

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISION DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



Evaluación de Sargazo para su Aplicación Como Soporte-Sustrato en la Producción de Antioxidantes

POR:

ANA LILIA GUADALUPE ALVARADO SALAZAR

Presentada Como Requisito Parcial para Obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenavista. Saltillo, Coahuila. México

JUNIO 2021

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISION DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Evaluación de Sargazo para su Aplicación Como Soporte-Sustrato en la Producción de Antioxidantes

POR:

ANA LILIA GUADALUPE ALVARADO SALAZAR

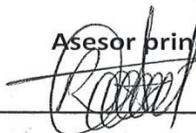
TESIS

QUE SOMETE A LA CONSIDERACION DEL H. JURADO EXAMINADOR COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

El siguiente trabajo ha sido dirigido por el siguiente comité:

Asesor principal



Dr. Armando Robledo Olivo

Co-asesor



Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez

Co-asesor

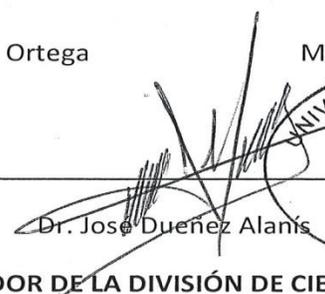


MC. Sarahí del Carmen Rangel Ortega

Co-asesor externo



MC. Rosa María Paredes Camacho

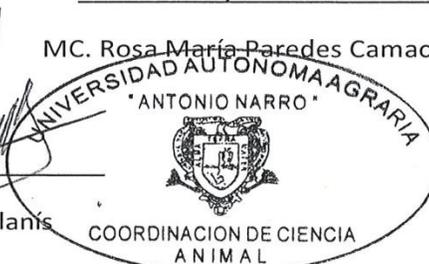


Dr. José Duñez Alanís

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Saltillo, Coahuila. México

Junio 2021



DECLARACIÓN DE INTEGRIDAD

Por la presente declaro que he realizado mi tesis con integridad. Confirmando que no he recurrido a ningún plagio o falsificación de resultados en el proceso de elaboración de la tesis.

Nombre completo: Ana Lilia Guadalupe Awarado Salazar.

Firma: Ana Salazar.

El presente trabajo de tesis forma parte del Proyecto: 38111-425204001-2289. De la Dirección de investigación de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Este proyecto impacta la línea de investigación “Obtención, caracterización y evaluación de aditivos para uso agroalimentario” del cuerpo académico UAAAN-CA-26 Bioprocesos Agroalimentarios.



SEP
SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



UAAAN
Universidad Autónoma Agraria
Antonio Narro

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a **DIOS** por darme la vida y permitirme cumplir mis propósitos y metas.

Por darme una familia maravillosa que me quiere, me apoya, confían plenamente en mí y me motivan a ser una mejor persona.

A **mis padres** María Guadalupe Salazar Salazar y José Guadalupe Alvarado Valero por su apoyo y pláticas que me daban para poder ser una mejor persona, sacrificios y apoyo para salir adelante.

A **mis tías** Gloria Graciela Salazar Salazar, María Concepción Salazar Salazar y **mi hermano** José Guadalupe Alvarado Salazar, por sus consejos, sacrificios y apoyo a lo largo de mi trayectoria en la universidad y sobre todo por creer en mi capacidad para poder lograrlo.

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** la responsable de la adquisición de todo mis conocimientos y mi carrera para poder enfrentar un mundo laboral.

A **La maestra en ciencias** Rosa María Paredes Camacho por su tiempo y su enseñanza en las pruebas de laboratorio, por su tiempo y paciencia para guiarme en dudas o aclaraciones que me surgían y estar durante todo el proyecto.

Al **Dr.** Armando Robledo Olivo por aceptar ser el asesor de mi proyecto, por su apoyo durante la realización de mi proyecto, consejos y aclaración de dudas para poder lograr mis objetivos.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES

A mis padres José Guadalupe Alvarado Valero, María Guadalupe Salazar Salazar que siempre estuvieron dándome apoyo para poder lograr mis objetivos.

A mis tías María Concepción Salazar Salazar, Gloria Graciela Salazar Salazar por estar siempre dándome apoyo y motivación para poder salir adelante y poder culminar mi carrera.

A mi hermano José Guadalupe Alvarado Salazar por darme su apoyo cuando me encontré en momentos difíciles y creer que soy capaz de lograrlo y a mi hermana Graciela De Jesús Alvarado Salazar por creer que soy capaz de lograr esta y muchas cosas más en la vida.

¡Los amo con todo mi corazón!

INDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCION	2
2. ANTECEDENTES	3
4. HIPOTESIS	5
5. OBJETIVO GENERAL	5
6. OBJETIVOS ESPECIFICOS	5
7. REVISIÓN DE LITERATURA	6
7.1. SARGAZO.....	6
7.2 PRODUCTOS QUE SE ELABORAN CON EL SARGAZO	7
7.3 COMPUESTOS FENOLICOS	9
7.4 BIOECONOMIA CIRCULAR Y BIOREFINERIA.....	11
7.5 BIORREFINERIA	12
7.6 CLASIFICACIÓN DE BIORREFINERIAS SEGÚN SU MATERIA PRIMA	13
7.7 FERMENTACION EN ESTADO SOLIDO.....	14
7.8 VENTAJAS DE LA FERMENTACION SOLIDA	15
7.9 DESVENTAJAS DE LA FERMENTACION SOLIDA	15
7.10 CRECIMIENTO MICROBIANO.....	16
8. MATERIALES Y MÉTODOS	19
Etapa 1: CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE LOS RESIDUOS DE SARGAZO	19
8.1 EL ÍNDICE DE ABSORCIÓN DE AGUA (IAA)	19
8.2 PUNTO CRÍTICO DE HUMEDAD.....	19
8.3 CENIZAS	20
8.4 GRASA	20
8.5 PROTEÍNA	21
Etapa 2: BIODEGRADACIÓN FÚNGICA DE SARGAZO MEDIANTE FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO	21
8.6 BIOPROCESO DE DEGRADACIÓN DE SARGAZO	21
8.7 AZÚCARES TOTALES	22
8.8 ANTIOXIDANTES ABTS	23

8.9 FENOLES HIDROLIZABLES TOTALES	24
8.10 CONTENIDO INDIRECTO DE CÉLULAS POR N-ACETIL-GLUCOSAMINA.....	24
8.11 AZÚCARES REDUCTORES	25
8.12 ACTIVIDAD TANASA	25
8.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	26
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
9. CONCLUSIONES.....	34
10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	35

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sargazo pelágico (<i>Sargassum</i> spp)	6
Figura 2. Sargazo en las playas del caribe mexicano, Cancún, Quintana Roo	7
Figura 3. Productos elaborados a base de sargazo: (a) libretas; (b) zapatos; (c) Fertilizante; (d) ladrillos.	8
Figura 4. Anillo aromático de benceno ligado a un grupo hidroxilo, estructura característica de fenoles.	9
Figura 5. Ejemplos de ácidos hidroxibenzoico (a) y hidroxicinámico (b). Tomada de Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006).	10
Figura 6. Estructura molecular del ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico).	10
Figura 7. Estructura de lignina de madera (Chávez-Sifontes, M., & Domine, M.E. 2013).	11
Figura 8. Esquema de reutilización de recursos renovables.	12
Figura 9. Generalización de biorrefinería y economía circular.	13
Figura 10. Taxonomía de colores para biorrefinerías de acuerdo con su materia prima.	14
Figura 11. Curva que describe el crecimiento de un microorganismo: (A) Fase de latencia o adaptación; (B) periodo de crecimiento exponencial; (C) Fase pre-estacionaria; (D) Fase estacionaria; (E) Fase de muerte.	16
Figura 12. Evaluación de crecimiento de la cepa <i>Aspergillus niger</i> M4 empleando sargazo lavado y sargazo natural.	29
Figura 13. Actividad antioxidante equivalente a vitamina C (VCEAC) presente durante la fermentación de sargazo limpio y sargazo natural.	31
Figura 14. Actividad tanasa presente durante la fermentación de sargazo limpio y sargazo natural.	32

INDICE DE CUADROS

Cuadro1. Caracterización de muestras de sargazo natural y sargazo lavado con agua potable empleado como materia prima para FMS	27
--	----

RESUMEN

El sargazo (*Sargassum*) es una especie de alga parda que habita en ambientes marinos de las zonas tropicales del mundo y desde el 2018 es un problema ambiental en las playas del Caribe mexicano. En este proyecto se utilizó el sargazo como soporte-sustrato para la proliferación de *Aspergillus niger*, con el fin de producir compuestos antioxidantes por medio de la biodegradación fúngica de los compuestos fenólicos. El sargazo fue caracterizado fisicoquímicamente, evaluando el punto crítico de humedad, índice de absorción de agua, cenizas, grasa, proteína y azúcares totales. Posteriormente se realizó la fermentación fúngica para la degradación del sargazo en cajas Petri, incubando a 30°C durante 240 h, haciendo un monitoreo cada 24 h, determinando actividad tanasa, azúcares totales, antioxidantes, fenoles hidrolizables totales y contenido indirecto de biomasa por N-acetil-glucosamina. Dentro de los resultados obtenidos, el IAA fue de 5.39 y 4.93 g gel/g muestra seca, para sargazo lavado y sargazo natural respectivamente. El mayor contenido de azúcares se presentó en el sargazo natural (6.04%), mientras que el mayor contenido de proteína se da para el sargazo limpio (4.6%). El valor máximo de biomasa fúngica (34.81 mg/gramos de material seco (g.m.s)) se alcanza a las 240 h de cultivo, empleando sargazo limpio; mientras que para el sargazo natural fue de 38.74 mg/g.m.s. La capacidad antioxidante se reportó con valores máximos de 869.8 y 771.5 mg VCEAC/100 g.m.s, para el sargazo limpio y sargazo natural respectivamente. La máxima producción de actividad tanasa (7.27 U/g.m.s) se registra a las 240 h de fermentación utilizando el sargazo natural; mientras que el bioproceso que empleó sargazo limpio como soporte-sustrato obtuvo el máximo de actividad a las 216 h con un valor de 6.82 U/g.m.s. El sargazo presentó buenas condiciones para ser empleado como soporte-sustrato durante la fermentación en estado sólido, en la obtención de compuestos antioxidantes por degradación fúngica.

