elección de los medios de cultivo para fermentación a gran escala se basa principalmente en las necesidades nutrimentales de los microorganismos, costo, disponibilidad y la estabilidad en su composición química (Walker, 2014). En términos de reducir los gastos de producción se buscan medios de cultivo con sustratos no convencionales más baratos, como son los subproductos o desechos de los procesos. Por ejemplo, la melaza de caña o remolacha, el nejayote, el bagazo de caña, el almidón, los aceites comerciales, etc., (Hernández, 2003). El inconveniente de usar estos subproductos es el gran contenido de impurezas, lo que puede provocar efectos negativos en el crecimiento celular, inhibición o reaccionar con los compuestos presentes provocando disminución en la accesibilidad de los nutrientes (Stanbury *et al.*, 2003).

Es por ello que se desarrollan pretratamientos para maximizar el aprovechamiento de estas fuentes de carbono con impurezas y/o poco asimilables, transformándolas a compuestos de fácil disponibilidad y fermentables (Stanbury *et al.*, 2003). Algunos pretratamientos son la centrifugación, la acidificación, el intercambio iónico, la clarificación, la hidrólisis ácida o básica de la materia prima, etc. Se busca que después del tratamiento sea fácil la recuperación del producto y que no generen efluentes (Walker, 2014). La hidrólisis química es uno de los procesos más utilizados en los últimos años. Esto porque permite romper moléculas grandes a pequeñas, haciendo que sean de fácil asimilación para el microorganismo (como los azúcares reductores) (Flores-Farías, 2004). No obstante este proceso tiene sus limitaciones, las principales desventajas son el uso de ácidos o álcalis, el tiempo y la energía utilizados (Flores-Farías, 2004).

En este sentido es necesario explorar nuevos pretratamientos de las fuentes de carbono poco asimilables para los microorganismos mejorando su aprovechamiento. De la misma forma es

necesario buscar nuevas fuentes de carbono no convencionales, sustentables y de fácil asimilación para la formulación de medios de cultivos óptimos y económicamente viables (Stanbury *et al.*, 2003; Walker, 2014).

Por otro lado, la mecanoquímica es una disciplina que estudia la transformación química de compuestos a partir de energía mecánica (Wieczorek-Ciurowa and Gamrat, 2007). La molienda mecánica de alta energía es un proceso que implica la transformación fisicoquímica de las muestras al agregarles energía por el impacto generado entre las bolas, la muestra y el tazón (Wieczorek-Ciurowa and Gamrat, 2007). Este proceso tiene múltiples usos industrialmente, en especial en la farmacéutica, metalúrgica y química extractiva, utilizándose principalmente para homogenizar muestras (Campos-Vaquero, 2011). También ha sido empleado para la modificación de almidón logrando disminuir la cristalinidad relativa e incrementar la solubilidad y su digestibilidad, teniendo ventajas con respecto a los costos y disminuir los residuos y/o contaminante (Hao and Qiang, 2012; Shenghua *et al.*, 2014).

Por lo tanto, en el presente trabajo se propone a la molienda mecánica de alta energía como un proceso alternativo para la modificación de sustratos orgánicos no convencionales, tales como, la soya, la harina de yuca y los almidones (de plátano, de frijol y de jinicuil). Dicho proceso, modificará fisicoquímicamente los sustratos favoreciendo la formación de compuestos de mayor asimilación para su uso en medios de cultivo.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Generalidades de los medios de cultivo

El medio de cultivo es un conjunto de nutrientes que permiten el crecimiento de los microorganismos (Frioni, 2005). Para el diseño de los medios de cultivo es necesario considerar varios criterios importantes, entre ellos, el suministro nutricional, el tipo de medio y las condiciones de incubación, así como los tratamientos previos y los costos (Walker, 2014).

Los tipos de medios pueden ser clasificados por su origen o composición nutricional en medios de cultivo químicamente definidos y complejos o no definidos (Tabla 1). Los medios definidos son aquellos cuya composición química se sabe con exactitud y están constituidos por compuestos orgánicos y/o inorgánicos (Madigan *et al.*, 2003). Mientras que los medios complejos o no definidos utilizan sustancias muy nutritivas cuya composición químicamente se desconoce o cambia en función de su origen, a menudo este tipo de medios necesita de un pretratamiento (Madigan *et al.*, 2003). En la mayoría de los casos se emplean sustratos, baratos y de fácil obtención. Sin embargo, dichos sustratos varían de lote a lote su consistencia nutricional (Walker, 2014).

**Tabla 1.** Clasificación de medios de cultivo en función de composición nutricional (Madigan *et al.*, 2003).

Tipo de medio	Composición	Ejemplo para <i>Escherichia coli</i>
Definidos	Carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y factores de crecimiento. Su composición química es conocida con exactitud.	Glucosa (4-10g), K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (7g), KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (2g), (NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub> (1g), MgSO <sub>4</sub> (0.1g), CaCl <sub>2</sub> (0.02g), elementos traza Fe, Co, Mn, Zn, Cu, Ni y Mo (2-10 µg para cada uno), agua destilada (1L).
Complejos o no definidos	Peptona, extracto de carne, extracto de levadura, sangre, caseína, soya u otras sustancias nutritivas. No se conoce con exactitud su composición química.	Glucosa (15g), extracto de levadura (5g), peptona (5g), KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , agua destilada (1L).

Los medios de cultivo también pueden ser clasificados por su naturaleza física: sólidos, líquidos, semisólidos o bifásicos (Madigan *et al.*, 2003). Por su aplicación se agrupan en medios de cultivos simples, enriquecidos, selectivos, diferenciales, de transporte anaerobios, entre otros. Los cultivos simples son medios que proveen los nutrientes mínimos requeridos para el microorganismo, generalmente son utilizados para su aislamiento y son llamados también medios basales. Los medios enriquecidos requieren de la adición de nutrientes a la formulación del medio; por ejemplo sangre. En ocasiones se agrega colorantes y antibióticos que convierte a estos medios enriquecidos en formulaciones selectivas de microorganismos (Madigan *et al.*, 2003).

Dentro de los requerimientos fundamentales que necesita un medio de cultivo se encuentran los compuestos carbonados, los cuales provienen de sustratos orgánicos. Estos representan la fuente principal de nutrición y obtención de energía para los microorganismos a partir de la metabolización de los mismos (Hernández, 2003; Madigan *et al.*, 2003). Algunos de estos compuestos incluyen biopolímeros de carbono como el almidón y la pectina; monosacáridos de hexosas y pentosas como la glucosa y xilosa, disacáridos como la sacarosa y la maltosa, trisacáridos y oligosacáridos como las maltodextrinas; alcoholes, polioles y ácidos orgánicos como el ácido láctico, el ácido acético y ácidos grasos, aminoácidos, péptidos y polipéptidos (Walker, 2014).

## **2.2. Sustratos orgánicos no convencionales**

La mayoría de los microorganismos de importancia industrial son heterótrofos, es decir, que aprovechan los compuestos con carbono para realizar su metabolismo y crecimiento (Hernández, 2003; Walker, 2014). Los carbohidratos son la fuente orgánica de energía más utilizada a nivel industrial para la fermentación, lo que representa altos gastos de producción (Hernández, 2003). Con el objetivo de reducir tales costos se usan sustratos obtenidos a partir de diferentes procesos industriales, denominado subproducto, a estos se les considera sustratos no convencionales. Algunos sustratos no convencionales son:

a) La melaza es un subproducto generado de la industria azucarera, son restos del refinado del azúcar y son una de las fuentes más baratas de carbohidratos. Además de tener una elevada cantidad de azúcares, también contiene sustancias nitrogenadas, vitaminas y elementos químicos en cantidades traza (Fajardo-Castillo and Sarmiento-Forero, 2007). La composición de la melaza varía

con el proceso de producción específico y la ubicación geográfica donde se lleva a cabo este proceso (Walker, 2014).

b) El extracto de malta representa el material soluble extraído de la malta durante el proceso de trituración de la cebada. Se trata de un sustrato excelente para muchos hongos, levaduras y actinomicetos. Los extractos secos de malta contienen aproximadamente un 90% de carbohidratos concretamente glucosa y fructosa, disacáridos como la maltosa y la sacarosa, e incluso trisacáridos como la maltotriosa (Walker, 2014).

c) El almidón es un polisacárido de interés comercial en la fabricación de diversos productos como alcohol para combustibles debido a su contenido de glucosas. Mediante hidrólisis del almidón se pueden obtener maltosas, dextrosas y generalmente azúcares fácilmente fermentables (Martín and López, 2009).

Los sustratos no convencionales se utilizan en diferentes industrias, principalmente en la alimentaria para la producción de bebidas y alimentos fermentados, así como en la farmacéutica para la producción de medicamentos o en la agricultura como bioinsecticidas (Tabla 2) (Orietta-Fernández and Larrea-Vega, 2002; Walker, 2014).

**Tabla 2.** Sustratos constituyentes de medios de cultivo utilizados industrialmente.

Medios de cultivo	Microorganismos	Productos
Mosto de malta de cebada	Levaduras ( <i>Saccharomyces spp.</i> )	Cerveza inglesa y cerveza lager, whisky de malta Scotch, levadura gastada (para extractos de levadura)
Hidrolizado de arroz	Hongo ( <i>Aspergillus oryzae</i> ), levaduras	Saké, sochu, arrack, binuburan
Extractos de papas, alcachofas, agave spp.	Levaduras, hongos, bacterias	Biomasa de levadura para hornear, vinificar y destilar; extractos de levadura/enzimas; ron, ácido cítrico, ácido glutámico
Melaza de caña de azúcar y remolacha azucarera	Levaduras, bacterias de ácido láctico	Vino, coñac, armagnac, brandy, grappa, kirsch, slivovitz, sidra, perada, hidromiel
Hidrolizados de almidón, jarabes de glucosa	<i>Chlorella</i> , <i>Scenedosmus</i> , <i>Spirulina</i>	Fuentes alimenticias, ácidos grasos omega-3; suplementos de proteínas/ vitaminas
Soya, trigo	<i>Neurospora sitophila</i>	Pan de centeno, tofu, etc.
Harina de trigo	Bacterias ácido lácticas y hongos	Salchichas, salsas de pescado, jamones curados
Plantas, verduras	<i>Agaricus bisporus</i>	Hongos
Salvado de trigo	Hongos ( <i>Aspergillus niger</i> )	Quesos suizos
Melaza	Bacterias ( <i>Clostridium acetobutylicum</i> )	Butanol, acetona y etano
Almidones y melazas	Bacterias ( <i>Bacillus thuringiensis</i> )	Cristales proteicos tóxicos, bioinsecticidas
Almidón, malta	<i>Penicillium</i> o <i>Cephalosporium</i>	Penicilina

### 2.3. Almidón

El almidón es un polisacárido de reserva sintetizado por las plantas superiores, en la cual constituye una fracción importante en base seca (Hernández-Medina *et al.*, 2008). Se encuentra principalmente en fuentes como los cereales, representando del 35 al 80%, en las raíces del 30 a 70%, en los tubérculos del 65 a 90%, en las legumbres del 25 a 50% y en algunas frutas inmaduras

como los plátanos o los mangos, aproximadamente el 70% en peso seco (Alcázar-Alay and Meireles, 2015; Hernández-Medina *et al.*, 2008).

Este polisacárido está organizado en partículas diminutas conocidas como gránulos, los cuales están constituidos principalmente de dos homopolímeros de D-glucosa y en pequeñas cantidades de lípidos, proteínas y fósforo. Estos últimos, aunque son componentes menores que representan aproximadamente el 1%, le proporcionan propiedades específicas (Biliaderis, 1991). Los almidones varían de morfología y composición química dependiendo de la especie botánica que los produzca (Biliaderis, 1991; Rivas González, 2006).

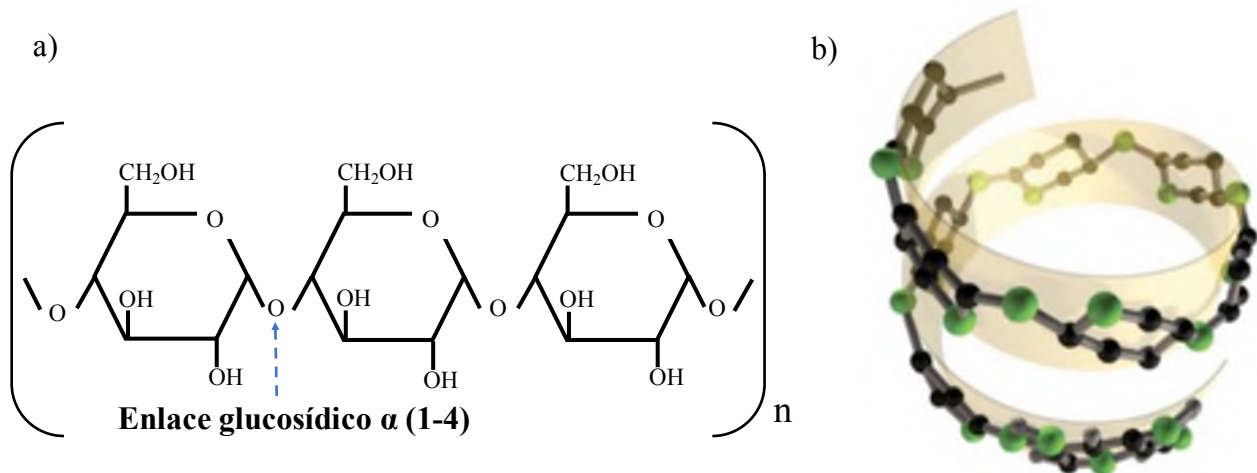
La estructura granular del almidón se debe a sus dos macromoléculas principales, la amilosa y la amilopectina, las cuales le otorgan la organización física y por ende sus propiedades fisicoquímicas y funcionales (Roger *et al.*, 1999). Para los gránulos de almidón el diámetro o tamaño de partícula es una de las características que más afectan sus propiedades funcionales de solubilidad e hinchamiento, variando de 1 a 100  $\mu\text{m}$  dependiendo de la especie botánica (Biliaderis, 1991; Rivas-González, 2012).

Los almidones son polisacáridos que muestran un arreglo molecular semicristalino (Roa-Acosta, 2015). Estos arreglos moleculares del gránulo de almidón se clasifican en diferentes tipos en función a su cristalinidad; se clasifican en A, B y C de acuerdo a su patrón de difracción de rayos X (Zobel *et al.*, 1988). Estas variedades cristalinas dependen de la longitud de las cadenas y ramificaciones de la amilopectina, ya que tienen una forma de doble hélice, las cuales conforman modelos de estructura ordenada. Así los arreglos del tipo A son encontrados principalmente en cereales y poseen cadenas cortas de amilopectina, el tipo B se describe principalmente en tubérculos y está constituida por cadenas largas de amilopectina, mientras que para el tipo C es una combinación entre el tipo A y B con una mezcla de cadenas cortas y largas (Hizukuri, 1985; Zobel *et al.*, 1988).

### 2.3.1. Amilosa

La amilosa es un polímero que es el producto de la condensación de D-glucopiranosas unidas por enlaces glucosídicos  $\alpha$  (1-4) y la cual forma largas cadenas lineales cuya unidad repetida es  $\alpha$ -maltosa con 200-2500 unidades en un número de cadenas que van de 1 a 20 (Figura 1a) (Badui-Dergal, 2006; MacAllister, 1979). La amilosa es la región amorfa del almidón. Tiene una masa

molecular de entre  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$  Daltons y una gran facilidad de adquirir una conformación tridimensional helicoidal, en la que cada vuelta de la hélice consta de seis moléculas de glucosa (Figura 1b) (Badui-Dergal, 2006).



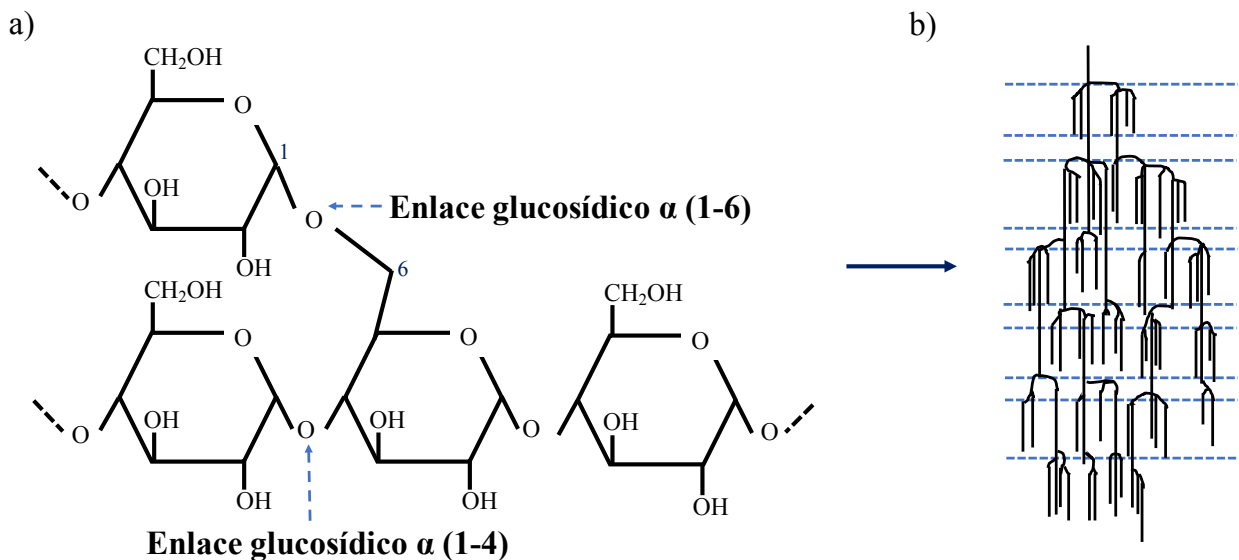
**Figura 1.** Estructura química de la amilosa, enlaces glucosídicos  $\alpha$  (1-4) (a) y forma tridimensional (b).  
Imagen tomada de [www.biociencias.com/revista/1/j.html](http://www.biociencias.com/revista/1/j.html)

El interior de la hélice de la amilosa tiene átomos de hidrógeno lo que le da susceptibilidad a formar complejos con moléculas hidrófobas, como yodo, ácidos grasos o hidrocarburos. Al exterior se encuentran orientados los grupos hidrofílicos, los cuales pueden establecer enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua, confiriéndole propiedades hidrofílicas al almidón (Flores-Farías, 2004; MacAllister, 1979). Este compuesto representa de 25 a 30% en el contenido de almidón total (Buleon *et al.*, 1998; Vermeylen *et al.*, 2004).

La amilosa tiene la propiedad de ser insoluble en agua fría, asociada a las regiones amorfas y es la causa principal de la retrogradación en el almidón (Maarel *et al.*, 2002).

### 2.3.2. Amilopectina

La amilopectina es un polímero compuesto por la unión de unidades de  $\alpha$ -D-glucosa a través de enlaces glucosídicos  $\alpha$  (1-4) y ramificaciones  $\alpha$  (1-6) (Figura 2a) las ramificaciones están constituidas por cientos de cadenas cortas (Figura 2b). Constituye de un 70 a 85% del almidón nativo (Alcázar-Alay and Meireles, 2015; Buléon *et al.*, 1998).



**Figura 2.** Estructura química de la amilopectina, enlaces glucosídicos  $\alpha$  (1-4) y  $\alpha$  (1-6) (a) y forma ramificada (b).

La organización de las cadenas de glucano y la formación de láminas cristalinas se rigen principalmente por una combinación de actividad enzimática y condiciones ambientales durante la biosíntesis (Alvani *et al.*, 2012). Los almidones nativos a menudo muestran un pico de fusión amplio, generalmente atribuido a la distribución del espesor de las laminillas cristalinas y a defectos de cristal. Las dobles hélices de amilopectina se unen a un esqueleto amorfo que influye en la alineación de cadenas dentro de las láminas cristalinas (Kiseleva *et al.*, 2005; Genkina *et al.*, 2007; Bertoft *et al.*, 2010; Vamadevan *et al.*, 2013).

#### 2.4. Pretratamientos para los sustratos no convencionales

Debido a que los sustratos no convencionales tienen una gran cantidad de impurezas y diferencias de lote a lote es necesario un pretratamiento que deje susceptible los carbohidratos para una mayor asimilación por los microorganismos (Walker, 2014). Es por esto que existen una gran variedad de métodos de pretratamientos utilizados para generar modificaciones en sustratos orgánicos no convencionales, que van desde químicas, enzimáticas y físicas (Zhu, 2015).

## 2.4.1. Métodos químicos

### 2.4.1.1. Oxidación

Permite la formación de grupos carbonilo y carboxilo a través de la sustitución de los grupos hidroxilos, llevando a cambios estructurales importantes como la despolimerización (Fonseca *et al.*, 2015; Klein *et al.*, 2014). La despolimerización incrementa los espacios libres entre las moléculas de la materia orgánica dando como resultado, para los casos de almidón y celulosa, cambios en propiedades como la plasticidad (Klein *et al.*, 2014). Para la oxidación puede utilizarse hipoclorito, peróxidos, ácidos u ozono (Fonseca *et al.*, 2015; Klein *et al.*, 2014; Östlund *et al.*, 2009).

### 2.4.1.2. Acetilación

El proceso de acetilación se emplea para incrementar las propiedades fisicoquímicas como la solubilidad, la estabilidad térmica y las temperaturas de gelatinización de algunos polímeros como el almidón (Zhu, 2015). El anhídrido acético es el compuesto químico más utilizado para este proceso. Es ampliamente usado en la industria de los alimentos principalmente por las características que produce en los sustratos orgánicos, como la solubilidad y la estabilidad del almacenaje (Adeoya *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 1999; Mbougeng *et al.*, 2012; Wang & Wang, 2001).

### 2.4.1.3. Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida conduce a diversos cambios fisicoquímicos, estructurales y morfológicos en diversos sustratos orgánicos (Zhu, 2015). Estos cambios son dependientes de la concentración y del tipo de ácido que se esté utilizando, siendo los más empleados el ácido clorhídrico, el ácido sulfúrico, el ácido acético y el ácido láctico (Simanjuntak *et al.*, 2014). La hidrólisis ácida conduce a diversos cambios en las propiedades del sustrato; por ejemplo: la viscosidad, la solubilidad, pérdida de la cristalinidad, entre otras (BeMiller and Whistler, 2004; Simanjuntak *et al.*, 2014).

#### 2.4.1.4. Ozono

La utilización del ozono como sistema de modificación de sustratos es ampliamente usada, debido que es un oxidante altamente efectivo (Klein *et al.*, 2014). Los grupos hidróxido de las moléculas que conforman al sustrato son oxidados a grupos carbonilo (Wang and Wang, 2001), el número de grupos carbonilo y carboxilo indican el grado de oxidación (Klein *et al.*, 2014; Pouyet *et al.*, 2014). Es un método que puede ser aplicado en gas o en medio líquido, que no generan residuos de ningún tipo, lo cual lo hace procedimiento ideal en la transformación de sustratos no convencionales; sin embargo, los costos son altamente elevados (Klein *et al.*, 2014).

#### 2.4.2. Método enzimático

Las enzimas son proteínas que se encuentran en todos los seres vivos, son esenciales para el funcionamiento de los organismos y son catalizadores altamente eficientes y específicos. Su uso va desde la industria alimentaria hasta la obtención de nuevos productos a partir de sustratos no convencionales (Paredes Medina *et al.*, 2010; Rajan *et al.*, 2008). Por ejemplo, el uso de las enzimas celulasas y xilasas para producción de bioalcohol a partir de residuos del cultivo de plátano (Paredes Medina *et al.*, 2010), estas enzimas rompen los enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 presentes en los polisacáridos de la celulosa y hemicelulosa, respectivamente. La amilasa y amilopectidasa son otras de las enzimas ampliamente utilizadas en la modificación del almidón (Rajan and Abraham, 2006; Rajan *et al.*, 2008).

#### 2.4.3. Métodos físicos

Actualmente los pretratamientos físicos son métodos emergentes de la denominada tecnología verde (Zhu, 2015). Existen una gran variedad de proceso de pretratamientos físicos que involucran el uso de radiaciones, altas presiones, la transferencia de energía u ondas electromagnéticas. Algunas de las técnicas más utilizadas en el pretratamiento de sustratos no convencionales son:

##### 2.4.3.1. Microondas

El uso de las microondas se ha extendido principalmente en la generación de nuevas propiedades del almidón (Xie *et al.*, 2013). El contenido del agua en el sustrato es muy importante en este método, ya que de esta depende la eficiencia del procedimiento. Las microondas destruyen

parcialmente la cristalinidad de los sustratos como el almidón y la celulosa, reduciendo la viscosidad e incrementando la solubilidad (Demiate *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2013).

#### 2.4.3.2. Altas presiones

El tratamiento a base de altas presiones es un procedimiento que comúnmente se emplea en la modificación de sustratos en la industria de los alimentos (Vittadini *et al.*, 2008). Induciendo a la gelatinización y formación de gel del almidón esto mediante presión hidrostática, aumentando el hinchamiento del gránulo, sin perder su cristalinidad (Li *et al.*, 2012; Vittadini *et al.*, 2008). Otros estudios han demostrado que las presiones altas modifican las propiedades dieléctricas de almidón, despolimerización de la celulosa, entre otros (Kasemwong *et al.*, 2011; Kokorevics and Gravitis, 1997).

## 2.5. Molienda mecánica de alta energía

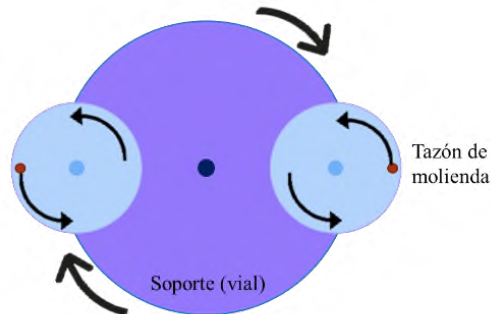
La molienda mecánica de alta energía es una técnica usada para el procesamiento de materia en estado sólido. Actualmente es uno de los métodos más empleados en el pretratamiento de sustratos, de bajo costo, rápido y eficiente (Liu *et al.*, 2011; Suryanarayana, 2001). Se utiliza en la producción de polvos, ya que reduce el tamaño de partícula, aumenta la superficie de contacto, la cinética de reacción (Suryanarayana, 2001), y la deformación de partículas debido a la energía de impacto (Sopicka-Lizer, 2010).

Hay una enorme variedad de equipos de molienda mecánica de alta energía como son los molinos de martillos, de rodillos, de discos, de bolas, entre otros. Los molinos de bolas pueden ser con agitación, atritor y planetario (Suryanarayana, 2001).

