



UNIVERSIDAD
DE ALMERÍA

Caracterización de las actividades carbohidrasas producidas por especies marinas con aplicación potencial en la mejora del valor nutritivo de macroalgas

- TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA -

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

Departamento Biología y Geología

Curso 2020-2021

Alumno: Laura Fernández Bonilla

Director: Fco. Javier Moyano López

Codirectora: Francisca Purificación Martínez Antequera

INDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	5
1.1. Las macroalgas como alimento animal.....	5
1.2. Composición química de los diferentes tipos de macroalgas.....	6
1.2.1. <i>Los polisacáridos de las macroalgas</i>	<i>7</i>
1.2.2. <i>Limitaciones que suponen los carbohidratos de las algas para su utilización como nutriente</i>	<i>9</i>
1.3. Tratamientos usados para la hidrólisis de carbohidratos estructurales presentes en las macroalgas.....	11
1.4. Carbohidrasas aplicadas a la alimentación animal: xilanasa y glucanasa	12
1.4.1. <i>Actividad xilanasa.....</i>	<i>12</i>
1.4.2. <i>Actividad β-glucanasa</i>	<i>14</i>
1.5. Los invertebrados marinos como fuente de enzimas	16
1.5.1. <i>Descripción de <i>Patella vulgata</i> y <i>Siphonaria pectinata</i></i>	<i>17</i>
1.6. Importancia de determinar los parámetros funcionales de las enzimas para valorar su aplicación industrial.....	19
1.7. Objetivos del trabajo.....	20
2. MATERIAL Y MÉTODOS	20
2.1. Experimento 1. Caracterización funcional de las actividades carbohidrasas presente en <i>Patella vulgata</i> y <i>Siphonaria pectinata</i>	20
2.1.1. <i>Obtención del extracto enzimático de hepatopáncreas de <i>Patella vulgata</i> (EP) y <i>Siphonaria pectinata</i> (ES)</i>	<i>20</i>
2.1.2. <i>Medida de las actividades de xilanasa y β-1,3-glucanasa</i>	<i>20</i>
2.1.3. <i>Determinación de óptimos funcionales de pH y temperatura.....</i>	<i>21</i>
2.1.4. <i>Determinación de la termoestabilidad enzimática a 45 °C.....</i>	<i>21</i>
2.1.5. <i>Determinación de la estabilidad frente a distintos pHs</i>	<i>21</i>
2.2. Experimento 2. Caracterización de la cinética enzimática (V_{max} y K_m aparentes)	21
2.2.1. <i>Diseño experimental para caracterización de los parámetros cinéticos de xilanasa y β-1,3-glucanasa</i>	<i>22</i>
2.3. Experimento 3. Evaluación <i>in vitro</i> de la capacidad de hidrólisis de las enzimas xilanasa y β-1,3- glucanasa presentes en extractos de <i>P. vulgata</i> sobre la fracción de polisacáridos presentes en diferentes especies de macroalgas	23
2.4. Tratamiento estadístico de los datos	24
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24

3.1. Experimento 1. Caracterización funcional de las actividades carbohidrasas presentes en <i>Patella vulgata</i> y <i>Siphonaria pectinata</i>	24
3.1.1. Medida de la actividad xilanasa	24
3.1.2. Medida de la actividad β -1,3-glucanasa	27
3.2. Experimento 2. Caracterización de la cinética enzimática (V_{max} y K_m aparentes) de la xilanasa y β-1,3-glucanasa de ambas especies marinas	30
3.3. Experimento 3. Evaluación controlada mediante simulación <i>in vitro</i> de la capacidad de hidrólisis de las enzimas xilanasa y β-1,3- glucanasa para la mejora nutritiva de diferentes especies de macroalgas representativas de cada grupo.....	35
4. CONCLUSIONES	37
5. REFERENCIAS.....	38

RESUMEN

Una prioridad actual en la industria de la acuicultura es la sustitución de la harina y aceites de pescado por piensos alternativos con ingrediente de origen vegetal, siendo las algas marinas uno de los mejores recursos sostenibles aprovechables para este fin. No obstante, su inconveniente principal es la presencia de factores antinutritivos, como los polisacáridos no amiláceos (PNA), que pueden afectar en el bienestar del animal, condicionando cada vez más su utilización. Por ello, la suplementación de carbohidrasas exógenas como aditivo alimentario es una de las mejores alternativas para contrarrestar dicha limitación. El presente trabajo abordó la caracterización de los parámetros operativos y funcionales de las actividades xilanasa y β -1,3-glucanasa procedentes del hepatopáncreas de los moluscos marinos *Patella vulgata* y *Siphonaria pectinata*. Además, se evaluó la potencial aplicación de una mezcla enzimática de *Patella* para hidrolizar la fracción de carbohidratos que componen las paredes celulares de las macroalgas *Ulva ohnoi* (macroalga verde), *Undaria pinnatifida* (macroalga parda) y *Porphyra spp.* (macroalga roja). Se demostró que las mejores condiciones de hidrólisis enzimática se daban a pH 5.5-6.0 y en un intervalo de 30–50 °C, así como la estabilidad de la xilanasa frente a variaciones de pH y temperatura fue mejor en *Siphonaria*, mientras que la β -1,3-glucanasa de *Patella* mostró mayor estabilidad de pH y dicha enzima en *Siphonaria* presentó mejor termoestabilidad. También se vio que *Siphonaria* tenía mayor afinidad por el sustrato, mientras que la velocidad de reacción de ambas enzimas era mayor en *Patella*. Por otro lado, mediante la ejecución del ensayo *in vitro* se evidenció que la macroalga roja es por lo general más susceptible a la acción enzimática, seguida de la macroalga verde y por último la macroalga parda.

ABSTRACT

A current priority in the aquaculture industry is the replacement of fishmeal and fish oils by alternative feeds with plant-based ingredients, seaweeds being one of the best sustainable resources that can be used for this purpose. However, their main drawback is the presence of anti-nutritional factors, such as non-starch polysaccharides (NSP), which can affect animal welfare, increasingly conditioning their use. Therefore, the supplementation of exogenous carbohydrases as a feed additive is one of the best alternatives to counteract this limitation. The present work addressed the characterization of the operational and functional parameters of xylanase and β -1,3-glucanase activities from the hepatopancreas of the marine mollusks *Patella vulgata* and *Siphonaria pectinata*. In addition, the potential application of a *Patella* enzyme mixture to hydrolyze the carbohydrate fraction of the cell walls of the macroalgae *Ulva ohnoi* (green seaweed), *Undaria pinnatifida* (brown seaweed) and *Porphyra spp.* (red seaweed) was evaluated. It was demonstrated that the best enzymatic hydrolysis conditions were at pH 5.5-6.0 and in a range of 30- 50°C, as well as the stability of xylanase against pH and temperature variations was better in *Siphonaria*, while β -1,3-glucanase from *Patella* showed better pH stability and this enzyme in *Siphonaria* presented better thermostability. It was also seen that *Siphonaria* had higher affinity for the substrate, while the reaction rate of both enzymes was higher in *Patella*. On the other hand, by performing the *in vitro* assay it was evident that red macroalgae is generally more susceptible to enzymatic action, followed by green macroalgae and finally brown macroalgae.

1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Las macroalgas como alimento animal

Actualmente, la utilización de recursos alimenticios naturales cuya producción sea ambientalmente sostenible está siendo muy demandado. El futuro desarrollo del sector de la acuicultura de peces y crustáceos marinos se sustenta en este hecho, pues hoy en día tiene una alta dependencia por la harina y el aceite de pescado derivados de los desechos del proceso de acuicultura. Son insumos de alto valor económico que suponen un aumento del coste operativo de los piensos (Sinha *et al.*, 2011), por lo que, a largo plazo, ya no será económicamente sostenible hacer uso de ellos. Teniendo en cuenta esto, una buena alternativa para sustituir esta fuente de lípidos y proteínas animales es hacer uso de recursos de origen vegetal, recibiendo especial atención las macroalgas marinas.

En los últimos 20 años, la tasa de crecimiento del empleo de las macroalgas ha ido aumentando considerablemente convirtiéndolas así en una potencial materia prima con varias aplicaciones industriales (Fernandes *et al.*, 2019). Se trata de un grupo grande y diverso de protistas multicelulares que comúnmente se localizan en distintas regiones marítimas del mundo y en función del tipo de pigmento que poseen, se clasifican en verdes (*Chlorophyta*), rojas (*Rhodophyta*) y pardas (*Phaeophyta*). Morfológicamente son poco complejas pues no disponen de las estructuras propias de las plantas vasculares (raíz, tallo, hojas, etc.) haciendo así que su manejo sea mucho más sencillo y rápido. Cuentan con más de 10,000 especies conocidas, no obstante, el número de especies estudiadas es muy reducido por lo que los mecanismos de acción de algunos de los compuestos químicos presentes en las mismas no están debidamente establecidos (Magallanes *et al.*, 2003).

Pueden ser recolectadas y procesadas para la producción de biocombustibles, así como para la elaboración de piensos potencialmente sostenibles para el ganado y la acuicultura gracias a la gran diversidad de compuestos bioactivos (antioxidantes, ácidos grasos poliinsaturados, polifenoles, vitaminas, carotenoides y minerales), macronutrientes (tales como carbohidratos, grasas y proteínas) y oligoelementos (entre los que destacan manganeso, hierro, cobalto, selenio, zinc y níquel) que poseen. Además, todos estos compuestos pueden verse incrementados como respuesta adaptativa a condiciones ambientales extremas, tales como la salinidad, la radiación, la temperatura, entre otras (Paul *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2013; Svensson *et al.*, 2013). De la misma manera, se ha confirmado que los exudados de algunas especies de *Chlorophyta*, *Phaeophyta* y *Rhodophyta* presentan actividad antimicrobiana (Magallanes *et al.*, 2003) inhibiendo así aquellos patógenos microbianos que puedan perjudicar su desarrollo.

De acuerdo con los experimentos centrados en el estudio de la incorporación de las macroalgas en piensos, se ha demostrado que su inclusión en la dieta de animales como caballos, vacas, cerdos, gallinas, ovejas, langostas y peces proporciona efectos beneficiosos en ellos (Cruz-Suárez *et al.*, 2013; Garcia-Vaquero & Hayes, 2016; Magnoni *et al.*, 2017). De hecho se ha visto que su potencial como aditivo mineral las convierte en un suplemento alimenticio con efectos favorables sobre la salud animal (Holdt & Kraan, 2011). También se ha demostrado que la incorporación en las dietas de la dorada

(*Sparus aurata*) algas tratadas térmicamente, tales como como *Gracilaria vermiculophylla* (macroalga roja) o *Ulva Lactuca* (macroalga verde), suponen una mejora de la tolerancia a la hipoxia aguda en el animal, que suele darse en prácticas de acuicultura intensiva donde los peces pueden estar expuestos a bajos niveles de oxígeno disuelto (Magnoni *et al.*, 2017).

Así mismo, las macroalgas cuentan con la ventaja de que tienen un fácil cultivo y manejo en agua salada, donde a diferencia de la biomasa vegetal, no requieren de ningún tipo de tierra cultivable, haciendo así que la mano de obra sea prácticamente innecesaria.

En consecuencia, a todo lo mencionado anteriormente, podemos afirmar que este diverso grupo de organismos fotosintéticos reciben cada vez más atención como prometedoras alternativas sostenibles con potenciales beneficios nutricionales y posible ingrediente en piensos para la acuicultura y la ganadería.

1.2. Composición química de los diferentes tipos de macroalgas

La composición química de las macroalgas varía considerablemente entre especies, según el hábitat y las condiciones ambientales en las que se encuentren, así como en la temporada en que sean recolectadas. Factores como la luz del sol, la salinidad, las corrientes de agua e incluso la profundidad del mar dentro de un área geográfica pequeña también pueden condicionar esta variación (Rioux & Turgeon, 2015; Øverland *et al.*, 2019).

El rango de composición de estos constituyentes químicos es muy variable en función del tipo de macroalga (verdes, rojas y pardas). De la misma manera, también es cambiante el tipo de pared celular, el tipo de clorofila y los pigmentos que poseen. En la Tabla 1 se recoge un breve resumen de estas principales diferencias entre los tres grupos de macroalgas marinas. Tal y como se detalla, el contenido de proteínas en las macroalgas marrones es generalmente bajo en comparación con las verdes y en especial las rojas, que son las que mayor cantidad de proteínas en base a materia seca (MS) poseen e incluso algunas tales como *Porphyra* spp. tienen niveles de proteínas comparables a la harina de soja (García-Vaquero & Hayes, 2016). No obstante, este contenido en proteínas puede verse sobreestimado cuando se analiza por los tradicionales métodos de laboratorio debido a que las macroalgas también contienen grandes cantidades de nitrógeno no proteico en forma de nitratos, amoníaco y nitrito. También se han de considerar como una fuente rica de aminoácidos esenciales, tal como ácidos aspártico y glutámico, metionina e histidina. Por otro lado, el contenido de lípidos en las macroalgas es bastante reducido, no llegando a superar el 5 % del peso seco en ninguna de ellas. Esta fracción lipídica ha despertado un gran interés debido a su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) que son considerados componentes nutricionales fundamentales para animales y humanos (Kendel *et al.*, 2015).

Tabla 1. Características generales y estimación proximal de los constituyentes químicos en las macroalgas en base a distintos autores.

CARACTERÍSTICAS GENERALES				
	Macroalgas verdes	Macroalgas marrones	Macroalgas rojas	Referencias
Tipo de clorofila	a, b	a, c	a	
Tipo de pared celular	Simple	Doble	Doble	
Pigmentos que predominan	Luteína, zeaxantina, β -caroteno, neoxantina	Fucoxantina, β -caroteno, violaxantina	Luteína, zeaxantina, ficobiliproteínas, β -caroteno	Øverland <i>et al.</i> (2019)
CONSTITUYENTES QUÍMICOS				
	Macroalgas verdes	Macroalgas marrones	Macroalgas rojas	Referencias
	30 %	14 %	50 %	Makkar <i>et al.</i> (2016)
Proteínas totales (% de peso seco)	10-26 %	17-21 %	35-47 %	Garcia-Vaquero & Hayes (2016)
	44 %	24 %	50 %	Rioux & Turgeon (2015)
Lípidos totales (% de peso seco)	0.3-1.6 %	0.3-4.8 %	0.2-3.8 %	Rioux & Turgeon (2015)
Polisacáridos (% de peso seco)	15-65 %	4-68 %	36-76 %	Holdt & Kraan (2011)

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la composición en minerales nutricionalmente importantes también es elevada, encontrándose para la mayoría de especies un rango de 200-350 g/kg de MS (Øverland *et al.*, 2019). No obstante, hay que hacer especial mención a los polisacáridos estructurales y de reserva que componen a las células de estos organismos fotosintéticos.

