

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Acuicultura**

**Generación de harina microbiana a partir de orujo de uva
como fuente de carbono**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Rubén Ortiz Herrera

Ensenada, Baja California, México
2024

Tesis defendida por
Rubén Ortiz Herrera

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Director de tesis

Dra. María de Lourdes Virginia Díaz Jiménez

Dr. Juan Pablo Lazo Corvera

Dr. Efraín Gómez Arias



Dr. Roberto Cruz Flores
Coordinador del Posgrado en Acuicultura

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Rubén Ortiz Herrera** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura

Generación de harina microbiana a partir de orujo de uva como fuente de carbono

Resumen aprobado por:

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Director de tesis

La harina de pescado es un ingrediente que se utiliza usualmente en las dietas de organismos acuáticos carnívoros. Su demanda actual tiene repercusiones negativas en las poblaciones de peces pelágicos por lo que su producción se ha vuelto una práctica insostenible. Por lo tanto, la búsqueda de fuentes proteicas que puedan sustituir o reemplazar a la harina de pescado es un tema investigación muy relevante. Una de las principales fuentes proteicas utilizadas en la formulación de dietas para peces son las harinas vegetales. Sin embargo, la demanda alimentaria originada por el crecimiento poblacional, limita la producción de granos para el uso en la ganadería y acuicultura. Por esta razón, la proteína unicelular es una alternativa prometedora debido a que cuenta con características que vuelven atractivo este método de producción, como el espacio de cultivo utilizado, la velocidad de replicación de la biomasa y su calidad nutricional. Para lograr esto, es necesario utilizar una relación C:N apropiada, permitiendo aumentar la producción de biomasa con una menor relación C:N. Se realizaron cultivos microbianos en biorreactores aeróbicos con 3 diferentes relaciones C:N; 1) 30:1, 2) 15:1 y 3) 8.5:1, se utilizó orujo de uva como fuente de carbono y se ajustaron las relaciones C:N adicionando NH_4Cl como fuente de nitrógeno. La tasa de consumo de oxígeno se utilizó como un estimador del crecimiento microbiano. Se cuantificaron los contenidos de proteína, lípidos, carbohidratos, fenoles totales y flavonoides de las harinas generadas a las 32, 40 y 48 h. Los resultados indicaron que el contenido más alto de proteína (47.8 %) se obtuvo a las 48 h para la relación 8.5:1, pero una cantidad menor de fenoles totales ($13.760 \pm 0.033 \text{ mg g}^{-1}$ de m.s.) y flavonoides ($8.91 \pm 0.55 \text{ mg g}^{-1}$ de m.s.). El incremento en la tasa de consumo de oxígeno indicó que cuando hay una mayor disponibilidad de nitrógeno inorgánico se incrementa la síntesis de células (biomasa), a medida que transcurre el cultivo.

Palabras clave: proteína unicelular, tasa de consumo de oxígeno, crecimiento microbiano, fenoles totales, flavonoides.

Abstract of the thesis presented by **Rubén Ortiz Herrera** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

Generation of microbial flour from grape pomace as a carbon source

Abstract approved by:

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Thesis Director

Fishmeal is an ingredient commonly used in the diets of carnivorous aquatic organisms. Its current demand negatively impacts pelagic fish populations, so its production has become unsustainable. Therefore, the search for protein sources that can substitute or replace fishmeal is a very relevant research topic. One of the main protein sources used in the formulation of fish diets is vegetable flour. However, the food demand caused by population growth limits the production of grains for use in livestock and aquaculture. For this reason, single-cell protein is a promising alternative because it has characteristics that make this production method attractive, such as the culture space used, the speed of biomass replication, and its nutritional quality. To produce microbial protein, an appropriate C:N ratio is necessary. Three different C:N ratios, 1) 30:1, 2) 15:1, and 3) 8.5:1 were evaluated in aerobic bioreactors. Grape pomace was used as a carbon source, and the C:N ratios were adjusted by adding NH_4Cl as a nitrogen source. The oxygen consumption rate was used as an estimator of microbial growth. The contents of proteins, lipids, carbohydrates, total phenols, and flavonoids of the flours generated at 32, 40, and 48 h were quantified. The results indicated that at 48 h, the highest protein content (47.8%) was obtained with the 8.5:1 ratio, but a lower amount of total phenols ($13.760 \pm 0.033 \text{ mg g}^{-1} \text{ m.s.}$) and flavonoids ($8.91 \pm 0.55 \text{ mg g}^{-1} \text{ m.s.}$). The increase in the oxygen consumption rate indicated that when there is a greater availability of inorganic nitrogen, cell synthesis (biomass) increases as the culture progresses.

Keywords: single-cell protein, oxygen consumption rate, microbial growth, total phenols, flavonoids.

Dedicatoria

A mis padres Rubén y Juanita que siempre hacen todo lo posible para que pueda cumplir todos mis sueños, metas y aspiraciones, gracias por todo el apoyo, amor y paciencia que me han dado, a donde vaya y lo que logre en la vida siempre se los agradeceré eternamente.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por otorgarme una beca para realizar mis estudios de maestría durante estos dos años.

Al Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) al departamento de acuicultura por aceptarme en la maestría, capacitarme y brindarme sus instalaciones para poder llevar a cabo mis experimentos.

Al Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California por prestar sus instalaciones y equipos que me permitieron iniciar con mi trabajo de investigación.

Al Dr. Benjamín Barón Sevilla por aceptarme como su estudiante, por todo el tiempo dedicado, por su paciencia, charlas, y compartir sus conocimientos para continuar firme con mi trabajo y motivarme siempre a no rendirme.

A los miembros de mi comité, Dr. Juan Pablo Lazo Corvera, el Dr. Efraín Gómez Arias y la Dra. María de Lourdes Virginia Díaz Jiménez, por todas las observaciones y recomendaciones que ayudaron a mejorar mi trabajo en todos sentidos.

A la Dra. Beatriz Cordero Esquivel por disponer de su laboratorio para que realizara mis análisis, y por todo su apoyo dado, la considero parte de mi comité, aunque formalmente no lo fuera.

A la Dra. Mónica Hernández Rodríguez, Dr. Miguel Ángel del Río Portilla, Dr. Misael Rosales Leija y el Dr. Helmut Maske Rubach por su ayuda cuando surgían dudas y siempre tuvieron disponibilidad de tiempo en ayudarme a resolverlas.

Al técnico César Octavio Almeda Jáuregui por ayudar a realizar el análisis elemental de mis muestras y capacitarme en el uso de los equipos de laboratorio.

A los técnicos, M. en C. Abelardo Campos Espinoza, M. en C. Yanet Guerrero Rentería y Luis Alberto Murillo Valenzuela por su ayuda y asesoramiento en el laboratorio y también por todas las pláticas que volvían agradable el tiempo en los laboratorios.

A mis amigos Héctor y Elíasid que volvieron mi experiencia en la maestría una de las más divertidas y llena de aprendizaje en cada reunión que teníamos.

A Victoria, por todo su apoyo, risas y tranquilidad que me ofreció cuando más lo necesité, y me permitió recuperar la motivación cuando la sentía perdida.

A mis amigos y compañeros de Maestría, Estefanía, Augusto, Naoki, Lety, Joce, Doris, Noé, Sergio, Erick, Tania por todas esas risas y pláticas que dejaron un buen recuerdo de ustedes.

A la guardia Nancy que ayudó durante la etapa experimental de mi trabajo, y que siempre tenía algún comentario o palabras de ánimo para levantar la moral.

A todo el personal académico y administrativo del departamento de Acuicultura que ayudaron a mi formación y atendieron mis dudas o dificultades durante mi estancia.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de Figuras	ix
Lista de Tablas.....	x
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 La producción de la harina de pescado y su uso en la acuicultura	1
1.2 El uso de microorganismos o proteína unicelular como fuente de proteína en dietas para la acuicultura	2
1.3 El orujo de uva como fuente de carbono y su potencial como antioxidante	7
1.4 Antecedentes	8
1.4.1 La Relación C:N y la tasa de consumo de oxígeno como indicador de crecimiento microbiano	8
1.4.2 Microorganismos utilizados para la generación de harinas microbianas con residuos agroindustriales.....	9
1.4.3 Sistemas de cultivo para la producción de harinas microbianas	10
1.4.4 El orujo de uva y su potencial como fuente de carbono.....	11
1.4.5 Compuestos fenólicos en el orujo de uva y su capacidad antioxidante	12
1.4.6 Degradación de compuestos fenólicos por microorganismos.....	14
1.4.7 Composición nutricional de harinas microbianas	14
1.5 Justificación	15
1.6 Hipótesis.....	16
1.7 Objetivos	16
1.7.1 Objetivo general	16
1.7.2 Objetivos específicos.....	16

Capítulo 2. Metodología.....	18
2.1.1 Obtención del orujo	18
2.1.2 Diseño experimental	18
2.1.3 Parámetros de cultivo	19
2.1.4 Cuantificación indirecta de crecimiento microbiano por respirometría.....	19
2.1.5 Estimación de Peso seco total (PST), Peso orgánico (PO) y Peso cenizas (PC).....	20
2.1.6 Cuantificación de fenoles totales y flavonoides.....	20
2.1.7 Cuantificación de Proteínas.....	21
2.1.8 Cuantificación Lípidos.....	22
2.1.9 Cuantificación Carbohidratos.....	23
2.1.10 Análisis estadístico	23
Capítulo 3. Resultados	25
3.1.1 Crecimiento microbiano medido por respirometría	25
3.1.2 Peso seco total (PST), Peso orgánico (PO) y Peso cenizas (PC) de harina microbiana	26
3.1.3 Fenoles totales y Flavonoides	27
3.1.4 Proteína total	29
3.1.5 Lípidos totales	30
3.1.6 Carbohidratos totales.....	31
3.1.7 Comportamiento del pH y del nitrógeno inorgánico	33
Capítulo 4. Discusión.....	34
4.1.1 Crecimiento respirometría	34
4.1.2 Fenoles y flavonoides	36
4.1.3 Proteínas	38
4.1.4 Lípidos	39
4.1.5 Carbohidratos.....	41
Capítulo 5. Conclusiones	43
Literatura citada	45

Lista de Figuras

Figura	Página
1. Fases en la curva de crecimiento bacteriano: 1) latencia, 2) exponencial, 3) estacionaria y 4) muerte obtenida de Bhatia (2015).....	6
2. Tipos de compuestos fenólicos presentes en el orujo de uva. Modificado de Beres <i>et al.</i> (2017).	13
3. Biorreactores para el cultivo de harinas microbianas.....	18
4. Consumo de oxígeno de cultivos microbianos con diferentes relaciones C:N.	25
5. Contenido de proteína en harinas microbianas cultivadas con diferente relación C:N.	30
6. Valor de pH en cultivos de harinas microbianas.	33
7. Valores de nitrógeno inorgánico en cultivos de harinas microbianas.	33

Lista de Tablas

Tabla	Página
1. Microorganismos con uso potencial para la generación de harinas microbianas.....	10
2. Composición proximal (%) de los principales microorganismos cultivados para la síntesis de proteína microbiana. Modificado de Nasser <i>et al.</i> (2011).	15
3. Composición de proteína (%) de harina microbiana (biofloc).	15
4. Contenido de materia orgánica ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de la harina microbiana producida en un reactor aeróbico intermitente (batch) con diferentes relaciones C:N (30:1, 15:1 y 8.5:1).	26
5. Peso seco total ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de la harina microbiana producida en un reactor aeróbico intermitente (batch) con diferentes relaciones C:N (30:1, 15:1 y 8.5:1).	27
6. Peso de cenizas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de la harina microbiana producida en un reactor aeróbico intermitente (batch) con diferentes relaciones C:N (30:1, 15:1 y 8.5:1).	27
7. Contenido de fenoles totales en la harina microbiana (mg g^{-1} de materia seca (m.s)) producida en un reactor aeróbico intermitente (batch) con diferentes relaciones C:N (30:1, 15:1 y 8.5:1).	28
8. Contenido de fenoles totales (mg g^{-1} de m.s.) en las harinas de orujo (HO) y microbiana (HM) para la relación C:N 8.5:1 al tiempo 6.	28
9. Contenido de Flavonoides de la harina microbiana (mg g^{-1} de m.s.) producida en un reactor aeróbico intermitente (batch) con diferentes relaciones C:N (30:1, 15:1 y 8.5:1).	29
10. Contenido de flavonoides totales (mg g^{-1} de m.s.) en las harinas de orujo (HO) y microbiana (HM) para la relación C:N 8.5:1 al tiempo 6.	29
11. Contenido de proteína (mg g^{-1} de m.s.) de la harina de orujo (HO) y la harina microbiana (HM) para la relación C:N 8.5:1 al tiempo 6.	30
12. Contenido de lípidos en harina microbiana (mg g^{-1} de m.s.) producida en un reactor aeróbico intermitente (batch) con diferentes relaciones C:N (30:1, 15:1 y 8.5:1).	31
13. Contenido de lípidos totales (mg g^{-1} de m.s.) de la harina de orujo (HO) y la harina microbiana (HM) para la relación C:N 8.5:1 al tiempo 6.	31
14. Contenido de carbohidratos totales de la harina microbiana (mg g^{-1} de m.s.) producida en un reactor aeróbico intermitente (batch) con diferentes relaciones C:N (30:1, 15:1 y 8.5:1).	32
15. Contenido de Carbohidratos totales (mg g^{-1} de m.s.) de la harina de orujo (HO) y la harina microbiana (HM) para la relación C:N 8.5:1 al tiempo 6.	32

Capítulo 1. Introducción

1.1 La producción de la harina de pescado y su uso en la acuicultura

La harina de pescado es uno de los ingredientes más utilizados en la formulación de dietas en animales acuáticos y terrestres. En el 2020, se produjeron 178 millones de toneladas de pescado por pesca y acuicultura, de las cuales 16 millones de toneladas se destinaron a la producción de harina (HP) y aceite de pescado (AP) (FAO, 2022). Entre las actividades pecuarias y acuícolas, dependientes de HP como ingrediente para la alimentación, la acuicultura es la actividad que demanda la mayor cantidad de este insumo. Por ejemplo, en el 2020 la acuicultura utilizó el 86 % de la HP consumida a nivel global (FAO, 2022; Tacon y Metian, 2015).

Dado que la actividad acuícola mantiene un ritmo de crecimiento del 2.6 % anual durante el periodo de 2019 - 2020, en comparación con la pesca (FAO, 2022), el uso de HP como ingrediente en las dietas de especies carnívoras, se vuelve una práctica insostenible, debido a los efectos ecológicos que genera la sobrepesca de las especies marinas utilizadas para la elaboración de harina y aceite de pescado, ya que las especies mayormente capturadas para la producción de HP son esenciales en la cadena alimentaria de los ecosistemas marinos, lo que genera una alteración en las dinámicas poblacionales de estos ecosistemas (Niles *et al.*, 2014). Adicionalmente, esto también provoca un impacto en las poblaciones locales humanas, que dependen de la pesca local para el autoconsumo y sustento, afectando su económica y seguridad alimentaria (Konar *et al.*, 2019).

Los niveles típicos de inclusión de proteínas en los alimentos para las especies de peces carnívoros van de un 29 a 30 % (Tacon y Metian, 2015). Como consecuencia del déficit en la disponibilidad de HP y por sus precios cada vez mayores, surgen alternativas que promueven a una acuicultura responsable, buscando fuentes proteicas alternativas para su uso como ingredientes en dietas que complementen o reemplacen a la HP como fuente de proteínas. Una de estas alternativas es el uso de harinas vegetales. Sin embargo, la futura disponibilidad de estas harinas se ve afectada por la demanda de alimentos para la población humana y para la ganadería. Además, la presencia de factores antinutricionales y la restricción de algunos aminoácidos, limitan su uso o generan un costo adicional para su procesamiento. Por ello, Paraskevopoulou *et al.* (2003) proponen como una alternativa el uso de harinas microbianas para la sustitución de las harinas de pescado y vegetales.

1.2 El uso de microorganismos o proteína unicelular como fuente de proteína en dietas para la acuicultura

La sustitución de HP por otras fuentes de proteína en las dietas ha generado una disminución en el empleo de este ingrediente, lo que ha propiciado un consumo eficiente y ha permitido reducir su inclusión en las dietas (Shepherd y Jackson, 2013). Una de las alternativas prometedoras para la sustitución de la HP es la utilización de harinas generadas a partir de biomasa microbiana (Jones *et al*, 2020). Algunos ejemplos son el uso de levaduras como *Candida utilis* en dietas para salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Øverland *et al.*, 2013), la harina de biofloc en dietas de camarón (Dantas *et al*, 2016) y el uso de harina bacteriana en dietas de Salmon Atlántico y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Øverland *et al*, 2010).

La proteína microbiana o proteína unicelular es aquella que se genera a partir de organismos como bacterias, levaduras o microalgas, cultivados bajo condiciones específicas, que favorecen la síntesis celular y que posteriormente son utilizados como harina tras su cosecha y secado (Najafpour, 2007).

Algunas de las características que se tienen que tomar en cuenta para seleccionar el tipo de microorganismo para la producción de biomasa son: 1) que generen un alto contenido de proteínas, 2) un rápido crecimiento y 3) sustrato de carbono a utilizar (Gamboa-Delgado y Márquez-Reyes, 2016).

Entre los microorganismos que se pueden utilizar para la producción de harina microbiana, las bacterias son candidatos de interés ya que tienen un rápido crecimiento y tiempos generacionales cortos, pudiendo multiplicar su masa celular en periodos de 20 min a 2 horas (Bogale, 2020). Pueden utilizar diferentes sustratos para crecer, como carbohidratos complejos (celulosa) y simples (azúcar) como principal fuente de carbono. Sin embargo, también pueden metabolizar el carbono procedente de otras macromoléculas como proteínas y lípidos (Jurtshuk, 1996). Otro factor importante es la fuente de nitrógeno que es útil para la formación de los aminoácidos, que son utilizados para la síntesis de proteínas que se destinan al crecimiento celular. Estas fuentes de nitrógeno incluyen las sales amoniacales y el nitrógeno orgánico contenido en los desechos orgánicos (Bogale, 2020).

Las bacterias necesitan agua, una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y algunas sales minerales para su desarrollo, catabolismo y anabolismo. Los macronutrientes como C, H, O, N, P, S, K, Mg y micronutrientes como Co, Cu, Zn y Mo son esenciales para su desarrollo (Caycedo *et al.*, 2021).