#### 2.5.1. Molino planetario de bolas

El molino planetario de bolas produce impactos continuos debido a la rotación centrífuga y centrípeta que presenta (Sopicka-Lizer, 2010). De esta forma se tiene la fuerza centrífuga producida por el giro de los viales alrededor de sus propios ejes y la fuerza producida por el soporte de disco giratorio (Figura 3) (Sopicka-Lizer, 2010). Debido a que los tazones y el disco de soporte giran en direcciones opuestas, las fuerzas centrífuga actúan en direcciones opuestas (Sopicka-Lizer, 2010).

Esto hace que las bolas trituren por efecto de fricción al colisionar por la pared interior del tazón y por efecto del impacto de las bolas (Campos-Vaquero, 2011; Karapinar and Fikret, 2006).



**Figura 3.** Mecanismo del molino planetario de bolas (Fritsch, 2007).

La molienda mecánica de alta energía se emplea en la reducción de tamaño, la homogenización de materiales y actualmente es utilizada para generar reacciones sólidas. Estas reacciones dependen de diversos factores, entre ellos: el tiempo molienda, el material de molienda, el volumen del tazón, la relación masa de las bolas – masa de la muestra, el número de bolas, etc. De estos factores depende la cantidad de energía que se libera al sistema, y por tanto, las reacciones mecanoquímicas que se puedan producir en el mismo (Broseghini *et al.*, 2016; Leonel *et al.*, 2014). Existen otro tipo de variables en la molienda, por ejemplo, la velocidad, la atmósfera, la temperatura, así como el tipo, tamaño y distribución de la muestra (Broseghini *et al.*, 2016; Campos-Vaquero, 2011).

### **III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los medios de cultivo son fundamentales para el desarrollo de microorganismos, tanto a nivel laboratorio como a nivel industrial. La composición de sus nutrientes debe estar en términos de disponibilidad, ausencia de compuestos inhibidores y bajos costos. Para disminuir los costos de producción a menudo se utilizan como fuentes de carbono subproductos industriales. Sin embargo, los subproductos industriales a pesar de ser una gran fuente de carbono requieren de pretratamientos como hidrólisis y/o purificación, con el fin de generar sustratos más asimilables y disminuir la cantidad de impurezas. No obstante, estos pretratamientos tienen como desventajas ser costosos, producir desechos contaminantes y/o consumir mucho tiempo para llevarse a cabo. Debido a esto en el presente trabajo se buscan alternativas de pretratamientos físicos a sustratos orgánicos no convencionales con alto contenido en carbohidratos buscando con ello la generación de nuevos medios de cultivo.

#### **IV. JUSTIFICACIÓN**

Debido a la problemática en el uso de subproductos industriales como fuentes de carbono existe una continua búsqueda de materia orgánica con alto contenido de carbohidratos. El pretratamiento de esta materia orgánica debe de ser eficaz, de bajo costo, de bajo consumo de energía, de fácil recuperación y reutilización, además de ser aplicable a diversas fuentes de carbono con eficiencia.

Por lo tanto, en este trabajo se propone como método de pretratamiento a la molienda mecánica de alta energía. El molino planetario de bolas es un método de fácil manejo, se observan resultados en corto tiempo, es económico y reproducible, además de que no genera desechos contaminantes. Asimismo, se propone el uso y aprovechamiento de recursos no convencionales como fuentes de carbono con altas concentraciones de carbohidratos como la yuca, el plátano, el frijol y el jinicuil, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en la región de la cuenca del Papaloapan.

## **V. HIPÓTESIS**

La molienda mecánica de alta energía modificará el contenido de azúcares reductores y las propiedades fisicoquímicas de sustratos orgánicos como la soya, harina de yuca y diferentes almidones de plátano, frijol y jinicuil.

## **VI. OBJETIVOS**

### **6.1. Objetivo general**

Modificar la concentración de azúcares reductores y las propiedades fisicoquímicas de diferentes sustratos orgánicos mediante molienda mecánica de alta energía.

### **6.2. Objetivos específicos**

- Realizar la comparación de los cambios en las propiedades fisicoquímicas de soya tratada en dos modelos diferentes de molinos planetarios de alta energía.
- Establecer las condiciones y tiempos óptimos de molienda para cada compuesto orgánico en términos de concentración de azúcares reductores e índice de solubilidad.
- Evaluar el efecto de la molienda mecánica sobre las propiedades fisicoquímicas de los sustratos orgánicos.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Obtención de los sustratos orgánicos

#### 7.1.1. Soya (*Glycine max*)

En el presente trabajo se utilizaron tres tipos de muestras de soya: soya entera (SE), harina de soya (HN) y soya previamente triturada (ST) en un molino de aspas casero de baja energía para reducir su tamaño. La SE se adquirió en una tienda naturista y la HN fue donada por el laboratorio de Bioprocesos del CINVESTAV.

#### 7.1.2. Harina de yuca (*Manihot esculenta*)

La yuca se adquirió de manera comercial en el centro de Tuxtepec, Oaxaca. Fue lavada y cortada en rodajas de aproximadamente 5 a 6 cm<sup>3</sup>. Se molió en una licuadora tipo industrial marca Inter modelo L1-3 y se tamizó en malla de No. 40 (0.425 mm). Los residuos obtenidos se lavaron con agua abundante hasta obtener un líquido claro. Los sólidos se secaron a una temperatura de 40°C durante 24 h. El polvo se tamizó en malla de No. 40.

#### 7.1.3. Almidón de plátano (*Musa paradisiaca L.*)

El almidón de plátano fue donado por el grupo de trabajo del Dr. Alejandro Aparicio Saguilán de la Universidad del Papaloapan. El cual se aisló mediante el método propuesto por Flores-Gorosquera *et al.* (2004). El plátano se obtuvo de los cultivos plataneros de Tuxtepec, Oaxaca, en estado fisiológico inmaduro. Los plátanos fueron lavados, pelados y cortados en rodajas de aproximadamente 5 a 6 cm<sup>3</sup> y posteriormente fueron sumergidas en una solución de ácido cítrico. Se molió en una licuadora tipo industrial marca Inter modelo L1-3 y se tamizó en mallas de No. 40 y 100 (0.15 mm). Los residuos obtenidos en cada malla se lavaron con agua abundante hasta que el líquido fue claro. El almidón, es decir los sólidos, se secó a una temperatura de 40°C durante 24h. El polvo obtenido se tamizó en una malla del No. 100 (Flores-Gorosquera *et al.*, 2004).

#### 7.1.4. Almidón de frijol (*Phaseolus vulgaris L.*)

El almidón de frijol fue donado por el grupo de trabajo del Dr. Alejandro Aparicio Saguilán de la Universidad del Papaloapan. El aislamiento del almidón de frijol se llevó a cabo con el método propuesto por Betancourt *et al.* (2003). Las semillas de frijol se lavaron y dejaron remojando durante 12 h, transcurrido el tiempo se realizó el descascarillado manual y se molió en una licuadora tipo industrial marca Inter modelo L1-3. La mezcla obtenida se dejó sedimentar por 1 h. Para posteriormente ser filtrada en mallas de No. 40 y 100 y se dejó sedimentar durante 4 h. Después se decantó el sobrenadante y se le realizaron lavados hasta que el agua decantada fuera cristalina. Posteriormente se secaron los sólidos recuperados, es decir el almidón, a una temperatura de 40 °C durante 24 h. El almidón obtenido se pulverizó en un mortero y se tamizó en una malla No. 100 (Betancur-Ancona *et al.*, 2003).

#### 7.1.5. Almidón de jinicuil (*Inga jinicuil*)

El almidón de jinicuil fue donado por el grupo de trabajo del Dr. Alejandro Aparicio Saguilán de la Universidad del Papaloapan. El aislamiento del almidón de jinicuil se llevó a cabo con el método propuesto por Flores-Gorosquera *et al.* (2004) con modificaciones. Las semillas de jinicuil se cortaron en rodajas de aproximadamente 5 a 6 cm<sup>3</sup>. Se molió en una licuadora tipo industrial marca Inter modelo L1-3 y se tamizó en mallas de No. 40 y 100. Los residuos obtenidos en cada malla se lavaron con abundante agua hasta que el líquido fuera claro. El almidón, es decir los sólidos, se secaron a una temperatura de 40 °C durante 24 h. El polvo obtenido se tamizó en una malla del No. 100 (Flores-Gorosquera *et al.*, 2004).

## 7.2. Molienda mecánica de alta energía

En el presente trabajo se utilizaron dos modelos de molinos planetarios de bolas, con características diferentes (Tabla 3).

**Tabla 3.** Diferencias entre los molinos planetarios de bolas utilizados.

<b>Características</b>	<b>Pulverisette 7 premium line marca Fritsch (Fritsch, 2007)</b>	<b>PM 400/2 marca Retsch (Retsch, 2016)</b>
Capacidad de procesamiento	2 tazones	4 tazones
Volumen del tazón	80 mL	250 mL
Rango de velocidad	10 a 1100 rpm	30 a 400 rpm
Tiempo	Desde segundos hasta varios min continuos	1 min hasta 5999 min continuos

### 7.2.1. Molino Pulverisette 7 premium line marca Fritsch

El molino planetario de bolas Pulverisette 7 (Figura 4) tiene como características que es un equipo pequeño, con 2 tazones de molienda de 80 mL de capacidad, alcanza 1100 rpm de velocidad y se le pueden asignar ciclos de molienda, es decir, programarse de tal modo que cada cierto tiempo el equipo se detenga y se enfríen los tazones (por ejemplo: 5 min de molienda con 5 min de pausa) (Fritsch, 2007).

La molienda se realizó manteniendo constante la velocidad a 600 rpm y con una muestra inicial de 5 g. Los materiales de molienda usados fueron carburo de tungsteno (WC), nitruro de silicio ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) y hierro (Fe), con 15 bolas de 10 mm o 4 bolas de 20 mm. Los tiempos de molienda fueron de 5, 10, 20 y 40 min.



**Figura 4.** Molino planetario de bolas Pulverisette 7 premium line marca Fritsch.

#### 7.2.2. Molino PM 400/2 marca Retsch

El molino planetario de bolas PM 400/2 (Figura 5) tiene como características que es un equipo grande, contiene espacio para colocar de 2 a 4 tazones de molienda con 250 mL de capacidad, alcanza 400 rpm de velocidad y este no realiza ciclos de molienda (Retsch, 2016).

Las moliendas se realizaron manteniendo constante la velocidad a 400 rpm y con una muestra inicial de 5.5 g. El material de molienda es hierro (Fe) con 9 bolas de 20 mm. Los tiempos de molienda fueron de 2, 5, 8, 10 y 20 min.



Figura 5. Molino planetario de bolas PM 400/2 marca Retsch.

### 7.3. Técnicas analíticas

#### 7.3.1. Determinación de azúcares reductores

Los azúcares reductores son mono y oligosacáridos que contiene un grupo aldehído en su estructura química y que presentan un efecto reductor (Eldridge *et al.*, 1979). Un ejemplo de azúcares reductores son la glucosa, cetosas, fructosa, maltosa, por mencionar algunos (Badui-Dergal, 2006; Eldridge *et al.*, 1979).

La cuantificación de los azúcares reductores se realizó con la técnica de DNS (ácido dinitrosalisílico), la cual es una técnica colorimétrica que tiene como característica reaccionar

únicamente con los azúcares reductores presentes en las muestras (Miller, 1959). Donde se pesaron 0.2 g de cada muestra obtenida de la molienda mecánica de alta energía y se le agregaron 10 mL de agua destilada. Posteriormente se colocaron en un tubo 500  $\mu$ L de muestra con 500  $\mu$ L de DNS y se leyó la absorbancia a 540 nm. Se utilizó glucosa como estándar.

#### 7.3.1.1. Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida se realizó solo para las muestras iniciales de soya, es decir, HS, SE y ST las cuales fueron llevadas a un pH menor a 2 y posteriormente en autoclave durante 15 min a condiciones de 120 °C y 1.3 kg/cm<sup>3</sup> de presión.

#### 7.3.2. Índice de solubilidad y perfil de hinchamiento

El hinchamiento y la solubilidad se determinaron por el método modificado de Sathe y Salunkhe (1981). Para lo cual en un tubo de centrífuga previamente tarado se pusieron 50 mL de una suspensión de almidón al 1 % (p/v). La cinética se realizó en agitación constante a diferentes temperaturas (60, 70, 80 y 90 °C) en baño maría durante 30 min para cada una. Posteriormente se centrifugó a 2500 rpm durante 15 min, se decantó el sobrenadante y se pesaron los gránulos hinchados. Del sobrenadante se tomó 10 mL y se secó a 120 °C durante 4 h. Los cálculos se realizaron con la ecuación (1) para el porcentaje de solubilidad (%S) y con la ecuación (2) para el poder de hinchamiento (PH) (Sathe and Salunkhe, 1981).

$$\% S = \frac{\text{peso del almidon soluble} * 400}{\text{peso de la muestra seca (base seca)}} \quad (1)$$

$$PH = \frac{\text{Peso del sedimento}}{\text{Peso de la muestra (base seca)} * (100 - \%solubilidad)} * 100 \quad (2)$$

## 7.4. Caracterización de los sustratos

### 7.4.1. Microscopia electrónica de barrido

La microscopia electrónica de barrido (MEB) nos permite ver la morfología y observar en tres dimensiones. Esta técnica se base en hacer pasar un flujo de electrones por la superficie, a modo de un pincel que barre toda la muestra, la interacción de los electrones con el objeto conduce a la emisión de electrones secundarios que son detectados y son transducidos en una imagen de alta resolución (Renau-Piqueras and Faura, 1994). La morfología de los sustratos analizados se observó en un microscopio marca Jeol JSM-6390 LV. Las muestras se recubrieron con una capa de carbón de 30 nm.

### 7.4.2. Difracción de rayos X

La difracción de rayos X (DRX) es una técnica empleada para determinar la estructura cristalina o grado de cristalinidad de productos orgánicos e inorgánicos, compuestos complejos como proteínas, polímeros de carbohidratos, etc., (Van Holde *et al.*, 2006). La difracción de rayos-X se usó en este trabajo para determinar los cambios estructurales antes y después de la molienda mecánica de alta energía. Los patrones de DRX se obtuvieron en un difractómetro Bruker AXS D8 Advance, utilizando una intensidad de 30 mA y voltaje de 40 kV. Las condiciones de medición fueron de 5 a 50 ° en 2 $\theta$ .

### 7.4.3. Análisis termogravimétrico y análisis térmico diferencial

El análisis termogravimétrico (TGA) es una técnica cualitativa que indica la pérdida de masa con respecto al aumento gradual de la temperatura. Para el estudio térmico se utilizó el analizador simultáneo modelo STA 6000 marca Perkin-Elmer. El cual permite por análisis térmico diferencial (DTA) observar los cambios energéticos y valorar si el proceso es endotérmico o exotérmico. Esto se hace durante la descomposición térmica de las muestras, determinando su comportamiento y su estabilidad. Las condiciones de medición fueron: calentamiento de 25 a 500 °C, velocidad de calentamiento de 10°C/min y flujo continuo de nitrógeno de 20 mL/min.

## VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1. Determinación de azúcares reductores

Los resultados en la concentración de azúcares reductores de los sustratos orgánicos se presentan en las Figuras 6-15.

#### 8.1.1. Soya

Los resultados del contenido de azúcares reductores antes y después de la hidrólisis ácida de las muestras de la soya entera (SE), soya entera triturada en una licuadora casera (ST) y la harina de soya (HS) se muestran en la Figura 6. Como era de esperarse, en las tres muestras se observa un incremento del contenido de azúcares reductores después de la hidrólisis ácida. En SE se registró un aumento 1.88 veces (sin hidrólisis 0.16 g/L y con hidrólisis 0.30 g/L). La ST tiene un incremento de 3.55 veces (sin hidrólisis 0.45 g/L y con hidrólisis 1.61 g/L). Mientras que para HS se tiene un aumento de 1.85 veces (sin hidrólisis 1.19 g/L y con hidrólisis 2.21 g/L). La HS fue la que obtuvo la concentración más alta antes y después de la hidrólisis. Por lo tanto, la concentración de azúcares reductores de la HS con hidrólisis se tomó de referencia para evaluar el efecto de la molienda de alta energía sobre los carbohidratos presentes en la soya.

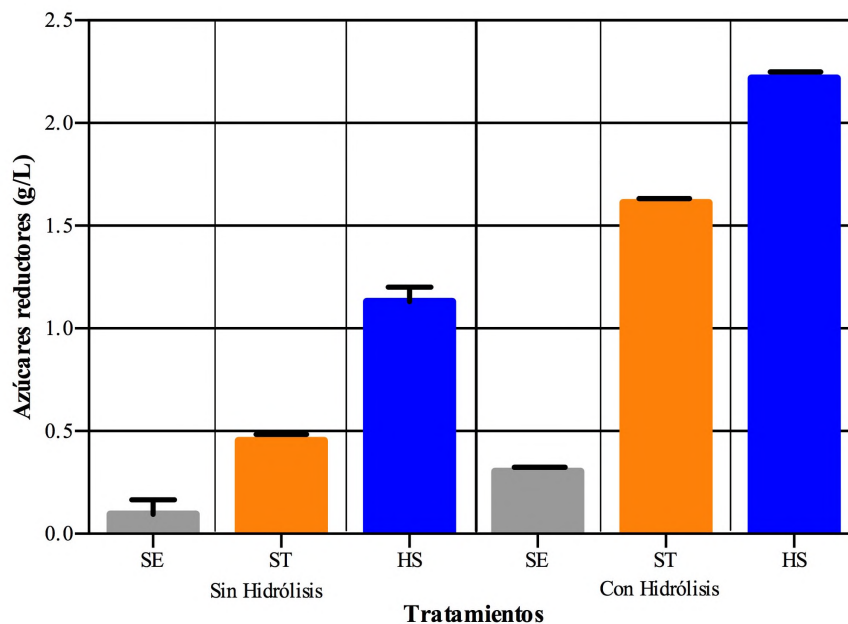


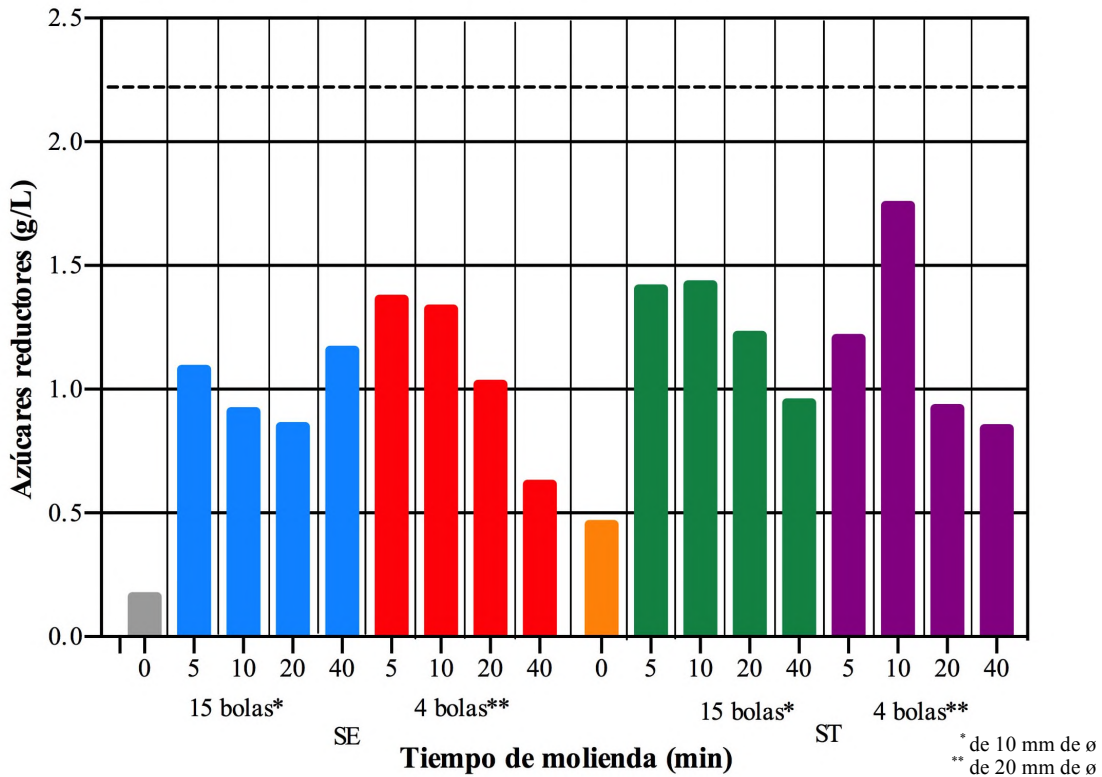
Figura 6. Concentración de azúcares reductores de soya antes y después de la hidrólisis ácida. Los datos son expresados como la media  $\pm$  SD.

En el caso de SE el aumento de la concentración de azúcares reductores es consecuencia de la hidrólisis ácida debido a que rompe las redes proteicas que conforman a la soya y en las cuales se encuentran embebidos los carbohidratos aislándolos del contacto con ciertos agentes químico, físicos o biológicos (AL-Bahri et al., 2009; Bridson, 2006). La proteólisis producida por el ácido lleva a que los carbohidratos estén expuestos, y por lo tanto, susceptibles a ser reducidos por este (Hu et al., 2014). Un ejemplo de este efecto “protector” de la red proteica es lo reportado por Kawamura *et al.* (1970) no detectan azúcares reductores en soya sin ser tratada. Después de la hidrólisis ácida obtienen un valor de 0.00053 g/L esto en condiciones ácidas (pH de 4.3) tras 1 hora de hidrólisis (Kawamura et al., 1970). A diferencia del presente trabajo que por hidrólisis ácida (pH de 2) se obtiene una concentración mayor (0.30 g/L). Para la muestra ST la reducción del tamaño de la partícula previa a la hidrólisis puede estar provocando una posible ruptura de algunas de las fibras de proteína, aumente el área de contacto con el ácido. De este modo podría incremento en la reacción de hidrólisis con los azúcares, llevando a una mayor formación de azúcares reductores (Hu et al., 2014). En HS, las altas concentraciones de azúcares encontradas probablemente tengan su origen en el proceso de obtención de la harina. Proceso en el cual se utilizan solventes y calentamiento para eliminar el contenido de aceites (Cromwell, 2012). Considerando que estos aceites presentes en la SE interfieren para la liberación o generación de azúcares reductores con hidrólisis ácida, ya que reacciona primero con los aceites y después con los componentes de la SE partícula de la soya, por lo que el pretratamiento a la harina, probablemente favorece la cuantificación de los azúcares (Karr-Lilienthal et al., 2005). Por lo tanto, la eliminación de los aceites y un menor tamaño de partícula en la HS aparentemente aumenta el área de exposición e incrementa los rendimientos de hidrólisis (Hu et al., 2014). En el caso de ST y HS no se encontraron datos en la literatura bajo las condiciones utilizadas en este trabajo.

#### 8.1.1.1. Molienda mecánica de alta energía con molino Pulverisette 7

En la Figura 7 se muestra la concentración de azúcares reductores para SE y ST mediante molienda mecánica de alta energía utilizando WC como material de molienda. Para la SE se observó el mayor incremento en la concentración de azúcares reductores con la molienda de 5 min con 4 bolas de 20 mm (Figura 7), aumentando 8.45 veces con respecto a la muestra sin molienda (0.16 - 1.36 g/L). Mientras que para SE utilizando 15 bolas de 10 mm (Figura 7), la máxima concentración de azúcares reductores se observó a los 40 min, aumentando 7.16 veces (0.16 - 1.36 g/L). En cambio,

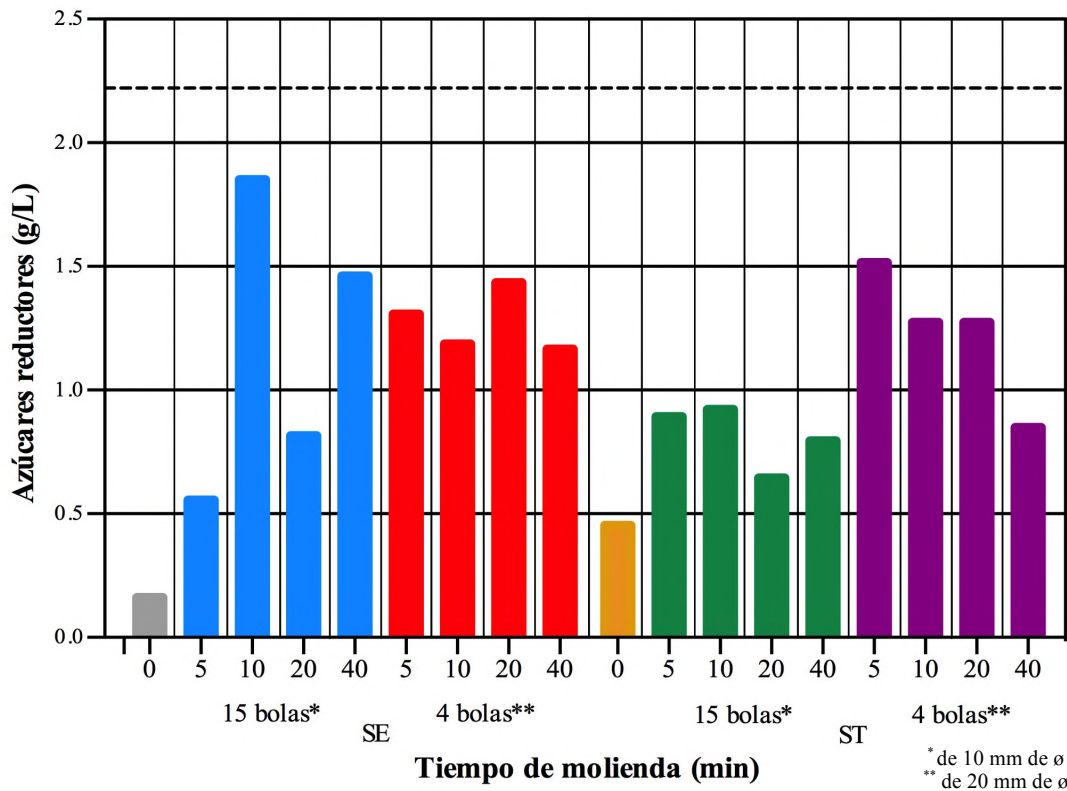
para ST se observó el mayor aumento en la concentración de azúcares reductores con la molienda de 10 min con 4 bolas de 20 mm (Figura 7), aumentando 3.83 veces con respecto a la muestra sin molienda (0.45 - 1.74 g/L). En tanto que para ST utilizando 15 bolas de 10 mm (Figura 7), la máxima concentración de azúcares reductores se observó a los 40 min, aumentando 3.13 veces (0.45 - 1.42 g/L).



**Figura 7.** Concentración de azúcares reductores de SE y ST a diferentes tiempos utilizando WC como material de molienda, molino Pulverisette 7. La línea punteada indica el valor máximo de azúcares reductores en HS con hidrólisis ácida (Figura 6).

