



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias en Energía Renovable

EVALUACIÓN DE LOS PRETRATAMIENTOS
ENZIMÁTICOS CON EXTRACTO DE *TRAMETES*
HIRSUTA RT-1 EN LA DEGRADACIÓN DE *SARGASSUM*
spp PARA LA PRODUCCIÓN DE METANO

Tesis que presenta

ANDRÉS HUMBERTO CANUL MANZANERO

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENONVALBE

Mérida, Yucatán, México

2023

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

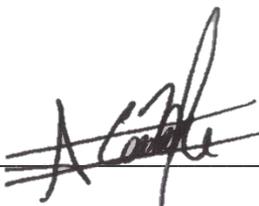
POSGRADO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE



DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de: Materiales y Métodos, Resultados y Discusión de este documento, proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que, a razón de lo anterior, y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y se registrarán, en todo caso, por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____



Nombre: Andrés Humberto Canul Manzanero

Mérida, Yucatán, México, a 29 de Septiembre de 2023



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Andrés Humberto Canul Manzanero** titulado **“Evaluación de los pretratamientos enzimáticos con extracto de *Trametes hirsuta* Rt-1 en la degradación de *Sargassum spp* para la producción de metano”**, fue realizado en la Unidad de Energía Renovable, en los laboratorios ERU 19 y 20 de la línea de investigación de Bioenergía del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del **Dr. Raúl Tapia Tussell** y la Codirección de la **Dra. Liliana Alzate Gaviria**, pertenecientes al Programa de Posgrado en Energía Renovable de este Centro.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 29 de septiembre de 2023

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnología (CONAHCYT), por la beca otorgada no. 757185 para la realización de esta investigación.

Al CICY, a la Unidad de Energía Renovable y los laboratorios UER 19 y 20, por otorgar el espacio, los instrumentos y equipos para la realización de esta tesis.

Al Dr. Raúl Tapia Tussell por brindarme la oportunidad de cumplir un objetivo más en mi formación profesional, por sus consejos y paciencia a lo largo de este camino. Mil gracias.

A la Dra. Liliana Alzate Gaviria por su apoyo, observaciones y consejos en la realización de esta tesis.

Al Dr. Juan Carlos Chavarría Hernández por sus observaciones y comentarios en la revisión de la tesis.

A la Dra. Sara Elena Solís Pereira por sus observaciones y comentarios en la revisión de la tesis.

A la Dra. Galdy Hernández Zarate por sus observaciones y comentarios en la revisión de esta tesis.

Al Mtro. Jorge Domínguez y la Dra. Elda Isaura España Gamboa, por su apoyo técnico en la realización del análisis FT-IR y análisis elemental, así como en la ayuda brindada en el laboratorio ERU 19.

A la I.Q.I. Tanit Toledano Thompson por el análisis en el microscopio electrónico de barrido, por su tiempo, paciencia y enseñanza en el manejo de los equipos del laboratorio ERU 20.

Al Dr. Edgar Olgún Maciel, por su ayuda a lo largo de toda la tesis, por compartir sus experiencias y conocimientos en pro de la investigación.

A mi madre Guadalupe y toda mi familia, por haberme apoyado en todo momento y empujarme a seguir adelante. Son el bastión de mi vida.

A mi novia Maily, quien me alentó a retomar y continuar con esta meta. Gracias por todo.

A mis compañeros y amigos de la unidad, Edwin, Rubí, Ricardo Daniel, Mariana, Michelle, Cindy, Guadalupe, Roberto. Por el apoyo, risas, consejos, pláticas y café compartido a lo largo de este tiempo. Con su convivencia hicieron el día a día más ameno.

DEDICATORIA

*A mi padre Gabriel Canul,
que desde el cielo me motiva a continuar cumpliendo con mis metas.
Te dedico este momento tan especial en mi vida.*

ÍNDICE

RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I	3
ANTECEDENTES	3
1.1 Sargazo pelágico	3
1.2 <i>Sargassum</i> spp.....	3
1.2.1 Gran cinturón Atlántico del sargazo (GASB).....	4
1.2.2 Origen del GASB.....	4
1.3 Arribos masivos de sargazo (AMS).....	5
1.3.1 Problemáticas por los AMS	6
1.4 Usos potenciales del sargazo	8
1.4.1 Manufactura de diversos productos.....	8
1.4.2 Aprovechamiento en biocombustibles	8
1.5 Limitantes para el aprovechamiento del sargazo	11
1.5.1 Metales pesados	11
1.5.2 Presencia de lignina en la pared celular	11
1.6 Gas Metano (CH ₄)	12
1.6.1 Potencial bioquímico de metano.....	13
1.7 Producción de CH ₄ a partir de macroalgas	14
1.7.1 Producción de CH ₄ a partir de sargazo.....	16
1.8 Pretratamientos aplicables al sargazo.....	18
1.9 Pretratamiento enzimático	19
1.9.1 Enzima lacasa.....	19
1.10 Metodología de Superficie de Respuesta.....	19

1.10.1 Diseño compuesto central	20
1.11 Hipótesis	21
1.12 Objetivos	21
1.12.1 Objetivo general	21
1.12.2 Objetivos específicos	21
CAPITULO II	22
MATERIALES Y MÉTODOS	22
2.1 Estrategia experimental	22
2.2 Acondicionamiento de la materia prima	23
2.2.1 Lavado	23
2.2.2 Secado, selección de tamaño de partícula	23
2.3 Caracterización de la materia prima	23
2.3.1 Determinación de humedad, sólidos totales, cenizas y sólidos volátiles	23
2.3.2 Determinación de lignina y holocelulosa	25
2.3.3 Análisis elemental CHNS-O	26
2.3.4 Análisis infrarrojo (FT-IR)	26
2.3.5 Microscopía electrónica de barrido	26
2.4 Producción de extracto enzimático	27
2.4.1 Cepa fúngica e inductores enzimáticos	27
2.4.2 Extracto enzimático	27
2.4.3 Cuantificación actividad lacasa	27
2.5 Pretratamiento enzimático	28
2.5.1 Metodología de Superficie de Respuesta-Diseño Compuesto Central	28
2.6 Ensayo potencial bioquímico de metano (BMP)	30
2.6.1 Potencial bioquímico de metano teórico (BMPT)	30
2.7 Caracterización de metano en biogás	31
2.7.1 Presión manométrica	31

2.7.2 Determinación de metano.....	31
CAPITULO III	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
3.1 Acondicionamiento de la materia prima	32
3.1.1 Lavado de sargazo	32
3.2 Caracterización de la materia prima.....	34
3.2.1 Determinación de humedad, sólidos totales, cenizas y sólidos volátiles	34
3.2.2 Análisis elemental.....	35
3.2.3 Determinación de lignina	36
3.2.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	37
3.3 Producción de extracto enzimático a partir de <i>Trametes hirsuta</i> RT-1	38
3.4 Pretratamientos enzimáticos.....	40
3.4.1 Diseño compuesto central	40
3.5 Caracterización de sargazo después de pretratamientos.....	41
3.5.1 Determinación de humedad, sólidos totales, cenizas y sólidos volátiles	41
3.5.2 Análisis elemental.....	42
3.5.3 Determinación de lignina y holocelulosa.....	43
3.5.4 Análisis infrarojo (FT-IR).....	44
3.5.5 Microscopía electrónica de barrido	46
3.6 Ensayos BMP	47
3.6.1 Volumen de biogás acumulado.....	47
3.6.3 Concentración de CH ₄	48
3.6.2 Volumen de CH ₄ acumulado.....	49
3.6.4 Rendimiento de CH ₄ (BMP).....	50
3.6.5 Índice de biodegradabilidad (BI)	52
3.7 Superficie de respuesta.....	53
CONCLUSIONES.....	55

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS57

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1 Producción de biocombustibles a partir de sargazo.	10
Tabla 1.2 Características generales del biogás.	12
Tabla 1.3 Rendimiento de CH ₄ a partir de diversas macroalgas.	15
Tabla 1.5 Pretratamientos aplicados al sargazo.	18
Tabla 2.1 Diseño compuesto central.	29
Tabla 2.2 Diseño del experimento factorial y la variable de respuesta observada.	29
Tabla 3.1 Evaluación de la conductividad durante el proceso de lavado.	33
Tabla 3.2 Análisis proximal.	35
Tabla 3.3 Análisis elemental del sargazo en diferentes años y sitios de colecta.	35
Tabla 3.4 Porcentaje de lignina y holocelulosa en Sargazo.	37
Tabla 3.5 Diseño compuesto central con variables dependientes e independiente.	40
Tabla 3.6 Contenido de humedad, sólidos totales, cenizas y sólidos volátiles después de pretratamientos.	41
Tabla 3.7 Porcentaje de lignina y holocelulosa después de pretratamientos.	43
Tabla 3.8 Índice de biodegradabilidad.	52

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 a) <i>S. fluitans</i> III b) <i>S. natans</i> I c) <i>S. natans</i> VIII [12].	3
Figura 1.2 En marrón el Gran cinturón Atlántico de los Sargazos [14].	4
Figura 1.3 Distribución del sargazo por especie y región. Diferencias entre densidades de sargazo en el mar de los sargazos y la región del Atlántico tropical oriental [13].	6
Figura 1.4 Sargazo en playa Punta Brava, Puerto Morelos, Q. Roo (2022)	7
Figura 1.5 Digestión anaerobia, sus etapas y productos [39].	13
Figura 1.6 Diseño compuesto central para $k=2$ y $\alpha= 2$ [57].	20
Figura 2. 1 Estrategia experimental	22
Figura 2.2 Rampa de temperatura para la terminación de SV.	24
Figura 3.1 Impurezas retiradas del sargazo: a) pastos marinos; b) Arena y c) Alga <i>Turbinaria turbinata</i> .	32
Figura 3.2 Especies marinas retiradas del sargazo.	32
Figura 3.3 Caracterización del sargazo NP	36
Figura 3.4 a) Micrografía del “tallo” de sargazo b) Magnificación a X1,100.	38
Figura 3.5 Comportamiento de la actividad lacasa con inductores st, ct y tr.	39
Figura 3.6 Contenido elemental en sargazo NP y después de pretratamientos	42
Figura 3.7 Espectro FT-IR del sargazo no pretratado y sargazo con pretratamiento 10.	45
Figura 3.8 a) “Tallo” después de pretratamiento b) Vesícula después de pretratamiento c) Fracturas en el tejido del sargazo.	46
Figura 3.9 a) Formación de estrías en el tejido del sargazo después de pretratamiento b) Estrías en el sargazo.	47
Figura 3.10 Volumen de biogás acumulado.	48
Figura 3.11 Concentración de CH ₄ .	49
Figura 3.12 Volumen de metano diario.	50
Figura 3.13 Rendimiento de CH ₄	51
Figura 3.14 Superficie de respuesta estimada a partir del DCC.	53

Figura 3.15 Contorno de la superficie de respuesta.54

RESUMEN

Los arribos masivos de sargazo en el caribe son una consecuencia de la contaminación actual, calentamiento global y cambio climático. Este es un problema que se ha presentado de manera periódica en los últimos 10 años, por lo que, es necesario desarrollar estrategias para el aprovechamiento del sargazo. En la presente tesis se abordan temas en torno al sargazo como, su composición estructural, ubicación en el océano Atlántico y la problemática que generan los arribos masivos de esta biomasa. En el caso particular del Caribe mexicano se documentan los esfuerzos para aprovechar el sargazo, entre los cuales se encuentra la producción de gas metano y los pretratamientos que pueden mejorar su potencial bioquímico de metano. Tambien, se describe la estrategia experimental para evaluar los pretratamientos enzimáticos aplicado a biomasa de sargazo colectado en Puerto Morelos, en octubre de 2021. Los pretratamientos se aplicaron de acuerdo a la metodología de superficie de respuesta, con un diseño central compuesto; posteriormente se llevaron a cabo ensayos de potencial bioquímico de metano a cada muestra de sargazo pretratada. De esta manera se alcanzó el objetivo de evaluar los pretratamientos enzimáticos con extracto enzimático de *Trametes hirsuta* RT-1 en la degradación del sargazo para la producción de metano. Si bien, los pretratamientos no dañaron severamente la estructura del sargazo; lograron modificar el tejido del sargazo permitiendo la accesibilidad de los carbohidratos. El pretratamiento más efectivo fue: extracto enzimático con 1500 U/g de actividad lacasa y 48 horas de reacción, dado que se alcanzó un potencial bioquímico de metano de 111.57 L CH₄/kg SV. La superficie de respuesta muestra un comportamiento lineal del diseño compuesto central, lo que indica aproximación a la región de los parámetros óptimos del pretratamiento.

ABSTRACT

The massive arrivals of *Sargassum spp.* in the Caribbean are a consequence of current pollution, global warming and climate change. This is a problem that has occurred periodically in the last 10 years, so it is necessary to develop strategies for the use of sargassum. In this thesis, the most important characteristics of *Sargassum spp.* are presented, such as: its structural composition, location in the Atlantic Ocean, in the case of the Mexican Caribbean, the efforts to take advantage of this raw material are described, such as the production of methane gas and the pretreatments that are applied to increase the biochemical potential of methane. The experimental strategy to evaluate the enzymatic pretreatments applied to sargassum (Puerto Morelos, 2022) is described, from its proximal characterization, elemental analysis, FT-IR spectroscopy and scanning electron microscopy. The pretreatments were carried out according to the response surface methodology, with a central composite design, subsequently, methane biochemical potential tests were carried out on each pretreated sargassum sample. In this way, the objective of evaluating the effect of enzymatic pretreatments with *T. hirsuta* RT-1 enzymatic extract on sargassum degradation was achieved by applying a response surface methodology and BMP tests to determinate the most effective conditions of pretreatments. Although, the pretreatments do not severely damage the structure of the sargassum, they modify the sargassum tissue allowing the accessibility of carbohydrates. The most effective pretreatment was: enzymatic extract with 1500 U/g of laccase activity and 48 hours of reaction, since a biochemical methane potential of 111.57 L CH₄/kg SV was reached. The response surface shows a linear behavior of the central composite design, which indicates an approximation to the region of the optimal parameters of the pretreatment.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el desarrollo del ser humano se ve amenazado por una crisis energética y ambiental, originada por el manejo indiscriminado de los recursos naturales. En un principio el desarrollo energético fue a partir de la biomasa disponible en la tierra, esta tendencia fue cambiando hacia el uso de recursos fósiles. A partir del desarrollo de la revolución industrial el principal combustible sería el fósil, no renovable. La quema de este energético, ha derivado en el cambio climático y en todas las consecuencias que este trae. Principalmente por la liberación del dióxido de carbono (CO₂) contenido en todos los energéticos como el petróleo, carbón mineral y gas natural.

Actualmente México cuenta con la materia prima, tecnología, desarrollo científico y capital humano para contribuir en los esfuerzos contra el cambio climático. Por ejemplo, el país de manera frecuente recibe biomasa marina (macroalgas) en sus costas, sin embargo, desde el año 2011 han llegado cantidades fuera de lo habitual de la macroalga marrón *Sargassum* spp (de aquí en adelante; sargazo); principalmente a las costas caribeñas de la península de Yucatán [1]. En agosto de 2014 las costas del estado mexicano de Quintana Roo recibieron 275,848.5 m³ de sargazo [2]. Se ha encontrado que el origen proviene del océano Atlántico en una región llamada Gran Cinturón Atlántico de los Sargazos, GASB por sus siglas en inglés. Las razones para la proliferación del alga en esta región se pueden deber a múltiples factores y la mayoría se puede explicar como consecuencia de actividades antropogénicas [3]. Este tema se aborda más a fondo en las secciones subsecuentes.

El sargazo, es una macroalga marrón en su mayoría comprendida por las especies *S. fluitans* y *S. natans* [4]. Posee una pared celular rígida con lignina, y con carbohidratos como, celulosa, hemicelulosa y xilosa [5]. Estos carbohidratos son de interés por su uso en la producción de biocombustibles. Estas características favorecen el desarrollo de diversas estrategias para la producción de energía; ya que el uso de biomasa como materia prima alternativa a los combustibles fósiles se prefiere debido a su papel en la reducción de las emisiones gases de efecto invernadero, por lo tanto, es reconocida como una fuente de energía renovable [6]. En este sentido se ha desarrollado investigación para optimizar los procesos capaces de extraer la energía contenida en la biomasa tales como; la fermentación alcohólica, la transesterificación de triglicéridos y la digestión anaerobia de materia orgánica, cabe destacar que estos son los estándares de la bioenergía. En este proyecto se propone la implementación de la digestión

anaerobia como método de bioconversión económicamente factible para la producción de gas metano [7].

El sargazo se caracteriza por tener una mayor complejidad en su composición morfológica en comparación con otras macroalgas. Esto se debe a la lignina, que se encuentra en las paredes celulares. La lignina es un material recalcitrante, lo que supone una limitante en la obtención de metano, por lo tanto, es necesario incluir una etapa de pretratamiento al proceso de obtención de energía [5]. Existen varios tipos de pretratamientos: físicos, químicos, térmicos, mecánicos, ultrasonido, microondas biológico y/o combinaciones entre estos [5,8,9]. El pretratamiento es una etapa previa a la digestión anaerobia, la finalidad es modificar la estructura de la materia prima para proporcionar accesibilidad a los microorganismos capaces de metabolizar los polímeros insolubles contenidos en la pared celular. [9]

El sargazo cumple con las características para ser probado en digestión anaerobia ya que como materia prima no compite con la producción de alimentos, no necesita grandes áreas de tierras cultivables y no requiere recursos de agua dulce para su reproducción[8]. Por lo tanto, el gas metano obtenido a partir de fuentes renovables, tal como la biomasa de sargazo tiene el potencial de reemplazar al gas natural después de su purificación.

CAPITULO I

ANTECEDENTES

1.1 Sargazo pelágico

Ampliamente se conoce como sargazo a las algas marrones que se desarrollan en la superficie marina. Su contacto con el fondo marino es limitado, por esta característica se denominan pelágicas. Estas algas se agrupan formando grandes manchas doradas que ven su trayectoria afectada por el viento y corrientes oceánicas. Se han identificado varios géneros de sargazo pelágico, tales como: *S. natans*, *S. fluitans*, *S. bacciferum*, *S. hystrix*, *S. muticum*, *S. wightii* entre otros [4]. Estas especies marinas brindan beneficios a otras especies, ya que, al encontrarse flotando en el océano funciona como hábitat para aves, moluscos y peces [10].

1.2 *Sargassum* spp.

La materia prima a estudiar es una macroalga marrón del género *Sargassum* la cual se encuentra principalmente en el mar de sargazo (MS) y en el Gran Cinturón Atlántico de Sargazo, GASB por sus siglas en inglés. El sargazo se conforma principalmente por dos especies: el *S. fluitans* y el *S. natans* [11]. Estas especies son similares en varias de sus características: su población se reproduce por fragmentación vegetativa, sus ramas laterales son extensamente ramificadas, largas y enredadas, un gran número de pequeñas bolsas de aire se forman a lo largo de las ramas laterales, las cuales le permiten flotar, sus filoides son grandes y dentados, y por último tienen pocos o ningún criptostomata [4]. En la figura 1.1 se pueden observar ambas especies.



Figura 1.1 a) *S. fluitans* III b) *S. natans* I c) *S. natans* VIII [12].

1.2.1 Gran cinturón Atlántico del sargazo (GASB)

Mediante imágenes satelitales se ha observado la floración de grandes cantidades de sargazo que se extienden desde el este de África hasta el caribe y el golfo de México. esta región es llamada Gran Cinturón Atlántico de los Sargazos. Del 2015 al 2018 el GASB cubrió más de 8,850 km, acarreando más de 20 millones de toneladas en junio de 2018. [3] En la figura 1.2, se puede observar la distribución del GASB. Existen 3 regiones de consolidación; la primera se encuentra en el gofo de Guinea en el este de África, la segunda se trata de la corriente de recirculación nor-ecuatorial y la tercera es el conjunto de corrientes de recirculación del estuario del rio Amazonas al norte de Brasil [13]. Durante este recorrido el sargazo encuentra las condiciones propicias en el océano para reproducirse, tales como: presencia de polvo del Sahara y fertilizantes químicos vertidos al mar por los agroindustriales que desforestan la Amazonia [3].

