



UNIVERSIDAD
DE ALMERÍA



EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DE *Ulva ohnoi* ORIENTADO A SU INCLUSIÓN COMO INGREDIENTE POTENCIAL EN PIENSOS PARA LA ACUICULTURA

Trabajo Fin de Grado en Biotecnología

Curso 2020/2021

Andrea Crescencia Domingo Ratia

Tutor: Fco. Javier Moyano López

Cotutora: Francisca Purificación Martínez Antequera

Facultad de Ciencias Experimentales

Departamento de Biología y Geología

Grupo de investigación en Modelización Digestiva

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Utilización de las macroalgas en acuicultura	5
1.2. Limitaciones del uso de macroalgas como ingredientes en piensos	6
1.3. Mejora de la biodisponibilidad de nutrientes en macroalgas	8
1.4. Objetivos.....	9
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
2.1. Obtención y preparación de la macroalga	10
2.2. Experimento 1. Evaluación comparada del efecto de dos preparados enzimáticos, una mezcla comercial y un extracto de glándula digestiva de <i>Patella vulgata</i>, sobre la hidrólisis de polisacáridos presentes en la macroalga.....	11
2.2.1. <i>Obtención y preparación del extracto de P. vulgata (EPV).....</i>	11
2.2.2. <i>Descripción del preparado comercial (MEC)</i>	11
2.2.3. <i>Medidas de actividad enzimática en ambos productos enzimáticos.....</i>	11
2.2.4. <i>Tratamiento enzimático y diseño factorial.....</i>	11
2.2.5. <i>Medida de los productos de hidrólisis y de capacidad antioxidante</i>	12
2.3. Experimento 2. Uso de modelos de simulación digestiva de dos especies de peces para evaluar el efecto de un pretratamiento sobre la biodisponibilidad de nutrientes en <i>Ulva</i>	13
2.3.1. <i>Tratamiento del alga y piensos elaborados</i>	13
2.3.2. <i>Ensayos de simulación digestiva in vitro</i>	15
2.4. Tratamiento estadístico de los datos.....	16
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
3.1. Experimento 1. Evaluación comparada del efecto de dos preparados enzimáticos, una mezcla comercial y un extracto de glándula digestiva de <i>Patella vulgata</i>, sobre la hidrólisis de polisacáridos presentes en la macroalga.....	18
3.1.1. <i>Caracterización de las actividades enzimáticas de los preparados.....</i>	18
3.1.2. <i>Optimización de las condiciones de hidrólisis enzimática mediante modelo factorial de superficie de respuesta.....</i>	19
3.2. Experimento 2. Uso de modelos de simulación digestiva de dos especies de peces para evaluar el efecto de un pretratamiento sobre la biodisponibilidad de nutrientes en <i>Ulva</i>	29
4. CONCLUSIONES	30
5. BIBLIOGRAFIA	31
6. ANEXO I.....	36

RESUMEN

En el presente trabajo se plantea el interés de incrementar el valor nutricional de una Clorofita (*Ulva ohnoi*) como ingrediente potencialmente utilizable en piensos para acuicultura mediante un pretratamiento enzimático con carbohidrasas. Dicho tratamiento sería equivalente a los que se llevan a cabo con objeto de hidrolizar los polisacáridos no amiláceos en materias primas vegetales utilizadas en piensos para animales terrestres. Para ello, se evaluó tanto un preparado enzimático comercial como un extracto procedente de la glándula digestiva del gasterópodo *Patella vulgata*, rico en distintas carbohidrasas (xilanasas, β -1,3-glucanasa y β -1,4-glucanasa). La optimización de las condiciones de hidrólisis se llevó a cabo mediante un diseño factorial que consideró el efecto de distintos factores (dosis, tiempo de incubación y humedad) tanto sobre la hidrólisis de carbohidratos como sobre la actividad de compuestos con capacidad antioxidante presentes en *Ulva*. Se encontró que ambos preparados enzimáticos hidrolizaban parcialmente los polisacáridos presentes en la macroalga, aunque los factores con efecto significativo en cada caso fueron diferentes; dosis y tiempo de incubación para la enzima comercial y tiempo de incubación y humedad para el extracto de *Patella*. No obstante, en ambos casos el tratamiento enzimático afectó de manera negativa a la capacidad antioxidante inicialmente presente en la harina de *Ulva*. Por último, se evaluaron los cambios en la biodisponibilidad digestiva de los antioxidantes y los carbohidratos resultantes del tratamiento con el preparado comercial, al incluir la harina de alga como ingrediente en piensos para dos peces marinos, *Sparus aurata* y *Mugil cephalus*, empleando para ello un sistema de modelización *in vitro* de la digestión en ambas especies.

ABSTRACT

In the present work, the interest of increasing the nutritional value of a Chlorophyte (*Ulva ohnoi*) as a potentially usable ingredient in aquaculture feed is raised by means of an enzymatic pretreatment with carbohydrases. The treatment would be equivalent to those carried out in order to hydrolyze non-starch polysaccharides in vegetable raw materials used in feed for terrestrial animals. For this, both a commercial enzyme preparation and an extract from the digestive gland of the gastropod *Patella vulgata*, rich in different carbohydrases (xylanase, β -1,3-glucanase and β -1,4-glucanase), were evaluated. The optimization of the hydrolysis conditions was carried out through a factorial design that considered the effect of different factors (dose, incubation time and moisture) both on the hydrolysis of carbohydrates and on the activity of compounds with antioxidant capacity present in *Ulva*. It was found that both enzyme preparations partially hydrolyzed the polysaccharides present in the macroalgae, although the factors with significant effect in each case were different; dose and incubation time for the commercial enzyme and incubation time and moisture for the limpet extract. However, in both cases the enzymatic treatment negatively affected the antioxidant capacity initially present in the *Ulva* meal. Finally, changes in the digestive bioavailability of antioxidants and carbohydrates resulting from treatment with the commercial preparation were evaluated by including seaweed meal as an ingredient in feeds for two marine fish, *Sparus aurata* and *Mugil cephalus*, using an *in vitro* modeling system of digestion in both species.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Utilización de las macroalgas en acuicultura

La acuicultura y la pesca de captura son dos de las actividades fundamentales para el suministro de alimentos a la población humana, alcanzando ambas un volumen de más de 150 MT en el año 2018 (FAO, 2020). Una fracción significativa de dichas capturas se destina a la fabricación de las harinas y aceites de pescado empleados en piensos para animales terrestres y especialmente acuáticos. Para reducir este consumo se ha planteado la posibilidad de sustituir dichos ingredientes en los piensos de acuicultura, al menos parcialmente, por otros con un valor nutritivo equivalente, lo que podría conllevar además de beneficios ambientales, una reducción en los costes de producción (Tacon & Metian, 2008; Hardy, 2010). Dentro del amplio abanico de materias primas que se han evaluado y que se considera de interés, cabe señalar las macroalgas, las cuales comprenden una gran variedad de especies con un gran potencial nutricional (Øverland *et al.*, 2019).

El uso nutritivo de las macroalgas depende de su composición, la cual puede ser muy variable en función de las condiciones fisicoquímicas de su lugar de crecimiento y del grupo al que pertenezcan: pardas (pertenecientes al filo Phaeophyta), rojas (filo Rhodophyta) y verdes (filo Chlorophyta) (Collins *et al.*, 2016). Los tres grupos presentan un alto contenido en minerales, las macroalgas rojas y verdes destacan por su alto contenido en proteínas en tanto que el nivel de azúcares y grasas es alto y similar entre algas pardas y verdes, siendo reseñable el contenido en compuestos fenólicos de estas últimas. Las algas pardas deben su color a un pigmento predominante denominado fucoxantina y contienen polisacáridos tales como celulosa, alginatos, laminarinas y fucanos, las verdes destacan por presentar en sus paredes celulares ulvan, un polisacárido estructural complejo (Robic *et al.*, 2009). Las algas rojas, además de presentar carbohidratos primarios como el agar y los carragenanos (O'Sullivan *et al.*, 2010), contienen ficoeritrina y ficocianina que forman su mayor proporción de pigmentos, junto a clorofilas y carotenoides (Lalegerie *et al.*, 2019). Una buena parte de estos compuestos presenta propiedades beneficiosas desde el punto de vista de la salud o el metabolismo que pueden ser aplicadas tanto en humanos en animales (Collins *et al.*, 2016).

En general, las macroalgas pardas son las que están constituidas por un porcentaje menor de proteínas: entre un 5-15% del peso seco, en tanto que algas rojas y verdes normalmente presentan niveles de entre 10-47%. Estos últimos valores se encuentran principalmente en las especies del género *Porphyra*, como *Porphyra tenera*, y en otras como *Palmaria palmata*, cuyo contenido en proteínas puede ser del 35% en peso seco. Sin embargo, como ya se ha mencionado, estos porcentajes varían en función de muchos factores externos e internos (Fleurence, 1999). Este contenido en proteína de las distintas macroalgas es uno de los rasgos de interés para su aprovechamiento en piensos destinados para la cría de peces (Sugita *et al.*, 2009).

En el caso concreto de las clorofitas del género *Ulva*, se trata de especies con características interesantes como el hecho de que su cultivo es fácil, pues pueden crecer en distintas condiciones climáticas con una amplia variedad de sustratos, y que presentan un buen perfil de vitaminas, minerales y compuestos potencialmente bioactivos (Tabarsa *et al.*, 2012; Shpigel *et al.*, 2017). Las especies de *Ulva* destacan igualmente por poseer una matriz muy compleja de carbohidratos

estructurales en las que abunda el ulvan (Figura 1), un polisacárido compuesto por una amplia variedad de glúcidos tales como xilosa, ramnosa, ácido glucurónico, ácido udurónico, glúcidos sulfatados, etc. que le dan un alto peso molecular y una buena resistencia mecánica (Robic *et al.*, 2009). Adicionalmente, estas macroalgas también presentan celulosa y hemicelulosa, polisacáridos con un alto contenido en glucosa y xilosa (Wahlström *et al.*, 2020) y además son las únicas que pueden contener hasta un 3% de lignina en su composición (Özçimen *et al.*, 2015).

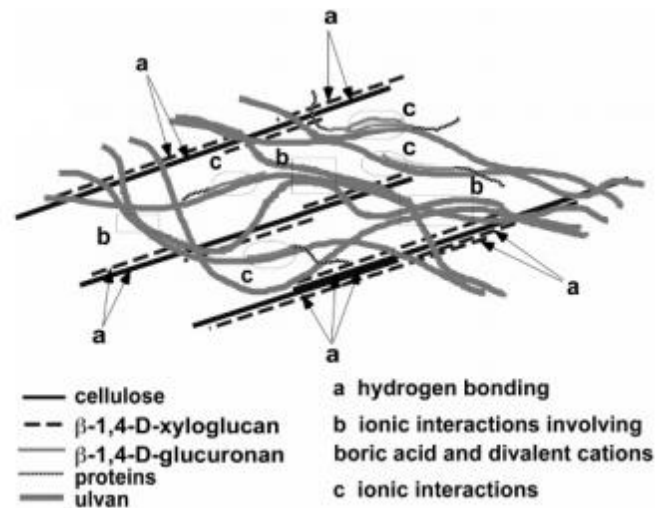


Figura 1. Asociación de los polisacáridos estructurales que forman las paredes celulares en especies del género *Ulva spp.* (Lahaye & Robic, 2007).

Se han utilizado diferentes especies de *Ulva* como ingredientes en piensos para acuicultura con resultados variables. Por ejemplo, resultados positivos se han obtenido en el crecimiento y contenido de grasa intraperitoneal de besugo rojo (*Pagrus major*) al emplear piensos que incluían *Ulva pertusa* (Mustafa *et al.*, 1995). En la misma línea, mújoles (*Mugil cephalus*) alimentados con piensos en los que se incluyó un 20 % de *Ulva lactuca* presentaron un buen crecimiento, así como firmeza y calidad muscular (Wassef *et al.*, 2001). También se ha demostrado la posibilidad de incluir hasta un 10 % de *Ulva rígida* en piensos para lubina (*Dicentrarchus labrax*), sin efectos negativos sobre el crecimiento (Valente *et al.*, 2006).

Además de como fuente de nutrientes, se ha demostrado que las especies del género *Ulva* contienen compuestos con capacidad activadora del sistema inmunológico y el metabolismo oxidativo. Concretamente el ulvan antes mencionado parece activar diversas rutas de señalización y de modulación del sistema inmunitario en el lenguado senegalés *Solea senegalensis*, (Ponce *et al.*, 2020) y extractos del alga completa mostraron activación de la actividad inmunitaria y de la respuesta antioxidante en lubina (Peixoto *et al.*, 2016).