Palabras clave: Sargazo, antioxidantes, fermentación en sustrato sólido.

1. INTRODUCCION

Las arribazones de sargazo se han vuelto una constante en el Caribe, con sus respectivas afectaciones ecosistémicas, económicas y sociales. Este fenómeno se ha generado por el calentamiento global y la contaminación antropogénica. Para hacerle frente, se han realizado reuniones nacionales e internacionales en las cuales se presentan las problemáticas y se discute cómo evitar o mitigar los impactos por el sargazo (Paredes 2020).

Desde 2011, y con mayor intensidad en 2015 y 2018, el Caribe ha recibido el impacto de las arribazones masivas de sargazo, las cuales han superado la capacidad de la infraestructura disponible para atender esta contingencia, por lo que también se generan efectos negativos en la industria hotelera y de servicios ofrecidos en la zona. El turismo ha sufrido en mayor medida, ya que se encuentra vinculado socioeconómica y ambientalmente, lo cual representa una relación compleja por efectos diversos, como los servicios ambientales para las actividades económicas o el incremento del turismo y la carga ambiental que se debe soportar. En este ámbito, algunos de los problemas detectados se relacionan con la acumulación masiva de sargazo en la playa, la producción de grandes cantidades de ácido sulfhídrico –que representa un riesgo para la salud humana y de los ecosistemas–, así como la interferencia en la anidación y eclosión de especies marinas, el impacto en la mortalidad de pastos marinos y corales, además de la erosión de la playa y el daño para el paisaje (Aldana et al, 2020).

Hay dos especies pelágicas en el océano Atlántico: *Sargassum fluitans* y *S. natans*; ambas poseen vesículas llenas de gas que les permiten vivir flotando mientras son arrastradas por las corrientes y el viento. Su reproducción por fragmentación da lugar a una planta nueva de cada fragmento que se desprende (Schell et al., 2015).

Se cree que la utilización de sargazo como soporte-sustrato en fermentación en medio sólido, permitirá obtener un extracto acuoso con actividad antioxidante.

Para el presente proyecto se quiere obtener un extracto líquido rico en actividad antioxidante y a su vez caracterizarlo fisicoquímicamente y definir sus condiciones de acumulación de antioxidantes por medio de una biodegradación fúngica de compuestos fenólicos, empleando

una fermentación sólida utilizando sargazo natural y sargazo lavado seguido de una utilización de un hongo filamentoso.

2. ANTECEDENTES

Un antioxidante (AOx) puede prevenir o retardar la oxidación (pérdida de uno o más electrones) de otras moléculas, generalmente sustratos biológicos como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos. La oxidación de tales sustratos podrá ser iniciada por dos tipos de especies reactivas: los radicales libres (RL), y aquellas especies que sin ser radicales libres, son suficientemente reactivas para inducir la oxidación de sustratos como los mencionados.,

Un AOx dietético es una sustancia que forma parte de los alimentos de consumo cotidiano y que puede prevenir los efectos adversos de especies reactivas sobre las funciones fisiológicas normales de los humanos (Patthamakanokporn, O., et al., 2008).

La función de los antioxidantes es actuar como una forma de defensa del cuerpo humano contra los radicales libres (RL). Son agentes que inhiben o neutralizan el daño potencial que los RL pueden ocasionarnos. Nuestro organismo no puede fabricar los antioxidantes, por ello necesitamos consumirlos a partir de los alimentos (Pastene E, 2012).

Se utilizan en la industria alimentaria adicionados a las grasas u otros productos para retrasar los procesos de oxidación, en tanto previenen el comienzo de la rancidez oxidativa (grasas) (Llancari A, 2011).

Entre los antioxidantes naturales que más se emplean como conservadores se encuentran: el ácido ascórbico, el alfa-tocoferol y derivados del ácido rosmarínico y el ácido gálico. Tales compuestos pueden ser obtenidos por extracción directa desde sus fuentes naturales.

3. JUSTIFICACION

El siguiente proyecto surge debido a una problemática en las playas turísticas, principalmente en el Caribe mexicano que enfrenta un grave problema ambiental como lo es la presencia de sargazo. Esta especie de macroalga parda ha afectado los ecosistemas costeros, causando la muerte de especies marinas como tortugas y peces. También ha traído afectaciones económicas a través de su impacto en las actividades turísticas de la región y representa una amenaza para la salud humana, debido, entre otros factores, a su descomposición en las playas y a su alto contenido de arsénico y metales pesados.

El presente proyecto plantea la finalidad de poder darle un uso a dicha alga, como soporte-sustrato en los procesos de fermentación en estado sólido, de manera que se pueda contribuir a un buen aprovechamiento de este material.

4. HIPOTESIS

La utilización de sargazo como soporte-sustrato en fermentación en medio sólido, permitirá obtener un extracto acuoso con actividad antioxidante.

5. OBJETIVO GENERAL

Obtener un extracto líquido rico en actividad antioxidante por medio de fermentación en medio sólido, utilizando como soporte *Sargassum* spp., y un hongo filamentoso.

6. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Caracterizar fisicoquímicamente los residuos de sargazo, evaluando el sargazo natural y sargazo lavado con agua potable.
- Definir las condiciones de acumulación de antioxidantes por medio de la biodegradación fúngica de los compuestos fenólicos en fermentación en medio sólido empleando sargazo natural y sargazo lavado.

7. REVISIÓN DE LITERATURA

7.1. SARGAZO

El sargazo es una macroalga café que vive flotando en el mar (Figura 1); es decir, sin necesidad de estar fijada a ningún sustrato, como otras especies de algas. Se ha estimado que por su tipo de crecimiento puede duplicar su volumen en menos de 20 días, lo que explica la rápida proliferación de estas mareas doradas. Existen 2 diferentes tipos de sargazo, los cuales llegan a las playas del caribe mexicano como lo son el sargazo flotante (*Sargassum fluitans*) y sargazo nadador (*Sargassum natans*).



Figura 1. Sargazo pelágico (*Sargassum* spp)

Es un fenómeno que se presenta y se extiende por todo el Caribe; más bien, en todo el Atlántico central, aunque en México se piensa que es local. La primera gran arribazón al Caribe fue en el año 2011, ante la sorpresa hubo cierta inmovilidad gubernamental; sin embargo, fue hasta el 7 de junio de 2018 que el gobierno de Barbados declaró una emergencia nacional. En 2015 surgen en México los lineamientos de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat) que permiten disponer de las algas una vez recolectadas en la playa y evitar así los impactos ecológicos de enterrar o tirar estos residuos. Se ha comprobado desde 2016 que el sargazo viene del Atlántico sur, cerca de Brasil (León C, 2020).

Más de 10 mil toneladas de sargazo llegan cada mes a las costas del Caribe mexicano (Figura 2), pero la capacidad de la Semar apenas alcanza para recoger 96 toneladas (unas 3.2 toneladas diarias).



Figura 2. Sargazo en las playas del caribe mexicano, Cancún, Quintana Roo

La composición de las especies de *Sargassum* spp., depende en gran medida de diversos factores como el origen geográfico de las algas, la temporada o incluso la parte de la planta analizada (Devault et al., 2020). La composición química del Sargazo contiene 14 a 44% de cenizas, 4 a 68% de carbohidratos, 9 a 20% de proteínas y 0.5 a 3.9% de lípidos (% base seca) (Hardouin et al., 2014). El contenido energético principal del alga se presenta en los carbohidratos, los cuáles contienen principalmente polisacáridos. Las principales familias de carbohidratos que se encuentran en *Sargassum* spp., son alginatos, polisacáridos sulfatados que contienen fucosa (generalmente descritos como fucoidanos), laminarina y manitol, así como celulosa, que, en la mayoría de los estudios, no se cuantifica (Devault et al., 2020).

7.2 PRODUCTOS QUE SE ELABORAN CON EL SARGAZO

Pese a que aún se necesitan estudios y recursos para impulsar la industrialización del sargazo, algunas personas ya comenzaron a desarrollar diversos productos con el alga como materia prima (Figura 3). Se han logrado hacer tenis, libretas y hasta combustible para aprovechar la llegada masiva de sargazo a costas de México. También creó la empresa Blue Green para

convertir sargazo en ladrillos y ya logró construir la primera casa en el mundo hecha con el alga (Milenio digital y agencia EFE, 2019)



Figura 3. Productos elaborados a base de sargazo: (a) libretas; (b) zapatos; (c) Fertilizante; (d) ladrillos.

7.3 COMPUESTOS FENOLICOS

Los compuesto fenólicos representan el segundo grupo más abundante de compuestos orgánicos en el reino vegetal y muestran diferentes actividades en las plantas, como soporte estructural, protección contra la radiación solar ultravioleta (UV), tolerancia a condiciones de estrés biótico o abiótico. Los compuestos fenólicos se emplean en las plantas como autodefensa frente a enfermedades inducidas principalmente por microorganismos. Estos compuestos se distribuyen de manera ubicua en la mayoría de los tejidos vegetales incluidas las partes comestibles como frutas, semillas, hojas, tallos, raíces entre otros (de la Rosa et al., 2018; Mikłasińska-Majdanik et al., 2018).

Los compuestos fenólicos (Figura 4) son un grupo de moléculas pequeñas que se caracterizan porque sus estructuras tienen al menos una unidad fenólica.

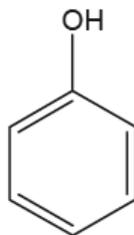


Figura 4. Anillo aromático de benceno ligado a un grupo hidroxilo, estructura característica de fenoles.

Según sus estructuras químicas, los compuestos fenólicos se pueden dividir en diferentes subgrupos (Figura 5) como lo son los ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, cumarinas, lignanos, quinonas, estilbenos y curcuminoides (Gan et al., 2018).