Para facilitar la proliferación de bacterias, se han utilizado medios nutritivos formulados con una mezcla

de melaza, urea, fosfato monocalcico, macronutrientes (e.g., cloruro de amonio, cloruro de calcio, fosfato de potasio, sulfato de magnesio) y micronutrientes (e.g., manganeso, zinc y níquel) (Kathleen Park y Barry, 2017).

Entre las rutas catabólicas bacterianas podemos distinguir dos: 1) aeróbica y 2) anaeróbica o fermentativa, en ambas rutas el sustrato catabolizado es la glucosa. En la ruta aeróbica el receptor final de electrones en la cadena de transporte de electrones es el oxígeno, esta ruta se considera más eficiente debido a que se producen 38 moléculas de ATP (energía) por cada molécula de glucosa catabolizada (Jurtschuk, 1996). Mientras que en la ruta anaeróbica o fermentativa se requiere un compuesto orgánico como receptor final de electrones, los productos orgánicos finales se secretan al medio como metabolitos de desecho (generalmente alcohol o un ácido orgánico) y por cada molécula de glucosa catabolizada se generan solo 2 moléculas de ATP, por lo que la producción de energía por la fermentación es menos eficiente (Ciani *et al.*, 2008).

Entre los microorganismos aeróbicos, se pueden distinguir dos grupos: los autótrofos y heterótrofos. Para los organismos autótrofos todo el carbono celular deriva del dióxido de carbono, mientras que, por su forma de obtener energía, se pueden clasificar en tres categorías: (1) Los fotoautótrofos (fotosintéticos), que obtienen la energía de la luz solar. (2) Los quimiolitautótrofos, que obtienen la energía mediante la oxidación de sustancias inorgánicas y (3) los heterotróficos que obtienen su energía mediante la oxidación de moléculas orgánicas (e.g., carbohidratos, proteínas y lípidos).

Las bacterias heterotróficas utilizan una fuente de carbono orgánico para producir biomoléculas como lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos (síntesis celular) (Caycedo *et al.*, 2021). La capacidad de síntesis y crecimiento celular es dependiente del metabolismo y velocidad de degradación del sustrato metabólico (fuente de carbono) (Monod, 1949). Los azúcares simples (e.g., monosacáridos, disacáridos y trisacáridos) son rápidamente degradados. Mientras que la celulosa y las hemicelulosas tienen un tiempo de degradación intermedio y finalmente los fenoles tienen una degradación lenta (Fenchel *et al.*, 2012).

Por lo anterior, es importante determinar la cantidad y tipo de fuente de carbono a utilizar. Las bacterias heterotróficas utilizan el carbono orgánico para obtener energía, pero también utilizan alguna forma de nitrógeno inorgánico presente en el agua como sustrato para producir proteínas durante su crecimiento celular y multiplicación (Avnimelech, 2009).

Los cultivos de estos microorganismos generan agregados microbianos, por procesos como la adhesión de

bacterias de cepas genéticamente idénticas, también denominada autoagregación, mientras que la adhesión entre cepas genéticamente distintas, de la misma especie o de especies diferentes, se denomina coagregación (Nwoko y Okeke, 2021). Por lo tanto, los bioflóculos se pueden definir como una coagregación de bacterias, algas, protozoarios, detritus y materia orgánica (Avnimelech, 2009). La manera de producir biomasa autotrófica, heterotrófica o ambas, dependerá del tipo y cantidad de nutrientes y la fuente de carbono usada en los sistemas de cultivo, para inducir la dominancia de alguna comunidad bacteriana (Gamboa-Delgado y Márquez-Reyes, 2018).

Los microorganismos autotróficos se caracterizan por un crecimiento lento y por el uso de carbono inorgánico como fuente de energía (carbonatos y bicarbonatos), también utilizan una fuente de nitrógeno inorgánica, principalmente amonio (NH_4^+) (Ward, 2008). Al tener una tasa de duplicación lenta, no pueden competir con los microorganismos heterotróficos que tiene una tasa de duplicación mayor y crecen rápidamente. De esta forma si los microorganismos disponen de una fuente de carbono orgánico, utilizan rápidamente el nitrógeno biodisponible para su replicación. En estas condiciones, limitan el crecimiento de los microorganismos autótrofos (Samocho y Prangnell, 2019).

Para obtener el nitrógeno necesario para sus funciones metabólicas, los microorganismos heterotróficos pueden excretar enzimas proteolíticas que digieren algunos péptidos y proteínas, liberando el nitrógeno del grupo amino de los aminoácidos (Zehr y Ward, 2002). La asimilación de este nitrógeno se lleva a cabo mediante dos vías: 1) una que involucra un transportador de amonio de alta afinidad (codificado por *amtB*), que mueve el amonio dentro de la célula, donde se combina con el glutamato, para formar glutamina, mediante la enzima glutamina sintetasa (GS), 2) un sistema de transporte de baja afinidad en el que el amoníaco se transporta pasivamente al interior de la célula (a través de difusión) y se combina con α -cetoglutarato mediante la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) para producir glutamato (Damashek y Francis, 2018).

La ventaja de utilizar bacterias heterotróficas radica en que son capaces de producir una mayor cantidad de biomasa que las bacterias autotróficas y las fermentadoras. Las bacterias quimiolitotróficas tiene la capacidad de producir 0.2 g de biomasa por cada 1 g de NH_4^+ . Mientras que las bacterias heterotróficas producen 8.07 g de biomasa por cada 1 g de NH_4^+ (Ebeling *et al.*, 2006).

Las bacterias heterótrofas obtienen energía por la oxidación de compuestos orgánicos como carbohidratos, lípidos y proteínas. Para que el proceso sea eficiente, es necesario tener una relación carbono:nitrógeno adecuada, usualmente la relación C:N de una célula bacteriana es de 4.6:1 (Metcalf &

Eddy Inc *et al.*, 2014). A pesar de que la fracción de carbono es mayor, se necesita aumentar más la relación debido a que solo una parte de carbono que se toma del sustrato metabolizado se destina a la síntesis de biomasa bacteria, mientras que otra parte de carbono se pierde durante el catabolismo en forma de CO₂ (Muñoz-Elías y McKinney, 2006) por lo que generalmente se agrega al sistema una fuente de carbono externa, principalmente carbohidratos para propiciar el crecimiento y dominancia de este tipo de bacterias (Jurtshuk, 1996). El tipo de carbohidrato utilizado determina la calidad nutricional del bioflóculo, y se ha demostrado que la biodisponibilidad de la fuente y tipo de carbono determina la composición de las comunidades microbianas, así, al utilizar glucosa y glicerol, se observa una dominancia de *Proteobacterias* y *Bacteroidetes*. En contraste, con el uso de almidón se puede observar el predominio de *cianobacterias*, que tienen una marcada diferencia en el contenido de proteínas, lípidos, carbohidratos y cenizas (Wei *et al.*, 2016). Sin embargo, cuando se analiza el valor nutricional de la mayoría de las harinas microbianas, producidas con diferentes fuentes de carbono, solo se describe su composición proximal, ya que la fuente de carbono puede afectar la composición nutricional de la harina. Sin embargo, hay fuentes de carbono derivadas de subproductos agroindustriales que además de aportar carbono, contienen otras moléculas que se acumulan como los compuestos fenólicos y pueden ser de interés al utilizar a las harinas microbianas como fuente de proteína y simultáneamente también como antioxidante para la formulación de alimentos.

El crecimiento microbiano se puede describir mediante un modelo que consiste en cuatro fases típicas de crecimiento (figura 1) (Bhatia, 2015).

- I. Fase de retraso: Las bacterias ajustan su metabolismo a las condiciones ambientales y a la concentración de nutrientes, su tasa de crecimiento es cero y se define como la transición a la fase exponencial. En esta fase comienza la síntesis de ARN mensajero (ARNm), específico para la síntesis de proteínas en la fase exponencial o logarítmica (Maier, 2009).
- II. Fase logarítmica o fase exponencial de crecimiento: durante esta fase las células se dividen rápidamente, provocando un aumento logarítmico en el número de células y un consumo de nutrientes máximo. En esta fase la síntesis de biomasa es más intensa y dado que el contenido de proteína en una célula bacteriana es del 55 % de proteína en base seca, se producirá la mayor cantidad de proteína en un cultivo (Allen y Waclaw, 2019).
- III. Fase estacionaria: Se caracteriza porque la tasa de división celular del cultivo disminuye, el número de células se estabiliza y finalmente se detiene el crecimiento, si las células se dejan en la fase

estacionaria demasiado tiempo, morirán. Metabólicamente las bacterias entran en un estado de estrés debido al agotamiento de nutrientes y comienzan a acumular reservas energéticas como: ácidos grasos, triacilgliceroles, polihidroxicanoatos, polifosfatos y glucógeno (Wang *et al.*, 2019).

- IV. Fase de muerte: se produce una reducción del número de células viables en el cultivo, esta fase a menudo se da de manera exponencial, aunque la tasa de la muerte celular suele ser más lenta que la tasa de crecimiento durante la fase exponencial. En esta fase, cuando las células mueren pueden liberar nutrientes al medio, que pueden ser reutilizadas por otras células (Maier, 2009).

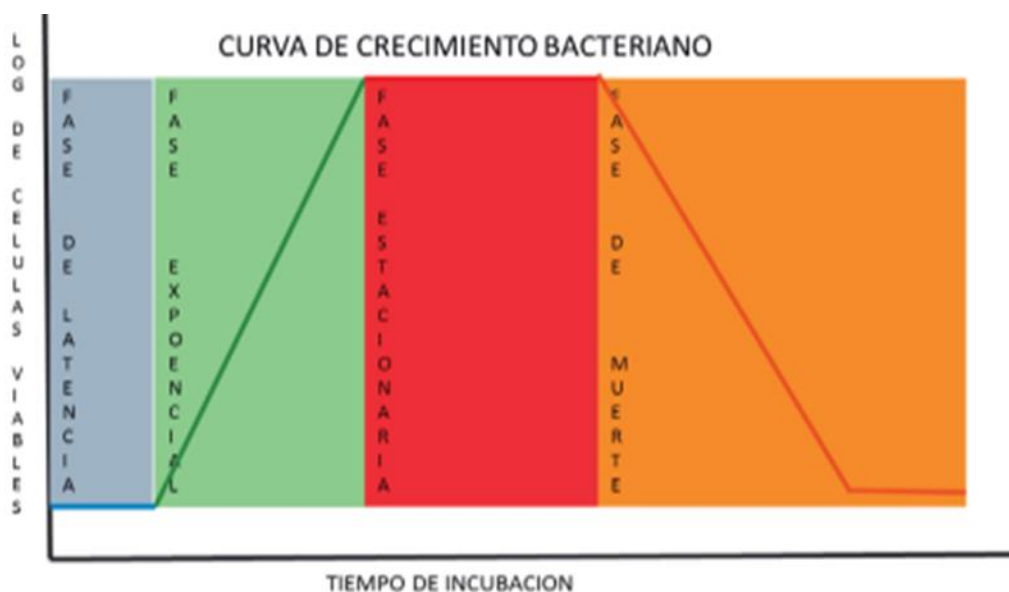


Figura 1. Fases en la curva de crecimiento bacteriano: 1) latencia, 2) exponencial, 3) estacionaria y 4) muerte obtenida de Bhatia (2015).

El cultivo de estos microorganismos se puede hacer en recipientes, tanques o contenedores que se denominan biorreactores, en estos las células pueden crecer de manera libre al transformar materias primas (nutrientes) en productos químicos o subproductos con aplicación biotecnológica, estos biorreactores pueden funcionar de manera discontinua o de forma continua, aeróbica o anaeróbica, y con cultivos puros (una cepa) o mixtos (diferentes cepas) (Erickson, 2009).

El cultivo discontinuo o batch es un sistema de cultivo cerrado que contiene una solución nutritiva esterilizada de nutrientes que se agrega al sistema, posteriormente se inocula con microorganismos y se incuba bajo condiciones ambientales (temperatura, pH, aireación) adecuadas que permiten su crecimiento. Las células crecen en un volumen finito de medio, finalmente la biomasa producida es cosechada en su totalidad al final del proceso (Behera y Varma, 2017).

1.3 El orujo de uva como fuente de carbono y su potencial como antioxidante

El orujo de uva es un subproducto residual derivado de la industria vinícola, se obtiene después del proceso de prensado que se les da a las uvas para la obtención de su jugo, durante este proceso se obtiene dos productos: 1) jugo de la uva o mosto y 2) el bagazo residual u orujo de uva. El orujo de uva está constituido principalmente por la piel, semillas y tallos de la uva. Cada uno de estos productos se compone de lípidos, proteínas, carbohidratos y fenoles, en diferentes proporciones (García-Lomillo y González-SanJosé, 2017).

Los carbohidratos se pueden clasificar dependiendo de la complejidad de su estructura, desde carbohidratos simples como monosacáridos hasta carbohidratos de mayor complejidad como la celulosa. Los fenoles pueden ser simples o poliméricos como las ligninas (Spinei y Oroian, 2021). Los compuestos fenólicos se generan mediante el metabolismo secundario de las plantas (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). Estas moléculas se caracterizan por su capacidad antioxidante, debido a que tienen grupos hidroxilo ubicados en el anillo aromático, esto les permite donar hidrógenos a moléculas oxidantes, evitando la oxidación de lípidos y otras biomoléculas (Brenes *et al.*, 2016).

El análisis bioquímico del orujo ha revelado un contenido diverso de proteínas, lípidos, carbohidratos y compuestos fenólicos, que dependen del tipo de uva (roja o blanca), su variedad, las condiciones climáticas del cultivo y las prácticas de procesamiento de la uva durante la fermentación y el prensado (Jin *et al.*, 2019). El contenido de proteínas en los orujos de uva es bajo (8.49 %) (Spinei y Oroian, 2021), en comparación con el contenido de proteína de la harina de pescado (55 - 65%) (Cabello *et al.*, 2013). No obstante, el orujo de uva tiene un contenido de 29.2 % de carbohidratos (Spinei y Oroian, 2021). Estos carbohidratos son una fuente rica en carbono, que puede ser utilizada por los microorganismos heterótrofos como fuente de energía, para sustentar los procesos de producción de biomasa microbiana, con un perfil proteico adecuado y manteniendo una concentración de fenoles con capacidad antioxidante.

La disponibilidad de subproductos agroindustriales, sumada a las características metabólicas de los microorganismos heterótrofos que hacen posible la producción de proteínas microbianas, estimulan el interés de generar harinas nutricionalmente adecuadas y enriquecidas con moléculas antioxidantes. Este estudio tiene como propósito la reutilización de un subproducto rico en carbono y compuestos fenólicos para la producción de una harina microbiana con un contenido adecuado de proteínas y compuestos antioxidantes.

1.4 Antecedentes

1.4.1 La Relación C:N y la tasa de consumo de oxígeno como indicador de crecimiento microbiano

La relación C:N es la relación entre el contenido de carbono y nitrógeno de una sustancia (Brust, 2019). Y su importancia en los cultivos microbianos erradica en el uso de nitrógeno inorgánico para metabolizar el carbono orgánico y generar biomoléculas que componen las células microbianas, si la fuente de carbono es rápidamente metabolizada, se reflejará en un aumento en la tasa de replicación celular (biomasa), pero si se utiliza una fuente de carbono más compleja (e.g., celulosa, hemicelulosa, fenoles y lignina), la síntesis de biomasa será más lenta (Bogale, 2020).

Algunas de las técnicas para medir el crecimiento de microorganismos, como bacterias, se basan en el análisis espectrofotométrico, en el recuento celular por microscopía y en el recuento de células viables. Sin embargo, el uso de estas técnicas puede subestimar o sobrestimar la cantidad de células totales, además, el proceso de biofloculación puede dificultar la cuantificación, ya que impide la separación individual de las células. Otra limitante de algunas técnicas convencionales es que se pueden contar de manera indistinta tanto células vivas como muertas, lo que reduce la precisión de las estimaciones del crecimiento microbiano (Madigan *et al.*, 2015).

Otra manera de estimar la biomasa producida es mediante la cuantificación de los sólidos suspendidos volátiles (VSS, por sus siglas en inglés *volatile suspended solids*), que son la fracción orgánica de una muestra de sólidos suspendidos de un cultivo microbiano. Cuando se cultivan microorganismos a partir de sustratos solubles, como el nitrógeno amoniacal o nitratos y una fuente de carbono también soluble como azúcar o melaza, los sólidos que se acumulan en el sistema corresponden a biomasa microbiana. Sin embargo, cuando se utiliza un sustrato orgánico que contiene una fracción importante de material insoluble (e.g., polifenoles o lignina) estos contribuyen una parte de los VSS debido a que son materia orgánica no viva que es estimada con esta técnica. De esta forma, la materia orgánica no viva forma parte de la fracción orgánica viva (microorganismos o biomasa microbiana) lo que lleva a sobreestimar la biomasa microbiana.

Por lo anterior, el uso de una técnica respirométrica es una alternativa para la medición indirecta del crecimiento microbiano, dado que la tasa de consumo de oxígeno es proporcional a la cantidad de

microorganismos aeróbicos presentes en un biorreactor. Por lo tanto, a mayor cantidad de microorganismos mayor es la tasa de consumo de oxígeno. La tasa de consumo de oxígeno se puede cuantificar mediante la medición de la reducción de la concentración del oxígeno disuelto en una cámara cerrada herméticamente, que contiene una muestra del cultivo microbiano. Se registran la concentración inicial y final de oxígeno disuelto (OD) durante un tiempo finito durante la cual la condición es aeróbica. A partir de estas medidas se puede calcular la tasa de consumo de oxígeno. Esta medida se expresa en mg O₂ consumido por unidad de tiempo y por unidad de volumen o de masa (mg de O₂ min⁻¹) (Hagman *et al.*, 2007).

La tasa de consumo de oxígeno (análisis respirométrico), se ha utilizado para medir el crecimiento de *Escherichia coli* y se ha observado que durante la etapa de crecimiento exponencial consumen la mayor cantidad de oxígeno (en un periodo de 3 h), posteriormente la tasa de consumo se mantiene constante, lo que indica que las bacterias se encuentran en su fase estacionaria, en la cual la población no se encuentran creciendo y finalmente, la tasa de consumo de oxígeno de los microorganismos se reduce, lo que indica que se encuentran en la fase de muerte (Çalik *et al.*, 2006). Este comportamiento fue similar para el cultivo de *Rhodococcus erythropolis*, ya que la mayor cantidad de células (biomasa) coincide con la etapa en que la concentración de oxígeno disuelto llega a su mínima concentración, lo que indica que durante la fase de crecimiento exponencial se registra la mayor intensidad metabólica (Olmo *et al.*, 2005).