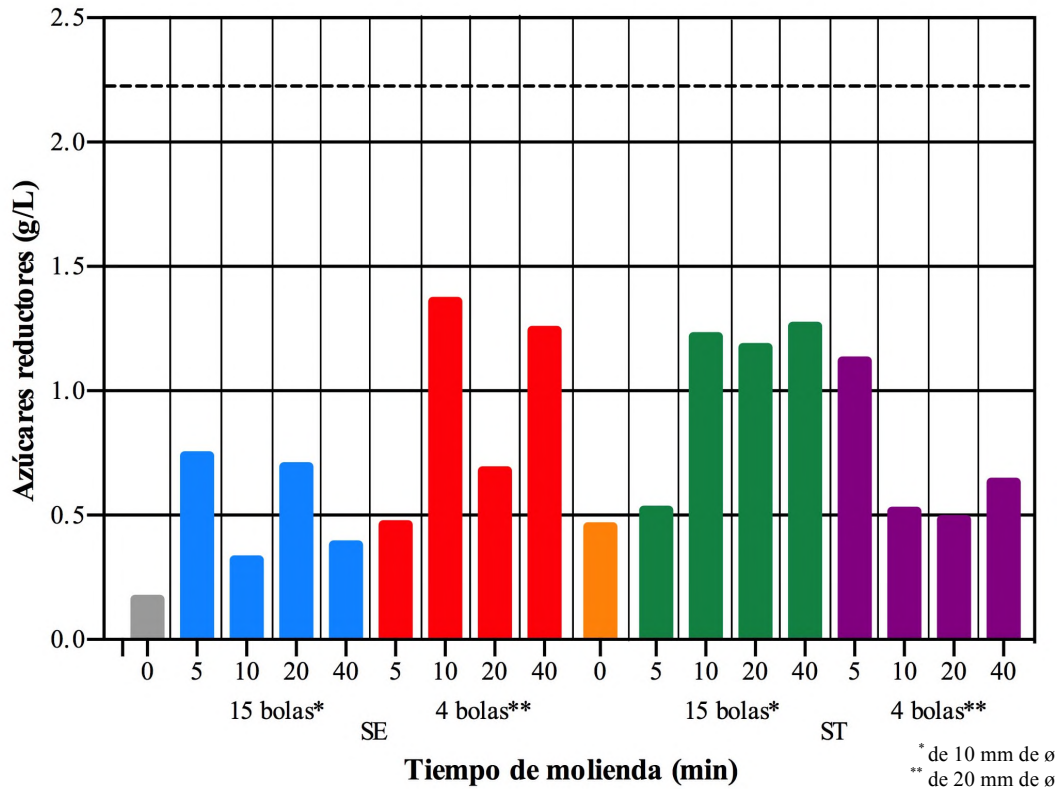
En la Figura 8 se muestra la concentración de azúcares reductores para SE y ST mediante molienda mecánica de alta energía utilizando Fe como material de molienda. Para la SE se observó un incremento más alto en la concentración de azúcares reductores con la molienda de 10 min con 15 bolas de 10 mm (Figura 8), aumentando 11.48 veces con respecto a la muestra sin molienda (0.16 - 1.85 g/L). En contraste, con 4 bolas de 20 mm el valor máximo se alcanzó a los 20 min de molienda, con un incremento de 8.88 veces (0.16 - 1.43 g/L). Mientras que para ST (Figura 8), la mayor concentración alcanzada fue a los 10 min de molienda con 15 bolas de 10 mm, aumento 2.02 veces (0.45 - 0.92 g/L). De misma manera, se determinó la concentración utilizando 4 bolas

de 20 mm (Figura 8), donde se obtuvo un valor máximo a los 5 min de molienda, incremento 3.33 veces (0.45 - 1.51 g/L).



**Figura 8.** Concentración de azúcares reductores de SE y ST a diferentes tiempos utilizando Fe como material de molienda, molino Pulverisette 7. La línea punteada indica el valor máximo de azúcares reductores en HS con hidrólisis ácida (Figura 6).

En la Figura 9 se muestra la concentración de azúcares reductores para SE y ST mediante molienda mecánica de alta energía utilizando  $\text{Si}_3\text{N}_4$ . Para la SE se observó el mayor incremento en la concentración de azúcares reductores con la molienda de 10 min con 4 bolas de 20 mm (Figura 9), aumentando 8.42 veces con respecto a la muestra sin molienda (0.16 - 1.36 g/L). Mientras que para SE utilizando 15 bolas de 10 mm (Figura 9), la máxima concentración de azúcares reductores se observó a los 5 min, aumentando 4.57 veces (0.16 - 0.73 g/L). En cambio, para ST se observó el mayor aumento en la concentración de azúcares reductores con la molienda de 10 min con 4 bolas de 20 mm (Figura 9), aumentando 3.83 veces con respecto a la muestra sin molienda (0.45 - 1.74 g/L). Mientras que para ST utilizando 15 bolas de 10 mm (Figura 9) la máxima concentración de azúcares reductores se observó a los 40 min, aumentando 3.13 veces (0.45 - 1.42 g/L).



**Figura 9.** Concentración de azúcares reductores de SE y ST a diferentes tiempos utilizando  $\text{Si}_3\text{N}_4$  como material de molienda, molino Pulverisette 7. La línea punteada indica el valor máximo de azúcares reductores en HS con hidrólisis ácida (Figura 6).

Las diferencias observadas en el contenido de azúcares reductores entre SE y ST después de la hidrólisis ácida (Figura 6) es evidente y se puede asociar mayoritariamente a un efecto de tamaño de partícula, siendo favorecida la muestra con el menor tamaño de partícula. Sin embargo, con la molienda mecánica de alta energía esta diferencia en el contenido de azúcares reductores entre SE y ST desaparece (Figuras 7-9). Este comportamiento se puede deber a que el contenido de azúcares está asociado a la frecuencia de colisión durante la molienda y al área de contacto con la muestra (tamaño de partícula). En ST se tiene una menor superficie de contacto entre las partículas de soya, las bolas y tazón durante el proceso de molienda, viéndose afectada la transformación fisicoquímica de los azúcares. Caso contrario, en SE se parte de una superficie de contacto más amplia y se logran obtener valores similares y en algunos casos mayores de azúcares reductores a los de ST. Lo anterior está de acuerdo con lo reportado por Johansson (2012), quien reporta que la eficiencia de la conversión de un sustrato depende de la dimensión del material a moler debido a que a medida

que disminuye el tamaño de partícula la probabilidad de colisión es menor, por lo tanto, la transferencia de energía se reduce.

Por otro lado, la variable que tiene un gran efecto en la concentración de azúcares reductores de las distintas muestras es la densidad del material de molienda (WC: 15.63 g/cm<sup>3</sup>; Fe: 7.9 g/cm<sup>3</sup>; Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>:3.1 g/cm<sup>3</sup>). Esta densidad está directamente relacionadas con la cantidad de energía proporcionada a la muestra (Johansson, 2012; Suryanarayana, 2001). Sin embargo, no se observó que la concentración de los azúcares reductores fuera directamente proporcional a la energía suministrada durante la molienda. La concentración de azúcares fue mayor cuando el material de molienda fue Fe, seguido por WC y por Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, respectivamente. Para el caso de WC, aparentemente la energía suministrada está siendo utilizada para otros procesos diferentes del rompimiento de las cadenas de carbohidratos, como podrían ser la formación de otras moléculas más pequeñas o la polimerización. Algunos estudios han demostrado que la fricción generada entre el impacto de alta energía de las bolas contra el tazón y la muestra conducen a la formación de moléculas de bajo peso molecular (Leonel *et al.*, 2014; Morrison *et al.*, 1994).

En la Tabla 4 se muestran los resultados del aumento en número de veces de azúcares reductores con respecto a la concentración inicial sin hidrólisis ácida. Como se puede observar el tratamiento que presentó mayor incremento en azúcares reductores es la molienda mecánica de alta energía para SE a los 10 min con 15 bolas de 10 mm de Fe (11.48 veces con respecto al inicial), mientras que el menor aumento para SE fue mediante hidrólisis ácida (1.88 veces). En caso contrario con ST el mayor incremento se observó a los 10 min utilizando 4 bolas de 20 mm de WC (3.83 veces), y el de menor aumento fue a los 10 min con 15 bolas de 10 mm de Fe (2.02 veces).

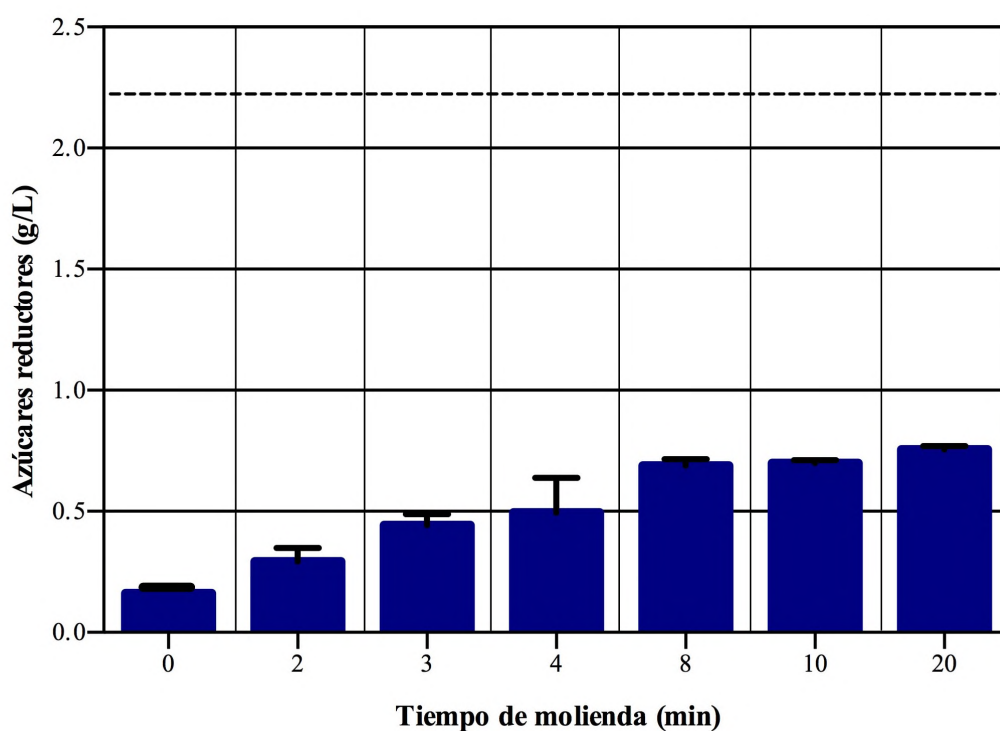
**Tabla 4.** Muestras con mayor contenido de azúcares reductores después de hidrólisis ácida y de molienda mecánica a diferentes tiempos.

Muestras	Azúcares reductores sin hidrólisis (g/L)	TRATAMIENTOS						
		Hidrólisis ácida (veces)	WC		Fe		Si <sub>3</sub> N <sub>4</sub>	
			15* (veces)/ Tiempo (min)	4** (veces)/ Tiempo (min)	15* (veces)/ Tiempo (min)	4** (veces)/ Tiempo (min)	15* (veces)/ Tiempo (min)	4** (veces)/ Tiempo (min)
SE	0.16	1.88	7.17/40	8.45/ 5	11.48/10	8.88/10	4.57/ 5	8.42/10
ST	0.45	3.55	3.13/10	3.83/10	2.02/10	3.33/ 5	2.77/40	2.46/ 5
HS	1.19	1.85						

\* bolas de 10 mm de  $\sigma$   
 \*\* bolas de 20 mm de  $\sigma$

### 8.1.1.2. Molienda mecánica de alta energía con el molino PM 400/2

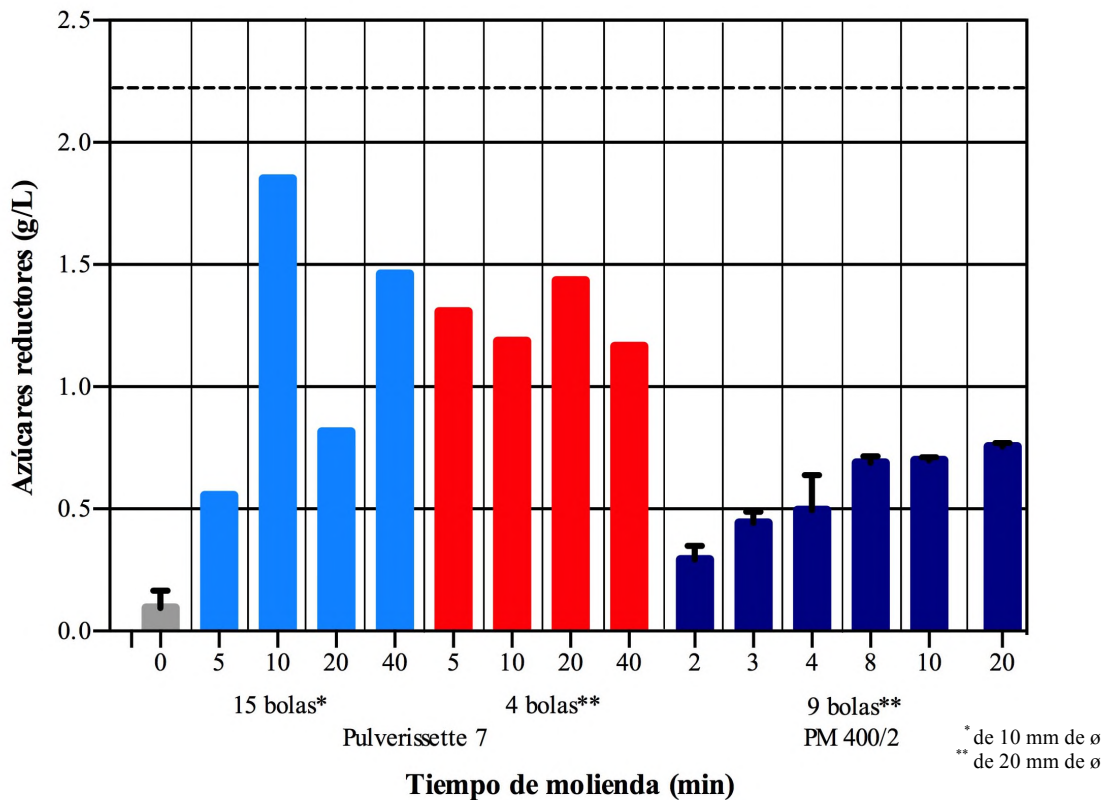
Se realizó una segunda molienda con otro molino planetario de bolas el PM 400/2 marca Retsch debido a que presenta características diferentes como el tamaño de tazón, la relación de bolas-muestra, el volumen de muestra que puede ser procesada, velocidad de molienda, entre otros (Retsch, 2016). Las concentraciones de azúcares reductores de SE con el molino PM 400/2 indican una elevación en la concentración conforme aumenta el tiempo de molienda (Figura 10). La concentración máxima se da a los 20 minutos de molienda con un incremento de 4.68 veces con respecto a la concentración inicial (0.16 - 0.75 g/L).



**Figura 10.** Concentración de azúcares reductores de SE con molino de alta energía PM 400/2 a diferentes tiempos, con 9 bolas de 20 mm y Fe como material de molienda. La línea punteada indica el valor máximo de azúcares reductores en HS con hidrólisis ácida (Figura 6). Los datos son expresados como la media  $\pm$  SD.

La comparación en la concentración de azúcares reductores para los dos molinos planetarios de bolas (Pulverisette 7 premium line y PM 400/2) se presentan en la Figura 11. Donde se observa una mayor concentración de azúcares en las moliendas del molino Pulverisette 7 aun en los tiempos más cortos y con bolas de menor tamaño. En el caso del molino PM 400/2 la presencia de azúcares reductores se mantienen en aumento, sin alcanzar un máximo, lo que indica que es necesario mayores tiempos de molienda para incrementar la concentración de azúcares reductores. Esto

sugiere que el molino PM 400/2 proporciona menos energía que el Pulverisette 7. Lo cual se puede ver en las concentraciones de azúcares reductores para ambos molinos donde en el caso del Pulverisette 7 alcanza mayores concentraciones. Algunos trabajos demuestran que todas las moléculas necesitan una cantidad de energía para reaccionar con otras moléculas, en molienda mecánica de alta energía son denominadas reacciones inducidas mecánicamente. Estas reacciones dependen de diversos factores como el tipo y las propiedades de los molinos, así como a las condiciones del proceso (Gotor *et al.*, 2013). Por lo anterior, es de esperarse que dadas las características de los dos molinos empleados en este trabajo, ambos molinos proporcionen energías y condiciones de esfuerzos de corte diferentes.



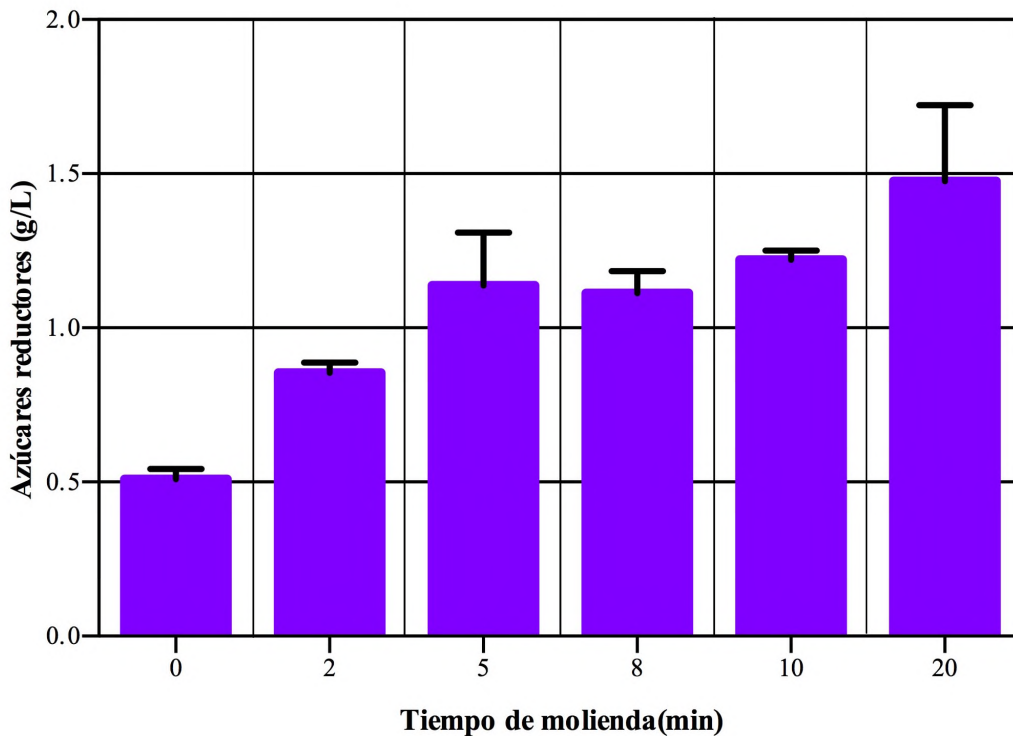
**Figura 11.** Concentración de azúcares reductores en SE con diferentes tiempos de molienda en dos tipos de molinos planetarios de bolas (Pulverisette 7 premium line y PM 400/2). La línea punteada indica el valor máximo de azúcares reductores en HS con hidrólisis ácida (Figura 6). Los datos son expresados como la media  $\pm$  SD.

La cantidad de energía suministrada durante la molienda mecánica es dependiente de la relación entre el peso de la muestra - el peso de las bolas de molienda y el tamaño de tazón (Gotor *et al.*, 2013). Hay modelos matemáticos que predicen la cantidad de energía generada en el sistema considerando estas variables (Burgio *et al.*, 1991). Además, otros autores mencionan que esta

relación varía con respecto al tipo de molino y a su capacidad de volumen (Suryanarayana, 2001). En este trabajo se utilizó una relación de 1:50 (peso de la muestra: peso de las bolas de molienda) para todas las moliendas, esta relación teóricamente proporciona la misma cantidad de energía en ambos molinos. Sin embargo, los resultados obtenidos demuestran que a pesar de tener la misma relación de peso en el molino Pulverisette 7 la concentración de azúcares reductores fue mejor en todas las moliendas. Por lo que bajo las condiciones utilizadas en este trabajo el molino Pulverisette 7 es más energético que en el PM 400/2.

### 8.1.2. Harina de yuca (HY)

Los resultados de la molienda mecánica de alta energía con el molino planetario PM 400/2 para la HY se muestran en la Figura 12. El contenido de azúcares reductores de la HY sin molienda es de 0.50 g/L. Después de la molienda mecánica de alta energía las concentraciones aumentaron con el tiempo de molienda. Obteniéndose un incremento máximo de 2.89 veces a los 20 min (0.50 - 1.47 g/L).

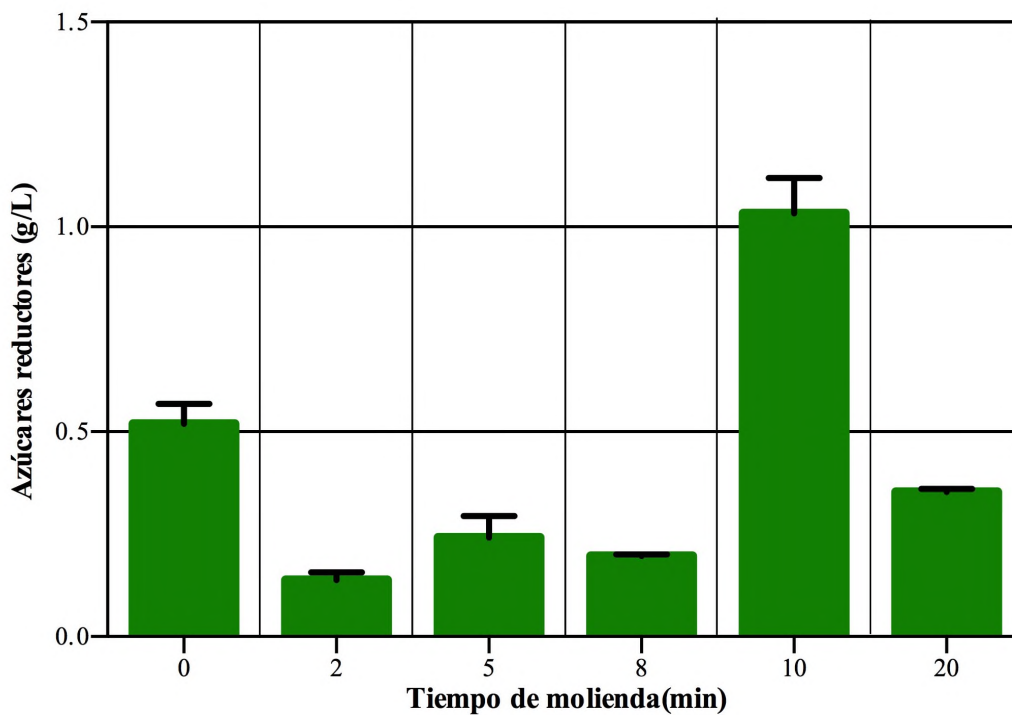


**Figura 12.** Concentración de azúcares reductores en HY a diferentes tiempos de molienda en molino de alta energía PM 400/2. Los datos son expresados como la media  $\pm$  SD.

Los reportes encontrados para la concentración de azúcares reductores en yuca tienen un amplio intervalo de variación. Por ejemplo: Simanjuntak *et al.* (2014) describe una concentración de 0.0015 g/L; Hermiati *et al.* (2012) de 86.8 g/L; mientras que en este trabajo el valor inicial fue de 0.50 g/L. Estas discrepancias pueden deberse al efecto de los tratamientos previos realizados a la HY o bien a su origen botánico (Zhu, 2015). La fuente botánica es influenciada por las condiciones en las que se cultiva el tubérculo, lo que deriva en diferencias en la composición química de este tubérculo, como lo es la cantidad de carbohidratos que contiene (Zhu, 2015).

### 8.1.3. Almidón de plátano (AP)

Los resultados de la molienda mecánica de alta energía con el molino planetario PM 400/2 para el AP se muestran en la Figura 13. La muestra inicial del AP tiene un contenido de azúcares reductores de 0.51 g/L. Después de la molienda mecánica las concentraciones disminuyen en los primeros tiempos; sin embargo, a los 10 min se alcanza el máximo con un aumento de 1.98 veces la concentración de azúcares reductores (0.51 - 1.03 g/L).

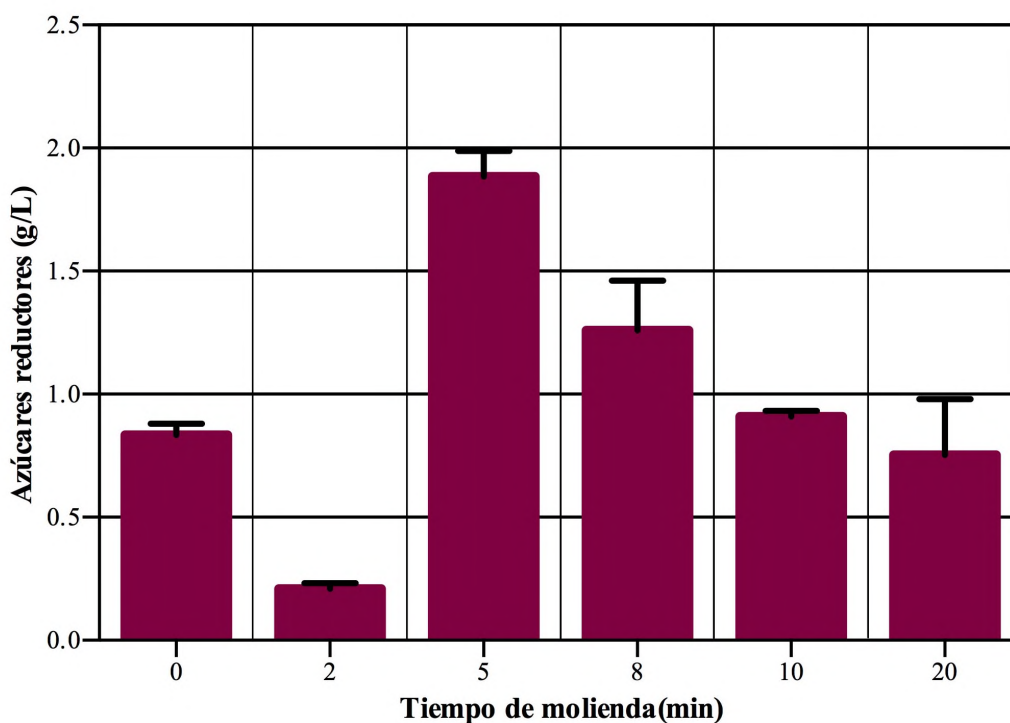


**Figura 13.** Concentración de azúcares reductores en AP a diferentes tiempos de molienda en molino de alta energía PM 400/2. Los datos son expresados como la media  $\pm$  SD.