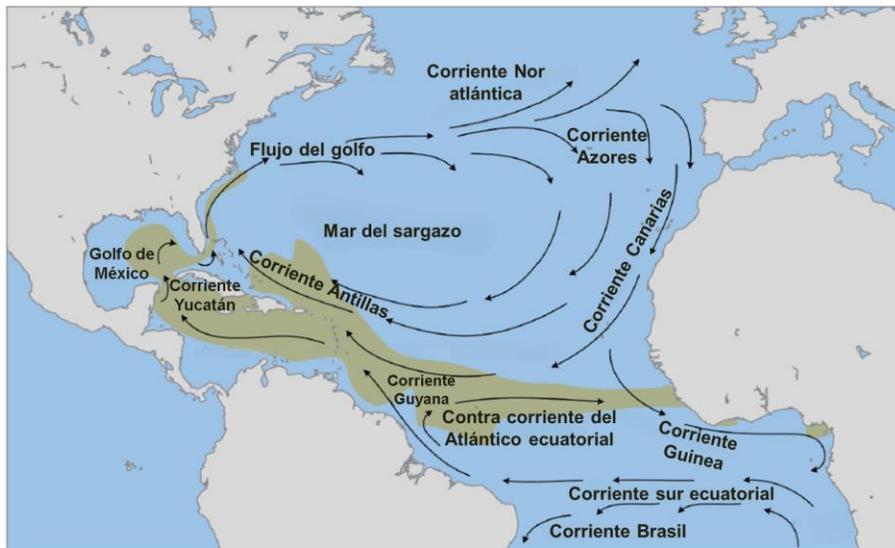


Figura 1.2 En marrón el Gran cinturón Atlántico de los Sargazos [14].

1.2.2 Origen del GASB

Para entender el origen del sargazo que arriba al caribe mexicano es necesario tener en cuenta la conjunción de más de un factor. Como se ha mencionado previamente; actualmente la biomasa que arriba al caribe no tiene conexión con el MS. Sin embargo, esta región pudo contribuir con la población semilla para el desarrollo del GASB. Se ha encontrado que durante el invierno de 2009-2010 la oscilación de corrientes del Atlántico norte presentó vientos inusualmente fuertes los cuales transportaron sargazo del MS hacia el extremo este del norte del océano Atlántico, subsecuentemente la biomasa se trasladó al extremo sur de la corriente nor-ecuatorial e ingresó

al Atlántico tropical central. Una segunda porción de sargazo continuó hacia el sur en la corriente canaria a lo largo de la costa africana para posteriormente unirse al sistema de corrientes tropicales; trayendo consigo la población semilla en el Atlántico tropical [15]. En este sentido se determinó que únicamente el 2% de biomasa es capaz de fluir a través de la corriente canaria. [16]. En conclusión, el sargazo que arriba a las costas mexicanas se reproduce en la región de recirculación nor-ecuatorial.

Entre las causas de la proliferación del sargazo se encuentra la entrada de nutrientes al océano. En el lado este del Atlántico se encuentra la descarga de nutrientes del río Congo y las corrientes de afloramiento del Congo. En el lado oeste el río Amazonas canaliza los residuos agroindustriales y los desechos de fertilizantes al océano Atlántico. De esta manera la biomasa que llegó al mar Caribe en el 2011 está directamente relacionada con la descarga de nutrientes del río Amazonas [3, 16]. Además, se encontró evidencia de enriquecimiento nutricional en muestras de sargazo halladas en Barbados. Se analizó específicamente la relación N:P y se encontró un incremento en la limitación de P, resultando en una mayor productividad de biomasa y un rápido crecimiento del sargazo [10]

1.3 Arribos masivos de sargazo (AMS)

Históricamente se ha registrado la presencia de sargazo principalmente en el océano Atlántico. La zona en la que abunda esta alga se le conoce como mar de los sargazos, localizada en el Atlántico norte central [12]. Durante los últimos 10 años, arribos masivos de sargazo (de aquí en adelante; AMS) sin precedentes han afectado a diversas islas del Caribe, el Caribe mexicano y la zona norte de Latinoamérica. Se ha demostrado mediante imágenes satelitales y experimentos *in-situ* que el origen de estos eventos no está ligado con el MS [17].

Uno de los primeros eventos reportados fue en la costa nororiental de la isla de San Andrés en el Caribe colombiano, una región que nunca había estado asociada con alta presencia de sargazo. Para dicho caso se determinó vía satélite que el origen de este sargazo fue un área al norte del estuario del río Amazonas [18]. En el Caribe mexicano el primer AMS fue desde el Atlántico sur en el año 2011. La procedencia fue localizada en el Océano Atlántico tropical hacia el este de Brasil [11]. Así mismo, no se encontró conexión con el mar de sargazo [19]. Posteriormente en verano de 2015, las playas a lo largo de la costa Caribe de México recibieron cantidades atípicamente grandes de sargazo. En promedio, se removieron 318.9 m³ de sargazo

por cada km de playa en Quintana Roo en agosto de 2015, esto quiere decir que las costas de Q. Roo recibieron 275,848.5 m³ de sargazo [2].

En el mar de los sargazos la especie dominante es *S. natans I*, mientras que las especies que arribaron al caribe son *S. natans VIII* y *S. fluitans*. Durante el evento de 2014 se estimó la densidad por especie de esta alga y se encontró una diferencia significativa en una de las cuatro regiones estudiadas. En la figura 1.3, se puede observar como la densidad de sargazo fue mucho mayor en los años de 2011 a 2015 en el Atlántico tropical oriental que en el sur del mar de los sargazos [11]

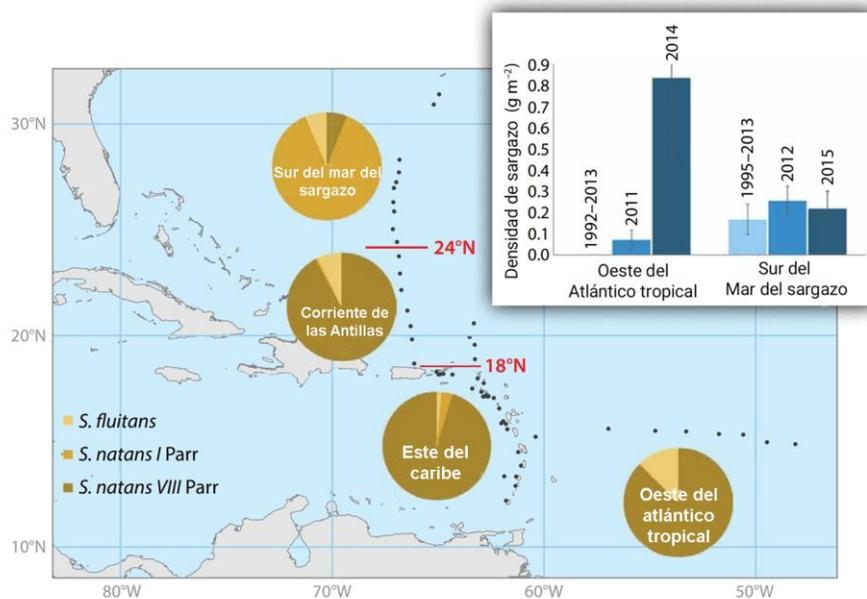


Figura 1.3 Distribución del sargazo por especie y región. Diferencias entre densidades de sargazo en el mar de los sargazos y la región del Atlántico tropical oriental [13].

1.3.1 Problemáticas por los AMS

Las problemáticas por los AMS se relacionan con el impacto a la economía de la región y del país ya que la zona afectada es la Riviera Maya; una de las principales fuentes económicas del país. En los últimos 6 años, el estado de Quintana Roo contó con una afluencia promedio de 17,623,049 visitantes, de los cuales se obtuvo una derrama económica aproximada de 11,460 MDD (millones de dólares) esta cantidad corresponde al 39% de del total de divisas que ingresaron al país por concepto de turismo SEDETUR (2022). Además, la pesca es la segunda actividad económica en importancia para el estado; sólo superada por el turismo. Son estas dos

actividades económicas afectadas por las AMS de los últimos 6 años. Los impactos generaron costos considerables por la limpieza de playas, ya que esta actividad ha quedado en manos de los hoteles y el gobierno. Así mismo, el aspecto estético se ha visto afectado de manera severa; las grandes cantidades de sargazo tiñen la playa y mar de color marrón, impiden el acceso a los turistas y llegan a causar que los visitantes deserten su estadía en el estado de Q. Roo. En la figura 1.4. se puede observar la afectación en Puerto Morelos, Q. Roo.



Figura 1.4 Sargazo en playa Punta Brava, Puerto Morelos, Q. Roo (2022)

Existe una problemática ecológica, donde los ecosistemas costeros son los principales afectados, porque una consecuencia de los AMS es la mortalidad de fauna y vegetación marina. Esto ocurre de manera indirecta y directa por la acumulación del sargazo. Indirectamente ya que en cuanto el volumen de sargazo asciende se utiliza maquinaria para su remoción de playas y traslado, lo que resulta en la compactación de arena, la destrucción de nidos y crías de tortugas marinas y en la erosión de playas, ya que cerca de 60% del volumen removido por las máquinas fue arena [2]. De manera directa sucede debido a que el AMS contribuye a la eutrofización de ambientes oligotróficos lo que propicia el deterioro de los arrecifes coralinos que tienen biodiversidad y gran importancia para la protección costera [10]. De igual manera existen indicios relacionados a problemas de salud, por ejemplo, Rodríguez et al. (2016) indicaron que el sargazo en proceso de descomposición genera olores fétidos, debido a la emisión de ácido sulfhídrico (H_2S), el cual está

asociado a complicaciones de salud, ya que la exposición puede provocar dermatitis, conjuntivitis y afectaciones del tracto respiratorio [2]. Además, la descomposición del sargazo genera gases como CH₄ y CO₂, contiene metales pesados, como el arsénico [1].

Una solución integral de este problema, debe comenzar por la caracterización de la biomasa para poder saber la línea de acción a tomar. Sin embargo, dadas las grandes cantidades de sargazo se han buscado alternativas para su aprovechamiento inmediato como su uso para la producción de papel, forraje y ladrillos para construcción, así como materia prima en las industrias farmacéuticas y de cosméticos, así como para la producción de biocombustibles [13].

1.4 Usos potenciales del sargazo

1.4.1 Manufactura de diversos productos.

El sargazo se ha usado para la fabricación de ladrillos para construcción de casas, por parte de la empresa Bluee Green México, la cual señaló que este producto sería un 30% más económico que un ladrillo de cemento. Otro caso es el empresario Omar Vázquez quien estableció una fábrica de ladrillos al sur de Quintana Roo y entablo una asociación con un grupo hotelero de Tulum [21]. Otro caso son los zapatos desarrollados por una empresa de Guanajuato a partir de esta macro alga, un par de estos zapatos contiene 200 g de sargazo. En cuanto a la iniciativa local se tiene el caso de Victoria Morfin de 18 años de edad, quien creó; papel, libretas, folders, porta vasos, etc. Indica que a la semana necesita casi 200 kg de sargazo para crear sus productos [22]. Además, las macroalgas marrones como el sargazo contienen metabolitos antioxidantes secundarios los cuales pueden tener aplicación en la industria farmacéutica. Esto se debe a que contienen compuestos antioxidantes como polifenoles, carotenoides, meroterpenoides, fitoesteroles entre otros [23]. Meng et al. indican que los antioxidantes naturales tales como los polifenoles son efectivos para combatir los procesos de estrés oxidativo asociados a múltiples desordenes de salud, se prefiere el uso de fuentes naturales de antioxidantes ya que la aparición de efectos secundarios es menor [24].

1.4.2 Aprovechamiento en biocombustibles

El contenido de carbohidratos del sargazo es de especial interés ya que pueden ser bio-transformados en energía. Este proceso es una alternativa plausible dada la cantidad de materia prima que llega al caribe mexicano. En la tabla 1.1 se resumen estudios que han sido aplicados al sargazo para la producción de biocombustibles, tales como bioetanol, biocombustible sólido y

metano. En la producción de bioetanol los porcentajes de conversión han sido mayores al 50% incluso por encima del valor teórico el cual Borines et al. (2013) reportó en 51% [25, 26]. Para la producción de metano estudios realizados por Thompson et al. (2021) o Tapia-Tusell et al. (2018) han reportado rendimientos de metano de 254 (Caribe, Barbados) y 82 (Golfo de México, Progreso) LCH₄/kgSV respectivamente, cabe mencionar que las muestras de sargazo son tomadas en diferentes puntos del atlántico.

El interés por el aprovechamiento de sargazo proviene de su contenido de carbohidratos. Entre los útiles para la producción de biocombustibles se han encontrado: 49.5 % de glucano después de aplicar pretratamientos químicos (*Sargassum angustifolium*, muestra invernal) el cual ha sido aprovechado para la producción de bioetanol [25]; 46.08% de holocelulosa, con una relación de 0.80 α -celulosa y hemicelulosa. Estos carbohidratos posteriormente; una vez aplicados los pretratamientos, pueden solubilizarse a azúcares monoméricos tales como xilosa, arabinosa y galactosa [26]. De igual manera, López et al. (2020) cuantificaron 8.7% de hemicelulosa y 13.1% de celulosa, en *Sargassum* spp. orientado para la producción de combustible sólidos [27]. Tapia-Tusell et al. (2018) identificaron celulosa y hemicelulosa en muestras de *Sargassum* spp. (Progreso, Yuc. Mex) [29].

Tabla 1.1 Producción de biocombustibles a partir de sargazo.

Biocom.	Muestra	Condiciones de operación	Resultado	Ref
Bioetanol	<i>Sargassum angustifolium</i> (Golfo pérsico)	Pretratamiento químico. 1) 10g de muestra en 75 mL de HCl a 0.2M, lavado y filtrado	Muestra de verano: 50.7% conversión a etanol	[25]
		2) 250 mL (2% p/p) agregados a la muestra filtrada. 90 °C y 2 h. Hidrólisis enzimática: Cellic® HTec2 y Cellic® CTec2 Fermentación: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Muestra de invierno: 60.7% conversión a etanol	
Bioetanol	<i>Sargassum</i> spp. (Filipinas)	Pretratamiento ácido: 72% H ₂ SO ₄ , 72 h Hidrólisis enzimática: celulasa y β-glucosidasa Fermentación: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Conversión a etanol: 65-89% Teórico: 51%	[26]
Metano	<i>Sargassum</i> spp. (Barbados)	Pretratamiento físico. Proceso hidrotérmico a 140 °C y 30 min, factor de severidad: 2.65. Aplicado al sargazo	254.84 LCH ₄ /kg SV	[27]
Metano	<i>Sargassum</i> spp. (Progreso, Yuc)	Pretratamiento biológico y enzimático. Fermentación sumergida con <i>T. hirsuta</i> Bm-2, 35 °C, 150 rpm y 6 días Extracto enzimático con 7000 U/g de actividad lacasa, 40 °C, 150 rpm y 24 h	82 LCH ₄ /kg SV	[28]
Combustible sólido	<i>Sargassum</i> spp. (Caribe mexicano)	Caracterización cinética de procesos termogravimétricos. Energía de activación: 186 kJ/mol Factor de frecuencia: 5.76x10 ⁵ /min	Energía potencial explotable: 0.203 GJ/m ³	[29]

Biocom: Biocombustible; Ref: Referencia;

1.5 Limitantes para el aprovechamiento del sargazo

1.5.1 Metales pesados

Una limitante para la manufactura de productos como los mencionados en la sección 1.4.1, es el contenido de metales pesados en el sargazo. Esta alga tiene gran capacidad de absorción de metales la cual es atribuida a los polisacáridos mayormente alginatos presentes en su pared celular. La concentración de metales pesados depende de su paso por áreas contaminadas durante su trayectoria. De acuerdo a Rodríguez et al (2019) muestras de sargazo del caribe mexicano (2018-2019) contienen Al, As, Ca, Cl, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, P, Pb, Rb, S, Si, Sr, Th, U, V, y Zn. La concentración de arsénico varió entre 24 y 172 ppm, lo cual excede el límite para su uso en alimentación animal de acuerdo a la normativa europea (40 ppm; EU,2019) y excede la concentración permitida para suelos de acuerdo a la normativa mexicana (22 ppm; NOM-147-SEMARNAT-SSA1-2004) [30]. El alto contenido de arsénico también es preocupante para la contaminación ambiental del mar y los acuíferos, ya que este se disuelve en los lixiviados originados en la degradación del sargazo. Una tonelada de sargazo en descomposición produce 316 L de lixiviado, cada litro contiene 17.18 mg de arsénico; 6.48 mg de boro y 2.51 mg de aluminio [31]. Si bien, existen procesos que disminuyen el contenido de metales en el sargazo, la literatura sugiere hacerlo desde un enfoque de biorrefinería, de esta manera la materia prima se aprovecha de forma integral la materia prima, al producir energía y coproductos de valor agregado sin concentraciones de metales fuera de las normativas. Por ejemplo, Azcorra et al (2022) realizó una extracción de alginato a sargazo de Puerto Morelos (2020) lo que ocasionó un decremento en la biomasa residual de metales como arsénico, zinc y aluminio [32]. Además, la biomasa residual se puede aprovechar para la producción de gas metano.

1.5.2 Presencia de lignina en la pared celular

La lignina es un polímero complejo y amorfo compuesto principalmente por unidades fenólicas, como el coniferil, sinapil y p-cumaril. Una característica a destacar es que los carbohidratos se encuentran recubiertos por una matriz formada de compuestos aromáticos aromáticos, la cual “protege” y por consiguiente limita el acceso a los carbohidratos para su bioconversión. En este sentido, Alzate et. al (2020) visualizó una segunda pared celular en los tejidos del sargazo mediante cortes histológicos. Encontró la presencia células lignificadas [33]. Azcorra (2021) confirmó estos resultados, ya que identificó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) 3 fenoles en el sargazo: ácido gálico, ácido vainillínico y ácido p-

cumárico, este último precursor de la síntesis de lignina [32]. Diversos estudios han cuantificado lignina en muestras de *Sargassum* spp. los porcentajes de contenido varían entre 15.6 y 31.96% [28, 31, 32, 33, 34, 35]. De acuerdo a Aparicio *et al.* (2021) estas variaciones son causadas por la temporalidad en la actividad reproductiva de la macroalga ya que, dependen de la ubicación geográfica y condiciones climáticas [35] así como de la actividad humana tal como la fuente de nutrientes [36].

1.6 Gas Metano (CH₄)

El CH₄ presente en el biogás se define como un producto del proceso de la respiración anaerobia en sistemas que soportan altas cargas orgánicas. El CH₄ se encuentra en una mezcla gaseosa de: dióxido de carbono (CO₂), nitrógeno (N₂), hidrógeno (H₂), monóxido de carbono (CO), a la que se le denomina biogás. Su composición depende del material digerido y del funcionamiento del proceso. A continuación, se enlistan las características generales del biogás [37].

Tabla 1.2 Características generales del biogás.

Característica	Descripción
Composición	55 – 70% metano (CH ₄) 30 – 45% dióxido de carbono (CO ₂) Trazas de N ₂ , H ₂ , CO.
Contenido energético	6.0 – 6.5 kW h m ⁻³
Límite de explosión	6 – 12 % de biogás en el aire
Temperatura de ignición	50 – 750 °C (con el contenido de CH ₄ mencionado)
Presión crítica	74 – 88 atm
Temperatura crítica	-82.5 °C
Densidad normal	1.2 kg/ m ³
Olor	Huevo podrido (el olor del biogás desulfurado es imperceptible)
Masa molar	16.043 kg/ kmol

La generación de biogás se obtiene gracias a un proceso biológico complejo y degradativo en el cual parte de un substrato orgánico (residuos humanos, animales y vegetales) es convertido en

CH₄ y otros subproductos. Para su producción es necesario usar un consorcio de microorganismos llamados bacterias anaeróbicas. Es importante resaltar que en este proceso más del 90% de la energía disponible por oxidación directa se transforma en CH₄, consumiéndose sólo un 10% de la energía en crecimiento bacteriano frente al 50% consumido en un sistema aeróbico [38]. De igual forma, la digestión anaerobia es de especial interés ya que se integra en estrategias experimentales bajo el concepto de biorrefinería, es decir, permite la obtención de productos de todas las etapas. La digestión anaerobia se realiza en cuatro etapas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis. En la figura 1.5 se observan los productos que a su vez pueden servir como reactivos para la etapa posterior [41].