1.2. Limitaciones del uso de macroalgas como ingredientes en piensos

Los principales factores que limitan el uso de macroalgas en piensos pueden ser de dos tipos:

Tecnológicos. Dado que las macroalgas presentan un alto grado de humedad y fácil descomposición, lo que dificulta su manejo y procesado. En el momento del recolectado, la biomasa vegetal marina presenta un contenido heterogéneo, voluminoso, muy acuoso y sujeto a un rápido deterioro, por ello

el procesado de una macroalga puede conllevar distintas fases que abarcan desde una adecuada preservación y homogeneización hasta el desecho final de sustancias antinutritivas (Martínez-Antequera, 2020). El desarrollo y la cosecha de estos organismos vegetales suele desarrollarse en periodos estacionales, por lo que la investigación del procesado y el almacenamiento a largo plazo es fundamental (Martínez-Antequera, 2020). En este aspecto ha de considerarse su gran contenido en agua, su temprana descomposición tras la cosecha y los distintos fines que pueden tener (Gallagher *et al.*, 2018). Las condiciones físicas juegan un papel fundamental, siendo una de las opciones el almacenamiento en frío. Por ejemplo, el mantenimiento de muestras de *Ulva lactuca* y de *Palmaria palmata* a 4°C les supone un desarrollo microbiológico menor y les aporta una mayor estabilidad (Liot *et al.*, 1993).

En la mayoría de los casos, la preservación va unida al secado de la macroalga ya que, por ejemplo, en la fabricación de piensos para la acuicultura este suplemento suele añadirse en forma de polvo fino (Evans & Critchley, 2014). Los distintos métodos de secado se resumen en secado al sol, por pulverización o al horno (Griffiths *et al.*, 2016). En esta línea, todos los sistemas de secado presentan ventajas y desventajas, pues la exposición al sol, por ejemplo, es un procedimiento de bajo coste, pero puede que no sea el método más higiénico sobre todo si el producto está destinado a la alimentación (Kadam *et al.*, 2015). Por otra parte, el secado al horno es el método más usual, que mejora la disponibilidad de las proteínas derivadas de las macroalgas (Wong & Cheung, 2001). No obstante, si el tiempo de exposición a altas temperaturas es prolongado, puede conllevar la pérdida de fenoles presentes en la composición de las macroalgas (Gupta, Cox & Abu-Ghannam, 2011). Es por ello, que se ha demostrado que realizando pretratamientos con ultrasonificación o aplicación de calor con microondas se disminuye el tiempo de secado (Jangam, 2011; Mothibe *et al.*, 2011) y, por tanto, existe una mayor biodisponibilidad de compuestos bioactivos y además a un coste menor.

Como se ha mencionado, la conservación en frío o el secado son métodos útiles de preservación, pero además existen métodos como el ensilado (Herrmann *et al.*, 2015). Este método tradicional de conservación de biomasa vegetal tiene como objetivo evitar la pérdida de carbohidratos, creando un ambiente ácido donde se disminuye o se inhibe la actividad microbiológica, resultando además ventajosa en costes, en riesgos y en la menor pérdida de materia seca. Este proceso se ha intentado en el caso de macroalgas pardas, donde diversos factores como la falta de carbohidratos fermentables, la escasa disminución del pH y la poca existencia de bacterias ácido-lácticas dificultan el proceso (Black, 1955; Herrmann *et al.*, 2015). Por otro lado, un trabajo pionero con *Ulva lactuca* (Wu *et al.*, 2018) demostró que su ensilado, junto con la adición de enzimas celulolíticas y la inoculación de bacterias ácido lácticas, es una buena opción como método de mantenimiento, pues se retuvieron más del 90% de los sólidos y se conservaron la mayoría de los carbohidratos durante los 30 días de ensayo.

Nutricionales. Como se ha indicado las macroalgas presentan una amplia variedad de carbohidratos complejos de naturaleza no amilácea (polisacáridos no amiláceos o PNAs) que dificultan su digestión ya que muchos organismos marinos carecen de las enzimas digestivas necesarias para su asimilación (González, 2017). Está ampliamente demostrado que los PNAs presentes en ingredientes vegetales de origen terrestre ejercen efectos nutricionales negativos en peces que dependen de su cantidad y del tipo, los cuales condicionan diferencias en cuanto a su solubilidad, tránsito intestinal, interacción con

otros nutrientes e influencia sobre la microbiota intestinal (Kroghdahl *et al.*, 2005; Gatesoupe *et al.*, 2014). Por otra parte, esta limitada digestión de los diferentes componentes estructurales puede condicionar también la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos de gran valor para la salud del animal.

1.3. Mejora de la biodisponibilidad de nutrientes en macroalgas

Considerando lo anteriormente expuesto, se deduce que los tratamientos de las macroalgas previos a su inclusión en los piensos destinados a hidrolizar parcialmente la fracción de polisacáridos estructurales pueden resultar útiles para la liberación de compuestos nutritivos y para asegurar que las enzimas digestivas tienen un mayor acceso a los diferentes sustratos (Felix & Selvaraj, 2004). Tales tratamientos pueden ser físicos, químicos o biológicos, incluyendo estos últimos los realizados con enzimas (Kadam *et al.*, 2015). Los tratamientos físicos se basan en procesos como la molienda o la aplicación de microondas (Yun *et al.*, 2016) que resultan una alternativa muy eficiente frente a los métodos de aplicación de calor (Banu *et al.*, 2020). Entre los tratamientos con reactivos, destaca el uso de ácidos como el sulfúrico, clorhídrico o cítrico que ayudan a romper las estructuras vegetales (Kwon *et al.*, 2016). Por ejemplo, la aplicación de un 3% de ácido sulfúrico en *Ulva fasciata* determina una gran liberación de azúcares (Hamouda *et al.*, 2016). Sin embargo, estos compuestos pueden dar lugar a productos indeseados como el hidroximetilfurfural y ácidos orgánicos que actúan como inhibidores de procesos fermentativos (Park *et al.*, 2012). A pesar de que la hidrólisis ácida permite la liberación de productos sin la inhibición de la reacción por saturación, también se ha de tener en cuenta que diversas sustancias del medio pueden convertirse en sustratos tóxicos, suponiendo un mayor riesgo medioambiental y sanitario (Hamouda *et al.*, 2016).

Por otro lado, las enzimas llevan a cabo procesos de hidrólisis cuyos costes de operación son menores, convirtiendo sustratos en productos deseados con una gran especificidad y en un alto grado de conversión (Tan & Lee, 2014). Asimismo, el número de productos tóxicos indeseados es mucho menor y las condiciones de pH y temperatura en las que operan pueden ser fácilmente controladas. La extracción enzimática ha sido utilizada en macroalgas para impulsar la liberación de elementos útiles en distintos ámbitos (Heo *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2019; Fernandes *et al.*, 2019). Las enzimas hidrolíticas que hacen frente a estas complejas estructuras moleculares son principalmente celulasas, β -glucanasas y xilanasas (Bhat, 2000). Las xilanasas son una serie de enzimas hemicelulolíticas, responsables de la rotura de los enlaces β (1-4) de los heteroxilanos que componen las paredes celulares vegetales (Lafond *et al.*, 2014). En este sentido también las β -glucanasas hacen una función similar y junto con las xilanasas, resultan imprescindibles a la hora de realizar una digestión enzimática como pretratamiento de una macroalga (Parab *et al.*, 2017; Linton, 2020). En la industria de piensos para animales terrestres es habitual utilizar mezclas de estas enzimas para hidrolizar parcial o totalmente los PNAs presentes en ingredientes y subproductos vegetales terrestres y, por tanto, existen en el mercado numerosos productos con composiciones y capacidades bien diferenciadas (Classen, 1996; Gdala *et al.*, 1997; Ai *et al.*, 2007). No obstante, cabe señalar que tales productos están diseñados para hidrolizar los polisacáridos complejos presentes en tales ingredientes, pero muy probablemente no presenten igual eficiencia para hidrolizar los complejos polisacáridos presentes en

las macroalgas, pese a que algunos de ellos, como la celulosa o el xilano, formen parte de los mismos en distintas proporciones.

En este sentido, cabe señalar que multitud de organismos presentes en el medio marino pueden ser una fuente amplia y prometedora de enzimas aplicables a la hidrólisis de los polisacáridos presentes en macroalgas, principalmente aquellos que las utilizan como sustrato alimenticio, ya sean microorganismos o animales, tanto invertebrados como vertebrados. En el caso de los invertebrados, el filum de los moluscos destaca por la gran diversidad de especies que se alimenta de algas y que, por lo tanto, son capaces de producir enzimas que les ayudan en la digestión de polisacáridos complejos (van Weel, 1961). Entre estas especies cabe señalar a los gasterópodos monoplacóforos, conocidos vulgarmente como lapas, organismos abundantes en las costas rocosas y entre ellos uno de los más conocidos es la lapa común, *Patella vulgata*. Este organismo endémico del noroeste de Europa se ha estudiado por su capacidad de sintetizar un mucus con gran capacidad adhesiva, pudiendo proporcionar así un potente producto biotecnológico (Kang *et al.*, 2020). *P. vulgata* se alimenta de macroalgas adheridas a las rocas de las costas marítimas (Schaal & Grall, 2015) tales como *Ascophyllum nodosum*, de la que extrae un gran beneficio nutritivo (Lorenzen, 2007) y distintas especies de *Ulva* (Figura 2). Para ello, su sistema digestivo secreta enzimas como la celulasa, la amilasa o la β -glucuronidasa, que son eficaces frente a las paredes celulares vegetales (Combie *et al.*, 1982; Murty *et al.*, 2013).



Figura 2. Imagen representativa del consumo de la macroalga *Ulva sp.* por *Patella vulgata* (Lorenzen, 2007).

1.4. Objetivos

De todo lo anteriormente expuesto, se deduce que con objeto de extender el uso de macroalgas como *Ulva* en piensos para acuicultura es preciso desarrollar procesos biotecnológicos no agresivos, fundamentalmente basados en el uso de enzimas, que permitan hidrolizar parcialmente la compleja matriz de polisacáridos presente en dichas especies, con objeto de incrementar la bioaccesibilidad de

sus nutrientes sin influir negativamente en su contenido en compuestos bioactivos. Por ello, en el presente trabajo se plantea el objetivo de:

Incrementar la biodisponibilidad de nutrientes procedentes de la macroalga verde *Ulva ohnoi* mediante un pretratamiento enzimático, con el fin de ser aplicada en piensos para la acuicultura.

Para llevar a cabo esta función se abordan dos objetivos específicos:

1. Evaluación comparada del efecto de dos preparados enzimáticos, una mezcla comercial y un extracto de glándula digestiva de *P. vulgata*, sobre la hidrólisis de polisacáridos presentes en la macroalga. Esta evaluación se llevará a cabo empleando un diseño multifactorial que valorará el efecto sobre la respuesta de hidrólisis de diferentes factores tales como la humedad de la mezcla, el tiempo de hidrólisis y la cantidad de enzima empleada.
2. Basándose en los resultados de dicho experimento, se utilizará el preparado enzimático más adecuado para realizar un tratamiento de la macroalga y se evaluará su efecto sobre la biodisponibilidad digestiva potencial de nutrientes (carbohidratos) y compuestos bioactivos al ser consumida por un pez omnívoro (dorada, *Sparus aurata*) y otro herbívoro (mújol, *Mugil cephalus*), empleando para ello un sistema de simulación *in vitro* de la digestión de ambas especies.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Obtención y preparación de la macroalga

La biomasa de *Ulva ohnoi* utilizada en el presente estudio ha sido cultivada en tanques externos de las instalaciones del Centro Tecnológico de la Acuicultura (CTAQUA). Tras un lavado con agua dulce, la biomasa se secó hasta alcanzar un contenido en humedad de aproximadamente el 15% mediante un secador solar. Una vez recepcionada en laboratorio, la biomasa fue sometida a un secado adicional en estufa durante 24 h a 60°C y posteriormente picada finamente usando una trituradora doméstica hasta conseguir un polvo fino (Figura 3) que se utilizó en los diferentes experimentos.



Figura 3. *Ulva ohnoi* antes y después del procesado.

2.2. Experimento 1. Evaluación comparada del efecto de dos preparados enzimáticos, una mezcla comercial y un extracto de glándula digestiva de *Patella vulgata*, sobre la hidrólisis de polisacáridos presentes en la macroalga

*2.2.1. Obtención y preparación del extracto de *P. vulgata* (EPV)*

Se recolectaron ejemplares de *P. vulgata* en la costa este de Almería que fueron almacenados en agua de mar a baja temperatura para su traslado al laboratorio. Los moluscos se diseccionaron para extraer las glándulas digestivas las cuales se homogenizaron (1:2 p/v) en buffer acetato sódico (100 mM, pH 6,5). El extracto se centrifugó posteriormente (12.000 x g, 4 °C, 20 min) para recolectar el sobrenadante, el cual se dosificó en alícuotas que fueron congeladas a -20 °C para su posterior utilización.

2.2.2. Descripción del preparado comercial (MEC)

Se utilizó el preparado enzimático comercial Rovabio Excel® (Adisseo, Francia), formado por un conjunto de enzimas fibrolíticas obtenidas a partir del hongo filamentoso *Talaromyces versatilis*. Entre ellas se encuentran enzimas con actividad xilanasa, β -glucanasa, celulasa, arabinofuranosidasa, pectinasa, proteasa y mananasa que permiten la degradación de PNAs y la liberación de otros compuestos de carácter nutritivo procedentes de materias primas vegetales.