Lii *et al.* (1982) reportan que el grado de maduración está relacionado con la concentración de azúcares reductores, entre más maduro es el plátano mayor es el porcentaje de azúcares reductores. Por ejemplo: para plátano verde (grado 0) tiene 0.24%; mientras que en estado inmaduro (grado 1) el porcentaje es de 1.30 %. Otro reporte mostró que en estado inmaduro (grado 1) la concentración de azúcares reductores es de 10 g/L (Olusanjo Adewalr *et al.*, 2013). En el presente trabajo se utilizó plátano en un estado de maduración intermedio entre grado 0 y 1 con una concentración de 0.51 g/L.

#### 8.1.4. Almidón de frijol (AF)

Los resultados de la molienda mecánica de alta energía con el molino planetario PM 400/2 para el AF se muestran en la Figura 14. La muestra inicial del AF tiene un contenido de azúcares reductores de 0.83 g/L pero a los 2 min de realizarse la molienda hay una reducción en la concentración (0.20 g/L). Mientras que a los 5 min tiene un incremento de 2.25 veces (0.83 - 1.88 g/L) con respecto al valor inicial. Posterior a esto la concentración de azúcares reductores disminuye en función del tiempo de molienda.

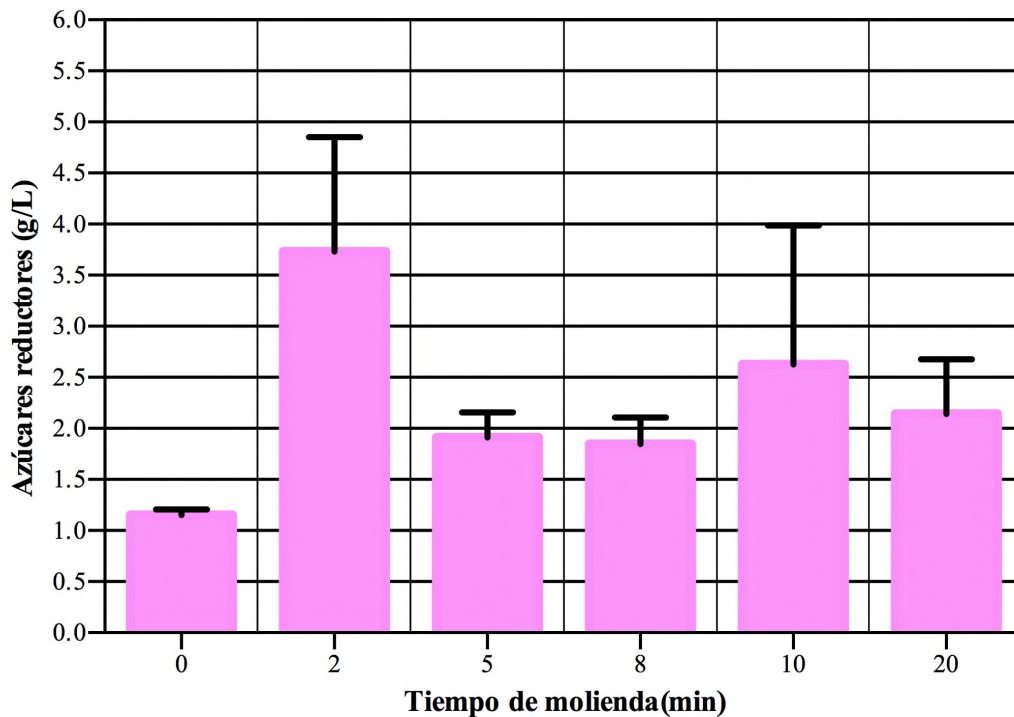


**Figura 14.** Concentración de azúcares reductores en AF a diferentes tiempos de molienda en molino de alta energía PM 400/2. Los datos son expresados como la media  $\pm$  SD.

Es importante mencionar que no se encontraron reportes en la literatura sobre la concentración de azúcares reductores en el almidón de frijol.

#### 8.1.5. Almidón de jinicuil (AJ)

Los resultados de la molienda mecánica de alta energía con el molino planetario PM 400/2 para el AJ se muestran en la Figura 15. La concentración inicial de azúcares reductores de AJ es de 1.15 g/L. A los 2 min de la molienda se incrementó 3.24 veces (1.15-3.73 g/L) con respecto al valor inicial. Mientras que al aumentar el tiempo de molienda la concentración de azúcares reductores fue menor.



**Figura 15.** Concentración de azúcares reductores en AJ a diferentes tiempos de molienda en molino de alta energía PM 400/2. Los datos son expresados como la media  $\pm$  SD.

La especie de leguminosas a la que pertenece el jinicuil, *Inga*, contiene aproximadamente 70 % de carbohidratos en base seca, siendo el almidón el más abundante, seguido por la xilosa, la sacarosa, la pectina y la lignina (Bressani, 2010).

La concentración de azúcares reductores de los almidones de plátano y frijol de forma muy general tienen un comportamiento similar con la molienda. Es decir, primero una disminución en la concentración de azúcares reductores a tiempos cortos de molienda, posteriormente un incremento súbito hasta alcanzar un máximo y posteriormente una disminución paulatina. En el almidón de jinicuil se observa el incremento de la concentración de azúcares reductores desde los pocos minutos de molienda y después su disminución paulatina. Este comportamiento puede deberse a que la cantidad de energía liberada durante el proceso de molienda conduce primero a una modificación y posteriormente a una polimerización y/o degradación de los componentes de los sustratos orgánicos (Leonel *et al.*, 2014; Morrison *et al.*, 1994). En el caso de la Harina de Yuca, la molienda logro la transformación de azúcares no reductores a reductores pero sin alcanzar un máximo en la concentración. Lo que sugiere la necesidad de incrementar el tiempo de molienda para alcanzar el máximo. Posiblemente como la harina contiene un alto contenido de fibras entonces requiere de mayor energía para transformar los carbohidratos, impidiendo las reacciones fisicoquímicas para la transformación de las muestras (Abera and Rakshit, 2003; Zhu, 2015).

Los sustratos orgánicos como la HY y los diferentes almidones (plátano, frijol y jinicuil) provienen de distintas fuentes botánicas, por lo que la concentración de azúcares reductores es diferente para cada una de ellas (BeMiller and Whistler, 2009). Por tanto, es de esperar variaciones en el contenido de azúcares reductores dependiendo del sustrato utilizado debido a factores como procedencia u obtención de la muestra, tamaño, estado de maduración, composición química, entre otras (Badui-Dergal, 2006; Zhu, 2015). Otro factor importante es el tamaño de gránulo. El AP tiene un tamaño de gránulo en un intervalo de 6 a 60  $\mu\text{m}$  (Lii and Chang, 1981) y un máximo de concentración de azúcares reductores a los 10 min de molienda; el AF un intervalo de 20 a 45  $\mu\text{m}$  (Chung *et al.*, 2008) y un máximo a los 5 min de molienda; mientras que para el AJ un tamaño de granulo <10  $\mu\text{m}$  (este trabajo) y un máximo en la concentración de azúcares a los 2 min de molienda. Por lo anterior parece ser que a menor tamaño de granulo de almidón es más rápido el efecto de la molienda mecánica en la producción de azúcares reductores.

Independiente de la concentración de azúcares reductores, de los sustratos orgánicos o de las condiciones de la molienda utilizadas lo que es evidente es que el tratamiento físico de la molienda mecánica de alta energía es un pretratamiento adecuado para la obtención de azúcares reductores de sustratos orgánicos. En la Tabla 5 se muestra la máxima concentración de azúcares reductores obtenidas por molienda mecánica de alta energía de los distintos sustratos orgánicos analizados.

**Tabla 5.** Máxima concentración de azúcares reductores obtenidas por molienda mecánica de alta energía de los sustratos orgánicos analizados en este trabajo.

<b>Muestra</b>	<b>Aumento en veces de azúcares reductores</b>	<b>Condiciones de molienda mecánica de alta energía</b>	<b>Molino planetario de bolas</b>
Soya entera	11.48	15* de Fe con 10 min	Pulverisette 7
Soya triturada	3.83	4** de WC con 10 min	Pulverisette 7
Harina de yuca	2.89	9** de Fe con 20 min	PM 400/2
Almidón de plátano	1.98	9** de Fe con 10 min	PM 400/2
Almidón de frijol	2.25	9** de Fe con 5 min	PM 400/2
Almidón de jinicuil	3.24	9** de Fe con 2 min	PM 400/2

\* bolas de 10 mm de  $\phi$   
 \*\* bolas de 20 mm de  $\phi$

Nota: Las muestras de soya fueron tratadas en los dos molinos (Pulverisette 7 y PM 400/2) mientras que la harina de yuca y los almidones solo se utilizó el molino PM 400/2.

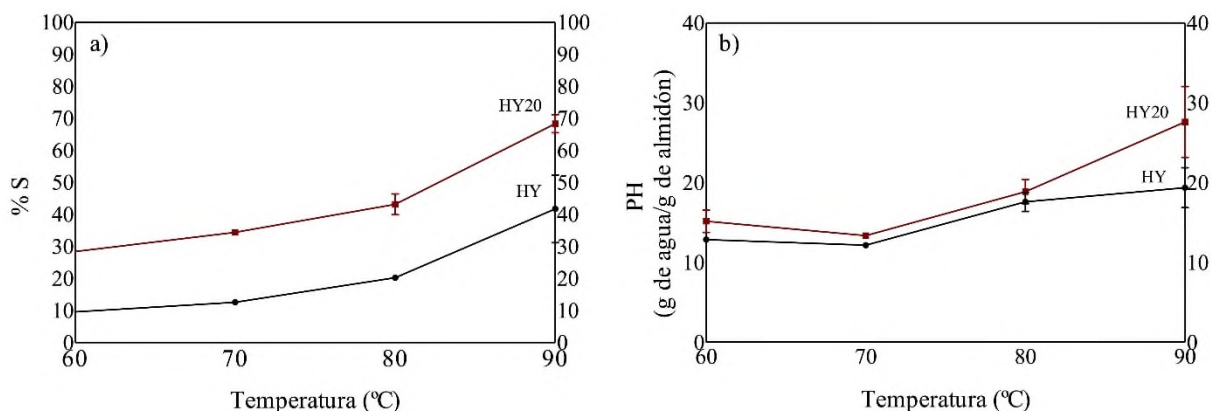
## 8.2. Índice de solubilidad y perfil de hinchamiento

El porcentaje de solubilidad (%S) y el perfil de hinchamiento (PH) de la HY y de los diferentes almidones se muestran en las Figuras 16-19.

### 8.2.1. Harina de yuca (HY)

El %S y el PH para las muestras de HY inicial y con 20 min de molienda mecánica que fue el tiempo donde se obtuvo la máxima concentración de azúcares reductores (HY20) se muestran en la Figura 16. El %S y PH son dependientes de la temperatura, es decir, conforme se eleva la temperatura se incrementa el valor de estos parámetros. Trabajos previos han descrito este mismo

comportamiento donde se observa que conforme aumenta la temperatura la solubilidad y el hinchamiento del almidón se incrementa (Hernández-Medina *et al.*, 2008). Hernández-Medina *et al.* (2008) reportan que para el almidón de yuca el %S a 60 y 90 °C es aproximadamente 2 y 52%, respectivamente, mientras que para el PH es de 4 y 60 g de agua/g de almidón, respectivamente. Por otro lado, Sánchez *et al.* (2009) reportan un %S de 0.2 hasta 16.6 % y de PH de 0.8 hasta 15.5 g de agua/g de almidón atribuyendo estas diferencias a la variación genética de la yuca (Sánchez *et al.*, 2009). En este trabajo se observó un %S de 9.66 hasta 41.82 % y de PH de 12.87 hasta 19.38 g de agua/g. En general la molienda mecánica también provoca un incremento en los valores de %S y PH. Con respecto a HY, el %S en HY20 aumento 2.36 veces en promedio a lo largo de todas las temperaturas analizadas. Así mismo el PH sube 1.19 veces en promedio en cada temperatura. Cabe resaltar que no se encontraron en la literatura valores de %S y PH de yuca o harina de yuca con molienda mecánica.



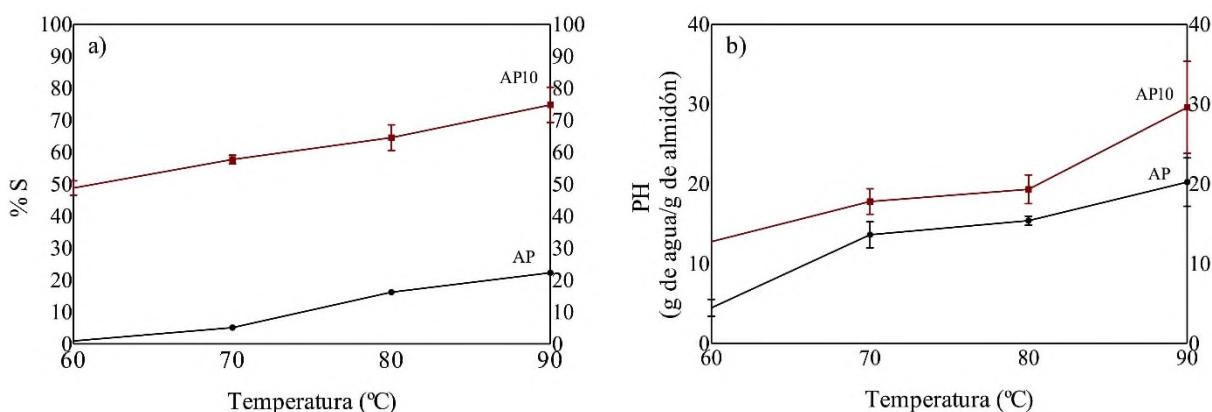
**Figura 16.** Porcentaje de solubilidad (%S) en agua (a) y perfil de hinchamiento (PH) (b) para harina de yuca (HY) y harina de yuca con 20 min de molienda mecánica (HY20). Los datos están representados como la media  $\pm$  SD.

### 8.2.2. Almidón de plátano (AP)

El %S y el PH de las muestras de AP y almidón de plátano con 10 min de molienda mecánica de alta energía (AP10) que fue el tiempo donde se obtuvo la máxima concentración de azúcares reductores se muestran en la Figura 17. Para AP a 60 y 90 °C se observó un %S de 0.98 hasta 22.25 % y de PH de 4.45 hasta 20.19 g de agua/g de almidón. Los valores reportados en la literatura indican que a 60 y 90 °C el AP nativo tiene una solubilidad del 2.2 y 8.77% respectivamente (Waliszewski *et al.*, 2003). Estos valores son inferiores a los obtenidos en este trabajo, lo cual puede deberse al origen del sustrato y a la forma de extracción del almidón, que se sabe influye en

las propiedades fisicoquímicas de las muestras (Abera and Rakshit, 2003; Zhu, 2015). En cuanto al PH algunos autores han reportado valores por encima de los descritos en este estudio, por ejemplo, Bello-Pérez *et al.* (1999) reportan que a 60 y 90 °C el PH es de 12 y 40 g de agua/ g de almidón. Las diferencias observadas para AP pueden atribuirse a la distribución de las cadenas de amilosa y amilopectina, así como también, a la relación que presentan ambas en el gránulo (Bello-Pérez *et al.*, 1999).

Por otro lado, la molienda mecánica tiene un efecto notorio en el %S de la muestra AP10, aumentando en promedio 16.99 veces con respecto a AP para todas las temperaturas. En el caso de PH este se eleva en promedio 1.76 veces para cada temperatura.



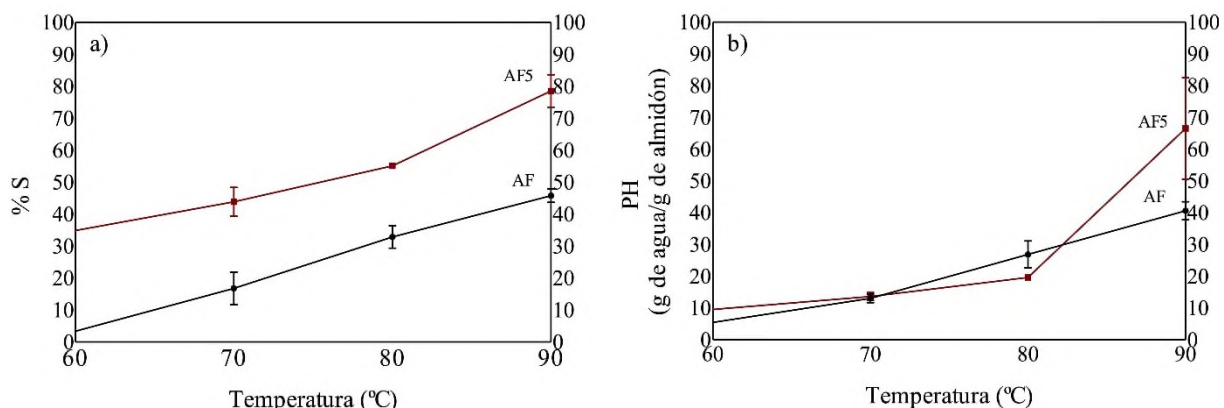
**Figura 17.** Porcentaje de solubilidad (%S) en agua (a) y perfil de hinchamiento (PH) (b) para almidón de plátano (AP) y almidón de plátano con 10 min de molienda mecánica (AP10). Los datos están representados como la media  $\pm$  SD.

### 8.2.3. Almidón de frijol (AF)

El %S y el PH para las muestras de AF y almidón de frijol con 5 min de molienda (AF5) que fue el tiempo donde se obtuvo la máxima concentración de azúcares reductores se muestran en la Figura 18. Para AF a 60 y 90 °C se observó un %S de 3.34 hasta 45.84 % y de PH de 5.44 hasta 40.57 g de agua/g. Los valores encontrados en este análisis son similares a los reportados por Lii and Chang (1981), quienes reportan que a 65 y 90 °C el %S del almidón de frijol es de aproximadamente 7 y 23 %, mientras que para PH son de 8 y 29 g de agua/g de almidón, respectivamente. Algunos trabajos han reportado que los contenidos de proteínas en los gránulos de almidón pueden influenciar las propiedades de hinchamiento. Las proteínas que están asociadas

a los gránulos interfirieren formando una envoltura que recubre al almidón (Hongsprabhas *et al.*, 2007).

La molienda mecánica nuevamente incrementa los valores del %S de la muestra AF5, la cual con respecto a AF aumenta 4.10 veces en promedio el %S en todas las temperaturas. En contraste el PH tiene valores similares hasta aproximadamente 82 °C donde AF5 muestra un aumento de 1.63 veces con respecto a AF.



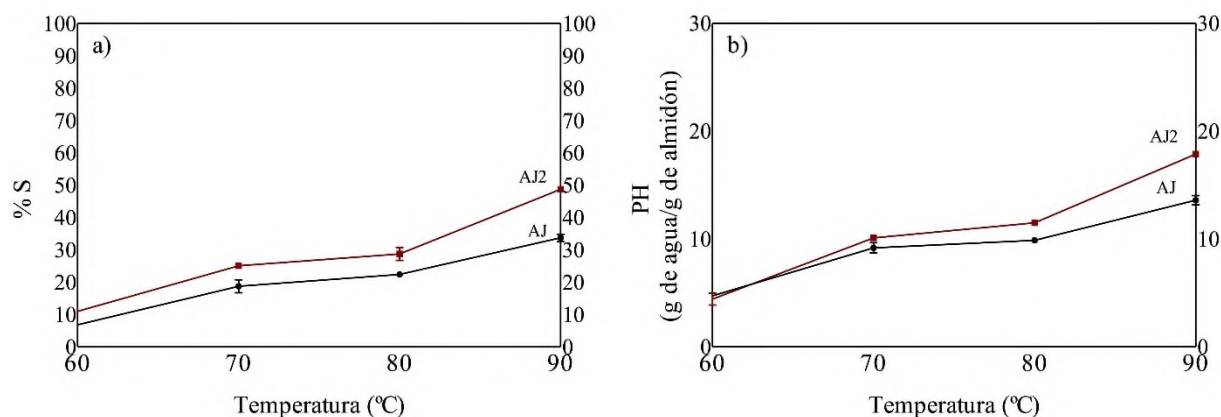
**Figura 18.** Porcentaje de solubilidad (%S) en agua (a) y perfil de hinchamiento (PH) (b) para almidón de frijol (AF) y almidón de frijol con 5 min de molienda mecánica (AF5). Los datos están representados como la media  $\pm$  SD.

#### 8.2.4. Almidón de jinicuil (AJ)

El %S y el PH para las muestras de AJ y almidón de jinicuil con 2 min de molienda mecánica (AJ2) que fue el tiempo donde se obtuvo la máxima concentración de azúcares reductores se muestran en la Figura 19. Para AJ a 60 y 90 °C se observó un %S de 6.87 hasta 33.81 % y de PH de 4.73 hasta 13.64 g de agua/g. A la fecha no existen reportes en la literatura que describan el %S y PH del almidón de jinicuil, probablemente debido que es poco conocida y solo es consumida en pequeños sectores de América Central. Sin embargo, el alto contenido de proteínas y carbohidratos (Sánchez Mendoza *et al.*, 2016) lo hacen un material que podría ser utilizado en la generación de almidón o azúcares de reductores, por lo que es muy importante la caracterización fisicoquímica de esta leguminosa.

La molienda mecánica de alta energía aumenta en promedio 1.41 el %S en AJ2 para todas las temperaturas con respecto a AJ. Mientras que el valor de PH va incrementando conforme

incrementa la temperatura: a 60°C es igual para AJ y AJ2, para 70°C aumenta 1.10 veces, a 80°C 1.16 veces y a 90°C 1.31 veces.



**Figura 19.** Porcentaje de solubilidad (%S) en agua (a) y perfil de hinchamiento (PH) (b) para almidón de jinicuil (AJ) y almidón de jinicuil con 2 min de molienda mecánica (AJ2). Los datos están representados como la media  $\pm$  SD.

En conjunto, los resultados demuestran que la molienda mecánica mejora el %S y PH en todas las muestras analizadas. Esta tendencia es similar a lo reportado en la literatura (Li *et al.*, 2017; Zhu, 2015). El efecto es además dependiente de la composición de amilosa/amilopectina, del arreglo que estos polisacáridos tienen en el almidón y de la microestructura del gránulo. Estas características también están directamente relacionadas con la fuente botánica (Delcour *et al.*, 2010; Tester *et al.*, 2004; van de Velde *et al.*, 2002; Waterschoot *et al.*, 2015). Cabe mencionar que AJ mostró un incremento en el %S a medida que aumenta la temperatura, sin embargo, no llegó a valores superiores al 50% a diferencia del resto de las muestras (Tabla 6).

**Tabla 6.** Índice de solubilidad a diferentes temperaturas de las muestras sin molienda y con el tiempo de molienda mecánica que alcanzó la mayor concentración de azúcares reductores.

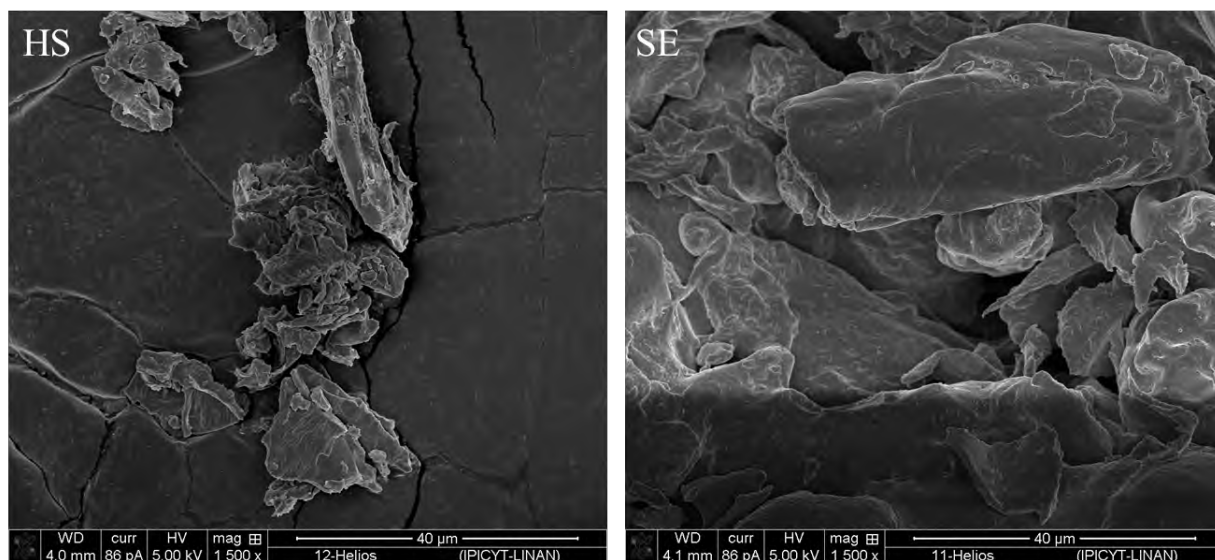
Muestras/veces	Temperaturas (°C)			
	60	70	80	90
HY20/HY	18.78	21.88	22.95	26.56
AP10/AP	47.80	52.55	48.32	52.59
AF5/AF	31.54	27.04	22.16	32.61
AJ2/AJ	4.10	6.37	6.36	15.01

### 8.3. Microscopia electrónica de barrido (MEB)

La microscopia electrónica de barrido de las muestras antes y después de la molienda mecánica se muestran en las Figuras 20-28.

#### 8.3.1. Soya

Para examinar las características estructurales iniciales de las muestras de HS y SE se realizó un análisis por MEB a 1500X (Figura 20). En donde se observó que la HS está formada por aglomerados irregulares de distintos tamaños, predominando las partículas mucho menores a 40  $\mu\text{m}$  (Figura 20). La SE está formada de gránulos alargados e irregulares, prevaleciendo las partículas mayores a 40  $\mu\text{m}$  (Figura 20). Las diferencias microscópicas entre HS y SE son derivadas del proceso de manufacturación de cada una de ellas (Liu *et al.*, 2011). Coutinho *et al.* (2013) describe formas alargadas e irregulares similares a las encontradas en este trabajo para SE, él también describe en la superficie de los gránulos pequeños fragmentos de proteínas y fibras, similar a lo que se observa en este trabajo.