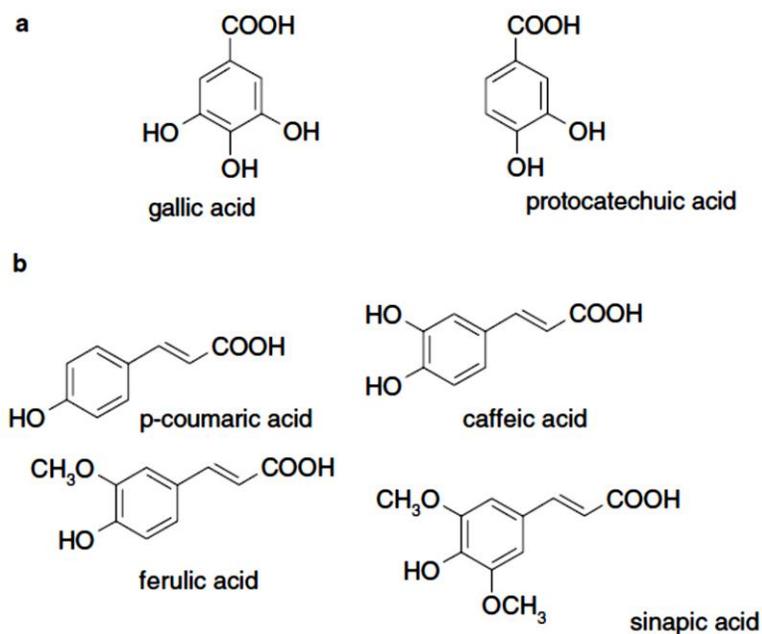


Figura 5. Ejemplos de ácidos hidroxibenzoico (a) y hidroxicinámico (b). Tomada de Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006).

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que son derivados del ciclo del ácido shikímico y la del acetato-malonato en las plantas (Gordo, 2018). Estructuralmente, los compuestos fenólicos comprenden un anillo aromático, que lleva uno o más sustituyentes hidroxilo y van desde moléculas fenólicas simples (Figura 6) hasta compuestos altamente polimerizados (Figura 7) (Isaza-Martínez, 2007).

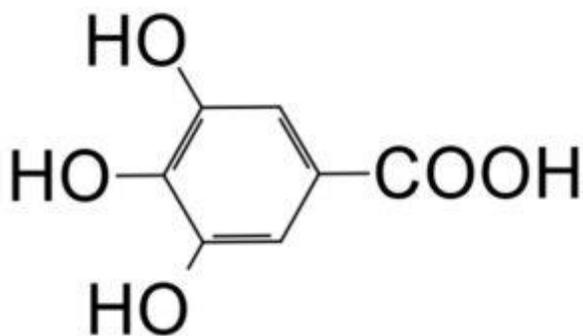


Figura 6. Estructura molecular del ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico).

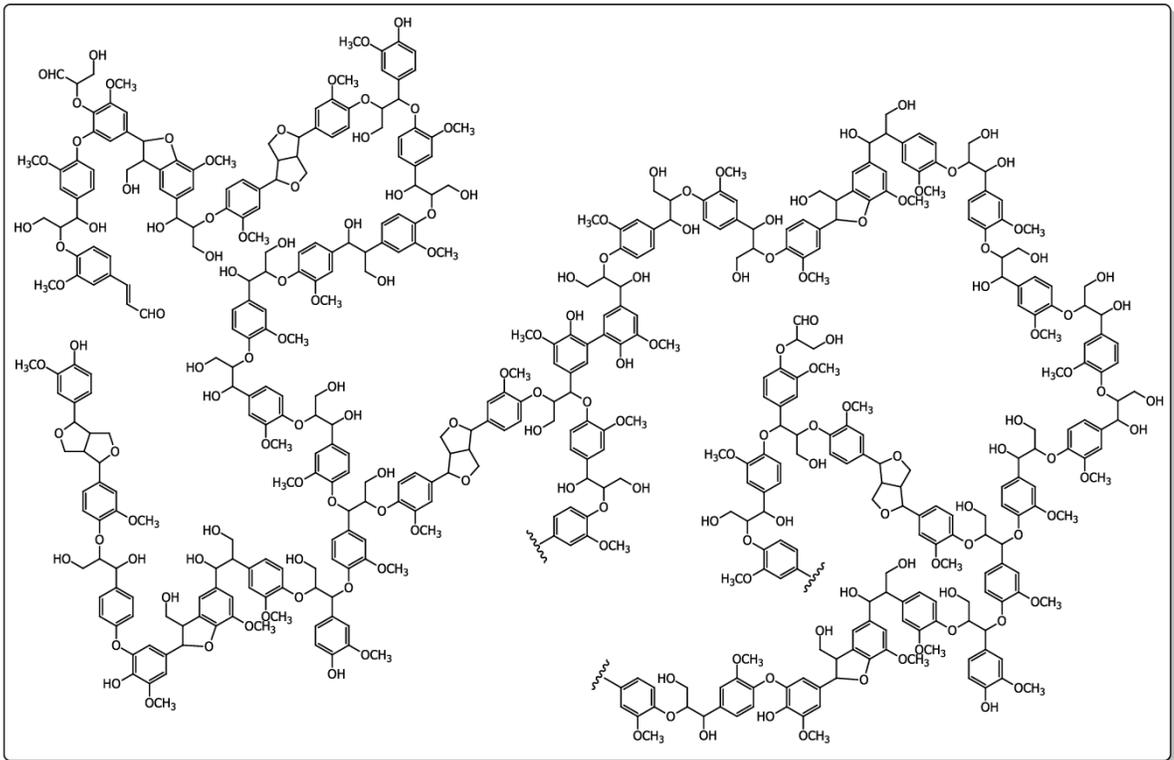


Figura 7. Estructura de lignina de madera (Chávez-Sifontes, M., & Domine, M.E. 2013).

7.4 BIOECONOMÍA CIRCULAR Y BIOREFINERÍA

La bioeconomía es un **modelo económico** basado en la producción de recursos biológicos renovables y la conversión de estos recursos en productos con valor añadido, como bioproductos, bioenergía y servicios. (Figura 8)

Surge como respuesta a los retos medioambientales y sociales actuales para garantizar el suministro y reparto justo de los alimentos, mitigar los efectos del cambio climático y reducir la utilización de combustibles fósiles. Además, permite generar oportunidades para el desarrollo económico y el empleo.

La biomasa ha sido tradicionalmente empleada como fertilizante o para la obtención de energía a partir de pellets o de biogás. Actualmente, es necesario impulsar el aprovechamiento en cascada de dicha biomasa pudiendo obtener productos de mayor valor añadido tales como

antioxidantes, proteínas o pigmentos y en último término proceder a la combustión de la biomasa para fines energéticos (Junta de Andalucía, 2021).

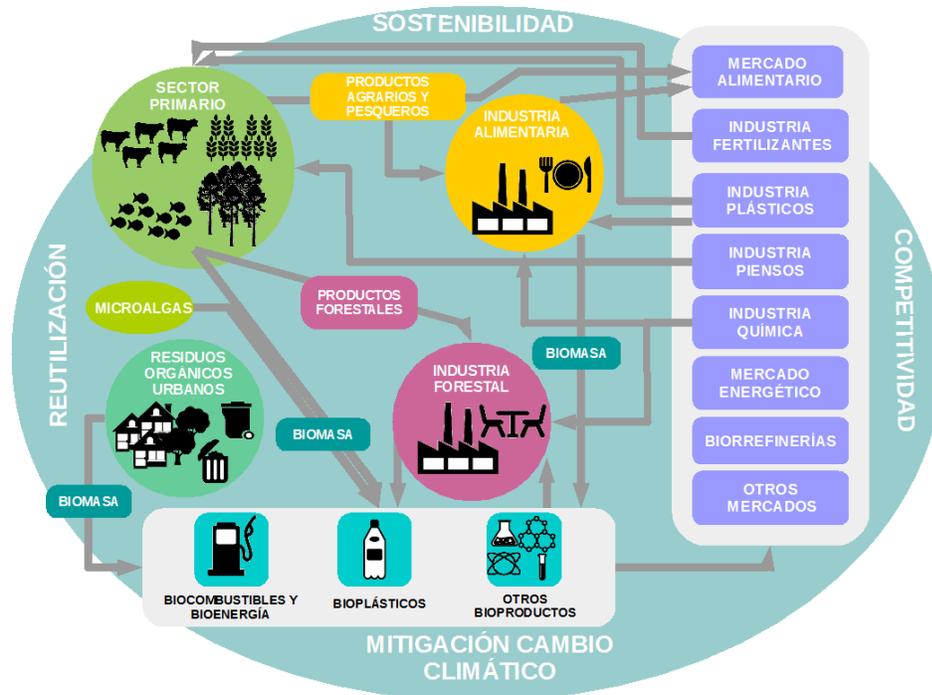


Figura 8. Esquema de reutilización de recursos renovables.

7.5 BIORREFINERIA

Biorrefinería es una red que integra biomasa vegetal, procesos de conversión y equipos para producir biocombustibles, energía y otros productos químicos (Figura 9). La biorrefinería se caracteriza por la obtención de un amplio espectro de productos de interés comercial, incluyendo los compuestos intermedios y los productos finales (energía, calor, alimentación humana y animal, biomateriales y sustancias químicas) (del Prado, 2008).

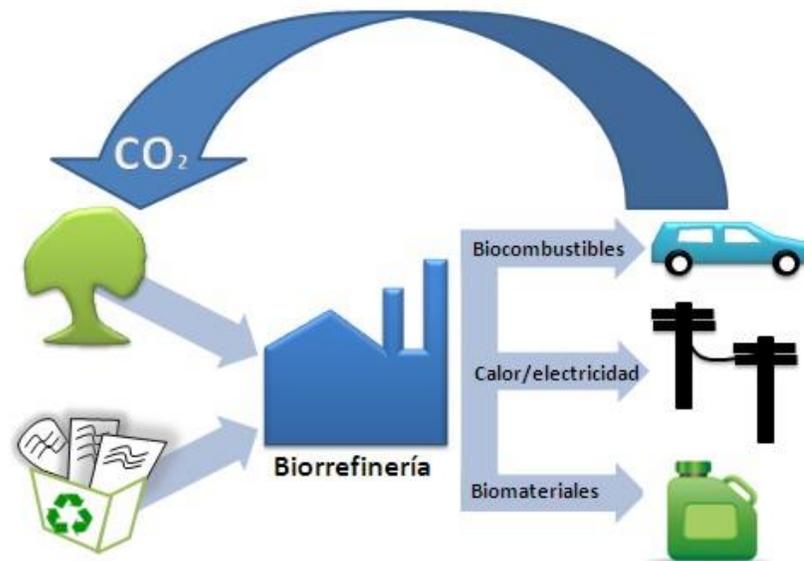


Figura 9. Generalización de biorrefinería y economía circular.