1.2.1. Los polisacáridos de las macroalgas

Las algas marinas representan una fuente abundante de polisacáridos convirtiéndose así en una de las sustancias químicas extraídas de las algas más ampliamente explotadas (Stiger-Pouvreau *et al.*, 2016). La mayoría forman parte de su pared celular confiriéndoles función estructural, con la excepción de los carbohidratos de almacenamiento que se encuentra en el plastidio (Rioux & Turgeon, 2015). Este último carbohidrato juega un papel fundamental en el ciclo de vida de las algas pues son su principal

fuerza de energía y reserva fotosintética ya que sirven como compuestos de almacenamiento de carbono de alto valor biológico y comercial (Busi *et al.*, 2014). Algunos de ellos también realizan funciones osmorreguladoras y dependiendo de la especie y las condiciones climáticas en la que se encuentran, la proporción de polisacáridos va a ser mayor o menor.

De forma general, las concentraciones totales de polisacáridos en las especies de algas de interés oscilan entre el 4 % y el 76 % del peso seco, siendo las especies *Ascophyllum* (alga parda), *Porphyra* (alga roja) , *Palmaria* (alga roja) y *Ulva* (alga verde) los que contienen un mayor contenido, concretamente, para ésta última, puede alcanzar hasta el 65 % de su peso seco (Holdt & Kraan, 2011).

Las propiedades funcionales de estos carbohidratos, así como sus estructuras pueden verse significativamente afectados en función del periodo en el que se produce su cosecha y del tipo de especie de macroalga del que se produce su extracción. Además, cada clase de macroalgas produce polisacáridos específicos que constituyen a los componentes de los esqueletos fibrilares y están asociados a la matriz de cada pared celular (Stiger-Pouvreau *et al.*, 2016).

Las **algas rojas** son una gran fuente de galactanos sulfatados únicos tales como agarosa, agar y carragenanos también conocidos como ficocoloides. Todos estos polisacáridos representan alrededor del 70% de los componentes de la pared celular (Rioux & Turgeon, 2015) y les confiere al talo un aspecto viscoso que le hace resistente frente a digestiones enzimáticas (Usov, 2011). La presencia de glicanos estructurales más rígidos también es contundente, entre los cuales destacamos manano, xilano y celulosa. Así mismo, el principal carbohidrato de almacenamiento propio de las *Rhodophytas* es el almidón florideano que se encuentra en forma de gránulos de pequeño tamaño libres en el citoplasma. Este polisacárido está formado por la unión de aproximadamente 15 anillos de glucosa a través de enlaces α (1,4)- glucosídicos con puntos de ramificación ocasionales en la posición α (1,6). Su estructura es similar a la amilopectina y el glucógeno pues posee un grado de ramificación intermedio entre ambos, aunque se ha visto que se parece más a éste primero (Rioux & Turgeon, 2015; Stiger-Pouvreau *et al.*, 2016).

Por otro lado, las **algas pardas** contienen polisacáridos aniónicos en sus paredes celulares, entre los cuales se destacan los alginatos y los fucanos, siendo este último glicanos heterogéneos ricos en L-fucosa sulfatada. Estos mucopolisacáridos confieren una estructura gelatinosa y se ven reforzados por una red de fibrillas de celulosa que no llega a superar el 8 % del peso seco de estas macroalgas (Verma *et al.*, 2015). Proteínas, florotaninos y el mineral yodo son componentes adicionales que también contribuyen a la estructura de la matriz celular. Esta organización estructural se establece en base al modelo de la pared celular del orden de *Fucales* (Figura 1), que son algas pardas propias de las costas intermareales superiores de los océanos templados.

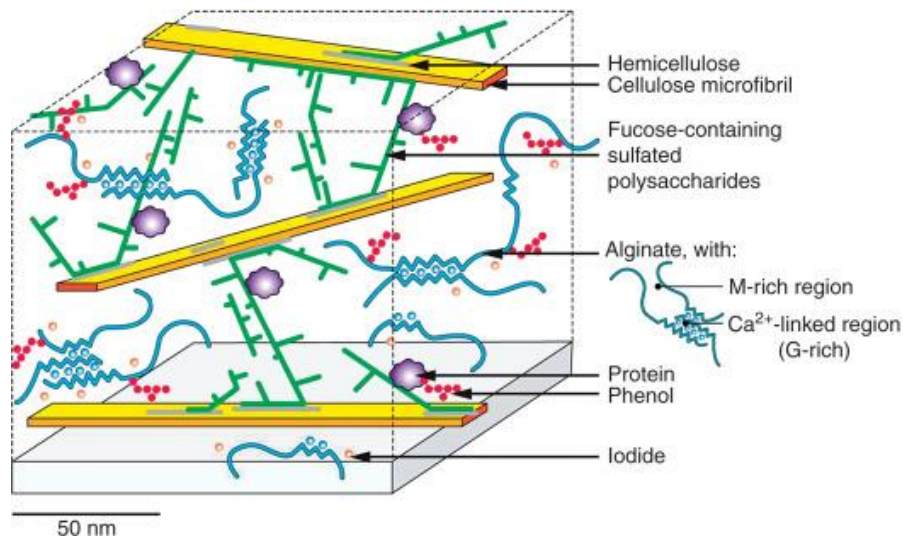


Figura 1. Modelo de pared celular de las algas pardas del orden Fucales (Rioux & Turgeon, 2015).

El principal polisacárido de reserva fotosintética en las algas pardas es la laminarina, siendo éste un β -1,3-glucano que de forma ocasional contiene ramificaciones en β -1,6 que les hace ser soluble en agua. Se localiza en el interior de las vacuolas o como depósitos en el citosol y la cantidad en la que se encuentra presente varía en función de la especie, la edad y la estación, siendo las algas del orden *Laminariaceae* las que contienen mayor cantidad de este carbohidrato, alcanzando hasta un 34 % de su peso seco (Stiger-Pouvreau *et al.*, 2016). Por otro lado, se ha visto que en aquellas algas marinas del orden *Fucales*, el contenido de laminarina varía del 1 al 19 %, llegando incluso a ser inferior que este primer porcentaje (Rioux & Turgeon, 2015; Stiger-Pouvreau *et al.*, 2016).

En las **algas verdes**, los polisacáridos de sus paredes celulares son generalmente sulfatados y representan alrededor del 38 al 54 % de su materia seca. La celulosa, hemicelulosa, xilanos, galactanos sulfatados y mananos suelen estar muy presentes, aunque dependiendo del género se encontrarán en mayor o menor abundancia. Por ejemplo, los géneros *Derbesia*, *Acetabularia*, *Halicoryne*, *Dasycladus*, *Neomeris*, *Cymopolia* y *Batophora* tienen como polímero de pared principal al manano (Stiger-Pouvreau *et al.*, 2016). En cambio, las algas del género *Ulva* y *Enteromorpha* se caracterizan por contener el polisacárido sulfatado ulvan, que llega a representar aproximadamente del 8 al 29 % del peso seco (Lahaye & Robic, 2007). El polisacárido de reserva que predomina en estas especies de macroalgas es el almidón, ubicado dentro del cloroplasto en forma de gránulos.

1.2.2. Limitaciones que suponen los carbohidratos de las algas para su utilización como nutriente

Se ha de tener en cuenta que, a pesar de lo mencionado previamente, también se dan algunas limitaciones que afectan su aplicación en piensos, tales como la presencia de posibles polisacáridos no amiláceos (PNA) que son considerados como sustancias antinutricionales debido a que tienen altas repercusiones sobre la capacidad de intercambio catiónico y de hidratación, dificulta la absorción de los alimentos a nivel intestinal y además aumenta la viscosidad de los mismos (Alba-Laverde, 2013).

Tabla 2. Diferencias en el contenido de carbohidratos en los distintos tipos de macroalgas marinas (Rioux & Turgeon, 2015; Stiger-Pouvreau et al., 2016).

Tipos de polisacáridos	Macroalgas verdes	Macroalgas marrones	Macroalgas rojas
Polisacáridos estructurales			Carragenanos
			Agares
		Xilanos	
			Xilanos
		Celulosa	Alginato
		Lignina	Celulosa
		Ulvanos	Manitol
		Mananos	Fucanos
Polisacáridos de reserva			Lignina
			Galactanos sulfatados
		Almidón	Laminarina
			Manitol
			Almidón florideano

Esta fracción de carbohidratos (Tabla 2) es frecuente encontrarla en cereales, leguminosas y otros ingredientes de uso común en piensos. Están constituidos por polímeros de diferentes tipos de azúcares que no son fácilmente degradables por las enzimas digestivas de vertebrados, especialmente por parte de los animales no rumiantes tales como los peces, moluscos o equinodermos, algunos de los cuales no poseen una eficaz reserva endógena de enzimas digestivas que posibilite su degradación para la obtención de nutrientes. Dentro del grupo de los PNA, se encuentran principalmente una serie de polímeros complejos como los betaglucanos, mananos, arabinoxilanos solubles e insolubles o galactanos, cada uno de los cuales interfiere en la utilización del alimento y afecta negativamente en el rendimiento de los animales. En función de su cuantía y tipología, la absorción de nutrientes, la diversidad microbiana, así como el tránsito intestinal pueden verse significativamente afectados (Sinha et al., 2011).

Así mismo, la digestibilidad de las proteínas que poseen también se ve limitada debido al hecho de que parte de la fracción proteica se encuentra retenida por esta mezcla de polisacáridos situados en la pared celular y matriz extracelular, formando una especie de barrera física que restringe el acceso de las enzimas endógenas. Por este motivo, las proteasas difícilmente pueden actuar sobre ellas haciendo que la liberación de aminoácidos y nitrógeno sea prácticamente inalcanzable. La fibra de polisacáridos solubles tales como xilano y carragenano, también hace que las proteínas estén menos biodisponibles

para su hidrólisis enzimática. Esto mismo se vio estudiando la digestibilidad de las proteínas que poseía el alga roja *Palmaria palmata*, pues este tipo de macroalga posee una proporción de polisacárido xilano bastante abundante (Marrion *et al.*, 2005).

1.3. Tratamientos usados para la hidrólisis de carbohidratos estructurales presentes en las macroalgas

La amplia diversidad en composición de carbohidratos que las macroalgas tienen las convierte en unos organismos no solo con potencial aplicación para la nutrición animal, sino que también pueden ser aprovechadas como materia prima para la biorrefinería, siendo ésta una posible solución sostenible para afrontar los problemas económicos y ambientales que el cambio climático y el agotamiento de los combustibles fósiles está ocasionando. En definitiva, los carbohidratos también pueden ser aprovechados con el fin de proponer un método alternativo y menos contaminante que sirva de biocombustible. En función del pretratamiento que se aplique sobre las macroalgas (químicos u enzimáticos), habrá mayor o menor biodisponibilidad de nutrientes y compuestos activos con distintos fines: bioenergía para biorrefinería e industria alimentaria u obtención de biomateriales.

Tratamiento químico. La hidrólisis fisicoquímica de los carbohidratos estructurales presentes en las paredes celulares se consigue aplicando ácidos, combinado o no con un segundo paso de tratamiento enzimático. El ácido sulfúrico al 4 % v/v es el más utilizado y hay que tener en cuenta la relación entre el volumen de solución de ácido y la masa de la macroalga (Chang & Murillo, 2017). Otra alternativa es hacer uso del ácido clorhídrico (HCl) y el ácido cítrico (C₆H₈O₇). En la hidrólisis ácida, la concentración de ácido y el tiempo de hidrólisis afecta a los rendimientos totales de azúcares reductores obtenidos por lo que es fundamental conocer las condiciones óptimas para maximizar la sacarificación de la biomasa de macroalgas. La aplicación de calor junto con el tratamiento químico es otra opción, pero esto depende mucho del tipo de macroalga que se esté ensayando, pues se ha observado que las condiciones térmicas pueden generar compuestos inhibidores de la fermentación microbiana. Generalmente, aplicar este tratamiento químico tiene como objetivo final llevar a cabo un proceso de fermentación de los azúcares obtenidos para producir bioetanol, un combustible renovable alternativo para reemplazar la dependencia actual de los combustibles fósiles.

Tratamiento enzimático. Una buena estrategia para contrarrestar los efectos negativos que los PNA ocasionan es hacer uso de complejos enzimáticos que sean capaces de degradarlos total o parcialmente con el fin de mejorar su digestibilidad y valor nutricional. Numerosos preparados comerciales que incluyen xilanasas, β-glucanasas y celulasas han mostrado ser altamente eficaces para incrementar la hidrólisis de los polisacáridos presentes en ingredientes vegetales de origen terrestre y, por tanto, su aplicación podría resultar igualmente interesante en el caso de las macroalgas. Sin embargo, son las enzimas procedentes de organismos marinos las que actualmente están recibiendo especial interés ya que incorporan de forma regular en su dieta macroalgas con carbohidratos en sus paredes celulares que han de macerar, convirtiéndolos así en una potencial fuente natural de este tipo de enzimas.

Este mecanismo de acción enzimática a base de carbohidrasas resulta ser de suma importancia para la industria de la acuicultura, pues se ha visto que los peces poseen una baja cantidad de enzimas digestivas que hidrolizan específicamente los enlaces β -glucosídicos de los PNA, e incluso en ocasiones, la ausencia de estas enzimas puede llegar a ser total (Castillo & Gatlin, 2015).

La investigación sobre la suplementación con carbohidrasas exógenas en la nutrición acuícola no es muy extensa pues la mayoría de los estudios y tratamientos en macroalgas se centran en el aprovechamiento integral de los lípidos que poseen. No obstante, se han obtenido resultados y efectos prometedores tras su aplicación en las especies de acuicultura estudiadas hasta la fecha, por lo que aumentar su investigación podría hacer que se convierta en una herramienta útil para renovar la acuicultura comercial.

1.4. Carbohidrasas aplicadas a la alimentación animal: xilanasas y glucanasas

Dentro del grupo enzimático de las carbohidrasas se incluyen todas las enzimas que catalizan la reducción del peso molecular de los hidratos de carbono poliméricos. Tal y como se ha mencionado previamente, estas enzimas pueden ser obtenidas a partir de preparados comerciales o bien a partir de los propios animales. La microbiota digestiva de los herbívoros terrestres y marinos también son una fuente natural de carbohidrasas y esto mismo se ha visto que ocurre en el caso del herbívoro marino *Haliotis tuberculata*, cuya microbiota simbiótica presente en su glándula digestiva es fundamental para que este tipo de gasterópodos puedan degradar los polisacáridos de las algas que usan para su alimentación (Gobet *et al.*, 2018). De hecho, se observó que la función de la microbiota puede ser debida a la transferencia horizontal de genes de la microbiota aerobia que poseen las macroalgas de las que se alimentan, pudiendo así conferirle la capacidad de sintetizar diferentes carbohidrasas con función digestiva tales como la agarasas y carragenasas.