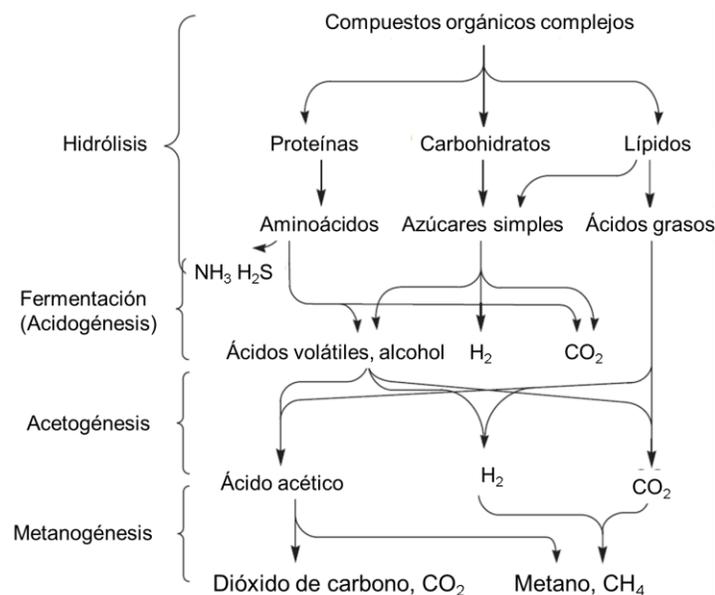


Figura 1.5 Digestión anaerobia, sus etapas y productos [39].

1.6.1 Potencial bioquímico de metano

El potencial bioquímico de metano, BMP por sus siglas en inglés, es una prueba a escala laboratorio para seleccionar y valorar la biomasa para su conversión a biogás (enriquecido en metano), es decir, proporciona información sobre cuánto y qué tan rápido el sustrato puede degradarse en condiciones controladas dentro de un reactor batch. Estos son parámetros valiosos en el diseño y operación de una planta escalada de digestión metanogénica. De igual forma, es una buena herramienta para identificar y desarrollar nuevos indicadores para la evaluación de posibles fuentes de materia prima [40]. En los ensayos BMP, eliminar el oxígeno es crucial para evitar la respiración aeróbica, la cual causa tanto la baja actividad de los

metanógenos como la pérdida del potencial de metano [41]. Un indicador sobre la eficacia del ensayo BMP es el índice de biodegradabilidad; BI por sus siglas en inglés. Se obtiene de la división del BMP experimental entre el potencial de biometano teórico (de aquí en adelante; BMPT), se puede expresar como un valor adimensional de 0 a 1 o como porcentaje de 0 a 100%, en cuanto BI se acerque a 1 o 100%, mayor es la eficacia de la digestión anaerobia en el BMP [42].

1.7 Producción de CH₄ a partir de macroalgas

La producción de CH₄ usando macroalgas como materia prima es amplia y se ha aplicado a diversas especies. En la tabla 1.2 se resume la información revisada de diversas fuentes, empezando con la especie de alga estudiada, el BMP de CH₄ (L/kgSV) y las condiciones usadas en el ensayo BMP. Se destaca la diversidad de rendimientos entre especies, así como, la metodología aplicada a los ensayos. De acuerdo a la literatura consultada el rendimiento de metano se encontró en un rango de 81.1 – 574 L/kgSV. Estos rendimientos corresponden a materia prima con reducción de tamaño de partícula y que puede estar o no estar lavada. Los ensayos BMP se aplican en un rango general de temperatura de 35 – 38 °C, exceptuando un caso a 53 °C. Así mismo, el tiempo estipulado para la digestión anaerobia varía ampliamente entre 14 y 60 días.

Tabla 1.3 Rendimiento de CH₄ a partir de diversas macroalgas.

Espece	Condiciones de muestra y operación BMP	BMP (LCH ₄ /kg SV)	Referencia
<i>Ulva sp.</i>	Muestra: lavada y macerada. BMP: 35 °C, 60 días	574	[43]
<i>G. vermiculophilla</i>	Muestra: marzo 2012. Lavada secada y triturada BMP: 37 °C, 28 días	349	[44]
<i>C. vinum</i>	Muestra: lavada y macerada BMP: 53 °C, 34 días	195	[45]
<i>U. vactuca</i>	Muestra: lavada y macerada BMP: 53 °C, 34 días	255	[45]
<i>S. vatissima</i>	Muestra: lavada y macerada BMP: 53 °C, 34 días	333	[45]
<i>Laminaria spp.</i>	Muestra: noviembre 2013, sin lavar, seca y triturada. Partícula de 1 mm BMP: 38 °C, 25 días	241	[46]
<i>F. vesiculosus</i>	Muestra: otoño 2014, lavada y macerada. Partícula menor a 5 mm BMP: 37 °C, 30 días	81.1	[47]
<i>Laminaria spp.</i>	Muestra: mayo 2014, sin lavar y triturada BMP: 38 °C, 14 días	240	[48]
<i>A. nodosum</i>	Muestra: agosto 2014, sin lavar y triturada BMP: 38 °C, 14 días	169	[48]

1.7.1 Producción de CH₄ a partir de sargazo

A partir de los AMS se incrementaron los esfuerzos por estudiar esta materia prima, por lo que, en la tabla 1.3 se resume la literatura encontrada al respecto (Características de la muestra, BMP, condiciones de ensayo BMP e índice de biodegradabilidad BI). Todos los estudios coinciden con aplicar un acondicionamiento previo a la biomasa, el cual consiste en lavado con agua y reducción del tamaño de partícula (triturado), por lo que algunos autores se refieren a este proceso como pretratamiento mecánico [5, 42]. El propósito del lavado es eliminar las impurezas del sargazo (arena, carbonatos, organismos muertos, etc.). Otro aspecto importante en la producción de CH₄ es la relación inóculo:sustrato (I:S). Si bien la relación predominante es 2:1 (g SV), se ha estudiado el efecto de variar este parámetro [49]. Así, mismo se ha estudiado el BMP en co-digestión con sustratos como residuo de aceite usado, desechos alimenticios y glicerol [50][27]. Los valores de BMP se encuentran por debajo de los alcanzados para otras macroalgas como; *Ulva sp.*, *G. vermiculophylla*, *S. vatissima*. [43, 44, 45], ya que los valores se encuentran entre un rango de 48.23 – 348 LCH₄/kg SV, mientras que el índice de biodegradabilidad del sargazo va desde 0.07 hasta 0.55.

Tabla 1.4 Rendimiento de CH₄ a partir de sargazo.

Muestra	Condiciones de operación BMP	BMP (LCH ₄ /kg SV)	BI	Ref.
Puerto Morelos (2020/2021)	40 °C; 30 días; I:S=2:1; espacio de cabeza: 110 mL	224.1	0.55	[42]
Lavada y secada. Partícula de 1 mm				
Playa del Carmen	35 °C; 46 días; I:S=2:1; espacio de cabeza: 173 mL	71.7	0.14	[51]
Lavada y secada. Partícula < 1 mm				
Cancún (junio, 2019)	37 °C; 39 días, muestreo cada 3er día; I:S=1:1.4	348	0.41	[49]
Lavada, secada y triturada				

Cancún (junio, 2019)				
Lavada, secada y triturada	37 °C; 39 días, muestreo cada 3er día; I:S=1:2.7	319	0.19	[49]
Cancún. (junio, 2019)				
Lavada, secada y triturada	37 °C; 39 días, muestreo cada 3er día; I:S=1:4.1	183	0.07	[49]
Portugal.	37 °C, 42 días			
Sin lavar	V _{trabajo} =50 mL	181.1	ND	[50]
Partícula <1 mm	25 mL _{inóculo} y 3.25 %ST _{sargazo}			
Portugal.	37 °C, 42 días			
Sin lavar	Co-digestión:	283	ND	[30]
Partícula <1mm	0.5%ST _{sargazo} y 3 g _{glicerol} /L			
Portugal.	37 °C, 42 días			
Sin lavar	Co-digestión: 1.31%ST _{sargazo} y 0.88 g _{GRAU} /L	265	ND	[50]
Partícula <1mm				
Barbados (junio, 2018)				
Lavada y triturada	35 °C, 21 días	48.23	ND	[27]
Partícula 0.5 – 1 mm	I:S= 4:1			
Barbados (junio, 2018)				
Lavada y triturada	35 °C, 21 días	41.84	ND	[69]
Partícula 0.5 – 1 mm	I:S= 4:1			
Progreso, Yuc. Mex. (2018)	38 °C, 29 días			
Lavada, secada	Espacio de cabeza: 60 mL	82.2	ND	[28]
	I:S= 2			

BI: índice de biodegradabilidad; Ref: Referencia; I:S: relación inóculo:sustrato; ND: No disponible

1.8 Pretratamientos aplicables al sorgo

La literatura respalda la aplicación de un proceso al sorgo previo a la digestión anaerobia el cual tiene como finalidad mejorar la producción de metano [27, 28, 42, 51]. A esta etapa se le denomina pretratamiento y es útil cuando se trabajan materiales lignocelulósicos, ya que en éstos los carbohidratos se encuentran recubiertos por lignina, la cual dificulta el desempeño de las bacterias para realizar la digestión anaerobia. En este sentido, el objetivo del pretratamiento es asegurar la accesibilidad de los carbohidratos hacia los microorganismos capaces de metabolizarlos [9]. Existen diversos tipos de pretratamientos, que se han aplicado al sorgo, en general se dividen en; físicos, químicos y biológicos [5]. En la tabla 1.5 se resumen algunos estudios de pretratamientos al sorgo.

Tabla 1.5 Pretratamientos aplicados al sorgo.

Muestra	Pretratamiento y condiciones	BMP (LCH ₄ /kgSV)	ΔBMP (%)	Ref.
Puerto Morelos (2020/2021)	Pretratamiento químico 10 g de sorgo con H ₂ O ₂ al 2.5%	230.82	+2.9%	[42]
Puerto Morelos (2020/2021)	Pretratamiento enzimático Suspensión de sorgo al 10% con EE de 7000U/g de actividad lacasa 40 °C, 150 rpm, 48 h	172.57	-23.0%	[42]
Puerto Morelos (2020/2021)	Pretratamiento químico – enzimático Condiciones previamente descritas	387.64	+72.9%	[42]
Playa del Carmen	Pretratamiento físico Dilución 1:1 en H ₂ O y molienda por 30s Mezcla filtrada con prensa y malla de nylon, tamaño de poro 150µm	83.45	+16.3%	[51]
Barbados (junio 2018)	Pretratamiento físico 140 °C y 30 min, factor de severidad: 2.65. Aplicado al sorgo	116.72	+26.3%	[64]

Progreso, Yuc. Mex. (2018)	Pretratamiento biológico			
	Fermentación sumergida con <i>T. hirsuta</i> Bm-2, 35 °C, 150 rpm y 6 días	104	+28.3%	[28]
Progreso, Yuc. Mex. (2018)	Pretratamiento enzimático			
	Extracto enzimático con 7000 U/g de actividad lacasa, 40 °C, 150 rpm y 24 h	86	+6.17	[28]

ΔBMP: aumento o disminución de BMP; Ref: referencia; EE: Extracto enzimático

1.9 Pretratamiento enzimático

Los pretratamientos enzimáticos son usados en biomasa lignocelulósica o amilolítica [25, 26, 28, 42, 52]. Si bien, existen diversos organismos capaces de producir las enzimas necesarias para aplicar estos pretratamientos (hongos, bacterias y plantas), la selección del pretratamiento adecuado depende del objetivo deseado en la producción de biocombustibles. En este caso, los carbohidratos del sargazo se encuentran embebidos en lignina, por lo que se propone el uso de enzimas lacasas. Con la finalidad de hacer accesibles los carbohidratos es necesario la producción de un extracto enzimático rico en actividad lacasa. Diversos factores en la aplicación de estos pretratamientos tales como la cantidad enzima (U/g) aplicada y el tiempo de reacción en el pretratamiento son un área de oportunidad ya que no existe un amplio registro de cómo estas variables tienen un efecto sobre el pretratamiento [28].

1.9.1 Enzima lacasa

Se ha reportado el uso de cepas fúngicas como *Trametes hirsuta* Bm-2, *Trametes hirsuta* Rt-1, *Trametes hirsuta* AHB-6, *Trametes versicolor*, *Pleurotus eryngii*, *Trametes villosa*, etc. [28, 42, 52, 53], éstos son hongos blancos capaces de producir enzimas lacasas. Dichas enzimas catalizan la oxidación de un amplio rango de compuestos fenólicos y aromáticos al remover electrones hasta que el oxígeno molecular es reducido a agua [53]. Las enzimas lacasas pertenecen a la familia de las oxidasas multi-cobre y actúan sobre monofenoles, difenoles, metoxifenoles, polifenoles, anilina, etc. Se pueden adicionar moléculas llamadas mediadores para ampliar este rango de acción [54, 55].

1.10 Metodología de Superficie de Respuesta

La metodología de superficie de respuesta o RSM por sus siglas en inglés permite establecer un diseño de experimentos que sea capaz de realizar las predicciones adecuadas de una respuesta;

es capaz de realizar ésto debido a que integra técnicas matemáticas y estadísticas. Permite identificar las condiciones óptimas en las variables de entrada del modelo que conducen a una respuesta máxima o mínima dentro de una región de interés. Los diseños SMR son útiles para encontrar las condiciones óptimas de un proceso, solucionar problemas de puntos débiles en procesos, hacer que un producto o proceso sea menos sensible a variables externas no controladas [56, 57].

1.10.1 Diseño compuesto central

El diseño compuesto central es la combinación de un diseño factorial fraccional con puntos centrales y un grupo de puntos de "estrella" (Figura 1.6), de esta manera, se puede estimar la curvatura de la superficie. La distancia desde el centro del espacio experimental haya un punto factorial es ± 1 para cada factor, la distancia desde el centro del espacio experimental hasta un punto estrella es $|\alpha| > 1$. Para el caso de 2 factores el valor de α la distancia axial es $\sqrt{2}$. Para 2 factores el diseño representa 8 puntos equitativamente espaciados en un círculo, más los puntos centrales.[57]

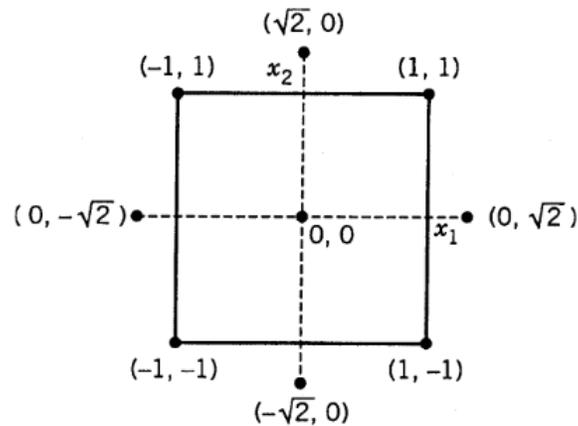


Figura 1.6 Diseño compuesto central para $k=2$ y $\alpha= \sqrt{2}$ [57].

1.11 Hipótesis

Los pretratamientos con extracto enzimático de *T. hirsuta* RT-1 causan modificaciones estructurales al sargazo facilitando la accesibilidad a los carbohidratos contenidos en el *Sargassum* spp; lo cual incrementa el potencial bioquímico de metano.

1.12 Objetivos

1.12.1 Objetivo general

Evaluar los pretratamientos enzimáticos con extracto de *Trametes hirsuta* RT-1 en la degradación de *Sargassum* spp. para la producción de metano.

1.12.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar estructuralmente la materia prima previo y después del pretratamiento.
2. Obtener extracto enzimático a partir de la cepa *T. hirsuta* RT-1 con actividad lacasa.
3. Diseñar una metodología de superficie de respuesta para la evaluación de los pretratamientos enzimáticos.
4. Determinar el potencial bioquímico de metano del *Sargassum* spp. pretratado.

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Estrategia experimental

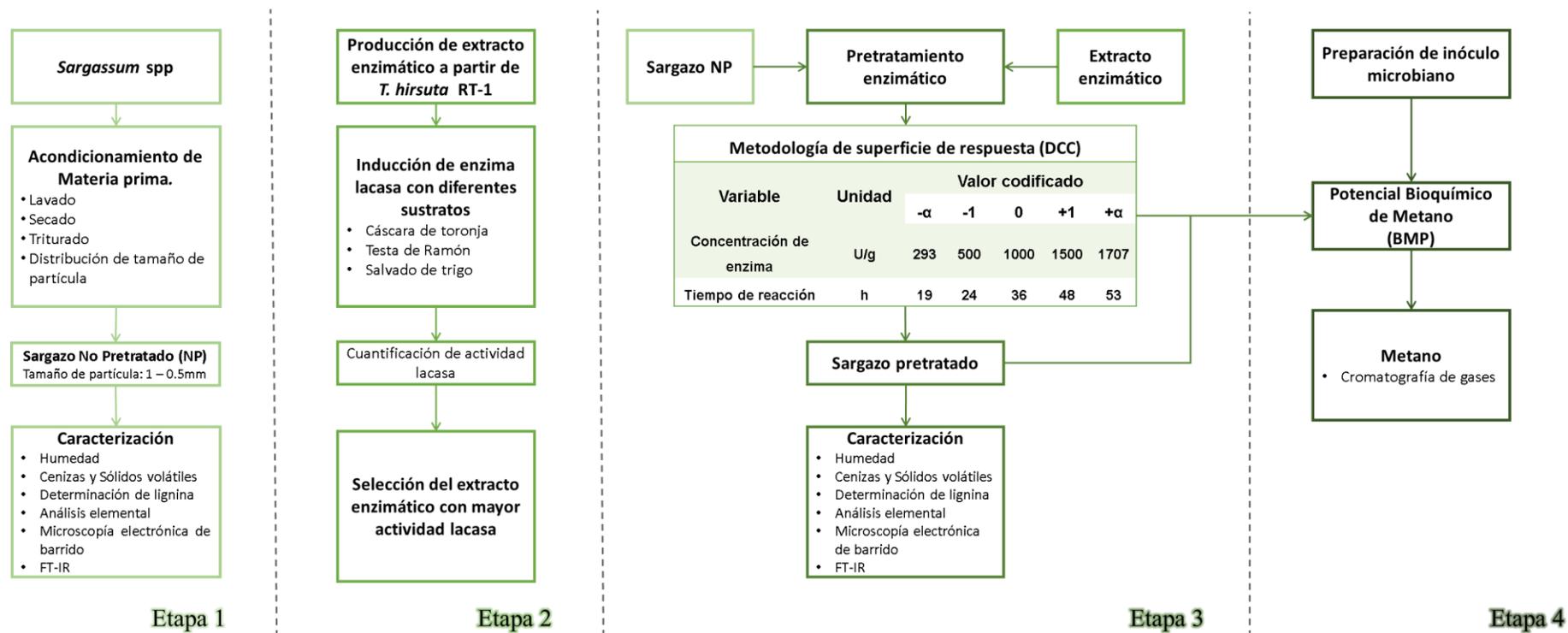


Figura 2. 1 Estrategia experimental

2.2 Acondicionamiento de la materia prima

2.2.1 Lavado

El sargazo a estudiar fue colectado en Puerto Morelos, Q. Roo, México, el 10 de octubre de 2021. Se tomó un 1 kg de sargazo y se realizaron 3 lavados por separado, cada uno con 6 L de agua en contenedores de 20 L. Se determinó la conductividad en el agua con un equipo HM (TDS-3). El cual usa como referencia de calibración la siguiente equivalencia 342 ppm= 0.5 µS [58]. Manualmente se retiraron pastos marinos y cualquier otro agente externo a la macroalga.

2.2.2 Secado, selección de tamaño de partícula

La materia prima se secó en exterior durante el día, 1 kg de sargazo fue repartido en tres bandejas de aluminio, posteriormente se usó un horno (Binder, Fed model 115[®] Tuttlingen, Alemania) a 70 °C durante 16 h. Se realizó una reducción de tamaño de partícula de forma manual y para su tamizaje se usó una torre de tamices en orden descendente: No. 10 (2 mm), No. 18 (1 mm), No. 35 (0.5 mm) y No. 50 (0.3 mm). Se seleccionó el tamaño partículas obtenidas en el tamiz No. 35 (0.5 mm) [28].

2.3 Caracterización de la materia prima

2.3.1 Determinación de humedad, sólidos totales, cenizas y sólidos volátiles

El porcentaje de sólidos totales (ST) y humedad (H) se determinó de acuerdo a la metodología del NREL (TP-510-42621). Se secaron crisoles en un horno (Binder, Fed model 115[®] Tuttlingen, Alemania) a 105 ± 3 °C durante un mínimo de cuatro horas, posteriormente se pesaron los crisoles en una balanza analítica (OHAUS, PA124C) y se registraron los pesos, se repitió este proceso hasta obtener peso constante. Se homogenizó la muestra a analizar y se pesó en el crisol a peso constante en una balanza con una precisión de al menos 0.1 mg. Después se colocó la muestra + crisol en el horno a 105 ± 3 °C durante cuatro horas, se repitió este proceso hasta obtener peso constante. El peso constante se define como un cambio de ± 0.1% en el porcentaje en peso de sólidos después de una hora de recalentamiento de la muestra. Se realizó por triplicado [59].