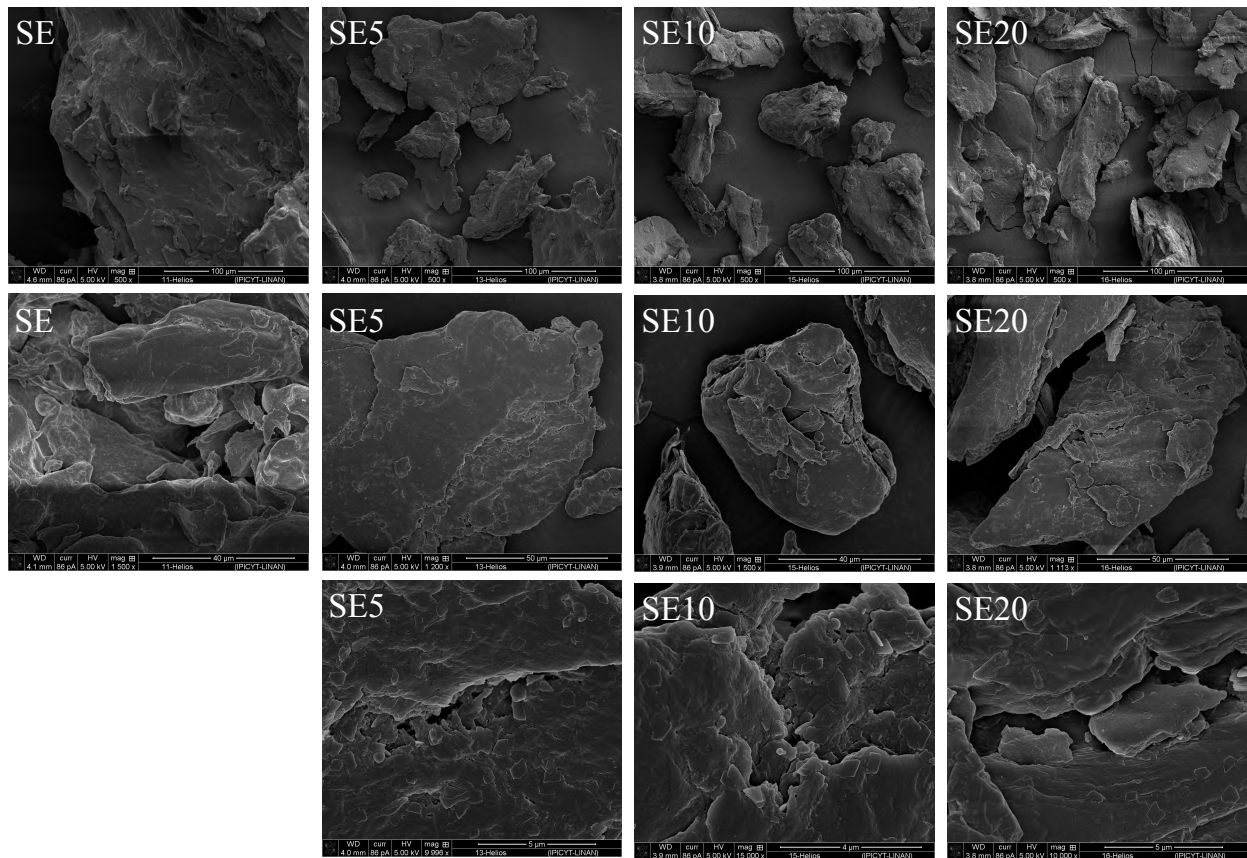


**Figura 20.** Microscopia electrónica de barrido de las muestras de harina de soya (HS) y soya entera (SE).

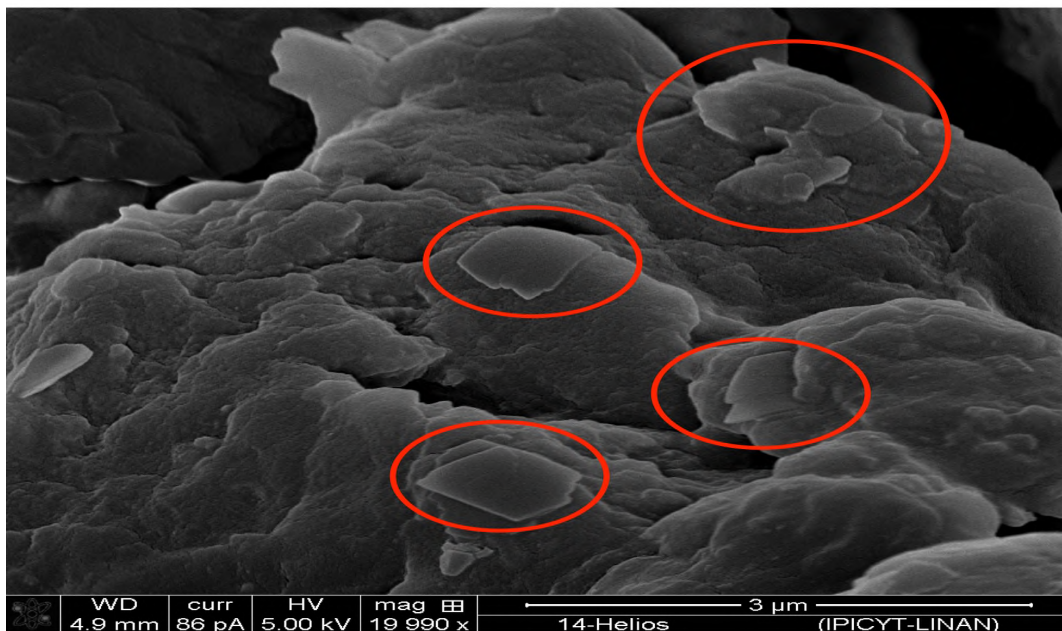
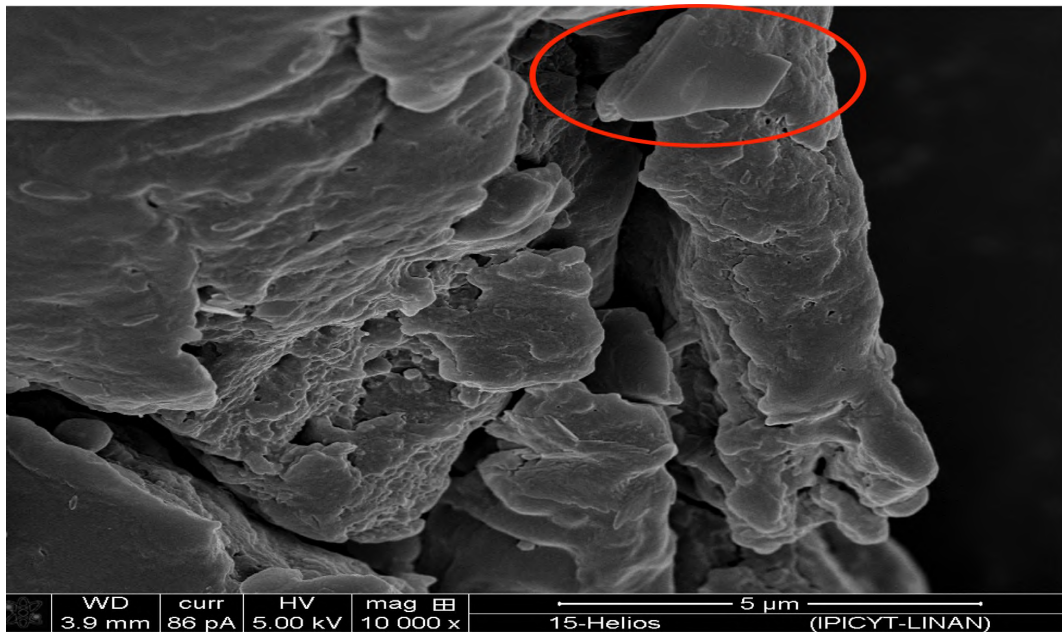
Como el principal interés de este trabajo es la transformación mecánica de sustratos orgánicos con posible uso en medio de cultivo y la parte económica es muy importante. Entonces esta sección se enfoca al efecto de la molienda mecánica en la SE. Ya que para trabajar la HS primero habría que obtener la harina, lo cual involucra un costo adicional.

Micrografías de SE y SE a 5, 10 y 20 minutos de molienda mecánica en el molino Pulverisette 7 se muestran en la Figura 21. En estas micrografías se puede ver que la molienda mecánica de alta energía lleva a la disminución del tamaño de partícula de la SE. A partir de los 10 min de molienda (SE10) se empieza a observar la formación de aglomerados.

Un fenómeno que vale la pena resaltar es que a altas magnificaciones se observan sobre la superficie de las partículas estructuras regulares y planas inmersas en matrices amorfas. Como si trataran de cristales micrométricos e inclusive nanométricos. En las micrografías inferiores de la Figura 21 se pueden observar dichas estructuras regulares y planas tanto en SE5, SE10 y SE20. En la Figura 22 se muestran dos micrografías de SE10 donde se enmarcan las estructuras planas observadas. La cantidad de estas estructuras regulares varía con el tiempo de molienda y pareciera tener una relación con la concentración de azúcares reductores obtenidos (Figura 8), aunque no se tiene un análisis que correlacione estos dos parámetros. Los difractogramas de SE con Fe de 4 bolas de 20 mm (Figura 30) muestran lo que pareciera ser un reordenamiento de su estructura amorfa, lo cual quizá pueda deberse a la formación de estas partículas micrométricas tipo cristal. Sin embargo, no es el objetivo de este trabajo identificar estas estructuras, pero es un trabajo que debe de ser explorado.



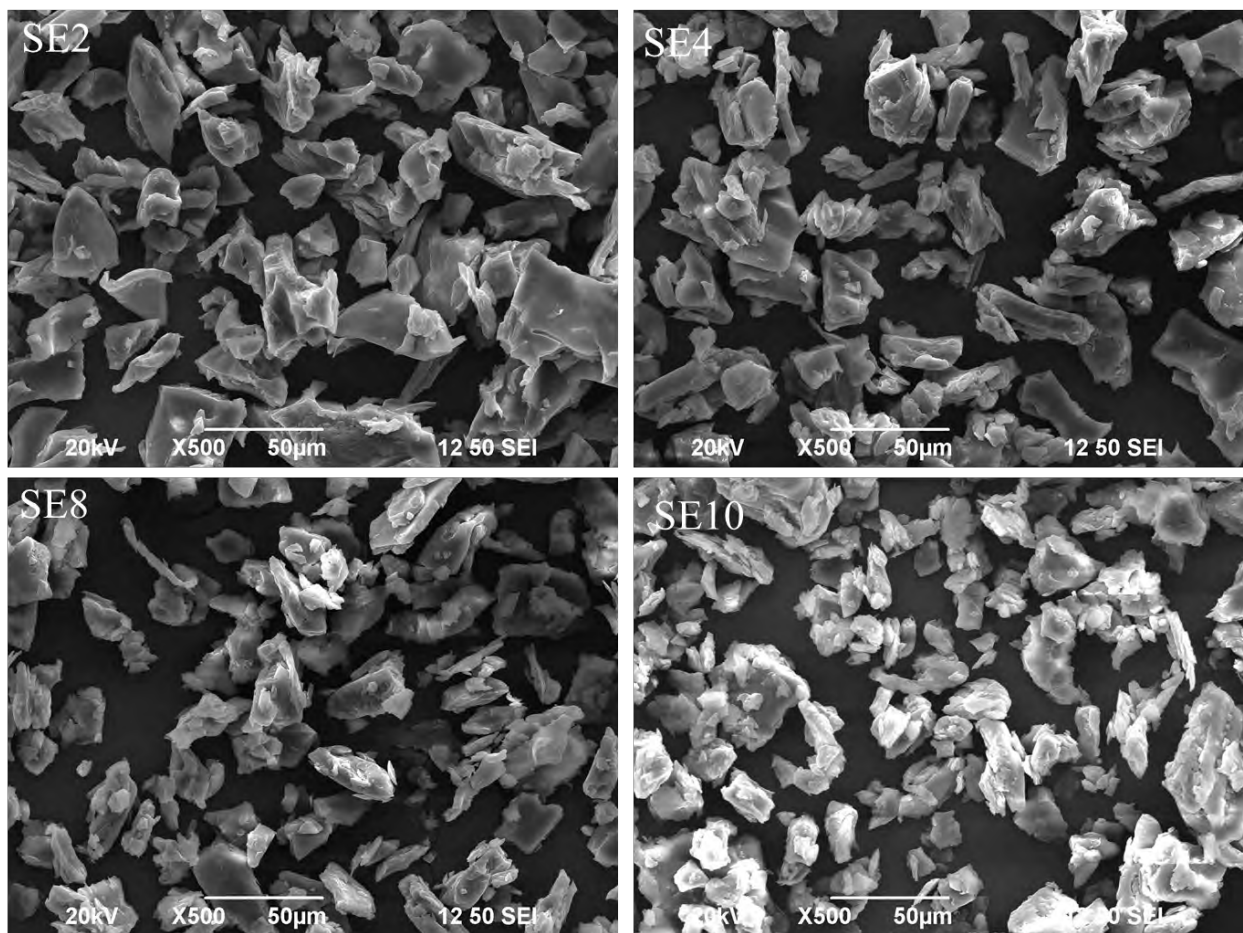
**Figura 21.** Microscopia electrónica de barrido de SE modificada en el molino Pulverisette 7, con Fe como material de molienda y 15 bolas de 10 mm. Soya entera (SE), soya entera con 5 min de molienda (SE5), 10 min de molienda (SE10) y 20 min de molienda (SE20).



**Figura 22.** Microscopia electrónica de barrido de SE modificada en el molino Pulverisette 7, con Fe como material de molienda, 15 bolas de 10 mm y 10 min de molienda (SE10). Los círculos muestran estructuras regulares y planas inmersas en una matriz amorfa

En la Figura 23 se muestran las micrografías de las muestras de soya tratada con molienda mecánica de alta energía con el molino planetario PM 400/2. A diferencia de la molienda con el molino Pulverisette 7 donde se observó reducción de tamaño de partícula y formación de aglomerados, en la molienda con el molino PM 400/2 sólo se observa una continua reducción de partícula. No se

observa formación de aglomerados. Si asociamos este comportamiento con la concentración de azúcares reductores de estas muestras (Figura 10) podemos ver que la concentración de azúcares no deja de ascender con el tiempo de molienda aunque la concentración es inferior a la alcanzada con el molino Pulverisette 7. Al ser menos energética la molienda en el molino PM 400/2 que en el Pulverisette 7 es necesario un mayor tiempo de molienda para alcanzar los mismos efectos. Yu *et al.*, (2015) muestran un fenómeno similar en donde observan que cuando hay un mayor daño existe un incremento en el número de aglomeraciones. Además reportan que la disminución en el tamaño de partícula conduce a la formación de aglomeraciones (Liu *et al.*, 2011).

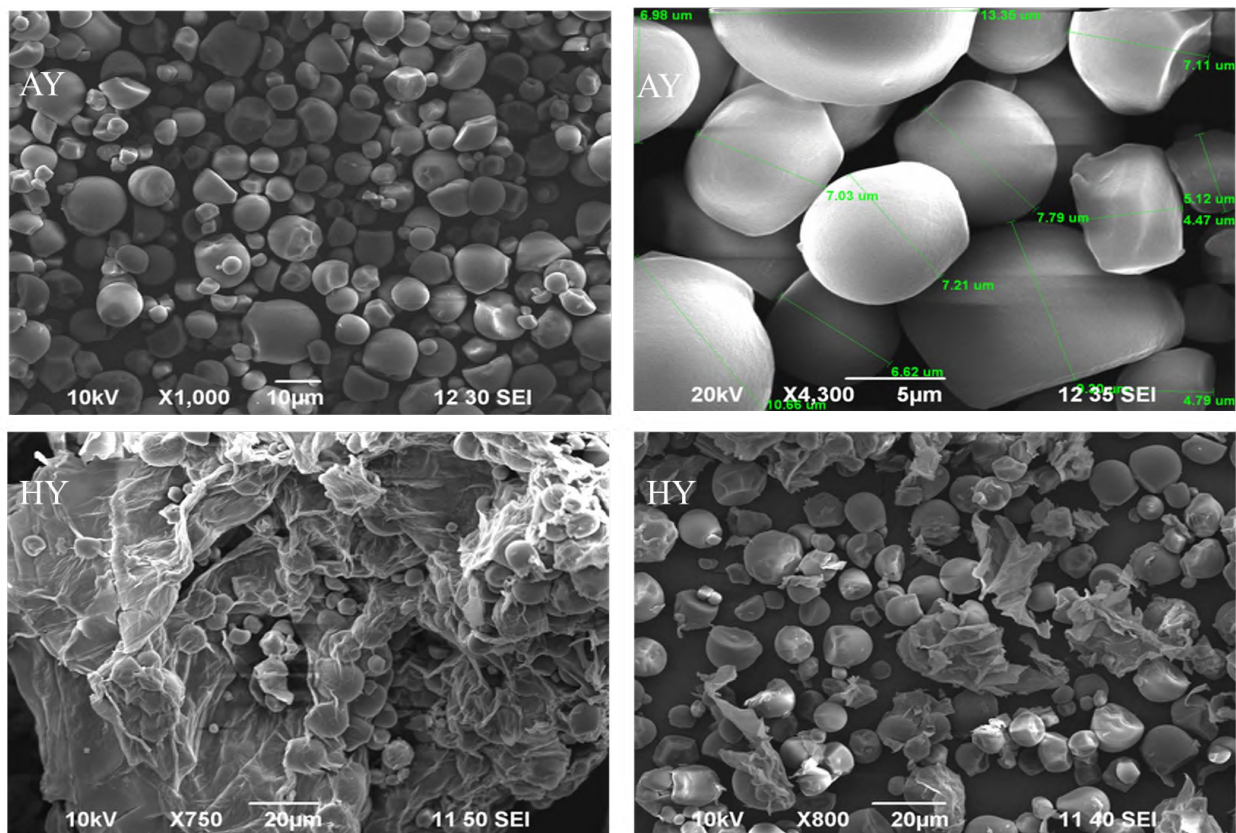


**Figura 23.** Microscopia electrónica de barrido de SE con molienda mecánica de alta energía en el molino PM 400/2 con 9 bolas de 20 mm de Fe a diferentes tiempos de: 2 min (SE2), 4 min (SE4), 8 min (SE8) y 10 min de molienda (SE10).

### 8.3.2. Harina de yuca (HY)

En la Figura 24 se muestran las micrografías de microscopía electrónica de barrido de las muestras de almidón y de harina de yuca (AY y HY, respectivamente). En las micrografías de AY se observan los gránulos del almidón y su forma en donde algunos son esencialmente ovalados o semi esféricos truncos similares a los observados por García *et al.*, (1997). Este mismo autor menciona que esta característica semi esférica trunca es consecuencia del proceso de extracción del almidón del tubérculo (García *et al.*, 1997; Tivana *et al.*, 2010). Los gránulos tienen un tamaño de 7 a 10  $\mu\text{m}$ , similar a lo reportado por Ren *et al.* (2010), mientras que la superficie tiene una forma plana sin poros ni fracturas.

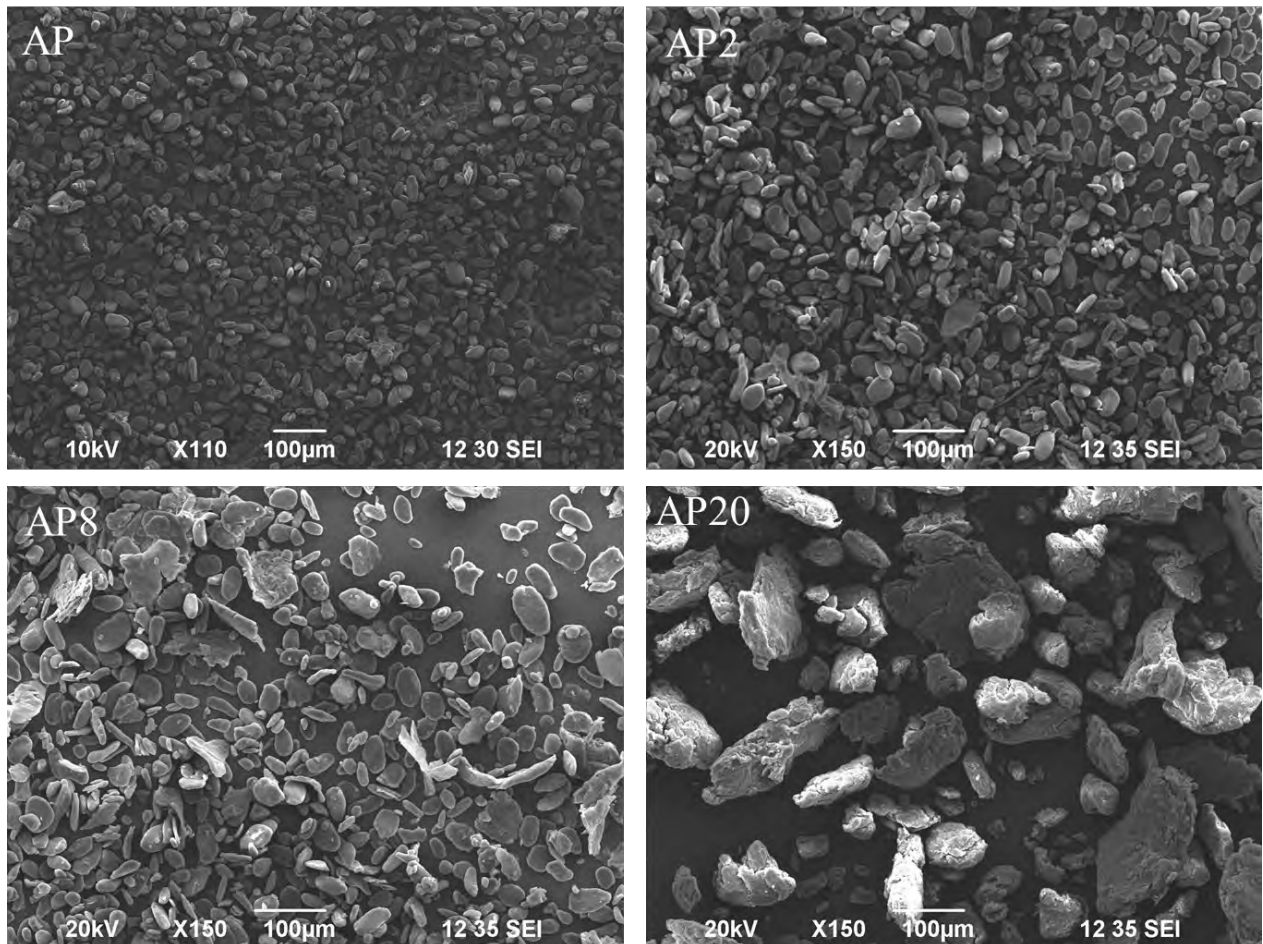
En la HY los gránulos tienen la misma estructura que en AY con la diferencia de que estos están contenidos dentro de una envoltura de aspecto rugoso. Esto se debe a que los gránulos de almidón se encuentran en el interior de las células conjuntamente con las proteínas, las grasas y los carbohidratos solubles de la yuca; los cuales son desechados en el proceso de extracción de almidón (Cobana and Antezana, 2008). El proceso de extracción del almidón consiste fundamentalmente en romper las paredes celulares para liberar los gránulos, mediante lavados y filtrados (Cobana and Antezana, 2008). En cambio, para la harina los filtrados son pasados por tamaños de poros más amplios y por tanto quedan residuos de los componentes de las células de la yuca (Tivana *et al.*, 2010).



**Figura 24.** Microscopia electrónica de barrido de almidón de yuca (AY) y harina de yuca (HY).

### 8.3.3. Almidón de plátano (AP)

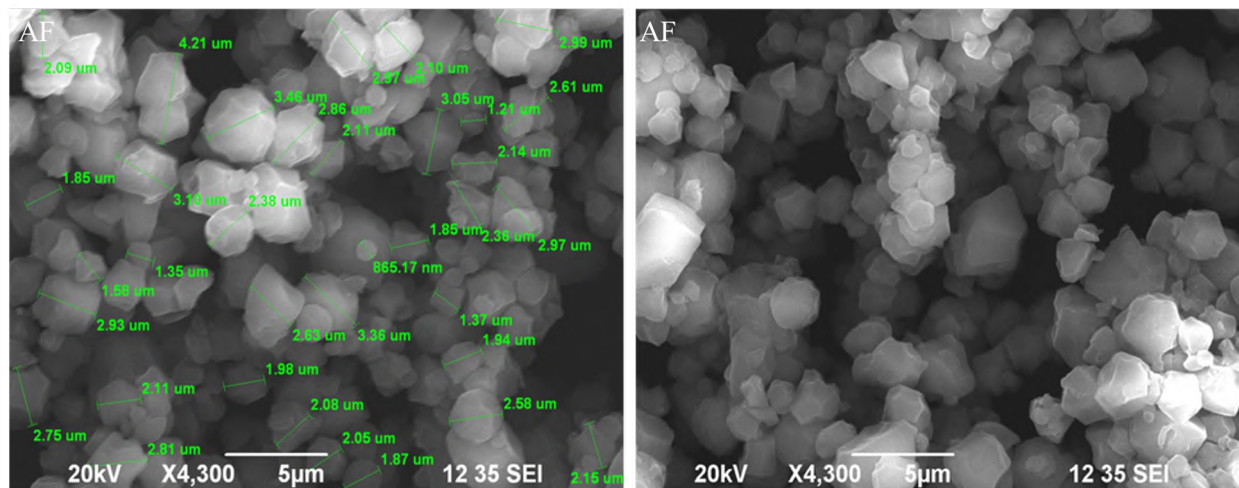
Las muestras de AP fueron analizadas por MEB antes y después de diferentes tiempos de molienda con el molino PM 400/2, usando 9 bolas de 20 mm (Figura 25). En la Figura 25 se observa la micrografía de AP sin molienda mecánica, la cual muestra una dispersión homogénea con gránulos aplanados y alargados de forma oval de tamaños variados (6 a 60  $\mu\text{m}$ ). Lo cual coincide con lo previamente reportado (Bello-Pérez *et al.*, 1999; Lii and Chang, 1981). Después de 2 min de molienda mecánica se observa la formación de pequeños fragmentos y tamaños más variados de gránulos (AP2). Mientras que a los 8 min de molienda se encuentran formas difusas y algunas aplanadas de forma oval (AP8). A los 20 min de molienda ya no existen gránulos de almidón y solo se observan aglomerados de diversos tamaños (AP20).



**Figura 25.** Microscopía electrónica de barrido de almidón de plátano sin molienda (AP) y a diferentes tiempos de molienda mecánica de alta energía: 2 min (AP2), 8 min (AP8) y 20 min (AP20) en molino planetario PM 400/2.