1.4.1. Actividad xilanasas

El xilano es uno de los principales polisacáridos que forman parte de la estructura de la pared celular de vegetales y algas marinas, llegando incluso a constituir más del 30 % de su peso seco. Concretamente, forma parte de la hemicelulosa presente en las paredes vegetales y sustituye a la celulosa en las paredes celulares de algunas algas verdes y rojas.

Este polímero lineal en las plantas terrestres está formando por la unión de D-xilosa mediante enlaces glucosídicos β (1 \rightarrow 4). No obstante, este patrón cambia ligeramente en las macroalgas, ya que la fusión molecular se establece mediante el enlace β (1 \rightarrow 3). Su configuración no es homogénea pues además de contar con unidades monoméricas de D-xilosa que conforman una estructura lineal, también pueden llegar a ser polisacáridos altamente ramificados pues contienen moléculas como L-arabinofuranosa, ácido D-glucurónico o ácido 4-O-metil-D-glucurónico unidos a los residuos de xilosa (Bajpai, 2014). Concretamente, el xilano puede llegar a contener 85-93 % de D-xilosa, una pequeña cantidad de L-arabinosa y trazas de residuos de ácido glucurónico (Bastawde, 1992).

Este polisacárido tan heterogéneo solo puede ser degradado por un complejo enzimático que actúa conjuntamente y de forma específica haciendo así que la eficiencia de hidrólisis del xilano sea mucho mayor. Este complejo lo componen enzimas como la β -1,4- endoxilanasas, β -xilosidasas, acetil xilano esterasa, arabinasa, α -glucuronidasa, ácido ferúlico esterasa y ácido p-cumárico esterasa (Beg *et al.*, 2001; Bajpai, 2014) siendo la primera de ellas la más importante pues es la principal enzima que se encarga de reducir el grado de polimerización del xilano (Figura 2). Esta primera enzima puede ser aislada de hongos terrestres, tales como *Aspergillus batatae*, *Chaetomium globosum* e *Irpex lacteus* (Dekker & Richards, 1976).

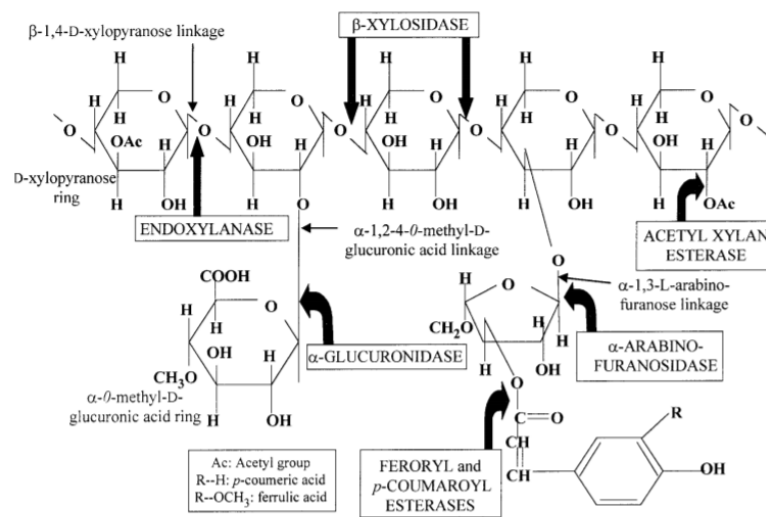


Figura 2. Estructura del xilano propia de las plantas superiores con distintos grupos sustituyentes y diferentes tipos de xilanasas que intervienen en su degradación (Beg *et al.*, 2001).

Cuando son los xilanos de las macroalgas los que deben degradarse, la enzima que mejor actúa sobre este polisacárido es la β -1,3-D-xilanasas. De hecho, se ha observado que es producida por cepas bacterianas ubicadas en los sedimentos del fondo marino y por las macroalgas verdes, rojas y pardas. Como se conoce, las xilanasas están ampliamente distribuidas, y pueden ser encontradas tanto en procariontas como en eucariotas, siendo en éstos últimos donde abundan mayoritariamente (Bastawde, 1992). Son enzimas sintetizadas por bacterias saprótroficas, levaduras, y en mayor medida por hongos y actinomicetos, aunque también se han encontrado en crustáceos, protozoos, algas marinas, caracoles y semillas de plantas terrestres. Todos estos organismos reciben buenos suministros de carbono y energía gracias a la función catalizadora que desempeñan.

En los últimos años, el uso biotecnológico de las xilanasas ha ido creciendo considerablemente, y fue en la década de 1980 cuando empezó a utilizarse dicha enzima, concretamente para la preparación de alimentos destinados al consumo animal (Bajpai, 2014). Dentro de las innumerables aplicaciones industriales de las xilanasas, destaca su utilidad en la fabricación de piensos ya que un pretratamiento con este tipo de enzimas supone una mejora en su valor nutricional, así como una superior asimilación y digestión para el animal gracias a la descomposición del almidón en los piensos con alto contenido en fibra. Para que esto se consiga con mayor éxito, también suelen intervenir de forma conjunta otro

tipo de enzimas tales como la β -glucanasas, celulasas, α -amilasas, proteasas y fitasas. La acción simultanea de todas ellas hace que la viscosidad de la materia prima de los alimentos se vuelva más digerible, y son las dos primeras enzimas mencionadas previamente (xilanasas y β -glucanasas) las que permiten reducir el efecto antinutricional del xilano y el β -glucano contenido en los tejidos de las macroalgas.

1.4.2. Actividad β -glucanasa

Los β -glucanos son polímeros lineales de hasta 1200 residuos de β -D-glucosa unidas por enlaces β -1,3 y/o β -1,4-glicosídicos, los cuales pueden presentar ramificaciones laterales de cadenas D-glucosa unidas por enlaces β -1,6 y β -1,4. Esta diferencia en la disposición y proporción de los enlaces glicosídicos es lo que les hace ser tan diversos (Espinoza-Gallardo *et al.*, 2017).

Este tipo de polisacárido es frecuente encontrarlo en las paredes celulares de plantas superiores, así como en los endospermos de cereales con alto valor comercial como cebada, trigo, arroz y centeno (Planas, 2000). De la misma forma, los β -glucanos han sido descritos previamente en bacterias, hongos, levaduras, microalgas y algunas macroalgas, donde desempeñan función estructural de la pared celular o de reservorio energético. Por ejemplo, tal y como se ha mencionado, las macroalgas pardas poseen en sus vacuolas el polisacárido laminarina, que es un β -1,3-glucano ramificado con función de almacenamiento energético (Figura 3). También se ha visto que la laminarina y los oligosacáridos derivados de su degradación pueden estimular la defensa contra patógenos en plantas (Espinoza-Gallardo *et al.*, 2017). Hay estudios que demuestran esto último pues la aplicación de harina de algas (pardas y rojas) como suplemento dietético para camarones ha supuesto una mejora de la respuesta inmune que estos poseen, así como la mejora de su supervivencia y resistencia cuando se ven desafiados por algunas bacterias o virus (Cruz-Suárez *et al.*, 2013).

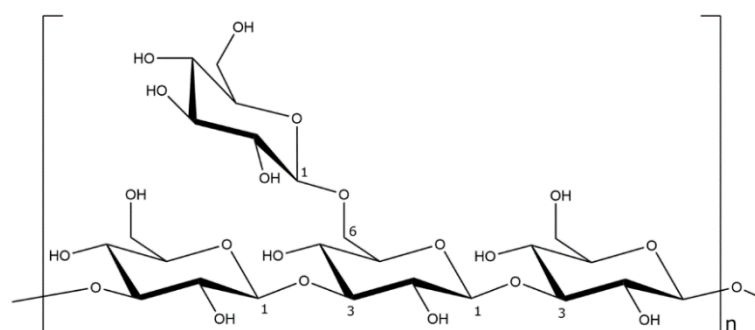


Figura 3. Estructura de 1,3;1,6- β -glucano ramificado propio de la laminarina o crisolaminarina (Espinoza-Gallardo *et al.*, 2017).

Las enzimas glucanasas son las responsables de la degradación de este polisacárido y en función de los mecanismos que usen para la hidrólisis del sustrato, se clasifican en endo- β -glucanasas y exo- β -glucanasas. El primer tipo enzimático rompe de manera aleatoria los sitios de enlace β de la cadena

liberando pequeños oligosacáridos. En cambio, las β -glucanasas hidrolizan los β -glucanos llevando a cabo una ruptura secuencial de residuos de glucosa desde el extremo no reductor (González *et al.*, 2011). Bien es cierto que ambos tipos de enzimas pueden actuar sinérgicamente para lograr una mayor degradación. De la misma manera, en función del tipo de enlace que hidrolicen, se podrán clasificar en β -1,4-glucanasa y β -1,3-glucanasa, siendo ésta última reconocida también con el nombre de laminarinasa.

La actividad de las β -1,4-glucanasas (Figura 4) se mide en función de su capacidad para hidrolizar carboximetilcelulosa y otros oligómeros pequeños de β -1,4-glucanos tales como celobiosa, celotriosa o celohexosa (Linton, 2020). Estas enzimas se suelen encontrar en el tracto digestivo de especies de invertebrados como moluscos, artrópodos y crustáceos, pues son los que más se alimentan de compuestos donde predomina este carbohidrato. No obstante, también se pueden localizar dentro de tejidos no digestivos, de tal forma que intervienen en otras funciones como la inmunidad innata.

Por otro lado, las β -1,3-glucanasas catalizan la hidrólisis de los β -1,3-glucanos (Figura 5) propios de las macroalgas, las paredes de las levaduras y los protozoos. La especificidad de esta enzima es mucho más estricta a las β -1,4-glucanasas de tal manera que a diferencia de ellas, catalizan exclusivamente a los β -1,3-glucanos (Linton, 2020). Su actividad se da generalmente en los tejidos digestivos de insectos, moluscos, crustáceos, equinodermos y lombrices de tierra de tal forma que pueden llevar a cabo la degradación de macroalgas pardas y los propios microorganismos que pueden incorporar inconscientemente en su dieta.

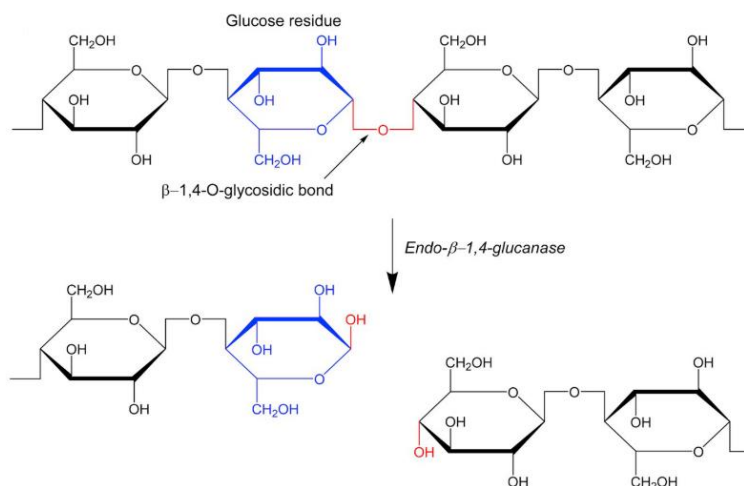


Figura 4. Reacción catalítica llevada a cabo por la endo- β -1,4-glucanasa donde en rojo se ve el tipo de enlace glicosídico que va a ser hidrolizado y en azul los residuos de carbohidratos dentro del polímero β -1,4-glucano (Linton, 2020).

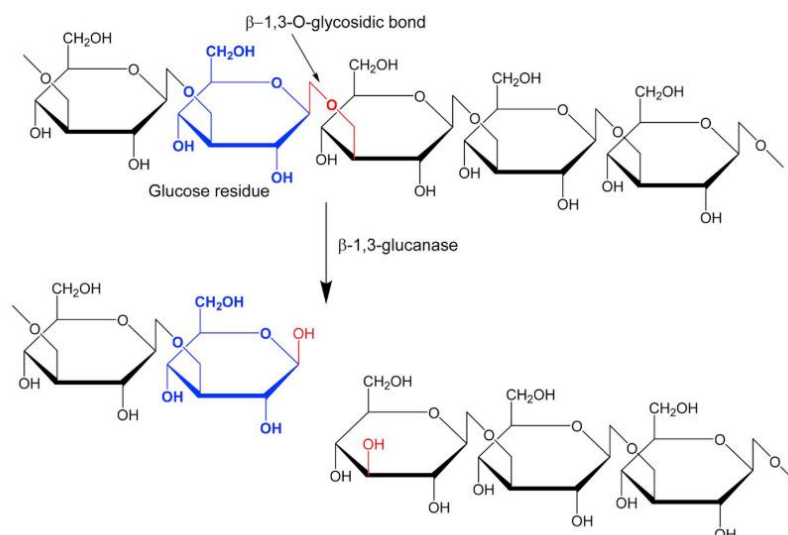


Figura 5. Reacción catalítica llevada a cabo por la β -1,3-glucanasa donde en rojo se ve el tipo de enlace glicosídico que va a ser hidrolizado y en azul los residuos de carbohidratos dentro del polímero β -1,3-glucano (Linton, 2020).

1.5. Los invertebrados marinos como fuente de enzimas

Los invertebrados marinos incluyen numerosos taxones que cuentan con diferentes etapas de evolución, estilos de vida y varios tipos de hábitos alimenticios convirtiéndolos así en una potencial fuente de enzimas con importantes aplicaciones biotecnológicas. Mayoritariamente, estas enzimas se encuentran en su tracto digestivos y se producen en los residuos de su procesamiento industrial (Sova *et al.*, 2013). De la misma manera, en estos organismos se ha visto la presencia de bacterias intestinales que colaboran con la degradación de los componentes alimenticios que ingieren, siendo mayoritariamente polisacáridos (Stone & Morton, 1958; Gobet *et al.*, 2018; Ito *et al.*, 2019).

Dentro de este grupo de invertebrados, los moluscos y crustáceos son los que mayores enzimas glicosidasas poseen, siendo la β -1,3-glucanasa la más abundante. Esto se ha confirmado haciendo estudios con el estilo cristalino de los moluscos bivalvos donde también se ha detectado la presencia de otro tipo de glucanasas, tales como las amilasas y celulasas (Stone & Morton, 1958; Tahir *et al.*, 2008). Por otro lado, la endo- β -1,4-mananasa también se ha caracterizado principalmente en *Mytilus edulis*, *Aplysia kurodai* y *Haliotis discus hannai*, siendo todos ellos especies de moluscos marinos. Así mismo, la presencia de celulasas, xilanasas y alginasas en moluscos gasterópodos *Opisthobranchios* también es muy común (Stone & Morton, 1958). Actualmente, se está comercializando una preparación enzimática de β -glucuronidasa Tipo II-L procedente de *Patella vulgata* donde se ha visto que además de ser termoestable, contiene actividad sulfatasa (Sigma-Aldrich SRE0093). En definitiva, se ha demostrado que los hábitos alimenticios de la mayoría de los miembros del grupo de los moluscos los han convertido en fuentes prometedoras de diferentes tipos de enzimas con distinta especialidad y capacidad hidrolítica.