1.4.2 Microorganismos utilizados para la generación de harinas microbianas con residuos agroindustriales

Algunos microorganismos como hongos y bacterias tienen un uso en la industria agropecuaria debido a su capacidad de degradar residuos agroindustriales (Matos Trujillo *et al.*, 2020) Estos microorganismos tienen la capacidad de sintetizar enzimas extracelulares que degradan compuestos hemicelulolíticos como el xilano (Cooper Bribiesca, 2013). Las bacterias como *Bacillus subtilis* tienen cuatro genes relacionados a la síntesis de xilanasas: el gen *xyn A*, que sintetiza la endo-1,4 beta-xilanasas, que despolimeriza el xilano para producir metilglucurono xilotetraosa y xilooligosacáridos. El gen *xyn B*, que codifica para β-xilosidasa. El *xyn C*, que codifica endoxilanasas de la familia GH30 (glucuronoxilanasas) y el gen *xyn D* arabinoxilano (arabinofuranohidrolasa) que se encarga de liberar arabinosa a partir de metilgalacturono xilanos (Chakdar *et al.*, 2016).

Una consideración importante para el cultivo de harinas microbianas es la capacidad metabólica de algunos microorganismos para utilizar sustratos hemicelulolíticos. Sin embargo, también se deben considerar algunas otras propiedades, como el no ser patógenos para las plantas, humanos y animales, deben tener buenos valores nutricionales, no deben contener compuestos tóxicos y que el costo de su producción sea bajo (Adedayo *et al.*, 2011). En la Tabla 1 se enlista algunos de los microorganismos con uso potencial para la generación de harinas microbianas.

Tabla 1. Microorganismos con uso potencial para la generación de harinas microbianas.

Micorganismo	Sustrato	Referencia
Bacteria		
<i>Bacillus pumilis</i>	Residuos del procesamiento de fécula de papa	(Liu <i>et al.</i> , 2013)
<i>Rhodobacter sphaeroides P47</i>	Residuos de piña	(Noparatnaraporn y Nagai, 1986)
<i>Rhodocyclus gelatinosus</i>	Residuos de yuca	(Noparatnaraporn <i>et al.</i> , 1987)
Hongos		
<i>Chrysonilia sitophilia</i>	Lignina	(Rodríguez <i>et al.</i> , 1997)
<i>Penicillium citrinum</i>	Salvado de arroz	(Valentino <i>et al.</i> , 2016)
<i>Aspergillus niger</i>	Orujo de manzana	(Bhalla y Joshi, 1994)
<i>Aspergillus niger</i>	Residuos del procesamiento de fécula de papa	(Liu <i>et al.</i> , 2014)
<i>Candida tropicalis</i>	bagazo de caña	(Pessoa <i>et al.</i> , 1996)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Residuos de cervecería	(Duarte <i>et al.</i> , 2008)

1.4.3 Sistemas de cultivo para la producción de harinas microbianas

En los sistemas biofloc (BFT, por sus siglas en inglés *Biofloc technology*), tiene como objetivo reducir el nitrógeno amoniacal (NAT) de los sistemas de cultivo de organismos acuáticos (peces y crustáceos), mediante el metabolismo de bacterias heterotróficas que se mantienen en suspensión aplicando una aireación constante. Para promover al crecimiento y dominancia de bacterias heterotróficas es necesaria la adición de una fuente de carbono externa. Se han utilizado fuentes de carbono de rápida asimilación

metabólica como la melaza y el azúcar (Huang *et al.*, 2022; Lima *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2016); sin embargo, también se han utilizado fuentes de carbono más complejas como harina de trigo (Rajkumar *et al.*, 2016), harina de maíz (Kaya *et al.*, 2019) y residuos de cerveza (Duarte *et al.*, 2008). Una consecuencia de esta forma de control amoniacal, es la producción de alimento in situ (bioflóculos compuestos por bacterias y una comunidad microbiana diversa), esta se consideran harina microbiana, pero su principal diferencia es que la harina de biofloc se genera en el sistema junto con organismos como peces o crustáceos, a diferencia de un biorreactor donde el cultivo es exclusivamente solo para microorganismos. Se ha utilizado harina de biofloc en la dieta de postlarvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* y se ha mostrado que un reemplazo del 30 % en la proteína mejora el crecimiento del camarón (Dantas *et al.*, 2016).

Algunos otros sistemas que se han utilizado para producir harinas microbianas son los reactores de lodos activados. Estos reactores están constituidos por tres compartimientos: un tanque para almacenamiento de agua, un tanque de fibra de vidrio (reactor) y una cámara de sedimentación de fibra de vidrio. Para mantener el flujo del agua se utilizan bombas dosificadoras (Neto *et al.*, 2015). También se han utilizado reactores de un solo contenedor (reactor de bacterias) para la generación de harina de biofloc, alimentado con agua proveniente de tanques de cultivo con peces. En estos reactores se agrega directamente la fuente de carbono, además se inyecta O₂ puro para mantener condiciones aeróbicas (mayores a 2 mL/L), el pH se mantiene entre 7 y 7.2 y la temperatura a 28 °C (Schneider *et al.*, 2006) que son las condiciones apropiadas para el cultivo de microorganismos heterotróficos.

1.4.4 El orujo de uva y su potencial como fuente de carbono

El uso de fuentes de carbono derivadas de residuos agroindustriales para el crecimiento de bacterias heterotróficas es una alternativa prometedora, ya que por un proceso de bioconversión se pueden utilizar carbohidratos complejos que tiene poca utilidad, como los materiales hemicelulósicos (Najafpour, 2007).

En México, el volumen de la producción de uva destinada a la elaboración de vinos de mesa fue de 78 mil toneladas en el 2022 (SIAP, 2023). Los orujos de uva son un subproducto que deriva del proceso de vinificación. Los orujos rojos se obtienen como resultado del prensado que se realiza para la obtención del jugo fermentado de la uva y del jugo no fermentado para el caso de los orujos blancos. El orujo está constituido principalmente por el epicarpio (piel u hollejo), las semillas y los tallos del racimo (Dávila *et al.*, 2017). El orujo puede representar el 20 % del volumen total de la uva no procesada (Schieber *et al.*, 2001), contiene carbohidratos complejos como lignina y celulosa, que representan del 16.8 al 24.2 % y del 27 al

37 %, respectivamente (Spinei y Oroian, 2021). También contiene azúcares simples y su contenido depende del tipo de orujo y de la variedad de la uva, para los orujos blancos va de 6.86 a 53.33 g kg⁻¹ de glucosa y de 7.47 a 52.9 g kg⁻¹ de fructosa en base seca. Mientras que para los orujos rojos el contenido de glucosa es de 2.09 a 6.18 g kg⁻¹ y el de fructosa de 3.79 a 10.9 g kg⁻¹ en base seca (Jin *et al.*, 2019). Los tallos son el “esqueleto” del racimo de uva, usualmente se incluyen en el procesamiento del vino. Se componen de celulosa (30.3 %), hemicelulosa (21 %), lignina (17.4 %), taninos (15.9 %) y proteínas (6.1 %) (Prozil *et al.*, 2012).

Las semillas de uva contienen compuestos fenólicos simples derivados del ácido hidroxibenzoico como el ácido gálico, ácido cinámico y polifenoles como quercetina y catequina (Moreno *et al.*, 2020). La piel de la uva u hollejo es el principal componente en los orujos, representa la mitad de su masa y contiene los polifenoles que se localizan en la capa interna del epicarpio (hipodermis) y se clasifican en: 1) fenoles que están unidos con polisacáridos mediante interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno. 2) fenoles que no pertenecen a la pared celular, fenoles confinados en las vacuolas de las células vegetales y fenoles asociados con el núcleo celular. Algunos de estos compuestos son: antocianinas, flavanoles, ácido hidroxibenzoico, estilbenos, ácido hidroxicinámico y flavan-3-oles (Dávila *et al.*, 2017).

1.4.5 Compuestos fenólicos en el orujo de uva y su capacidad antioxidante

Los fenoles son de los compuestos más diversos en el reino vegetal. Son moléculas que contienen un anillo aromático con varios grupos hidroxilo (Beres *et al.*, 2017). Los compuestos fenólicos, que se encuentran en la uva y el vino se pueden clasificar en dos grupos: fenoles simples (ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinámico) y los polifenoles (flavonoides, estilbenos y taninos) (Peixoto *et al.*, 2018). Estas moléculas por sus características químicas pueden actuar como agentes reductores, eliminando los radicales libres y ejerciendo un efecto antioxidante. Los antioxidantes son sustancias que retardan la oxidación de biomoléculas, como los lípidos y las proteínas, mejorando la vida útil de los productos al protegerlos contra el deterioro por oxidación. Su capacidad antioxidante total se debe a que pueden donar hidrógenos provenientes de los grupos hidroxilo, ubicados en los anillos aromáticos.

En el orujo de uva se pueden encontrar una gran variedad de compuestos fenólicos, pero su importancia radica en la estructura que se presentan, los monoméricos o fenoles simples son menos potentes como captadores de radicales (donantes de hidrógeno) que los polifenoles (Figura 2) (Beres *et al.*, 2017).

Entre los compuestos fenólicos presentes en la uva y los vinos se encuentran los polifenoles como, los flavonoides que pueden reducir el oxígeno reactivo de los aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos, bloqueando el deterioro de las células o eliminando los procesos de peroxidación lipídica, dada la conformación de su estructura estos polifenoles son los que tiene mayor capacidad antioxidante (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

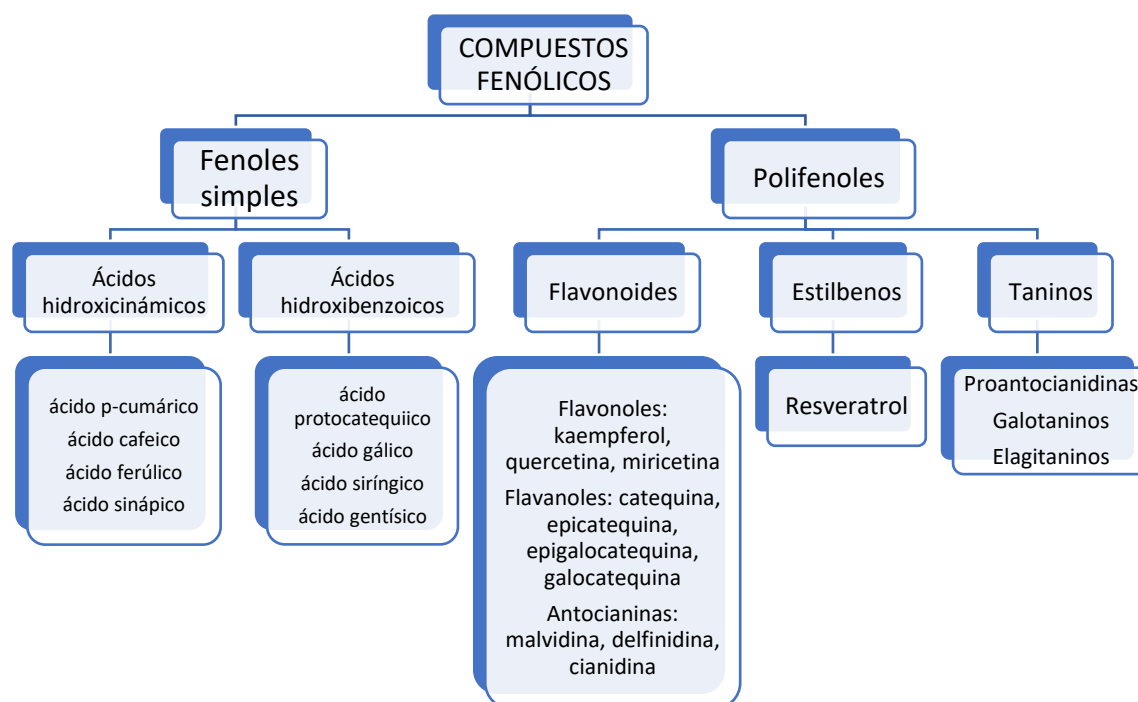


Figura 2. Tipos de compuestos fenólicos presentes en el orujo de uva. Modificado de Beres *et al.* (2017).

Se ha demostrado que el uso de los compuestos fenólicos contenidos en el té verde (*Camellia sinensis*) en una dosis de 100 mg kg^{-1} , suplementado en dieta de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) reduce la peroxidación lipídica y que la actividad de la Superóxido dismutasa (SOD) es mayor (Nootash *et al.*, 2013). También se ha probado el efecto de los polifenoles del maíz morado en la alimentación de trucha arco iris y se ha observado un aumento en la expresión del gen *GPx1*, que codifica para la glutatión peroxidasa (GP), junto con una disminución en los niveles de peroxidación lipídica y un incremento en la proporción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) (Villasante *et al.*, 2015).

Por otra parte, la suplementación de la dieta del pez cebra (*Danio rerio*), con 100, 150 y 200 mg kg^{-1} de extracto de cáscara de mango (PC), aumentó la actividad de la catalasa (CAT) y tuvo un efecto protector contra la peroxidación lipídica in vivo (Lizárraga-Velázquez *et al.*, 2019).

1.4.6 Degradación de compuestos fenólicos por microorganismos

Una consideración importante que se debe de tomar en cuenta cuando se utilizan productos naturales como fuente de compuestos antioxidantes, es que los compuestos aromáticos como los fenoles, pueden ser degradados por la acción de enzimas como las oxigenasas, producidas por las bacterias aeróbicas. (Schink *et al.*, 2000). Se han identificado una serie de bacterias que tienen la capacidad de degradar una amplia variedad de compuestos aromáticos, como *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus laterosporus*, *Alcaligenes eutrophus*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus sp.* y algunas especies del género *Pseudomonas* que se caracterizan por usar solamente compuestos aromáticos como fuente de carbono (Krastanov *et al.*, 2013).

La degradación de fenoles ocurre por vía aeróbica, como resultado de una hidroxilación en la posición *orto* del anillo aromático, mediante una fenol hidroxilasa (monooxigenasa) que forma catecol. Dependerá del tipo de cepa bacteriana la ruta de oxidación del catecol: 1) La orto-escisión es la ruta por la cual la catecol 1,2-dioxigenasa inicia la degradación que lleva a la formación de succinil Co-A y acetil Co-A. 2) La meta-escisión del semialdehído 2-hidroxi mucónico por medio de la enzima catecol 2,3-dioxigenasa lleva a la formación de piruvato y acetaldehído (Basha *et al.*, 2010).

Otro tipo de degradación de fenoles es mediante la ruta anaeróbica del benzoato. El primer paso en esta vía es la carboxilación del fenol en la posición *para* del anillo aromático a 4-hidroxibenzoato, aquí la enzima involucrada es la 4-hidroxibenzoato carboxilasa. La biodegradación anaeróbica de los compuestos fenólicos está mediada por una carboxilación seguida de una dihidroxilación (Mishra y Kumar, 2017).

Durante el proceso anaeróbico o fermentativo aproximadamente un 70% de compuestos fenólicos se conservan en los orujos de uva, a pesar de la degradación parcial que ocurre durante los procesos fermentativos (Ratnasooriya y Rupasinghe, 2012).

1.4.7 Composición nutricional de harinas microbianas

En general, las células microbianas pueden contener 25 % de materia seca, de la cual el 48.9 % es carbono, 5.2 % es hidrógeno, 24.8 % oxígeno y 9.46 % es nitrógeno (Avnimelech, 2009). Su composición nutricional varía, pero en general el promedio de la composición proximal de los principales organismos utilizados para la generación de proteína microbiana se muestra en la Tabla 2 (Nasseri *et al.*, 2011). Sin embargo, los

porcentajes de proteína varían dependiendo de las condiciones de cultivo y fuentes de carbono utilizadas (Tabla 3).

Tabla 2. Composición proximal (%) de los principales microorganismos cultivados para la síntesis de proteína microbiana. Modificado de Nasser *et al.* (2011).

Composición	Hongo	Alga	Levadura	Bacteria
Proteína (%)	30-45	40-60	45-55	55-65
Grasa (%)	2-8	7-25	2-6	1-3
Ceniza (%)	9-14	8-10	5-10	3-7
Ácidos nucleicos (%)	7-10	3-8	6-12	8-12

Tabla 3. Composición de proteína (%) de harina microbiana (biofloc).

Origen de la harina microbiana	Fuente de carbono	Proteína (%)	Referencia
Efluente de cultivo de tilapia	Azúcar	49.0	(Kuhn <i>et al.</i> , 2009)
Biofloc de <i>Litopenaeus vannamei</i>	Melaza	45.98	(Rajkumar <i>et al.</i> , 2016)
	Harina de tapioca	52.01	
	Harina de trigo	53.65	
Biofloc de <i>Oreochromis niloticus</i>	Melaza	42.01	(Becerril-Cortés <i>et al.</i> , 2018)
	Desperdicio de café	30.28	
	Salvado de arroz	47.99	
Biofloc de <i>Litopenaeus vannamei</i>	Melaza	36.53	(Ibarra Mayorga <i>et al.</i> , 2019)

1.5 Justificación

El uso de HP como fuente de proteínas para la formulación de alimentos para especies de peces carnívoros es una práctica insostenible, por sus efectos ecológicos y pesqueros, por los altos niveles de inclusión en la formulación de dietas y por el aumento de su precio. En la actualidad, se buscan alternativas que puedan complementar o reemplazar a este producto, teniendo como opción el uso de las harinas microbianas. Las

harinas microbianas se pueden producir mediante el cultivo de microorganismos heterotróficos. Estos organismos tienen un mejor desempeño en su síntesis celular, ya que pueden producir mayor cantidad de biomasa con un buen perfil nutricional. Sin embargo, un requisito metabólico de las bacterias heterotróficas es una fuente de carbono orgánico, que se agrega al medio de cultivo. Los residuos agroindustriales como el orujo de uva son un subproducto no utilizado de la industria vinícola, volviéndose de interés para su uso como fuente de carbono en los cultivos de bacterias heterotróficas. Por su contenido de compuestos fenólicos, el orujo de uva podría utilizarse también como una fuente de antioxidantes. Esta alternativa productiva ofrece la posibilidad de generar una harina con valor nutricional y a su vez con capacidad antioxidante. Por lo tanto, en este trabajo se plantea el uso del orujo de uva como fuente de carbono para el cultivo de bacterias heterotróficas en reactores aeróbicos, con la finalidad de producir harina microbiana que contenga un alto valor proteico y antioxidante.

1.6 Hipótesis

La biotransformación del orujo de uva en biorreactores batch generará una harina bacteriana con una fracción proteica mayor al 35 % y un contenido residual de compuestos fenólicos superior al 70%.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo general

Producir harina bacteriana con un porcentaje de proteína mayor al 35% y una presencia mínima del 70% de compuestos fenólicos no degradados por la biotransformación del orujo de uva a harina microbiana.