2.3.1.1 Cálculos para determinar el porcentaje de sólidos totales y humedad.

$$\%ST = \left(\frac{\text{peso de crisol seco con muestra seca} - \text{peso de crisol seco}}{\text{peso de muestra}} \right) \times 100 \quad (\text{Ecu. 1})$$

$$\%H = 100 - \left(\frac{\text{peso de crisol seco con muestra seca} - \text{peso de crisol seco}}{\text{peso de muestra}} \right) \times 100 \quad (\text{Ecu. 2})$$

El porcentaje de sólidos volátiles (SV) y cenizas se determinó de acuerdo a la metodología del NREL (TP-510-42622). Después de determinar ST y H; las muestras ingresaron a una mufla Vulcan 3-550. Se programó una rampa de temperatura de la siguiente manera [60]. La determinación de humedad, sólidos totales, sólidos volátiles y cenizas se realizó a la biomasa no pretratada y después de aplicarle los pretratamientos.

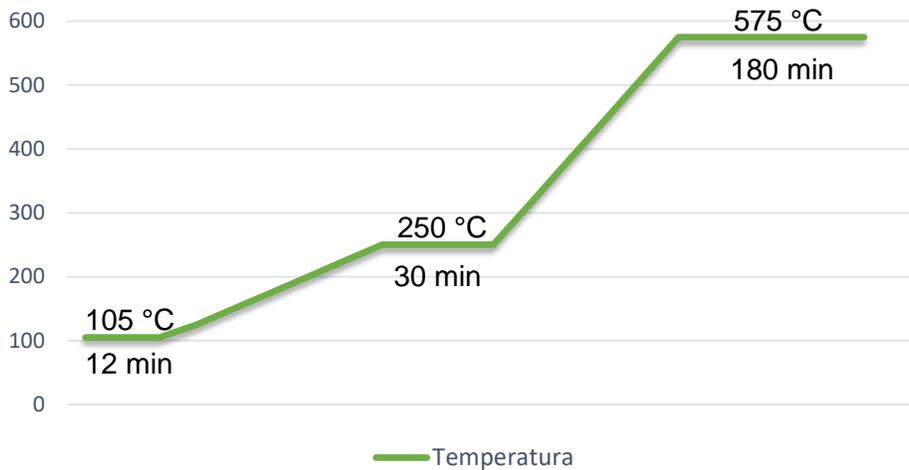


Figura 2.2 Rampa de temperatura para la terminación de SV.

2.3.1.2 Cálculos para determinar el porcentaje de cenizas.

Los resultados se reportaron en base seca (BS) por lo cual se calculó el peso seco en horno, utilizando la determinación de porcentaje de sólidos totales descrito previamente.

$$BS = \left(\frac{\text{peso de la muestra} \times \%ST}{100} \right) \quad (\text{Ecu. 3})$$

- Calcular el porcentaje de ceniza y sólidos volátiles.

$$\%cenizas = \left(\frac{\text{peso de crisol y ceniza de la muestra} - \text{peso del crisol}}{BS_{muestra}} \right) \times 100 \quad (\text{Ecu. 4})$$

$$\%SV = 100 - \left(\frac{\text{peso de crisol y ceniza de la muestra} - \text{peso del crisol}}{BS_{muestra}} \right) \times 100 \quad (\text{Ecu. 5})$$

2.3.1.3 Cálculos para reportar el porcentaje de sólidos totales, humedad y cenizas

- Diferencia porcentual relativa

$$RPD = \left(\frac{X_1 - X_2}{X_{Prom}} \right) \times 100 \quad (\text{Ecu. 6})$$

Donde:

X_1 y X_2 = valores medidos

X_{Prom} = media entre X_1 y X_2

- Calcular la media cuadrática (X_m):

$$X_m = \sqrt{\left(\frac{\sum_1^n x}{n} \right)^2} \quad (\text{Ecu. 7})$$

- Calcular la desviación estándar con la siguiente ecuación.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_1^n (X_i - X_m)^2}{n}} \quad (\text{Ecu. 8})$$

Donde:

X_m = Media cuadrática

n = número de muestras

X_i = valor de una medida

2.3.2 Determinación de lignina y holocelulosa

El porcentaje de lignina y holocelulosa se determinó de acuerdo a la metodología del NERL (TP-510-42618) con modificación. Se pesaron 500 mg de sargazo en una balanza analítica, se agregó la muestra a tubos de ensayo con capacidad de 20-25 ml, se realizaron muestras por triplicado. Se agregaron 5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 72% v/v a los tubos de ensayo, se agitaron a 200 rpm en un baño de agua a 35 °C durante 1 hora. La mezcla se trasladó a frascos de almacenamiento con tapa-rosca hermética. Las muestras se filtraron en un filtro Gooch con poro

de 15 μm a peso constante. La fracción sólida se lavó 3 veces consecutivamente con agua destilada, por último, se secaron los filtros con la fracción sólida en el horno a 60 °C por mínimo 8 horas hasta obtener peso constante. Se determinó el contenido de lignina a la biomasa no pretratada y después de los pretratamientos. Los cálculos para obtener el porcentaje de lignina son los siguientes [61]:

$$\%lignina = \left(\frac{\text{peso filtro y muestra seca} - \text{peso filtro}}{g \text{ muestra}} \right) \times 100 \quad (\text{Ecu. 9})$$

El porcentaje de holocelulosa se determinó al calcular la diferencia porcentual de lignina y cenizas de la muestra, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%holocelulosa = \text{muestra} - \%lignina - \%ceniza \quad (\text{Ecu. 10})$$

2.3.3 Análisis elemental CHNS-O

Se realizó el análisis elemental por combustión (Flash 2000[®] Thermo Scientific[®]). La muestra fue previamente triturada a un tamaño de partícula menor de 0.33 mm y secada a 70 °C durante 24 h. Se usaron 10 mg de pentóxido de vanadio V_2O_5 para la reducción de azufre, y se colocaron 4.8 mg de muestra dentro de un recipiente de estaño para el análisis elemental CHNS. La medición se hizo por duplicado [28]. El análisis elemental se realizó a la biomasa antes y después de los pretratamientos.

2.3.4 Análisis infrarrojo (FT-IR)

El análisis FT-IR se realizó en un espectrofotómetro FT-IR (Tensor II Milton, ON, Canadá). Las muestras se analizaron en platino reflexión total atenuada (RTA), el espectro obtenido fue en las longitudes de onda de 4000-500 $1/\text{cm}$ a una resolución de 4 cm^{-1} con 32 escáneres [28]. El análisis infrarrojo se realizó a la biomasa no pretratada y después de los pretratamientos.

2.3.5 Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido, SEM por sus siglas en inglés se realizó con un microscopio (SEM, JSM-6360L, JEOL, Tokio, Japón). Se tomaron 10 mg de muestra y se usó un estereoscopio (LEICA MZ6) para seleccionar el tejido a observar, posteriormente se secó a 70 °C durante 24 h. Las muestras fueron montadas en un cubo metálico con cinta adhesiva doble cara recubierta con una capa de 15 nm de oro. Se realizaron micrografías a 20 kV, con aumentos

x30, x170 y x1100 [28]. La microscopía electrónica de barrido se realizó a la biomasa no pretratada y después de los pretratamientos.

2.4 Producción de extracto enzimático

2.4.1 Cepa fúngica e inductores enzimáticos

En este estudio se utilizó el hongo *Trametes hirsuta* RT-1. El cual fue aislado de la planta *Acalypha gaumeri*, especie endémica del estado de Yucatán [52]. *T. hirsuta* RT-1 se mantiene en el banco de cepas de la Unidad de Energía Renovable del CICY. Este hongo fue utilizado para la producción de extracto enzimático (de aquí en adelante; EE) en medio de extracto de levadura, maltosa, peptona y glucosa (YMPG) suplementado con inductores enzimáticos con: salvado de trigo (de aquí en adelante; st), cáscara de toronja (de aquí en adelante; ct) y testa de ramón (de aquí en adelante; tr)

2.4.2 Extracto enzimático

La producción del EE se realizó según la metodología propuesta por de Zapata-Castillo et al. (2012) con modificaciones, las cuales se describen a continuación. El proceso se dividió en dos etapas, la primera consistió en el crecimiento del hongo *T. hirsuta* RT-1. en cajas Petri de Agar-Maltosa al 2%. Se incubó a 32 °C durante 9 días en una incubadora (Labnet, 211DS). Se realizaron dos subcultivos antes de preparar el medio líquido.

En la segunda etapa se prepararon tres matraces con medio YMPG el cual contiene: glucosa 10 g/L, extracto de maltosa 10 g/L, peptona 2 g/L, extracto de levadura 2 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, tiamina HCl 1 mg/L; adicionalmente se agregó uno de los inductores a cada matraz, en una proporción de 2% p/v obteniendo 3 matraces con las siguientes denominaciones: YMPGst, YMPGct y YMPGtr. Posteriormente se inoculó 1 disco de 1 cm de diámetro del hongo *T. hirsuta* RT-1 previamente crecido en cajas Petri, por cada 50 mL de medio YMPGst, YMPGct y YMPGtr. Los matraces se incubaron a 32 °C, 150 rpm durante 12 días en una incubadora (CORNING, LSE). Transcurrido el tiempo de crecimiento, el EE se filtró y se almacenó en frasco ámbar a 4 °C [53].

2.4.3 Cuantificación actividad lacasa

La cuantificación de actividad lacasa se realizó según la metodología descrita por Zapata-Castillo et al. (2012). Esta se basa en la oxidación del reactivo ácido ABTS (2,2'-azinobis [3-

etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]). En tubos de 2 mL de capacidad se realizó una mezcla de reacción que contiene: 700 μL de agua destilada, 100 μL de buffer de acetato de sodio a una concentración de 1 M y 100 μL de ABTS a una concentración de 5 mM. Se pre incubó dicha mezcla a 40 °C durante 5 min, transcurrido el tiempo se retiraron los tubos y se agregaron 100 μL de EE. Cabe destacar que se diluyó la muestra en una relación 1:100 y 1:500 según fue pertinente. El volumen final de reacción fue de 1 mL, este ingreso a incubación a 40 °C durante 20 min. La actividad lacasa se determinó en un Bioespectrómetro (Eppendorf) con las siguientes condiciones: 25 °C, 420 nm y con una cubeta desechable de rango visible de 1mm³. Se graficó el comportamiento de la actividad en U/mL vs tiempo. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que oxida 1 μmol de sustrato por minuto [53].

2.5 Pretratamiento enzimático

El pretratamiento enzimático se realizó según la metodología de Tapia-Tussel (2018) con modificaciones. El volumen de trabajo fue de 50 mL, con una carga de trabajo al 10% (p/v), se prepararon matraces con sargazo en una solución buffer de acetatos a pH 4.5, la temperatura fue de 40 °C y se agitaron a 150 rpm en una incubadora (CORNING, LSE) [28]. Posteriormente se recuperó la biomasa usando un filtro de celulosa para separar la fracción líquida; la fracción sólida ingresó a un horno (Binder, Fed model 115[®], Tuttlingen, Alemania) a 80 °C para su posterior almacenamiento. Se realizó el pretratamiento bajo la metodología de superficie de respuesta (por sus siglas en inglés, SMR) descrita en la sección 2.5.1. Se evaluaron 3 diferentes concentraciones de enzima y a 3 tiempos diferentes de reacción.

2.5.1 Metodología de Superficie de Respuesta-Diseño Compuesto Central

La evaluación del pretratamiento enzimático se llevó a cabo con la metodología de superficie de respuesta, se siguió la metodología descrita por Oliveira et al. (2015). El experimento fue bifactorial de 3 niveles; 3² por lo que se implementó un diseño compuesto central. Se evaluó el efecto de 2 factores numéricos, la concentración de extracto enzimático (X1) y el tiempo de reacción del pretratamiento (X2), la variable dependiente o respuesta esperada es el BMP (Y1) [50]. Los niveles a estudiar se especifican en la tabla 2.1, así como los valores reales y los valores codificados de las variables independientes con los respectivos niveles. En la tabla 2.2 se presentan las 11 corridas necesarias para modelar la superficie de respuesta. Los pretratamientos se realizaron por duplicado. El diseño compuesto central se corrió con la asistencia del software Statgraphics[®] [62].

Tabla 2.1 Diseño compuesto central.

Variable	Unidad	Valor codificado				
		$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Concentración de enzima	U/g	293	500	1000	1500	1707
Tiempo de reacción	h	19	24	36	48	53

α : puntos axiales de diseño compuesto central

Tabla 2.2 Diseño del experimento factorial y la variable de respuesta observada.

Pretratamiento	X1	Concentración enzimática [U/g]	X2	Tiempo [h]	Y1 [LCH ₄ /kgSV]
1	$-\alpha$	293	0	36	
2	-1	500	-1	24	
3	-1	500	+1	48	
4	0	1000	$-\alpha$	19	
5*	0	1000	0	36	
6*	0	1000	0	36	
7*	0	1000	0	36	
8	0	1000	$+\alpha$	53	
9	+1	1500	-1	24	
10	+1	1500	+1	48	
11	$+\alpha$	1707	0	36	

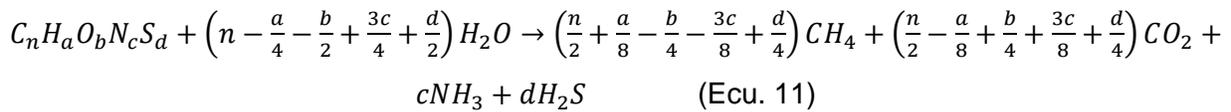
X1 y X2: variables independientes; Y1: variable de respuesta; 5*: punto central; 6* punto central; 7*: punto central

2.6 Ensayo potencial bioquímico de metano (BMP)

El potencial bioquímico de metano se determinó según la metodología descrita por Valero et al (2015); Se utilizaron frascos serológicos de 250 mL con tapones de goma para el septum, con un volumen útil de 150 mL y un volumen de espacio de cabeza de 100 mL. El inóculo consistió en un consorcio microbiano mixto nativo que contiene 30 g/L de tierra profunda, 300 g/L de estiércol de ganado, 150 g/L de estiércol de cerdo, 1.5 g/L de Na₂CO₃ comercial, 5 g/L de azúcar y 1 L de agua. El inóculo se desgasificó durante cinco días a 38 °C. La relación inóculo/sustrato fue de 2.05 gSV inóculo/ gSV de sustrato. Posteriormente, los frascos se llenaron con agua destilada hasta 150 mL. Se inyectó nitrógeno para desplazar el aire en el espacio superior durante 1 min y se incubaron a 38 °C, durante un período de 26 días. La producción de biogás se midió por el aumento de presión en el volumen del espacio superior. Después de cada medición, los reactores se desfogaron hasta que se alcance la presión atmosférica en el frasco [63].

2.6.1 Potencial bioquímico de metano teórico (BMPT)

El BMPT se determinó de acuerdo a la metodología descrita por Thompson *et al.* (2020). Se calculó de acuerdo a la ecuación de Buswell y Boyle [64], tal como se describe a continuación.



$$BMPT \left(L CH_4 \frac{Kg}{SV} \right) = \frac{22.4 \times \left(\frac{n}{2} + \frac{a}{8} - \frac{b}{4} - \frac{3c}{8} + \frac{d}{4} \right)}{12n+a+16b+14c+32d} \quad (\text{Ecu. 12})$$

El índice de biodegradabilidad, BI por sus siglas en inglés; fue calculado al estimar la eficiencia de la digestión anaerobia. Se calculó como el porcentaje del BMPT alcanzado por el sustrato al final del periodo de digestión anaerobia. De acuerdo a la siguiente ecuación.

$$BI (\%) = \frac{BMP}{BMPT} \times 100 \quad (\text{Ecu. 13})$$

2.7 Caracterización de metano en biogás

2.7.1 Presión manométrica

La presión manométrica se midió en el espacio de cabeza de los reactores a través del tapón con una jeringa conectada a un transductor de presión digital con celda de medición de silicio (ifm, Alemania-tipo PN2596, hasta 2000 mbar) [63].

2.7.2 Determinación de metano

Las muestras de metano se tomaron a través del tapón con una jeringa. La concentración de CH₄ se midió en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer con una columna Elite-GC GS MOLESIEVE de 30 m de longitud y un diámetro interno de 0.53 mm. Las temperaturas del inyector, horno y detector se configuraron a 150 °C, 60 °C y 200 °C respectivamente. Se usó nitrógeno como gas portador. Los volúmenes de metano se expresan a 100 °C y 1 atm [63].

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Acondicionamiento de la materia prima

3.1.1 Lavado de sargazo

Durante el proceso de lavado a la biomasa colectada en 2 sitios diferentes: antes de barrera (3.903 kg) y después de barrera (4.501 kg); se retiraron 71 g de impurezas al sargazo colectado antes de barrera y 88 g de impurezas al sargazo colectado después de barrera, siendo las principales impurezas encontradas en esta biomasa: pastos marinos, arena y un alga de la especie *Turbinaria turbinata* (Figura 3.1). Es importante señalar que en la biomasa de sargazo pelágico se encontraron diversas especies marinas lo que indica que esta macroalga sirve como un micro ecosistema para este tipo de especies (figura 3.2).



Figura 3.1 Impurezas retiradas del sargazo: a) pastos marinos; b) Arena y c) Alga *Turbinaria turbinata*.



Figura 3.2 Especies marinas retiradas del sargazo.

En la tabla 3.1 se presenta el comportamiento de la conductividad del agua durante el proceso de lavado, la conductividad promedio encontrada en el primer lavado fue de $167.22 \times 10^3 \mu\text{S}$, mientras que en el tercer lavado se obtuvo una media de $109.60 \mu\text{S}$ este valor se puede considerar bajo ya que es 3 órdenes de magnitud menor a la conductividad en el agua del primer lavado.

Tabla 3.1 Evaluación de la conductividad durante el proceso de lavado.

Muestra	Peso muestra [kg]	Conductividad [μS] lavado 1	Conductividad [μS] lavado 2	Conductividad [μS] lavado 3	Punto de colecta
M1A	1	135.50×10^3	50.50×10^3	106.50	Antes de barrera
M2A	1	169.50×10^3	47.35×10^3	97.50	
M3A	1	163.50×10^3	59.50×10^3	121.00	
M4A	0.832	174.50×10^3	45.00×10^3	89.00	
M1D	1	158.50×10^3	48.45×10^3	106.00	Después de barrera
M2D	1	182.00×10^3	52.50×10^3	112.50	
M3D	1	182.00×10^3	59.50×10^3	130.00	
M4D	1	182.50×10^3	54.50×10^3	112.50	
M5D	0.413	157.00×10^3	53.50×10^3	111.50	
Media	0.916	167.22×10^3	52.31×10^3	109.60	

μS : Micro siemens

Los resultados del tercer lavado sugieren una disminución en el contenido de sales presentes en el sargazo, Milledge *et al.* (2019) menciona que un alto contenido de sal (conductividades altas) pueden inhibir la digestión anaerobia debido a una acumulación de la presión osmótica y deshidratación de microorganismos metanogénicos [65]. Esto se sustenta con lo reportado por Suhartini *et al.* (2020), donde se estudió el efecto del lavado de la macroalga *Gracilaria verrucosa* en el potencial bioquímico de metano. El autor reporta un BMP de $0.018 \text{ LCH}_4/\text{kg SV}$ cuando el alga no es lavada, mientras que al realizar un proceso de lavado previo a los ensayos BMP se

obtuvieron 0.108 LCH₄/kg SV [66], esto sugiere que en el primer caso los microorganismos requirieron más tiempo de adaptación, lo que indicaría una inhibición en la digestión anaerobia.

De acuerdo a los resultados obtenidos, valores de conductividad superiores a 52.31x10³ μS (conductividad en el segundo lavado) podrían inhibir el proceso de digestión anaerobia para la generación de gas metano, mientras que valores alrededor de 109 μS o menores se podrían considerar adecuados para el manejo de macroalgas en dicho proceso.

El sargazo previamente lavado (8.245 kg) se secó al sol en una cama de secado, se obtuvieron 914 g de biomasa seca, lo que corrobora que alrededor del 88% de su peso es agua. Esto coincide con lo reportado por Olgúin-Maciel *et al.* para sargazo colectado en el año 2020 en Puerto Morelos donde encontró que un 86% del peso del sargazo es agua [31]. La biomasa fue triturada y tamizada en una torre de tamiz y se seleccionó para este estudio el tamaño de partícula de 0.5 a 1 mm que representó el 41 % de la biomasa seca.