2.2.3. Medidas de actividad enzimática en ambos productos enzimáticos

Se midieron las actividades de xilanasa, β -1,3-glucanasa y β -1,4-glucanasa en los dos complejos enzimáticos con objeto de poder equiparar los tratamientos a realizar con los mismos adaptando las cantidades a emplear de cada uno de ellos. Para la determinación de la actividad xilanasa se empleó como sustrato una solución de xilano, para β -1,3-glucanasa una solución de laminarina y para β -1,4-glucanasa el sustrato empleado fue carboximetilcelulosa; en todos los casos las soluciones se prepararon al 1% p/v. Tras la incubación de los extractos enzimáticos durante 90 min a 37 °C se midieron en cada caso los monosacáridos liberados mediante el método de Miller (1959) usando el ácido dinitrosalicílico (DNS). Este método consiste en que, en presencia de calor, el DNS es capaz de reaccionar con los grupos carbonilos (C=O) de los azúcares reductores, reduciéndose y dando lugar a un cambio de color que podrá ser medido por espectrofotometría. La disolución en este caso aparecerá desde un color amarillo (si la concentración de azúcares es baja) hasta un color marrón intenso (si la concentración de azúcares es alta). Finalmente, la coloración será medida a 540 nm.

Para cada enzima se construyeron rectas patrón empleando diferentes concentraciones (con xilosa para xilanasa y con glucosa para las glucanasas) que permitían obtener el valor de concentración de monosacárido liberado de las muestras. Una unidad de actividad se definió como 1 micromol de azúcar liberado por min.

2.2.4. Tratamiento enzimático y diseño factorial

Una vez caracterizados los productos enzimáticos a utilizar, se planteó el principal objetivo del experimento; optimizar sus condiciones de aplicación sobre la biomasa de *Ulva* con objeto de comprobar su capacidad de hidrolizar los polisacáridos del alga. Para llevar a cabo el tratamiento de manera lo más equivalente posible, una vez medidas las 3 actividades enzimáticas antes indicadas se ajustaron las cantidades de ambos extractos usando como referencia la actividad de xilanasa. La

aplicación de los productos enzimáticos se realizó utilizando la metodología de Hidrólisis en Estado Sólido (SSH o *Solid State Hydrolysis* por sus siglas en inglés). Los diferentes factores considerados para realizar esta SSH se contemplaron dentro de un diseño en superficie de respuesta del tipo Box-Behnken que consideró un factor categórico y 3 factores continuos:

Factor categórico > Tipo de compuesto enzimático; comercial/ extracto de *P. vulgata*.

Factores continuos > Estos factores se evalúan siempre en un rango definido por 3 valores; máximo, mínimo e intermedio.

- *Humedad*. Las condiciones de humedad utilizadas para la hidrólisis de macroalga estarán en el intervalo de 50-70%. Para alcanzar esta humedad se empleará buffer citrato (100 mM, pH 5,0).
- *Tiempo*. Los tiempos de hidrólisis se situaron en el rango de 6 a 24 horas.
- *Dosis*. Se utilizó como referencia para el valor intermedio del rango a evaluar la dosis comercial de Rovabio Excel[®] empleada para el tratamiento de ingredientes vegetales terrestres. Dado que las actividades relativas de xilanasas y glucanasas presentes en el extracto de *P. vulgata* eran diferentes a las del preparado comercial, se calcularon las dosis con objeto de igualar las unidades de xilanasas aportadas por ambos. De este modo el rango establecido fue de 0,25 a 0,95 U/g materia seca.

Las unidades de ensayo fueron pequeños contenedores de 50 cc de capacidad donde se dosificaban 3 g de harina de *Ulva* mezclada con distintos volúmenes de tampón citrato (0,1 M, pH 5,0) para alcanzar el % de humedad requerido. Las enzimas fueron administradas por pulverización fina sobre la harina previa disolución en una cantidad adecuada del mismo tampón citrato. A partir de aquí, los contenedores fueron ubicados en una cámara de incubación mantenida a 45°C y mantenidos en la misma los tiempos correspondientes a cada grupo. Las mezclas fueron removidas regularmente cada 2 h para garantizar que la hidrólisis se extendía por toda la mezcla dando así un resultado óptimo. Una vez finalizado el tiempo de incubación de cada lote de muestras, estas eran almacenadas a -20°C para detener cualquier proceso enzimático y sólo fueron descongeladas para llevar a cabo los procesos de extracción requeridos para la determinación de productos de hidrólisis. En total se utilizaron 60 contenedores para evaluar todas las combinaciones de valores de los factores indicados.

2.2.5. Medida de los productos de hidrólisis y de capacidad antioxidante

La hidrólisis efectuada por los dos tipos de preparados enzimáticos sobre los polisacáridos de *Ulva* se evaluó midiendo los productos finales; los azúcares reductores se cuantificaron mediante el método del DNS antes indicado, y las pentosas por el método del fluoroglucinol (Douglas, 1981). El método consiste en exponer a las muestras al reactivo fluoroglucinol que junto con una alta temperatura permitirá a las pentosas presentes en el medio reaccionar específicamente convirtiéndolas en el compuesto llamado furfural. Este químico reacciona con el grupo fenol del fluoroglucinol dando lugar a una mezcla coloreada medible espectrofotométricamente a 540 nm. Los aminoácidos liberados por hidrólisis se cuantificaron mediante el reactivo ortoftalaldehído (OPA) (Church *et al.*, 1983), el cual en presencia de DL-Dithiothreitol (DTT) reacciona con los grupos α -amino liberados en la hidrólisis

enzimática dando lugar a un complejo que absorbe fuertemente a una longitud de onda de 340 nm. A partir de una recta patrón de L-serina a 50 mg/250 mL realizada se extrapolan los datos para conocer la concentración de las muestras analizadas.

Para determinar la capacidad antioxidante específica total (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity TEAC) de las muestras hidrolizadas enzimáticamente se utilizó el método del radical libre 2,3-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), descrito por Brand-Williams *et al.* (1995) en el que los compuestos antioxidantes del medio reaccionan con el radical libre DPPH cediéndole un protón. Finalmente, el resultado de la reacción se mide espectrofotométricamente a una absorbancia de 515 nm, permitiendo así la cuantificación de la cantidad de compuestos antioxidantes que permanecen después de la exposición de la macroalga a la acción de las enzimas. Para la equivalencia entre los valores de absorbancia y concentración se realiza una recta patrón de Trolox al 0,01% en etanol.

2.3. Experimento 2. Uso de modelos de simulación digestiva de dos especies de peces para evaluar el efecto de un pretratamiento sobre la biodisponibilidad de nutrientes en *Ulva*

El objetivo del experimento era evaluar en qué medida la hidrólisis parcial de la harina de *Ulva* mediante un pretratamiento enzimático se vería reflejada en diferencias en la biodisponibilidad potencial de nutrientes (proteína y carbohidratos) a nivel digestivo, y de igual modo, cómo afectaría la combinación de dicho tratamiento y la acción digestiva a la presencia de compuestos con capacidad antioxidante. Los ensayos se plantearon simulando las condiciones del digestivo de dos especies de peces marinos con distinto hábito alimenticio y por tanto la harina de *Ulva* se incluyó en piensos formulados con distintos ingredientes. Para los ensayos se utilizaron fórmulas simplificadas que sólo contenían los principales ingredientes proteicos, pero no los aceites, micronutrientes ni ingredientes tecnológicos (aglomerantes, saborizantes, etc.).

2.3.1. Tratamiento del alga y piensos elaborados

El tratamiento enzimático de la harina de alga que fue utilizada en las fórmulas se llevó a cabo con la enzima que ofreció mejores resultados en el experimento anterior y utilizando igualmente las condiciones optimizadas mediante el diseño factorial en superficie de respuesta. Una vez concluido el tratamiento enzimático, la macroalga se mezcló en una proporción del 10% en peso con el resto de los ingredientes utilizados en las fórmulas que se detallan en la Tabla 1. Todos los ingredientes se molieron finamente hasta un tamaño de partícula < 0.5 mm, se mezclaron y se utilizaron para los ensayos de digestión *in vitro*.

Tabla 1. Resumen de los tipos y de la cantidad de ingredientes añadidos (g/100 g) para los piensos utilizados en la simulación digestiva de dorada y mújol.

Ingredientes	P. Control		P. con <i>Ulva</i> sin tratar		P. con <i>Ulva</i> con tratamiento	
	DORADA	MÚJOL	DORADA	MÚJOL	DORARA	MÚJOL
Pescado 67/10/15	25,0	10,0	25,0	10,0	25,0	10,0
Harina de soja 47	13,3	15,0	13,1	15,0	13,1	15,0
Harina de <i>Ulva</i>	0,0	0,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Concentrado de proteína de soja	10,0	22,6	10,0	20,6	10,0	20,6
Harina de guar	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Salvado de arroz desengrasado	8,0	15,0	0,0	15,0	0,0	15,0
Gluten de maíz 60%	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0

2.3.2. Ensayos de simulación digestiva *in vitro*

Los extractos enzimáticos que se han utilizado durante el presente ensayo se obtuvieron a partir de paquetes digestivos procedentes de ejemplares de *Sparus aurata* y *Mugil cephalus*. En el primer caso, se utilizaron extractos de las dos secciones del digestivo (estómago e intestino proximal) y en el segundo caso se utilizó únicamente extracto intestinal. En este caso, para mújol se utilizaron los paquetes digestivos de varios ejemplares adultos de *M. cephalus* de unos 3 kg. Se prepararon extractos de estómago e intestino proximal y se procedió a medir el pH y determinar la actividad de proteasas totales (ácida/alcalina) según los métodos de Anson (1938) y Walter (1984) usando hemoglobina y caseína como sustratos respectivamente. Como se comprobó la muy escasa actividad en el estómago se decidió limitar la simulación a la digestión intestinal. Por otro lado, para el extracto enzimático de dorada se emplearon digestivos obtenidos de 5 de ejemplares *S. aurata* de unos 350 g de peso medio. Se procedió a realizar el mismo procedimiento experimental anterior para determinar la actividad de proteasas totales.

Para realizar esta simulación digestiva se emplea el sistema de biorreactores desarrollado por el Grupo «Modelización Digestiva» de la UAL que permiten imitar las hidrólisis enzimáticas que se llevan a cabo en el sistema digestivo de un pez. Dichos biorreactores están provistos de dos cámaras separadas con una membrana de diálisis de MWCO 3500 Da. En la cámara de arriba se introducen una cantidad de pienso y de extracto enzimático suficiente que permita obtener la relación enzima/sustrato necesaria para la digestión y la cámara inferior está conectada a una solución tamponada y atemperada que permite la retirada de los productos de dicha hidrólisis. El sistema además debe de mantenerse a un pH adecuado al compartimento digestivo que se simula y en agitación constante a 25°C. Finalmente, se retirará un volumen de muestra 15 ml que serán destinados a los distintos procesos analíticos deseados. Las condiciones impuestas durante este procedimiento se resumen en la Tabla 2 y son aplicadas para cada pienso experimental.

Tabla 2. Resumen de las distintas condiciones impuestas durante la simulación digestiva *in vitro*.

Extracto enzimático	Etapas digestivas	Cantidad de pienso	Cantidad de extracto enzimático	Tiempo requerido en cada etapa	pH establecido
Extracto de dorada	Estomacal (Ácida)	600 mg	90 mg	1 hora	4-4,5
	Intestinal (alcalina)		35 mg	4 horas	8-8,5
Extracto de mújol	Intestinal (alcalina)		4 ml	4 horas	8-8,5

Tras la recogida de muestras estas fueron analizadas para evaluar la liberación de azúcares reductores y capacidad antioxidante. Los azúcares reductores totales se analizaron por el método de Miller descrito anteriormente. Igualmente, la capacidad antioxidante de las muestras resultantes se midió mediante el método del radical libre 2,3-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) (Brand-Williams *et al.*, 1995)

descrito previamente. Las muestras utilizadas para dichas medidas fueron, en el caso de la digestión con dorada, una toma de una hora de etapa ácida, una tras 4 horas de digestión alcalina y una muestra de la solución restante final procedente de la cámara de arriba del biorreactor. En el caso de la digestión con mújol se usaron muestras obtenidas tras la digestión alcalina y de la cámara de arriba.

2.4. Tratamiento estadístico de los datos.

Para el diseño y evaluación posterior de los datos del experimento 1, tal y como se indicó anteriormente se construyó un diseño factorial Box-Behnken de tres niveles con dos réplicas usando el software Minitab 17 (Minitab Inc., State College, PA). El resultado fue un diseño centrado en la cara de un bloque ($\alpha = 1$) para los tres factores numéricos y uno categórico (tipos de extracto enzimático). Las combinaciones de los valores de las variables (codificados y no codificados) se detallan en la Tabla 3:

Tabla 3. Combinaciones de los valores de cada uno de los factores numéricos y categórico.