1.7.2 Objetivos específicos

- Generar harina de orujo de uva a partir de orujo húmedo residual del proceso de vinificación.
- Cuantificar la composición proximal de la harina de orujo de uva.
- Cuantificar la cantidad de fenoles totales y flavonoides de la harina del orujo de uva.

- Generar harina microbiana a partir de cultivos de microorganismos heterotróficos utilizando la harina de orujo como fuente de carbono.
- Cuantificar la composición proximal de la harina microbiana generada a partir orujo de uva.
- Cuantificar la cantidad de fenoles totales y flavonoides de la harina microbiana generada a partir de orujo de uva.

Capítulo 2. Metodología

2.1.1 Obtención del orujo

El orujo de uva, de la variedad nebbiolo (*Vitis vinifera*), fue donado por el viñedo Don Raúl ubicado en callejón de la liebre, Avenida Emiliano Zapata 107, 22755, El Porvenir, B.C. Un lote de 40 kg de orujo húmedo se trasladó a las instalaciones del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California, en donde se secó en una estufa a 60 °C durante 42 h y se trituroó en un molino “pulvex” de 1.5 HP con una malla de 0.2 mm para generar una harina de partícula fina.

2.1.2 Diseño experimental

Los reactores tipo batch consistieron en botellones de vidrio con un volumen de 20 L, provistos de un tapón de caucho para garrafones de vidrio, con dos salidas para mangueras de vinilo (3/8" o 1/2"). Para mantener las partículas en suspensión se utilizó aire filtrado a 1 µm suministrado por medio de mangueras de plástico que se conectaron a varillas de vidrio colocadas en los tapones de cada reactor. Los reactores se llenaron a 14 L con agua dulce pasada por luz UV, y a continuación esterilizada químicamente con 3 mL de hipoclorito de sodio (NaClO) por litro de agua. El cloro residual se neutralizó con 0.15 g de tiosulfato de sodio (Na₂S₂O₃) por litro de agua. Para iniciar los bioensayos, a cada biorreactor se le agregaron 10 g L⁻¹ de harina de orujo (figura 3).

Los tratamientos consistieron en 3 relaciones de C:N, 30:1, 15:1 y 8.5:1. La relación 30:1 es la nativa de la harina de orujo de uva, ya que sus contenidos de carbono y nitrógeno son de 49 y 1.6 % respectivamente. Las relaciones 15:1 y 8.5:1, se ajustaron con nitrógeno inorgánico, utilizando como fuente el NH₄Cl.



Figura 3. Biorreactores para el cultivo de harinas microbianas.

Los microorganismos cultivados fueron los que se encontraban de manera nativa en la harina de orujo, no se realizó ningún tipo de inóculo específico o maduro en este experimento.

La toma de muestras se realizó en intervalos de 8 h durante 72 h, se tomaron 200 mL del cultivo y se congelaron a -20°C para su análisis posterior. Las muestras analizadas fueron 4 tiempos: T0 (0 h), T3 (24 h), T4 (32 h), T5 (40 h) y T6 (48 h).

Para la obtención de la harina microbiana (HM) se tomaron 15 mL del cultivo, se congelaron y se liofilizaron durante 94 h.

2.1.3 Parámetros de cultivo

Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 28°C y con un pH de 4.3 a 4.4, el cual se midió con un potenciómetro (ThermoOrion® modelo 230 021A). El valor de pH se registró al agregar la harina de orujo a los biorreactores, y la acidez del pH se debe a que la harina de orujo viene de un proceso fermentativo anteriormente.

2.1.4 Cuantificación indirecta de crecimiento microbiano por respirometría

Se utilizó una cámara respirométrica de acrílico con un volumen de 7 mL, contenida en una cámara externa que permitió controlar la temperatura a 28°C con la ayuda de un baño de recirculación. La cámara se cerró herméticamente con un tapón que contenía un sensor de oxígeno de fibra óptica con una precisión de 0.000 mg L^{-1} acoplado a un analizador de oxígeno (FIBOX 3, PreSens) y una barra de agitación. La cámara se colocó sobre un agitador magnético que mantuvo la muestra homogénea durante el tiempo de medición.

Se tomó una muestra de cada biorreactor y se colocó dentro de la cámara respirométrica para su medición, se tomaron medidas cada 30 segundos por un periodo de 5 min. Estas mediciones se hicieron cada 8 h durante 72 h.

Con los datos obtenidos de la concentración de oxígeno (cada 30 segundos por 5 min), se calculó el consumo de oxígeno por unidad de volumen (1 mL) y por unidad de tiempo (1 h), se ajustaron a una

función lineal y se calculó la pendiente, que se expresó como la tasa consumo de oxígeno (OUR, por sus siglas en inglés, oxygen uptake rate) en mg de O₂ consumido por mL de cultivo por minuto. Cabe destacar que las OUR son proporcionales a la biomasa microbiana contenida en un volumen estándar (e.g. 1 mL) para cada tratamiento en cada etapa del cultivo, expresado como mg de O₂ / mL /min .

2.1.5 Estimación de Peso seco total (PST), Peso orgánico (PO) y Peso cenizas (PC)

Se tomaron alícuotas de 10 mL de las muestras de los tiempos T0, T3, T4, T5, T6 de cada tratamiento y se filtraron en filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C RTU de 47 mm de diámetro y 1.2 µm de retención de partículas, previamente incinerados. Los filtros con las muestras se secaron en una estufa a 60 °C (Oven series 9000, Thermolyne) durante 42 h y se pesaron para cuantificar el peso seco (PS). Posteriormente fueron incinerados a 500 °C durante 12 h y pesados para cuantificar el peso de las cenizas (C). Y finalmente se calculó el peso orgánico (PO) como la diferencia entre el peso seco total y el peso de las cenizas (Sorokin, 1973).

$$\text{Peso seco (PS)} = (\text{PFMS}) - (\text{PF}) \quad (1)$$

$$\text{Cenizas (C)} = (\text{PFC}) - (\text{PF}) \quad (2)$$

$$\text{Peso orgánico (PO)} = (\text{PS}) - (\text{C}) \quad (3)$$

PFMS = peso del filtro con muestra seca

PFC = peso del filtro con cenizas

PF = peso del filtro calcinado

2.1.6 Cuantificación de fenoles totales y flavonoides

Para la extracción de los fenoles totales de la harina de orujo (HO) o harina microbiana (HM), se utilizó una mezcla de agua, metanol y acetona en una relación (5:3:1). Se agregaron 2.5 mL de solución extractora a 25 mg de harina y se mantuvieron en agitación en un vórtex durante 1 h. Finalmente se centrifugó a 2,200 g por 15 min a 10 °C (García Martínez *et al.*, 2015).

El contenido de fenoles totales (TPC) se cuantificó con la prueba Folin-Ciocalteu (García Martínez *et al.*, 2015). Donde 10 μL del extracto se mezclaron con 15 μL del reactivo Folin-Ciocalteu. Después se añadieron 100 μL de Na_2CO_3 (2 % p/v) y 100 μL de NaOH (0.4 % p/v). Se incubó por 20 min y la absorbancia se midió a 760 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Termo Scientific 10S, Termo Fisher Scientific Inc, EE.UU.). Los resultados se expresaron en mg de ácido gálico (mg GAE/100 g de harina microbiana).

Para la extracción de los flavonoides se usó la metodología de Pérez-Pérez *et al.* (2014). Para lo cual, 25 mg de harina de orujo o harina microbiana se homogeneizaron por 20 min en un sonicador con 2.5 mL de solución extractora (metanol: agua a 80:20 % v/v). Después de la extracción, la mezcla se centrifugó de 2,200 g a 10 °C por 15 min. El sobrenadante se almacenó por 24 h en viales opacos a 4 °C hasta su análisis.

Para cuantificar el contenido de flavonoides se usó el método colorimétrico de AlCl_3 (Zhishen *et al.*, 1998). Se tomaron 10 μL del extracto correspondiente y se mezclaron con 400 μL de agua destilada y 30 μL de NaNO_2 (al 5 % p/v). Pasados cinco min, se agregaron 30 μL de AlCl_3 (10 % p/v) y después de 6 min de reacción, se añadieron 200 μL de NaOH (1 M) a la mezcla, el volumen se aforó a 1 mL con agua destilada. Se registró la absorbancia a 510 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Termo Scientific 10S, Termo Fisher Scientific Inc, EE.UU.). Se usó la catequina como estándar y los resultados se expresaron como equivalentes de catequina.

2.1.7 Cuantificación de Proteínas

Para cuantificar la cantidad de proteína cruda en la harina microbiana y harina de orujo se utilizó un análisis elemental que cuantificó la cantidad de nitrógeno total, posteriormente se multiplicó por un factor de estimación proteico (6.25).

$$\text{Nitrógeno} * 6.25 * 100 = \% \text{ de Proteínas} \quad (4)$$

El análisis elemental se realizó mediante el equipo vario Micro Cube, en este equipo se colocó una muestra con un peso promedio de 0.75 ± 0.21 mg pesado en una micro balanza Mettler – Toledo XP6 con sensibilidad de 0.001 mg en cápsulas de estaño, se colocaron en el carrusel de carga del equipo y fueron incineradas a 1200 °C, los gases que resultaron de esta combustión fueron acarreados por un gas inerte (He) hacia una columna de separación. La mezcla de gases es separada en una columna que cambia su temperatura para gasificar y liberar cada uno de los elementos (Nitrógeno, Hidrógeno y Dióxido de

carbono). Finalmente, estos gases pasan a un termo detector de conductividad que mide la cantidad de gas en la muestra según el peso utilizado.

2.1.8 Cuantificación Lípidos

Para la cuantificación de lípidos se utilizó el método de Pande *et al.* (1963). Para el proceso de extracción una muestra de 25 mg de harina de orujo o harina microbiana se trituro con un homogeneizador de perlas de zirconio, agregando 15 mg de perlas en un tubo eppendorf con 1 mL de la solución extractora diclorometano:metanol en una proporción de 1:2, se enfrió el tubo eppendorf y a continuación se recuperó la muestra homogenizada en tubos de ensayo de 15 mL (tubo 1) y se agregó 1 mL más de diclorometano:metanol, para completar un volumen de 2 mL de solución extractora, se aplicó ultrasonido y se dejó reposar durante 24 h en refrigeración a 4 °C.

Una vez transcurrido el tiempo de reposo, se centrifugó a 4,327 g por 15 min. Se recuperó el sobrenadante en tubos de cristal de 12 mL (tubo 2) y se realizó una segunda extracción en el tubo 1, agregando 2 mL de diclorometano:metanol, se aplicó ultrasonido durante 1 min y se centrifugó de nuevo para recuperar el sobrenadante en el tubo 2, posteriormente se agregaron 2 mL de agua destilada para separar los solventes generando una bicapa, la fracción superior (agua y metanol) se recuperó y se desechó como residuo peligroso, la fracción de diclorometano se evaporó en una estufa a 60 °C por 48 h.

A continuación, se agregaron 3 mL de dicromato de potasio al 2%, se colocó en baño maría a 100 °C durante 15 min con una tapa de papel aluminio, se dejó enfriar a temperatura ambiente y con cuidado se agregaron 4.5 mL de agua destilada, finalmente se midió la absorbancia a 590 nm en un espectrofotómetro.

Los resultados obtenidos con el método de Pande *et al.* (1963) sobreestiman la cantidad de lípidos totales, posiblemente por la interferencia que ocasionan algunos componentes del orujo de uva. Para ajustar los resultados se aplicó un factor de ajuste, tomando como base el contenido de lípidos en la harina de orujo cuantificado mediante un análisis Soxhlet, posteriormente el contenido de lípidos obtenido por Soxhlet (5.5 %) se dividió entre el contenido de lípidos obtenido por el método de Pande (22 %), lo que resultó en un factor de corrección (0.25). Finalmente, los resultados obtenidos por el método de Pande se multiplicaron por el factor de corrección para tener los valores corregidos de lípidos totales en la harina microbiana.

$$\frac{5.5}{22} = 0.25 \quad (5)$$

2.1.9 Cuantificación Carbohidratos

Para la cualificación de los carbohidratos totales se utilizó el método de Dubois *et al.* (1954), que consiste en la reacción de H₂SO₄ concentrado y fenol con los azúcares reductores, lo que produce un compuesto amarillo-marrón que se puede cuantificar en un espectrofotómetro a 485 nm. Mediante este ensayo se pueden cuantificar hexosas, disacáridos, oligosacáridos, polisacáridos y derivados metilados que tengan un grupo libre o potencialmente libre.

El proceso de extracción se hizo triturando 25 mg de harina de orujo o de harina microbiana con un homogeneizador de perlas de zirconio, se agregaron 15 mg de perlas de zirconio en un tubo eppendorf con 1 mL de H₂SO₄ 1 M y se homogenizaron por 1 min, el homogenizado se recuperó en un tubo de centrifugadora (tubo 1) y se agregaron 2 mL más de H₂SO₄ 1 M, para completar un volumen de 3 mL de solución extractora, se aplicó ultrasonido y se incubó durante 24 h en refrigeración 4 °C.

Una vez transcurrido el tiempo, se llevó a un baño maría a 100 °C durante 2 h y se centrifugó a 4,327 g durante 30 min. Posteriormente se tomaron 0.4 mL de extracto y se colocaron en un tubo de ensayo de 15 mL, se agregaron 0.4 mL de fenol al 5 % y dejaron reposar por 40 min. Finalmente, se agregaron 2 mL de H₂SO₄ concentrado, se agitaron y una vez que se enfriaron a temperatura ambiente se leyeron a 485 nm en un espectrofotómetro Beckman Coulter AD200, se realizó una curva de calibración utilizando glucosa como estándar con una $r^2 = 0.998$.

2.1.10 Análisis estadístico

Para confirmar que los datos cumplieran con los supuestos de normalidad y homogeneidad de la varianza, se hicieron las pruebas de Shapiro-Wilk y de Levene (Zar, 2009) respectivamente.

Para las variables de proteínas, lípidos, carbohidratos, peso seco total, peso orgánico, fenoles totales, flavonoides y amonio se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$, entre las diferentes relaciones C:N (tratamientos) y tiempos, en caso de existir diferencias significativas se realizó la prueba post hoc de Tukey para establecer las diferencias entre tratamientos.

Para el análisis de la tasa de consumo de oxígeno (OUR) realizó una prueba no paramétrica Friedman, en caso de existir diferencias significativas se realizó la prueba de Wilcoxon para establecer las diferencias entre tratamientos.

Para el análisis de cenizas se realizó una prueba no paramétrica Kruskal Wallis entre tratamientos, en caso de existir diferencias significativas se realizó la prueba de Wilcoxon para establecer las diferencias entre tratamientos.

Finalmente, para contrastar el contenido de proteínas, carbohidratos y flavonoides entre la harina de orujo de uva y la harina microbiana, solo se consideró la harina microbiana que contenía la mayor cantidad de proteína y se hizo una prueba t de student (Zar, 2009) con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. Mientras que para contrastar el contenido de lípidos y fenoles entre la harina de orujo y la harina microbiana se aplicó una prueba de U de Mann-Whitney (Zar, 2009).

Capítulo 3. Resultados

3.1.1 Crecimiento microbiano medido por respirometría

En la Figura 4 se puede ver la tasa de consumo de oxígeno (OUR $\text{mg O}_2/\text{mL} / \text{min}$) entre el inicio (0 h) y final del bioensayo (48 h). La OUR fue menor ($p < 0.05$) a las 0 h en comparación con la observada a las 40 y 48 h. Tomando en consideración que se compara la tasa de consumo para un volumen similar del cultivo (1 ml), una mayor tasa implica que hay una mayor densidad celular, por lo que el crecimiento de los microorganismos es mayor. De acuerdo con el modelo de crecimiento microbiano (Figura 4), la fase máxima de crecimiento exponencial se registró a las 40 h para las relaciones 15:1 y 8.5:1, mientras que la relación 30:1 mostro su mayor crecimiento a las 48 h, que correspondió a las mayores tasas de consumo de oxígeno.

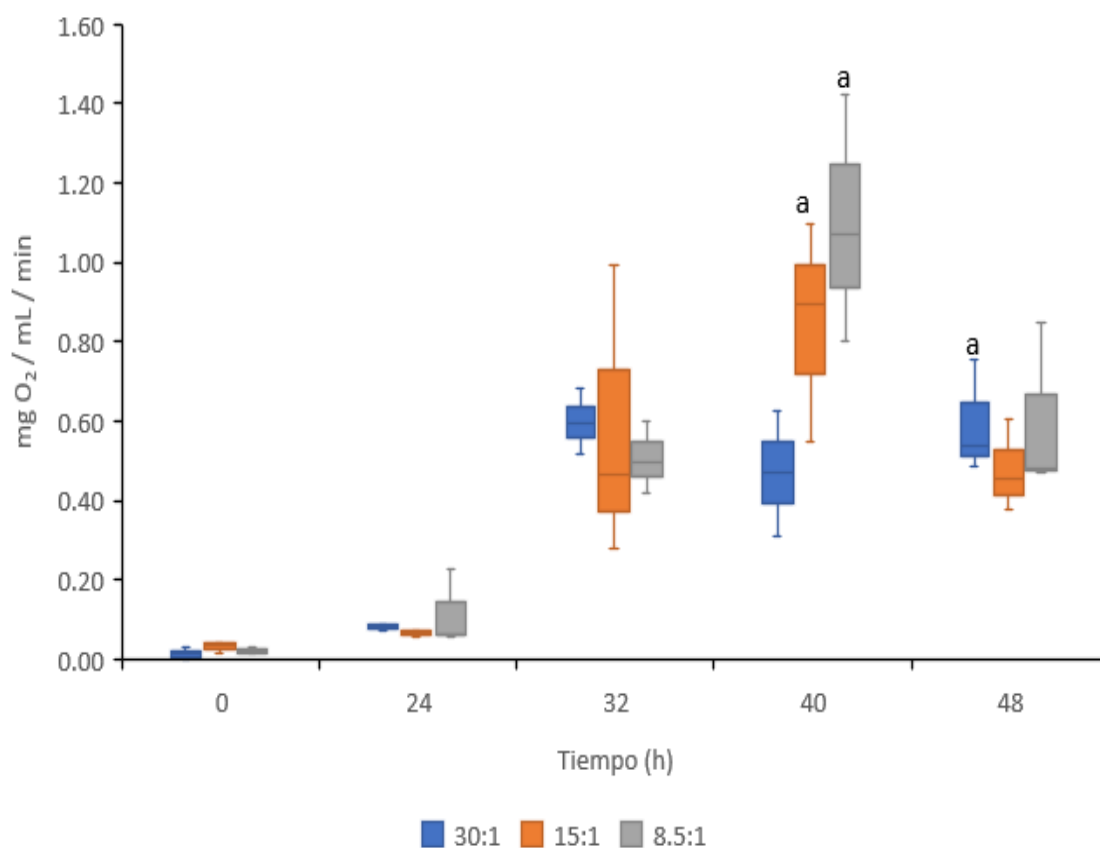


Figura 4. Consumo de oxígeno de cultivos microbianos con diferentes relaciones C:N.