3.2 Caracterización de la materia prima

3.2.1 Determinación de humedad, sólidos totales, cenizas y sólidos volátiles

Conocer el contenido de sólidos volátiles del sargazo es importante ya que el rendimiento de metano se calcula de acuerdo a los gramos añadidos de sólidos volátiles. En la tabla 3.2 se muestran los porcentajes de sólidos totales (ST) y sólidos volátiles (SV) del sargazo no pretratado (NP), los cuales fueron de 89.01% y 81.85% respectivamente. El contenido de sólidos volátiles se encuentra dentro del rango reportado por diversos autores, tales como: Chikani-Cabrera *et al.* (2022) [42]; Azcorra-May *et al.* (2022) [32] y Paredes *et al.* (2023) [35], donde reportan valores de 77.78 %, 78.87 % y 81.6 % respectivamente en muestras colectadas en Puerto Morelos durante el 2019 y 2021. A diferencia de las muestras colectadas en diversas regiones del caribe donde se hace evidente la variación en el contenido de sólidos volátiles, Thompson *et al.* 2020 reportan 37.84%, SV en muestras de sargazo colectadas en Barbados [27], mientras que Salgado-Hernández *et al.* 2023 reportan 13.2 % de SV en la biomasa de Sargazo colectada en Playa del Carmen [67]. Aparicio *et al.* (2020) señalaron que estas y otras variaciones en la composición bioquímica del sargazo pueden estar relacionadas a la temporalidad de su reproducción y a las diferentes condiciones climáticas y de localización geográfica de cada muestra [34].

Tabla 3.2 Análisis proximal.

Muestra	Humedad	ST	SD	Cenizas	SV	SD	SV/ST
Sargazo no pretratado (NP)	10.99 %	89.01%	0.0011	18.15%	81.85%	0.0012	0.91
Inóculo	NA	61.82 g/L	2.7183	23.23 g/L	38.57 g/L	2.3756	0.62

ST: sólidos totales; SV: sólidos volátiles; SV/ST: relación de sólidos volátiles entre sólidos totales; SD: desviación estándar y NA: No aplica.

La relación de SV/ST obtenida en este estudio (0.91), coincide con la reportada por Chikani-Cabrera *et al.* (2022) y Paredes *et al.* (2023), donde obtuvieron valores de 0.89 y 0.92 respectivamente [35, 42]. Estos valores se encuentran en los rangos reportado por Pacheco *et al.* (2022) (0.86-0.96) en la producción de metano a partir de desechos urbanos [68].

3.2.2 Análisis elemental

El análisis elemental (C, H, O, N, S) del sargazo NP se muestra en la tabla 3.3. El contenido de carbono es de 35.79% y el contenido de nitrógeno es de 0.61%; lo que coincide con los datos encontrados por Azcorra-May (2023, en proceso) en el grupo de trabajo donde el porcentaje de carbono y nitrógeno fue de 34.8% y 0.73 respectivamente para sargazo colectado durante el 2022 en Puerto Morelos [69]. En cambio, autores como Chikani-Cabrera *et al.* (2022) y Thompson *et al.* (2020) que reportaron un contenido de carbono de 33.84% y 27.50% respectivamente y un contenido de nitrógeno de 1.39% y 1.21% respectivamente en sargazo colectado los años 2020-2021, esto indica que el contenido elemental varía según el sitio y año de colecta del sargazo [42, 69].

Tabla 3.3 Análisis elemental del sargazo en diferentes años y sitios de colecta.

Ubicación y año de colecta de sargazo	C [%]	H [%]	O [%]	N [%]	S [%]	C/N	Ref.
Puerto Morelos 2021	35.79±0.19	4.92±0.10	39.44	0.61±0.02	1.09±0.01	58.67	Este trabajo
Puerto Morelos 2022	34.8±0.02	4.81±0.01	ND	0.73±0.01	1.08±0.03	47.67	[69]
Puerto Morelos 2021	33.84±1.05	4.71±0.22	36.62	1.39±1.39	1.21±0.22	24.26	[42]
Barbados 2020	27.50±0.65	4.16±0.30	34.49	1.21±0.06	0.82±0.22	21.67	[64]

C/N: relación carbono/nitrógeno; ND: no disponible; Ref: referencia

El sargazo NP tiene una relación C/N de 58.67 lo cual es mayor a lo reportado por Chikani-Cabrera *et al.* (2022), Thompson *et al.* (2020) y Azcorra-May (2023 en proceso) donde encuentran valores de 24.26, 21.67 y 47.67 respectivamente. La relación C/N encontrada está por encima del rango ideal para digestión anaerobia el cual es de 20-30:1 [69], lo que puede influir en el comportamiento de las bacterias metanogénicas.

3.2.3 Determinación de lignina

En la figura 3.3 se muestra el contenido proximal del sargazo NP. Usando los métodos TP-510-42618 y TP-510-42622 propuestos por el NREL. Se cuantificó 27.41% de lignina y 18.15% de ceniza respectivamente, por lo tanto, se estimó un contenido de holocelulosa de 54.44% en el sargazo no pretratado.

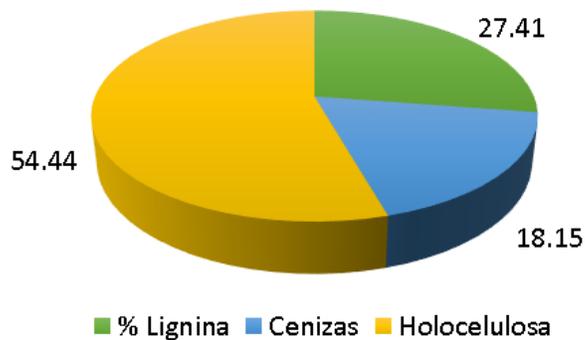


Figura 3.3 Caracterización del sargazo NP

En la tabla 3.4 se observa que el porcentaje de lignina del sargazo NP se encuentra dentro del rango de 20% hasta 32% reportado por diversos autores. Estos valores corresponden a sargazo colectado en Puerto Morelos, durante los años 2019 y 2020. Es importante señalar que el rango de 12% se puede deber a que la biomasa se encuentra sometida a un estrés abiótico (altas temperaturas, luz UV, presencia de metales) el cual puede impactar en la variación del contenido de lignina de esta macroalga durante su recorrido [34], además, el contenido varía en dependencia de la presencia de las especies *S. fluitans* y *S. natans* en el sargazo, ya que Álzate-Gaviria *et al.* (2020) reportaron diferencias en el porcentaje de lignina a nivel especie [33].

Tabla 3.4 Porcentaje de lignina y holocelulosa en Sargazo.

Muestra	Lignina [%]	Holocelulosa [%]	Referencia
Puerto Morelos (2021)	27.41 ± 0.15	54.44	Este trabajo
Puerto Morelos (2019) sin lavar	22 ± 3.87	58.70	[35]
Puerto Morelos (2019)	20 ± 2.12	61.60	[35]
Puerto Morelos (2020)	31.96 ± 0.54	45.41	[31]
Puerto Morelos (2020)	29.52 ± 0.18	49.35	[32]
<i>S. natans</i> Puerto Morelos (2019)	29.50 ± 2.35	45.39	[33]
<i>S. fluitans</i> Puerto Morelos (2019)	25.40 ± 1.30	34.43	[33]
Puerto Morelos 2019	26.46 ± 0.31	53.27	[34]

El porcentaje de holocelulosa (54.44%) es comparable con el estudio realizado por Aparicio *et al.* (2021) donde se estima un contenido de 53.27% [34], diversos autores estiman un contenido por debajo de 50% [31,32,33] a diferencia de lo reportado por Paredes-Camacho *et al.* (2023) donde para sargazo sin lavar y sargazo lavado el contenido de holocelulosa es de 58.70 y 61.60% respectivamente [35]. El sitio y años de colecta de estos valores se especifican en la tabla 3.4.

3.2.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En las micrográficas realizadas al sargazo NP se observa el “tallo” a una escala de 500 µm (Fig. 3.4 a), su magnificación a X1,100 (Fig. 3.4 b) permite ver una superficie compacta del tejido que le confiere rigidez y recalcitrancia a los pretratamientos de esta biomasa. De igual forma, se puede observar la presencia de partículas adyacentes al “tallo” que pueden ser residuos de sales, carbonatos o arena, esto coincide con lo reportado por Tapia-Tussell *et al.* (2019) para macroalgas presentes en el golfo de México [28].

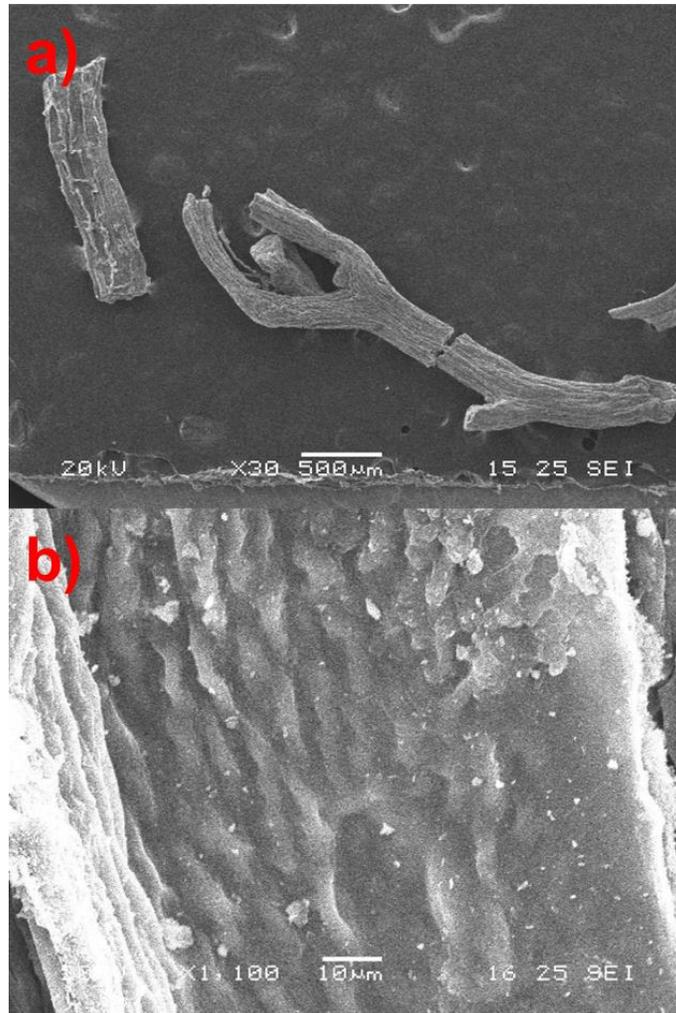


Figura 3.4 a) Micrografía del “tallo” de sargazo b) Magnificación a X1,100

3.3 Producción de extracto enzimático a partir de *Trametes hirsuta* RT-1

Se evaluaron 3 inductores para la producción del extracto enzimático de lacasa. En la figura 3.5 se observa el comportamiento de la actividad enzimática en los medios YMPG suplementados con salvado de trigo (st), cáscara de toronja (ct) y testa de ramón (tr) como inductores enzimáticos por un tiempo de 12 días. Se observa que la actividad enzimática en los tres medios aumenta de manera significativa a partir del día 5, este aumento coincide con lo reportado por Garza (2021) usando el hongo *T. hirsuta* RT-1 en medio de harina de *Brosimum alicastrum* (árbol de Ramón) a una temperatura de 32 °C [69].

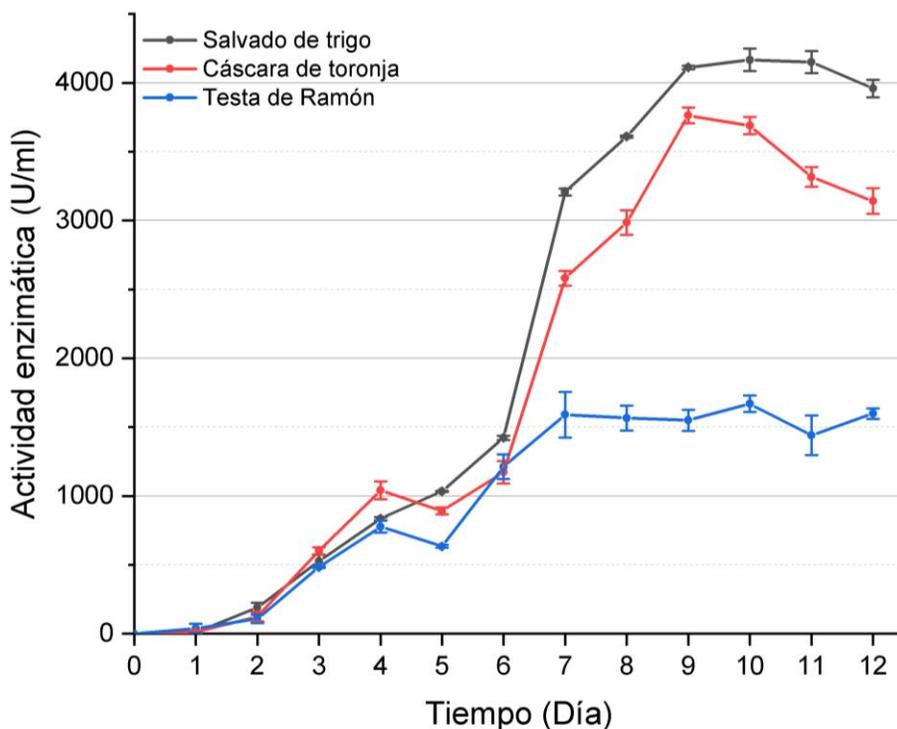


Figura 3.5 Comportamiento de la actividad lacasa con inductores st, ct y tr.

El incremento en la actividad enzimática está relacionado con la concentración de compuestos fenólicos en el medio, ya que estos actúan como inductores para la síntesis de lacasa en *T. hirsuta* [69]. El salvado de trigo y la cáscara de toronja son materiales lignocelulósicos que se usan como inductores en la producción de la enzima lacasa [53, 54, 55, 71] ya que contienen fenoles procedentes de la lignina, algunos como; ácido gálico, ácido vanílico y ácido *p*-cumárico pueden estar presentes en la testa de la semilla del árbol de ramón [38, 70]. Sin embargo, no existen reportes sobre el uso de la testa de Ramón como inductor en la producción de extracto enzimático rico en la enzima lacasa, por lo que este sería el primer estudio del uso de esta biomasa.

En todos los medios se alcanzaron las máximas actividades enzimáticas los días 9 y 10. Destacando que los medios suplementados con salvado de trigo y cáscara de toronja duplican el valor de la actividad enzimática (4166 U/mL y 3762 U/mL) respecto al enriquecido con testa de Ramón donde solo se alcanzó una actividad de 1669 U/mL (Fig. 3.5), dicho valor coincide con lo reportado por Chablé (2022) donde reporta una actividad de 1915 U/mL de lacasa utilizando un medio lignocelulósico (residuos de piña) con la cepa del hongo *T. hirsuta* (RT-1). Teniendo en

cuenta estos resultados y siguiendo la metodología propuesta, se decidió implementar el extracto enzimático producido en medio YMPG suplementado con salvado de trigo.

Diversos autores también han estudiado el comportamiento de la actividad enzimática lacasa a partir de la cepa Bm-2 del hongo *T. hirsuta*, por ejemplo, Zapata-Castillo *et al.* (2012) reportó que en un medio basal (buffer de fosfato 60 mM y pH 6) inducido con 2% p/v de salvado de trigo se alcanzó una actividad máxima de 3496 U/mL en un tiempo de 4 días [53]; Tapia-Tussell *et al.* (2020) usando un medio Rodríguez-Couto adicionado con 3% p/v de cáscara de toronja; cuantificó una actividad máxima de 4500 U/mL en el día 4 [70].

3.4 Pretratamientos enzimáticos

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en el diseño compuesto central para la evaluación de los pretratamientos, cabe mencionar que la variable de respuesta (Y1) es el BMP obtenido de cada pretratamiento; los resultados de BMP se presentan en la sección 3.3.2.

3.4.1 Diseño compuesto central

Con la finalidad de obtener todos los datos necesarios para el diseño compuesto central (DCC), se llevaron a cabo los ensayos BMP, usando el sargazo pretratado como sustrato. Los resultados obtenidos de rendimiento de metano (LCH₄/kg SV) se muestran en la tabla 3.5. En primera instancia se puede inferir un comportamiento lineal de la variable de respuesta respecto a las variables de entrada. Sin embargo, realizar el análisis de superficie de respuesta proporciona mayor certeza para conocer si la región estudiada es de carácter lineal o cuadrática.

Tabla 3.5 Diseño compuesto central con variables dependientes e independiente.

Pretratamiento	X ₁	C. Enzimática [U/g]	X ₂	Tiempo [h]	Y ₁ (BMP) [LCH ₄ /kgSV]
1	-α	293	0	36	84.55
2	-1	500	-1	24	85.21
3	-1	500	+1	48	94.76
4	0	1000	-α	19	89.44
PC	0	1000	0	36	98.75

8	0	1000	+α	53	101.76
9	+1	1500	-1	24	103.03
10	+1	1500	+1	48	111.57
11	+α	1707	0	36	109.03

X1, X2: variables independientes codificadas; C. Enzimática: concentración enzimática y Y1: Variable independiente (potencial bioquímico de metano)

3.5 Caracterización de sargazo después de pretratamientos

3.5.1 Determinación de humedad, sólidos totales, cenizas y sólidos volátiles

En la tabla 3.6 se observa la variación en el sargazo del contenido de humedad, sólidos totales, cenizas y sólidos volátiles después de aplicar los pretratamientos. El contenido de humedad disminuyó a porcentajes entre 3.21% y 5.42% respecto al sargazo NP, mientras que los sólidos volátiles se mantuvieron alrededor de 81% (79.65%-82.43%) lo que no representa un cambio significativo respecto al sargazo NP. Sin embargo, la relación SV/ST cayó a valores de 0.82-0.87 debido a la disminución en el contenido de humedad de las muestras pretratadas. Cabe destacar que la relación SV/ST después de los pretratamientos continúa dentro de lo reportado por autores como Chikani-Cabrera *et al.* (2022) y Paredes *et al.* (2023) 0.89 y 0.92 respectivamente, para sargazo colectado de Puerto Morelos [35, 42].

Tabla 3.6 Contenido de humedad, sólidos totales, cenizas y sólidos volátiles después de pretratamientos.

P	C. Enzimática [U/g]	Tiempo [h]	Humedad [%]	ST [%]	SD	Cenizas [%]	SV [%]	SD	SV/ST
NP	NA	NA	10.99	89.01	0.0011	18.15	81.85	0.0012	0.91
1	293	36	4.98	95.02	0.0009	19.16	80.84	0.0021	0.85
2	500	24	5.25	94.75	0.0266	17.57	82.43	0.0146	0.87
3	500	48	5.09	94.91	0.0016	18.65	81.35	0.0004	0.85
4	1000	19	5.23	94.77	0.0315	19.22	80.78	0.0005	0.85

PC	1000	36	5.42	94.57	0.0099	18.37	81.63	0.0054	0.86
8	1000	53	3.21	96.79	0.0020	20.35	79.65	0.0025	0.82
9	1500	24	3.95	96.05	0.0007	18.56	81.44	0.0005	0.84
10	1500	48	5.71	94.29	0.0010	17.84	82.16	0.0061	0.87
11	1707	36	4.34	95.66	0.0006	17.84	82.16	0.0066	0.86

P: pretratamiento; ST: sólidos totales; SV: sólidos volátiles; SV/ST: relación sólidos volátiles: sólidos totales; SD: desviación estándar; NP: no pretratado; NA: no aplica y PC: punto central

3.5.2 Análisis elemental

En la figura 3.6 se observa la variación porcentual del contenido elemental del sargazo después de ser pretratado. Sí bien, el contenido elemental después de aplicar los pretratamientos no varió significativamente respecto al sargazo no pretratado; los pretratamientos que presentaron un mayor cambio en el porcentaje de carbono y nitrógeno fueron los: 4 (1000 U/g y 19 h), 8 (1000 U/g y 53 h), 10 (1500 U/g y 48 h) y 11 (1707 U/g y 36 h). Por lo tanto, la relación C/N en estos pretratamientos fue de 48.58, 52, 50.29 y 50.10, respectivamente, esto representa una disminución respecto al sargazo NP donde se obtuvo una relación C/N de 58.67.