1.5.1. Descripción de *Patella vulgata* y *Siphonaria pectinata*

Patella vulgata también conocida como lapa común es un molusco gasterópodo endémico de los mares de Europa occidental que se distribuye por las costas del Círculo Polar en Noruega hasta el Mar Mediterráneo. Se caracteriza por tener una concha cónica de base ancha y de color grisáceo o azul verdoso mientras que el pie musculoso esencial para su movilidad presenta unas tonalidades amarillentas e incluso anaranjadas. En la parte anterior de la concha se encuentra el ápice sin abertura haciendo así que la inclinación sea más acentuada y corta. En la parte externa aparecen innumerables estrías que le confieren un aspecto rugoso y está surcada radialmente por las líneas de crecimiento que son concéntricas y bien definidas entre otras que no lo son tanto. El dibujo externo que se acaba formando se puede visualizar ligeramente en los márgenes internos de la concha donde además se distingue la impresión muscular y un brillo visiblemente notable (Figura 6).

Otra distintiva singularidad que poseen es que la secreción de excrementos, así como la entrada y salida de agua necesaria para su respiración se lleva a cabo entre el margen del manto y el cuerpo ya que no disponen del típico agujero en el ápice que poseen otras especies de su mismo orden.



Figura 6. Partes externa e interna de la concha de *Patella vulgata* (Bermejo, 2013).

El desplazamiento que llevan a cabo lo hacen con fines alimenticios, de tal forma que cuando hay periodos de marea alta, van en busca de macroalgas esenciales para su supervivencia ya sean algas verdes, rojas o pardas. Gracias al rastro que van dejando en forma de mucus, pueden volver al punto exacto desde el que han partido de manera que se acaba formando una cicatriz en la roca que facilita la intensa unión que se establece con la lapa (Figura 7). Esta fusión le permite a este tipo de gasterópodos protegerse de la desecación que se pueda dar cuando hay ciclos de marea baja, los depredadores terrestres o de las fuerzas de maremotos propias de la zona intermareal donde habitan (Kang *et al.*, 2020). Mediante estudios previos con varias muestras de individuos se ha observado que este tipo de lapas presentan la peculiaridad de comenzar su vida siendo machos y transcurridos aproximadamente tres años de vida, se produce una transición en el sexo, convirtiéndose la mayoría de ellas en hembras (Orton, 1929).



Figura 7. *Patella vulgata* unida intensamente a la roca. Se aprecia el claro producido al alimentarse de la macroalga verde *Ulva* spp.

Siphonaria pectinata, también conocida como falsa lapa, es un molusco gasterópodo pulmonar que ha adoptado un modo de vida similar al género *Patella* (Ocaña & Fa, 2003) (Tabla 3). Presenta además características comunes tales como una concha ovalada de color crema con tonos pardos y con abundantes estrías radiales juntas confiriéndole un aspecto superficial rugoso. En la parte interna de la concha aparece al igual que para *P. vulgata*, una marca en el lugar de inserción del músculo y predominan los colores negros con finas líneas radiales menos visibles. No obstante, a diferencia de lo que ocurre en *Patella*, se puede apreciar que el ápice no se localiza justo en la parte central, sino que se encuentra desplazado ligeramente hacia la parte posterior (Figura 8).



Figura 8. Parte externa e interna de la concha de *Siphonaria pectinata* (Simone & Seabra, 2017).

En lo que respecta a su hábitat y distribución, cabe añadir que se suele localizar en los fondos rocosos de las zonas intermareales del Mediterráneo Occidental o bien en el Atlántico desde el sur de África hasta el sur de la Península ibérica donde se incluyen los terrenos rocosos de la costa de Gibraltar. Además, de forma ocasional, se han visto este tipo de moluscos en las aguas de la costa gallega donde el nivel de la marea suele ser elevado. En cuanto a sus características anatómicas, constan de un sifón en el lado derecho del cuerpo que le confiere la capacidad de llevar a cabo el proceso respiratorio ya

que se trata de una especie de tubo que permite conducir al agua al interior o exterior del cuerpo del animal.

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *Siphonaria pectinata* y *Patella vulgata*.

Especie	<i>Siphonaria pectinata</i>	<i>Patella vulgata</i>
Reino	Animalia	Animalia
Filo	<i>Mollusca</i>	<i>Mollusca</i>
Clase	<i>Gastropoda</i>	<i>Gastropoda</i>
Orden	<i>Basommatophora</i>	<i>Patellogastropoda</i>
Familia	<i>Siphonariidae</i>	<i>Patellidae</i>
Género	<i>Siphonaria</i>	<i>Patella</i>

S. pectinata tiene una estrategia de alimentación diferente a *P. vulgata* pues hacen uso de su radícula con finos dientes para pastar las algas superficiales y poco compactas que se van encontrando (Ocaña & Fa, 2003). Esto no suele ocurrir habitualmente, ya que la mayoría de las especies del género *Patella* tienden a raspar profundamente las algas que se encuentran más consistentes en la superficie rocosa donde se adhieren. Esta peculiaridad le confiere una ventaja a *S. pectinata* puesto que la competencia por la alimentación con otras lapas es muy reducida. Cabe recalcar que, actualmente, en la literatura hay muy poca información disponible sobre los métodos alimenticios, la anatomía y la histología de su sistema digestivo.

1.6. Importancia de determinar los parámetros funcionales de las enzimas para valorar su aplicación industrial

El interés por los catalizadores biológicos ha ido aumentando considerablemente en los últimos diez años debido a las diversas aplicaciones biotecnológicas que pueden tener siendo las más frecuentes las aplicaciones industriales, incluida aquella destinada a la alimentación animal, la industria farmacéutica, la industria textil, la producción sostenible de productos químicos y biocombustibles, así como el tratamiento de efluentes y residuos agrícolas (Subramaniyan & Prema, 2002; Silva *et al.*, 2015). Para asegurar el éxito funcional en estas aplicaciones, es fundamental conocer los parámetros operativos tales como el pH y la temperatura ya que contribuyen a establecer las mejores condiciones de hidrólisis enzimática. No obstante, a esto también hay que sumarle el estudio de los parámetros funcionales (K_m y V_{max}) a partir de los cuales se puede conocer la especificidad que tienen las enzimas por su sustrato, la dosis óptima de enzima necesaria para alcanzar la mayor productividad de un proceso y el tiempo que tarda en transformar un determinado producto en sustrato. Además, estos parámetros también pueden ser evaluados a partir de extractos enzimáticos brutos de tal manera que se puede saber si es rentable o no llevar a cabo el proceso de purificación enzimática, siendo esta una técnica costosa que puede afectar incluso en el rendimiento de los catalizadores debido a la alteración de sus estabilidad (Massarente *et al.*, 2020).

1.7. Objetivos del trabajo

Considerando todo lo anterior se planteó para el presente trabajo el siguiente objetivo general:

Evaluación de las características funcionales de carbohidrasas obtenidas de *P. vulgata* y *S. pectinata* para su uso en la hidrólisis parcial de polisacáridos de macroalgas que faciliten su utilización como ingrediente en piensos para acuicultura.

Este objetivo general se abordará mediante los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterización de parámetros operativos de las actividades xilanasa y β -1,3-glucanasa de ambas especies: óptimos y estabilidades de pH y temperatura.
2. Caracterización de parámetros funcionales de ambas enzimas: K_m y V_{max} .
3. Evaluación *in vitro* de las diferencias en la hidrólisis de la fracción de polisacáridos de distintas especies de macroalgas (*Ulva ohnoi*, *Undaria pinnatifida* y *Porphyra spp.*) llevada a cabo por el extracto enzimático de *P. vulgata*.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Experimento 1. Caracterización funcional de las actividades carbohidrasas presente en *Patella vulgata* y *Siphonaria pectinata*

Este experimento iba orientado, tanto a cuantificar las actividades de xilanasa y glucanasa presentes en la glándula digestiva de los moluscos gasterópodos *P. vulgata* y *S. pectinata* como a conocer sus óptimos funcionales de pH y temperatura. Con esta información se pudo establecer la estabilidad de cada enzima a diferentes pHs y su termoestabilidad.

2.1.1. Obtención del extracto enzimático de hepatopáncreas de *Patella vulgata* (EP) y *Siphonaria pectinata* (ES)

Se obtuvo a partir del hepatopáncreas de ejemplares de ambas especies recolectadas en la costa de Almería y mantenidas en frío hasta el momento de su utilización. Los extractos se prepararon a partir de tejidos extraídos mediante disección seguida de la homogeneización mecánica en agua destilada con una relación 1:3 (peso/volumen) y posterior centrifugación a 12000 rpm a 4 °C y durante 15 minutos.

2.1.2. Medida de las actividades de xilanasa y β -1,3-glucanasa

La actividad xilanasa se analizó mediante hidrólisis en condiciones controladas del polisacárido xilano obteniéndose finalmente el monosacárido xilosa en tanto que la de β -1,3-glucanasa se evaluó mediante hidrólisis del polisacárido laminarina midiéndose la liberación de D-glucosa. En ambos casos la cantidad de tales azúcares liberados se cuantificó haciendo uso de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) mediante el método de Miller (1959) empleando como patrones soluciones estándar de xilosa o

glucosa. El reactivo DNS consiste en un anillo bencénico tetrasustituido por un grupo carboxilo, un hidroxilo y dos grupos nitro. La presencia de grupos carbonilos libres (C=O) que los azúcares liberados presentan es posible determinarlos haciendo uso de este ácido debido a que reaccionan con él en presencia de calor (100 °C), observándose así una variación de color desde amarillo hasta un tono marrón oscuro. De forma consecutiva se detenía la reacción con hielo para finalmente diluir con agua destilada en una relación 1:5 y se leía a una longitud de onda de 540 nm en espectrofotómetro. Una unidad de actividad se definió como la liberación de 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$.

2.1.3. Determinación de óptimos funcionales de pH y temperatura

Para determinar el pH óptimo de las actividades xilanasas y β -1,3-glucanasas se utilizó una modificación del protocolo descrito por *Lu et al.* (2008). Se prepararon disoluciones de los correspondientes sustratos (1 %) en buffer universal (Stauffer) 0.05 M ajustado a los diferentes pH deseados (3 a 10). Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente (25 °C) durante 90 minutos. El óptimo de temperatura se determinó en un rango de 10 °C a 60 °C, con intervalos de 10 °C. En ambos casos se siguió el protocolo descrito para medir los azúcares reductores liberados detallado en el apartado 2.1.2.

2.1.4. Determinación de la termoestabilidad enzimática a 45 °C

La estabilidad térmica a 45 °C se evaluó preincubando las muestras de los extractos enzimáticos en diferentes tiempos (2, 4, 6, 8, 10, 24 h) antes de evaluar su actividad residual frente a los sustratos (xilano o laminarina) según el protocolo descrito en el apartado 2.1.2.

2.1.5. Determinación de la estabilidad frente a distintos pHs

La estabilidad de los extractos frente a 3 pHs diferentes (4, 5 y 7 para xilanasas; 5,6 y 7 para β -1,3-glucanasas) y 25 °C se evaluó preincubando los mismos a dichos pHs durante distintos intervalos de tiempo (2, 4, 6, 8, 10, 24 h) y midiendo la actividad residual frente a los sustratos según el protocolo descrito en el apartado 2.1.2.

2.2. Experimento 2. Caracterización de la cinética enzimática (V_{max} y K_m aparentes)

La cinética enzimática se determina estudiando la velocidad de las reacciones catalizadas por las enzimas xilanasas y β -1,3-glucanasas propias de las dos especies marinas. Esto va a proporcionar información directa acerca del mecanismo de reacción catalítica que llevan a cabo y de la especificidad de las enzimas. Para ello, se requiere enfrentar una cantidad constante de enzimas con concentraciones crecientes de sustrato xilano (para xilanasas) y laminarina (para β -1,3-glucanasas). Debido a que la velocidad de formación de productos es directamente proporcional a la concentración del sustrato, la reacción que se lleva a cabo es de primer orden, $v = k [A]$, siendo:

- V : la velocidad de hidrólisis del sustrato.

- K: la constante de proporcionalidad.
- [A]: la concentración de sustrato a hidrolizar por la enzima.

Complejos enzimáticos utilizados

Como se indicó anteriormente, para este estudio se emplearon dos complejos enzimáticos; el extracto enzimático de la glándula digestiva de *P. vulgata* (EP) y *S. pectinata* (ES) descritos en el experimento 1.

2.2.1. Diseño experimental para caracterización de los parámetros cinéticos de xilanasas y β -1,3-glucanasa

Se prepararon soluciones madre del sustrato elegido en buffer ajustado al pH óptimo correspondiente a la actividad enzimática en *P. vulgata* y *S. pectinata* (obtenido en el experimento 1). A partir de aquí se realizaron diluciones seriadas desde 32 mg/mL hasta 0 mg/mL para el sustrato xilano, y diluciones menos concentradas para el caso del sustrato laminarina (debido a la dificultad de disolución) desde 16 mg/mL hasta 0 mg/mL. Se realizaron incubaciones con los extractos a 45 °C durante un tiempo de 2h y posteriormente se midió la cantidad de azúcares liberados (xilosa o D-glucosa) por el método ya indicado. Los datos de liberación de azúcares fueron utilizados para el cálculo de los siguientes parámetros:

Velocidad máxima (V_{max}): es la velocidad que se obtendría cuando todo el enzima se encuentra unido al sustrato. Este parámetro se obtiene cuando la concentración de sustrato se aumenta hasta alcanzar una velocidad constante de formación de producto. De esta forma, un incremento de la concentración de sustrato no supondrá una elevación en el índice de reacción enzimática debido a que sus sitios activos quedan saturados por las moléculas de sustrato. Por tanto, se puede afirmar que la velocidad máxima depende de factores como la cantidad de catalizador biológico presente y de la capacidad que éste tiene para transformar el sustrato en producto.

Constante de Michaelis-Menten (K_m): parámetro cinético que corresponde a la concentración de sustrato a la cual la velocidad de la reacción enzimática es la mitad de la velocidad máxima ($V = V_{max}/2$). Esta constante proporciona una idea de la afinidad que tiene el enzima por el sustrato de forma que cuanto mayor sea su valor, menor será la afinidad que tienen la enzima por el sustrato, es decir, la fuerza que liga al sustrato con el sitio activo del enzima es pequeña. No obstante, cuanto menor es el valor de la constante K_m , la afinidad del catalizador biológico por el sustrato es mucho mayor.