3.1.2 Peso seco total (PST), Peso orgánico (PO) y Peso cenizas (PC) de harina microbiana

La cantidad de biomasa producida en los cultivos microbianos se muestra en la Tabla 4. Se observa para los tiempos un incremento de manera sostenida en el tratamiento 8.5:1, en contraste en el tratamiento con la menor concentración de nitrógeno, tiende a disminuir después del tiempo 4 (32 h) conforme se desarrolla el cultivo, en este periodo la diferencia entre los tratamientos 30:1 y 8.5:1 es significativa ($p < 0.05$). Existe una diferencia significativa para el tratamiento 15:1 a las 0 h y 48 h, donde muestra un incremento en la materia orgánica ($p < 0.05$).

Para el peso seco la tendencia es similar (Tabla 5), se puede observar que el tratamiento con la relación C:N de 8.5:1 en el tiempo 6 (48 h), tiene la mayor cantidad de peso seco ($6.25 \mu\text{g mL}^{-1}$). Encontrando diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las 0 h y 48 h para los tres tratamientos.

La cantidad de cenizas se observa en la Tabla 6 que muestra un aumento sobre el tiempo de las 0 h a las 48 h para las tres relaciones C:N mostrando una diferencia significativa ($p < 0.05$). Mientras que la cantidad de cenizas entre tratamientos a sus diferentes tiempos no mostro diferencias significativas ($p > 0.05$).

Tabla 4. Contenido de materia orgánica ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de la harina microbiana producida en un reactor aeróbico intermitente (batch) con diferentes relaciones C:N (30:1, 15:1 y 8.5:1).

Tiempo	Relaciones C:N			P valor
	30:1	15:1	8.5:1	
T0 (0 h)	3.14 ± 0.50^a	4.02 ± 0.50^a	4.13 ± 0.70^a	0.16
T4 (32 h)	5.31 ± 0.30^b	5.20 ± 0.60^{ab}	5.34 ± 0.60^{ab}	0.94
T5 (40 h)	4.97 ± 0.30^b	4.90 ± 0.40^{ab}	5.72 ± 0.90^{ab}	0.24
T6 (48 h)	4.95 ± 0.60^b	5.60 ± 0.20^b	6.09 ± 0.50^b	0.06
P valor	0.001	0.01	0.04	

Los números indican diferencia significativa entre relaciones C:N (tratamientos) entre relaciones C:N (tratamientos) y las letras indican diferencia significativa entre tiempos de acuerdo con la prueba ANOVA.

Tabla 5. Peso seco total ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de la harina microbiana producida en un reactor aeróbico intermitente (batch) con diferentes relaciones C:N (30:1, 15:1 y 8.5:1).

Tiempo	Relaciones C:N			P valor
	30:1	15:1	8.5:1	
T0 (0 h)	3.27 ± 0.50 ^a	4.15 ± 0.50 ^a	4.28 ± 0.80 ^a	0.18
T4 (32 h)	5.56 ± 0.40 ^b	5.43 ± 0.60 ^b	5.57 ± 0.70 ^{ab}	0.94
T5 (40 h)	5.15 ± 0.30 ^b	5.00 ± 0.40 ^{ba}	5.84 ± 0.90 ^{ab}	0.27
T6 (48 h)	5.11 ± 0.60 ^b	5.75 ± 0.20 ^b	6.25 ± 0.50 ^b	0.06
P valor	0.01	0.01	0.04	
Tiempo				

Los números indican diferencia significativa entre relaciones C:N (tratamientos) entre relaciones C:N (tratamientos) y las letras indican diferencia significativa entre tiempos de acuerdo con la prueba ANOVA.

Tabla 6. Peso de cenizas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de la harina microbiana producida en un reactor aeróbico intermitente (batch) con diferentes relaciones C:N (30:1, 15:1 y 8.5:1).

Tiempo	Relaciones C:N			P valor
	30:1	15:1	8.5:1	
T0 (0 h)	0.12 ± 0.03 ^b	0.13 ± 0.02 ^{ac}	0.15 ± 0.07	0.78
T4 (32 h)	0.24 ± 0.04 ^a	0.23 ± 0.01 ^{bc}	0.23 ± 0.03	0.78
T5 (40 h)	0.18 ± 0.02 ^{1a}	0.10 ± 0.01 ^{1a}	0.13 ± 0.03 ²	0.04
T6 (48 h)	0.17 ± 0.02 ^a	0.15 ± 0.01 ^{ac}	0.17 ± 0.01	0.21
P valor	0.02	0.01	0.08	
Tiempo				

Los números indican diferencia significativa entre relaciones C:N (tratamientos) entre relaciones C:N (tratamientos) y las letras indican diferencia significativa entre tiempos de acuerdo con la prueba ANOVA.

3.1.3 Fenoles totales y Flavonoides

En la Tabla 7 se resumen los contenidos promedio de fenoles totales en la harina microbiana, y se observa un incremento en el tiempo 5 (40 h) en los 3 tratamientos ($p < 0.05$). Mientras que para los tratamientos con la relación C:N 15:1 y 8.5:1 muestran un descenso en la cantidad de fenoles totales del tiempo 5 (40 h) al tiempo 6 (48 h) mostrando diferencia significativa ($p < 0.05$).

Tabla 7. Contenido de fenoles totales en la harina microbiana (mg g^{-1} de materia seca (m.s)) producida en un reactor aeróbico intermitente (batch) con diferentes relaciones C:N (30:1, 15:1 y 8.5:1).

Tiempo	Relaciones C:N			P valor
	30:1	15:1	8.5:1	
T4 (32 h)	15.45 \pm 0.28	14.67 \pm 0.38 ^a	14.56 \pm 0.88 ^{ab}	0.20
T5 (40 h)	17.29 \pm 0.33 ¹	17.88 \pm 0.82 ^{1b}	15.96 \pm 0.86 ^{2a}	0.04
T6 (48 h)	15.87 \pm 1.42	15.60 \pm 0.80 ^a	13.76 \pm 0.33 ^{ab}	0.07
P valor	0.08	0.04	0.02	
Tiempo				

Los números indican diferencia significativa entre relaciones C:N (tratamientos) entre relaciones C:N (tratamientos) y las letras indican diferencia significativa entre tiempos de acuerdo con la prueba ANOVA.

En la Tabla 8 se muestra de forma comparativa la concentración de fenoles totales de la harina de orujo de uva y de la harina microbiana producida en el tiempo 6. La harina de orujo de uva tiene una mayor concentración de fenoles totales en comparación con la harina microbiana cultivada con la relación C:N 8.5:1 en el tiempo 6 ($p < 0.05$). Esto indica que hubo una pérdida de compuestos fenólicos durante el cultivo microbiano.

Tabla 8. Contenido de fenoles totales (mg g^{-1} de m.s.) en las harinas de orujo (HO) y microbiana (HM) para la relación C:N 8.5:1 al tiempo 6.

Harina de orujo	23.73 \pm 2.39 ^a
Harina microbiana	13.76 \pm 0.33 ^b
(C:N 8.5:1, T6)	

Las letras en superíndice indican diferencia significativa ($p < 0.05$) de acuerdo con la prueba de U de Mann-Whitney.

La cantidad de flavonoides totales en la harina microbiana se muestra en la Tabla 9. En los tratamientos 30:1 y 8.5:1 se observa una menor concentración en el tiempo 4 con respecto al tratamiento 15:1 encontrando diferencia significativa ($p < 0.05$). En el tiempo 5 (40 h) la concentración se incrementa en los tratamientos 30:1 y 8.5:1 y se iguala con el tratamiento 15:1. Al tiempo 6 (48 h) en todos los tratamientos la cantidad de flavonoides se reduce. Se encontró que en el tiempo 4 (32 h) el contenido de flavonoides

fue mayor en el tratamiento 15:1 en contraste con el tratamiento 30:1 y 8.5:1 ($p < 0.05$). El resultado indica que hubo una mayor pérdida de flavonoides en el tratamiento 15:1 a las 48 h.

Tabla 9. Contenido de Flavonoides de la harina microbiana (mg g^{-1} de m.s.) producida en un reactor aeróbico intermitente (batch) con diferentes relaciones C:N (30:1, 15:1 y 8.5:1).

Tiempo	Relaciones C:N			P valor
	30:1	15:1	8.5:1	
T4 (32 h)	9.09 ± 0.78^1	10.42 ± 0.20^{2a}	9.40 ± 0.33^1	0.03
T5 (40 h)	10.23 ± 0.24	10.23 ± 0.28^a	10.00 ± 0.68	0.77
T6 (48 h)	9.62 ± 0.52	9.40 ± 0.24^b	8.91 ± 0.55	0.23
P valor	0.11	0.005	0.12	
Tiempo				

Los números indican diferencia significativa entre relaciones C:N (tratamientos) entre relaciones C:N (tratamientos) y las letras indican diferencia significativa entre tiempos de acuerdo con la prueba ANOVA.

En la Tabla 10 se observa que la cantidad de Flavonoides totales en la harina de orujo (13.78 mg g^{-1} de m.s.), es mayor en comparación con su concentración en la harina microbiana producida con una relación C:N 8.5:1 en el tiempo 6 ($p < 0.05$). Esto indica que hubo una pérdida de los flavonoides durante el cultivo microbiano.

Tabla 10. Contenido de flavonoides totales (mg g^{-1} de m.s.) en las harinas de orujo (HO) y microbiana (HM) para la relación C:N 8.5:1 al tiempo 6.

Harina de orujo	13.78 ± 1.04^a
Harina microbiana	8.91 ± 0.55^b
(C:N 8.5:1, T6)	

Las letras en superíndice indican diferencia significativa ($p < 0.05$) de acuerdo con la prueba t de student.

3.1.4 Proteína total

En la Figura 5 se puede observar la cantidad de proteína expresada en mg g^{-1} de m.s. La harina del tratamiento con la relación 30:1 tuvo una menor cantidad de proteína, en comparación con los

tratamientos con relaciones 15:1 y 8.5:1. Todos los tratamientos fueron diferentes ($p < 0.05$) en el tratamiento 15:1 y 8.5:1 se observó una tendencia al incremento en la cantidad de proteína conforme transcurrió el tiempo, la mayor concentración de proteína se observó en la relación C:N 8.5:1 a las 48 h (478 mg de proteína por g de m.s).

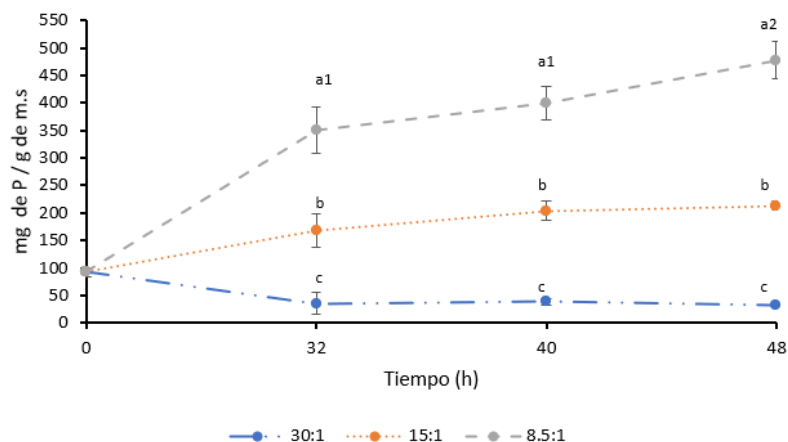


Figura 5. Contenido de proteína en harinas microbianas cultivadas con diferente relación C:N.

El contenido de proteína de la harina microbiana cultivada al tiempo 6 (48 h) con la relación C:N 8.5:1 fue significativamente mayor que el contenido de proteína de la harina de orujo de uva (Tabla 11) ($p < 0.05$). Este resultado indica que los microorganismos cultivados asimilan el nitrógeno inorgánico y los carbohidratos para la síntesis de sus proteínas, y también se puede apreciar que a medida que se incrementa la cantidad de nitrógeno el contenido de proteínas aumenta (Figura 5).

Tabla 11. Contenido de proteína (mg g^{-1} de m.s.) de la harina de orujo (HO) y la harina microbiana (HM) para la relación C:N 8.5:1 al tiempo 6.

Harina de orujo	92 ± 10^a
Harina microbiana	478 ± 30^b
(C:N 8.5:1, T6)	
Las letras en superíndice indican diferencia significativa ($p < 0.05$) de acuerdo con la prueba t de student.	

3.1.5 Lípidos totales

La cantidad de lípidos en la harina microbiana se muestra en la Tabla 12. Todos los tratamientos (30:1, 15:1 y 8.5:1) muestran un decremento del tiempo 4 (32 h) y el tiempo 5 (40 h) y posteriormente un

incremento al tiempo 6 (T6) a excepción del tratamiento 15:1 que mostró un decremento progresivo; a pesar de esta tendencia, no se encontraron diferencias significativas entre las relaciones C:N y tiempos ($p > 0.05$).

Tabla 12. Contenido de lípidos en harina microbiana (mg g^{-1} de m.s.) producida en un reactor aeróbico intermitente (batch) con diferentes relaciones C:N (30:1, 15:1 y 8.5:1).

Tiempo	Relaciones C:N			P valor Relaciones C:N
	30:1	15:1	8.5:1	
T4 (32 h)	105 ± 46	114 ± 28	88 ± 26	0.66
T5 (40 h)	63 ± 10 ¹	78 ± 23	54 ± 09	0.21
T6 (48 h)	97 ± 29	74 ± 26	92 ± 37	0.66
P valor				
Tiempo	0.30	0.19	0.23	

Los números indican diferencia significativa entre relaciones C:N (tratamientos) entre relaciones C:N (tratamientos) y las letras indican diferencia significativa entre tiempos de acuerdo con la prueba ANOVA.

En la Tabla 13 se puede observar la cantidad de lípidos de la harina de orujo (HO) y de la harina microbiana (HM). La cantidad de lípidos en harina microbiana fue mayor en comparación con la harina de orujo ($p < 0.05$). Esto indica que existió una acumulación de lípidos en harina producida.

Tabla 13. Contenido de lípidos totales (mg g^{-1} de m.s.) de la harina de orujo (HO) y la harina microbiana (HM) para la relación C:N 8.5:1 al tiempo 6.

Harina de orujo	55 ± 10 ^a
Harina microbiana	92 ± 37 ^b
(C:N 8.5:1, T6)	

Las letras en superíndice indican diferencia significativa ($p < 0.05$) de acuerdo con la prueba t de student.

3.1.6 Carbohidratos totales

En la Tabla 14 se puede observar la concentración de carbohidratos totales de la harina microbiana. En el tratamiento 30:1, al tiempo 4 (32 h), se observó una menor concentración de carbohidratos en

comparación con los tratamientos 15:1 y 8.5:1 a las 32 h, mostrando diferencia significativa ($p < 0.05$). Para el tratamiento 15:1 entre el tiempo 4 (32 h) y tiempo 5 (40 h) la concentración se mantuvo constante, pero para el tiempo 6 (T6) se observó una disminución de la concentración de carbohidratos ($p < 0.05$). Por último, para el tratamiento 8.5:1, en el tiempo 5 y 6 muestra una disminución en la cantidad de carbohidratos en comparación con el tiempo 4. A pesar de las tendencias observadas, no se encontraron diferencias significativas.

Tabla 14. Contenido de carbohidratos totales de la harina microbiana (mg g^{-1} de m.s.) producida en un reactor aeróbico intermitente (batch) con diferentes relaciones C:N (30:1, 15:1 y 8.5:1).

Tiempo	Relaciones C:N			P valor
	30:1	15:1	8.5:1	
T4 (32 h)	146 ± 08 ²	166 ± 11 ^{1a}	172 ± 09 ¹	0.03
T5 (40 h)	169 ± 08	168 ± 10 ^a	159 ± 11	0.41
T6 (48 h)	153 ± 12	135 ± 15 ^b	156 ± 17	0.23
P valor	0.059	0.02	0.33	

Los números indican diferencia significativa entre relaciones C:N (tratamientos) entre relaciones C:N (tratamientos) y las letras indican diferencia significativa entre tiempos de acuerdo con la prueba ANOVA.

Para el tratamiento con la relación C:N de 8.5:1, se obtuvo una concentración de 156 mg g^{-1} de carbohidratos, que al ser contrastada con la cantidad de carbohidratos de la harina de orujo con un contenido de 200 mg g^{-1} , se puede apreciar que tiene una menor concentración en la harina microbiana, mostrando una diferencia significativa ($p < 0.05$) en la Tabla 15. Indicando que existe una pérdida de carbohidratos durante el cultivo de la harina microbiana.

Tabla 15. Contenido de Carbohidratos totales (mg g^{-1} de m.s.) de la harina de orujo (HO) y la harina microbiana (HM) para la relación C:N 8.5:1 al tiempo 6.

Harina de orujo	200 ± 10 ^a
Harina microbiana	156 ± 37 ^b

(C:N 8.5:1, T6)

Las letras en superíndice indican diferencia significativa ($p < 0.05$) de acuerdo con la prueba t de student.

3.1.7 Comportamiento del pH y del nitrógeno inorgánico

En la Figura 6 se puede ver el comportamiento del pH del bioensayo, se registró una disminución a partir de las 24 h, este comportamiento es el resultado de la actividad metabólica de los microorganismos, ya que a medida que se incrementa la biomasa, la producción de CO₂ residual también se incrementa y su disolución en el agua provoca un descenso del pH, que se hace muy evidente a las 48 h.

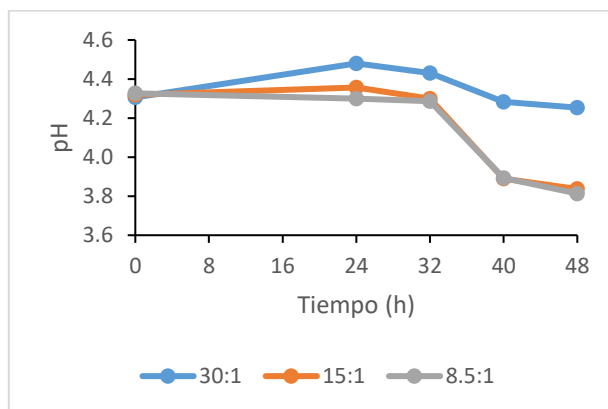


Figura 6. Valor de pH en cultivos de harinas microbianas.