Número de combinaciones	DOSIS (μ l)	TIEMPO (h)	HUMEDAD (%)	TIPO DE ENZIMA
1	30,0	24	70	MEC
2	44,2	15	60	EPV
3	44,2	6	50	EPV
4	44,2	15	60	EPV
5	44,2	6	70	EPV
6	48,0	15	70	MEC
7	30,0	6	50	MEC
8	17,7	6	60	EPV
9	30,0	15	60	MEC
10	12,0	15	50	MEC
11	30,0	24	50	MEC
12	17,7	15	50	EPV
13	70,6	6	60	EPV
14	30,0	15	60	MEC
15	70,6	24	60	EPV
16	30,0	6	70	MEC
17	12,0	24	60	MEC
18	48,0	6	60	MEC
19	12,0	6	60	MEC
20	44,2	24	70	EPV
21	17,7	24	60	EPV
22	12,0	15	70	MEC
23	17,7	15	70	EPV
24	44,2	24	50	EPV
25	48,0	15	50	MEC
26	70,6	15	70	EPV

27	44,2	15	60	EPV
28	70,6	15	50	EPV
29	48,0	24	60	MEC
30	30,0	15	60	MEC
31	44,2	6	50	EPV
32	12,0	6	60	MEC
33	12,0	15	70	MEC
34	12,0	15	50	MEC
35	70,6	15	70	EPV
36	48,0	15	70	MEC
37	70,6	24	60	EPV
38	48,0	15	50	MEC
39	70,6	6	60	EPV
40	30,0	24	70	MEC
41	30,0	6	70	MEC
42	30,0	15	60	MEC
43	48,0	6	60	MEC
44	44,2	24	50	EPV
45	30,0	15	60	MEC
46	44,2	24	70	EPV
47	30,0	6	50	MEC
48	17,7	24	60	EPV
49	17,7	6	60	EPV
50	17,7	15	50	EPV
51	12,0	24	60	MEC
52	17,7	15	70	EPV
53	44,2	15	60	EPV
54	44,2	15	60	EPV
55	30,0	15	60	MEC
56	30,0	24	50	MEC
57	70,6	15	50	EPV
58	44,2	6	70	EPV
59	44,2	15	60	EPV
60	48,0	24	60	MEC

El cálculo de los mínimos cuadrados ortogonales realizado sobre los datos del diseño factorial se utilizó para obtener ecuaciones empíricas que describían las diferentes variables de respuesta evaluadas (azúcares reductores, aminoácidos, pentosas y capacidad antioxidante). La forma general de las ecuaciones polinomiales es:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i X_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j=1}^3 b_{ij} X_i X_j$$

donde Y es la variable de respuesta, b_0 , b_i , b_{ii} y b_{ij} son los coeficientes de intersección, lineal, cuadrático y de interacción, respectivamente; y X_i y X_j son las variables independientes (los factores numéricos considerados en el modelo). Se utilizó un ANOVA de una vía para evaluar la significancia estadística de los coeficientes de regresión y se determinaron el coeficiente de determinación R^2 y R^2 ajustado para el modelo generado. La falta de ajuste del modelo se midió utilizando un valor de $p < 0,05$. Una vez que se determinó el modelo de regresión ajustado, se obtuvieron gráficos de superficie de respuesta manteniendo constante cada factor en un punto central, mientras que los otros dos factores variaban dentro del rango experimental.

Los datos del resto de experimentos se evaluaron mediante ANOVA de una o dos vías, seguido de una prueba LSD de Fisher a un nivel de confianza del 95%.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Experimento 1. Evaluación comparada del efecto de dos preparados enzimáticos, una mezcla comercial y un extracto de glándula digestiva de *Patella vulgata*, sobre la hidrólisis de polisacáridos presentes en la macroalga

3.1.1. Caracterización de las actividades enzimáticas de los preparados

Las actividades de las 3 carbohidrasas evaluadas tanto en el preparado enzimático comercial como en el extracto de *P. vulgata* se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Valores de actividad enzimática expresados en $\mu\text{mol/ml}$. Las siglas MEC hacen referencia al extracto enzimático comercial, mientras que EPV se refiere al extracto enzimático de *Patella vulgata*. Valores en una columna que no comparten la misma letra difieren significativamente con $p < 0,05$.

	xilanasa	β -1,3-glucanasa	β -1,4-glucanasa
MEC	50,83 \pm 3,29 ^A	69,48 \pm 1,77 ^A	32,14 \pm 2,45 ^A
EPV	33,62 \pm 3,43 ^B	36,09 \pm 1,91 ^B	8,18 \pm 0,30 ^B

Los resultados expuestos en la tabla anterior muestran que la actividad xilanasa medida en MEC es significativamente mayor que la que presenta EPV, ya que existe un aumento significativo de la concentración de compuestos hidrolizados por MEC respecto de la que se da en EPV. Lo mismo ocurre en el caso de las actividades enzimáticas β -1,3-glucanasa y β -1,4-glucanasa, donde se da un aumento significativo de la concentración de monómeros liberados por la acción hidrolítica de MEC, siendo esta última significativamente mayor que la que ofrecen las actividades glucanasas de la enzima digestiva de *Patella vulgata*.

3.1.2. Optimización de las condiciones de hidrólisis enzimática mediante modelo factorial de superficie de respuesta

En primer lugar, cabe señalar que a pesar de la normalización de las dosis enzimáticas en función de la actividad xilanasa presente en ambos extractos enzimáticos, la hidrólisis llevada a cabo con MEC resultó más eficaz que la realizada con EPV. Esto pudo ser debido a dos causas: a) que pese a la mencionada normalización, el resto de actividades implicadas en la hidrólisis de carbohidratos no alcanzó niveles equivalentes (tal como se puede ver en la Tabla 4) o b) la presencia de otras enzimas adicionales en MEC cuya actividad no fue evaluada y que pudieron contribuir a una hidrólisis más eficiente de los polisacáridos presentes en la macroalga.

Los resultados del experimento factorial se detallan a continuación. En todos los casos, la evaluación del efecto de los distintos factores siempre arroja un primer modelo que permite evaluar qué factores o interacciones resultan significativos y cuáles no. A partir de aquí, se procede a un refinado del modelo por simplificación, manteniendo en el mismo únicamente los factores e interacciones significativas. Se incluye como ejemplo esta secuencia para el análisis del efecto de los factores analizados sobre la liberación de azúcares producida por el EPV:

Modelo general sin refinar:

Regresión de superficie de respuesta: Azúcares vs. DOSIS (µl); TIEMPO (h); HUMEDAD (%)

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	9	0,073702	0,008189	9,69	0,000
Lineal	3	0,057684	0,019228	22,75	0,000
DOSIS (µl)	1	0,001878	0,001878	2,22	0,152
TIEMPO (h)	1	0,001318	0,001318	1,56	0,226
HUMEDAD (%)	1	0,054488	0,054488	64,45	0,000
Cuadrado	3	0,014152	0,004717	5,58	0,006
DOSIS (µl)*DOSIS (µl)	1	0,000026	0,000026	0,03	0,863
TIEMPO (h)*TIEMPO (h)	1	0,001239	0,001239	1,47	0,240
HUMEDAD (%) * HUMEDAD (%)	1	0,013424	0,013424	15,88	0,001
Interacción de 2 factores	3	0,001869	0,000623	0,74	0,542
DOSIS (µl)*TIEMPO (h)	1	0,001010	0,001010	1,20	0,287
DOSIS (µl)*HUMEDAD (%)	1	0,000136	0,000136	0,16	0,693
TIEMPO (h)*HUMEDAD (%)	1	0,000723	0,000723	0,85	0,366
Error	20	0,016907	0,000845		
Falta de ajuste	3	0,002717	0,000906	1,09	0,382
Error puro	17	0,014190	0,000835		
Total	29	0,090609			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,0290751	81,34%	72,94%	55,01%

Coefficientes codificados

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	0,0303	0,0119	2,56	0,019	
DOSIS (µl)	0,01083	0,00727	1,49	0,152	1,00

TIEMPO (h)	-0,00908	0,00727	-1,25	0,226	1,00
HUMEDAD (%)	0,05836	0,00727	8,03	0,000	1,00
DOSIS (µl)*DOSIS (µl)	0,0019	0,0107	0,18	0,863	1,01
TIEMPO (h)*TIEMPO (h)	0,0130	0,0107	1,21	0,240	1,01
HUMEDAD (%)*HUMEDAD (%)	0,0426	0,0107	3,98	0,001	1,01
DOSIS (µl)*TIEMPO (h)	-0,0112	0,0103	-1,09	0,287	1,00
DOSIS (µl)*HUMEDAD (%)	-0,0041	0,0103	-0,40	0,693	1,00
TIEMPO (h)*HUMEDAD (%)	-0,0095	0,0103	-0,92	0,366	1,00

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

$$\begin{aligned} \text{Azúcares} = & 1,086 + 0,00182 \text{ DOSIS } (\mu\text{l}) + 0,00261 \text{ TIEMPO (h)} - 0,0431 \text{ HUMEDAD } (\%) \\ & + 0,000003 \text{ DOSIS } (\mu\text{l}) * \text{DOSIS } (\mu\text{l}) + 0,000160 \text{ TIEMPO (h)} * \text{TIEMPO (h)} \\ & + 0,000426 \text{ HUMEDAD } (\%) * \text{HUMEDAD } (\%) - 0,000047 \text{ DOSIS } (\mu\text{l}) * \text{TIEMPO (h)} \\ & - 0,000016 \text{ DOSIS } (\mu\text{l}) * \text{HUMEDAD } (\%) - 0,000106 \text{ TIEMPO (h)} * \text{HUMEDAD } (\%) \end{aligned}$$

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	Azúcares	Ajuste	Resid	est.	
4	0,2354	0,1629	0,0725	3,15	R
13	0,0893	0,1399	-0,0506	-2,20	R

Residuo grande R

Como se puede comprobar, de todos los factores evaluados en este caso únicamente la humedad ejerce un efecto significativo sobre la liberación de azúcares al utilizar el EPV, y además lo hace siguiendo una relación lineal, pero también cuadrática. Esto último indica que dentro del rango evaluado existirá una curva que presentará un valor máximo. En cualquier caso, el modelo se puede simplificar entonces de manera muy notable, eliminando todos los factores e interacciones no significativas y manteniendo únicamente los términos correspondientes a la humedad.

Modelo simplificado:

Regresión de superficie de respuesta: Azúcares vs. HUMEDAD (%)

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	2	0,067389	0,033695	39,18	0,000
Lineal	1	0,054481	0,054481	63,35	0,000
HUMEDAD (%)	1	0,054481	0,054481	63,35	0,000
Cuadrado	1	0,012909	0,012909	15,01	0,001
HUMEDAD (%) * HUMEDAD (%)	1	0,012909	0,012909	15,01	0,001
Error	27	0,023220	0,000860		
Falta de ajuste	10	0,009030	0,000903	1,08	0,426
Error puro	17	0,014190	0,000835		
Total	29	0,090609			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,0293255	74,37%	72,48%	67,67%

Coefficientes codificados

EE del Término	Coef	coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	0,03882	0,00784	4,95	0,000	
HUMEDAD (%)	0,05835	0,00733	7,96	0,000	1,00
HUMEDAD (%) * HUMEDAD (%)	0,0416	0,0107	3,87	0,001	1,00

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

$$\text{Azúcares} = 1,186 - 0,0441 \text{ HUMEDAD } (\%) + 0,000416 \text{ HUMEDAD } (\%) * \text{HUMEDAD } (\%)$$

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	Azúcares	Ajuste	Resid	Resid	
			est.	est.	
4	0,23537	0,13875	0,09661	3,52	R

Residuo grande R

De esta forma, el modelo determina una ecuación mucho más sencilla que establece que la liberación de azúcares por acción de EPV depende únicamente del contenido en humedad de la mezcla, según la ecuación señalada y con un ajuste razonable del 74,4%. Haciendo este mismo procedimiento para todas las variables evaluadas y para los dos tipos de productos enzimáticos EPV y MEC se obtuvieron los resultados que se resumen en las Tablas 5 y 6 y las Figuras 4 a 7. El detalle de todos los modelos originales generados, así como las sucesivas simplificaciones se incluyen como Anexo I. Tal como se detalla en las Tablas 4 y 5 además de las distintas respuestas lineales generadas por los distintos factores impuestos en el modelo, también se detallan interacciones entre factores o respuestas cuadráticas que se deben tener en cuenta a la hora de predecir un proceso hidrolítico óptimo.

En la optimización del modelo influye en gran medida la capacidad que se tenga de ajustar dichos factores descritos. Es por ello por lo que se debe de intentar predecir el ajuste del modelo en función de los factores que influyen significativamente. En primer lugar, durante la hidrólisis de *Ulva ohnoi* con la enzima de *Patella*, se observa que el ajuste para los compuestos bioactivos daría un valor de R² de 40,36%, lo que indica que la capacidad del modelo para predecir el efecto de la hidrólisis sobre dicho parámetro no es muy alta. Por otro lado, los valores de R² obtenidos en el caso de los parámetros nutricionales son 74,37, 85,76 y 92,85% para azúcares, pentosas y aminoácidos respectivamente. Estos valores indican una buena capacidad de predecir la liberación de tales compuestos en función de los factores considerados. Algo distinto ocurre en los resultados obtenidos para el extracto comercial (MEC), que se exponen en la Tabla 5. Como se puede observar, en el caso de la TEAC, se ha obtenido un R² elevado (80,21%) que indica una alta capacidad de predicción del efecto de los factores sobre este parámetro. En la misma línea, la capacidad de predicción del modelo también es elevada para la liberación de pentosas (93,52%) y aminoácidos (93,87%). Sin embargo, no se puede decir lo mismo para el caso de los azúcares. El proceso de hidrólisis de dicho parámetro nutricional no puede ser ajustado óptimamente de acuerdo con los rangos establecidos en este experimento.

Tabla 5. Resumen de los resultados obtenidos en el modelo factorial de superficie de respuesta con el extracto de *Patella vulgata* (EPV).