Estos parámetros pueden ser calculados siempre que la cinética de la enzima en cuestión obedezca a la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

La representación gráfica de dicha ecuación es una hipérbola (Figura 9).

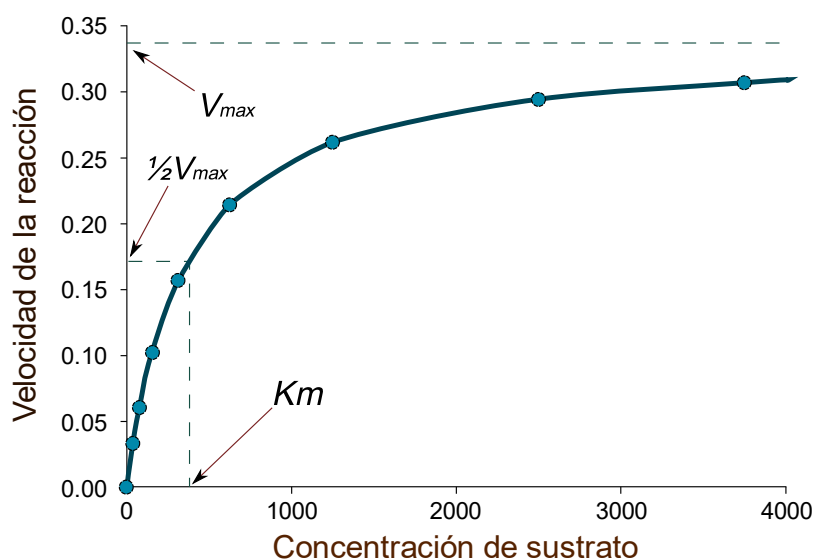


Figura 9. Representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten.

Para calcular los valores de K_m y V_{max} se aplicó el algoritmo de regresión no lineal por mínimos cuadrados utilizando el siguiente sitio web:

<http://biomodel.uah.es/metab/enzimas/MM-regresion.htm>

2.3. Experimento 3. Evaluación *in vitro* de la capacidad de hidrólisis de las enzimas xilanasas y β -1,3-glucanasa presentes en extractos de *P. vulgata* sobre la fracción de polisacáridos presentes en diferentes especies de macroalgas

Se utilizó el mismo extracto obtenido a partir de hepatopáncreas de *P. vulgata* descrito hasta el momento. Como sustrato para hidrólisis se emplearon muestras de biomasa de tres especies de macroalgas: *Ulva ohnoi*, *Undaria pinnatifida* y *Porphyra spp.* La primera de ellas fue suministrada por CTAQUA (Puerto Sta. María, Cádiz) en tanto que las otras dos fueron adquiridas en una web dedicada a la venta de productos alimenticios naturales:

<https://algasdegalicia.com/categoria-producto/algas-deshidratadas-ecologicas/>

Teniendo en cuenta que todas ellas estaban deshidratadas en el momento de su utilización, se procedió a realizar el ensayo. Este se llevó a cabo pesando 0.5 g de muestra de cada tipo alga en un tubo falcon de 15 mL al que se añadieron 5 mL de tampón citrato a pH 5.0 (0.1M) con objeto de llevar a cabo la humidificación. Se homogeneizaban agitando las mezclas en el vortex. Se añadió el extracto enzimático a razón de 1 unidad de actividad xilanasas/g materia seca y se incubaron las muestras a 45 °C durante 6 h. Cada 30 minutos se agitaron las muestras para garantizar su homogeneización. Transcurridas las 6 horas de incubación, los tubos se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos y se utilizó el sobrenadante para la determinación de azúcares reductores y pentosas.

Los azúcares reductores liberados durante la hidrólisis se determinaron siguiendo el método de Miller (1959) indicado en el apartado 2.1.2. Las pentosas se midieron por el método de floroglucinol (Douglas, 1981) el cual se basa en la reacción específica de las pentosas con el reactivo floroglucinol que cuando se calientan se convierten en furfural y reaccionan en presencia de un grupo fenol (floroglucinol) para formar finalmente un compuesto coloreado medible a 545 nm. La recta patrón que se utiliza es una solución estándar de xilosa y el reactivo que se debe de usar para este ensayo se prepara disolviendo floroglucinol en ácido acético y ácido clorhídrico. Una vez que la recta patrón y las muestras de macroalgas están preparadas, se pone en ebullición en baño María durante 5 minutos para posteriormente dejar enfriar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Finalmente se leen las muestras a 545 nm.

2.4. Tratamiento estadístico de los datos

Las diferencias entre los valores de los distintos parámetros se evaluaron mediante ANOVA (una o dos vías) seguidas del test de Tukey utilizando el software Minitab Statistical (Minitab Inc, LLC. State Collegue, Pensilvania, EE. UU.).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Experimento 1. Caracterización funcional de las actividades carbohidrasas presentes en *Patella vulgata* y *Siphonaria pectinata*

3.1.1. Medida de la actividad xilanasa

Determinación de óptimos funcionales de pH y temperatura

Los óptimos de pH y temperaturas para la actividad xilanasa presente en los extractos de los dos moluscos se detallan en la Figura 10. Los resultados muestran que:

- La actividad xilanasa en *Patella* es significativamente mayor que la presente en *S. pectinata*. El pH óptimo para la actividad xilanasa de EP se situó en un valor de 5.5 en tanto que el de ES fue de 6.0.
- Los perfiles de actividad en función de la temperatura en ambas especies fueron muy similares, manteniendo una alta actividad en un amplio rango de temperatura, que va desde los 30 °C hasta los 50 °C. No obstante, a partir de 50 °C, la pérdida de funcionalidad resultó muy marcada en ambas especies.

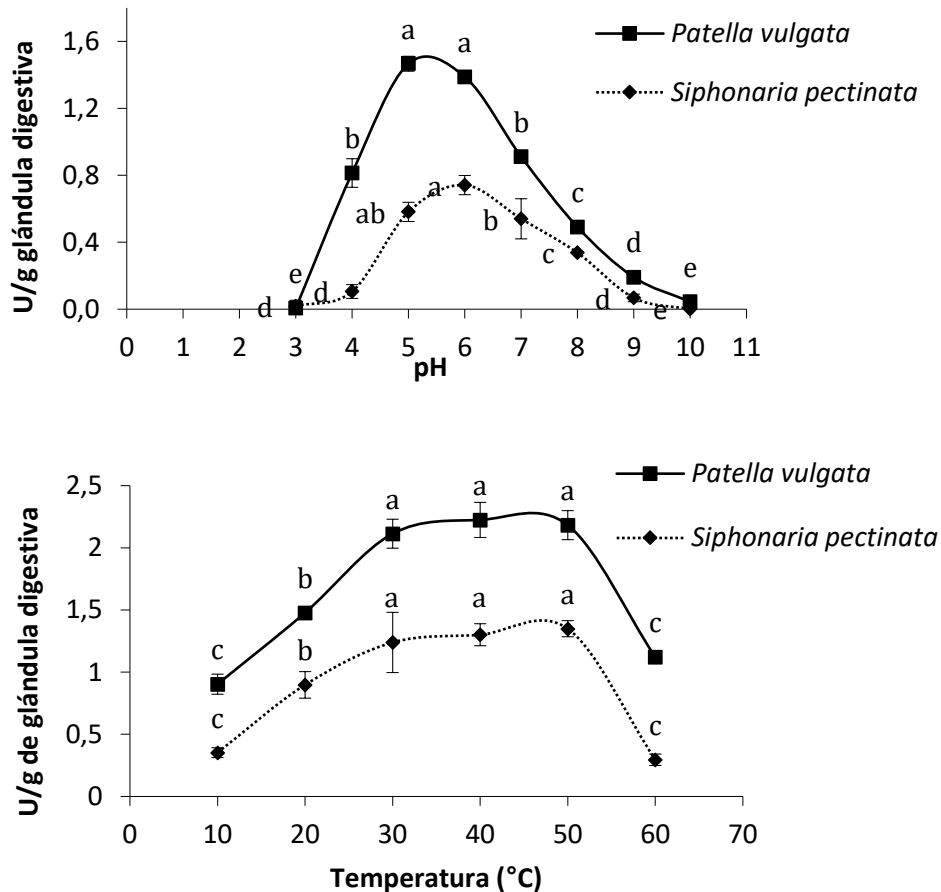


Figura 10. Óptimo de pH y temperatura para la actividad xilanasa de *P. vulgata* y *S. pectinata*. Los valores de cada especie que no comparten la misma letra difieren significativamente con $p < 0.05$.

Estabilidad frente a variaciones de pH y termoestabilidad

Los resultados de la termoestabilidad y estabilidad frente a diferentes pHs de la xilanasa presente en el hepatopáncreas de ambas especies marinas se resumen en la Figura 11. Los resultados muestran una elevada termotestabilidad de la actividad presente en *Siphonaria*, que no se vio afectada por la incubación a 45 °C durante un periodo prolongado de tiempo. Por el contrario, la actividad en *Patella* mostró un brusco descenso (más del 65 % tras una preincubación de tan sólo 2 h, manteniéndose a niveles estables a partir de ese momento). En ambas especies la actividad de la xilanasa no se vio afectada de manera significativa por la preincubación durante periodos prolongados a ninguno de los 3 pHs ensayados.

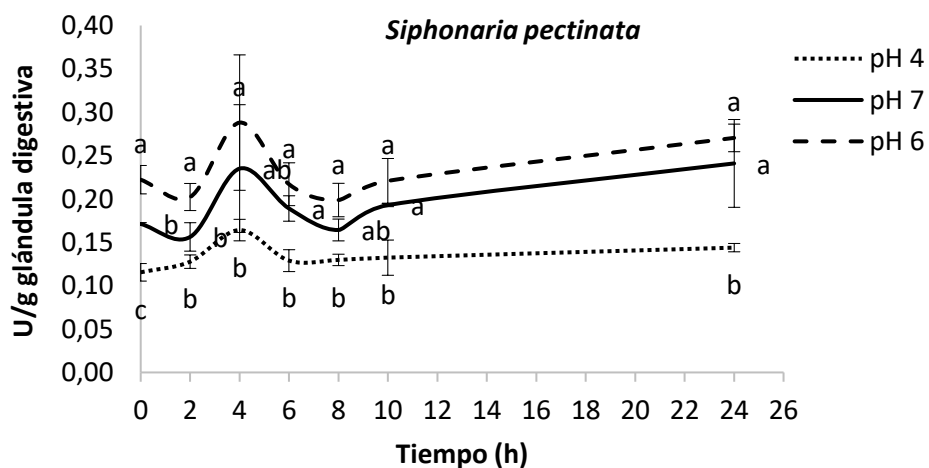
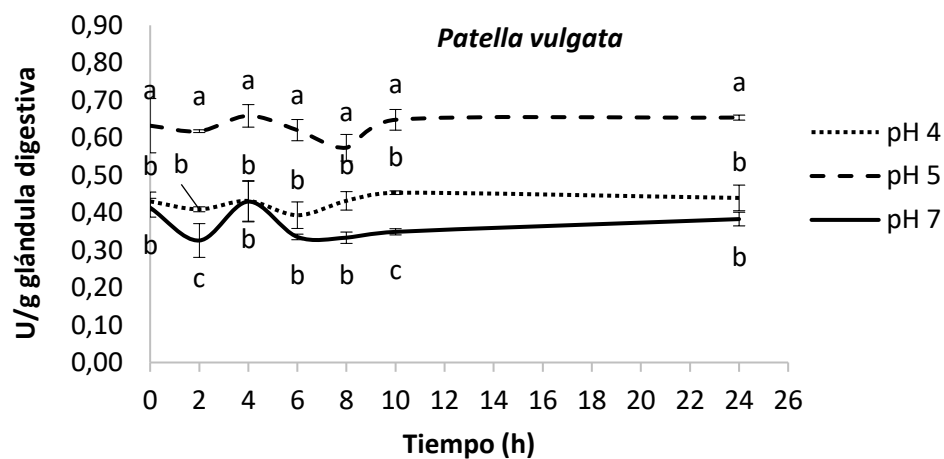
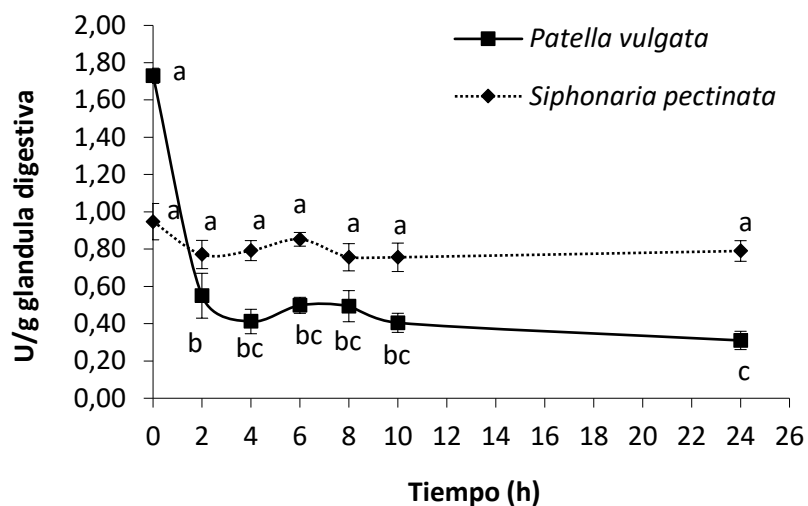


Figura 11. Estabilidad de la actividad xilanasa de *P. vulgata* y *S.pectinata* frente a variaciones de pH y termoestabilidad a 45 °C . Los valores de cada especie y para cada pH que no comparten la misma letra difieren significativamente con $p < 0.05$.