En la Figura 7 se observa el comportamiento de la concentración de NH₄, se observa un incremento para las relaciones 15:1 y 8.5:1 a las 32 h, a pesar de este comportamiento no hubo diferencia significativa ($p>0.05$). Este aumento se debe al agregar el NH₄Cl, al no dejar el tiempo necesario para que se solubilizara todo el amonio agregado y se tomó la muestra casi de manera inmediata. Posteriormente se ve una disminución en la concentración de NH₄ a partir de las 32 h para los tratamientos enriquecidos con nitrógeno inorgánico (15:1 y 8.5:1) teniendo una diferencia significativa ($p<0.05$). La disminución es dada por el consumo del NH₄ por los microorganismos para su crecimiento. Mientras que para el tratamiento 30:1 donde no se agregó nitrógeno inorgánico, se mantiene constante no mostrando diferencias significativas ($p>0.05$).

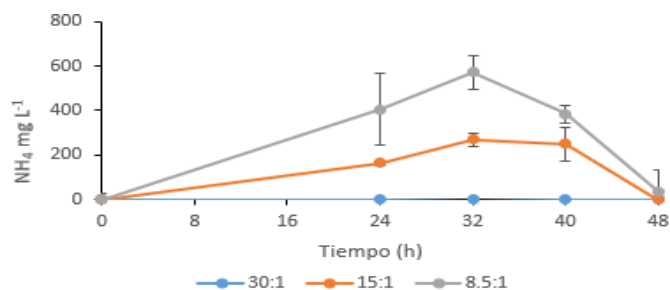


Figura 7. Valores de nitrógeno inorgánico en cultivos de harinas microbianas.

Capítulo 4. Discusión

4.1.1 Crecimiento respirometría

Algunos de los métodos que se utilizan de manera convencional para medir el crecimiento microbiano son la espectrofotometría, el recuento por microscopía y el recuento de células viables (Madigan *et al.*, 2015). Sin embargo, a pesar de que estas técnicas son las más utilizadas para medir el crecimiento microbiano, la selección de la mejor técnica dependerá del tipo de sustrato y de los microorganismos cultivados. Para este trabajo la medición de crecimiento microbiano se realizó mediante respirometría.

Para estimar el crecimiento microbiano de manera indirecta, mediante la tasa de consumo de oxígeno (OUR, por sus siglas en inglés *oxygen uptake rate*). Esta técnica permite medir el consumo de oxígeno de un organismo en un medio acuático saturado de oxígeno (OD), por lo tanto, al colocar una muestra de un cultivo de organismos aeróbicos en una cámara hermética de volumen conocido, se puede medir la disminución de la concentración de oxígeno y con ello calcular el consumo de oxígeno por unidad de volumen de cultivo y por unidad de tiempo. Esta disminución se representa mediante la pendiente de la curva de consumo de oxígeno (OUR) y es proporcional a la biomasa contenida en un volumen específico del cultivo.

Una consideración importante que se debe tener presente para la cualificación de biomasa por medio de respirometría es la duración de la medición, como menciona Hagman *et al.* (2007), esta técnica se puede utilizar para cuantificar la OUR de los microorganismos en diferentes estados metabólicos. Si la cuantificación se hace en ausencia de sustrato orgánico metabólico (ausencia de una fuente de carbono), se cuantifica el metabolismo basal de los microorganismos, en contraste, cuando se agrega una fuente de carbono de fácil biodisponibilidad como el acetato, la OUR aumenta hasta que la fuente de carbono es degradada por completo por los microorganismos, entonces la OUR vuelve a su medida inicial, de esta manera se puede determinar la cantidad de oxígeno que se requiere para metabolizar una fuente de carbono. Sin embargo, una consideración importante que se debe tomar en cuenta es la tasa de duplicación de los microorganismos, ya que en periodos cortos de medición la cantidad de microorganismos (biomasa) no cambia de manera considerable y por ello la OUR es proporcional a la biomasa que hay en el cultivo en ese momento. Si las mediciones se repiten en periodos suficientemente largos, de 8 h como en este estudio, la población de microorganismos en los cultivos aumenta

considerablemente y la OUR en lugar de volver a su medida inicial, se incrementará en forma proporcional al crecimiento de los microorganismos.

Durante la fase exponencial de crecimiento, los microorganismos se encuentran en su fase metabólica más activa ya que los nutrientes están en exceso y los microorganismos crecen a su máxima tasa específica de crecimiento (Stanbury *et al.*, 2017). Cuando los microorganismos se encuentran en su fase exponencial o fase rápida de crecimiento el oxígeno se consume rápidamente y en forma creciente, cuando el cultivo llega a su fase estacionaria el consumo de oxígeno se mantiene constante.

Como se pudo observar, el consumo de oxígeno de los cultivos microbianos es mayor a las 32 h, cuando se considera que los cultivos se encuentran a la mitad de su crecimiento exponencial para los tratamientos con las relaciones C:N de 15:1 y 8.5:1. A las 40 h horas el consumo aumentó para estos dos tratamientos, a diferencia del tratamiento 30:1 que muestra su máximo consumo de oxígeno a las 32 h. Este comportamiento se debe a que el crecimiento en el tratamiento 30:1 se vio limitado por la fuente de nitrógeno, ya que, al no adicionar nitrógeno inorgánico, los microorganismos utilizaron el nitrógeno orgánico disponible en la harina de orujo de uva, lo que limitó el crecimiento. Esta condición se vio reflejada en el consumo de oxígeno, que se redujo a las 40 h y se mantuvo sin cambio hasta las 48 h.

En los tratamientos donde se adicionó nitrógeno inorgánico (NH_4Cl), se observó una tendencia creciente en el consumo de oxígeno a medida que disminuyó la relación C:N. El mayor consumo de oxígeno se observó en la relación 8.5:1, donde se adicionó la mayor cantidad de nitrógeno. Sin embargo, al contrastar las OUR para los cultivos con las tres relaciones C:N no se encontraron diferencias significativas. Es posible que el diseño y funcionamiento del biorreactor influyera en estos resultados, ya que se observó que durante el cultivo de los microorganismos el crecimiento de hongos fue muy evidente y sus hifas se adherían a las paredes del biorreactor, este efecto se vio influenciado por la turbulencia que producía la inyección de aire al biorreactor al provocar salpicaduras, esto generó que los bioflóculos quedaran adheridos a la pared del reactor, justo en la zona limítrofe agua-aire. Como consecuencia, esta biomasa no permanecía en la columna de agua y por lo tanto no se estimó su OUR.

El diseño de un biorreactor es fundamental para poder mantener toda la biomasa producida dentro de la columna de agua y evitar tener pérdidas mediante la adhesión de partículas que se retienen en las paredes del tanque de cultivo. Un diseño cónico y un flujo que mantenga un lavado en las paredes del reactor, permitirá mantener una muestra homogénea para cuantificar el peso seco total, materia orgánica total, cenizas y OUR de manera más precisa, sin subestimar las medidas reales.

4.1.2 Fenoles y flavonoides

De manera natural, las plantas tienen la capacidad de sintetizar metabolitos que promueven su desarrollo y supervivencia. Los metabolitos primarios se relacionan con las funciones vitales de la planta, como los procesos fotosintéticos, respiratorios, de asimilación y síntesis de nutrientes como las proteínas, carbohidratos o lípidos (Gordo, 2018). Los metabolitos secundarios se relacionan con mecanismos de defensa, y adaptación ambiental como los compuestos fenólicos (Al Jitan *et al.*, 2018).

La síntesis de estos metabolitos secundarios se ve afectada por las condiciones ambientales, el tipo de suelo, las prácticas de cultivo y depende también de la variedad de la vid (Martínez-Flórez *et al.*, 2002). Una consideración importante que afecta la concentración de compuestos fenólicos es que son compuestos muy reactivos y conforme transcurre el tiempo se convierten en especies químicas nuevas, lo que ocasiona que el contenido fenólico total disminuya (Jackson, 2020).

En este trabajo, la variedad de uva Nebbiolo que se utilizó tuvo un contenido de fenoles totales de 23.79 mg g⁻¹ de m.s. de orujo, que es menor al descrito por Jin *et al.* (2019) para las variedades Petit Verdot (64.8 g / kg de orujo) que equivale a 64.8 mg g⁻¹, Merlot (35.8 g / kg) que equivale a 35.8 mg g⁻¹ y Cabernet Franc (36.1 g / kg) que equivale a 36.1 mg g⁻¹, así como lo reportó Spinei y Oroian, (2021) para para *Vitis vinifera* (60.1 mg/g de m.s.). Los compuestos fenólicos son moléculas con capacidad antioxidante que se deriva de su estructura molecular. Esta se encuentra constituida por un anillo aromático unido a uno o varios grupos hidroxilo (Al Jitan *et al.*, 2018). Por lo tanto, una menor cantidad de estas moléculas significa una menor capacidad antioxidante.

De las harinas microbianas que se obtuvieron en el presente estudio, la que se produjo con una relación C:N 8.5:1 (48 horas), se conservó el 58 % del contenido original de fenoles totales que estaban contenidos en la harina de orujo (HO) inicial. La reducción en la cantidad de fenoles totales se puede deber a procesos de solubilización en el agua, en este sentido, cabe desatacar que uno de los procesos convencionales de extracción de compuestos fenólicos es la maceración acuosa (Alara *et al.*, 2021). Al momento de cosechar la harina microbiana, parte de los fenoles pudieron quedar disueltos en el agua del cultivo. En este caso, la pérdida fue 5.87 mg g⁻¹ de los fenoles totales.

Otra pérdida de compuestos fenólicos puede ocurrir por procesos de degradación microbiana, ya que algunos géneros de bacterias como *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus laterosporus*, *Alcaligenes eutrophus*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus sp*, *Pseudomonas putida* (Krastanov *et al.*, 2013) y

hongos como *Candida albicans* (Tsai *et al.*, 2005), pueden utilizar el fenol como fuente de carbono. Su degradación inicia la ruptura del fenol, que se convierte en catecol por la acción enzimática (fenol hidrolasa), posteriormente este catecol se puede romper en la posición *ortho* o *meta* del anillo aromático y las moléculas resultantes de este proceso pueden ser catabolizadas en el ciclo de Krebs.

En este trabajo la cantidad de flavonoides de la harina de orujo fue de 13.78 mg g⁻¹ de m.s., una concentración similar a la descrita por Jin *et al.* (2019), quienes cuantificaron en el orujo de 4 especies de uvas rojas, valores que van de 10.5 a 32.2 g/kg de m.s., que equivalen a 10.5 a 31.2 mg g⁻¹ de m.s. de orujo. De manera similar, Spinei y Oroian, (2021) reportaron un contenido de 13.10 mg/g de m.s. en orujo de uva. En contraste, Negro *et al.* (2003), reportaron una concentración mayor de flavonoides (3.94 g/100 g de m.s.) que equivale a 39.4 mg g⁻¹ de m.s. de orujo. Sin embargo, la concentración de flavonoides entre las harinas microbianas en el presente trabajo no se vió afectada significativamente por su cultivo en el biorreactor, la mayor concentración de flavonoides (10.42 mg g⁻¹ de m.s.) se obtuvo con la relación C:N 15:1 a las 32 h (tiempo 4) y la menor (8.91 mg g⁻¹ de m.s.) con la relación C:N 8.5:1 a las 48 h (tiempo 6). Sin embargo, si hubo una diferencia entre la cantidad de flavonoides de la harina de orujo de uva y la harina microbiana, indicando que existe una pérdida después de la bioconversión de harina de orujo a harina microbiana.

La importancia de los flavonoides como moléculas antioxidantes se deriva de su estructura química, ya que tienen un número mayor de grupos hidroxilo en comparación con otros polifenoles, estos grupos hidroxilo pueden donar hidrógenos a moléculas oxidantes, como el anión superóxido, los radicales hidroxilo o peróxido, implicadas también en procesos de peroxidación lipídica (Foti *et al.*, 1994; Haida y Hakiman, 2019; Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

Algunos trabajos, como el de García-Becerra *et al.* (2016) evaluaron el efecto que tienen los extractos de orujo de uva como antioxidantes frente a especies reactivas de oxígeno (ROS) y demostraron que concentraciones de 0.1 µg/mL de extracto de orujo de uva inhiben la hemólisis humana hasta en un 85-95%. Otro aspecto relevante de los compuestos fenólicos es que usualmente se consideran factores antinutricionales, porque inhiben la digestibilidad de las proteínas (Samtiya *et al.*, 2020). Sin embargo, se ha demostrado que la inclusión del 6% (60 g kg⁻¹) de orujo de uva en las dietas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) mejora la digestibilidad. Este nivel de inclusión equivale a una concentración de 2.7 mg g⁻¹ de fenoles totales (Peña *et al.*, 2020).

4.1.3 Proteínas

Las bacterias y los hongos tienen la capacidad de utilizar diferentes fuentes de nitrógeno como nutriente, ya sea orgánico (como los aminoácidos) o inorgánico (como el amonio, nitratos, nitritos). Las bacterias tienen proteínas transportadoras de amonio (AmtB) que les ayudan a absorberlo del medio para utilizarlo en la síntesis de aminoácidos como el glutamato y la glutamina, gracias a la acción de las enzimas glutamato sintasa y la glutamina sintetasa (Burkovski, 2003; He *et al.*, 2022; Merrick y Edwards, 1995).

En este trabajo se demostró que la cantidad de proteína en las harinas microbianas aumentó conforme se incrementó la cantidad de nitrógeno inorgánico en los cultivos y conforme pasaba el tiempo. La mayor concentración de proteína se obtuvo con las relaciones C:N de 15:1 y 8.5:1, a las 48 h (tiempo 6). En este punto de la curva de crecimiento, los microorganismos se encontraban en su fase de crecimiento exponencial máxima, y se sabe que durante esta fase del crecimiento microbiano y microalgal, se registra la mayor tasa de síntesis de proteínas, que son utilizadas durante los procesos de replicación y división celular. Esta condición caracteriza a esta fase como la de mayor productividad proteica. El tratamiento con la relación C:N 8.5:1 tuvo la mayor cantidad de proteína (47.8 %). Este resultado indica que a mayor concentración de nitrógeno habrá una mayor cantidad de proteína producida.

Cuando se compara el resultado anterior con el que se obtuvo con la relación C:N de 30:1, se puede observar que conforme pasa el tiempo, una de las principales limitantes para el crecimiento microbiano es la falta de nitrógeno inorgánico y por ello, los microorganismos comienzan a degradar las proteínas que tiene disponibles para obtener el nitrógeno. Para disponer de este nitrógeno orgánico, utilizan enzimas proteolíticas y obtiene el nitrógeno de los aminoácidos por la acción de la enzima glutamato deshidrogenasa, que desprende el grupo amino de los aminoácidos convirtiéndolos en amoniaco (NH_3) y α cetoglutarato (Merrick y Edwards, 1995). El tratamiento con la relación C:N 30:1 muestra una tendencia a la reducción en la cantidad de proteínas, con la menor concentración del 3.3 % en el tiempo 6. Esto indica que, durante los procesos de cultivo de microorganismos, es recomendable cosechar los cultivos en la fase exponencial donde se obtiene la mayor cantidad de proteína.

Tomando en cuenta que en el tratamiento con la relación C:N de 8.5:1 se registró la mayor cantidad de proteína (47.8 %) y comparándolo con otras harinas microbianas, como las harinas producidas en sistemas biofloc adicionadas con melaza como fuente de carbono, se puede observar una menor concentración de proteína en estas últimas. Por ejemplo, Ibarra Mayorga *et al.* (2019), mostró un contenido de proteína en harina de biofloc de 36.53 g / 100 g que equivale a 36.53 % y Becerril-Cortés *et al.* (2018), evidenció un

contenido proteico del 42.01 % en harina de biofloc con melaza. De manera similar, el contenido de proteína del biofloc producido con desperdicio de café como fuente de carbono fue aún menor (30.28 %) que el producido con melaza y que el de la harina microbiana producida en este estudio. Sin embargo, en contraste con los resultados anteriores, se ha logrado producir biofloc con contenidos de proteína mayores. Kuhn *et al.* (2009), obtuvieron un contenido de proteína del 49.0 g / 100 g que equivale a 49 % utilizando azúcar como fuente de carbono y Rajkumar *et al.* (2016), utilizaron harina de tapioca y harina de trigo como fuente de carbono en sistemas biofloc y obtuvieron un contenido proteico del 52.03 % y 53.65 % respectivamente.

Estas diferencias en el contenido de proteína pueden ser el resultado de la dinámica poblacional de los microorganismos presentes en estos cultivos, ya que las condiciones ambientales y nutricionales favorecen la predominancia de algún tipo de microorganismo (Monroy-Dosta *et al.*, 2013). Normalmente los cultivos de biofloc se mantiene en pH cercanos a la neutralidad, debido a que estos sistemas de cultivo están orientados al cultivo de organismos como peces o camarones, para los cuales esta condición es necesaria para su crecimiento óptimo (Prangnell *et al.*, 2019). El pH es un factor ambiental que condiciona al crecimiento de ciertas especies de microorganismos, por lo que ocasiona que el contenido proteico cambie.

En este estudio de producción de proteína a partir de la harina de orujo de uva, que proviene de un proceso fermentativo, donde se generan sustancias como ácido málico y láctico que le confieren una acidez natural, su adición al medio de cultivo ocasionó el descenso del pH a 4.3. Por lo tanto, los cultivos se llevaron a cabo bajo condiciones ácidas que favorecieron el crecimiento de organismos como los hongos, que crecen mejor bajo condiciones ácidas, como se ha reportado en el cultivo de *Aspergillus niger* con un contenido de proteína de 18.9 % cultivado a un de pH 4 (Said *et al.*, 2019) y lo descrito por Jin *et al.* (1998) en el cultivo de *Aspergillus oryzae* con un valor de pH de 5.5 obteniendo un contenido de proteína de 38 %, que es un valor muy similar al obtenido por Singh *et al.* (1991) en el cultivo de *Aspergillus niger* AS-101, con un valor de proteína de 30.4 %.