#### 8.3.4. Almidón de frijol (AF)

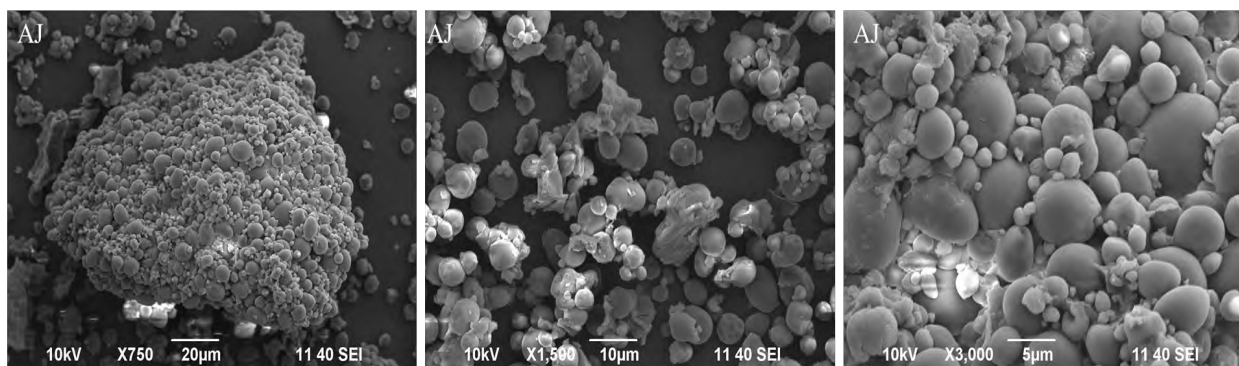
La muestra inicial de AF fue analizada en el microscopio electrónico de barrido como se observa en la Figura 26. En donde se aprecia una forma del gránulo irregular, principalmente poliédrica. Los gránulos de AF son de diferentes tamaños que van desde 1.8 a 3  $\mu\text{m}$ , presentan una superficie aparentemente lisa, sin fracturas ni poros y formando aglomerados. Algunos autores describen la morfología del AF como gránulos de aspecto oval de un tamaño promedio de 13 a 25  $\mu\text{m}$  (Ovando-Martínez *et al.*, 2011) lo que no coincide con nuestros resultados. La morfología observada en este trabajo se asemeja más a la morfología reportada para el almidón de maíz (Sujka and Jamroz, 2009).



**Figura 26.** Microscopia electrónica de barrido de almidón de frijol sin molienda (AF).

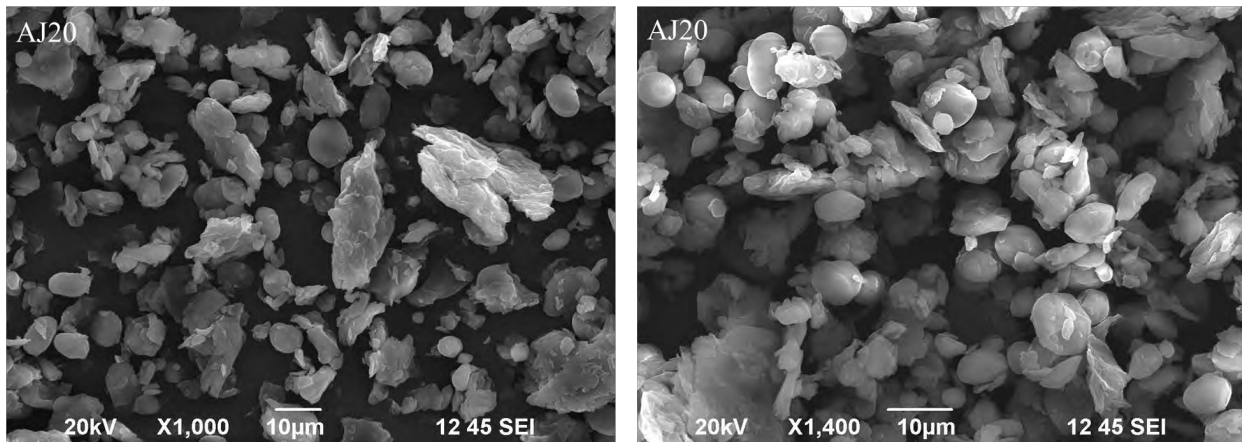
### 8.3.5 Almidón de jinicuil (AJ)

El análisis por MEB de AJ sin molienda, a 750X, 1500X y 3000X (Figura 27). En donde se observa que los gránulos de AJ tienden a formar aglomerados (AJ). Además de tener una forma circular bastante bien definida de tamaño y distribución variada. En la micrografía ampliada a 3000X, se muestra como los gránulos de AJ se aglomeran y tienen un tamaño <10 µm.



**Figura 27.** Microscopia electrónica de barrido de almidón de jinicuil (AJ) sin molienda mecánica a) 750X, b) 1500X y c) 3000X.

Las micrografías de los gránulos de AJ después de la molienda de 20 minutos en el molino PM 400/2 con 9 bolas de 20 mm de Fe se muestran en la Figura 28. A 1000X se observan los gránulos de forma y tamaño irregulares, así como en la superficie una pequeña cantidad de aglomerados y partículas de menor dimensión. Mientras que a 1400X se hace notoria la conformación granular dañada, mostrando de igual manera fragmentos de menor tamaño.



**Figura 28.** Microscopia electrónica de barrido de almidón de jinicuil con 20 min (AJ20) de molienda en el molino PM 400/2 con 9 bolas de 20 mm de Fe. 1000X y 1400X.

En general los resultados destacan que a mayor tiempo de molienda mayor cambio en la forma de la morfología de las muestras. Esto es debido a los múltiples impactos generados por la molienda mecánica, provocando así la aglomeración y modificación de la superficie de los gránulos, causando la pérdida de su forma definida. Similar a lo reportado por Liu *et al.* (2011).

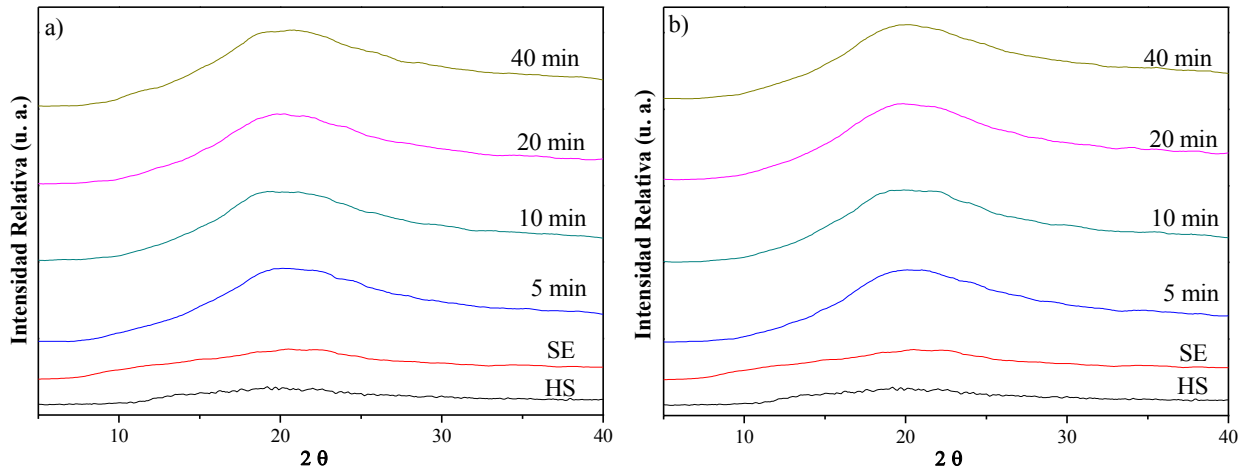
#### **8.4. Difracción de rayos-X (DRX)**

Los patrones de difracción de rayos X se muestran en las Figuras 29-34.

##### **8.4.1. Soya**

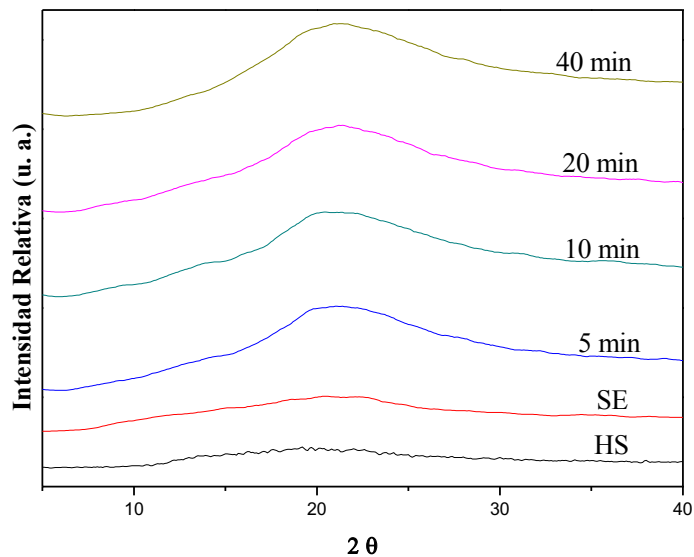
En la Figura 29 se ven los patrones de difracción de rayos X de HS, SE y SE con molienda mecánica en el molino de bolas planetario Pulverisette 7 premium line, con WC como material de molienda y usando dos diferentes diámetros de bolas. HS y SE tienen patrones de difracción característico de un material amorfo (Figura 29). En la molienda mecánica con 15 bolas de 10 mm (Figura 29a) después de 5 minutos de molienda, hay un incremento de la intensidad del pico observado alrededor de  $21^\circ$ . Esta reflexión está asociada al ordenamiento de los polisacáridos solubles de la soya y ha sido reportada por muchos autores (Wang *et al.*, 2017; Salarbashi *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2015). Lue *et al.*, (2015) reportan que al incrementar el grado de polimerización o interconexión entre los polisacáridos solubles de la soya disminuye su cristalinidad. En este trabajo la intensidad de la reflexión a los  $21^\circ$  aumenta conforme aumenta el tiempo de molienda, lo que implica que se está

perdiendo la interconexión entre los polisacáridos solubles provocando una mayor cristalinidad en las muestras. Lo anterior también es consistente con el incremento en la concentración de azúcares reductores conforme se incrementa el tiempo de molienda. No existe cambio significativo en los difractogramas de la muestra tratada con 15 bolas de 10 mm o con 4 bolas de 20 mm (Figura 29b).



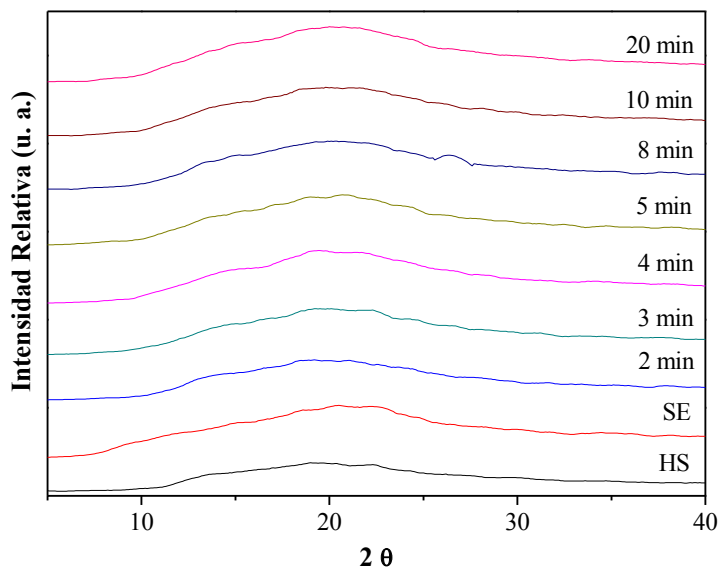
**Figura 29.** Patrones de difracción de rayos X de HS, SE y SE con molienda mecánica a diferentes tiempos. Pulverisette 7 premium line, WC como material de molienda y 15 bolas de 10 mm (a) o 4 bolas de 20 mm (b).

Los patrones de difracción de rayos X de HS, SE y SE con molienda mecánica en el molino de bolas planetario Pulverisette 7 premium line, con 4 bolas de 20 mm de Fe, se muestran en la Figura 30. En estos datos nuevamente se observa un incremento de la intensidad de la reflexión de alrededor de 21°.



**Figura 30.** Patrones de difracción de rayos de X de HS, SE y SE con molienda mecánica en molino Pulverisette 7 premium line con 4 bolas de 20 mm de Fe a diferentes tiempos.

Los patrones de difracción de rayos X de SE con molienda mecánica de alta energía en el molino planetario de bolas PM 400/2, con 9 bolas de 20 mm de Fe, se muestran en la Figura 31. A diferencia de lo encontrado con el molino Pulverisette 7 premium line lo que se observa en las muestras tratadas con el molino PM 400/2 es que no hay cambios significativos en la cristalinidad de las muestras. Lo anterior se puede asociar a que la baja energía generada en el molino PM 400/2 no es suficiente para romper la interconexión entre los polisacáridos solubles provocando que la cristalinidad en las muestras se mantenga constante.



**Figura 31.** Patrones de difracción de rayos X de HS, SE y SE con molienda mecánica en molino planetario PM 400/2, con 9 bolas de 20 mm de Fe a diferentes tiempos

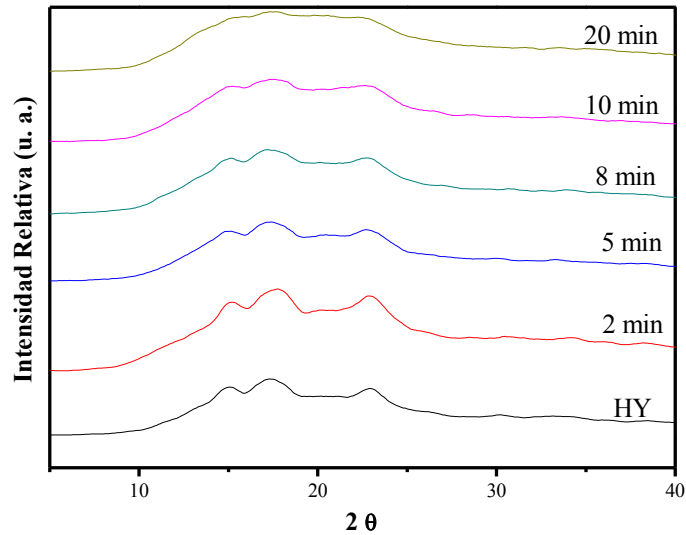
La soya se puede considerar como un material amorfo, y por lo tanto carente de estructura cristalina, debido a que está constituida principalmente por proteínas, carbohidratos, agua y aceites (Martino *et al.*, 2011). Lo anterior implica que en el patrón de difracción de rayos X no se tengan picos característicos como en los compuestos cristalinos. En los patrones de rayos X de las muestras de soya sólo se puede observar una banda muy ancha y poco intensa alrededor de los 21°, la cual se asocia al ordenamiento de los polisacáridos solubles de la soya (Wang *et al.*, 2017). Cuando la intensidad de los picos de difracción disminuye y el ancho aumenta significa que el material se está amortizando. Por el contrario, cuando la intensidad aumenta y los picos se vuelven más angostos entonces el material se está ordenando o está mejorando su cristalinidad. El análisis de los difractogramas con los dos molinos planetarios de bolas indica que para las moliendas con el molino Pulverisette 7 existe un ligero reordenamiento estructural a largo del tiempo de molienda,

lo cual no se percibe en el molino PM 400/2. Demostrando de esta manera que la cantidad de energía proporcionada por el molino PM 400/2 quizá sean insuficientes para modificar la estructura de la soya.

#### 8.4.2. Harina de yuca (HY)

En la Figura 32 se muestran los difractogramas la HY antes y después de la molienda mecánica a diferentes tiempos (molino planetario de bolas PM 400/2, con 9 bolas de 20 mm de Fe). El patrón de difracción de rayos X para la HY previo al proceso de molienda presenta tres reflexiones a 15, 18 y 23°, respectivamente. Estas reflexiones son características de almidón del tipo A, lo que coincide con lo reportado por Flores-Farías (2004). No obstante, existen otros reportes que describen los patrones de difracción de rayos X de la yuca con un comportamiento del almidón tipo C, que es la combinación de A y B (Lomelí-Ramírez *et al.*, 2010).

Al someter la HY a molienda mecánica se observa que al aumentar el tiempo de molienda estos picos se van perdiendo, por lo indican que la cristalinidad de la muestra disminuye. A los 10 minutos de molienda aún se alcanzan a distinguir estos picos, sin embargo, a los 20 minutos se pierden casi por completo las intensidades de 15 y 23°. Esta pérdida de intensidad de los picos genera un halo ensanchado característico de un patrón amorfo. En este caso no se observa por completo este perfil ya que aun después de 20 min de molienda se alcanzan a percibir un pequeño rastro de intensidad de los picos característicos. Pudiendo deberse a que los gránulos de almidón están envueltos como se observa en la microscopia (Figura 24). Provocando que este recubrimiento no permita que la energía liberada por la molienda mecánica incida por completo con los gránulos de almidón.

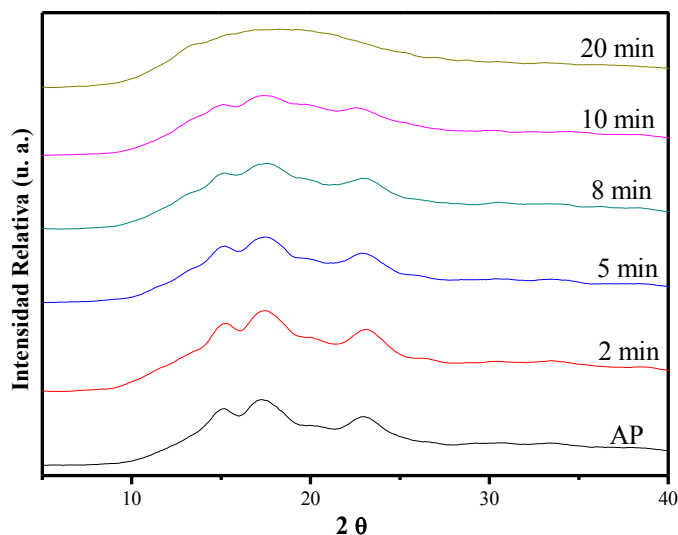


**Figura 32.** Patrones de difracción de rayos X de HY y HY con molienda mecánica a diferentes tiempos con 9 bolas de 20 mm de Fe en molino de bolas planetario Restch PM 400/2.

#### 8.4.3. Almidón de plátano (AP)

En la Figura 33 se muestran los difractogramas de AP antes y después de la molienda mecánica a diferentes tiempos (molino planetario de bolas PM 400/2, con 9 bolas de 20 mm de Fe). Se observó un fenómeno similar al descrito en HY. La muestra inicial de AP sin molienda mecánica tiene un patrón de rayos X del tipo A, esto es, tres picos en el ángulo de  $2\theta$  a 15, 17 y 23°, respectivamente. Bello-Pérez *et al.* (2000) reportan este mismo patrón de difracción para plátano macho y criollo. Sin embargo, también existen reportes que indican que el AP es de almidón del tipo B y C (Agama-Acevedo *et al.*, 2015). Por lo que se considera que la cristalinidad depende de diversos factores como son las condiciones climáticas y de crecimiento de la planta, tipo de cultivo, la técnica de aislamiento, así como también puede verse afectada en gran medida por la organización interna del almidón, esto es de las características estructurales principalmente de la amilopectina (Agama-Acevedo *et al.*, 2015; Jacobs and Delcour, 1998).

Para las muestras de AP con molienda mecánica de alta energía indican que existe pérdida de la intensidad conforme aumenta el tiempo de molienda, señalando que la muestra pierde su cristalinidad, predominando la fase amorfa. Este fenómeno es más notorio que en HY, ya que en la muestra inicial los gránulos de AP están sin residuos (Figura 25 AP). A los 10 min de molienda ya se percibe una disminución de la intensidad y al cabo de 20 min de molienda se alcanza por completo las características de un material amorfo.

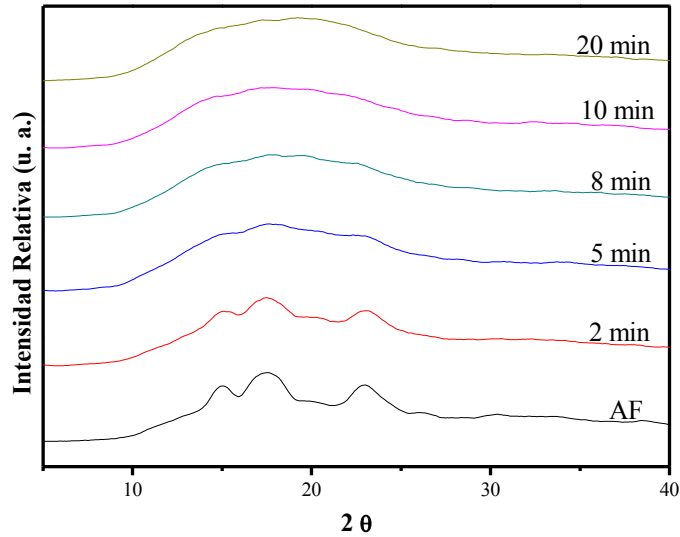


**Figura 33.** Patrones de difracción de rayos X de AP y AP con molienda mecánica a diferentes tiempos con 9 bolas de 20 mm de Fe en molino PM 400/2.

#### 8.4.4. Almidón de frijol (AF)

En la Figura 34 se muestran los difractogramas de AF antes y después de la molienda mecánica a diferentes tiempos (molino planetario de bolas PM 400/2, con 9 bolas de 20 mm de Fe). AF exhibe picos muy bien definidos en el ángulo de  $2\theta$  en  $15^\circ$ ,  $17^\circ$  y  $23^\circ$ , respectivamente; lo que se asocia a un patrón de rayos X del tipo A. Existen controversia entre el tipo de almidón que constituye al frijol, algunos estudios indican que está formado principalmente por el tipo C (Ovando-Martínez *et al.*, 2011), el cual es una mezcla entre tipo A y B. Sin embargo, la influencia que cada uno de estos tipos tienen proporciona una inclinación hacia un tipo u otro, algunos autores escriben el tipo estructura del almidón de frijol con un subíndice indicando la predominancia del tipo (por ejemplo si existe una predominancia del tipo A entonces se denota: tipo  $C_A$ ) (Kim *et al.*, 2007).

Los picos característicos del AF van perdiendo su intensidad conforme aumenta el tiempo de molienda, lo que indica que la muestra se va transformando en un material amorfo. A los 8 min de molienda ya se observa en su totalidad la pérdida de cristalinidad.

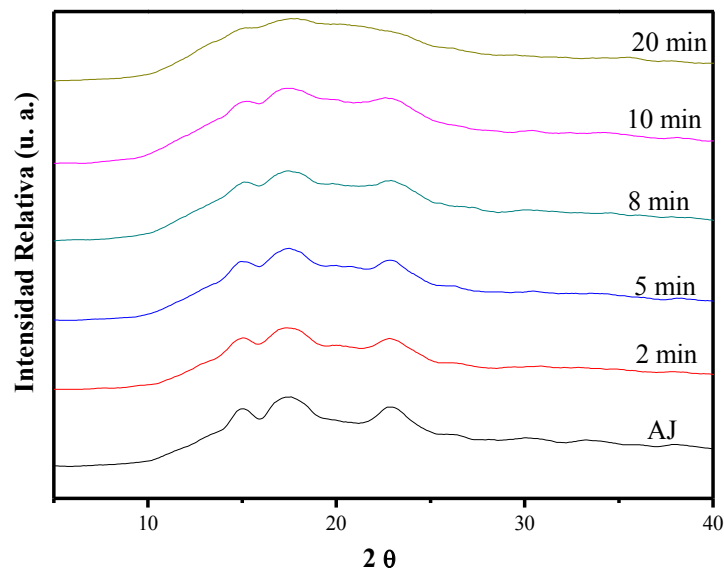


**Figura 34.** Patrones de difracción de rayos X de AF y AF con molienda mecánica a diferentes tiempos con 9 bolas de 20 mm de Fe en molino PM 400/2.

#### 8.4.5. Almidón de jinicuil (AJ)

En la Figura 35 se muestran los difractogramas de AJ antes y después de la molienda mecánica a diferentes tiempos (molino planetario de bolas PM 400/2, con 9 bolas de 20 mm de Fe). Los patrones de difracción encontrados en este trabajo para el AJ sugieren que es del tipo A. En el caso de jinicuil no existen datos en la literatura que hagan mención del tipo de almidón que lo constituyen.

Las intensidades de los picos característicos del AJ mantienen su intensidad hasta los 10 min de molienda mecánica, perdiendo su cristalinidad a los 20 min de molienda, tiempo en el cual ya hay un ensanchamiento completo, adquiriendo un perfil de difracción característico de un material amorfo.



**Figura 35.** Patrones de difracción de rayos-X de AJ y AJ con molienda mecánica a diferentes tiempos con 9 bolas de 20 mm de Fe en molino PM 400/2.

En general, la pérdida de cristalinidad nos indica que existe un cambio en la estructura del almidón principalmente en su arreglo de la doble hélice, que se sabe es por la ruptura de los enlaces de puentes de hidrógeno (Hizukuri, 1986; Roa-Acosta, 2015; Zobel *et al.*, 1988). Además, las variaciones entre el tiempo de molienda y la amorfización de los sustratos orgánicos analizados por difracción de rayos X puede estar en función de la fuente botánica, como lo es el tamaño de gránulo, el arreglo estructural de los principales componentes (la amilosa y la amilopectina), entre otros. Se sabe que la fuente botánica es determinante para las características fisicoquímicas de los almidones (Delcour *et al.*, 2010; Tester *et al.*, 2004; Zhu, 2015). El aumento en el tiempo de molienda podría estar afectando más allá de las interacciones de los puentes de hidrógeno. Por ejemplo, la ruptura de los enlaces covalentes de los carbohidratos dando origen a moléculas de menor tamaño o al entrecruzamiento de las mismas. Es por ello que es importante realizar más pruebas que confirmen esto.