3.1.2. Medida de la actividad β -1,3-glucanasa

Determinación de óptimos funcionales de pH y temperatura

Los óptimos de pH y temperatura para la actividad β -1,3-glucanasa presente en los extractos de los dos moluscos se detallan en la Figura 12. Los resultados muestran que:

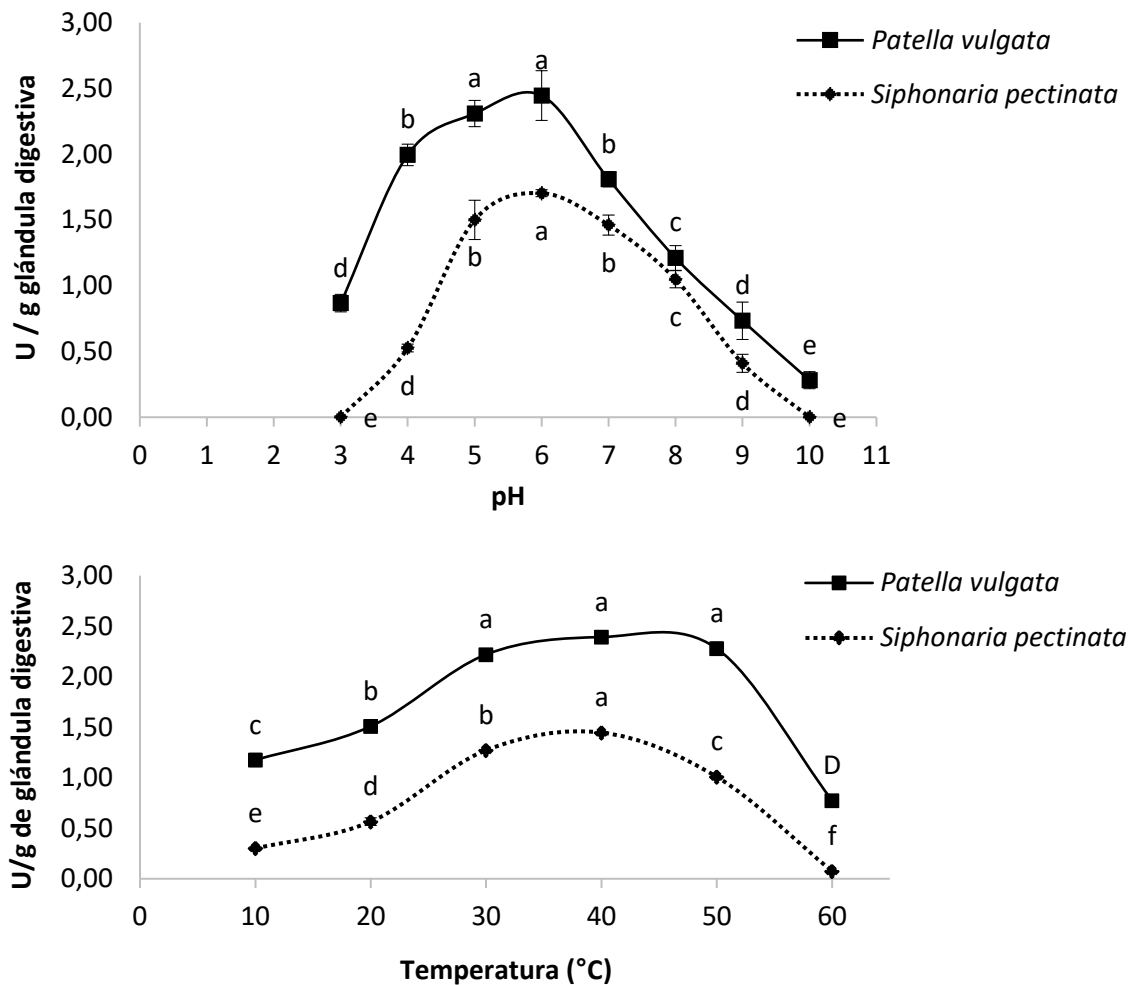


Figura 12. Óptimo de pH y temperatura para actividad β -1,3-glucanasa de *P. vulgata* y *S. pectinata*. Los valores de cada especie que no comparten la misma letra difieren significativamente con $p < 0.05$.

- La actividad β -1,3-glucanasa en *P. vulgata* es significativamente mayor que la presente en *S. pectinata*. El pH para la actividad β -1,3-glucanasa del EP y ES mostró un óptimo muy marcado en un valor de 6.0. Además, en un intervalo de pH de 4.5 a 7.0, la enzima conserva más del 50 % de su actividad.
- La actividad de la β -1,3-glucanasa en *P. vulgata* a 45 °C es significativamente mayor a la presente a esa misma temperatura en *Siphonaria*. Los perfiles de actividad en función de la temperatura en

Los resultados de la termoestabilidad y estabilidad frente a diferentes pH de la actividad β -1,3-glucanasa presente en el hepatopáncreas de ambas especies marinas se resumen en la Figura 13. Se observa que:

- La actividad presente en ambas especies se vio afectada de manera muy significativa por la incubación durante 8 h a 45 °C mostrando reducciones muy aparentes (concretamente un 65 % y 84 %, respectivamente). A partir de ese momento, las β -1,3-glucanasa del ES y EP mantienen su actividad estable.
- En *P. vulgata*, durante las 6 primeras horas de incubación, la función β -1,3-glucanasa a pH 6 se mantiene parcialmente estable. Sin embargo, pasado este tiempo, esta estabilidad se vio disminuida, aunque no de manera significativa al incubar a pH 5 y 6. En *S. pectinata* en cambio, esta reducción sí resultó significativa, llegando a ser de un 83 %.

En resumen, se puede decir que en ambas especies las dos carbohidrasas estudiadas presentaban rasgos similares, pero también diferencias que podrían resumirse en:

- Óptimos de pH ligeramente diferentes en ambas enzimas.
- Óptimos de temperatura iguales.
- Mayor actividad comparada de ambas enzimas en *Patella* que en *Siphonaria*.
- Mayor estabilidad térmica en la xilanasa de *Siphonaria* que en la de *Patella*.
- Mayor estabilidad térmica de la β -1,3-glucanasa que en la xilanasa de ambas especies.
- Mayor sensibilidad al pH de la β -1,3-glucanasa de *Siphonaria* que en la de *Patella*.

Cabe señalar que el valor de pH óptimo para ambas enzimas se sitúa en el rango descrito para las carbohidrasas digestivas de diferentes gasterópodos marinos, tales como las fuicoidan hidrolasas contenidas en el extracto de hepatopáncreas del molusco *Littorina kurila* (Kusaykin *et al.*, 2003) o las alginato liasas, agarasas y celulasas descritas para una variedad de especies por Gómez-Pinchetti & García-Reina (1993). Así mismo, se ha visto que las endo- β -1,3-glucanasas de otros gasterópodos marinos como *Littorina sitkana* presentan su óptimo de pH en este rango de valores (Sova *et al.*, 2013). Lo mismo ocurre para la β -1,3-glucanasa obtenida del hongo *Ganoderma tsugae* pues mostró tener una actividad y estabilidad máxima a pH 5.0 y 50 °C (Liang *et al.*, 1995) hidrolizando así buena parte de los polisacáridos extracelulares que componen la pared del hongo. También es reseñable que una β -glucuronidasa comercial de *Patella vulgata* (Sigma-Aldrich SRE0093) presenta su óptimo funcional a pH 4.5 y la β -1,3-glucanasa procedente del estilo cristalino *Perna viridis* mostró tener su máxima actividad en un rango de pH de 4.0 a 6.5 y a una temperatura de 45 °C (Zakharenko *et al.*, 2011). Esta adaptación funcional viene determinada por el tipo de digestión ligeramente ácida que tiene lugar en la glándula digestiva de los moluscos.

Normalmente, la temperatura óptima para la actividad xilanasa oscila entre 35-60 °C (Butt *et al.*, 2008; Walia *et al.*, 2017). En el presente trabajo se comprueba que esto ocurre así tanto para las enzimas en

Siphonaria como en *Patella*. Así mismo, el rango óptimo de temperatura fue similar al obtenido en el estudio que se llevó a cabo con las agarasas, y celulasas propias de extractos digestivos de varios gasterópodos marinos (Gómez-Pinchetti & García-Reina, 1993) y para la β -1,3-glucanasa del molusco marino *Tapes literata*, cuya máxima actividad se dio a 45 °C (Zakharenko *et al.*, 2011).

Respecto a la termoestabilidad, aunque en la revisión de Sova *et al.* (2013) se afirma que todas las β -1,3-glucanasas estudiadas de los moluscos marinos presentan alta resistencia a diferentes temperaturas, los resultados del presente estudio muestran que la β -1,3-glucanasa de ambas especies es estable sólo durante las primeras horas de incubación, pero pasado este tiempo, su actividad se reduce en más de un 50 %. Dicha estabilidad está fuertemente determinada por la mayor o menor presencia de enlaces disulfuro y residuos de cisteína en su estructura. En contraste, la actividad xilanasas de *Siphonaria* mostró una elevada estabilidad a 45 °C lo que sugiere su utilidad para llevar a cabo tratamientos de hidrólisis prolongados.

En la industria papelera resulta fundamental hacer uso de xilanasas y glucanasas con los parámetros operativos descritos anteriormente, es decir, resistentes a altas temperaturas y pH ácidos. No obstante, habría que asegurarse que dichas enzimas se encuentren libres de celulasas, por lo que la purificación de estas sería imprescindible. La termoestabilidad y estabilidad ácida que ha demostrado tener dichas enzimas, las convierte en una excelente alternativa al blanqueamiento de papel convencional, donde se hace uso de reactivos químicos como el cloro que pueden afectar a la calidad del producto y el medio ambiente (Beg *et al.*, 2001; Bribiesca, 2013; Walia *et al.*, 2017). De esta manera se consigue una mayor productividad y sostenibilidad del proceso, permitiendo además ahorrar tiempo y dinero. Por otro lado, la eficacia de su aplicación en piensos para mejorar la digestibilidad de los ingredientes que lo componen es indudable y esto mismo se demostró a través de un ensayo de digestión *in vitro* que simulaba las condiciones intestinales de las aves de corral. En dicho ensayo se trabajó con mezclas de enzimas diferentes, siendo unas de ellas la β -1,3-glucanasa y la xilanasas cuya actividad fue medida a 40 °C y a pH 4.8 (Malathi & Devegowda, 2001).

3.2. Experimento 2. Caracterización de la cinética enzimática (V_{max} y K_m aparentes) de la xilanasas y β -1,3-glucanasa de ambas especies marinas

El resultado de la incubación de las muestras de EP y ES con las diferentes concentraciones crecientes de xilano se muestran en las Figuras 14 y 15, respectivamente.

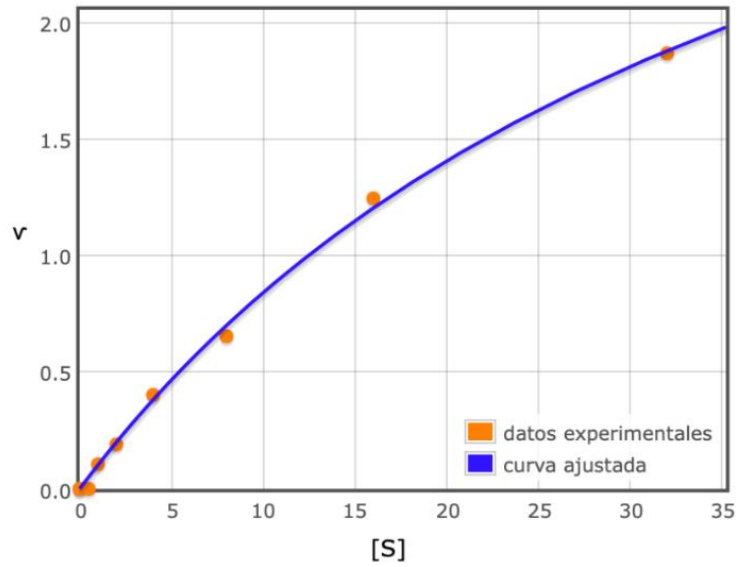


Figura 14. Representación gráfica de la curva de saturación ajustada para la xilanasa en *P. vulgata*.

- **Km (g/L) = 40.702 ± 5.486 , $p = 0.000308$**
- **Km (M) = 0.271**
- **Vmax (U/g) = 4.276 ± 0.372 , $p = 0.00026$**

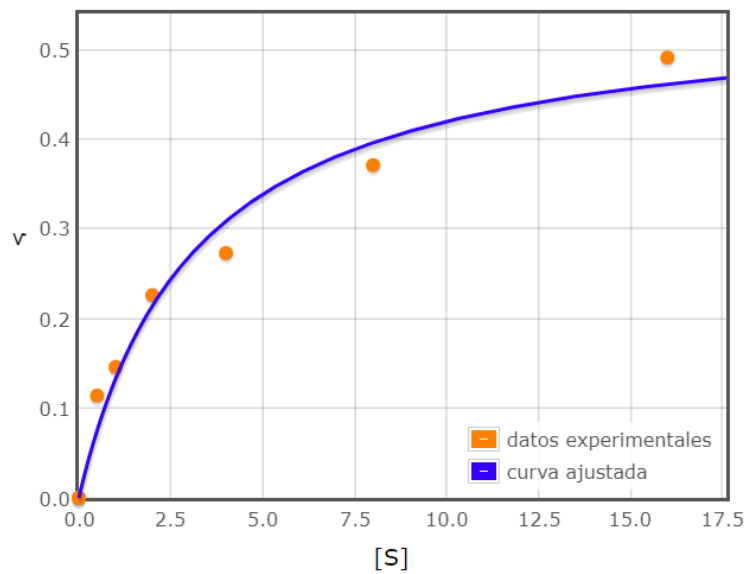


Figura 15. Representación gráfica de la curva de saturación ajustada para la xilanasa en *S. pectinata*.

- **Km (g/L) = 3.159 ± 0.763 , $p = 0.008980$**
- **Km (M) = 0.021**
- **Vmax (U/g) = 0.552 ± 0.048 , $p = 0.000085$**

El resultado de la incubación de las muestras de EP y ES con las diferentes concentraciones crecientes de laminarina se muestran en las Figuras 16 y 17, respectivamente.

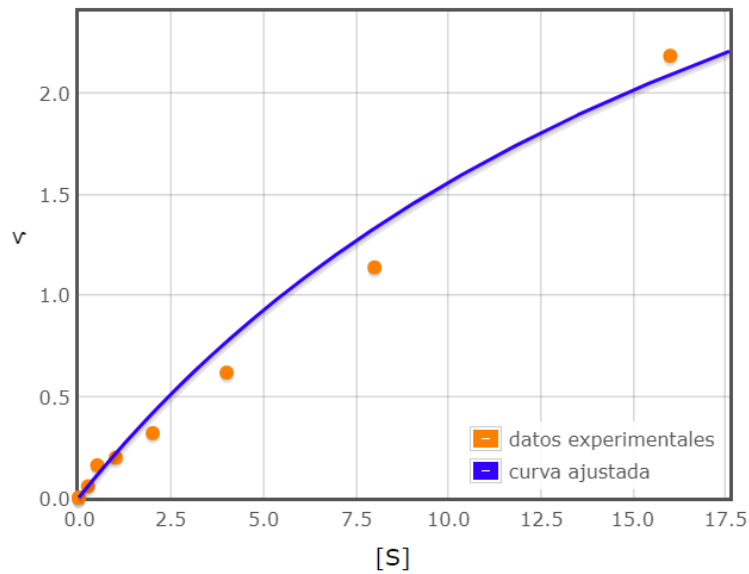


Figura 16. Representación gráfica de la curva de saturación ajustada para la β -1,3-glucanasa en *P. vulgata*.