7.6 CLASIFICACIÓN DE BIORREFINERIAS SEGÚN SU MATERIA PRIMA

Según ella, podemos distinguir entre cinco tipos de biorrefinerías teniendo en cuenta las materias primas (Figura 10).

Biorrefinería Azul basada en biomasa marina (descartes y residuos de pescado, algas); Biorrefinería Marrón basada en lodos y residuos domésticos; Biorrefinería Verde basada en hojas verdes frescas y césped; Biorrefinería Blanca (o Biorrefinería Gris) basada en subproductos del sector agroindustrial; Biorrefinería Amarilla basada en paja, hojas y tallos de maíz y madera (BioRefineries Blog, 2016).

Taxonomía de colores para biorrefinerías de acuerdo a su materia prima	Biorrefinería Amarilla 	Biorrefinería Azul 	Biorrefinería Blanca 	Biorrefinería Gris 
	Biorrefinería Marrón 	Biorrefinería Negra 	Biorrefinería Oro 	Biorrefinería Roja 

Figura 10. Taxonomía de colores para biorrefinerías de acuerdo con su materia prima.

7.7 FERMENTACION EN ESTADO SOLIDO

Fermentación en medio sólido o también Fermentación en estado sólido, se define como el crecimiento de microorganismos en medios sólidos, o semi-sólidos, en ausencia de agua libre. Esta técnica ha sido aplicada desde la antigüedad en la preparación de alimentos fermentados. Las fermentaciones de estas características son aquellas en las cuales el sustrato no está ni disuelto ni en suspensión en un gran volumen de agua.

Este proceso ocurre en ausencia de agua libre, seleccionando un sustrato natural o inerte con una alta porosidad, alta capacidad de absorción de agua, y capaz de proveer nutrientes y promover el crecimiento microbiano. El éxito de la Fermentación en Medio Sólido (FMS) radica en el hecho de que permite el uso de sustratos de muy bajo costo, tales como residuos vegetales, agrícolas, y agroindustriales. Esta tecnología presenta una escasa probabilidad de contaminación por bacterias o levaduras dada su reducida actividad de agua, y ofrece condiciones similares al hábitat natural de los hongos. El diseño de los reactores es fácil y económico, aunque se dificulta el control del proceso.

Los hongos filamentosos son los mejor adaptados para crecer en sustratos sólidos con bajo contenido de agua libre; además, tienen la capacidad de usar polisacáridos como fuentes de carbono para fraccionarlos en monosacáridos. (Soccol et al., 2017)

7.8 VENTAJAS DE LA FERMENTACION SOLIDA

A continuación, se enumeran una serie de ventajas de carácter general acerca de los cultivos en estado sólido frente a otros procedimientos de fermentación (Pastrana, L. 1996)

1. Simplicidad de los medios de cultivo, ya que generalmente un único sustrato proporciona casi todos los nutrientes necesarios.
2. Fermentadores con menores requerimientos espaciales, ya que los sustratos se utilizan más concentrados y no se utilizan grandes volúmenes de agua.
3. Mayor simplicidad en el diseño de los fermentadores y de los sistemas de control.
4. Mayores facilidades para la obtención y aplicación del inoculo, pudiendo utilizarse las esporas directamente en la mayor parte de las situaciones.
5. Facilidad para el escaldado de los procesos.
6. Necesidades reducidas de disolventes para la extracción de los productos.
7. Rendimientos comparables, e incluso superiores a los correspondientes procesos en cultivo sumergido.
8. Reducido riesgo de contaminaciones bacterianas, menos aptas para soportar la baja actividad de agua que caracteriza a estos sistemas. Posibilidad, en ocasiones, de trabajar incluso en condiciones no asépticas.
9. Elevada aireación del sistema, lo que hace a esta modalidad de cultivo especialmente adecuada a aquellos procesos que impliquen un metabolismo oxidativo intenso.
10. Bajos requerimientos energéticos. A menudo no es preciso autoclavar, airear ni agitar.
11. Ambiente similar al de los hábitats naturales de los microorganismos utilizados
12. Reducido volumen de efluentes.

7.9 DESVENTAJAS DE LA FERMENTACION SOLIDA

1. Frecuente necesidad de pretratamiento de los sustratos (molienda, prehidrólisis parciales).
2. Dificultad para mantener los niveles óptimos de humedad durante la fermentación.
3. Ausencia de métodos analíticos simples para determinar el crecimiento microbiano.
4. Dificultad de control y regulación de variables del cultivo como temperatura, humedad, pH y oxígeno libre durante el proceso.

5. Dificultad para la agitación de aquellos procesos que así lo requieran.
6. Frecuente necesidad de inoculo voluminoso.
7. Escasez (al menos por el momento) de diseños y desarrollos de ingeniería para la construcción de los fermentadores, así como para ciertas operaciones (inoculación, extracción de los productos) (Pastrana, L. 1996).

7.10 CRECIMIENTO MICROBIANO

En microbiología, el crecimiento se define como el incremento en el número de células. Cuando un cultivo se duplica de manera regular durante un intervalo de tiempo, se denomina crecimiento exponencial. La estimación del comportamiento del crecimiento de microorganismos a través del tiempo (Figura 11), permite determinar cuándo se produce la mayor cantidad de biomasa o de metabolitos (primarios o secundarios).

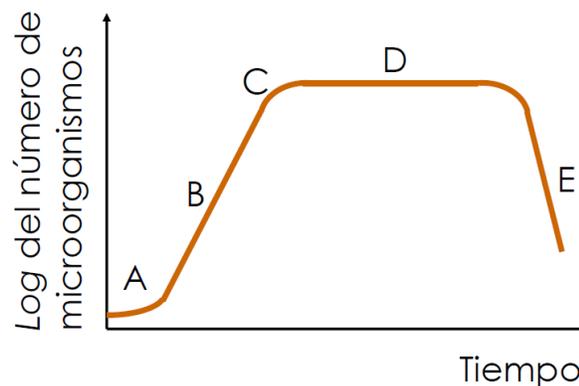


Figura 11. Curva que describe el crecimiento de un microorganismo: (A) Fase de latencia o adaptación; (B) periodo de crecimiento exponencial; (C) Fase pre-estacionaria; (D) Fase estacionaria; (E) Fase de muerte.

- A. Fase de latencia:** Esta fase coincide con el periodo de adaptación de los microorganismos a las nuevas condiciones nutricionales y ambientales. Se presenta inmediatamente después de la inoculación y su duración depende del estado fisiológico de la célula inoculada y de las condiciones ambientales. Si el microorganismo se encuentra en su fase exponencial antes de la inoculación, la fase

latencia es muy pequeña o puede no presentarse. Durante este periodo, el aumento de células se lleva a cabo a una razón pequeña, pues el microorganismo utiliza la energía disponible con el fin de sintetizar las enzimas que requiere para su desarrollo en el nuevo medio.

- B. Fase exponencial:** En esta fase las células se multiplican a la máxima velocidad y su crecimiento puede ser cuantificado con base en el número de células que se producen por unidad de tiempo (para levaduras o bacterias) o por el aumento en la biomasa por unidad de tiempo. La velocidad de crecimiento durante este periodo permanece constante y es independiente de la concentración del sustrato, siempre y cuando éste se encuentre en exceso.

La fase exponencial termina si se produce alguna de estas tres situaciones:

- a. Los nutrientes se agotan,
- b. Las condiciones ambientales indispensables para la célula se modifican,
- c. Cuando la célula produce metabolitos tóxicos o que inhiben su reproducción.

- C. Fase pre-estacionaria:** Periodo de retardo, desaparece el crecimiento exponencial, los microorganismos entran en estrés.

- D. Fase estacionaria:** En esta fase la velocidad de crecimiento (reproducción) del microorganismo es igual a la velocidad de deceso y esto implica un equilibrio celular. La importancia de esta fase varía con el tipo de fermentación. Si el objetivo final de la fermentación es la producción del etanol, no es necesario continuar el proceso cuando se alcanza la fase estacionaria, ya que una vez que obtiene la máxima concentración de las células, la producción de etanol disminuye. Por lo contrario, en la producción de

antibióticos, la mayor acumulación de estas sustancias se presenta durante la fase estacionaria.

E. **Fase endógena:** Se inicia cuando los nutrientes que están en el medio de cultivo no son suficientes para que el microorganismo pueda reproducirse. Otro de los motivos por los cuales empieza esta etapa es la producción de sustancias tóxicas que impiden la multiplicación de las células.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

El sargazo utilizado como materia prima para obtener el fermentado se obtuvo en Julio de 2019 de la costa de Puerto Morelos, Quintana Roo, México. El sargazo recolectado fue identificado y dividido en dos lotes. El lote identificado como “Sargazo limpio”, fue lavado con agua de lluvia; y el otro lote, identificado como “Sargazo natural”, se utilizó tal y como venía del lugar de colecta en la región costera. Para ambos lotes, el material fue secado al sol para su tamizado, donde se homogenizó y recolectó partículas de diámetro 0.5-1 mm para su posterior utilización y análisis.

El presente estudio se dividió en 2 etapas, las cuales se describen a continuación:

Etapas 1: CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS RESIDUOS DE SARGAZO

8.1 EL ÍNDICE DE ABSORCIÓN DE AGUA (IAA)

El IAA fue determinado de acuerdo a la metodología descrita por Anderson et al., 1976. La técnica consiste en evaluar una suspensión de 1.25 g de residuo y 15 ml de agua destilada. Antes de la centrifugación, la suspensión fue agitada en un vortex (Hermann HMV-NZ-A) por 3 minutos y colocada dentro de un tubo de centrifugación tarado de 50 ml. La centrifuga (UNICO®) fue operada a 3000 rpm (RCF = 631) por 10 minutos, el sobrenadante fue decantado y el peso del gel fue reportado utilizando una balanza (BIOBASE). El IAA fue expresado como g gel/g soporte seco.