Parámetros nutricionales	Factor lineal	Factor cuadrático	Interacción entre 2 factores	Ajuste R-cuadrado	Ecuación de regresión
Antioxidantes	Tiempo y humedad			40,36%	TEAC (μM)/100mg alga seca = -10,41 - 0,471 TIEMPO (h) + 0,391 HUMEDAD (%)
Azúcares	Humedad	Humedad*humedad		74,37%	Azúcares = 1,186 - 0,0441 HUMEDAD (%) + 0,000416 HUMEDAD (%) * HUMEDAD (%)
Pentosas	Tiempo y humedad	Humedad*humedad		85,76 %	Pentosas = 0,334 + 0,003428 TIEMPO (h) - 0,0182 HUMEDAD (%) + 0,000219 HUMEDAD (%) * HUMEDAD (%)
Aminoácidos	Humedad	Humedad*humedad		92,85 %	Aa totales = 0,552 - 0,0320 HUMEDAD (%) + 0,000431 HUMEDAD (%) * HUMEDAD (%)

Tabla 6. Resumen de los resultados obtenidos en el modelo factorial de superficie de respuesta con el extracto comercial (MEC).

Parámetros nutricionales	Factor lineal	Factor cuadrático	Interacción entre 2 factores	Ajuste R-cuadrado	Ecuación de regresión
Antioxidantes	Tiempo y humedad		Tiempo *humedad	80,21 %	TEAC (μ M)/100mg alga seca = -75,6 + 3,31 TIEMPO (h) + 1,692 HUMEDAD (%) - 0,0712 TIEMPO (h)*HUMEDAD (%)
Azúcares	Humedad			52,97 %	Azúcares = -0,2810 + 0,00697 HUMEDAD (%)
Pentosas	Dosis, tiempo y humedad	Humedad*humedad	Tiempo*humedad	93,52 %	Pentosas = 1,511 + 0,002346 DOSIS (μ l) - 0,0204 TIEMPO (h) - 0,0557 HUMEDAD (%) + 0,000558 HUMEDAD (%) * HUMEDAD (%) + 0,000458 TIEMPO (h) * HUMEDAD (%)
Aminoácidos	Dosis y humedad	Humedad*humedad		93,87 %	Aa totales = 0,542 + 0,001241 DOSIS (μ l) - 0,0319 HUMEDAD (%) + 0,000422 HUMEDAD (%) * HUMEDAD (%)

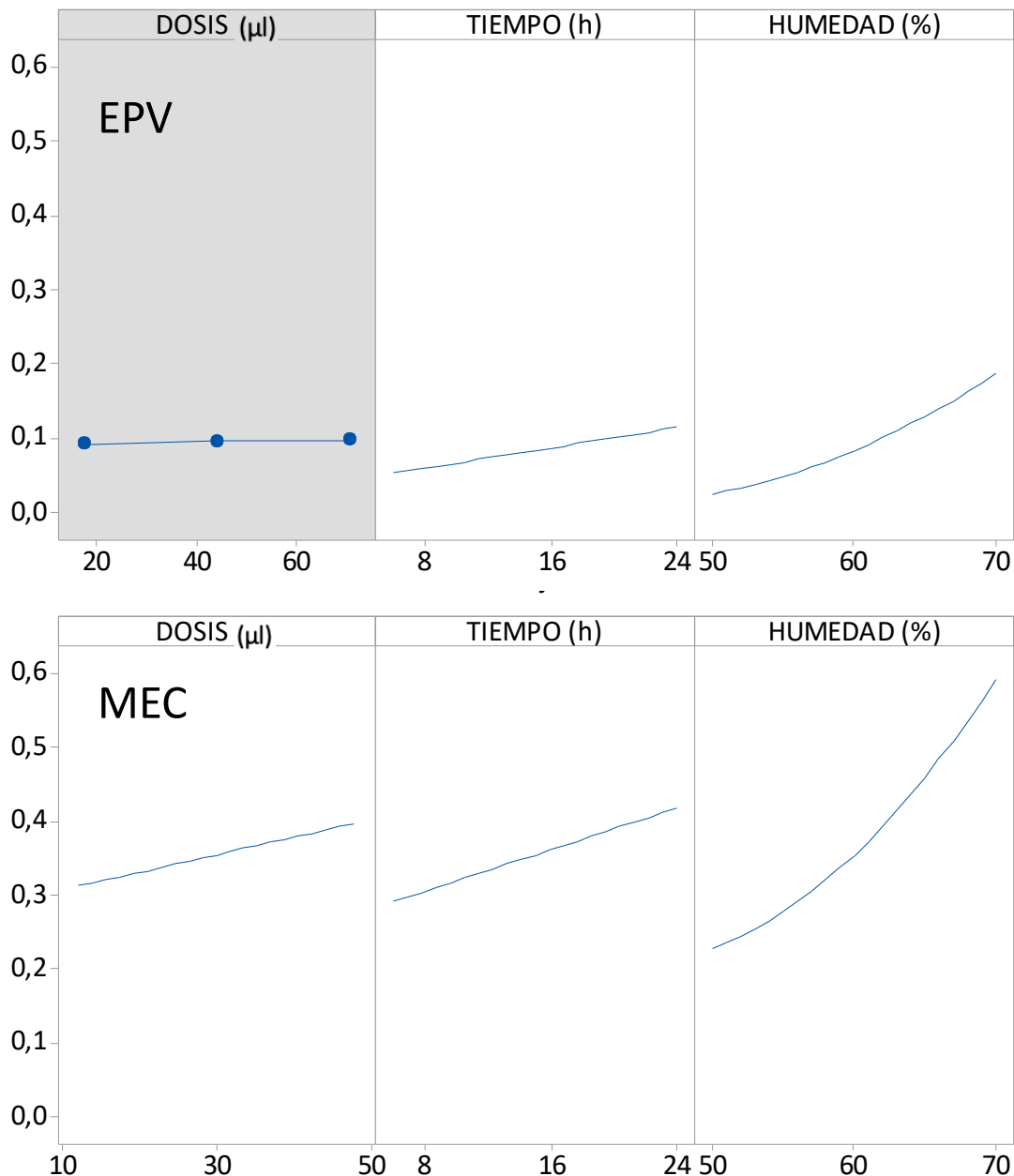


Figura 4. Gráficas de efectos principales sobre la liberación de pentosas (mg/100 mg) tras la acción de los dos preparados enzimáticos sobre la harina de *Ulva*. Los factores sin efecto significativo en el rango evaluado aparecen con fondo gris.

Para la hidrólisis de polisacáridos que liberan pentosas los factores que influyen fueron diferentes para ambos tipos de enzimas; dosis, tiempo y humedad al emplear MEC y sólo tiempo y humedad al emplear EPV. En este último caso se comprobó un efecto muy reducido (menos de 1/3 de la cantidad liberada al usar EPV), lo que sería indicativo de la presencia de una menor cantidad de enzimas específicas para hidrolizar los polisacáridos del alga en el extracto de lapa. El efecto del tiempo y la humedad se corresponde con lo esperado, de modo que se obtuvieron mayores valores de liberación al aumentar ambos factores, aunque en el caso de la humedad el efecto resultó mucho más significativo ya que mostró una tendencia exponencial, en tanto que el efecto del tiempo fue lineal.

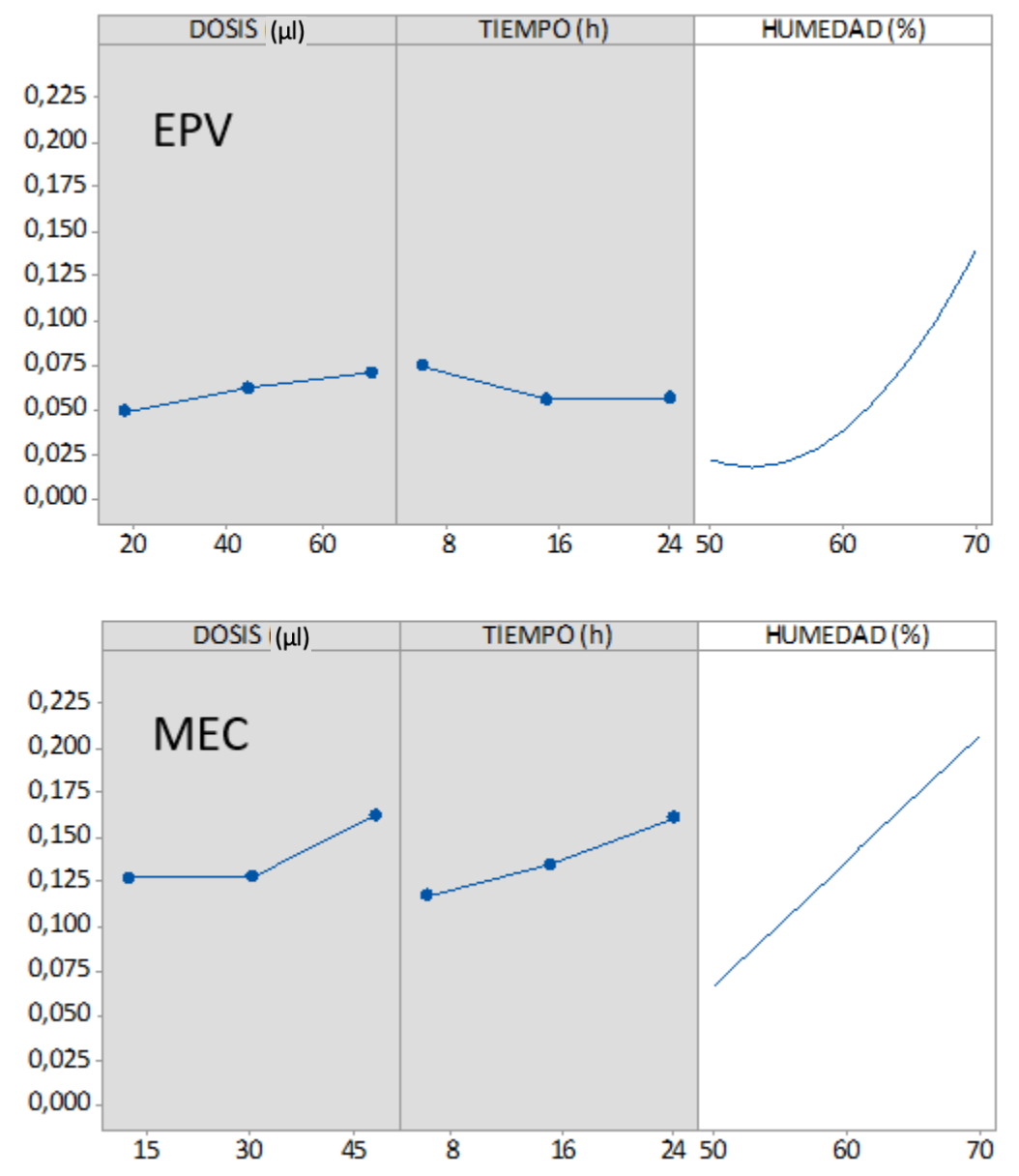


Figura 5. Gráficas de efectos principales sobre la liberación de azúcares reductores (mg/100 mg) tras la acción de los dos preparados enzimáticos sobre la harina de *Ulva*. Los factores sin efecto significativo en el rango evaluado aparecen con fondo gris.

Para la hidrólisis de polisacáridos que liberan azúcares reductores los resultados obtenidos con los dos tipos de enzimas fueron también diferentes. Sólo el efecto de la humedad resultó significativo, pero según un modelo lineal en el caso del MEC y exponencial para EPV. Cabe señalar que, aunque los efectos de la dosis y el tiempo no resultaron significativos para ninguno de los dos preparados enzimáticos, en este caso la hidrólisis llevada a cabo por MEC liberó una cantidad significativamente mayor de azúcares. Esto confirmaría la presencia de actividades enzimáticas claramente diferentes en ambos preparados.