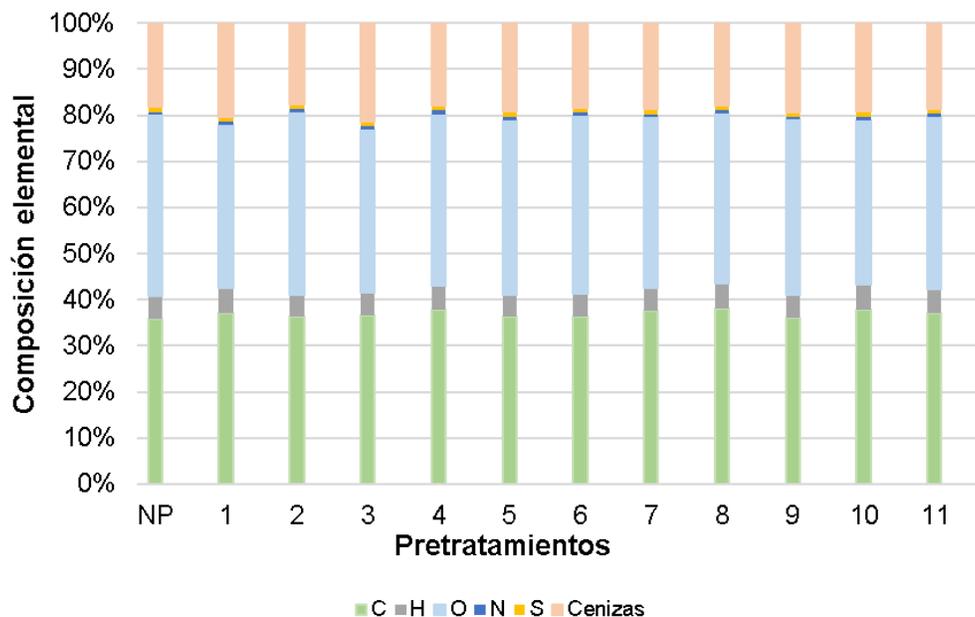


Figura 3.6 Contenido elemental en sargazo NP y después de pretratamientos.

Es importante resaltar el contenido de azufre en el sargazo. Al realizar el análisis elemental a la biomasa no pretratada se obtuvo un 1.09% de azufre, mientras que posterior al pretratamiento el contenido de azufre estuvo en un rango de 1.09-1.15%. Estos valores se encuentran dentro del rango reportado por Chikani *et al.* (2022) y Azcorra-May *et al.* (2022) donde en biomasa colectada de Puerto Morelos en los años 2019-2021 se obtuvo un contenido de azufre de 1.21 y 0.98%, respectivamente [32, 42]. En contraste, autores como Thompson *et al.* (2020), Milledge *et al.* (2020) y Salgado-Hernández *et al.* (2022) reportaron contenidos menores a los obtenidos en la presente tesis, los valores fueron de 0.82 (Barbados), 0.21 (Islas turcas y caicos) y 0.36% (Playa del Carmen), respectivamente. Esta biomasa se colectó en el caribe de diferentes sitios y años de muestreo [51, 64, 73].

3.5.3 Determinación de lignina y holocelulosa

Los pretratamientos enzimáticos no resultaron en una deslignificación significativa de la biomasa, ya que no se observó una diferencia relevante en el contenido de lignina después de los pretratamientos. Pues bien, en los pretratamientos 11 (1707 U/g y 36 h) y 9 (1500 U/g y 24 h) se encontró un contenido de lignina de 27.22 ± 0.44 y $27.32 \pm 0.05\%$ respectivamente, siendo estos dos los únicos donde el porcentaje de lignina se redujo, lo que equivale a una disminución de 0.19% y 0.09% respecto al sargazo NP.

Este comportamiento coincide con lo reportado por Azcorra (2021) quien aplicó pretratamientos enzimáticos a sargazo (Puerto Morelos, 2020), donde no se observó diferencia en la deslignificación de la biomasa al comparar los pretratamientos con: extracto enzimático rico en lacasa, lacasa reactiva, extracto enzimático más mediador y lacasa reactiva más mediador. Sin embargo, el contenido de carbohidratos cuantificados mediante HPLC después de estos pretratamientos fue significativamente mayor en comparación con pretratamientos químicos de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) también llevados a cabo por la autora [71].

Tabla 3.7 Porcentaje de lignina y holocelulosa después de pretratamientos.

Pretratamiento	Concentración enzimática [U/g]	Tiempo [h]	Lignina [%]	SD	Holocelulosa [%]
NP	NA	NA	27.41	0.1554	54.44
1	293	36	27.68	0.1414	53.16

2	500	24	27.52	0.0205	54.90
3	500	48	27.52	0.0773	53.83
4	1000	19	27.90	0.8724	52.87
PC	1000	36	27.91	0.8891	53.72
8	1000	53	27.91	0.3817	51.74
9	1500	24	27.32	0.0540	54.12
10	1500	48	27.77	0.2417	54.38
11	1707	36	27.23	0.4422	54.93

C. Enzimática: Concentración enzimática y SD: Desviación estándar; NA: No aplica

El contenido de holocelulosa va desde 51.74% hasta 54.93%, de modo que, en los pretratamientos 2 (500 U/g y 24 h) y 11 (1707 U/g y 36 h) se obtuvo: 54.90 y 54.93% respectivamente, siendo los únicos dos pretratamientos en donde el contenido aumentó respecto al sargazo no pretratado, no obstante, el menor contenido de holocelulosa se obtuvo después de aplicar los pretratamientos 4 (1000 U/g y 19 h) y 8 (1000 U/g y 53 h) donde se estimó 52.87 y 51.74% respectivamente. Es importante señalar que el contenido de holocelulosa se calcula a partir del contenido de cenizas y lignina.

3.5.4 Análisis infrarrojo (FT-IR)

Se llevó a cabo una espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier para visualizar el efecto del pretratamiento enzimático. El espectro de absorción (Fig. 3.7) está dentro del rango de 500-5000 cm^{-1} y muestra picos similares entre el sargazo no pretratado (Sargazo NP 2021, curva roja) y el pretratamiento 10 (1500 U/g y 48 h, curva azul). Las bandas pronunciadas en 3325 cm^{-1} y 1407 cm^{-1} corresponden a las vibraciones de los enlaces O-H, característica presente en los grupos hidroxilo de diversos compuestos como celulosa, hemicelulosa y lignina [69]. Los picos observados en 2986-2900 cm^{-1} muestran el estiramiento de los enlaces C-H, asociados a diversos polisacáridos como celulosa, hemicelulosa y alginato [71], así como, vibraciones por estiramiento de los enlaces N-H en compuestos alifáticos. Las dos bandas intensas en 1606 cm^{-1} y 1407 cm^{-1} representan el estiramiento de los enlaces C=C y sugieren la presencia de lignina y compuestos aromáticos [32]. La banda alrededor de 1230-1250 cm^{-1} es atribuible a los grupos ésteres sulfatados (S=O) y al estiramiento de enlaces C-O en fenoles [32, 74]. El pico en 1055 cm^{-1} indica

las vibraciones por estiramiento de los enlaces C-O-C en los xilanos asociados a la hemicelulosa y a las vibraciones de los enlaces C-N de aminas alifáticas en proteína [32, 69]. El pico en 822 cm^{-1} muestra las vibraciones en los enlaces C-H fuera del plano en la unidad p-hidroxifenilo asociados a anillos aromáticos [69, 72]. El espectro FT-IR del sargazo NP es similar a lo reportado por Thompson *et al.* (2020) y Azcorra-May *et al.* (2022) para biomasa de sargazo procedente de Barbados (2018) y Puerto Morelos (2020) respectivamente.

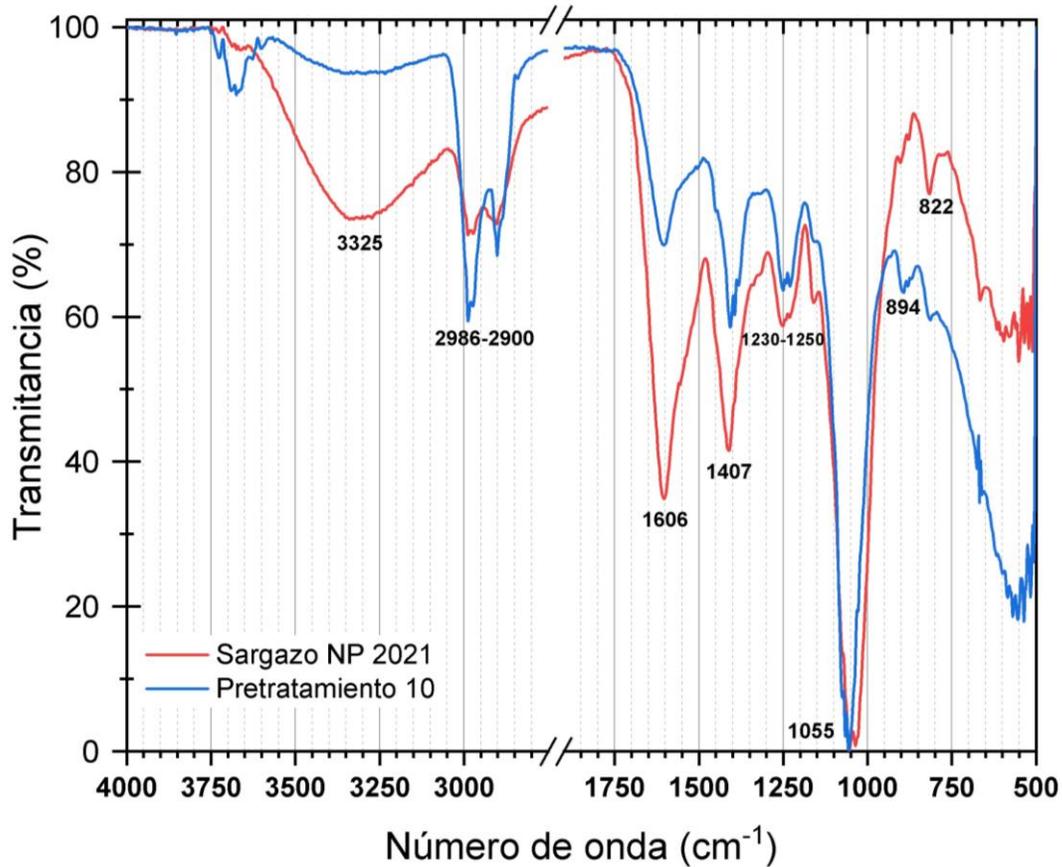


Figura 3.7 Espectro FT-IR del sargazo no pretratado y sargazo con pretratamiento 10.

A partir del análisis del espectro infrarrojo, se pudo observar que el sargazo tratado previamente con la enzima lacasa exhibe bandas de absorción similares a las del sargazo no pretratado. Específicamente, en los picos de interés que corresponden a los grupos funcionales O-H (3325 cm^{-1}), C=C (1606 cm^{-1} y 1407 cm^{-1}) y C-H (822 cm^{-1}), se evidencia una disminución en la intensidad de las bandas de la biomasa tratada; mientras que, en las regiones correspondientes a los grupos funcionales C-H (2986-2900 cm^{-1}), se observó un incremento en la intensidad de los picos. Estas observaciones sugieren que el pretratamiento enzimático induce modificaciones en

la estructura del sargazo, lo que podría facilitar una mayor exposición de compuestos como la celulosa, hemicelulosa y alginatos [64].

3.5.5 Microscopía electrónica de barrido

Después de aplicar los pretratamientos, se realizaron micrografías mediante microscopía electrónica de barrido al sargazo, en la figura 3.8 se observa el tejido a una escala de 500 μm donde es apreciable un daño más severo en la vesícula de la macroalga (Fig. 3.8 a) en comparación con el “tallo” (Fig. 3.8 b), esto coincide con las micrografías reportadas por Chikani-Cabrera et. Al (2022) después de aplicar pretratamientos con extracto enzimático rico en lacasa a sargazo colectado en Puerto Morelos (2019-2021) [42].

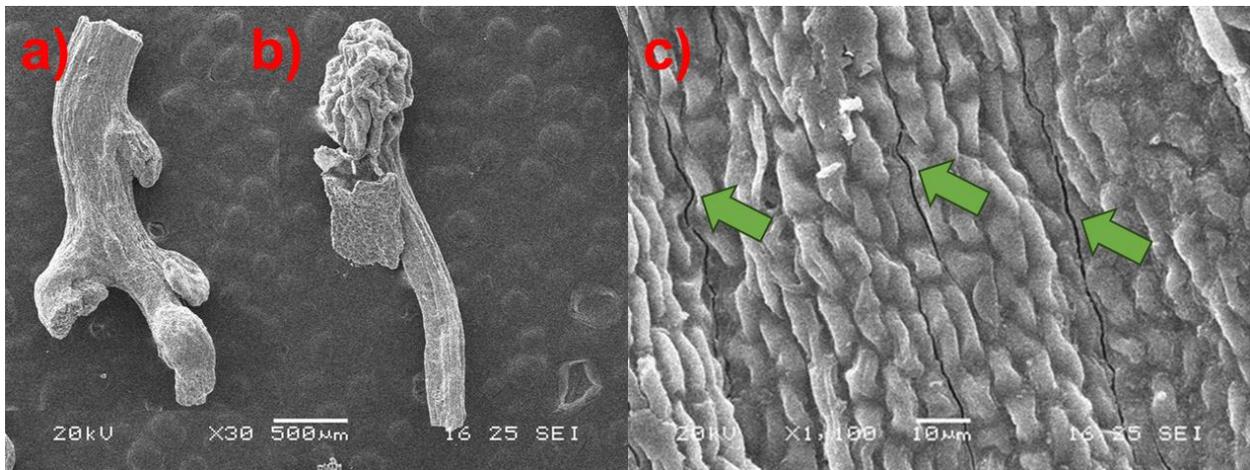


Figura 3.8 a) “Tallos” después de pretratamiento b) Vesícula después de pretratamiento
c) Fracturas en el tejido del sargazo

La modificación de la vesícula podría ser causada por el proceso de secado de la muestra, por lo que, se realizó un aumento de x 1,100 al “tallos” del sargazo, donde a una escala de 10 μm se pudo observar el cambio en la superficie de la biomasa. En la figura 3.6c se aprecia la superficie del sargazo después de haber sido pretratado, el tejido es de textura rugosa con patrones distintivos. Estas características no son observadas en el tejido del sargazo no pretratado, lo que sugiere la pérdida de compacidad en la biomasa de sargazo. También, es importante destacar la formación de fracturas en la superficie (señaladas con flechas verdes), las cuales podrían atribuirse a la manipulación mecánica de la muestra durante el proceso experimental, en lugar de ser el resultado directo de la acción de la enzima lacasa en el tejido.

En la Figura 3.9a se observa la imagen ampliada del "tallo" del sargazo utilizando una magnificación de x170. Se pueden notar múltiples "estrías" en el tallo, indicadas por las flechas verdes. Al aumentar la magnificación a x1,100 (Fig. 3.9b), se pudo observar la aparición de espacios vacíos en el tejido del sargazo. Aunque la estructura del sargazo no se rompe por completo, la formación de estos espacios en el tejido sugiere que la enzima ha provocado una modificación en la superficie. Según el estudio realizado por Alzate-Gaviria *et al* (2020), estas "estrías" o espacios vacíos en el tejido pueden atribuirse a la modificación de la lignina en el sargazo, el autor destaca que cuando el contenido de lignina es alto (mayor a 25.40%), la estructura del sargazo tiende a mantenerse íntegra [33].

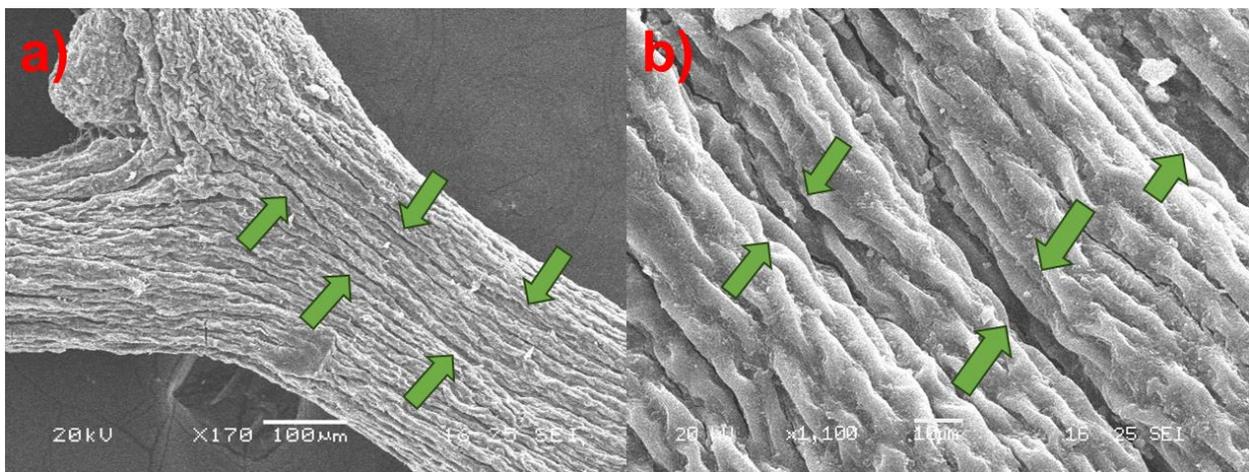


Figura 3.9 a) Formación de estrías en el tejido del sargazo después de pretratamiento b) Estrías en el sargazo

3.6 Ensayos BMP

3.6.1 Volumen de biogás acumulado

La caracterización de los ensayos BMP se llevó a cabo midiendo la presión de los frascos serológicos e inyectando muestras de biogás a un cromatógrafo de gases cada 24 h. En la figura 3.10 se observan las curvas de biogás acumulado durante los 26 días del ensayo BMP. Se observa que las curvas del volumen de biogás acumulado formaron dos grupos. El primer grupo se encuentra por debajo de 250 mL de biogás y corresponde a las curvas de los pretratamientos 1 (293 U/g y 36 h), 2 (500 U/g y 24 h), 3 (500 U/g y 48 h), 4 (1000 U/g y 19 h) y PC (1000 U/g y 36 h). En contraste, las curvas pertenecientes a los pretratamientos: 8 (1000 U/g y 53h), 9 (1500

U/g y 24 h), 10 (1500 U/g y 48 h) y 11 (1707 U/g y 36h) se agruparon entre 350 y 400 mL de biogás.

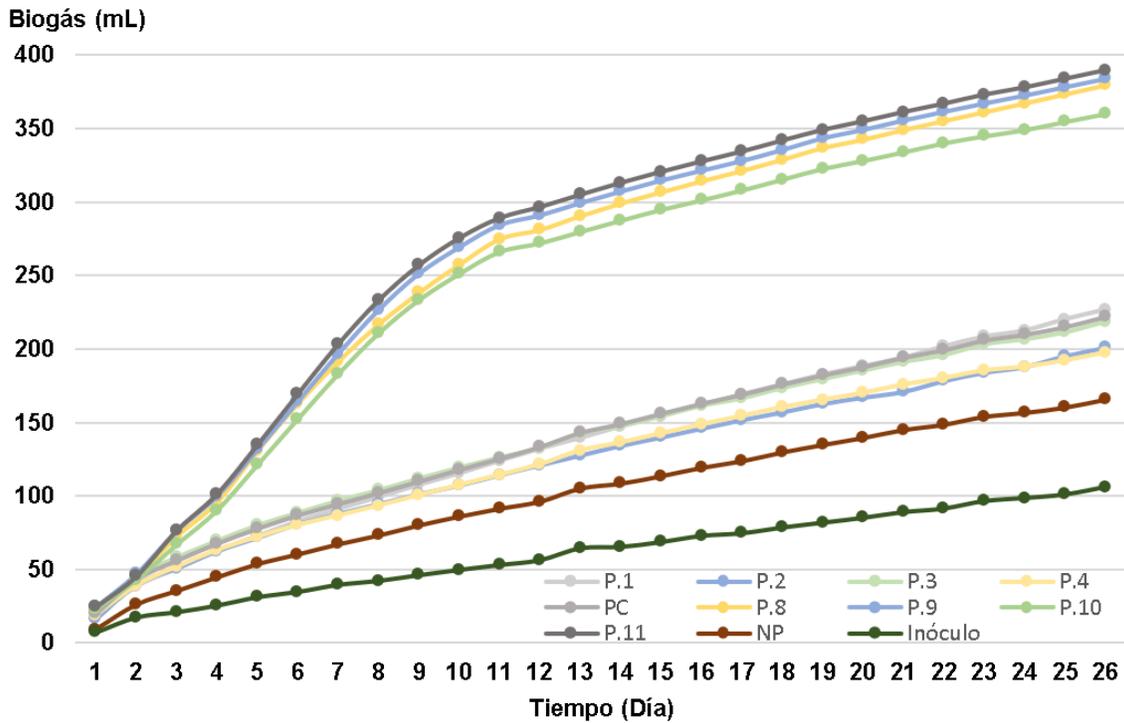


Figura 3.10 Volumen de biogás acumulado

3.6.3 Concentración de CH₄

Una característica importante a tener en cuenta es el contenido porcentual de metano en el biogás, ya que si se encuentra por debajo del 65% se considera que el biogás no es utilizable. Por lo tanto, en la figura 3.11 se observa el contenido de metano en el biogás. Los pretratamientos 2, 4 y PC mostraron una concentración de CH₄ inferior al 65%. Mientras que los pretratamientos 1, 3, 8, 9, 10 y 11 obtuvieron concentraciones máximas que se agruparon entre 70 y 87%. Es importante destacar que el pretratamiento 11 alcanzó la concentración máxima de metano a los 20 días, con un valor de 86.39%. Esto representa una diferencia significativa de más de 100% en comparación con el sargazo no pretratado. Estos valores son mayores a lo reportado por Thompson *et al.* (2020) quien aplicando un pretratamiento físico (explosión de vapor) a sargazo de Barbados colectado en 2018 encontró la concentración de CH₄ en un rango de 45-50% para todas las muestras pretratadas. Mientras que, Tapia-Tussell (2018) al aplicar un pretratamiento enzimático (7000 U/g de enzima lacasa) reportó un contenido de 46% de CH₄ en muestras de sargazo colectas en Progreso Yuc. en el año 2018. Por otro lado, la máxima concentración de

CH₄ encontrada en este estudio es similar a lo reportado por Chikani-Cabrera *et al.* (2022) quien reportó una concentración de CH₄ máxima de 84.56% (día 12) utilizando un extracto enzimático rico en lacasa procedente del hongo *Trametes hirsuta* Bm-2 [42]. Sin embargo, se ha de mencionar que la concentración enzimática utilizada en dicho estudio fue de 7000 U/g lo que es más de 4 veces la cantidad de enzima empleada en el pretratamiento 11 (1707 U/g).