8.2 PUNTO CRÍTICO DE HUMEDAD

La humedad se estimó utilizando una termobalanza (Precisa) colocando 1 g de la muestra saturada de humedad (resultado del IAA) a una temperatura de 120°C por 60 minutos, monitoreando cada minuto el contenido de humedad (Orzua et al., 2009).

8.3 CENIZAS

En la determinación de ceniza se pesaron 2 gramos de sargazo en un crisol de porcelana el cual se sometió a peso constante en la estufa (SINCE 1889, YAMATO modelo DKN602C) a una temperatura de 105°C por 24 h. Dentro de una campana de extracción se carbonizó la muestra con una parrilla eléctrica a 250°C por una hora, posteriormente se introdujo en una mufla FELISA a 500°C por 5 h.

El porcentaje de ceniza de la muestra se calculó mediante la expresión:

$$\% \text{ ceniza} = \frac{\text{crisol con ceniza} - \text{crisol solo}}{\text{gramos de muestra}} \times 100 \quad \text{Ecn (1)}$$

8.4 GRASA

Se pesaron 5 gramos de muestra y se envolvió en un papel filtro. Se introdujo a un sifón y se unió a un matraz bola fondo plano (previamente sometido a peso constante y adicionando 150 ml de hexano). Enseguida se insertó la parte superior del sifón a un refrigerante y la muestra se sometió a reflujo durante 4 h a una temperatura de 80°C. Después de este tiempo, se evaporó el hexano contenido en el matraz. Enseguida se sometió el matraz con la muestra obtenida al horno a 70°C por 2 h para mantener el material seco. Después se transfirió a un desecador, para posteriormente tomar el peso en una balanza (BIOBASE).

El porcentaje de grasa obtenida fue calculado mediante la expresión:

$$\% \text{ grasa} = \frac{\text{peso matraz con grasa} - \text{peso matraz solo}}{\text{gramos de muestra}} \times 100 \quad \text{Ecn (2)}$$

8.5 PROTEÍNA

El contenido de proteína se realizó por el método Kjeldahl, donde se pesó 0.1 gramo de sargazo realizando un pequeño doblez en el papel filtro y se introdujo en el matraz fondo redondo de cuello largo. Se añadió 4 ml de solución digestora, introduciendo la muestra en el digestor Kjeldahl a una temperatura de 100°C. La muestra se mantuvo en movimiento constante, evitando evaporar la solución digestora. Después se colocó la muestra en el equipo de destilación Micro-Kjeldahl y se agregó la mitad de la muestra NaOH al 50%. Se esperó el destilado sumergiendo el frasco de recepción que contenía 30 ml ácido bórico al 2%, previamente adicionado con 2 gotas de indicador de proteína. Una vez observado el cambio de color a verde cristalino y obteniendo 60 ml de muestra se pasó a titular con ácido sulfúrico al 0.026 N.

El nitrógeno obtenido se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ nitrógeno} = \frac{(\text{ml H}_2\text{SO}_4 \text{ gastados} \times N \text{ H}_2\text{SO}_4) - (\text{ml gastados blanco} \times N \text{ blanco})}{\text{gramos de muestra}} \times 100 \quad \text{Ecn (3)}$$

Finalmente, el porcentaje de proteína se calculó multiplicando el porcentaje de nitrógeno por el factor 6.25 indicado por la AOAC (Horwitz W. 2010).

Etapa 2: BIODEGRADACIÓN FÚNGICA DE SARGAZO MEDIANTE FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

8.6 BIOPROCESO DE DEGRADACIÓN DE SARGAZO

El bioproceso fue evaluado en cajas Petri (Robledo et al., 2008) donde se agregaron 2.5 gramos de muestra de sargazo, el cual fue humedecido con 7 ml de medio Czapek-Dox (g/L): NaNO₃ (7.65); KH₂PO₄ (3.04); MgSO₄ (1.52); KCl (1.52), empleando el propio soporte como fuente de carbono. Posteriormente se inoculó en el centro de la caja 6 µl de esporas de la cepa

Aspergillus niger M4 (1×10^7 por gramo de soporte). Las cajas se emplearon y se incubaron a 30°C con duración de 240 h y monitoreo cada 24 h, sacando 2 cajas de sargazo natural y 2 de sargazo limpio.

Para la obtención del extracto crudo empleado en los análisis posteriores, el material fermentado se diluyó con 40 mL de agua destilada. La solución se homogenizó por agitación magnética durante 5 min y posteriormente se filtró por papel, para separar la biomasa de la fracción líquida. La fracción líquida se centrifugó (UNICO®) a 3000 rpm (RCF = 631) durante 20 min y el sobrenadante transparente se filtró a través de una membrana de filtro de nailon de 0.20 μm . El filtrado final obtenido se utilizó como extracto fermentado crudo (EFC), y se empleó para sus análisis. La biomasa obtenida (sargazo + células microbianas) en la primera filtración se empleó para la determinación indirecta del crecimiento fúngico.

Para determinar la capacidad de crecimiento del microorganismo (X) sobre los diferentes sustratos, se evaluó la velocidad de crecimiento mediante la ecuación logística (Ecuación 1). Esta ecuación describe una limitación en el crecimiento, en una población microbiana en función de la densidad máxima de biomasa (K), la tasa de crecimiento específica (μ_{max}) y el tiempo (t) como se describe en la siguiente ecuación:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\text{max}} \left(1 - \frac{X}{K}\right) X \quad (1)$$

La forma integrada de esta ecuación, utilizada para realizar el ajuste del modelo y la estimación de parámetros en este estudio, se presenta en la ecuación (2)

$$X_{(t)} = \frac{K}{1 + \left(\frac{K}{X_0} - 1\right) e^{-\mu t}} \quad (2)$$

8.7 AZÚCARES TOTALES

Para la determinación de azúcares totales, se empleó la técnica de Dubois (1956). Este método se fundamenta en la sensibilidad de los carbohidratos a la aplicación de ácidos fuertes y

temperaturas altas. Bajo estas condiciones, toman lugar una serie de reacciones complejas, comenzando con la deshidratación simple, posteriormente la producción de varios derivados del furano que condensa consigo mismo y con otros subproductos para producir compuestos coloridos generados por la condensación con el fenol. Para realizar esta técnica, se colocaron en tubos de ensaye 500 μ l de EFC, se le añadieron 500 μ l de fenol 5% y se dejó en baño de agua con hielo durante 5 min. Posteriormente, se le añadieron 1000 μ l de H₂SO₄ concentrado, se dejó reposar durante 15 min en el baño y después se agito en un vórtex. Las muestras se calentaron a 50°C durante 5 minutos, y se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Finalmente se leyó la absorbancia a 470 nm en lector de microplacas (BIOBASE EL-10A).

8.8 ANTIOXIDANTES ABTS

Para la actividad antioxidante se siguió la metodología de Dudonne et al., (2009). El radical 2,2-azino bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) (ABTS) posee coloración azul, pero cuando encuentra un H⁺ con el cual complementar su estructura, pierde la coloración. El cambio de coloración es lo que permite cuantificar el poder antioxidante de la sustancia colocada como muestra. Para la formación del radical ABTS es necesaria la presencia de persulfato de potasio. Para el desarrollo de la técnica, se agregaron 20 μ l de EFC y 980 μ l de ABTS en tubos de ensaye. Se dejaron reposar a 30°C por 10 minutos y finalmente se leyó la absorbancia a 754 nm en lector de microplacas (BIOBASE EL-10A). Como antioxidante de referencia, se empleó ácido cítrico a una concentración de 0-100 μ g/mL (concentración final), en las mismas condiciones. La actividad captadora de radicales ABTS se expresa en miligramos por porción de capacidad antioxidante equivalente a vitamina C por 100 gramos de muestra seca (mg VCEAC/100 g ms).

8.9 FENOLES HIDROLIZABLES TOTALES

El método espectrofotométrico con el reactivo de Folin Ciocalteu, permite cuantificar el contenido de fenoles hidrolizables totales. Este método se basa en la presencia de los ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico en el reactivo, los cuales se reducen al oxidar a los fenoles debido a la transferencia de electrones a pH básico. La reacción anterior da lugar a la formación de compuestos cromógenos como óxido de molibdeno y de tungsteno de coloración azul-verde. La concentración producida es proporcional a la concentración de polifenoles presentes en la muestra. Para la realización de esta técnica, se tomaron alícuotas de 400 µl de EFC, se colocaron en tubos de ensaye, y después se le adicionaron 150 µl de reactivo Folin Ciocalteu. Posteriormente se le agregaron 50 µl de solución de carbonato de sodio, y al final se le agregó a cada tubo 3.6 ml de agua y se dejó reposar en la oscuridad por 30 min y finalmente se leyó su absorbancia a 750 nm en lector de microplacas (BIOBASE EL-10A).