4.1.4 Lípidos

Todos los microorganismos sintetizan lípidos para sus funciones estructurales y esenciales (Dowhan *et al.*, 2008) por lo que, durante su crecimiento, la síntesis de lípidos es notoria. Una característica metabólica importante para la síntesis de los lípidos es ciclo de carbono, en el que la glucosa es el principal precursor

para la síntesis de acetil-coA, que es transformada a malonil-coA mediante la enzima acetil-coA carboxilasa y posteriormente, por medio del enzima ácido graso sintasa, sigue un proceso de elongación en el que se agregan carbonos del malonil-coA a la cadena de acil, para finalmente sintetizar un ácido graso (Beopoulos *et al.*, 2009). Sin embargo, cuando existe una deficiencia de carbohidratos (glucosa), los microorganismos heterotróficos utilizan otras macromoléculas como lípidos y proteínas como fuente de carbono, esto indica que, en condiciones de deficiencia de carbohidratos como la glucosa, los microorganismos catabolizan los lípidos utilizando rutas alternas de obtención de energía como la β -oxidación y aminoácidos mediante procesos de desaminación y trasaminación (Jimenez-Diaz *et al.*, 2017; Newsholme *et al.*, 2011). Estos procesos metabólicos podrían resultar en un aumento y posterior disminución en el contenido de lípidos y proteínas.

En las concentraciones de lípidos que se cuantificaron con las diferentes relaciones C:N, se observó una tendencia a la disminución del contenido de lípidos entre los tiempos 4 y 6 para las relaciones C:N 30:1 y 15:1. Mientras que en la relación 8.5:1, esta tendencia se observa del tiempo 4 al 5. Esto podría indicar que durante la fase de crecimiento exponencial se consumen los carbohidratos más biodisponibles como la glucosa (Zappi *et al.*, 2010), a medida que transcurre esta fase del crecimiento, la glucosa o los carbohidratos se agotan. Por lo tanto, para que los procesos metabólicos de producción de energía continúen, es necesario el catabolismo de lípidos y proteínas. En el tratamiento con la relación C:N 30:1 donde no se agregó nitrógeno inorgánico, la concentración inicial de proteína fue de 920 mg g^{-1} de m.s. y se observó una disminución en la cantidad de proteínas de la harina microbiana hasta una concentración de 330 mg g^{-1} de m.s. al tiempo 6. Esto puede indicar que las proteínas fueron utilizadas como fuente de carbono.

El comportamiento de los lípidos contrasta con el de las proteínas, para la relación C:N 8.5:1, al inicio del bioensayo se tenía una concentración de 55 mg g^{-1} de m.s., posteriormente se observó una fluctuación con un incremento y reducción del contenido a las 40 h (tiempo 5), para finalmente, a las 48 h (tiempo 6), registrar una concentración mayor de lípidos (92 mg g^{-1}). Este comportamiento en la reducción transitoria de lípidos se puede relacionar con la función de rutas metabólicas alternas, como la vía del glioxilato, que utiliza triacilglicéridos para la obtención de carbohidratos como la glucosa (Muñoz-Elías y McKinney, 2006).

Los organismos heterotróficos al estar expuestos a variaciones ambientales estresantes como pH ácidos, responden eliminando los protones mediante bombas dependientes de ATP, lo que requiere energía que es obtenida principalmente de los carbohidratos, pero cuando estos se encuentran en cantidades limitadas, es necesario obtener energía mediante otras macromoléculas como los lípidos, que se

catabolizan para generar ATP y así poder utilizar la H^+ ATPasa como mecanismos de repuestas al estrés por el pH (Guan y Liu, 2020). Por lo tanto, la concentración de lípidos puede estar involucrada en el uso de estos compuestos como fuente de energía para regular la homeostasis de los microorganismos durante el cultivo. En este estudio el valor inicial de pH fue de 4.3, pero conforme los tratamientos con adición de nitrógeno inorgánico (C:N 15:1 y 8.5:1) entraron a su fase exponencial el pH cayó a un valor de 3.8 a las 40 y 48 h (tiempo 4 y 5 respectivamente), mostrando una reducción en la concentración de lípidos en los tiempos 4 y 5. Esto podría indicar que una fracción de lípidos se utiliza como fuente de energía de manera simultánea al descenso de pH como mecanismo de regulación por estrés fisiológico.

4.1.5 Carbohidratos

La cantidad de carbohidratos que se obtuvo para el orujo de uva en este estudio fue de 200 mg g^{-1} de m.s., que es inferior a $29.20 \text{ g} / 100 \text{ g}$ de m.s. que es equivalente a 292 mg g^{-1} reportados por Spinei y Oroian, (2021) y se encuentra en el límite inferior reportado por Rondeau *et al.* (2013) para 8 tipos de orujo en diferentes regiones de Francia, con concentraciones que van de 19.49 a $46.44 \text{ g} / 100 \text{ g}$ equivalentes a 19.49 al 46.44 mg g^{-1} y es mucho menor que el rango de 30.8 a $44.5 \text{ g} / \text{kg}$ que es equivalente a 30.8 a 44.5 mg g^{-1} reportado por Jin *et al.* (2019) para las variedades de orujos rojos (Chambourcin, híbrido interespecífico, Blacksburg, VA, USA), Merlot, Cabernet Franc y Petit Verdot (*V. vinifera*, Crozet, VA, USA). Estas variaciones en el contenido de carbohidratos están relacionadas con la variedad de uva, las condiciones ambientales en donde se desarrolla la vid y con los procesos de producción del mosto (Spinei y Oroian, 2021).

El contenido de carbohidratos totales de las harinas microbianas producidas en este trabajo varía entre 135 y 172 mg g^{-1} de m.s., dependiendo de la relación C:N y de la duración del proceso heterotrófico en el biorreactor. La comparación entre la cantidad de carbohidratos en el orujo de uva 200 mg g^{-1} y la harina microbiana, muestra una disminución moderada del 22 %. Esta reducción moderada en el contenido de carbohidratos puede deberse al uso de carbohidratos residuales que no fueron metabolizados y se mantuvo una fracción residual después de los procesos fermentativos que pasan los orujos durante la elaboración de vino y que son de mayor biodisponibilidad como los azúcares simples o disacáridos que se utilizan como fuente de energía durante el metabolismo y también como esqueletos de carbono para la generación de biomoléculas. Finalmente, la tendencia que muestra la cantidad de carbohidratos entre los tratamientos se mantiene estable, esto podría indicar un posible agotamiento de estos carbohidratos de mayor asimilación. A pesar de ello, esto no es una limitante para el uso de otro tipo de carbohidratos de mayor complejidad, que para su uso implica que los microorganismos deben sintetizar enzimas que

ayuden a la degradación de los carbohidratos complejos como celulosa y hemicelulosa, convirtiéndolos a su forma menos compleja y fácilmente asimilable como la glucosa, esto permite que tengan un mayor potencial de uso los residuos lignocelulósicos como fuente de carbono para su uso en la producción de harinas microbianas (Bikash Chandra *et al.*, 2017).

Capítulo 5. Conclusiones

La adición de nitrógeno inorgánico y una mejor relación C:N, aumenta el crecimiento de los microorganismos en los cultivos microbianos. Por lo tanto, el contenido de proteína en la harina microbiana aumentó a un 46.5 % en comparación con el contenido de proteína de 9.2 % de la harina de orujo de uva cultivada a las 48 h con la relación C:N de 8.5:1

La cantidad de fenoles que se retienen en la harina microbiana cultivada a las 48 h con la relación C:N de 8.5:1 es de 57.98 %.

El pH de la harina de orujo de uva tiene un valor ácido de 4.3 derivado del proceso de fermentación que previamente sufre durante la elaboración de vino tinto. Esta condición favorece a la dominancia un grupo de microorganismos que afecta el contenido de proteína.

Recomendaciones

Diseñar y utilizar un biorreactor adecuado para el tipo de microorganismos que se desea cultivar que permita mantener la materia orgánica suspendida en la columna de agua, y que permita medir el crecimiento microbiano por medio de respirometría sin subestimar la tasa de consumo de oxígeno por la pérdida de microorganismos que se acumulan en la pared del biorreactor relacionada con la interfase agua-aire.

Mantener en suspensión y movimiento los cultivos microbianos, evitando que se precipite el sustrato y que no se pierdan los microorganismos fuera de la columna de agua por adhesión en las paredes del cultivo.

Realizar el cultivo de la harina microbiana bajo condiciones de pH neutro para valorar si mejora el contenido de proteína en la harina microbiana.

Cuantificar la cantidad de lípidos por métodos gravimétricos y no espectrofotométricos para evitar la interferencia por moléculas que contenga el orujo de uva como las antocianinas.

Evaluar la digestibilidad de la harina microbiana para valorar su uso potencial como fuente de proteína en la inclusión de dietas para organismos acuáticos y el efecto antinutricional de la harina microbiana

formulando dietas con diferentes niveles de inclusión para algún organismo de interés comercial y evaluar su IC_{50} (concentración de inhibidor requerida para una inhibición del 50% de la actividad enzimática).

Evaluar la capacidad antioxidante de la harina microbiana en un modelo biológico para comprobar su efecto en la reducción de estrés oxidativo. Midiendo enzimas antioxidantes como catalasa, glutatión peroxidasa o superóxido dismutasa, bajo una condición de estrés aplicada a un modelo biológico y poder determinar si la harina microbiana tiene un efecto antioxidante.

Literatura citada

- Adedayo, M. R., Ajiboye, E. A., & Odaibo, A. (2011). Single Cell Proteins: As Nutritional Enhancer. *Advances in Applied Science Research*, 2(5), 396–409. <https://www.semanticscholar.org/paper/Single-cell-proteins%3A-as-nutritional-enhancer.-Adedayo-Ajiboye/a3eb03426c3765b6bbc882b4590f54a33f6eb8b8>
- Al Jitan, S., Alkhoori, S. A., & Yousef, L. F. (2018). Phenolic Acids From Plants: Extraction and Application to Human Health. En *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 58, pp. 389–417). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64056-7.00013-1>
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, 4, 200–214. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>
- Allen, R. J., & Waclaw, B. (2019). Bacterial growth: A statistical physicist's guide. *Reports on Progress in Physics*, 82(1). <https://doi.org/10.1088/1361-6633/aae546>
- Ávalos, G. A., & Pérez-Urria, C. E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119–145. <https://docta.ucm.es/rest/api/core/bitstreams/26b94db5-92de-4aaf-8822-8f063c180904/content>
- Avnimelech, Y. (2009). *Biofloc technology a practical guide book* (3a ed.). The World Aquaculture Society.
- Basha, M. K., Rajendran, A., & Thangavelu, V. (2010). Recent Advances in the Biodegradation of Phenol: A Review. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*, 1, 219–234. <https://www.researchgate.net/publication/265526019>
- Becerril-Cortés, D., Del, M., Monroy-Dosta, C., Gustavo, M., Emerenciano, C., Sofia, B., Bermúdez, S., Correa, G. V., Castro-Mejía, G., & Schettino Bermúdez, B. S. (2018). Effect on nutritional composition of produced bioflocs with different carbon sources (Molasses, coffee waste and rice bran) in Biofloc system. *International journal of fisheries and aquatic studies*, 6(2), 541–547. <https://www.fisheriesjournal.com/archives/2018/vol6issue2/PartG/6-2-30-391.pdf>
- Behera, B. K., & Varma, A. (2017). Microbial biomass process technologies and management. En *Microbial Biomass Process Technologies and Management*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-53913-3>
- Beopoulos, A., Cescut, J., Haddouche, R., Uribelarrea, J. L., Molina-Jouve, C., & Nicaud, J. M. (2009). *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Research*, 48(6), 375–387. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.08.005>
- Beres, C., Costa, G. N. S., Cabezudo, I., da Silva-James, N. K., Teles, A. S. C., Cruz, A. P. G., Mellinger-Silva, C., Tonon, R. V., Cabral, L. M. C., & Freitas, S. P. (2017). Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Management*, 68, 581–594. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.07.017>
- Bhalla, T. C., & Joshi, M. (1994). Protein enrichment of apple pomace by co-culture of cellulolytic moulds and yeasts. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 10, 116–117. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/bf00357577.pdf>

- Bhatia, S. (2015). Plant Tissue Culture. En *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences* (pp. 31–107). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4.00002-9>
- Bikash Chandra, B., Sethi, B. K., Mishra, R. R., Dutta, S. K., & Thatoi, H. N. (2017). Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 197–210. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.12.001>
- Bogale, T. T. (2020). Microbial Protein Production from Agro-industrial Wastes as Food and Feed. *American Journal of Life Sciences*, 8(5), 121. <https://doi.org/10.11648/j.ajls.20200805.16>
- Brenes, A., Viveros, A., Chamorro, S., & Arija, I. (2016). Use of polyphenol-rich grape by-products in monogastric nutrition. A review. *Animal Feed Science and Technology*, 211, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.09.016>
- Brust, G. E. (2019). Management strategies for organic vegetable fertility. En *Safety and Practice for Organic Food* (pp. 193–212). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812060-6.00009-X>
- Burkovski, A. (2003). I do it my way: Regulation of ammonium uptake and ammonium assimilation in *Corynebacterium glutamicum*. *Archives of Microbiology*, 179(2), 83–88. <https://doi.org/10.1007/s00203-002-0505-4>
- Cabello, A., García, A., Figuera, Bertha, Higuera, Yoli, & Vallenilla, O. (2013). Ciencias básicas y tecnología calidad físico-química de la harina de pescado venezolana. *Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente*, 25(4), 414–422. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=427739464009>
- Çalik, P., Yilgör, P., & Demir, A. S. (2006). Influence of controlled-pH and uncontrolled-pH operations on recombinant benzaldehyde lyase production by *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(5), 617–627. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.07.029>
- Caycedo, L. L., Corrales Ramírez, L. C., & Trujillo Suárez, D. M. (2021). Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. *Nova*, 19(36), 49–94. <https://doi.org/10.22490/24629448.5293>
- Chakdar, H., Kumar, M., Pandiyan, K., Singh, A., Nanjappan, K., Kashyap, P. L., & Srivastava, A. K. (2016). Bacterial xylanases: biology to biotechnology. *3 Biotech*, 6(150). <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0457-z>
- Ciani, M., Comitini, F., & Mannazzu, I. (2008). Fermentation Metabolic Biodiversity. En *Encyclopedia of Ecology* (pp. 1548–1557). <https://doi.org/10.1016/b978-008045405-4.00272-x>
- Cooper Bribiesca, B. L. (2013). Enzimas xilanólicas bacterianas y sus aplicaciones industriales institución. *Vertientes. Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 16(1), 19–22. <https://www.revistas.unam.mx/index.php/vertientes/article/view/51713>
- Damashek, J., & Francis, C. A. (2018). Microbial Nitrogen Cycling in Estuaries: From Genes to Ecosystem Processes. *Estuaries and Coasts*, 41(3), 626–660. <https://doi.org/10.1007/s12237-017-0306-2>
- Dantas, E. M., Valle, B. C. S., Brito, C. M. S., Calazans, N. K. F., Peixoto, S. R. M., & Soares, R. B. (2016). Partial replacement of fishmeal with biofloc meal in the diet of postlarvae of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 22(2), 335–342. <https://doi.org/10.1111/anu.12249>

- Dávila, I., Robles, E., Egüés, I., Labidi, J., & Gullón, P. (2017). The Biorefinery Concept for the Industrial Valorization of Grape Processing By-Products. En *Handbook of Grape Processing By-Products: Sustainable Solutions* (pp. 29–53). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809870-7.00002-8>
- Dowhan, W., Bogdanov, M., & Mileykovskaya, E. (2008). Functional roles of lipids in membranes. En D. E. Vance & J. E. Vance (Eds.), *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (5a ed., pp. 1–37). Elsevier. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780444532190500039>
- Duarte, L. C., Carvalheiro, F., Lopes, S., Neves, I., & Gírio, F. M. (2008). Yeast biomass production in brewery's spent grains hemicellulosic hydrolyzate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 148, 119–129. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-8046-6>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1954). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3). <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60111a017>
- Ebeling, J. M., Timmons, M. B., & Bisogni, J. J. (2006). Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, 257, 346–358. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.019>
- Erickson, L. E. (2009). Bioreactors. En M. Schaechter (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology* (3a ed., pp. 206–211). Elsevier. <https://www.sciencedirect.com/referencework/9780123739445/encyclopedia-of-microbiology>
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). (2022). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. En *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461es>
- Fenchel, T., King, G. M., & Blackburn, T. H. (2012). Degradation of Organic Polymers and Hydrocarbons. En *Bacterial Biogeochemistry* (pp. 49–57). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-415836-8.00003-7>
- Foti, M., Piattelli, M., Amico, V., & Rubertobp, G. (1994). Antioxidant activity of phenolic meroditerpenoids from marine algae. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 26(2), 159–164. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1011134494070385>
- Gamboa-Delgado, J., & Márquez-Reyes, J. M. (2016). Potential of microbial-derived nutrients for aquaculture development. *Reviews in Aquaculture*, 10(1), 224–246. <https://doi.org/10.1111/raq.12157>
- García Martínez, E. M., Fernández Segovia, I., & Fuentes López, A. (2015). *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu*. <https://riunet.upv.es:443/handle/10251/52056>
- García-Becerra, L., Mitjans, M., Rivas-Morales, C., Verde-Star, J., Oranday-Cárdenas, A., & Vinardell María, P. (2016). Antioxidant comparative effects of two grape pomace Mexican extracts from vineyards on erythrocytes. *Food Chemistry*, 194, 1081–1088. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.131>
- García-Lomillo, J., & González-SanJosé, M. L. (2017). Applications of Wine Pomace in the Food Industry: Approaches and Functions. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(1), 3–22. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12238>