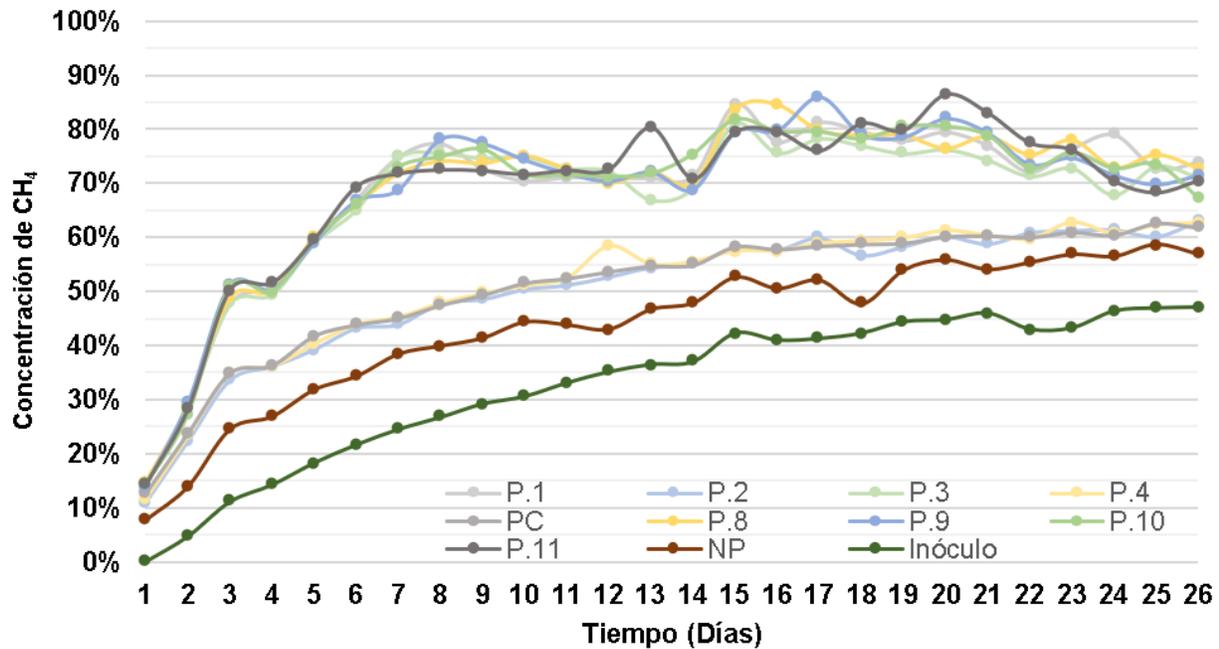


Figura 3.11 Concentración de CH₄

3.6.2 Volumen de CH₄ acumulado

En la figura 3.12 se puede observar el volumen de CH₄ acumulado en los ensayos BMP durante 26 días. En la gráfica se observa que el sargazo no pretratado produjo el menor volumen de metano con 69.37 mL. Los pretratamientos 1, 2 y 4 no mostraron diferencias significativas en comparación con el sargazo NP, ya que produjeron alrededor de 71 mL de CH₄. Mientras que con los pretratamientos restantes el volumen de CH₄ acumulado se elevó a un rango entre 77.98 y 96.98 mL; siendo los pretratamientos 9 (1500 U/g y 24 h), 10 (1500 U/g y 48 h) y 11 (1707 U/g y 36 h) aquellos que generaron los mayores valores acumulativos de metano, siendo 87.14, 96.98 y 86.88 mL respectivamente. Estos valores son mayores a lo reportado por Salgado-Hernández *et al.* (2022) donde con un pretratamiento físico a la biomasa de Sargazo colectada en Playa del Carmen obtuvo un incremento de la producción metano de 63 mL a 75 mL en el mismo periodo de tiempo [51].

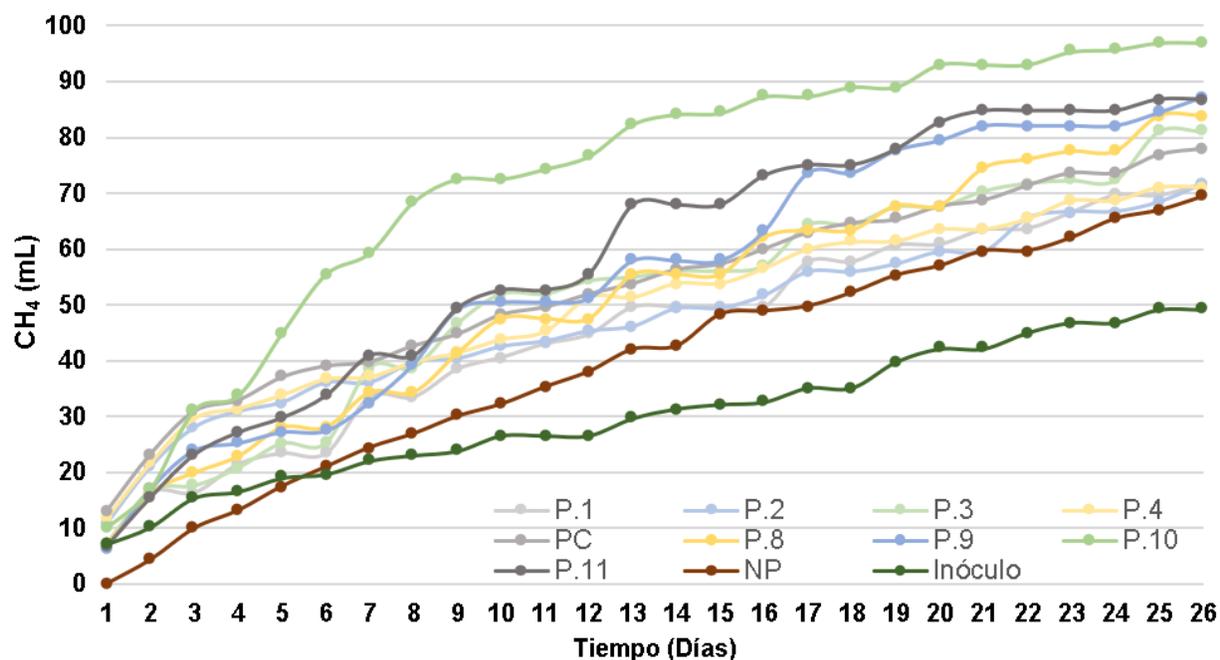


Figura 3.12 Volumen de metano diario

3.6.4 Rendimiento de CH₄ (BMP)

En la figura 3.12 se puede apreciar que los distintos pretratamientos tuvieron un impacto favorable en el rendimiento BMP, ya que la curva correspondiente al sargazo NP mostró un rendimiento máximo de 53.54 LCH₄/kg SV. En el caso del sargazo no pretratado se encontró un amplio rango de valores para el BMP. Thompson *et al.* (2020), Chikani-Cabrera *et al.* (2022), Milledge *et al.* (2020) y Tapia-Tussell *et al.* (2018) reportaron valores de 41.84, 152.89, 113 y 81 LCH₄/kg SV, respectivamente.

Después de aplicar los pretratamientos enzimáticos, se encontró que todas las curvas de rendimiento terminaron por arriba de los 80 LCH₄/kg SV. Por ejemplo, el rendimiento observado en las curvas de los pretratamientos 1, 2 y 4 fue de 84.55, 85.21 y 89.44 LCH₄/kg SV respectivamente. Estos valores son comparables con lo reportado por Tapia *et al.* (2018) donde después de aplicar un pretratamiento enzimático (7000 U/mL lacasa y 48h) a sargazo de Progreso Yuc. (2018) obtuvo un BMP de 86 LCH₄/kgSV. Los pretratamientos 3, PC, 8 y 9 presentaron un rendimiento de 94.76, 98.75, 102.13 y 103.03 LCH₄/kgSV respectivamente. Estos rendimientos se encuentran próximos a lo reportado por Tapia *et al.* (2018) donde después de aplicar un pretratamiento biológico con *T. hirsuta* Bm-2 el BMP fue de 104 LCH₄/kgSV. Mientras que las curvas que corresponden a los pretratamientos 10 y 11 representan los rendimientos más altos

observados entre todas las curvas de los pretratamientos, sobresalieron con valores de 111.57 y 109.03 LCH₄/kgSV respectivamente. Si bien, dichos pretratamientos tuvieron el rendimiento más alto; los valores son menores a lo reportado por Chikani-Cabrera *et al.* (2022) donde se estudió el efecto de un pretratamiento con extracto enzimático (7000 U/g lacasa y 48 h) proveniente de *T. hirsuta* Bm-2 aplicado a una muestra de sargazo de Puerto Morelos (2019-2021) consiguiendo un rendimiento de 172.57 LCH₄/kg SV [42].

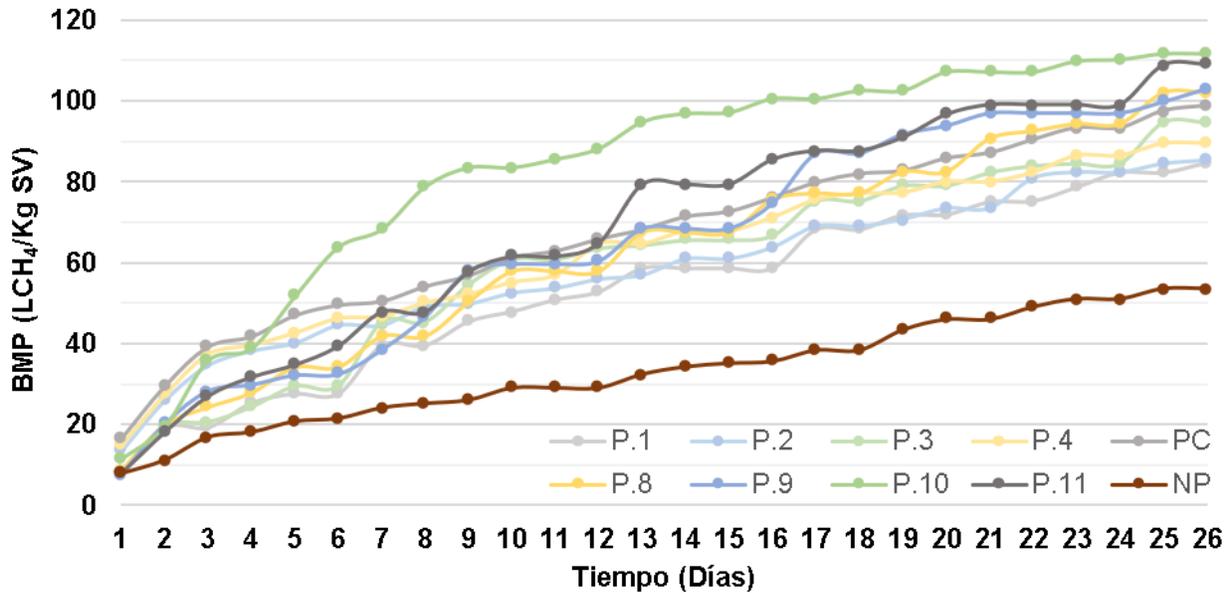


Figura 3.13 Rendimiento de CH₄

Autores como Thompson *et al.* (2020), Chikani-Cabrera *et al.* (2022) y Milledge *et al.* (2020) estudiaron pretratamientos físicos y químicos, donde se consiguieron los siguientes rendimientos: 116.72, 230.82, 71.7 y 159.7 LCH₄/kgSV respectivamente [64, 42, 72]. Sin embargo, es importante reconocer que las condiciones experimentales y las variables específicas influyen en el resultado, así como se debe considerar el consumo energético en el caso de los pretratamientos físicos y en el caso de los pretratamientos químicos; la generación de residuos (alcalinos o ácidos) que deben ser procesados de manera correcta.

Es importante tener en cuenta que la relación C/N de la biomasa de sargazo se mantuvo en un rango de 48.58 a 58.60, después de los pretratamientos enzimáticos. Sí bien, en algunos pretratamientos (4, 8, 10 y 11) la relación disminuyó; continúa siendo un valor elevado para un proceso de digestión anaerobia adecuado. Una relación C/N elevada provoca que las bacterias metanogénicas consuman rápidamente el nitrógeno disponible para satisfacer sus necesidades

proteicas y a su vez no consuman el carbono, esto conlleva a una reducción en la producción de metano [42]. Así mismo, es importante destacar que el contenido de azufre en el sargazo NP se encontró en un rango de 1.09-1.15%. Salgado *et al.* (2022) explica que un contenido de azufre por arriba del 1% puede inhibir la producción de metano, debido a la formación de ácido sulfhídrico (H₂S) [51].

3.6.5 Índice de biodegradabilidad (BI)

Los resultados previamente expuestos muestran un incremento significativo en el BMP, sin embargo, después de los pretratamientos el índice de biodegradabilidad (BI) más alto se presentó en el pretratamiento 10 con un valor de 0.27 como se observa en la tabla 3.8 Esto se debe a que El BMP teórico del sargazo NP es de 408.9 LCH₄/kg SV. El BI reportado por autores como Chikani-Cabrera *et al.* (2022) implementando un pretratamiento enzimático fue de 0.42 e implementando una combinación de pretratamientos enzimáticos y químicos obtuvo un índice BI de 0.95 [42].

Tabla 3.8 Índice de biodegradabilidad.

Pretratamiento	C. Enzimática [U/g]	Tiempo [h]	BMP	BI
1	293	36	84.55	0.20
2	500	24	85.21	0.20
3	500	48	94.76	0.23
4	1000	19	89.44	0.21
PC	1000	36	98.75	0.23
8	1000	53	101.76	0.24
9	1500	24	103.03	0.25
10	1500	48	111.57	0.27
11	1707	36	109.03	0.26

C. Enzimática: Concentración enzimática; BMP: Potencial bioquímico de metano y BI: índice de biodegradabilidad

3.7 Superficie de respuesta

En la figura 3.13 se puede observar la superficie de respuesta generada a partir de la información del diseño compuesto central. De acuerdo al análisis de varianza para el rendimiento de CH₄; la curva obtenida es de primer orden. Tanto la concentración de enzima y el tiempo de reacción tienen un efecto lineal sobre el rendimiento de metano (valor-P < 0.05). El estadístico de R² indica que este ajuste del modelo explica 97.855% de la variabilidad en la variable dependiente. La desviación estándar de los residuos es 1.50635 y el error absoluto medio es de 1.18152 el cual representa el valor promedio de los residuos. En la figura 3.14 se observa el diagrama de contornos de la superficie, este suele ser una herramienta para visualizar mejor aquellas regiones de la curva donde se presenta un mayor efecto de las variables de entrada; la región roja representa el mayor efecto y la región azul representa el menor efecto. En este caso se interpreta que al aumentar la concentración de enzima y tiempo de reacción en los pretratamientos aumenta el rendimiento de metano producido en los ensayos BMP. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que una curva de primer orden no indica el punto óptimo de la variable de salida, sino que sugiere un acercamiento a la región donde se encuentra dicho punto. La ecuación que describe el comportamiento de la curva es la siguiente:

$$Y_1 = 62.3346 + 0.0175536X_1 + 0.625908X_2 \quad (\text{Ecu. 14})$$

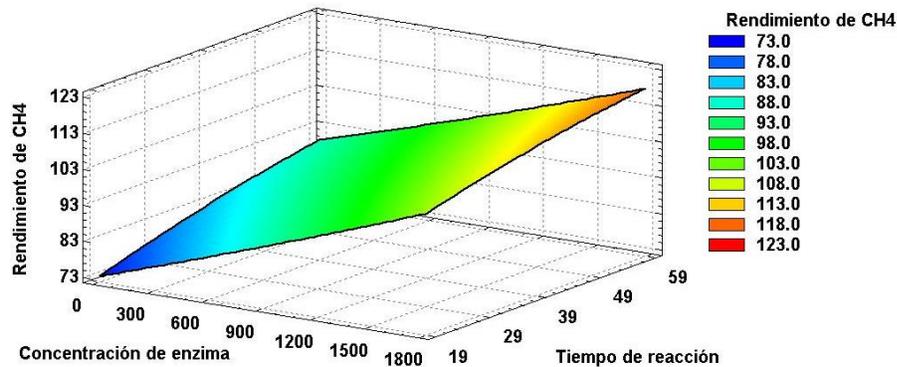


Figura 3.14 Superficie de respuesta estimada a partir del DCC.

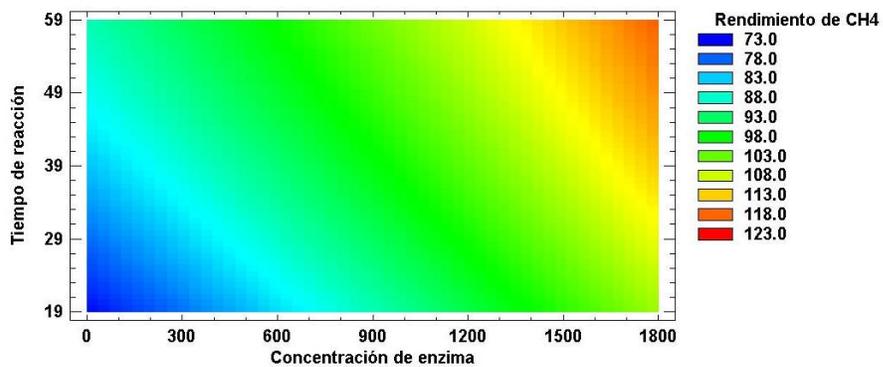


Figura 3.15 Contorno de la superficie de respuesta.

Los resultados sugieren que el aumento en el BMP se debe al pretratamiento, si bien, los valores determinados de BMP ($LCH_4/kg\ SV$) son menores a los que la literatura presenta, el aumento de +108% determinado para el pretratamiento 10 es significativamente mayor al -23% [42] y +6.27% [28] reportado para pretratamientos enzimáticos (7000 U/g y 24 h de reacción).