- **Km (g/L)** = 21.286 ± 5.489 , $p = 0.008196$
- **Km (M)** = 0.042
- **Vmax (U/g)** = 4.874 ± 0.938 , $p = 0.002021$

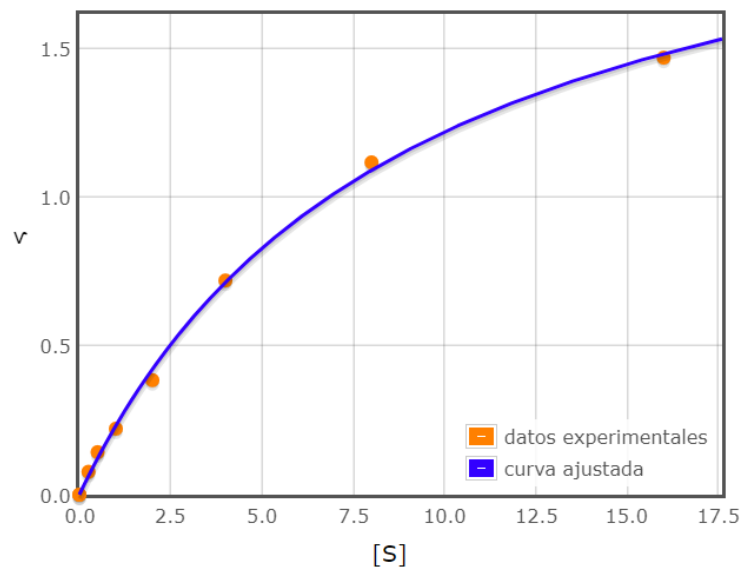


Figura 17. Representación gráfica de la curva de saturación ajustada para la β -1,3-glucanasa en *S. pectinata*.

- **Km (g/L)** = 8.952 ± 0.663 , $p = 0.000010$
- **Km (M)** = 0.018
- **Vmax (U/g)** = 2.310 ± 0.086 , $p = 0.000000$

Tabla 4. Resumen de los parámetros cinéticos obtenidos para las dos enzimas en ambas especies marinas.

		XILANASA	β -1,3-GLUCANASA
<i>Patella vulgata</i>	K_m (g/L)	40.702	21.286
	K_m (M)	0.271	0.042
	V_{max} (U/g)	4.276	4.874
<i>Siphonaria pectinata</i>	K_m (g/L)	3.159	8.952
	K_m (M)	0.021	0.018
	V_{max} (U/g)	0.552	2.310

En la Tabla 4, se puede comprobar una afinidad mucho mayor por el sustrato en xilanasas de *Siphonaria* pero una velocidad de reacción mucho menor que en *Patella* y una tendencia similar para la β -1,3-glucanasa, aunque en este caso las diferencias no son tan marcadas.

Los resultados obtenidos para ambas constantes no están en línea a los obtenidos por otras xilanasas, por ejemplo, las de los hongos *Aspergillus niger* y *Trichoderma spp.* (Lopes *et al.*, 2013). Estas difieren especialmente en los valores de V_{max} pues la enzima presente en ambas especies de hongos mostró tener una velocidad máxima aparente ($V_{max} = 6,993$ U/g y $V_{max} = 29,869$ U/g, respectivamente) mucho mayor a la obtenida para la enzima xilanasas del ES y EP. Por otra parte, la constante de afinidad de ambos hongos fue $K_m = 2.077$ g/L y 3.310 g/L, respectivamente, siendo en este caso, valores próximos al obtenido para la actividad xilanasas de *Siphonaria*. Por todo esto, se puede inferir que las xilanasas fúngicas requieren mucha mayor concentración de sustrato para alcanzar su saturación y menos tiempo para convertir dicho sustrato en producto.

En el caso de la β -1,3-glucanasa los valores de afinidad obtenidos para dicha enzima en este trabajo son ligeramente diferentes a los obtenidos por Rodríguez-Mendoza (2019) para una exo- β -1,3-glucanasa procedente del hongo termófilo *Thielavia terrestris*, que ha demostrado tener una mayor afinidad y especificidad por el sustrato laminarina ($K_m = 2.2$ mg/mL). No obstante, se ha de considerar que dicha diferencia no es tan notoria respecto a la afinidad que tiene esta misma enzima en *Siphonaria*. Se realizó otro estudio por García-Huante *et al.* (2017) con este mismo hongo, pero esta vez con una xilanasas que se evaluó frente a diferentes fuentes de carbono, siendo el xilano procedente de la madera de haya la fuente de carbono con la que mostró tener mayor afinidad ($K_m = 0.41$ mg/mL). Este último valor no está para nada próximo al obtenido para la xilanasas del EP ($K_m = 40.702$ g/L), no obstante, si se encuentra más próximo al obtenido para dicha enzima del ES ($K_m = 3.159$ g/L). Otro estudio revela que la β -1,3-glucanasa aislada y purificada del estilo cristalino del mejillón *Perna viridis* tenía un valor de K_m de 0.3 mg/mL (Zakharenko *et al.*, 2011). Esta misma enzima también fue aislada del estilo cristalino del molusco *Tapes literata*, mostrando valores de K_m prácticamente iguales a los dados en *Perna viridis* (K_m de 0.25 mg/mL). Además, Sova *et al.* (2013) recogen en su revisión valores de esta constante para otra diversidad de moluscos marinos que se encuentran en un rango de 0.2 - 0.6 mg/mL. De acuerdo con esta comparativa, los valores de K_m obtenidos en este trabajo para la β -1,3-glucanasa de ambas especies marinas es mayor, especialmente en *Patella*, por lo que la β -1,3-

glucanasa del hepatopáncreas de *Siphonaria* es la que más se aproxima a la afinidad por el sustrato que muestran tener los moluscos en general.

Estos hallazgos indican que, desde el punto de vista biotecnológico, su aplicación industrial se deberá valorar en función del tiempo de reacción y la cantidad de sustrato con la que trabajen, pues, por ejemplo, si se desea que actúen durante un tiempo prolongado y a elevada velocidad, las enzimas del hepatopáncreas de *Patella* son una excelente opción, pues su saturación no se alcanzará hasta pasadas varias horas. No obstante, si lo que se busca es que reaccionen rápidamente con poca cantidad de sustrato, entonces, las enzimas del hepatopáncreas de *Siphonaria* son las mejores candidatas, pues su afinidad por el sustrato es considerablemente mayor tanto en la xilanasas como en la β -1,3-glucanasa.

Considerando todo lo anterior se deduce que los rasgos operativos y funcionales de las enzimas de ambas especies, resumidos en la Tabla 5 están equilibrados y que deberían ser valorados en función de su potencial aplicación biotecnológica.

Tabla 5. Resumen de los rasgos más favorables encontrados en los parámetros funcionales de las enzimas de ambas especies. Se destaca con "X" la especie más favorable en cada caso.

	<i>P. vulgata</i>	<i>S. pectinata</i>
<u>XILANASA</u>		
Cantidad de actividad (U/g tejido)	X	
Óptimos de temperatura	Similares para ambas especies	
Estabilidad a incubaciones 45 °C		X
Óptimos de pH	Similares para ambas especies	
Estabilidad cambios pH		X
Afinidad por sustrato		X
Velocidad de reacción	X	
<u>GLUCANASA</u>		
Cantidad de actividad (U/g tejido)	X	
Óptimos de temperatura	Similares para ambas especies	
Estabilidad a incubaciones 45 °C		X
Óptimos de pH	Similares para ambas especies	
Estabilidad cambios pH	X	
Afinidad por sustrato		X
Velocidad de reacción	X	

En este sentido, los rasgos favorables siempre van a ser:

- Una mayor cantidad de actividad por U/g tejido.
- Una mayor estabilidad frente a cambios de pH y temperatura.
- Una elevada velocidad de reacción.
- Una elevada afinidad por su sustrato.

Se comprueba entonces que las enzimas de ambas especies podrían ser utilizadas bajo diferentes premisas operativas, por ejemplo:

- **Disponibilidad y coste de extracción** > más favorable para las enzimas de *P. vulgata* que están presentes en mayores concentraciones.
- **Necesidad de incubaciones prolongadas a 45 °C** > Mejor la xilanasas de *S. pectinata* por su elevada termoestabilidad.
- **Incubaciones más breves a 45 °C** > Mejor las enzimas de *P. vulgata* por su velocidad de reacción.
- **Cantidades bajas de sustrato** > Mejor las enzimas de *S. pectinata* que requieren menos cantidad de sustrato para empezar a funcionar.

3.3. Experimento 3. Evaluación controlada mediante simulación *in vitro* de la capacidad de hidrólisis de las enzimas xilanasas y β -1,3-glucanasa para la mejora nutritiva de diferentes especies de macroalgas representativas de cada grupo

En la Tabla 6 se muestran los resultados de azúcares reductores totales y pentosas obtenidos tras la aplicación de la mezcla enzimática procedente de la glándula digestiva de *P. vulgata* sobre las macroalgas *Ulva ohnoi*, *Undaria pinnatifida* y *Porphyra spp.*

Tabla 6. Liberación de azúcares reductores y pentosas durante la digestión *in vitro* de diferentes algas con extracto enzimático de *P. vulgata*. Los datos en una columna que no comparten la misma letra difieren significativamente con $p < 0.05$.

	Azúcares reductores (mg glucosa/100 mg alga)	Pentosas (mg xilosa/100 mg alga)
<i>Ulva ohnoi</i> (alga verde)	0.285 ± 0.057 ^b	1.114 ± 0.251 ^b
<i>Undaria pinnatifida</i> (alga parda)	0.042 ± 0.026 ^c	0.000 ± 0.066 ^c
<i>Porphyra spp.</i> (alga roja)	1.207 ± 0.146 ^a	3.218 ± 0.206 ^a

Los resultados muestran que:

- Las especies del género *Porphyra* tienen una liberación de azúcares reductores y pentosas significativamente mayores que la dada en la macroalga verde y parda por lo que se confirma que la degradación de sus polisacáridos es mucho más elevada.

- La liberación de azúcares reductores en la macroalga parda *Undaria pinnatifida* es muy reducida. Así mismo, la presencia de pentosas tras la hidrólisis enzimática es nula, lo cual indica que no ha existido prácticamente hidrólisis de los complejos polisacáridos presente en estas macroalgas.
- En *Ulva ohnoi* se da una liberación intermedia de azúcares reductores y pentosas, por lo que los carbohidratos que componen su estructura celular han sido degradados parcialmente por la mezcla enzimática.

En resumen, transcurridas las 6h de actuación enzimática, *Porphyra spp.* mostró ser la macroalga con mayor liberación de pentosas y azúcares reductores, seguida de *Ulva ohnoi* y finalmente *Undaria pinnatifida*.

La nula degradación *in vitro* de la macroalga parda se atribuye a la complejidad de sus fracciones de carbohidratos. Se sabe que las estructuras de los fucanos sulfatados que componen la mayor parte de sus paredes celulares son, por lo general, mucho más heterogéneos que los galactanos sulfatados que poseen las algas verdes y rojas. Esta complejidad se debe a la presencia de ramificaciones, a los diferentes tipos y posiciones de los enlaces glucosídicos, a la distribución aleatoria de grupos sulfatados y a la metilación, acetilación o aparición de residuos de fucosa no sulfatados (Pomin, 2011). Esto se puede corroborar con un ensayo llevado a cabo con la microbiota humana, donde al igual que en el presente estudio, los fucanos sulfatados de *Laminaria digitata* y *Undaria pinnatifida* no fueron degradados (Cuesta, 2018). Igualmente, esta baja susceptibilidad a la actuación enzimática también puede deberse a la presencia de alginatos difícilmente metabolizables que incluso hacen que este tipo de algas no puedan ser aprovechadas para la producción de biocombustibles, pues a la maquinaria enzimática microbiana le es complicado acceder a los azúcares fermentables que lo componen. Otra posible teoría que justifique los resultados obtenidos para *Undaria pinnatifida* es la presencia de inhibidores de naturaleza proteica que inhiben las enzimas digestivas de los animales marinos que se alimentan de ellas. De hecho, se demostró la presencia de inhibidores con alta especificidad por la β -1,3-glucanasa del molusco marino *Spisula sachalinensis* en 14 especies de algas pardas investigadas (Yermakova *et al.*, 2002).

Por otro lado, de acuerdo con el presente ensayo, la intermedia degradación de *Ulva ohnoi* puede deberse a que, en general, las macroalgas verdes presentan grandes cantidades de polisacáridos aniónicos en sus paredes celulares tales como los alginatos u otros galactanos sulfatados. Estos últimos parecen ser más complejos que los galactanos sulfatados que poseen las algas rojas (Pomin, 2011) pues las unidades de β -3-D-galactopiranosilo sulfatado parece ser el componente más predominantes de su heterogénea estructura, muchas de las cuales pueden llegar a estar altamente piruviladas y aumentar su resistencia contra las enzimas. En las algas rojas, en cambio, los galactanos sulfatados están compuestos por una estructura lineal de unidades repetidas de disacáridos con diferentes patrones de sulfatación más simples que puede variar entre especies. Así mismo, la particular estructura ramificada que poseen los ulvanos propios de las algas verdes es otro de los polisacáridos responsables de su baja susceptibilidad a la acción enzimática. Esta parcial degradación también se observó en un estudio llevado a cabo con las enzimas del fluido rumial, otras especies de *Ulva* y la

macroalga verde *Cladophora rupestris*, donde concretamente la digestibilidad de la materia seca era del 56.4 % y 47.3 %, respectivamente (Ploegmakers, 2020).

Al contrario de lo ocurrido para *Ulva ohnoi* y *Undaria pinnatifida*, la macroalga roja ha demostrado ser la más digerible y, por tanto, la mejor opción de suministro para la alimentación animal. De hecho, en otro estudio con la especie *Grateloupia turuturu*, se observó una abundante liberación de azúcares reductores y neutros tras la aplicación de un tratamiento enzimático con preparados comerciales que contenía actividad β -glucuronidasa, xilanasa, celulasa, entre otras (Denis *et al.*, 2009). De la misma forma, en la publicación de Ploegmakers (2020) mencionada anteriormente, se afirma que la digestibilidad de *Palmaria palmata*, *Mastocarpus stellatus* y *Porphyra spp.* fue la más alta (75-86 %) en comparación con las macroalgas verdes y pardas ensayadas (47-56 % y 35-81 %, respectivamente).