- Gordo, M. D. A. (2018). Los Compuestos Fenólicos, Un Acercamiento A Su Biosíntesis, Síntesis Y Actividad Biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 9(1), 81–104. https://www.researchgate.net/publication/326902933_Los_Compuestos_Fenolicos_Un_Acercamiento_A_Su_Biosintesis_Sintesis_Y_Actividad_Biologica
- Guan, N., & Liu, L. (2020). Microbial response to acid stress: mechanisms and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(1), 51–65. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10226-1>
- Hagman, M., La, J., & Jansen, C. (2007). Oxygen uptake rate measurements for application at wastewater treatment plants. *vatten*, 63, 131–138. https://www.tidskriftenvatten.se/wp-content/uploads/2017/04/48_article_2361.pdf
- Haida, Z., & Hakimian, M. (2019). A comprehensive review on the determination of enzymatic assay and nonenzymatic antioxidant activities. *Food Science and Nutrition*, 7(5), 1555–1563. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1012>
- He, H., Li, Y., Zhang, L., Ding, Z., & Shi, G. (2022). Understanding and application of Bacillus nitrogen regulation: A synthetic biology perspective: *Journal of Advanced Research*. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2022.09.003>
- Huang, H. H., Liao, H. M., Lei, Y. J., & Yang, P. H. (2022). Effects of different carbon sources on growth performance of *Litopenaeus vannamei* and water quality in the biofloc system in low salinity. *Aquaculture*, 546. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144860922000413>
- Ibarra Mayorga, E., Llanes Iglesias, J. E., & Rodríguez Sánchez, B. (2019). Nutritional characterization of biofloc developed with water from the Ecuadorian Pacific for growing *Litopenaeus vannamei*. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 53(4). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2079-34802019000400395&lng=es&tling=en.
- Jackson, R. S. (2020). Chemical constituents of grapes and wine. En *Wine Science* (pp. 375–459). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816118-0.00006-4>
- Jimenez-Diaz, L., Caballero, A., & Segura, A. (2017). Pathways for the Degradation of Fatty Acids in Bacteria. En *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils and Lipids* (pp. 1–23). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39782-5_42-1
- Jin, B., Van Leeuwen, H. J., Patel, B., & Yu, Q. (1998). Utilisation of starch processing wastewater for production of microbial biomass protein and fungal α -amylase by *aspergillus oryzae*. *Bioresource Technology*, 66, 201–206. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852498000601>
- Jin, Q., O’Hair, J., Stewart, A. C., O’Keefe, S. F., Neilson, A. P., Kim, Y. T., McGuire, M., Lee, A., Wilder, G., & Huang, H. (2019). Compositional characterization of different industrial white and red grape pomaces in Virginia and the potential valorization of the major components. *Foods*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/foods8120667>
- Jones, S. W., Karpol, A., Friedman, S., Maru, B. T., & Tracy, B. P. (2020). Recent advances in single cell protein use as a feed ingredient in aquaculture. *Current Opinion in Biotechnology*, 61, 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.026>

- Jurtshuk, P. (1996). Bacterial Metabolism. En *Microbiología médica* (4a ed.). National library of medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7919/>
- Kathleen Park, T., & Barry, C. (2017). *Foundations in Microbiology: Basic Principles* (10a ed.). McGraw Hill.
- Kaya, D., Genc, M. A., Aktas, M., Eroldogan, O. T., Aydin, F. G., & Genc, E. (2019). Effects of biofloc technology (BFT) on growth of speckled shrimp (*metapenaeus monoceros*). *Tarim Bilimleri Dergisi*, 25(4), 491–497. <https://doi.org/10.15832/ankutbd.441745>
- Konar, M., Qiu, S., Tougher, B., Vause, J., Tlusty, M., Fitzsimmons, K., Barrows, R., & Cao, L. (2019). Illustrating the hidden economic, social and ecological values of global forage fish resources. *Resources, Conservation and Recycling*, 151. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2019.104456>
- Krastanov, A., Alexieva, Z., & Yemendzhiev, H. (2013). Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives. *Engineering in Life Sciences*, 13(1), 76–87. <https://doi.org/10.1002/elsc.201100227>
- Kuhn, D. D., Boardman, G. D., Lawrence, A. L., Marsh, L., & Flick, G. J. (2009). Microbial floc meal as a replacement ingredient for fish meal and soybean protein in shrimp feed. *Aquaculture*, 296, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.07.025>
- Lima, E. C. R., Souza, R. L., Girao, P. J. M., Braga, Í. F. M., & Correia, E. de S. (2018). Culture of Nile tilapia in a biofloc system with different sources of carbon. *Revista Ciencia Agronomica*, 49(3), 458–466. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20180052>
- Liu, B., Li, Y., Song, J., Zhang, L., Dong, J., & Yang, Q. (2014). Production of single-cell protein with two-step fermentation for treatment of potato starch processing waste. *Cellulose*, 21(5), 3637–3645. <https://doi.org/10.1007/s10570-014-0400-6>
- Liu, B., Song, J., Li, Y., Niu, J., Wang, Z., & Yang, Q. (2013). Towards industrially feasible treatment of potato starch processing waste by mixed cultures. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(4), 1001–1010. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0401-1>
- Lizárraga-Velázquez, C. E., Hernández, C., González-Aguilar, G. A., & Heredia, J. B. (2019). Effect of dietary intake of phenolic compounds from mango peel extract on growth, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in zebrafish (*Danio rerio*). *Latin American Journal of Aquatic Research*, 47(4), 602–611. <https://doi.org/10.3856/vol47-issue4-fulltext-3>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender Kelly S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). *Brock. Biología de los Microorganismos* (M. Martin Romo, Ed.; 14a ed.). Pearson.
- Maier, R. M. (2009). Bacterial Growth. En *Environmental Microbiology* (pp. 37–54). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370519-8.00003-1>
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., Tuñón, M. J., & Jesús Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes Correspondencia. *Nutrición hospitalaria*, 17(6), 271–278. <https://www.nutricionhospitalaria.org/magazines/242/show>
- Matos Trujillo, M., Pérez Hernández, Y., Avila, A. V., Ranilla, M. J., Alonso, Z. R., Fontanills, Y. R., Reyes, A. D., Jardines González, S., & Camacho Campos, C. (2020). Use of agroindustrial residues for producing enzymes by *Bacillus subtilis* E 44 Utilización de residuos agroindustriales para la producción de enzimas por *Bacillus subtilis* E 44. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 54(1).

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2079-34802020000100035&lng=es&tlng=en.

- Merrick, M. J., & Edwards, R. A. (1995). Nitrogen Control in Bacteria. *Microbiological reviews*, 59(4), 604–622. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/mr.59.4.604-622.1995>
- Metcalf & Eddy Inc, Tchobanoglous, G., Stensel, David. H., Tsuchihashi, R., & Burton, F. (2014). *Wastewater Engineering: Treatment and Resource Recovery* (5a ed.). McGraw-Hill Professional.
- Mishra, V. K., & Kumar, N. (2017). Microbial Degradation of Phenol: A Review Journal of Water Pollution & Purification Research Microbial Degradation of Phenol: A Review. *Journal of Water Pollution & Purification Research*, 4(1), 17–22. https://www.researchgate.net/publication/316666855_Microbial_Degradation_of_Phenol_A_Review
- Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology*, 3, 371–394. <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.mi.03.100149.002103>
- Monroy-Dosta, M. del C., de Lara, R. A., Castro-Mejía, J., Castro-Mejía, G., & Coelho-Emerenciano, M. G. (2013). Microbiology community composition and abundance associated to biofloc in tilapia aquaculture. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 48(3), 511–520. <https://doi.org/10.4067/s0718-19572013000300009>
- Moreno, A. D., Ballesteros, M., & Negro, M. J. (2020). Biorefineries for the valorization of food processing waste. En *The Interaction of Food Industry and Environment* (pp. 155–190). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816449-5.00005-9>
- Muñoz-Elías, E. J., & McKinney, J. D. (2006). Carbon metabolism of intracellular bacteria. *Cellular Microbiology*, 8(1), 10–22. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00648.x>
- Najafpour, G. D. (2007). Single-Cell Protein. *Biochemical Engineering and Biotechnology*, 332–341. <https://doi.org/10.1016/B978-044452845-2/50014-8>
- Nasseri, A. T., Rasoul-Amini, S., Morowvat, M. H., & Ghasemi, Y. (2011). Single Cell Protein: Production and Process. *American Journal of Food Technology*, 6(2), 103–106. <https://doi.org/10.3923/ajft.2011.103.116>
- Negro, C., Tommasi, L., & Miceli, A. (2003). Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technology*, 87(1), 41–44. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12733573/>
- Neto, H. S., Santaella, S. T., & Nunes, A. J. P. (2015). Bioavailability of crude protein and lipid from biofloc meals produced in an activated sludge system for white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 44(8), 269–275. <https://doi.org/10.1590/S1806-92902015000800001>
- Newsholme, P., Stenson, L., Sulvucci, M., Sumayao, R., & Krause, M. (2011). Amino Acid Metabolism. En *Comprehensive Biotechnology, Second Edition* (Vol. 1, pp. 3–14). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00002-7>
- Niles, L. J., Dey, A. D., & Maslo, B. (2014). Overexploitation of marine species and its consequences for terrestrial biodiversity along coasts. En *Coastal Conservation* (pp. 347–368). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/cbo9781139137089.014>

- Nootash, S., Sheikhzadeh, N., Baradaran, B., Oushani, A. K., Maleki Moghadam, M. R., Nofouzi, K., Monfaredan, A., Aghebati, L., Zare, F., & Shabanzadeh, S. (2013). Green tea (*Camellia sinensis*) administration induces expression of immune relevant genes and biochemical parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*, 35(6), 1916–1923. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.09.030>
- Noparatnaraporn, N., & Nagai, S. (1986). Selection of rhodobacter sphaeroides P47 as a useful source of single cell protein. *J. Gen. Appl. Microbiol*, 32, 351–359. <https://www.semanticscholar.org/paper/SELECTION-OF-RHODOBACTER-SPHAEROIDES-P47-AS-A-OF-Noparatnaraporn-Nagai/a961527e616a8ab28ecf039a775b4f3963c20e7b>
- Noparatnaraporn, N., Trakulnaleumsai, S., Silveira, R. G., Nishizawa, Y., & Nagai, S. (1987). SCP Production by mixed culture of rhodocyclus gelatinosus and rhodobacter sphaeroides from cassava waste. *J. Ferment. Technol*, 65(1), 11–16. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0385638087900598>
- Nwoko, E. S. Q. A., & Okeke, I. N. (2021). Bacteria autoaggregation: How and why bacteria stick together. *Biochemical Society Transactions*, 49(3), 1147–1157. <https://doi.org/10.1042/BST20200718>
- Olmo, C. H. D., Santos, V. E., Alcon, A., & Garcia-Ochoa, F. (2005). Production of a Rhodococcus erythropolis IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulfurization: Influence of operational conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 22(3), 229–237. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.09.015>
- Øverland, M., Karlsson, A., Mydland, L. T., Romarheim, O. H., & Skrede, A. (2013). Evaluation of *Candida utilis*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts as protein sources in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 402–403, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.03.016>
- Øverland, M., Tauson, A. H., Shearer, K., & Skrede, A. (2010). Evaluation of methane-utilising bacteria products as feed ingredients for monogastric animals. En *Archives of Animal Nutrition* (Vol. 64, Número 3, pp. 171–189). <https://doi.org/10.1080/17450391003691534>
- Pande, S. V., Parvin Khan, R., & Venkitasubraimanian, T. A. (1963). Microdetermination of lipids and serum total fatty acids. *Analytical Biochemistry*, 6, 415–423. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003269763900940>
- Paraskevopoulou, A., Athanasiadis, I., Kanellaki, M., Bekatorou, A., Blekas, G., & Kiosseoglou, V. (2003). Functional properties of single cell protein produced by kefir microflora. *Food Research International*, 36(5), 431–438. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(02\)00176-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(02)00176-X)
- Peixoto, C. M., Dias, M. I., Alves, M. J., Calhelha, R. C., Barros, L., Pinho, S. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. *Food Chemistry*, 253, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.163>
- Peña, E., Badillo-Zapata, D., Viana, M. T., & Correa-Reyes, G. (2020). Use of grape pomace in formulated feed for the rainbow trout fry, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *Journal of the World Aquaculture Society*, 51(2), 542–550. <https://doi.org/10.1111/jwas.12669>
- Pérez-Pérez, E., Ettene, G., Merín, M., Casassa-Padron, A., Silvia, N., Raga, J., González, C., Sandoval, L., & Medina, D. (2014). Determinación de fenoles y flavonoides totales en hojas de guayabo (*Psidium*

- guajava L.). *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia*, 31(1), 60–77. <https://www.revfacagronluz.org.ve/>
- Pessoa, A., Mancilhab, I. M., & Satoc, S. (1996). Cultivation of *Candida tropicalis* in sugar cane hemicellulosic hydrolyzate for microbial protein production. *Journal of Biotechnology*, 51, 83–88. <https://www.semanticscholar.org/paper/Cultivation-of-Candida-tropicalis-in-sugar-cane-for-Pessoa-Mancilha/eb29798fe26f9937e388776afc5ba976871ed682>
- Prangnell, D. I., Samocha, T. M., & Staresinic, N. (2019). Water. En *Sustainable Biofloc Systems for Marine Shrimp* (pp. 37–58). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818040-2.00004-6>
- Prozil, S. O., Evtuguin, D. V., & Lopes, L. P. C. (2012). Chemical composition of grape stalks of *Vitis vinifera* L. from red grape pomaces. *Industrial Crops and Products*, 35(1), 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.06.035>
- Rajkumar, M., Pandey, P. K., Aravind, R., Vennila, A., Bharti, V., & Purushothaman, C. S. (2016). Effect of different biofloc system on water quality, biofloc composition and growth performance in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture Research*, 47(11), 3432–3444. <https://doi.org/10.1111/are.12792>
- Ratnasooriya, C. C., & Rupasinghe, H. P. V. (2012). Extraction of phenolic compounds from grapes and their pomace using β -cyclodextrin. *Food Chemistry*, 134(2), 625–631. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.014>
- Rodríguez, J., Ferraz, A., Nogueira, R. F. P., Ferrer, I., Esposito, E., & Durán, N. (1997). Lignin Biodegradation by the Ascomycete *Chrysondia sitophila*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 62, 233–242. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9170255/>
- Rondeau, P., Gambier, F., Jolibert, F., & Brosse, N. (2013). Compositions and chemical variability of grape pomaces from French vineyard. *Industrial Crops and Products*, 43(1), 251–254. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.053>
- Said, S. D., Zaki, M., Asnawi, T. M., & Novita, E. (2019). Single cell protein production by a local *Aspergillus niger* in solid state fermentation using rice straw pulp as carbon source: Effects of fermentation variables. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 543(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/543/1/012002>
- Samocha, T. M., & Prangnell, D. I. (2019). System treatment and preparation. En *Sustainable Biofloc Systems for Marine Shrimp* (pp. 119–131). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818040-2.00006-X>
- Samtiya, M., Aluko, R. E., & Dhewa, T. (2020). Plant food anti-nutritional factors and their reduction strategies: an overview. *Food Production, Processing and Nutrition*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/s43014-020-0020-5>
- Schieber, A., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2001). By-products of plant food processing as a source of functional compounds-recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 12, 401–413. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224402000122>
- Schink, B., Philipp, B., & Müller, J. (2000). Anaerobic Degradation of Phenolic Compounds. *Naturwissenschaften*, 87, 12–23. <https://link.springer.com/article/10.1007/s001140050002>

- Schneider, O., Sereti, V., Machiels, M. A. M., Eding, E. H., & Verreth, J. A. J. (2006). The potential of producing heterotrophic bacteria biomass on aquaculture waste. *Water Research*, 40(14), 2684–2694. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.05.008>
- Shepherd, C. J., & Jackson, A. J. (2013). Global fishmeal and fish-oil supply: Inputs, outputs and markets. *Journal of Fish Biology*, 83(4), 1046–1066. <https://doi.org/10.1111/jfb.12224>
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). (2023). *Panorama Agroalimentario*. <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/panorama-agroalimentario-258035>
- Singh, A., Abidi, A. B., Agrawal, A. K., & Darmwal, N. S. (1991). Single cell protein production by *Aspergillus niger* and its evaluation. *Zentralblatt für Mikrobiologie*, 146(3), 181–184. [https://doi.org/10.1016/s0232-4393\(11\)80178-2](https://doi.org/10.1016/s0232-4393(11)80178-2)
- Sorokin, C. (1973). Dry weight, packed cell volume and optical density. En *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurement*. Cambridge University Press.
- Spinei, M., & Oroian, M. (2021). The Potential of Grape Pomace Varieties as a Dietary Source of Pectic Substances. *Foods*, 10(867). <https://doi.org/10.3390/foods>
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2016). Microbial growth kinetics. En F. Geraghty (Ed.), *Principles of Fermentation Technology* (Third, pp. 21–74). Joe Hayton. <https://www.sciencedirect.com/book/9780080999531/principles-of-fermentation-technology>
- Tacon, A. G. J., & Metian, M. (2015). Feed matters: Satisfying the feed demand of aquaculture. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 23(1), 1–10. <https://doi.org/10.1080/23308249.2014.987209>
- Tsai, S.-C., Tsai, L.-D., & Li, Y.-K. (2005). An Isolated *Candida albicans* TL3 Capable of Degrading Phenol at Large Concentration. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 69(12), 2358–2367. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.2358>
- Valentino, M. J. G., Ganado, J. S., & Undan, J. R. (2016). *Single cell protein potential of endophytic fungi associated with bamboo using rice bran as substrate*. <https://www.primescholars.com/articles/single-cell-protein-potential-of-endophytic-fungi-associated-with-bamboo-using-rice-bran-as-substrate.pdf>
- Villasante, A., Patro, B., Chew, B., Becerra, M., Wacyk, J., Overturf, K., Powell, M. S., & Hardy, R. W. (2015). Dietary Intake of Purple Corn Extract Reduces Fat Body Content and Improves Antioxidant Capacity and n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Profile in Plasma of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 46(4), 381–394. <https://doi.org/10.1111/jwas.12206>
- Wang, L., Yang, J., Huang, Y., Liu, Q., Xu, Y., Piao, X., & Wise, M. J. (2019). Systematic analysis of metabolic pathway distributions of bacterial energy reserves. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 9(8), 2489–2496. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400123>
- Ward, B. B. (2008). Nitrification in Marine Systems. En *Nitrogen in the Marine Environment* (pp. 199–261). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372522-6.00005-0>
- Wei, Y. F., Liao, S. A., & Wang, A. li. (2016). The effect of different carbon sources on the nutritional composition, microbial community and structure of bioflocs. *Aquaculture*, 465, 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.08.040>

- Xu, W. J., Morris, T. C., & Samocha, T. M. (2016). Effects of C/N ratio on biofloc development, water quality, and performance of *Litopenaeus vannamei* juveniles in a biofloc-based, high-density, zero-exchange, outdoor tank system. *Aquaculture*, 453, 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.021>
- Zappi, M., Dufreche, S., & Bajpai, R. K. (2010). Lipids from *Lipomyces starkeyi* H2 production from water View project. En *Article in Food Technology and Biotechnology*. <https://www.researchgate.net/publication/50385762>
- Zar, J. H. (2009). *Biostatistical Analysis* (5a ed.). Prentice Hall / Pearson.
- Zehr, J. P., & Ward, B. B. (2002). Nitrogen cycling in the ocean: New perspectives on processes and paradigms. En *Applied and Environmental Microbiology* (Vol. 68, Número 3, pp. 1015–1024). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1015-1024.2002>
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1998). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Elsevier*. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)