CONCLUSIONES

- Se logró la máxima actividad enzimática (4166 U/mL) a partir del extracto enzimático enriquecido con salvado de trigo. No obstante, con el uso de testa de ramón como inductor de lacasa, se obtuvo una actividad enzimática de 1669 U/mL, lo que es relevante debido a que la testa de ramón es un subproducto derivado de la semilla del árbol de Ramón. El uso de este inductor no solo puede resultar en una actividad enzimática útil, sino que también supone una disminución en el costo de producción de extracto enzimático rico en enzima lacasa.
- La relación C/N en la biomasa de sargazo no pretratado y después de los pretratamientos es alta, con valores promedio de 58.67 y 52.87 respectivamente. Esto indica que el sargazo tiene un contenido muy bajo de nitrógeno en comparación con su contenido de carbono. Esta relación puede tener implicaciones importantes en la descomposición y disponibilidad de nutrientes en el sargazo, ya que un bajo contenido de nitrógeno puede limitar su capacidad de degradación ante bacterias metanogénicas.
- El porcentaje de lignina en el sargazo pretratado se mantuvo relativamente constante respecto a la biomasa no pretratada, con valores alrededor de 27.52%. Esta estabilidad en el contenido de lignina después de los pretratamientos indica que los pretratamientos no han tenido un impacto significativo en la descomposición de la lignina en la biomasa de sargazo.
- La microscopía electrónica de barrido no detectó daños significativos en la estructura de la biomasa después de los pretratamientos. A pesar de la falta de un deterioro evidente, se observó una reconfiguración de la estructura microscópica del sargazo. Esto se evidenció en la formación de “estrías” o espacios entre el tejido de la biomasa. Esta reconfiguración puede ser importante, ya que sugiere una mejor accesibilidad a los carbohidratos presentes en el sargazo.
- Aunque la cantidad total de lignina en la biomasa de sargazo no cambió de manera significativa, los pretratamientos enzimáticos con lacasa pueden haber causado reorganizaciones en la estructura de la lignina. Estos cambios se reflejan en la intensidad de las bandas en el espectro FT-IR; especialmente en los grupos funcionales O-H (3325 cm^{-1}), C=C (1606 cm^{-1} y 1407 cm^{-1}), C-H (822 cm^{-1}) y C-H ($2986\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$) los cuales pueden estar relacionados con modificaciones en la

estructura química y conformación de los componentes de la biomasa, como celulosa, hemicelulosa y lignina.

- De acuerdo a los resultados obtenidos en el diseño compuesto central; la superficie de respuesta presenta un comportamiento que corresponde a un modelo lineal. Es decir, una ecuación de primer orden, esto indica una aproximación hacia la región de la curva donde se encuentra el punto óptimo de la variable de respuesta.
- Por lo tanto, el mejor pretratamiento fue con 1500 U/g de extracto enzimático de lacasa y 48 horas de reacción, dicho pretratamiento mostró la mejor bioconversión de la biomasa obteniendo un índice de biodegradabilidad de 27%.
- La biodegradabilidad en el sargazo es baja y la superficie de respuesta de primer orden, lo que sugiere continuar con investigación futura para encontrar una superficie de respuesta con efectos cuadráticos, lo que indicaría el punto óptimo del rendimiento de metano. Esto puede llevar a mejorar la eficiencia de bioconversión del sargazo y por ende mejorar la biodegradabilidad de la materia prima.
- Los pretratamientos lograron modificar la estructura del sargazo. Si bien no hay un cambio significativo en la cantidad total de lignina en el sargazo, los análisis SEM y FT-IR muestran que existe una reconfiguración en el tejido del sargazo, la cual permitió una mayor accesibilidad a los carbohidratos presentes en la biomasa. El efecto de los pretratamientos se vio reflejado en el rendimiento de metano, ya que el BMP de las muestras pretratadas mostraron una mejora significativa en comparación con la biomasa no pretratada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] León, C. (2020). El sargazo a escena. salud pública de México, 61, 701-703. <https://doi.org/10.21149/10870>
- [2] Rodríguez, R., van Tussenbroek, B., y Jordán, E. (2016). Afluencia masiva de sargazo pelágico a la costa del Caribe mexicano (2014–2015). Florecimientos Algaes Nocivos en México. 352-365.
- [3] Wang, M., Hu, C., Barnes, B., Mitchum, G., Lapointe, B., y Montoya, J. (2019). The great Atlantic *sargassum* belt. Science, 365(6448), 83-87. <https://doi.org/10.1126/science.aaw7912>
- [4] De Széchy, M., Guedes, P., Baeta, M., y Oliveira, E. (2012). Verification of *Sargassum natans* (Linnaeus) Gaillon (*Heterokontophyta: Phaeophyceae*) from the Sargasso Sea off the coast of Brazil, western Atlantic Ocean. Check List, 8(4), 638-641. <https://doi.org/10.15560/8.4.638>
- [5] Maneein, S., Milledge, J., Nielsen, B., y Harvey, P. (2018). A review of seaweed pre-treatment methods for enhanced biofuel production by anaerobic digestion or fermentation. Fermentation, 4(4), 100. <https://doi.org/10.3390/fermentation4040100>
- [6] Biswas, B., Singh, R., Krishna, B., Kumar, J., y Bhaskar, T. (2017). Pyrolysis of *azolla*, *sargassum tenerrimum* and water hyacinth for production of bio-oil. Bioresource Technology, 242, 139-145. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.044>
- [7] Thompson, T., Young, B., y Baroutian, S. (2019). Advances in the pretreatment of brown macroalgae for biogas production. Fuel Processing Technology, 195, 106151. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2019.106151>
- [8] Rodriguez, C., Alaswad, A., El-Hassan, Z., y Olabi, A. G. (2018). Waste paper and macroalgae co-digestion effect on methane production. Energy, 154, 119-125. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2018.04.115>
- [9] Thompson, T., Young, B., y Baroutian, S. (2020). Pelagic *Sargassum* for energy and fertiliser production in the Caribbean: A case study on Barbados. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 118, 109564. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109564>

- [10] Lapointe, B., West, E., Sutton, T., y Hu, C. (2014). Ryther revisited: nutrient excretions by fishes enhance productivity of pelagic *Sargassum* in the western North Atlantic Ocean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 458, 46-56. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2014.05.002>
- [11] Franks, J., Johnson, D., Ko, D., Sánchez, G., Hendon, J., y Lay, M. (2012). Unprecedented influx of pelagic *Sargassum* along Caribbean island coastlines during summer 2011.
- [12] Davis, D., Simister, R., Campbell, S., Marston, M., Bose, S., McQueen, S., y Tonon, T. (2021). Biomass composition of the golden tide pelagic seaweeds *Sargassum fluitans* and *S. natans* (morphotypes I and VIII) to inform valorisation pathways. *Science of the Total Environment*, 762, 143134.
- [13] Schell, J., Goodwin, D., y Siuda, N. (2015). Recent *Sargassum* inundation events in the Caribbean: shipboard observations reveal dominance of a previously rare form. *Oceanography*, 28(3), 8-11.
- [14] Amador, F., García, T., Alper, H., Rodríguez, V., y Carrillo, D. (2021). Valorization of pelagic *sargassum* biomass into sustainable applications: Current trends and challenges. *Journal of Environmental Management*, 283, 112013. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112013>
- [15] Johns, E., Lumpkin, R., Putman, N., Smith, R., Muller, F., Rueda, D., y Werner, F. (2020). The establishment of a pelagic *Sargassum* population in the tropical Atlantic: biological consequences of a basin-scale long distance dispersal event. *Progress in Oceanography*, 182, 102269. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2020.102269>
- [16] Franks, J., Johnson, D., & Ko, D. (2016). Pelagic *sargassum* in the tropical North Atlantic. *Gulf and Caribbean Research*, 27(1), 6-11. <https://doi.org/10.18785/gcr.2701.08>
- [17] Webster, R., y Linton, T. (2013). Development and implementation of *Sargassum* early advisory system (SEAS). *Shore & Beach*, 81(3), 1.
- [18] Gavio, B., Rincón, M., y Santos, A. (2015). Massive quantities of pelagic *Sargassum* on the shores of San Andres Island, Southwestern Caribbean. *Acta Biológica Colombiana*, 20(1), 239-241. <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v20n1.46109>

- [19] Johnson, D., Ko, D., Franks, J., Moreno, P., y Sanchez, G. (2013). The *Sargassum* invasion of the Eastern Caribbean and dynamics of the Equatorial North Atlantic.
- [20] Schell, J., Goodwin, D., y Siuda, N. (2015). Recent *Sargassum* inundation events in the Caribbean: shipboard observations reveal dominance of a previously rare form. *Oceanography*, 28(3), 8-11.
- [21] Martínez, G. (2019). Sargazo: la irrupción atípica de un ecosistema milenario. *salud pública de méxico*, 61(5), 698-700. <https://doi.org/10.21149/10838>
- [22] Excelsior (2019) Sargazo: opciones para fabricar material para construcción. <https://paolarojas.com.mx/sargazo-opciones-para-fabricar-material-para-construccion/>
Consultado: 4 de noviembre de 2019
- [23] Hempel, M. D. S. S., Colepicolo, P., & Zambotti-Villela, L. (2023). Macroalgae Biorefinery for the Cosmetic Industry: Basic Concept, Green Technology, and Safety Guidelines. *Phycology*, 3(1), 211-241. <https://doi.org/10.3390/phycology3010014>
- [24] Meng, W., Sun, H., Mu, T., y Garcia, M. (2023). Extraction, purification, chemical characterization and antioxidant properties in vitro of polyphenols from the brown macroalga *Ascophyllum nodosum*. *Algal Research*, 70, 102989. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.102989>
- [25] Ardalan, Y., Jazini, M., y Karimi, K. (2018). *Sargassum angustifolium* brown macroalga as a high potential substrate for alginate and ethanol production with minimal nutrient requirement. *Algal research*, 36, 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.10.010>
- [26] Borines, M., de Leon, R., y Cuello, J. (2013). Bioethanol production from the macroalgae *Sargassum* spp. *Bioresource technology*, 138, 22-29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.108>
- [27] Thompson, T., Young, B., y Baroutian, S. (2021). Enhancing biogas production from caribbean pelagic *Sargassum* utilising hydrothermal pretreatment and anaerobic co-digestion with food waste. *Chemosphere*, 275, 130035. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130035>
- [28] Tapia, R., Avila, J., Domínguez, J., Valero, D., Olguin, E., Pérez, D., y Alzate, L. (2018). Biological pretreatment of mexican caribbean macroalgae consortiums using Bm-2 strain

(trametes hirsuta) and its enzymatic broth to improve biomethane potential. *Energies*, 11(3), 494. <https://doi.org/10.3390/en11030494>

[29] López, L., Alvarado, J., Corral, J., Aguilera, A., Rodríguez, R., Guevara, S., y Morales M. (2020). A prospective study of the exploitation of pelagic *Sargassum* spp. as a solid biofuel energy source. *Applied Sciences*, 10(23), 8706. <https://doi.org/10.3390/app10238706>

[30] Rodríguez, R., Roy, P., Torrescano, N., Cabanillas, N., Carrillo, S., Collado, L., y van Tussenbroek, B. (2020). Element concentrations in pelagic *Sargassum* along the Mexican Caribbean coast in 2018-2019. *PeerJ*, 8, e8667. <https://doi.org/10.7717/peerj.8667>

[31] Olguin, E., Leal, R., Alzate, L., Domínguez, J., y Tapia, R. (2022). Environmental impact of *Sargassum* spp. landings: an evaluation of leachate released from natural decomposition at Mexican Caribbean coast. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(60), 91071-91080. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22123-8>

[32] Azcorra, K., Olguin, E., Domínguez, J., Toledano, T., Leal, R., Alzate, L., y Tapia, R. (2022). *Sargassum* biorefineries: potential opportunities towards shifting from wastes to products. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02407-2>

[33] Alzate, L., Domínguez, J., Chablé, R., Olguin, E., Leal, R., Canché, G., y Tapia, R. (2020). Presence of polyphenols complex aromatic “lignin” in *Sargassum* spp. from Mexican Caribbean. *Journal of Marine Science and Engineering*, 9(1), 6. <https://doi.org/10.3390/jmse9010006>

[34] Aparicio, E., Rodríguez, R., Pinales, C., Loredo, A., Robledo, A., Aguilar, C., y Ruiz, H. (2021). High-pressure technology for *Sargassum* spp biomass pretreatment and fractionation in the third generation of bioethanol production. *Bioresource Technology*, 329, 124935. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124935>

[35] Paredes, R., González, S., González, J., Rodríguez, R., Benavides, A., Charles, A., y Robledo, A. (2023). Characterization of *Sargassum* spp. from the Mexican Caribbean and Its Valorization through Fermentation Process. *Processes*, 11(3), 685. <https://doi.org/10.3390/pr11030685>

- [36] Brooks, M., Coles, V., Hood, R., y Gower, J. (2018). Factors controlling the seasonal distribution of pelagic *Sargassum*. *Marine Ecology Progress Series*, 599, 1-18. <https://doi.org/10.3354/meps12646>
- [37] Deublein, D., y Steinhauser, A. (2011). *Biogas from waste and renewable resources: an introduction*. John Wiley & Sons. Weinheim
- [38] Varnero, M. (2011) *Manual de biogás*. CHI/00/G32 Santiago, Chile
- [39] Drapcho, C., Nghim, N., y Walker, T. (2008). *Biofuels engineering process technology*. McGraw-Hill Education.
- [40] Strömberg, S., Nistor, M., y Liu, J. (2014). Towards eliminating systematic errors caused by the experimental conditions in Biochemical Methane Potential (BMP) tests. *Waste management*, 34(11), 1939-1948. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.07.018>
- [41] Koch, K., Fernández, Y., y Drewes, J. (2015). Influence of headspace flushing on methane production in Biochemical Methane Potential (BMP) tests. *Bioresource Technology*, 186, 173-178.
- [42] Chikani, K., Fernandes, P., Tapia, R., Parra, D., Hernández, G., Valdez, R., y Alzate, L. (2022). Improvement in methane production from pelagic *sargassum* using combined pretreatments. *Life*, 12(8), 1214. <https://doi.org/10.3390/life12081214>
- [43] Akila, V., Manikandan, A., Sukeetha, D., Balakrishnan, S., Ayyasamy, P., y Rajakumar, S. (2019). Biogas and biofertilizer production of marine macroalgae: An effective anaerobic digestion of *Ulva* sp. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18, 101035. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101035>
- [44] Oliveira, J., Alves, M., y Costa, J. C. (2014). Design of experiments to assess pre-treatment and co-digestion strategies that optimize biogas production from macroalgae *Gracilaria vermiculophylla*. *Bioresource technology*, 162, 323-330. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.155>
- [45] Nielsen, H., y Heiske, S. (2011). Anaerobic digestion of macroalgae: methane potentials, pre-treatment, inhibition and co-digestion. *Water science and technology*, 64(8), 1723-1729. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.654>

- [46] Montingelli, M., Benyounis, K., Stokes, J., y Olabi, A. (2016). Pretreatment of macroalgal biomass for biogas production. *Energy conversion and management*, 108, 202-209. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2015.11.008>
- [47] Pastare, L., Aleksandrovs, I., Lauka, D., y Romagnoli, F. (2016). Mechanical pretreatment effect on biological methane potential from marine macro algae: results from batch tests of *fucus vesiculosus*. *Energy Procedia*, 95, 351-357. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2016.09.021>
- [48] Montingelli, M., Benyounis, K., Quilty, B., Stokes, J., y Olabi, A. (2017). Influence of mechanical pretreatment and organic concentration of Irish brown seaweed for methane production. *Energy*, 118, 1079-1089. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2016.10.132>
- [49] López, H., Kennedy, G., Gómez, J., Huerta, E., Peralta, M., Zavala, F., y Pérez, A. (2021). Practical and Theoretical Modeling of Anaerobic Digestion of *Sargassum* spp. in the Mexican Caribbean. *Polish Journal of Environmental Studies*, 30(4). <https://doi.org/10.15244/pjoes/128735>
- [50] Oliveira, J., Alves, M., y Costa, J. (2015). Optimization of biogas production from *Sargassum* sp. using a design of experiments to assess the co-digestion with glycerol and waste frying oil. *Bioresource technology*, 175, 480-485. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.121>
- [51] Salgado, E., Ortiz, Á., Martínez, S., Rosas, E., Dorantes, A., Alvarado, A., y Alvarado, A. (2023). Methane Production of *Sargassum* spp. Biomass from the Mexican Caribbean: Solid-Liquid Separation and Component Distribution. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(1), 219. <https://doi.org/10.3390/ijerph20010219>
- [52] Chablé R. D. (2022) Producción de bioetanol de segunda generación a partir de residuos agroindustriales de piña (*Ananas comosus* L.). Tesis de doctorado, CICY, México
- [53] Zapata, P., Villalonga, M., Tamayo, Jorge., Rivera, G., y Sólis S. (2012) Purification and characterization of laccase from *Trametes hirsuta* Bm-2 and its contribution to dye and effluent decolorization. *Afr. J. Biotechnol*, 11(15), 3603-3611. <https://doi.org/10.5897/AJB11.2050>

- [54] Zapata, P., Villalonga, L., Islas, I., Rivera, G., Ancona, W., y Solís, S. (2015). Synergistic action of laccases from *Trametes hirsuta* Bm2 improves decolourization of indigo carmine. *Letters in Applied Microbiology*, 61(3), 252-258. <https://doi.org/10.1111/lam.12451>
- [55] Ancona, W., Tapia, R., Pool, L., Can, A., Lizama, G., y Solís, S. (2018). Laccase-mediator system produced by *Trametes hirsuta* Bm-2 on lignocellulosic substrate improves dye decolorization. *3 Biotech*, 8, 1-8. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1323-y>
- [56] Soares, J., Demeke, M., Foulquié, M., Van de Velde, M., Verplaetse, A., Fernandes, A., y Fernandes, P. (2016). Green coconut mesocarp pretreated by an alkaline process as raw material for bioethanol production. *Bioresource technology*, 216, 744-753. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.105>
- [57] Myers, R, Montgomery, D., y Anderson, C. (2009). *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*. John Wiley & Sons. New jersey
- [58] Dhungana, B., Lohani, S., y Marsolek, M. (2022). Anaerobic co-digestion of food waste with livestock manure at ambient temperature: a biogas based circular economy and sustainable development goals. *Sustainability*, 14(6), 3307. <https://doi.org/10.3390/su14063307>
- [59] Sluiter, A., Hames, B., Hyman, D., Payne, C., Ruiz, R., Scarlata, C., y Wolfe, J. (2008). Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples. *National Renewable Energy Laboratory*, 9, 1-6.
- [60] Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., y Crocker, D. (2008). Determination of ash in biomass. *Laboratory analytical procedure*, (1), 1-5.
- [61] Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., y Crocker, D. (2008). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Laboratory analytical procedure*, 1617(1), 1-16.
- [62] Sathish, S., y Vivekanandan, S. (2016). Parametric optimization for floating drum anaerobic bio-digester using Response Surface Methodology and Artificial Neural Network. *Alexandria Engineering Journal*, 55(4), 3297-3307. <https://doi.org/10.1016/j.aej.2016.08.010>

- [63] Valero, D., Montes, J., Rico, J., y Rico, C. (2016). Influence of headspace pressure on methane production in Biochemical Methane Potential (BMP) tests. *Waste management*, 48, 193-198. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.11.012>
- [64] Thompson, T., Young, B., y Baroutian, S. (2020). Efficiency of hydrothermal pretreatment on the anaerobic digestion of pelagic *Sargassum* for biogas and fertilizer recovery. *Fuel*, 279, 118527. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118527>
- [65] Milledge, J., Nielsen, B., Maneein, S., y Harvey, P. (2019). A brief review of anaerobic digestion of algae for bioenergy. *Energies*, 12(6), 1166. <https://doi.org/10.3390/en12061166>
- [66] Suhartini, S., Sihaloho, R., Rahmah, N., Nurika, I., Junaidi, M., Paul, R., y Melville, L. (2020). Effect of pre-treatment on anaerobic biodegradability of *Gracilaria verrucosa*. *Earth and Environmental Science*, 475(1), 12064. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/475/1/012064>
- [67] Singleton, V., y Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>
- [68] Pacheco, L., Tamayo, J., Moraes, B., y Franco, T. (2022). Bioenergy, electricity, biogas production, and emission reduction using the anaerobic digestion of organic municipal solid waste in campinas, One of the largest brazilian cities. *Processes*, 10(12), 2662. <https://doi.org/10.3390/pr10122662>
- [69] Garza C. L. (2021) Sacarificación y co-fermentación simultanea para la producción de bioetanol a partir de harina de semillas de *Brosimum alicastrum*. Tesis de maestría, CICY, México
- [70] Tapia, R., Pereira, A., Alzate, L., Lizama, G., Pérez, D., y Solis, S. (2020). Decolorization of textile effluent by *Trametes hirsuta* Bm-2 and lac-T as possible main laccase-contributing gene. *Current Microbiology*, 77(12), 353-361. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02188-9>
- [71] Azcorra K. J. (2021) Desarrollo de un proceso de deslignificación de *Sargassum* spp. para la obtención de compuestos con potencial en la producción de biocombustibles. Tesis de maestría, CICY, México

[72] Milledge, J., Maneein, S., Arribas, E. y Bartlett, D. (2020). *Sargassum* inundations in Turks and Caicos: Methane potential and proximate, ultimate, lipid, amino acid, metal and metalloid analyses. *Energies*, 13(6), 1523. <https://doi.org/10.3390/en13061523>