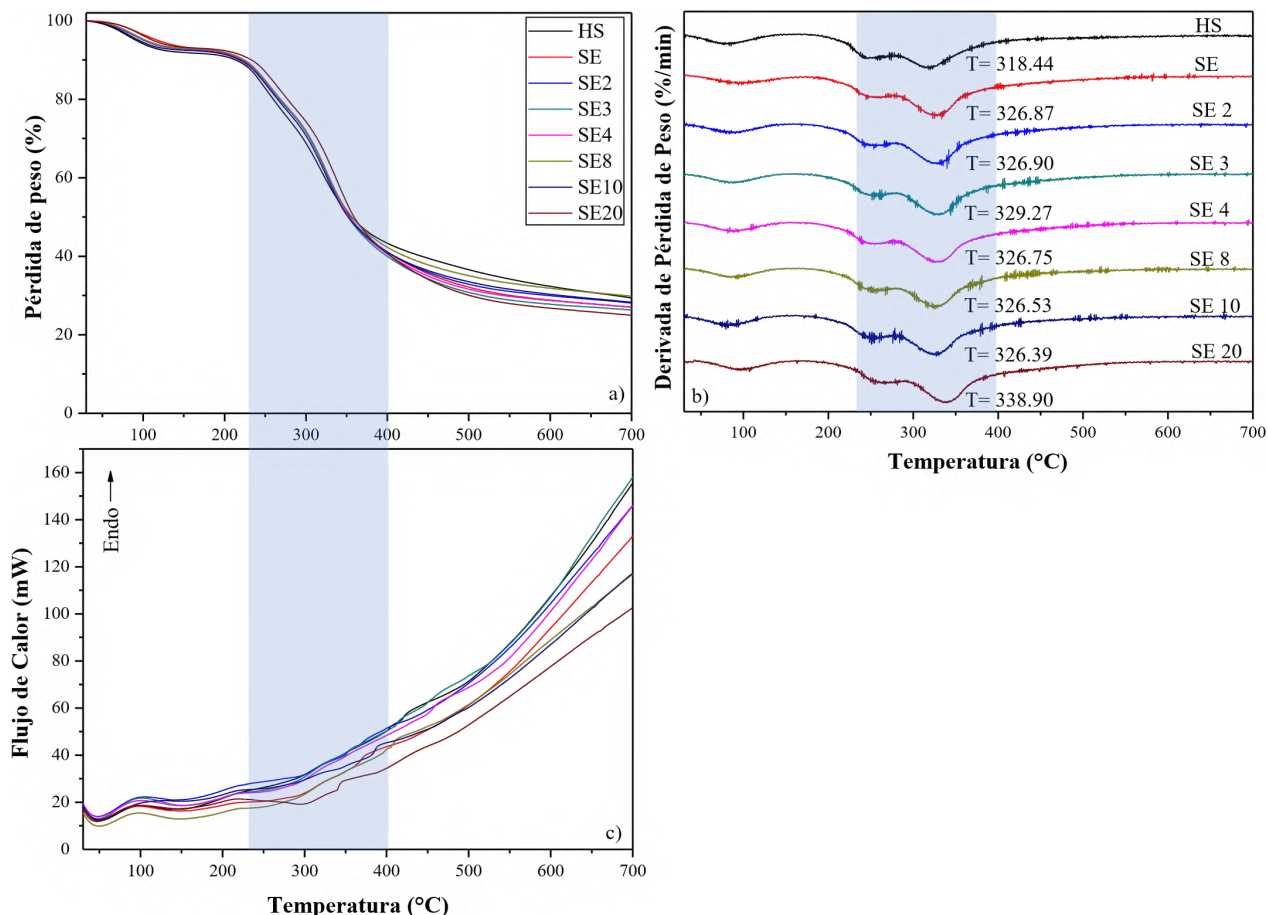
## 8.5. Análisis termogravimétrico (TGA) y térmico diferencial (DTA)

Los termogramas se muestran de las Figuras 36-40.

### 8.5.1. Soya

En la Figura 36 se muestra el análisis de termogravimétrico (TGA), las derivadas de las pérdidas de peso (DTGA) y flujo de calor (DTA) de las muestras de HS, SE y SE con diferentes tiempos de molienda mecánica de alta energía. En la Figura 36a se pueden observar dos etapas de pérdida de peso. La primera etapa se observa a 100 °C la cual está asociada a la evaporación de agua, aproximadamente 8 % del peso total de la muestra. La segunda región se encuentra entre 250 y 350 °C donde se observa que la pérdida de peso es de alrededor de 60%, atribuida a la degradación de los componentes de la soya. En las curvas de DTA se pueden ver más claramente que la segunda etapa consiste de dos eventos diferentes, uno alrededor de 250 °C y el otro por encima de 300 °C. Estos eventos se pueden asociar a la descomposición de enlaces glucosídicos y a la despolimerización de la SE (Londoño-Restrepo *et al.*, 2014; Bolio-López *et al.*, 2011). Aparentemente la molienda mecánica no tiene un efecto marcado en el comportamiento térmico de la SE. Solamente en la muestra con 20 min de molienda (SE20) se observa un pequeño desplazamiento a mayores temperaturas de descomposición y degradación.

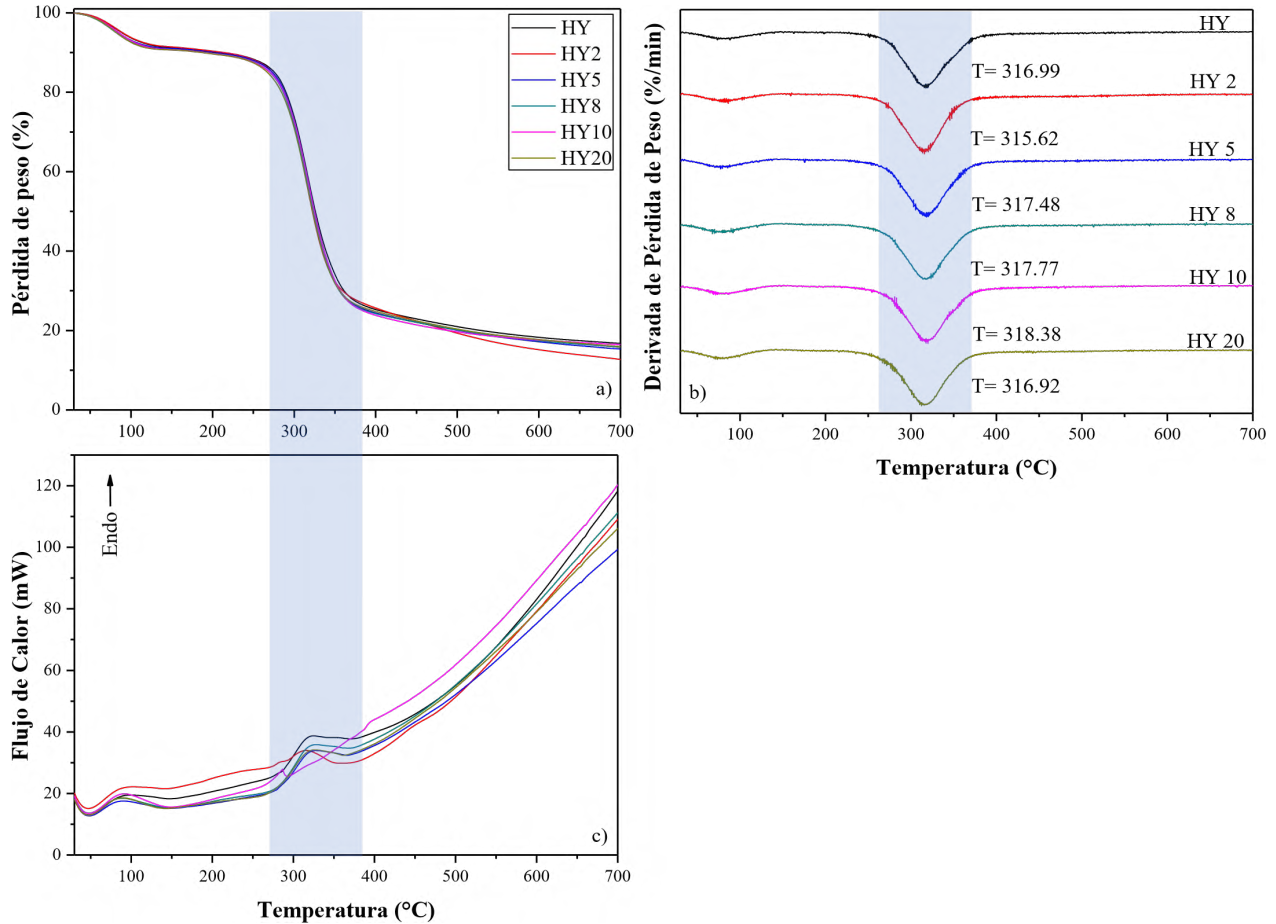
Por DTA se puede observar que una vez superada la temperatura de descomposición y degradación de las muestras (300 °C) solo quedan residuos carbonosos que requieren menos energía para su degradación, lo anterior se puede ver por una disminución en la pendiente de las curvas de DTA por arriba de los 400 °C.



**Figura 36.** Termogramas de las muestras de HS, SE y SE con molienda mecánica de alta energía. Curvas de pérdida de peso TGA (a), derivadas de las curvas de pérdida de peso con temperatura DTGA (b) y curvas de análisis térmico diferencial DTA (c). La franja azul representa el intervalo de temperatura en el cual se observa la mayor pérdida de masa.

### 8.5.2. Harina de yuca (HY)

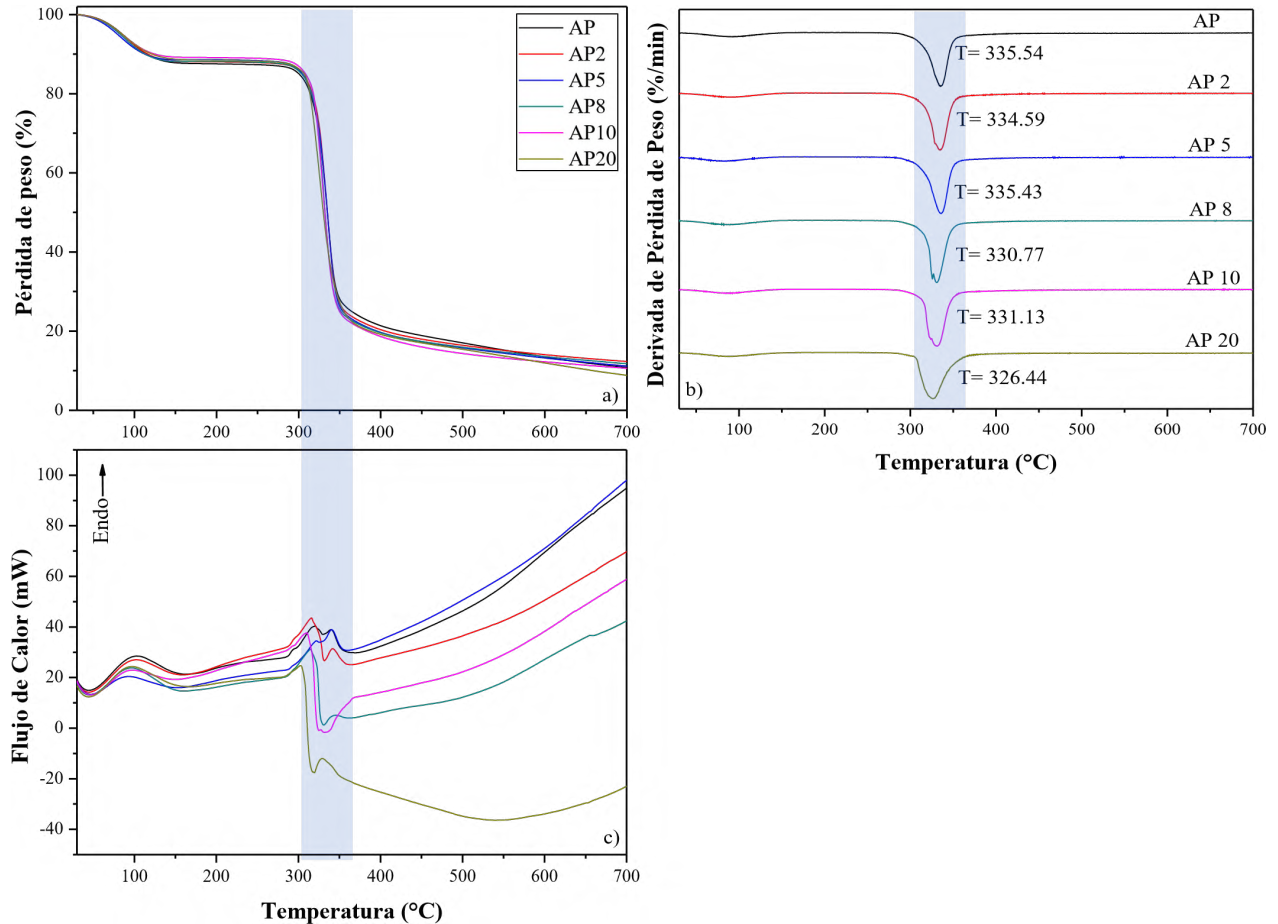
En la Figura 37 se muestran termogramas (TGA, DTGA y DTA) de la HY sin y con diferentes tiempos de molienda mecánica de alta energía. Similar a lo observado en la SE, en la HY se pueden observar dos regiones de pérdida de peso. La primera región es atribuida a la evaporación de agua, por debajo de 100 °C, de alrededor del 9.8 % (Figura 37a). La segunda región correspondiente a la degradación de almidón que inicia aproximadamente a los 280 y finaliza a los 350 °C con un porcentaje de pérdida de peso de aproximadamente un 65, como se observa en la Figura 37b. El flujo de calor endotérmico (Figura 37c) indica una creciente de energía necesaria para degradar la muestra de HY. Después de esta región lo que resta son los componentes inorgánicos, las cenizas que pudieran estar presentes en el biopolímero, las cuales se descomponen a temperaturas mayores. Para HY2 hay una ligera diferencia tanto en TGA, DTGA y DTA.



**Figura 37.** Termogramas de las muestras de HY antes y después de molienda mecánica de alta energía. Curvas de pérdida de peso TGA (a), derivadas de las curvas de pérdida de peso con temperatura DTGA (b) y curvas de análisis térmico diferencial DTA (c). La franja azul representa el intervalo de temperatura en el cual se observa la mayor pérdida de masa.

### 8.5.3. Almidón de plátano (AP)

En la Figura 38 se muestran los TGA, DTGA y DTA de AP sin y con diferentes tiempos de molienda mecánica de alta energía. En donde se pueden observar dos regiones de pérdida de peso. La primera región es atribuida a la evaporación de agua (100 °C) con una pérdida de peso de alrededor del 12 % (Figura 38a). La segunda región corresponde a la degradación de almidón que inicia aproximadamente a los 300 y termina 350 °C, obteniéndose para cada muestra temperaturas diferentes con respecto a los tiempos de molienda (Figura 38b), con un porcentaje de pérdida de peso de aproximadamente un 80 %. Las curvas de DTA muestran distintos flujos de energía necesaria para degradar la muestra de AP (Figura 38c). Estos valores deben ser reevaluados.

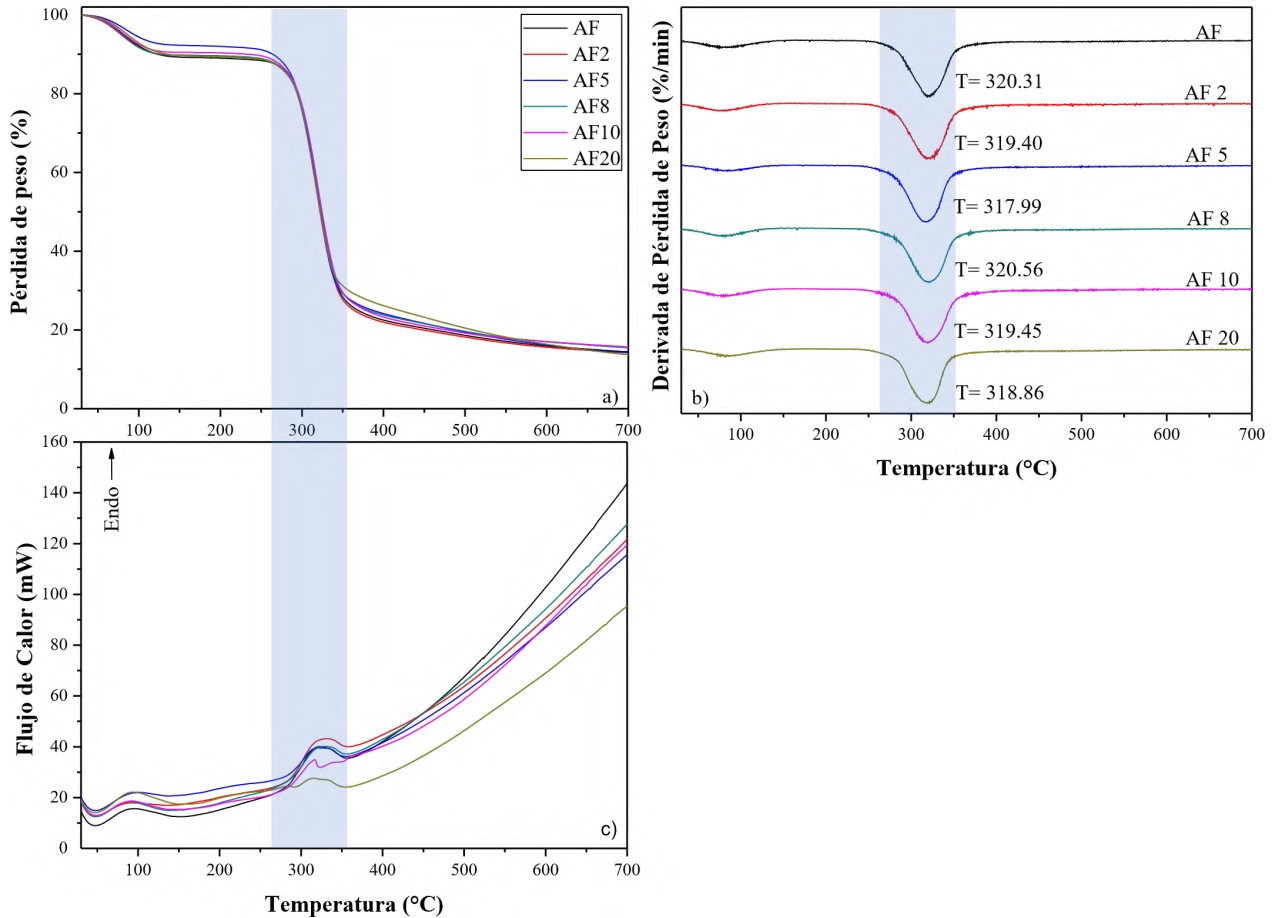


**Figura 38.** Termogramas de las muestras de AP antes y después de molienda mecánica de alta energía. Curvas de pérdida de peso TGA (a), derivadas de las curvas de pérdida de peso con temperatura DTGA (b) y curvas de análisis térmico diferencial DTA (c). La franja azul representa el intervalo de temperatura en el cual se observa la mayor pérdida de masa.

#### 8.5.4. Almidón de frijol (AF)

En la Figura 39 se muestran los TGA, DTGA y DTA de las muestras de AF sin y con diferentes tiempos de molienda mecánica de alta energía. En donde se pueden observar dos regiones de pérdida de peso. La primera región es atribuida a la evaporación de agua (100 °C) con una pérdida de alrededor del 10 % (Figura 39a). La segunda región correspondiente a la degradación del almidón que se presenta entre 270 y 350 °C (Figura 39b), con un porcentaje de pérdida de peso de aproximadamente 65. Las curvas de DTA indican una mayor necesidad de energía para degradar la muestra de AF (Figura 39c). Después de esta región lo que queda comprende al componente

inorgánico. No se observan diferencias en el TGA, mientras que en DTGA la variación de temperatura es mínima.

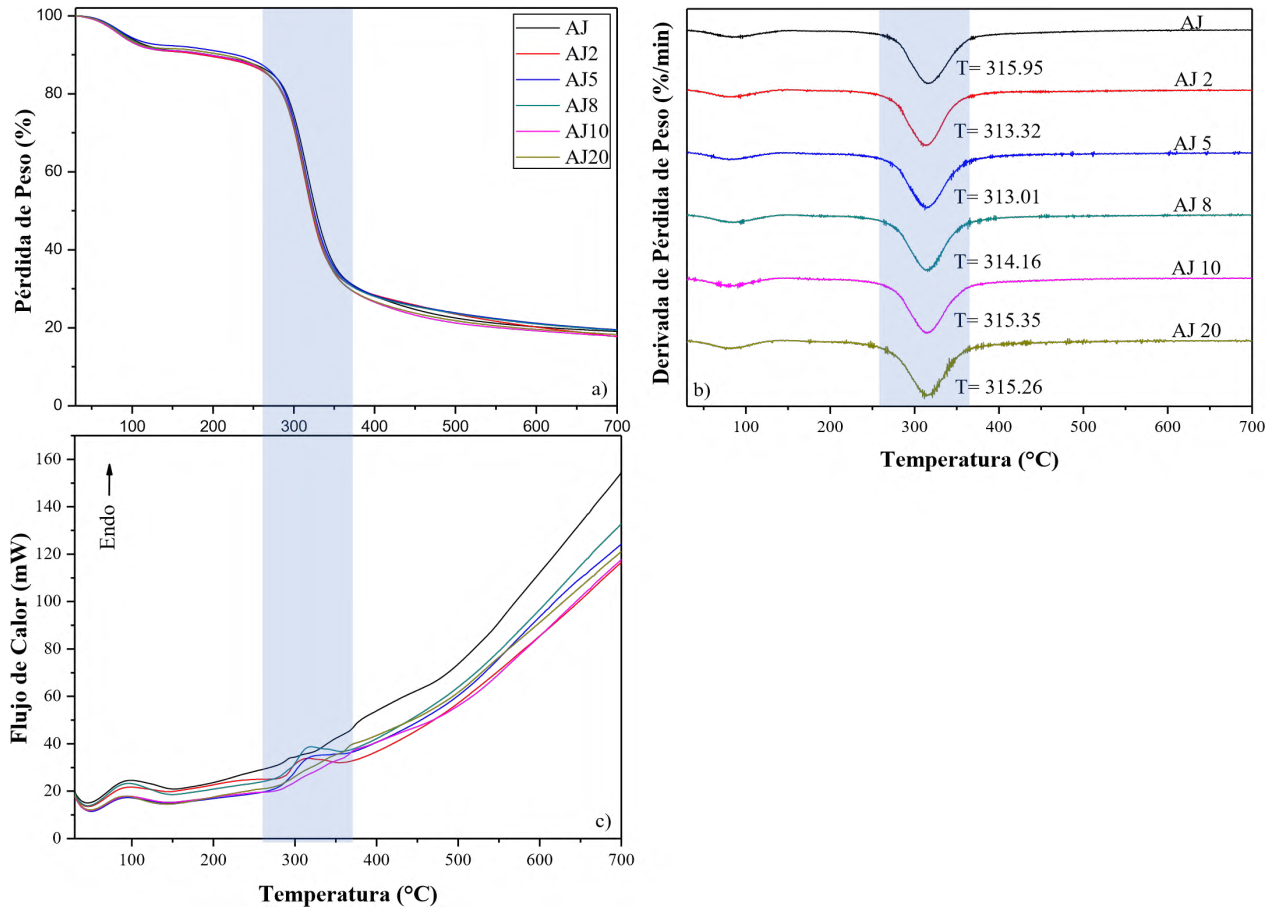


**Figura 39.** Termogramas de las muestras de AF antes y después de molienda mecánica de alta energía. Curvas de pérdida de peso TGA (a), derivadas de las curvas de pérdida de peso con temperatura DTGA (b) y curvas de análisis térmico diferencial DTA (c). La franja azul representa el intervalo de temperatura en el cual se observa la mayor pérdida de masa.

#### 8.5.5. Almidón de jinicuil (AJ)

En la Figura 40 se muestran los TGA, DTGA y DTA de AJ sin y con tiempos de molienda mecánica de alta energía. En donde se pueden observar dos regiones de pérdida de peso. La primera región atribuida a la evaporación de agua (100 °C) con una pérdida de alrededor del 10% (Figura 40a). La segunda región corresponde a la degradación del almidón, entre los 280 y 350°C, obteniéndose para cada muestra variaciones en las temperaturas con respecto a los tiempos de molienda (Figura 40b), con un porcentaje de pérdida de peso de aproximadamente 55. Las curvas de DTA dan

evidencia del incremento de energía necesaria para degradar AJ (Figura 40c). Después de esta región lo que queda comprende al componente inorgánico. No se observan diferencias a ninguno de los tiempos de molienda analizados.



**Figura 40.** Termogramas de las muestras de AJ antes y después de molienda mecánica de alta energía. Curvas de pérdida de peso TGA (a), derivadas de las curvas de pérdida de peso con temperatura DTGA (b) y curvas de análisis térmico diferencial DTA (c). La franja azul representa el intervalo de temperatura en el cual se observa la mayor pérdida de masa.

El análisis termogravimétrico de los diferentes sustratos orgánicos analizados en este trabajo mostraron dos etapas de pérdida de masa. En el caso de la soya además este análisis indica que probablemente la molienda mecánica de alta energía lleva a la estabilidad térmica de la soya, similar a lo reportado por Navarro-Mtz *et al.*, (2017). En el caso de HY, las temperaturas de pérdida de masa reportadas en este trabajo son similares con lo encontradas por Gaewchingduang and Pengthemkeerati, (2010), ellos indican que la segunda etapa de pérdida de peso inicia a aproximadamente a 300 °C finalizando a 350°C. Rendón-Villalobos *et al.*, (2011) muestran que la

segunda etapa en AP tiene un intervalo de temperatura entre 280 °C y 350 °C coincidiendo con los datos registrados en este estudio. En el caso de AF, Gabardo-Granza *et al.*, (2015) encuentra que la segunda etapa se da a 280 °C y terminando en 350 °C, datos que correlacionan con lo observado en este trabajo. En todos los casos atribuida a la descomposición del almidón.

No se observaron procesos de cristalización ni de transición de fase. Los flujos de calor varían dependiendo del tiempo de molienda y que entre más tiempo de molienda tenga el material es necesaria mayor energía para degradar, lo cual coincide con la temperatura máxima a la que son degradadas las muestras de almidón. Después de esta región lo que queda comprende al componente inorgánico, las cenizas que pudieran estar presentes en el biopolímero y las cuales se descomponen a temperaturas mayores.

## IX. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo permiten concluir que:

- En soya hay un incremento en la concentración de azúcares reductores tras la molienda mecánica de alta energía en el molino planetario de bolas. La cual varía en función del modelo del molino que está directamente relacionada con las energías que estos liberan.
- La concentración de azúcares reductores y la solubilidad se aumentaron con respecto al tiempo de molienda. Que además dependen del origen y la composición.
- Los cambios en el contenido de azúcares reductores y el incremento en la solubilidad hacen a los sustratos analizados en este trabajo candidatos posibles como componentes de medios de cultivo.
- El almidón de jinicuil tuvo alta susceptibilidad a la molienda mecánica de alta energía debido a que obtiene mayores concentraciones de azúcares reductores tanto antes como después de molienda a cortos tiempos.
- Los cambios estructurales como la formación de aglomerados, pérdida de cristalinidad y de masa producidos por la molienda mecánica sugieren un papel importante en el incremento en la concentración de azúcares reductores y el mejoramiento de la solubilidad.

## **X. PERSPECTIVAS DE TRABAJO**

Realizando pruebas para determinar los daños causados por la molienda mecánica de alta energía, como las pruebas de cuantificación de amilosa y amilopectina, reología, birrefringencia, entre otras. Así como también la identificación de subproductos generados, en cromatografía líquida de alta resolución.