8.10 CONTENIDO INDIRECTO DE CÉLULAS POR N-ACETIL-GLUCOSAMINA

La glucosamina ($C_6H_{13}NO_5$) es un amino-azúcar que se encuentra formando parte de la pared celular de hongos y muchos organismos. Su cuantificación nos permite tener una estimación del crecimiento de microorganismos en un cultivo complejo. Para determinar el contenido de glucosamina, se requiere una hidrólisis para liberarla de la pared celular, posteriormente se combina con la acetilacetona formando un compuesto pirrólico, que al reaccionar con el p-dimetilaminobenzaldehído (PDBA) forma un compuesto de color rojo a una absorbancia de 530 nm. Para la realización de la técnica (Charles-Rodríguez et al, 2018), se colocaron 100 mg de la biomasa obtenida en la primer etapa de filtración en un tubo de ensaye, y se agregaron 5 ml de H_2SO_4 al 5N. Se agitó durante 15 minutos y se centrifugo (UNICO®) a 5000 rpm (RCF = 2522) durante 10 minutos. El líquido se decantó y la pasta sobrante se lavó 2 veces con 5 ml de agua destilada, posteriormente se agregaron 100 µl de HCl al 10M (20°C), se dejó reposar 16 h. Después se le agregó 4 ml de agua destilada para diluir, se metió a la autoclave (15 lb/kg por 2 h), y posteriormente se neutralizo con NaOH 10N y 0.5N, ajustando con HCl a 5.5N al ser necesario. De la muestra resultante, se mezclaron 200 µl y 200 µl de solución A (Solución

de 1 mL de acetilacetona en 50 mL de Na_2CO_3 0.5N) y se vertieron en un tubo de ensaye, se taparon los tubos y se colocaron a baño maría (96°C durante 20 min). Después se enfriaron a temperatura ambiente, se le agrego 2 ml de etanol al 96% y 200 μl de solución B (Solución de 1.6 g de *p*-dimetilaminobenzaldehído en 60 mL de HCl-EtOH (1:1 v/v)), se homogenizaron y se dejaron reposar (45-60 min). Finalmente se leyó la absorbancia a 530 nm en lector de microplacas (BIOBASE EL-10A).

8.11 AZÚCARES REDUCTORES

Para la cuantificación de azúcares reductores se empleó la técnica de Miller G.L. (1959). La base propuesta del método de Miller (1959), se enfoca en la reacción del DNS, el cuál es reducido del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) a ácido 3-amino-5-nitro-salicílico (ANS). Este proceso de reducción se realiza debido a que las moléculas de azúcar actúan como agentes reductores, siempre que contengan un grupo aldehído y existan en una estructura de cadena abierta. Durante este proceso, el grupo aldehído de los azúcares se oxida a los respectivos ácido carboxílico generando una coloración intensa y estable. Para la realización de esta técnica, se adicionaron 1000 μl de muestra en un tubo, después se le agrego 1000 μl de DNS y se sometió a baño maría durante 5 minutos. Posteriormente se detuvo la reacción mediante un baño de agua con hielo en la cual se dejó reposar 5 minutos. Se le adicionaron 5 ml de agua destilada y se agitaron, se procedió a sacar los tubos del baño helado y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Finalmente se leyó la absorbancia a 546 nm en lector de microplacas (BIOBASE EL-10A).

8.12 ACTIVIDAD TANASA

La actividad enzimática tanasa, se cuantificó siguiendo la metodología descrita por Sharma et al., (2000). El método consiste en la medición del ácido gálico liberado durante la reacción enzimática, utilizando como sustrato para la tanasa un éster del ácido gálico (metil-galato). La medición del ácido gálico se basa en la formación de un cromóforo entre dicho ácido y la 2-tio-4-cetotiazolidina, también conocida como rodanina. Para realizar esta técnica, se

etiquetaron 3 tubos de ensaye (muestra, control y blanco). Se procedió a agregar 250 μ l de metil-galato en cada uno de los tubos, después al tubo del blanco se le añadió 250 μ l de buffer de citratos. A los tubos muestra se les agregó 250 μ l de EFC y al tubo control no se le añadió nada. Todos los tubos se incubaron a 30°C durante 5 minutos, luego se colocaron 300 μ l de rodanina metanólica en cada uno de los 3 tipos de tubos, y se volvieron a incubar a 30°C durante 5 minutos. Después se les agrego 200 μ l de hidróxido de potasio (0.5 N) y se volvieron a incubar a 30°C durante otros 5 minutos. Se añadió 4 ml de agua, se agitaron y se incubaron por última vez a 30°C durante 10 minutos, para finalmente leer su absorbancia a 520 nm en lector de microplacas (BIOBASE EL-10A).

8.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron procesados con el software estadístico Minitab (versión 17.1.0), donde se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). Los resultados se representaron como la media de los datos \pm desviación estándar.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El sargazo al ser una macroalga presenta una composición química variada, con diversas propiedades biológicas. La caracterización fisicoquímica (Cuadro 1) realizada, nos muestra la posibilidad de establecer un proceso de fermentación en estado sólido, empleando los residuos de sargazo como soporte y de manera simultánea, que el microorganismo lo utilice como sustrato para la obtención de energía.

Cuadro1. Caracterización de muestras de sargazo natural y sargazo lavado con agua potable empleado como materia prima para FMS

COMPONENTES	Sargazo Lavado	Sargazo natural
IAA (g gel/g muestra seca)	5.39 ± 0.15 ^a	4.93 ± 0.65 ^a
PCH (%)	28.87 ± 2.79 ^a	27.44 ± 6.21 ^a
Ceniza (%)	18.40 ± 1.88 ^a	19.30 ± 1.11 ^a
Grasa (%)	0.53 ± 0.05 ^a	0.60 ± 0.05 ^a
Proteína (%)	4.63 ± 0.98 ^a	4.6 ± 0.15 ^a
AT (%)	1.10 ± 0.01 ^b	2.64 ± 0.01 ^a
FHT (%)	1.21 ± 0.26 ^b	6.04 ± 0.08 ^a

Nomenclatura: IAA: índice de absorción de agua; PCH: punto crítico de humedad; AT: azúcares totales; FHT: fenoles hidrolizables totales. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

La composición del material juega un papel muy importante para el desarrollo del microorganismo, debido a la utilización del sargazo como fuente de carbono y energía durante el bioproceso. Diversos estudios mencionan al alginato como el principal compuesto en las células de especies de sargazo, con valores entre 15-25%, seguidos de los fucoidanos (3-12%) (Devault et al., 2020). En el caso del sargazo utilizado en este proyecto, la caracterización muestra valores considerables de azúcares totales (fuente de carbono) y de proteína (fuente de nitrógeno), tanto para el sargazo lavado, como para el sargazo natural.

Las algas pardas, y en particular las fucales (a las que pertenecen las especies de *Sargassum*), son conocidas por su alto contenido de polifenoles. Estos polifenoles o compuestos fenólicos, se componen principalmente de florotaninos, oligómeros y polímeros de floroglucinol, reportando un contenido de polifenoles con un valor alrededor del 5-15% (Devault et al., 2020; Saldarriaga et al., 2020). La presencia de fucooidanos (no cuantificados en este trabajo) y los compuestos fenólicos presentes en las muestras de sargazo limpio y natural, le confieren la posibilidad de generar moléculas antioxidantes de bajo peso molecular mediante la degradación fúngica. El número y las posiciones de los grupos hidroxilo y la naturaleza de las sustituciones en los anillos aromáticos, confieren a los compuestos fenólicos la capacidad de inactivar radicales libres (Minatel et al., 2017). Ouattara et al., (2021) reporta la presencia de esteroides, fenoles hidrolizables, catequina, y saponinas, para muestras acuosas de *Sargassum fluitans* y *Sargassum natans*.

La valorización de los residuos de sargazo como soporte de fermentación en estado sólido, debe cumplir, además del contenido de componentes nutricionales, con una serie de características fisicoquímicas entre las que se incluyen el índice de absorción de agua (IAA), y el punto crítico de humedad (PCH). Estos parámetros influyen directamente en la capacidad de invasión y colonización del residuo por parte del microorganismo. El IAA es la cantidad de agua que puede ser absorbida por el soporte y que está adherida a la superficie del material y contenida en los capilares y poros; el sargazo lavado presenta una mayor capacidad de retención de agua, comparado con el sargazo natural, sin tener diferencia estadística significativa entre ambos materiales. Se prefieren materiales con altos valores de IAA, ya que presentan una mayor facilidad para modificar el contenido de humedad durante los cultivos sólidos.

Respecto al PCH, este representa la cantidad de agua ligada al soporte que no puede ser empleada por el microorganismo, denominada agua de cristalización, y que está ligada a la estructura cristalina del residuo vegetal. Para el caso de las muestras de sargazo limpio y natural, se obtuvieron valores de 28.87% y 27.44% respectivamente.

Derivado de la caracterización fisicoquímica del sargazo residual limpio y natural, se puede determinar que ambos elementos pueden ser utilizados como soporte-sustrato durante un proceso de fermentación en medio sólido.

La evaluación del crecimiento de la cepa *Aspergillus niger* M4 en FMS empleando sargazo natural y sargazo lavado, se muestran en la figura 12.

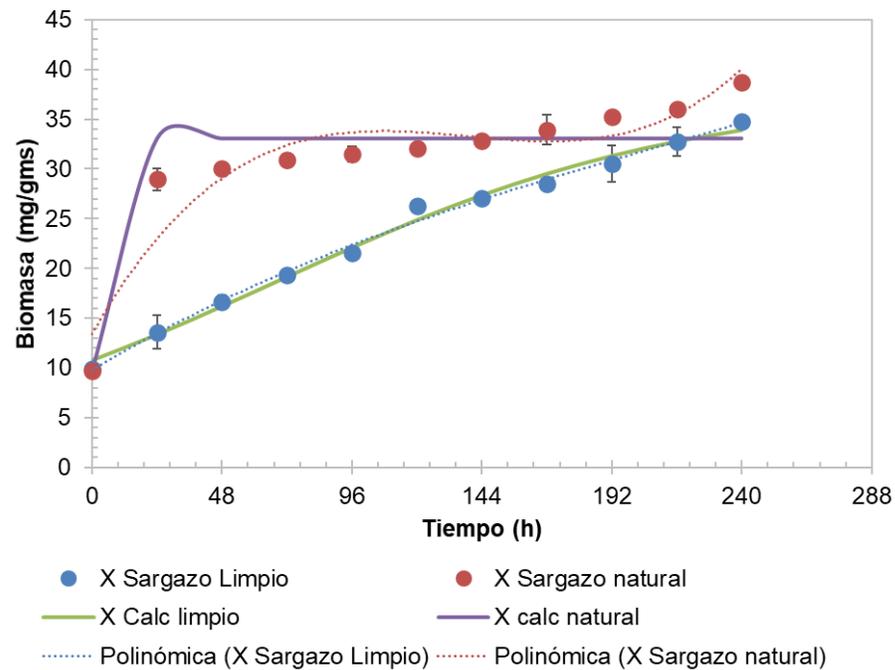


Figura 12. Evaluación de crecimiento de la cepa *Aspergillus niger* M4 empleando sargazo lavado y sargazo natural.