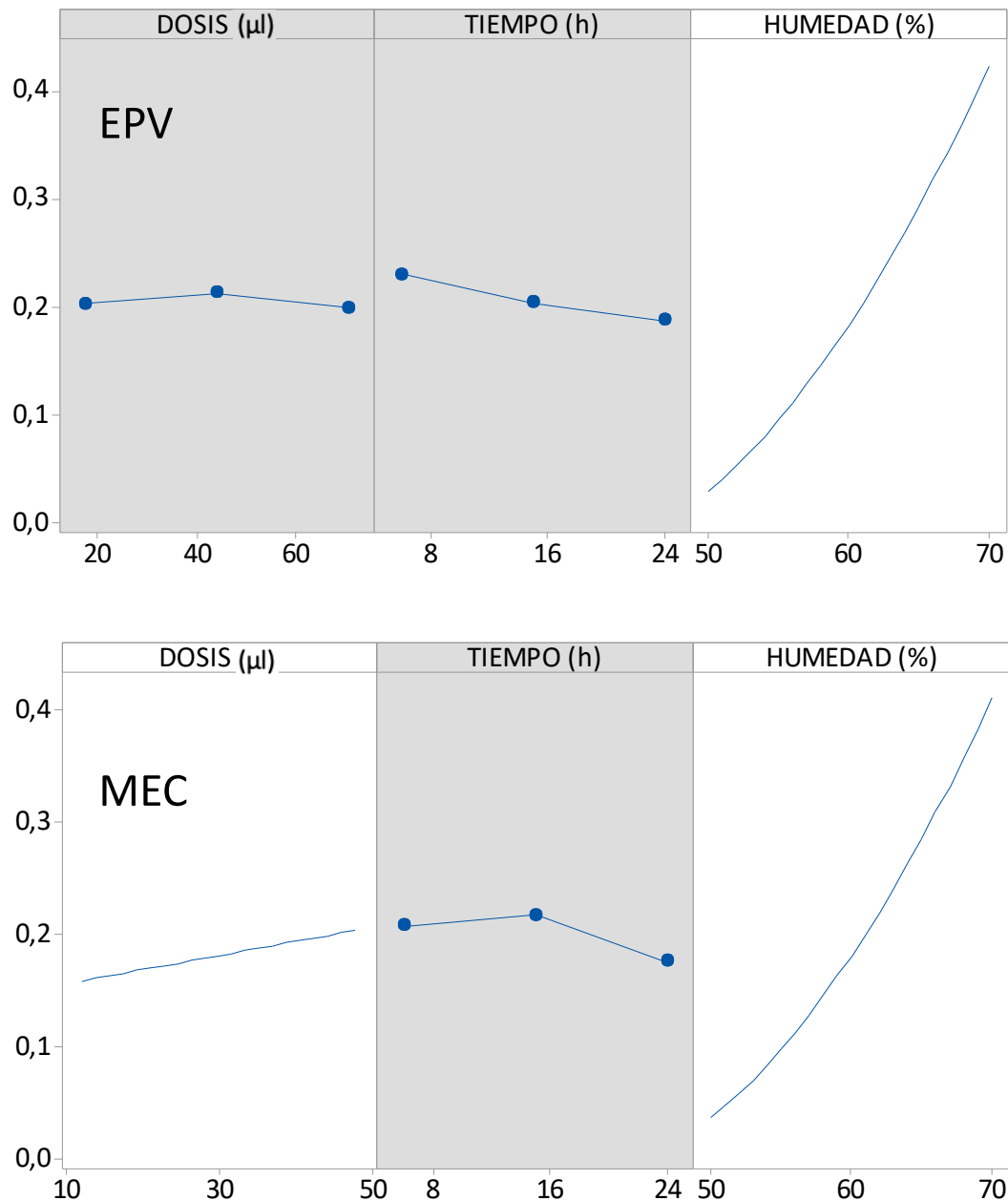


Figura 6. Gráfica de efectos principales para la liberación de aminoácidos por los dos preparados enzimáticos sobre la harina de *Ulva* (en mg). Los factores sin efecto significativos en el rango evaluado aparecen con fondo gris.

Para la hidrólisis de proteínas, nuevamente los resultados obtenidos con los dos extractos fueron muy diferentes, con efecto muy significativo de la humedad en ambos casos y también de la dosis en MEC.

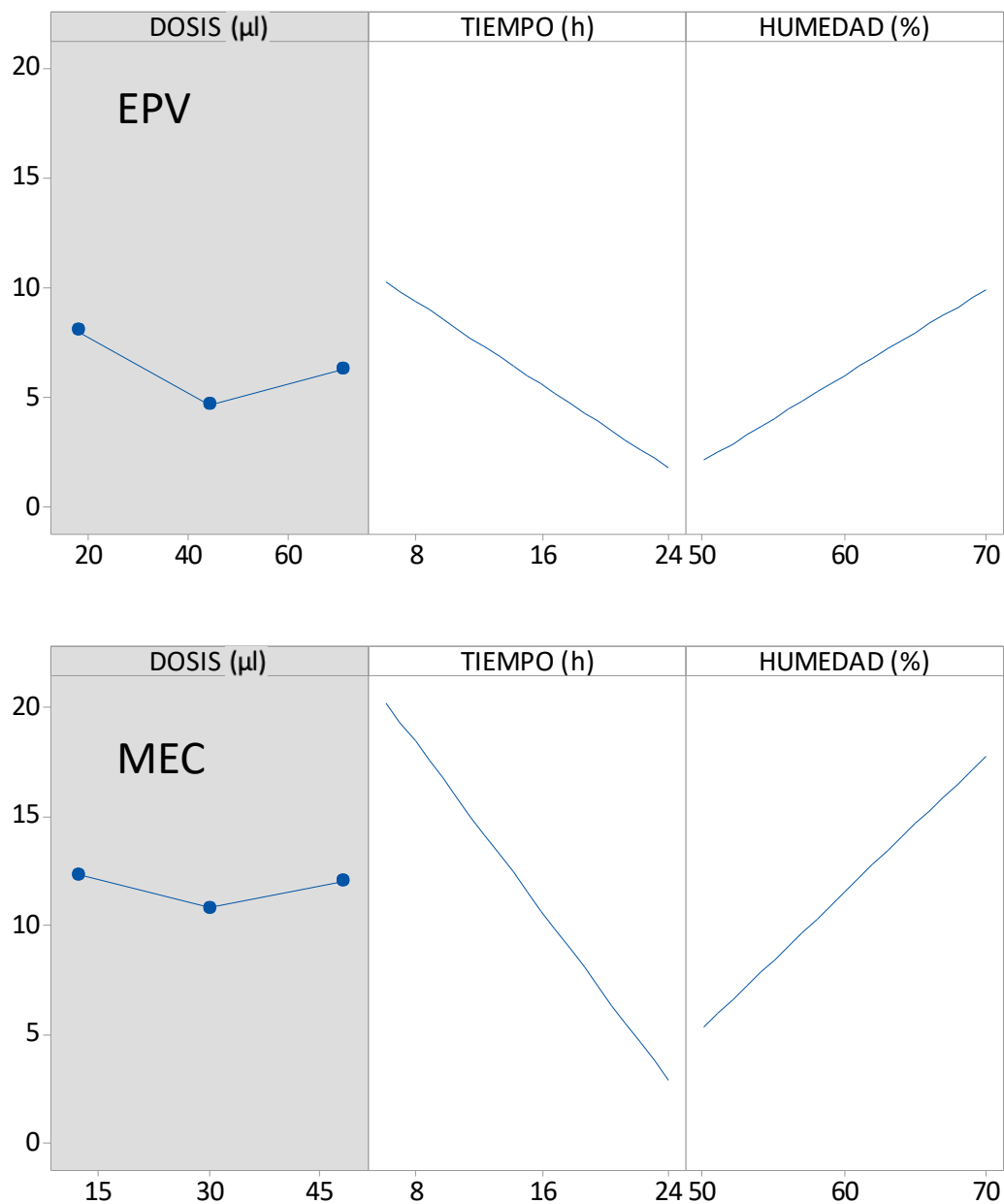


Figura 7. Gráfica de efectos principales sobre la TEAC ($\mu\text{M}/100\text{ mg}$) presente en la harina de *Ulva* tras la acción de los dos preparados enzimáticos. Los factores sin efecto significativo en el rango evaluado aparecen con fondo gris.

El efecto de ambos tipos de enzimas sobre la TEAC fue similar y en ambos casos los factores con efecto significativo fueron el tiempo y la humedad, pero con una tendencia opuesta; mientras que la humedad mostró un efecto creciente y lineal similar al observado para otros nutrientes, el efecto del tiempo de incubación mostró la tendencia contraria de manera que su aumento determinaba una clara disminución en la TEAC.

Considerando los resultados anteriores, cabe concluir que el diseño factorial utilizado en los ensayos ha sido de gran utilidad para predecir la optimización de la hidrólisis de la macroalga. Este enfoque se utiliza rutinariamente en estudios de hidrólisis enzimática en el ámbito de la Ingeniería Química o la Tecnología de Alimentos. Por ejemplo, se ha utilizado para evaluar el impacto del pH, la cantidad de sólidos y la dosis enzimática en la hidrólisis del rastrojo de maíz con celulasas (Zambare & Christopher, 2012). También se ha utilizado para comparar la acción enzimática de dos peptidasas sobre un concentrado soluble de pescado, introduciendo en el modelo como factores la temperatura, el tiempo y la concentración de enzima (Nilsang *et al.*, 2005) o para establecer las condiciones óptimas de temperatura, tiempo y dosis para la clarificación enzimática de zumos de frutas (Lee *et al.*, 2006).

Los resultados evidenciaron la semejanza entre ambos tipos de preparados enzimáticos, cuya acción se vio influenciada en general por los mismos factores, entre los que destacaba la humedad. Esto es debido a que suele ser el factor limitante clave en la SSH y sobre todo cuando se emplean cantidades reducidas de muestra que se secan rápidamente. En un estudio realizado igualmente con *Ulva* tratada por fermentación para la obtención de bioetanol, Trivedi *et al.* (2015) encontraron un óptimo del 60% dentro del rango del 40-100% para un mejor funcionamiento de la actividad de los microorganismos inoculados. Si la humedad era demasiado baja no promovía la acción metabólica y por otro lado, una humedad excesiva evita la entrada de oxígeno dando peores resultados (Trivedi *et al.*, 2015). En el caso de la acción enzimática la humedad resulta limitante para mantener en entorno adecuado para el contacto entre enzimas y sustratos.

Por otra parte, se comprobó para ambos tipos de enzimas que la capacidad antioxidante se ve negativamente afectada con el incremento del tiempo de incubación. Aunque algunos estudios han señalado que la utilización de carbohidrasas ayuda a incrementar la obtención de antioxidantes procedentes de las macroalgas (Adalbjörnsson & Jónsdóttir, 2015) no ocurrió así en el presente estudio. Esto pudo deberse a la influencia de la temperatura, que es capaz de eliminar componentes bioactivos si no se controla debidamente (Hammed *et al.*, 2013) y que en estos experimentos actuó durante un tiempo prolongado.

Aunque la presencia de una mayor cantidad de carbohidrasas distintas a la xilanasas en el extracto comercial hace que el grado de hidrólisis producido por este último sea mayor existen grandes semejanzas en la acción ejercida por ambos. Hay que considerar que MEC es un producto comercial sometido a un proceso de purificación y concentración, en tanto que EPV es un extracto crudo sin apenas purificación. Esto apunta a que la acción de dicho extracto podría ser mejorada y refuerza el interés de explorar diferentes especies de gasterópodos como fuentes de enzimas hidrolíticas efectivas frente a los polisacáridos de macroalgas y otras fuentes con aplicaciones en la industria alimentaria o farmacéutica (Ojima *et al.*, 2018).

3.2. Experimento 2. Uso de modelos de simulación digestiva de dos especies de peces para evaluar el efecto de un pretratamiento sobre la biodisponibilidad de nutrientes en *Ulva*

Los resultados obtenidos tras la hidrólisis *in vitro* de los piensos que incluían harina de *Ulva* pretratada enzimáticamente o no en condiciones que simulaban el digestivo de dorada o mújol se resumen en las Tablas 7 y 8.

Tabla 7. Cantidad de azúcares liberados (mg) durante la simulación de la digestión *in vitro* de dorada (*Sparus aurata*) y mújol (*Mugil cephalus*). Los valores en una columna que no comparten la misma letra difieren significativamente con $p < 0,05$.

	DORADA	MÚJOL
P. Control	2,36 ± 0,76	13,88 ± 0,72
P. con <i>Ulva</i> sin tratar	3,81 ± 2,27	25,23 ± 8,36
P. con <i>Ulva</i> tratada	6,74 ± 1,89	13,18 ± 3,08

Tabla 8. Capacidad antioxidante (TEAC (μM)) liberada durante la simulación de la digestión *in vitro* de dorada (*Sparus aurata*) y mújol (*Mugil cephalus*). Los valores en una columna que no comparten la misma letra difieren significativamente con $p < 0,05$.

	DORADA	MÚJOL
P. Control	0,00 ± 0,00 ^A	333,10 ± 96,15 ^A
P. con <i>Ulva</i> sin tratar	95,49 ± 37,28 ^B	811,11 ± 133,16 ^B
P. con <i>Ulva</i> tratada	74,29 ± 0,38 ^B	602,17 ± 111,45 ^B

Se puede comprobar que:

- El uso de distintos ingredientes para formular los piensos de ambas especies hace que las fórmulas sin *Ulva* añadida ya presenten importantes diferencias en cuanto a la cantidad de azúcares o TEAC que es posible recuperar tras la hidrólisis digestiva.
- La adición de harina de *Ulva* sin tratar incrementó la cantidad de azúcares liberados en la digestión en ambas especies con respecto a las presentes en los piensos control, aunque la variabilidad en los resultados obtenidos no permite afirmar que las diferencias fuesen significativas y algo similar ocurrió al evaluar los resultados obtenidos con la adición de harina de *Ulva* pretratada con MEC que ofreció resultados parecidos.
- Por el contrario, la TEAC sí presentó diferencias significativas en ambos casos. Las diferencias entre los valores de TEAC medidos tras la hidrólisis digestiva de los piensos control y con *Ulva* fueron mucho mayores en el caso del mújol. Esto podría estar relacionado con la ausencia de una fase ácida de la digestión en este caso, lo que habría permitido mantener una biodisponibilidad mucho mayor de los compuestos antioxidantes incorporados mediante el

alga. Por otra parte, tal y como cabía esperar, la digestión de piensos que incluían *Ulva* tratada enzimáticamente presentó una menor liberación de TEAC, aunque la variabilidad de los valores no permitió establecer diferencias significativas.