Realizar ensayos de funcionalidad de los sustratos modificados por molienda mecánica para medios de cultivo y probarlos en diferentes microorganismos.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Abera, S.; Rakshit, S. K., Processing technology comparison of physicochemical and functional properties of cassava starch extracted from fresh root and dry chips. *Starch-Stärke* **2003**, 55 (7), 287-296.
- Adeoya, A.; Badejo, A.; Fagbemi, T., Effect of Acetylation on the Physical and Functional Properties of Industrial and Laboratory Cassava (*Manihot esculenta Crantz*) Starches. *Advances in Research* **2015**, 4 (3), 156-165.
- Adewale, I. O.; Adefila, A.; Adewale, T. B., Changes in Amylase Activity, Soluble Sugars and Proteins of Unripe Banana and Plantain during Ripening. **2013**.
- Agama-Acevedo, E.; Nunez-Santiago, M. C.; Alvarez-Ramirez, J.; Bello-Perez, L. A.; Physicochemical, digestibility and structural characteristics of starch isolated from banana cultivars. *Carbohydr Polym* **2015**, 124, 17-24.
- Alanís-López, P.; Pérez-González, J.; Rendón-Villalobos, R.; Jiménez-Pérez, A.; Solorza-Feria, J.; Extrusion and characterization of thermoplastic starch sheets from “Macho” banana. *Journal of food science* **2011**, 76 (6), E465-E471.
- AL-Bahri, M. B.; AL-Naimi, A.; Ahammed, S. H., Study the effect of hydrolysis variables on the production of soya proteins hydrolysis. *Al-Khwarizmi Eng J* **2009**, 5 (4), 25-38.
- Alcázar-Alay, S. C.; Meireles, M. A. A.; Physicochemical properties, modifications and applications of starches from different botanical sources. *Food Science and Technology (Campinas)* **2015**, 35 (2), 215-236.
- Alvani, K.; Qi, X.; Tester, R. F., Gelatinisation properties of native and annealed potato starches. *Stärke* **2012**, 64 (5), 297-303.
- Alvani, K.; Qi, X.; Tester, R. F., Gelatinisation properties of native and annealed potato starches. *Starch-Stärke* **2012**, 64 (4), 297-303.
- Aquihuatl, M.; Pérez, C.; Manual de prácticas de laboratorio microbiología general. Universidad Autónoma Metropolitana **2004**, 65-69.
- Badui Dergal, S., Química de los alimentos. México: Alhambra Mexicana **2006**.
- Bello Pérez, L. A.; Sáyago Ayerdi, S. G.; Villagómez Méndez, J.; Montiel Salas, L. I.; Almidón de plátano y calidad sensorial de dos tipos de galletas. *Agrociencia* **2000**, 34 (5).
- Bello-Perez, L. A.; Agama-Acevedo, E.; Sanchez-Hernandez, L.; Paredes-Lopez, O.; Isolation and partial characterization of banana starches. *Journal of Agricultural and Food Chemist* **1999**, 47 (3), 854-7.
- BeMiller, J. N.; Whistler, R. L., Starch: chemistry and technology. Academic Press: **2009**.

- Bertoft, E.; Laohaphatanalert, K.; Piyachomkwan, K.; Sriroth, K., The fine structure of cassava starch amylopectin. Part 2: building block structure of clusters. *Int J Biol Macromol* **2010**, 47 (3), 325-35.
- Betancur-Ancona, D.; López-Luna, J.; Chel-Guerrero, L., Comparison of the chemical composition and functional properties of *Phaseolus lunatus* prime and tailing starches. *Food chemistry* **2003**, 82 (2), 217-225.
- Biliaderis, C. G., The structure and interactions of starch with food constituents. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **1991**, 69 (1), 60-78.
- Bolio-López, G.; Valadez-González, A.; Veleza, L.; Andreeva, A., Whiskers de celulosa a partir de residuos agroindustriales de banano: Obtención y caracterización. *Revista mexicana de ingeniería química* **2011**, 10 (2), 291-299.
- Bressani, R., Valoración química nutricional de la harina de semilla de diferentes especies de Inga (I. *jinicuil*, I. *laurina*, I. *vera*). Estudios preliminares para su incorporación a la dieta de la población rural. **2010**.
- Bridson, E. Y., The OXOID Manual. 9 ed.; E. Y. Bridson: England, **2006**.
- Broseghini, M.; D'Incau, M.; Gelisio, L.; Pugno, N. M.; Scardi, P.; Effect of jar shape on high-energy planetary ball milling efficiency: Simulations and experiments. *Materials and Design* **2016**, 110, 365-374.
- Buléon, A.; Colonna, P.; Planchot, V.; Ball, S.; Starch granules: structure and biosynthesis. *International journal of biological macromolecules* **1998**, 23 (2), 85-112.
- Burgio, N.; Iasonna, A.; Magini, M.; Martelli, S.; Padella, F., Mechanical alloying of the Fe– Zr system. Correlation between input energy and end products. *Nuovo cimento D* **1991**, 13 (4), 459-476.
- Campos Vaquero, B. Síntesis y caracterización de los sistemas Eu (2 subíndice) O (3 subíndice) y Gd (2 subíndice) O (3 subíndice) por molienda mecánica. **2011**.
- Chung, H.-J.; Liu, Q.; Peter Pauls, K.; Fan, M. Z.; Yada, R.; In vitro starch digestibility, expected glycemic index and some physicochemical properties of starch and flour from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in Canada. *Food Research International* **2008**, 41 (9), 869-875.
- Cobana, M.; Antezana, R.; Proceso de extracción de almidón de yuca por vía seca. *Revista Boliviana de Química* **2007**, 24 (1), 78-84.
- Coutinho, L. S.; Batista, J. E. R.; Caliari, M.; Soares Júnior, M. S.; Optimization of extrusion variables for the production of snacks from by-products of rice and soybean. *Food Science and Technology (Campinas)* **2013**, 33 (4), 705-712.
- Cromwell, D., Soybean Meal—An Exceptional Protein Source. Soybean Meal Info Center **2012**.

- Delcour, J. A.; Bruneel, C.; Derde, L. J.; Gomand, S. V.; Pareyt, B.; Putseys, J. A.; Wilderjans, E.; Lamberts, L.; Fate of starch in food processing: from raw materials to final food products. *The Annual Review of Food Science and Technology* **2010**, 1, 87-111.
- Demiante, I.; Dupuy, N.; Huvenne, J.; Cereda, M.; Wosiacki, G.; Relationship between baking behavior of modified cassava starches and starch chemical structure determined by FTIR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers* **2000**, 42 (2), 149-158.
- Eldridge, A. C.; Black, L. T.; Wolf, W. J.; Carbohydrate composition of soybean flours, protein concentrates, and isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1979**, 27 (4), 799-802.
- Fajardo Castillo, E. E.; Sarmiento Forero, S. C.; Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. **2007**.
- Fan, J.; De Bruyn, M.; Budarin, V. L.; Gronnow, M. J.; Shuttleworth, P. S.; Breeden, S.; Macquarrie, D. J.; Clark, J. H.; Direct microwave-assisted hydrothermal depolymerization of cellulose. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, 135 (32), 11728-11731.
- Flores-Farias, S; Obtención de almidones con tamaño de partícula reducido mediante pulverizado mezclado con alta energía **2008**.
- Flores-Gorosquera, E.; García-Suárez, F. J.; Flores-Huicochea, E.; Núñez-Santiago, M. C.; González-Soto, R. A.; Bello-Pérez, L. A., Rendimiento del proceso de extracción de almidón a partir de frutos de plátano (*Musa paradisiaca*). Estudio en planta piloto. *Acta Científica Venezolana* **2004**, 55 (1), 86-90.
- Fonseca, L. M.; Gonçalves, J. R.; El Halal, S. L. M.; Pinto, V. Z.; Dias, A. R. G.; Jacques, A. C.; Zavareze, E. d. R., Oxidation of potato starch with different sodium hypochlorite concentrations and its effect on biodegradable films. *LWT - Food Science and Technology* **2015**, 60 (2), 714-720.
- Frioni, L., Microbiología Básica, ambiental y agrícola. L. Frioni: Uruguay, **2005**.
- Fritsch, Operating Manual Traslacion of the original. 1 ed.; Fritsch: German: Fritsch GmbH Milling, **2007**.
- Gaewchingduang, S.; Pengthemkeerati, P.; Enhancing efficiency for reducing sugar from cassava bagasse by pretreatment. *Measurement* **2010**, 5352, 15593.
- Garcia, V.; Colonna, P.; Bouchet, B.; Gallant, D. J., Structural changes of cassava starch granules after heating at intermediate water contents. *Starch-Stärke* **1997**, 49 (5), 171-179.
- Genkina, N. K.; Wikman, J.; Bertoft, E.; Yuryev, V. P., Effects of structural imperfection on gelatinization characteristics of amylopectin starches with A- and B-type crystallinity. *Biomacromolecules* **2007**, 8 (7), 2329-35.

- Gómez, G.; Batista, C.; Revisión bibliográfica Optimización de medios de cultivos para microorganismos, una valiosa estrategia para la producción de bioproductos de interés agrícola *Cultivos Tropicales* **2006**, 27 (3), 17-24.
- Gotor, F.; Achimovicova, M.; Real, C.; Balaz, P.; Influence of the milling parameters on the mechanical work intensity in planetary mills. *Powder technology* **2013**, 233, 1-7.
- Granza, A. G.; Travalini, A. P.; Farias, F. O.; Colman, T. A. D.; Schnitzler, E.; Demiate, I. M.; Effects of acetylation and acetylation–hydroxypropylation (dual-modification) on the properties of starch from Carioca bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2015**, 119 (1), 769-777.
- Hermiati, E.; Azuma, J.-i.; Tsubaki, S.; Mangunwidjaja, D.; Sunarti, T. C.; Suparno, O.; Prasetya, B.; Improvement of microwave-assisted hydrolysis of cassava pulp and tapioca flour by addition of activated carbon. *Carbohydrate polymers* **2012**, 87 (1), 939-942.
- Hernández, A. Microbiología industrial; 996831255X; San José, CR: EUNED: **2003**.
- Hernández-Medina, M.; Torruco-Uco, J. G.; Chel-Guerrero, L.; Betancur-Ancona, D.; Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. *Food Science and Technology* (Campinas) **2008**, 28 (3), 718-726.
- Hizukuri, S., Relationship between the distribution of the chain length of amylopectin and the crystalline structure of starch granules. *Carbohydrate research* **1985**, 141 (2), 295-306.
- Hizukuri, S.; Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance. *Carbohydrate research* **1986**, 147 (2), 342-347.
- Hongsprabhas, P.; Israkarn, K.; Rattanawattanaprakit, C., Architectural changes of heated mungbean, rice and cassava starch granules: Effects of hydrocolloids and protein-containing envelope. *Carbohydrate Polymers* **2007**, 67 (4), 614-622.
- Hu, X. M.; Zhang, B. X.; Dong, S. J.; Zhao, Y.; Gao, Y. F., Hydrolysis of Soybean By-Products to Prepare Reducing Sugar in Ionic Liquids. *Asian Journal of Chemistry* **2014**, 26 (24), 8475-8478.
- Johansson, A., Correlation between process parameters and milling efficiency. **2012**.
- Kapdan, I. K.; Kargi, F., Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and microbial technology* **2006**, 38 (5), 569-582.
- Karapinar, K.; Fikret, K. L., Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology* **2006**, 38 (5), 569-582.
- Karr-Lilienthal, L. K.; Kadzere, C. T.; Grieshop, C. M.; Fahey, G. C., Chemical and nutritional properties of soybean carbohydrates as related to nonruminants: A review. *Livestock Production Science* **2005**, 97 (1), 1-12.

- Kasemwong, K.; Ruktanonchai, U. R.; Srinuanchai, W.; Itthisoponkul, T.; Srirath, K.; Effect of high-pressure microfluidization on the structure of cassava starch granule. *Starch-Stärke* **2011**, 63 (3), 160-170.
- Kawamura, S.; Tanusi, S.; Tada, M., Acid hydrolysis of soybean oligosaccharides at the isoelectric point of soybean globulins. *Kagawa Univ Fac Agr Tech Bull* **1970**.
- Kim, S. H.; Lee, B. H.; Baik, M. Y.; Joo, M. H.; Yoo, S. H.; Chemical structure and physical properties of mung bean starches isolated from 5 domestic cultivars. *Journal of Food Science* **2007**, 72 (9), C471-7.
- Kiseleva, V. I.; Krivandin, A. V.; Fornal, J.; Blaszczyk, W.; Jelinski, T.; Yuryev, V. P., Annealing of normal and mutant wheat starches. LM, SEM, DSC, and SAXS studies. *Carbohydr Res* **2005**, 340 (1), 75-83.
- Klein, B.; Vanier, N. L.; Moomand, K.; Pinto, V. Z.; Colussi, R.; da Rosa Zavareze, E.; Dias, A. R., Ozone oxidation of cassava starch in aqueous solution at different pH. *Food Chem* **2014**, 155, 167-73.
- Kokorevics, A.; Gravitis, J., Cellulose depolymerization to glucose and other water soluble polysaccharides by shear deformation and high pressure treatment. *Glycoconjugate journal* **1997**, 14 (5), 669-676.
- Leonel, E.; Nassar, E.; Ciuffi, K.; dos Reis, M.; Calefi, P.; Effect of high-energy ball milling in the structural and textural properties of kaolinite. *Cerâmica* **2014**, 60 (354), 267-272.
- Li, J.; Wei, X.; Wang, Q.; Chen, J.; Chang, G.; Kong, L.; Su, J.; Liu, Y.; Homogeneous isolation of nanocellulose from sugarcane bagasse by high pressure homogenization. *Carbohydrate Polymers* **2012**, 90 (4), 1609-1613.
- Li, N.; Niu, M.; Zhang, B.; Zhao, S.; Xiong, S.; Xie, F.; Effects of concurrent ball milling and octenyl succinylation on structure and physicochemical properties of starch. *Carbohydrate Polymers* **2017**, 155, 109-116.
- Lii, C. Y.; Chang, S. M.; Characterization of red bean (*Phaseolus radiatus* var. Aurea) starch and its noodle quality. *Journal of Food Science* **1981**, 46 (1), 78-81.
- Lii, C. Y.; Chang, S. M.; Young, Y. L.; Investigation of the physical and chemical properties of banana starches. *Journal of Food Science* **1982**, 47 (5), 1493-1497.
- Liu, H.; Ramsden, L.; Corke, H., Physical Properties of Cross-linked and Acetylated Normal and Waxy Rice Starch. *Starch-Stärke* **1999**, 51 (7), 249-252.
- Liu, T. Y.; Ma, Y.; Yu, S. F.; Shi, J.; Xue, S.; The effect of ball milling treatment on structure and porosity of maize starch granule. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2011**, 12 (4), 586-593.
- Loh, Z. H.; Samanta, A. K.; Sia Heng, P. W., Overview of milling techniques for improving the solubility of poorly water-soluble drugs. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2015**, 10 (4), 255-274.

- Londoño-Restrepo, S. M.; Rincón-Londoño, N.; Contreras-Padilla, M.; Acosta-Osorio, A. A.; Bello-Pérez, L. A.; Lucas-Aguirre, J. C.; Quintero, V. D.; Pineda-Gómez, P.; del Real-López, A.; Rodríguez-García, M. E., Physicochemical, morphological, and rheological characterization of Xanthosoma robustum Lego-like starch. *International journal of biological macromolecules* **2014**, 65, 222-228.
- MacAllister, R. V., Nutritive Sweeteners made from Starch. **1979**, 36, 15-56.
- Madigan, M.; Martinko, J.; Parker, J., *Biología de los microorganismos*. 10<sup>a</sup> ed.; Washington DC, Estados Unidos, **2003**.
- Martín, J. C.; López, E.; Modificación física del almidón de yuca y evaluación de la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática por una alfa amilasa. *Revista colombiana de química* **2009**, 38 (3), 395-408.
- Martino, H. S. D.; de Moraes Cardoso, L.; Ribeiro, S. M. R.; de Souza Dantas, M. I.; Piovesan, N. D.; De Mejía, E.; Nutritional and Bioactive Compounds of Soybean: Benefits on Human Health. In *Soybean and Health, InTech*: **2011**.
- Mbougoung, P. D.; Tenin, D.; Scher, J.; Tchiégang, C., Influence of acetylation on physicochemical, functional and thermal properties of potato and cassava starches. *Journal of Food Engineering* **2012**, 108 (2), 320-326.
- Medina, D. A. P.; Nuñez, M. F. A.; Ordoñez, M. S., Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo de banano. *Revista Tecnológica-ESPOL* **2010**, 23 (1).
- Miller, G. L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry* **1959**, 31 (3), 426-428.
- Morrison, W.; Tester, R.; Gidley, M.; Properties of damaged starch granules. II. Crystallinity, molecular order and gelatinisation of ball-milled starches. *Journal of Cereal Science* **1994**, 19 (3), 209-217.
- Navarro-Mtz, A.; Urzua-Valenzuela, M.; Morelos-Pedro, M.; Roldan-Sabino, C.; Quintana-Melgoza, J.; Juarez-Arellano, E., Hydrogen Production from Non-Conventional Biomass Pyrolysis. *Inorganic Chemistry: An Indian Journal* **2017**, 12 (1).
- Ostlund, A.; Lundberg, D.; Nordstierna, L.; Holmberg, K.; Nyden, M., Dissolution and gelation of cellulose in TBAF/DMSO solutions: the roles of fluoride ions and water. *Biomacromolecules* **2009**, 10 (9), 2401-7.
- Ovando-Martínez, M.; Bello-Pérez, L. A.; Whitney, K.; Osorio-Díaz, P.; Simsek, S., Starch characteristics of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in different localities. *Carbohydrate Polymers* **2011**, 85 (1), 54-64.
- Pouyet, F.; Chirat, C.; Potthast, A.; Lachenal, D., Formation of carbonyl groups on cellulose during ozone treatment of pulp: consequences for pulp bleaching. *Carbohydrate Polymers* **2014**, 109, 85-91.

- Rajan, A.; Abraham, T. E.; Enzymatic modification of cassava starch by bacterial lipase. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **2006**, 29 (1), 65-71.
- Rajan, A.; Sudha, J.; Abraham, T. E.; Enzymatic modification of cassava starch by fungal lipase. *Industrial crops and products* **2008**, 27 (1), 50-59.
- Ramírez, M. G. L.; Muniz, G. I.; Satyanarayana, K. G.; Tanobe, V.; Iwakiri, S.; Preparation and characterization of biodegradable composites based on Brazilian cassava starch, corn starch and green coconut fibers. *Matéria (Rio de Janeiro)* **2010**, 15 (2), 330-337.
- Ren, G.-y.; Li, D.; Wang, L.-j.; Özkan, N.; Mao, Z.-h.; Morphological properties and thermoanalysis of micronized cassava starch. *Carbohydrate Polymers* **2010**, 79 (1), 101-105.
- Renau-Piqueras, J.; Faura, M.; Principios básicos del microscopio electrónico de barrido. Centro de Investigación. Hospital" La Fé", Sección de microscopía electrónica, Valencia, España **1994**.
- Retsch, Operating Instructions Ball Mills. 1 ed.; Retsch: German, **2016**.
- Rivas, G.; Almidón acetilado de plátano: caracterización fisicoquímica y molecular. Tesis Doctoral en Ciencia de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, **2012**.
- Rivas-Gonzalez, M. Caracterización fisicoquímica y molecular del almidón de plátano (*Musa Paradisiaca* L. var. Macho) modificado por métodos químicos. Investigación, Instituto Politécnico Nacional, México, **2006**.
- Rivas-González, M.; Caracterización fisicoquímica y molecular del almidón de plátano (*Musa paradisiaca* L. var. Macho) modificado por métodos químicos. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, **2006**.
- Roa Acosta, D. F. Métodos de molienda seca y húmeda en molino planetario para la obtención y caracterización de fracciones de amaranto y su aplicación como agente encapsulante. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, **2015**.
- Roa, D. F.; Baeza, R. I.; Tolaba, M. P.; Effect of ball milling energy on rheological and thermal properties of amaranth flour. *Journal of Food Science* **2015**, 52 (12), 8389-94.
- Roger, P.; Bello-Perez, L. A.; Colonna, P.; Contribution of amylose and amylopectin to the light scattering behaviour of starches in aqueous solution. *Polymer* **1999**, 40 (25), 6897-6909.
- Salarbashi, D.; Mortazavi, S. A.; Noghabi, M. S.; Bazzaz, B. S. F.; Sedaghat, N.; Ramezani, M.; Shahabi-Ghahfarrokhi, I.; Development of new active packaging film made from a soluble soybean polysaccharide incorporating ZnO nanoparticles. *Carbohydrate polymers* **2016**, 140, 220-227.
- Sánchez Mendoza, N. A.; Jiménez Martínez, C.; Cardador Martínez, A.; Martín del Campo Barba, S. T.; Dávila Ortiz, G.; Caracterización física, nutricional y no nutricional de las semillas de *Inga paterno*. *Revista chilena de nutrición* **2016**, 43 (4), 10-10.

- Sánchez, T.; Salcedo, E.; Ceballos, H.; Dufour, D.; Mafla, G.; Morante, N.; Calle, F.; Pérez, J. C.; Debouck, D.; Jaramillo, G.; Screening of starch quality traits in cassava (*Manihot esculenta Crantz*). *Starch-Stärke* **2009**, 61 (1), 12-19.
- Sathe, S.; Salunkhe, D.; Functional properties of the great northern bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins: emulsion, foaming, viscosity, and gelation properties. *Journal of Food Science* **1981**, 46 (1), 71-81.
- Simanjuntak, W.; Satria, H.; Utami, N., Production of Reducing Sugar from Cassava Solid Waste by Simultaneous Ultrasonication and Acid Hydrolysis. *Indonesian Journal of Chemistry* **2014**, 14 (3), 233.
- Sopicka-Lizer, M., High-energy ball milling: mechanochemical processing of nanopowders. Elsevier: **2010**.
- Stanbury, P. F.; Whitaker, A.; Hall, S. J.; Principles of fermentation technology. Elsevier: **2013**.
- Sujka, M.; Jamroz, J.;  $\alpha$ -Amylolysis of native potato and corn starches—SEM, AFM, nitrogen and iodine sorption investigations. *LWT-Food Science and Technology* **2009**, 42 (7), 1219-1224.
- Suryanarayana, C.; Mechanical alloying and milling. *Progress in materials science* **2001**, 46 (1), 1-184.
- Tester, R. F.; Karkalas, J.; Qi, X.; Starch- composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science* **2004**, 39 (2), 151-165.
- Tivana, L. D.; Dejmek, P.; Bergenståhl, B.; Characterization of the agglomeration of roasted shredded cassava (*Manihot esculenta crantz*) roots. *Starch-Stärke* **2010**, 62 (12), 637-646.
- Vamadevan, V.; Bertoft, E.; Seetharaman, K., On the importance of organization of glucan chains on thermal properties of starch. *Carbohydrate Polymers* **2013**, 92 (2), 1653-9.
- Vamadevan, V.; Bertoft, E.; Soldatov, D. V.; Seetharaman, K., Impact on molecular organization of amylopectin in starch granules upon annealing. *Carbohydrate Polymers* **2013**, 98 (1), 1045-55.
- van de Velde, F.; van Riel, J.; Tromp, R. H.; Visualisation of starch granule morphologies using confocal scanning laser microscopy (CSLM). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2002**, 82 (13), 1528-1536.
- Van Der Maarel, M. J.; Van Der Veen, B.; Uitdehaag, J. C.; Leemhuis, H.; Dijkhuizen, L.; Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *Journal of biotechnology* **2002**, 94 (2), 137-155.
- Van Holde, K. E.; Johnson, W. C.; Ho, P. S.; Principles of physical biochemistry. **2006**.
- Varela, G.; Grotiuz, G., Fisiología y metabolismo bacteriano. Uruguay, Editorial Cefa **2002**.
- Vermeulen, R.; Goderis, B.; Reynaers, H.; Delcour, J. A., Amylopectin molecular structure reflected in macromolecular organization of granular starch. *Biomacromolecules* **2004**, 5 (5), 1775-1786.

- Vittadini, E.; Carini, E.; Chiavaro, E.; Rovere, P.; Barbanti, D.; High pressure-induced tapioca starch gels: physico-chemical characterization and stability. *European Food Research and Technology* **2008**, 226 (4), 889-896.
- Waliszewski, K. N.; Aparicio, M. A.; Bello, L. s. A.; Monroy, J. A., Changes of banana starch by chemical and physical modification. *Carbohydrate polymers* **2003**, 52 (3), 237-242.
- Walker, G., Media for industrial fermentations. 2 ed.; A. Press. Elsevier: UK, **2014**; 1.
- Wang, L.; Wang, Y. J., Structures and physicochemical properties of acid-thinned corn, potato and rice starches. *Starch-Stärke* **2001**, 53 (11), 570-576.
- Wang, S.; Wang, J.; Zhang, W.; Li, C.; Yu, J.; Wang, S.; Molecular order and functional properties of starches from three waxy wheat varieties grown in China. *Food Chem* **2015**, 181, 43-50.
- Wang, Z.; Kang, H.; Zhang, W.; Zhang, S.; Li, J.; Improvement of Interfacial Adhesion by Bio-Inspired Catechol-Functionalized Soy Protein with Versatile Reactivity: Preparation of Fully Utilizable Soy-Based Film. *Polymers* **2017**, 9 (3), 95.
- Waterschoot, J.; Gomand, S. V.; Fierens, E.; Delcour, J. A.; Production, structure, physicochemical and functional properties of maize, cassava, wheat, potato and rice starches. *Starch - Stärke* **2015**, 67 (1-2), 14-29.
- Wieczorek-Ciurowa, K.; Gamrat, K.; Some aspects of mechanochemical reactions. *Materials Science Poland* **2007**, 25 (1), 219-232.
- Xie, Y.; Yan, M.; Yuan, S.; Sun, S.; Huo, Q.; Effect of microwave treatment on the physicochemical properties of potato starch granules. *Chemistry Central Journal* **2013**, 7 (1), 113.
- Yu, J.; Wang, S.; Wang, J.; Li, C.; Xin, Q.; Huang, W.; Zhang, Y.; He, Z.; Wang, S.; Effect of laboratory milling on properties of starches isolated from different flour millstreams of hard and soft wheat. *Food Chem* **2015**, 172, 504-14.
- Zhu, F., Composition, structure, physicochemical properties, and modifications of cassava starch. *Carbohydrate Polymers* **2015**, 122, 456-80.
- Zobel, H.; Young, S.; Rocca, L.; Starch gelatinization: An X-ray diffraction study. *Cereal Chem* **1988**, 65 (6), 443-446.