La cepa microbiana fue capaz de crecer en ambas condiciones de sargazo evaluadas. El crecimiento mostrado en el sargazo limpio muestra una fase de crecimiento exponencial muy alargada en el tiempo, pero constante. El valor máximo de biomasa fúngica (34.81 mg/gramos de material seco (g.m.s)) se alcanza a las 240 h de cultivo, empleando sargazo limpio.

A diferencia del bioproceso con sargazo limpio, la fermentación realizada empleando el sargazo natural, muestra una fase exponencial corta entre las 0 y 24 h, para posteriormente mantener una baja tasa de generación celular, alcanzando el máximo a las 240 h (38.74 mg/g.m.s). Al comparar las tasas de crecimiento (μ_{max}) en las fermentaciones con distinto sustrato (sargazo limpio y natural), se muestra una mayor velocidad a las 24 h de

fermentación, para el sargazo natural ($\mu_{\max} = 0.0456 \text{ h}^{-1}$), por lo que tiene una velocidad de crecimiento mayor, comparado con las primeras 24 h de fermentación sobre sargazo limpio ($\mu_{\max} = 0.0133 \text{ h}^{-1}$). Sin embargo, considerando la velocidad de crecimiento posterior a las 24 h (entre las 24 y 240 h), la mayor velocidad se presenta en el sargazo limpio ($\mu_{\max} = 0.0041 \text{ h}^{-1}$), comparada con el sargazo natural ($\mu_{\max} = 0.0012 \text{ h}^{-1}$).

La velocidad máxima de crecimiento para el sargazo natural dentro de las primeras 24 h se puede ver estimulada debido al contenido de compuestos libres en el medio, y que no fueron removidos por efecto de un lavado con agua potable. La posterior disminución en la velocidad de crecimiento para el proceso fermentativo con sargazo natural pudo deberse a la posible acumulación de diversos compuestos que están relacionados con la viscosidad del medio sólido, lo que disminuye el metabolismo del microorganismo (Reyes-Ocampo et al., 2013). El efecto del lavado del material puede remover diferentes compuestos tanto benéficos como tóxicos, mejorando su aplicación como soporte-sustrato. También puede disminuir la disponibilidad de azúcares de fácil asimilación por el microorganismo, por lo que la adaptación al medio de cultivo y la degradación de los polisacáridos del sargazo como fucoidan y alginato (Saldarriaga et al., 2020) se ven retardadas en la fermentación con sargazo limpio.

La evaluación de las condiciones de acumulación de antioxidantes por medio de la biodegradación fúngica de los compuestos fenólicos en FMS empleando sargazo natural y sargazo lavado, se muestran en la figura 13.

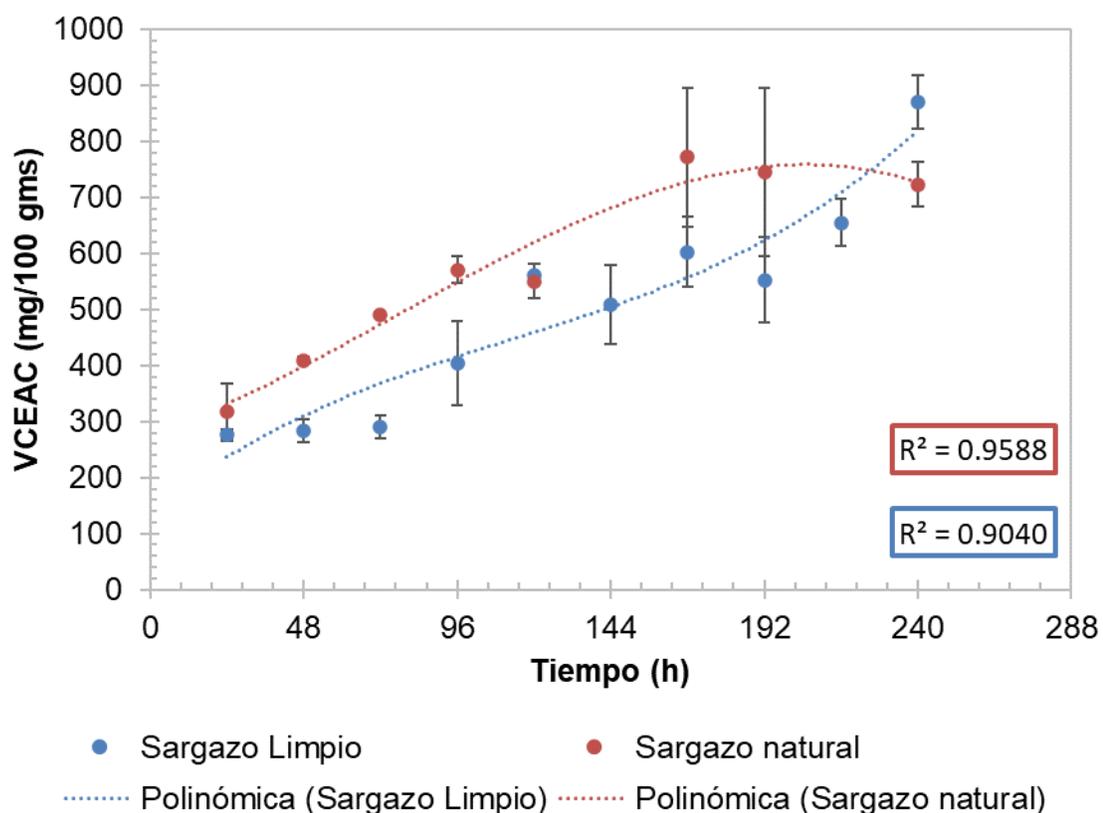


Figura 13. Actividad antioxidante equivalente a vitamina C (VCEAC) presente durante la fermentación de sargazo limpio y sargazo natural.

El contenido de actividad antioxidante evaluada en el bioproceso de degradación de especies de sargazo se incrementa en relación con el tiempo de fermentación para ambos sustratos. La mayor actividad antioxidante (869.8 mg VCEAC/100 g.m.s) para el sargazo limpio se alcanza a las 240 h, lo que es 1.4 veces más que el valor inicial (202.9 mg VCEAC/100 g.m.s). Para el caso del sargazo natural como soporte-sustrato, se alcanzó una actividad antioxidante máxima de 771.5 mg VCEAC/100 g.m.s a las 168 h de fermentación; 1.3 veces más que el valor inicial (236.9 mg VCEAC/100 g.m.s).

En ambos tipos de sargazo utilizado, el proceso fermentativo permite acumular compuestos con actividad antioxidante, sin embargo, el mayor valor se obtiene con el sargazo limpio. La cantidad de FHT presentes en las muestras contienen principalmente galotaninos o elagitaninos, que son ésteres de ácido gálico o ácido elágico, respectivamente, y están ligados

a una unidad central de carbohidrato con enlaces de fácil capacidad para hidrolizarse en presencia de ácidos, bases o enzimas (Olivas-Aguirre et al., 2015). Los derivados de los FHT muestran una gran capacidad para captar radicales libres causantes del estrés oxidativo (Kuskoski et al., 2005). El extremo reductor del azúcar, o grupo hidroxilo hemiacetal, favorece la actividad antioxidante de polisacáridos. La función del hidrógeno en el grupo hidroxilo activo de los compuestos fenólicos, es eliminar los radicales libres; mientras la función de los iones metálicos complejos del hidroxilo activo es inhibir la generación de radicales libres (Zhang et al., 2019).

La enzima tanasa es responsable de catalizar la hidrólisis de enlaces tipo éster de los taninos complejos e hidrolizables. La expresión enzimática de tanasa durante la fermentación de ambos tipos de sargazo, se presenta en la figura 14.

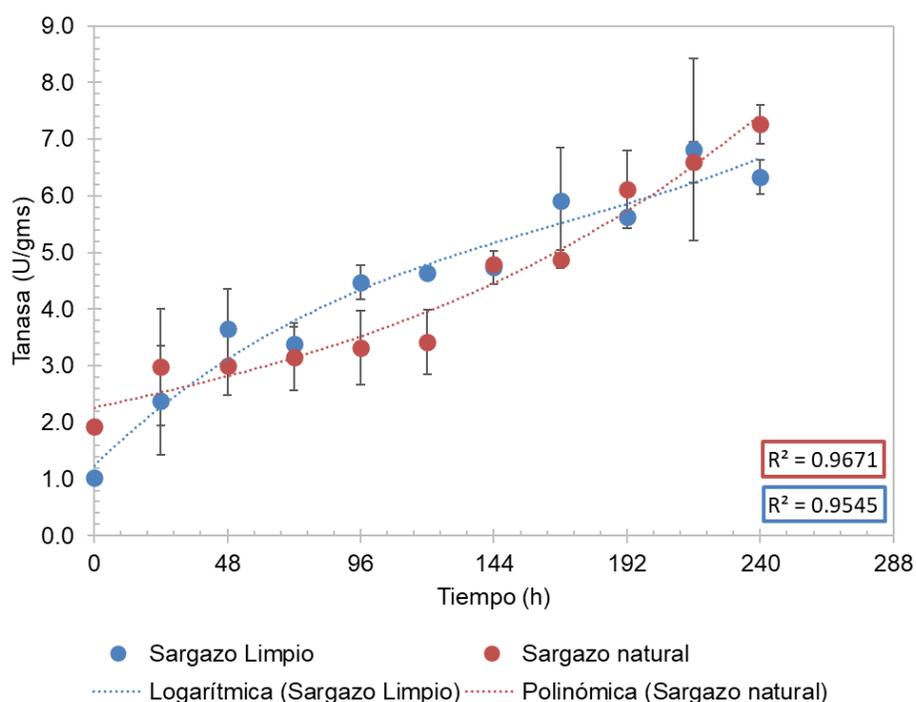


Figura 14. Actividad tanasa presente durante la fermentación de sargazo limpio y sargazo natural.