Los ensayos de simulación digestiva *in vitro* constituyen una herramienta con amplias aplicaciones en nutrición en acuicultura ya que permiten evaluar de manera simplificada y accesible diferentes factores que influyen en la biodisponibilidad digestiva de nutrientes y otros compuestos (Moyano *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos en el presente ensayo ponen de manifiesto que los compuestos con actividad antioxidante aportados al alimento mediante la inclusión de una cierta cantidad de *Ulva* en el pienso mantienen su actividad tras el proceso de digestión, aunque los resultados muestran las diferencias ligadas a las características de la digestión en peces carnívoros u omnívoros. Por otra parte, la acción de las enzimas de los peces durante el proceso de digestión no mejora ni complementa la hidrólisis enzimática de los polisacáridos presentes en la harina de alga, ni tampoco tuvo efectos positivos sobre la cantidad de compuestos antioxidantes, de manera que no se observó un incremento significativo ni en la liberación de azúcares ni en la TEAC, en contraste con lo reportado por otros autores que sometieron harina de alga a la acción de enzimas hidrolíticas (Zhu *et al.*, 2016; Fernandes *et al.*, 2019).

4. CONCLUSIONES

1. La aplicación de complejos enzimáticos ricos en carbohidrasas produce una hidrólisis significativa de los polisacáridos presentes en la macroalga *Ulva ohnoi* al emplear un proceso de Hidrólisis en Estado Sólido.
2. El factor clave para incrementar la hidrólisis de los polisacáridos es la humedad de la mezcla, de manera que la eficiencia del proceso se incrementa con valores del 70%. Por el contrario, el factor que más influye en la estabilidad de los compuestos con capacidad antioxidante es el tiempo total de incubación.
3. Aunque la hidrólisis obtenida con el extracto crudo de *Patella vulgata* fue menor que con el producto comercial, mostró una eficiencia comparable en buena medida, lo que sugiere que un producto purificado obtenido a partir del molusco podría ser una fuente de enzimas de interés con una aplicación equivalente.
4. Los ensayos de digestión simulada *in vitro* pusieron de manifiesto que las enzimas digestivas de las dos especies evaluadas no aumentan la hidrólisis de carbohidratos iniciada por el pretratamiento enzimático, pero también que los compuestos antioxidantes soportan las condiciones de la digestión de ambas especies, con una notable diferencia en el caso del mújol.

5. BIBLIOGRAFIA

- Adalbjörnsson, B. V., & Jónsdóttir, R. (2015). Enzyme-enhanced extraction of antioxidant ingredients from algae. In *Natural Products From Marine Algae* (pp. 145-150). Humana Press, New York, NY
- Ai, Q., Mai, K., Zhang, W., Xu, W., Tan, B., Zhang, C., & Li, H. (2007). Effects of exogenous enzymes (phytase, non-starch polysaccharide enzyme) in diets on growth, feed utilization, nitrogen and phosphorus excretion of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 147(2), 502-508.
- Anson, M. L. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *The Journal of general physiology*, 22(1), pp. 79.
- Banu, J. R., Tamilarasan, K., Chang, S. W., Nguyen, D. D., Ponnusamy, V. K., & Kumar, G. (2020). Surfactant assisted microwave disintegration of green marine macroalgae for enhanced anaerobic biodegradability and biomethane recovery. *Fuel*, 281, 118802.
- Bhat, M. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology advances*, 18(5), 355-383.
- Black, W. A. P. (1955). The preservation of seaweed by ensiling and bactericides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 6(1), 14-23.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H., & Catignani, G. L. (1983). Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of dairy science*, 66(6), 1219-1227
- Classen, H. L. (1996). Cereal grain starch and exogenous enzymes in poultry diets. *Animal Feed Science and Technology*, 62(1), 21-27.
- Collins, K. G., Fitzgerald, G. F., Stanton, C., & Ross, R. P. (2016). Looking beyond the terrestrial: the potential of seaweed derived bioactives to treat non-communicable diseases. *Marine drugs*, 14(3), 60.
- Combie, J., Blake, J. W., Nugent, T. E., & Tobin, T. (1982). Morphine glucuronide hydrolysis: superiority of beta-glucuronidase from *Patella vulgata*. *Clinical chemistry*, 28(1), 83-86.
- Douglas, S. G. (1981). *A rapid method for the determination of pentosans in wheat flour* (No. CIMMYT.).
- Evans, F. D., & Critchley, A. T. (2014). Seaweeds for animal production use. *Journal of applied phycology*, 26(2), 891-899.
- FAO. 2020. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma.
- Felix, N., & Selvaraj, S. (2004). Enzymes for sustainable aquaculture. *Aquaculture Asia*, 9, 5-6.
- 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, 277-285.
- Fleurence, J. (1999). Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends in food science & technology*, 10(1), 25-28.

- Gallagher, J. A., Turner, L. B., Adams, J. M., Barrento, S., Dyer, P. W., & Theodorou, M. K. (2018). Species variation in the effects of dewatering treatment on macroalgae. *Journal of applied phycology*, 30(4), 2305-2316.
- Gatesoupe, F. J., Huelvan, C., Le Bayon, N., Sévère, A., Aasen, I. M., Degnes, K. F., Masurais, D., Panserat, S., Zambonino-Infante, J. L. & Kaushik, S. J. (2014). The effects of dietary carbohydrate sources and forms on metabolic response and intestinal microbiota in sea bass juveniles, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 422, 47-53.
- Gdala, J., Johansen, H. N., Knudsen, K. B., Knap, I. H., Wagner, P., & Jørgensen, O. B. (1997). The digestibility of carbohydrates, protein and fat in the small and large intestine of piglets fed non-supplemented and enzyme supplemented diets. *Animal feed science and technology*, 65(1-4), 15-33.
- González, Ó. M. (2017). Caracterización y uso de carbohidrasas para la hidrólisis de polisacáridos no amiláceos en harinas de leguminosas, empleadas en piensos para peces, utilizando modelos de digestión in vitro (Doctoral dissertation, Universidad de Almería).
- Griffiths, M., Harrison, S. T., Smit, M., & Maharajh, D. (2016). Major commercial products from micro- and macroalgae. In *Algae biotechnology* (pp. 269-300). Springer, Cham.
- Gupta, S., Cox, S., & Abu-Ghannam, N. (2011). Effect of different drying temperatures on the moisture and phytochemical constituents of edible Irish brown seaweed. *LWT-Food Science and Technology*, 44(5), 1266-1272.
- Hammed, A. M., Jaswir, I., Amid, A., Alam, Z., Asiyani-H, T. T., & Ramli, N. (2013). Enzymatic hydrolysis of plants and algae for extraction of bioactive compounds. *Food Reviews International*, 29(4), 352-370.
- Hamouda, R. A., Sherif, S. A., Dawoud, G. T., & Ghareeb, M. M. (2016). Enhancement of bioethanol production from *Ulva fasciata* by biological and chemical saccharification. *Rendiconti Lincei*, 27(4), 665-672.
- Hardy, R. W. (2010). Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquaculture Research*, 41(5), 770-776.
- Heo, S. J., Park, E. J., Lee, K. W., & Jeon, Y. J. (2005). Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresource Technology*, 96(14), 1613-1623.
- Herrmann, C., FitzGerald, J., O'Shea, R., Xia, A., O'Kiely, P., & Murphy, J. D. (2015). Ensiling of seaweed for a seaweed biofuel industry. *Bioresource technology*, 196, 301-313.
- Jangam, S. V. (2011). An overview of recent developments and some R&D challenges related to drying of foods. *Drying Technology*, 29(12), 1343-1357.
- Kadam, S. U., Álvarez, C., Tiwari, B. K., & O'Donnell, C. P. (2015). Processing of seaweeds. In *Seaweed sustainability* (pp. 61-78). Academic Press.
- 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.
- Krogdahl, Å., Hemre, G. I., & Mommsen, T. P. (2005). Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. *Aquaculture nutrition*, 11(2), 103-122.
- Kwon, O. M., Kim, D. H., Kim, S. K., & Jeong, G. T. (2016). Production of sugars from macro-algae *Gracilaria verrucosa* using combined process of citric acid-catalyzed pretreatment and enzymatic hydrolysis. *Algal Research*, 13, 293-297.

- Lafond, M., Guais, O., Maestracci, M., Bonnin, E., & Giardina, T. (2014). Four GH11 xylanases from the xylanolytic fungus *Talaromyces versatilis* act differently on (arabino) xylans. *Applied microbiology and biotechnology*, *98*(14), 6339-6352.
- Lahaye, M., & Robic, A. (2007). Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules*, *8*(6), 1765-1774.
- Lalegerie, F., Lajili, S., Bedoux, G., Taupin, L., Stiger-Pouvreau, V., & Connan, S. (2019). Photo-protective compounds in red macroalgae from Brittany: Considerable diversity in mycosporine-like amino acids (MAAs). *Marine environmental research*, *147*, 37-48.
- Lee, W. C., Yusof, S. A. L. M. A. H., Hamid, N. S. A., & Baharin, B. S. (2006). Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice using response surface methodology (RSM). *Journal of food Engineering*, *73*(1), 55-63.
- Li, S. Y., Wang, Z. P., Wang, L. N., Peng, J. X., Wang, Y. N., Han, Y. T., & Zhao, S. F. (2019). Combined enzymatic hydrolysis and selective fermentation for green production of alginate oligosaccharides from *Laminaria japonica*. *Bioresource technology*, *281*, 84-89.
- Linton, S. M. (2020). 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.
- Liot, F., Colin, A., & Mabeau, S. (1993). Microbiology and storage life of fresh edible seaweeds. *Journal of applied phycology*, *5*(2), 243-247.
- Lorenzen, S. (2007). The limpet *Patella vulgata* L. at night in air: effective feeding on *Ascophyllum nodosum* monocultures and stranded seaweeds. *Journal of Molluscan studies*, *73*(3), 267-274.
- Martínez-Antequera, F. (2020). Evaluación de diferentes procedimientos orientados a mejorar *Ulva ohnoi* como ingrediente potencial en piensos para acuicultura. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Almería.
- Martínez-Antequera, F. P., Martos-Sitcha, J. A., Reyna, J. M., & Moyano, F. J. (2021). Evaluation of the Inclusion of the Green Seaweed *Ulva ohnoi* as an Ingredient in Feeds for Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) and European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *Animals*, *11*(6), 1684.
- Miller, G. L. (1959). Modified DNS method for reducing sugars. *Anal Chem*, *31*(3), pp. 426-428.
- Mothibe, K. J., Zhang, M., Nsor-atindana, J., & Wang, Y. C. (2011). Use of ultrasound pretreatment in drying of fruits: Drying rates, quality attributes, and shelf life extension. *Drying Technology*, *29*(14), 1611-1621.
- Moyano, F. J., Saenz de Rodriganez, M. A., Díaz, M., & Tacon, A. G. (2015). Application of in vitro digestibility methods in aquaculture: constraints and perspectives. *Reviews in Aquaculture*, *7*(4), 223-242.
- Murty, K. V. R., Shameem, A., & Umadevi, K. (2013). Feeding, anatomy and digestive enzymes of false limpet *Siphonaria guamensis*. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, *5*(1), 104-109.
- Mustafa, G., Wakamatsu, S., Takeda, T. A., Umino, T., & Nakagawa, H. (1995). Effects of algae meal as feed additive on growth, feed efficiency, and body composition in red sea bream. *Fisheries Science*, *61*(1), 25-28.
- Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M., & Assavanig, A. (2005). Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *Journal of food Engineering*, *70*(4), 571-578.