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permitieron alcanzar las siguientes conclusiones:

1. Mediante el estudio de los parámetros operativos para las enzimas xilanasa y β -1,3-glucanasa del extracto de hepatopáncreas de *Patella* y *Siphonaria*, se ha observado que ambas tienen pH y temperatura óptima muy similares, siendo en *P. vulgata* donde la actividad enzimática siempre es mayor. La termoestabilidad mostró ser mejor en las enzimas de *Siphonaria*. La estabilidad frente a variaciones de pH es superior en la xilanasa de *Siphonaria* y en la β -1,3-glucanasa de *Patella*.
2. Los parámetros funcionales evaluados para ambas especies marinas demostraron que la xilanasa y β -1,3-glucanasa de *Siphonaria* tenían una afinidad por su sustrato mucho mayor. No obstante, la velocidad de reacción es superior para ambas enzimas en *Patella*.
3. Es factible emplear el extracto enzimático de *P. vulgata* para llevar a cabo una hidrólisis parcial de los polisacáridos presentes en macroalgas, aunque debido a la diferente naturaleza de los mismos, los efectos más apreciables se obtendrían sobre algas rojas y verdes y serían prácticamente nulos sobre algas pardas.

5. REFERENCIAS

- Alba-Laverde, D. P. (2013). Efectos nutricionales de los polisacáridos no amiláceos en pollo de engorde de la línea Ross. *Revista Ciencia y Agricultura*, 10(1), 39-45.
- Bajpai, P. (2014). *Xylanolytic enzymes*. Academic press.
- Bastawde, K. B. (1992). Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 8(4), 353–368.
- Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L., & Hoondal, G. S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(3–4), 326–338.
- Bermejo, J. D. (2013). *FON FISHING. Escuela de Pesca*. Obtenido de Llampara - Lapa: <https://www.fon-fishing.com/informacion-sobre-llampara-lapa-187/>
- Bribiesca, B. L. C. (2013). Enzimas xilanolíticas bacterianas y sus aplicaciones industriales. *VERTIENTES Revista especializada en ciencias de la salud*, 16(1), 19-22.
- Busi, M. V., Barchiesi, J., Martín, M., & Gomez-Casati, D. F. (2014). Starch metabolism in green algae. *Starch-Stärke*, 66(1-2), 28-40.
- Butt, M. S., Tahir-Nadeem, M., Ahmad, Z., & Sultan, M. T. (2008). Xylanases and their applications in baking industry. *Food Technology and Biotechnology*, 46(1), 22–31.
- Castillo, S., & Gatlin III, D. M. (2015). Dietary supplementation of exogenous carbohydrase enzymes in fish nutrition: A review. *Aquaculture*, 435, 286–292.
- Chang, R., & Murillo, L. (2017). Determinación espectrofotométrica, de carbohidratos aprovechables en las algas *Ulva sp* y *Chaetomorpha sp* para la producción de etanol que funcione como biocombustible, por el método de la antrona. *Revista de Investigación*, 41(90), 053–066.
- Cruz-Suárez, L. E., Nieto-López, M., Tapia-Salazar, M., Gamboa-Delgado, J., Maldonado-Muñiz, M., Villarreal-Cavazos, D., & Ricque-Marie, D. (2013). Avances en la Valoración de Macroalgas del Género *Ulva* como Nutracéutico en *Litopenaeus vannamei*. *Avances en Nutrición Acuicola*.
- Cuesta, R. G. (2018). Algas marinas, fuente potencial de macronutrientes/Marine algae, potential source of macronutrients. *Revista de Investigaciones Marinas*, 37(2), 16-28.
- Dekker, R. F., & Richards, G. N. (1976). Hemicellulases: their occurrence, purification, properties, and mode of action. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, 32, 277-352.
- Denis, C., Le Jeune, H., Gaudin, P., & Fleurence, J. (2009). An evaluation of methods for quantifying the enzymatic degradation of red seaweed *Grateloupia turuturu*. *Journal of Applied Phycology*, 21(1), 153–159.
- Douglas, S.G. (1981). *A rapid method for the determination of pentosans in wheat flour* (No. CIMMYT.).
- Espinoza-Gallardo, D., Contreras-Porcía, L., & Ehrenfeld, N. (2017). β -glucanos, su producción y

- propiedades en microalgas con énfasis en el género *Nannochloropsis* (Ochrophyta, Eustigmatales). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 52(1), 33–49.
- Fernandes, H., Salgado, J. M., Martins, N., Peres, H., Oliva-Teles, A., & Belo, I. (2019). Sequential bioprocessing of *Ulva rigida* to produce lignocellulolytic enzymes and to improve its nutritional value as aquaculture feed. *Bioresource Technology*, 281(February), 277–285.
- García-Huante, Y., Cayetano-Cruz, M., Santiago-Hernández, A., Cano-Ramírez, C., Marsch-Moreno, R., Campos, J. E., Aguilar-Osorio, G., Benitez-Cardoza, C. G., Trejo-Estrada, S., & Hidalgo-Lara, M. E. (2017). The thermophilic biomass-degrading fungus *Thielavia terrestris* Co3Bag1 produces a hyperthermophilic and thermostable β -1,4-xylanase with exo- and endo-activity. *Extremophiles*, 21(1), 175–186.
- García-Vaquero, M., & Hayes, M. (2016). Red and green macroalgae for fish and animal feed and human functional food development. *Food Reviews International*, 32(1), 15–45.
- Gobet, A., Mest, L., Perennou, M., Dittami, S. M., Caralp, C., Coulombet, C., Huchette, S., Roussel, S., Michel, G., & Leblanc, C. (2018). Seasonal and algal diet-driven patterns of the digestive microbiota of the European abalone *Haliotis tuberculata*, a generalist marine herbivore. *Microbiome*, 6(1), 60.
- Gómez-Pinchetti, J. L., & García-Reina, G. (1993). Enzymes from marine phycophages that degrade cell walls of seaweeds. *Marine Biology: International Journal on Life in Oceans and Coastal Waters*, 116(4), 553–558.
- González, I., Infante, D., Peteira, B., Martínez, B., Arias, Y., González, N., & Miranda, I. (2011). Caracterización bioquímica de aislamientos de *Trichoderma spp.* promisorios como agentes de control biológico. II. Expresión de actividad glucanasa. *Revista de Protección Vegetal*, 26(1), 23–29.
- Holdt, S. L., & Kraan, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 543–597.
- Ito, M., Watanabe, K., Maruyama, T., Mori, T., Niwa, K., Chow, S., & Takeyama, H. (2019). Enrichment of bacteria and alginate lyase genes potentially involved in brown alga degradation in the gut of marine gastropods. *Scientific Reports*, 9(1), 3–4.
- Kang, V., Lengerer, B., Wattiez, R., & Flammang, P. (2020). Molecular insights into the powerful mucus-based adhesion of limpets (*Patella vulgata* L.). *Open biology*, 10(6), 200019.
- Kendel, M., Wielgosz-Collin, G., Bertrand, S., Roussakis, C., Bourgougnon, N. B., & Bedoux, G. (2015). Lipid composition, Fatty Acids and Sterols in the seaweeds *Ulva armoricana*, and *Solieria chordalis* from Brittany (France): An analysis from Nutritional, Chemotaxonomic, and Antiproliferative Activity Perspectives. *Marine Drugs*, 13(9), 5606–5628.
- Kusaykin, M. I., Burtseva, Y. V., Svetasheva, T. G., Sova, V. V., & Zvyagintseva, T. N. (2003). Distribution of O-glycosylhydrolases in marine invertebrates. Enzymes of the marine mollusk *Littorina kurila*

- that catalyze fucoidan transformation. *Biochemistry (Moscow)*, 68(3), 317-324.
- Lahaye, M., & Robic, A. (2007). Structure and function properties of Ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules*, 8(6), 1765–1774.
- Liang, Z. C., Hseu, R. S., & Wang, H. H. (1995). Partial purification and characterization of a 1,3- β -D-glucanase from *Ganoderma tsugae*. *Journal of Industrial Microbiology*, 14(1), 5–9.
- Linton, S. M. (2020). Review: The structure and function of cellulase (endo- β -1, 4-glucanase) and hemicellulase (β -1, 3-glucanase and endo- β -1, 4-mannase) enzymes in invertebrates that consume materials ranging from microbes, algae to leaf litter. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 240, 110354.
- Lopes, A. M., Valeri, D., & Pessoa-júnior, A. (2013). Comparison of kinetic characteristics of xylanases from *Aspergillus niger* and *Trichoderma* sp. with pH and temperature baking process parameters. *African Journal of Biotechnology*, 12(19), 2640–2645.
- Lu, F., Lu, M., Lu, Z., Bie, X., Zhao, H., & Wang, Y. (2008). Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. *Bioresource technology*, 99(13), 5938-5941.
- Magallanes, C., Córdova, C., & Orozco, R. (2003). Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú. *Revista Peruana de Biología*, 10(2), 125–132.
- Magnoni, L. J., Martos-Sitcha, J. A., Queiroz, A., Calduch-Giner, J. A., Gonçalves, J. F. M., Rocha, C. M. R., Abreu, H. T., Schrama, J. W., Ozorio, R. O. A., & Perez-Sanchez, J. (2017). Dietary supplementation of heat-treated *Gracilaria* and *Ulva* seaweeds enhanced acute hypoxia tolerance in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Biology Open*, 6(6), 897–908.
- Makkar, H. P. S., Tran, G., Heuzé, V., Giger-Reverdin, S., Lessire, M., Lebas, F., & Ankers, P. (2016). Seaweeds for livestock diets: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 212, 1–17.
- Malathi, V., & Devegowda, G. (2001). *In vitro* evaluation of Nonstarch Polysaccharide Digestibility of Feed Ingredients by Enzymes. *Poultry Science*, 80(3), 302–305.
- Marrion, O., Fleurence, J., Schwertz, A., Guéant, J. L., Mamelouk, L., Ksouri, J., & Villaume, C. (2005). Evaluation of protein *in vitro* digestibility of *Palmaria palmata* and *Gracilaria verrucosa*. *Journal of Applied Phycology*, 17(2), 99–102.
- Massarente, V. S., de Araujo Zandoni, J., Gomes, E., & Bonilla-Rodriguez, G. O. (2020). Biochemical characterization of endoglucanases produced by *Myceliophthora thermophila* M. 7.7 in solid-state culture. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 27, 101684.
- Miller, G. L. (1959). Modified DNS method for reducing sugars. *Anal Chem*, 31(3), pp. 426-428.
- Ocaña, T., & Fa, D. A. (2003). Microalgal availability and consumption by *Siphonaria pectinata* (L., 1758) on a rocky shore. *Boletín Instituto Español de Oceanografía*, 19, 65-73.
- Oliveira, A. S., Sudatti, D. B., Fujii, M. T., Rodrigues, S. V., & Pereira, R. C. (2013). Inter- and

- intrapopulation variation in the defensive chemistry of the red seaweed *Laurencia dendroidea* (Ceramiales, Rhodophyta). *Phycologia*, 52(2), 130–136.
- Orton, J. H. (1929). Observations on *Patella vulgata*. Part III. Habitat and Habits. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 16(1), 277–288.
- Øverland, M., Mydland, L. T., & Skrede, A. (2019). Marine macroalgae as sources of protein and bioactive compounds in feed for monogastric animals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(1), 13–24.
- Paul, V. J., Ritson-Williams, R., & Sharp, K. (2011). Marine chemical ecology in benthic environments. *Natural Product Reports*, 28(2), 345–387.
- Planas, A. (2000). Bacterial 1,3-1,4- β -glucanases: structure, function and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543(2), 361–382.
- Ploegmakers, M. (2020). *Algas marinas: Un alimento potencial para rumiantes*. Obtenido de All about feed: <https://es.allaboutfeed.net/algas-marinas-un-alimento-potencial-para-los-rumiantes/>
- Pomin, V. H. (2011). Structure and Use of Algal Sulfated Fucans and Galactans. *Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology*, 229–261.
- Rioux, L. E., & Turgeon, S. L. (2015). Seaweed carbohydrates. In *Seaweed sustainability*, 141–192. Academic Press.
- Rodríguez-Mendoza, J. (2019). Clonación y expresión del gen codificante para la exo- β -1, 3-glucanasa del hongo termófilo *Thielavia terrestris* Co3Bag1 en *Aspergillus niger*. Aplicación de la enzima en la hidrólisis de β -1, 3-glucanos.
- Silva, L. A. O., Terrasan, C. R. F., & Carmona, E. C. (2015). Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma inhamatum*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(4), 307–313.
- Simone, L. R. L., & Seabra, M. I. G. (2017). Shell and body structure of the plesiomorphic pulmonate marine limpet *Siphonaria pectinata* (Linnaeus, 1758) from Portugal (Gastropoda: Heterobranchia: Siphonariidae). *Folia Malacologica*, 25(3).
- Sinha, A. K., Kumar, V., Makkar, H. P. S., De Boeck, G., & Becker, K. (2011). Non-starch polysaccharides and their role in fish nutrition - A review. *Food Chemistry*, 127(4), 1409–1426.
- Sova, V. V., Pesentseva, M. S., Zakharenko, A. M., Kovalchuk, S. N., & Zvyagintseva, T. N. (2013). Glycosidases of marine organisms. *Biochemistry (Moscow)*, 78(7), 746–759.
- Stiger-Pouvreau, V., Bourgoignon, N., & Deslandes, E. (2016). Carbohydrates from seaweeds. In *Seaweed in health and disease prevention*, 223–274. Academic press.
- Stone, B. A., & Morton, J. E. (1958). The distribution of cellulases and related enzymes in mollusca. *Journal of Molluscan Studies*, 33(3), 127–141.

- Subramaniyan, S., & Prema, P. (2002). Biotechnology of microbial xylanases: Enzymology, molecular biology, and application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(1), 33–64.
- Svensson, J. R., Nylund, G. M., Cervin, G., Toth, G. B., & Pavia, H. (2013). Novel chemical weapon of an exotic macroalga inhibits recruitment of native competitors in the invaded range. *Journal of Ecology*, 101(1), 140–148.
- Tahir, M., Saleh, F., Ohtsuka, A., & Hayashi, K. (2008). An effective combination of carbohydrases that enables reduction of dietary protein in broilers: Importance of hemicellulase. *Poultry Science*, 87(4), 713–718.
- Usov, A. I. (2011). Polysaccharides of the red algae. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, 65, 115-217.
- Verma, P., Arun, A., & Sahoo, D. (2015). Brown Algae. In *The Algae World*. 177–204. Springer, Dordrecht.
- Walia, A., Guleria, S., Mehta, P., Chauhan, A., & Parkash, J. (2017). Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. *3 Biotech*, 7(1), 1–12.
- Yermakova, S. P., Sova, V. V., & Zvyagintseva, T. N. (2002). Brown seaweed protein as an inhibitor of marine mollusk endo-(1 → 3)-β-D-glucanases. *Carbohydrate Research*, 337(3), 229–237.
- Zakharenko, A. M., Kusaykin, M. I., Kovalchuk, S. N., Anastyuk, S. D., Ly, B. M., Sova, V. V., Rasskazov, V. A., & Zvyagintseva, T. N. (2011). Enzymatic and molecular characterization of an endo-1,3-β-d-glucanase from the crystalline styles of the mussel *Perna viridis*. *Carbohydrate Research*, 346(2), 243–252.