La máxima producción de actividad tanasa (7.27 U/g.m.s) se registra a las 240 h de fermentación utilizando el sargazo natural; mientras que el proceso fermentativo que empleó sargazo limpio como soporte-sustrato, obtuvo el máximo de actividad a las 216 h con un valor de 6.82 U/g.m.s. La presencia de actividad tanasa en el medio de fermentación, está relacionada con la degradación de compuestos fenólicos hidrolizables (Balabanova et al., 2018). Comparando la síntesis de la enzima tanasa con el crecimiento celular previamente mostrado, se observa que la síntesis enzimática está ligada directamente con el crecimiento celular. Para el sargazo limpio, la síntesis de enzima se genera durante toda la etapa de crecimiento del microorganismo, lo que permite la obtención de carbohidratos de energía y la liberación de los ácidos fenólicos, responsables de la acumulación de la actividad antioxidante. Por otra parte, la evaluación de la actividad tanasa para el sargazo natural, muestra una actividad constante dentro de las primeras 120 h de fermentación, relacionado posiblemente al consumo de otras fuentes de carbohidratos diferentes a los FHT. Estos resultados sugieren la utilización del sargazo limpio como posible fuente de inducción para la síntesis de la enzima tanasa, y la generación de compuestos antioxidantes.

9. CONCLUSIONES

El proceso de fermentación en estado sólido empleando el sargazo como soporte-sustrato y la cepa *Aspergillus niger* M4, logró la obtención de un extracto líquido con actividad antioxidante.

Los residuos de sargazo pelágico remanente en las costas del caribe mexicano poseen características físicas y químicas que lo convierten en una buena opción para ser utilizado como soporte-sustrato en fermentación en medio sólido.

El pretratamiento de lavado con agua potable de los residuos de sargazo afecta el crecimiento celular de la cepa *Aspergillus niger* M4, y favorece la síntesis de la enzima tanasa y la obtención de compuestos antioxidantes.

La combinación de sargazo costero y la cepa de *Aspergillus niger* M4, permite la obtención de actividad tanasa bajo las condiciones evaluadas en este trabajo.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Balabanova, L., Slepchenko, L., Son, O., & Tekutyeva, L. (2018). Biotechnology potential of marine fungi degrading plant and algae polymeric substrates. *Frontiers in microbiology*, 9, 1527. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01527>
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99(1), 191-203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- BioRefineries Blog. (2016). Los verdaderos colores de las biorrefinerías. Consultada en Mayo 2021. Disponible en: <https://biorrefineria.blogspot.com/2016/11/los-verdaderos-colores-de-las-biorrefinerias-materias-primas.html>
- Charles-Rodríguez, V., Guerrero-Mata, A., Martínez-Vázquez, G., Cruz-Hernández, M. A., Belmares-Cerda, R. E., & Robledo, A. (2018). Bioreactor analysis for the corn-cob valorization in the xylanase production. *Waste and Biomass Valorization*, 9(6), 995-1001. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9754-3>
- Chávez-Sifontes, M., & Domine, M. E. (2013). Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances en ciencias e Ingeniería*, 4(4), 15-46. <https://www.redalyc.org/pdf/3236/323629266003.pdf>
- Dalila Aldana Aranda, Martha Enríquez Díaz y Vidal Elías, 2020. Cooperación en el Caribe ante el sargazo, (2021) disponible en: https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/71_4/PDF/13_71_4_1288_Sargazo_Cooperacion.pdf
- De la Rosa, L. A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J., & Alvarez-Parrilla, E. (2018). Phenolic compounds. In *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9>
- Del Prado García, M. 2008. Biorrefinerías: Situación Actual y Perspectivas de Futuro. Informe de Vigilancia Tecnológica. Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas. Genoma España. España. Disponible en: https://icono.fecyt.es/sites/default/files/filepublicaciones/2009-biorrefinerias-pub_80_d.pdf
- Devault, D. A., Pierre, R., Marfaing, H., Dolique, F., & Lopez, P. J. (2020). Sargassum contamination and consequences for downstream uses: a review. *Journal of Applied Phycology*, 1-36. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02250-w>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>

- Dudonne, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., & Mérillon, J. M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(5), 1768-1774. <https://doi.org/10.1021/jf803011r>
- Gan, R. Y., Chan, C. L., Yang, Q. Q., Li, H. Bin, Zhang, D., Ge, Y. Y., Gunaratne, A., Ge, J., & Corke, H. (2018). Bioactive compounds and beneficial functions of sprouted grains. In *Sprouted Grains: Nutritional Value, Production, and Applications* (pp. 191–246). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811525-1.00009-9>
- Gordo, D. A. M. (2018). Los compuestos fenólicos, un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de investigación agraria y ambiental*, 9(1), 81-104. <https://doi.org/10.22490/21456453.1968>
- Hardouin, K., Bedoux, G., Burlot, A. S., Nyvall-Collen, P., & Bourgougnon, N. (2014). Enzymatic recovery of metabolites from seaweeds: Potential applications. *Advances in botanical research*, 71, 279-320. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408062-1.00010-X>
- Horwitz, W. (2010). *Official methods of analysis of AOAC International. Volume I, agricultural chemicals, contaminants, drugs*/edited by William Horwitz. Gaithersburg (Maryland): AOAC International, 1997. <http://hdl.handle.net/10637/3158>
- Isaza-Martínez, J. H. (2007). Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia Et Technica*, 13(33), 13–18. <https://www.redalyc.org/pdf/849/84903303.pdf>
- Junta de Andalucía. (2021). BIOECONOMIA EN ANDALUCIA. Consultada en Mayo 2021. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Disponible en: <http://www.bioeconomiaandalucia.es/que-es-la-bioeconomia>
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicação de diversos métodos químicos para determinar atividade antioxidante em polpa de frutas. *Food Science and Technology*, 25(4), 726-732. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016>.
- León, C. (2020). El sargazo a escena. *Salud pública de México*, 61, 701-703. <https://doi.org/10.21149/10870>
- Llancari, A., Matos, A. 2-4 noviembre, 2011. Valoración de los nutrientes y antioxidantes en la salud humana e industria alimentaria. En: Universidad Peruana Unión. I Congreso Nacional de Investigación. Perú, Lima.
- Miklasińska-Majdanik, M., Kępa, M., Wojtyczka, R. D., Idzik, D., & Wąsik, T. J. (2018). Phenolic compounds diminish antibiotic resistance of staphylococcus aureus clinical strains. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 15, Issue 10). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijerph15102321>

- MILENIO DIGITAL Y AGENCIA EFE, (2019) ¿Qué productos se han hecho en México con sargazo? Consultada en Mayo 2021. disponible en: <https://www.milenio.com/estados/que-productosse-han-hecho-con-sargazo>
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Minatel, I. O., Borges, C. V., Ferreira, M. I., Gomez, H. A. G., Chen, C. Y. O., & Lima, G. P. P. (2017). Phenolic compounds: Functional properties, impact of processing and bioavailability. *Phenolic Compd. Biol. Act*, 1-24. <http://dx.doi.org/10.5772/66368>
- Olivas-Aguirre, F. J., Wall-Medrano, A., González-Aguilar, G. A., López-Díaz, J. A., Álvarez-Parrilla, E., Rosa, L. A., & Ramos-Jimenez, A. (2015). Taninos hidrolizables: bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. *Nutrición hospitalaria*, 31(1), 55-66. <https://scielo.isciii.es/pdf/nh/v31n1/05revision05.pdf>
- Orzua, M. C., Mussatto, S. I., Contreras-Esquivel, J. C., Rodríguez, R., de la Garza, H., Teixeira, J. A., & Aguilar, C. N. (2009). Exploitation of agro industrial wastes as immobilization carrier for solid-state fermentation. *Industrial Crops and Products*, 30(1), 24-27. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.02.001>
- Paredes Rangel, B. (2020). El sargazo: retos y oportunidades. *Ciencia*, 71(4), 8-13. https://www.amc.edu.mx/revistaciencia/images/revista/71_4/PDF/71-4_SARGAZO_RED.pdf
- Pastene, E. Estado actual de la búsqueda de plantas con actividad antioxidante. *Boletín Latinoam Caribe Plantas Med Aromáticas*. 2009; 8 (6), pp. 449- 55. <https://www.redalyc.org/pdf/856/85617461001.pdf>
- Pastrana, L. (1996). Fundamentos de la fermentación en estado sólido y aplicación a la industria alimentaria. *CYTA-Journal of Food*, 1(3), 4-12. <https://doi.org/10.1080/11358129609487556>
- Patthamakanokporn, O., Puwastien, P., Nitithamyong, A., & Sirichakwal, P. P. (2008). Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(3), 241-248. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2007.10.002>
- Reyes-Ocampo, I., & González-Brambila, M., & López-Isunza, F. (2013). UN ANÁLISIS DEL METABOLISMO DE *Aspergillus niger* CRECIENDO SOBRE UN SUSTRATO SÓLIDO. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12(1),41-56. [fecha de Consulta 18 de Mayo de 2021]. ISSN: 1665-2738. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62028007005>
- Robledo, A., Aguilera-Carbó, A., Rodriguez, R., Martinez, J. L., Garza, Y., & Aguilar, C. N. (2008). Ellagic acid production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation of pomegranate residues. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(6), 507-513. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0309-x>

- Saldarriaga-Hernandez, S., Hernandez-Vargas, G., Iqbal, H. M., Barcelo, D., & Parra-Saldívar, R. (2020). Bioremediation potential of *Sargassum* sp. biomass to tackle pollution in coastal ecosystems: Circular economy approach. *Science of The Total Environment*, 715, 136978. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136978>
- Soccol, C. R., da Costa, E. S. F., Letti, L. A. J., Karp, S. G., Woiciechowski, A. L., & de Souza Vandenberghe, L. P. (2017). Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*, 1(1), 52-71. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.01.002>
- Sharma, S., Bhat, T. K., & Dawra, R. K. (2000). A spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine. *Analytical Biochemistry*, 279(1), 85-89. <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4405>
- Zhang, R., Zhang, X., Tang, Y., & Mao, J. (2020). Composition, isolation, purification and biological activities of *Sargassum fusiforme* polysaccharides: A review. *Carbohydrate polymers*, 228, 115381. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115381>