- O'Sullivan, L., Murphy, B., McLoughlin, P., Duggan, P., Lawlor, P. G., Hughes, H., & Gardiner, G. E. (2010). Prebiotics from marine macroalgae for human and animal health applications. *Marine drugs*, 8(7), 2038-2064.
- Ojima, T., Rahman, M. M., Kumagai, Y., Nishiyama, R., Narsico, J., & Inoue, A. (2018). Polysaccharide-degrading enzymes from marine gastropods. *Methods in enzymology*, 605, 457-497
- 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.
- Özçimen, D., İnan, B., & Biernat, K. (2015). An overview of bioethanol production from algae. *Biofuels-Status and Perspective*, 141-162.
- Parab, P., Khandeparker, R., Amberkar, U., & Khodse, V. (2017). Enzymatic saccharification of seaweeds into fermentable sugars by xylanase from marine *Bacillus* sp. strain BT21. *3 Biotech*, 7(5).
- Park, J. H., Hong, J. Y., Jang, H. C., Oh, S. G., Kim, S. H., Yoon, J. J., & Kim, Y. J. (2012). Use of *Gelidium amansii* as a promising resource for bioethanol: a practical approach for continuous dilute-acid hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*, 108, 83-88.
- Peixoto, M. J., Salas-Leitón, E., Pereira, L. F., Queiroz, A., Magalhães, F., Pereira, R., Abreu, H., Reis, P. A., Magalhães Gonçalves, J. F. & de Almeida Ozório, R. O. (2016). Role of dietary seaweed supplementation on growth performance, digestive capacity and immune and stress responsiveness in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture Reports*, 3, 189-197.
- Ponce, M., Zuasti, E., Anguís, V., & Fernández-Díaz, C. (2020). Effects of the sulfated polysaccharide ulvan from *Ulva ohnoi* on the modulation of the immune response in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Fish & shellfish immunology*, 100, 27-40.
- Robic, A., Gaillard, C., Sassi, J. F., Lerat, Y., & Lahaye, M. (2009). Ultrastructure of ulvan: a polysaccharide from green seaweeds. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 91(8), 652-664.
- Schaal, G., & Grall, J. (2015). Microscale aspects in the diet of the limpet *Patella vulgata* L. *Marine Biological Association of the United Kingdom. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 95(6), 1155.
- Shpigel, M., Guttman, L., Shauli, L., Odintsov, V., Ben-Ezra, D., & Harpaz, S. (2017). *Ulva lactuca* from an integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) biofilter system as a protein supplement in gilthead seabream (*Sparus aurata*) diet. *Aquaculture*, 481, 112-118.
- Sugita, T., Yamamoto, T., & Yashimatsu, T. (2009). Utilization of waste Porphyra products as eco-friendly feed ingredients. *Bulletin of Fisheries Research Agencies*, 8, 19-27.
- Tabarsa, M., Rezaei, M., Ramezanpour, Z., & Waaland, J. R. (2012). Chemical compositions of the marine algae *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta) and *Ulva lactuca* (Chlorophyta) as a potential food source. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(12), 2500-2506.
- Tacon, A. G., & Metian, M. (2008). Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*, 285(1-4), 146-158.
- Trivedi, N., Reddy, C. R. K., Radulovich, R., & Jha, B. (2015). Solid state fermentation (SSF)-derived cellulase for saccharification of the green seaweed *Ulva* for bioethanol production. *Algal Research*, 9, 48-54.

- Valente, L. M. P., Gouveia, A., Rema, P., Matos, J., Gomes, E. F., & Pinto, I. S. (2006). Evaluation of three seaweeds *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* and *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 252(1), 85-91.
- Van Weel, P. B. (1961). The comparative physiology of digestion in molluscs. *American Zoologist*, 245-252.
- Wahlström, N., Edlund, U., Pavia, H., Toth, G., Jaworski, A., Pell, A. J., Choong, F. X., Shirani, H., R. Nilsson, K. P. & Richter-Dahlfors, A. (2020). Cellulose from the green macroalgae *Ulva lactuca*: isolation, characterization, optotracing, and production of cellulose nanofibrils. *Cellulose*, 1-19.
- Walter, H.E. (1984). Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In methods of Enzymatic Analysis. Vol. V, pp. 270-277. Edited by H.J. Bergmeyer. Verlag Chemie, Weinham.
- Wassef, E. A., El Masry, M. H., & Mikhail, F. R. (2001). Growth enhancement and muscle structure of striped mullet, *Mugil cephalus* L., fingerlings by feeding algal meal-based diets. *Aquaculture Research*, 32, 315-322.
- Wong, K., & Cheung, P. C. (2001). Influence of drying treatment on three Sargassum species 2. Protein extractability, in vitro protein digestibility and amino acid profile of protein concentrates. *Journal of applied phycology*, 13(1), 51-58.
- Wu, Z. Z., Li, D. Y., & Cheng, Y. S. (2018). Application of ensilage as a green approach for simultaneous preservation and pretreatment of macroalgae *Ulva lactuca* for fermentable sugar production. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 20(9), 2057-2065.
- Yun, E. J., Kim, H. T., Cho, K. M., Yu, S., Kim, S., Choi, I. G., & Kim, K. H. (2016). Pretreatment and saccharification of red macroalgae to produce fermentable sugars. *Bioresource technology*, 199, 311-318.
- Zambare, V. P., & Christopher, L. P. (2012). Optimization of enzymatic hydrolysis of corn stover for improved ethanol production. *Energy exploration & exploitation*, 30(2), 193-205.
- Zhu, D., Wen, X., Li, S., Xuan, X., & Li, Y. (2016). Effects of exogenous non-starch polysaccharide-degrading enzymes in diets containing *Gracilaria lemaneiformis* on white-spotted snapper *Lutjanus stellatus* Akazaki. *Aquaculture international*, 24(2), 491-502.

6. ANEXO I

Modelos para EPV

Modelo general sin refinar:

Regresión de superficie de respuesta: TEAC (μM)/10 vs. DOSIS (μl); TIEMPO (h); HUMEDAD (%)

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	9	819,95	91,11	3,65	0,008
Lineal	3	545,33	181,78	7,28	0,002
DOSIS (μl)	1	12,90	12,90	0,52	0,481
TIEMPO (h)	1	286,98	286,98	11,50	0,003
HUMEDAD (%)	1	245,45	245,45	9,83	0,005
Cuadrado	3	163,27	54,42	2,18	0,122
DOSIS (μl)*DOSIS (μl)	1	42,30	42,30	1,69	0,208
TIEMPO (h)*TIEMPO (h)	1	80,91	80,91	3,24	0,087
HUMEDAD (%)*HUMEDAD (%)	1	28,02	28,02	1,12	0,302
Interacción de 2 factores	3	111,32	37,11	1,49	0,248
DOSIS (μl)*TIEMPO (h)	1	17,31	17,31	0,69	0,415
DOSIS (μl)*HUMEDAD (%)	1	27,26	27,26	1,09	0,308
TIEMPO (h)*HUMEDAD (%)	1	66,76	66,76	2,67	0,118
Error	20	499,21	24,96		
Falta de ajuste	3	115,08	38,36	1,70	0,205
Error puro	17	384,13	22,60		
Total	29	1319,16			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
4,99605	62,16%	45,13%	16,96%

Coefficientes codificados

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	5,47	2,04	2,68	0,014	
DOSIS (μl)	-0,90	1,25	-0,72	0,481	1,00
TIEMPO (h)	-4,24	1,25	-3,39	0,003	1,00
HUMEDAD (%)	3,92	1,25	3,14	0,005	1,00
DOSIS (μl)*DOSIS (μl)	2,39	1,84	1,30	0,208	1,01
TIEMPO (h)*TIEMPO (h)	-3,31	1,84	-1,80	0,087	1,01
HUMEDAD (%)*HUMEDAD (%)	1,95	1,84	1,06	0,302	1,01
DOSIS (μl)*TIEMPO (h)	-1,47	1,77	-0,83	0,415	1,00
DOSIS (μl)*HUMEDAD (%)	-1,85	1,77	-1,04	0,308	1,00
TIEMPO (h)*HUMEDAD (%)	-2,89	1,77	-1,64	0,118	1,00

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

$$\begin{aligned} \text{TEAC } (\mu\text{M})/100\text{mg } \text{alga } \text{seca} = & 6,7 + 0,175 \text{ DOSIS } (\mu\text{l}) + 2,95 \text{ TIEMPO (h)} \\ & - 1,16 \text{ HUMEDAD (\%)} + 0,00342 \text{ DOSIS } (\mu\text{l}) * \text{DOSIS } (\mu\text{l}) - 0,0409 \text{ TIEMPO (h)} * \text{TIEMPO (h)} \\ & + 0,0195 \text{ HUMEDAD (\%)} * \text{HUMEDAD (\%)} - 0,00618 \text{ DOSIS } (\mu\text{l}) * \text{TIEMPO (h)} - 0,00698 \text{ DOSIS } (\mu\text{l}) \\ & * \text{HUMEDAD (\%)} - 0,0321 \text{ TIEMPO (h)} * \text{HUMEDAD (\%)} \end{aligned}$$

Modelo simplificado:

Regresión de superficie de respuesta: TEAC (μM)/100mg alga seca vs. TIEMPO (h); HUMEDAD (%)

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	2	532,4	266,20	9,14	0,001
Lineal	2	532,4	266,20	9,14	0,001
TIEMPO (h)	1	287,2	287,17	9,86	0,004
HUMEDAD (%)	1	245,2	245,23	8,42	0,007
Error	27	786,8	29,14		
Falta de ajuste	10	402,6	40,26	1,78	0,142
Error puro	17	384,1	22,60		
Total	29	1319,2			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
5,39808	40,36%	35,94%	27,23%

Coefficientes codificados

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	6,021	0,986	6,11	0,000	
TIEMPO (h)	-4,24	1,35	-3,14	0,004	1,00
HUMEDAD (%)	3,91	1,35	2,90	0,007	1,00

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

$$\text{TEAC } (\mu\text{M})/100\text{mg alga seca} = -10,41 - 0,471 \text{ TIEMPO (h)} + 0,391 \text{ HUMEDAD (\%)}$$

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	TEAC (μM)/100mg alga seca	Ajuste	Resid	Resid est.	R
25	20,74	9,94	10,81	2,11	R

Residuo grande R

Modelo general sin refinar:

Regresión de superficie de respuesta: Azúcares vs. DOSIS (μl); TIEMPO (h); HUMEDAD (%)

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	9	0,073702	0,008189	9,69	0,000
Lineal	3	0,057684	0,019228	22,75	0,000
DOSIS (μl)	1	0,001878	0,001878	2,22	0,152
TIEMPO (h)	1	0,001318	0,001318	1,56	0,226
HUMEDAD (%)	1	0,054488	0,054488	64,45	0,000
Cuadrado	3	0,014152	0,004717	5,58	0,006
DOSIS (μl)*DOSIS (μl)	1	0,000026	0,000026	0,03	0,863
TIEMPO (h)*TIEMPO (h)	1	0,001239	0,001239	1,47	0,240
HUMEDAD (%)*HUMEDAD (%)	1	0,013424	0,013424	15,88	0,001
Interacción de 2 factores	3	0,001869	0,000623	0,74	0,542
DOSIS (μl)*TIEMPO (h)	1	0,001010	0,001010	1,20	0,287
DOSIS (μl)*HUMEDAD (%)	1	0,000136	0,000136	0,16	0,693
TIEMPO (h)*HUMEDAD (%)	1	0,000723	0,000723	0,85	0,366
Error	20	0,016907	0,000845		

Falta de ajuste	3	0,002717	0,000906	1,09	0,382
Error puro	17	0,014190	0,000835		
Total	29	0,090609			

Resumen del modelo

	S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
	0,0290751	81,34%	72,94%	55,01%

Coefficientes codificados

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	0,0303	0,0119	2,56	0,019	
DOSIS (µl)	0,01083	0,00727	1,49	0,152	1,00
TIEMPO (h)	-0,00908	0,00727	-1,25	0,226	1,00
HUMEDAD (%)	0,05836	0,00727	8,03	0,000	1,00
DOSIS (µl)*DOSIS (µl)	0,0019	0,0107	0,18	0,863	1,01
TIEMPO (h)*TIEMPO (h)	0,0130	0,0107	1,21	0,240	1,01
HUMEDAD (%)*HUMEDAD (%)	0,0426	0,0107	3,98	0,001	1,01
DOSIS (µl)*TIEMPO (h)	-0,0112	0,0103	-1,09	0,287	1,00
DOSIS (µl)*HUMEDAD (%)	-0,0041	0,0103	-0,40	0,693	1,00
TIEMPO (h)*HUMEDAD (%)	-0,0095	0,0103	-0,92	0,366	1,00

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

$$\begin{aligned} \text{Azúcares} = & 1,086 + 0,00182 \text{ DOSIS } (\mu\text{l}) + 0,00261 \text{ TIEMPO } (\text{h}) - 0,0431 \text{ HUMEDAD } (\%) \\ & + 0,000003 \text{ DOSIS } (\mu\text{l}) * \text{DOSIS } (\mu\text{l}) + 0,000160 \text{ TIEMPO } (\text{h}) * \text{TIEMPO } (\text{h}) \\ & + 0,000426 \text{ HUMEDAD } (\%) * \text{HUMEDAD } (\%) - 0,000047 \text{ DOSIS } (\mu\text{l}) * \text{TIEMPO } (\text{h}) \\ & - 0,000016 \text{ DOSIS } (\mu\text{l}) * \text{HUMEDAD } (\%) - 0,000106 \text{ TIEMPO } (\text{h}) * \text{HUMEDAD } (\%) \end{aligned}$$

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	Azúcares	Ajuste	Resid	Resid est.	
4	0,2354	0,1629	0,0725	3,15	R
13	0,0893	0,1399	-0,0506	-2,20	R

Residuo grande R

Modelo simplificado:

Regresión de superficie de respuesta: Azúcares vs. HUMEDAD (%)

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	2	0,067389	0,033695	39,18	0,000
Lineal	1	0,054481	0,054481	63,35	0,000
HUMEDAD (%)	1	0,054481	0,054481	63,35	0,000
Cuadrado	1	0,012909	0,012909	15,01	0,001
HUMEDAD (%) * HUMEDAD (%)	1	0,012909	0,012909	15,01	0,001
Error	27	0,023220	0,000860		
Falta de ajuste	10	0,009030	0,000903	1,08	0,426
Error puro	17	0,014190	0,000835		
Total	29	0,090609			

Resumen del modelo

R-cuad. R-cuad.

S	R-cuad.	(ajustado)	(pred)
0,0293255	74,37%	72,48%	67,67%

Coefficientes codificados

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	0,03882	0,00784	4,95	0,000	
HUMEDAD (%)	0,05835	0,00733	7,96	0,000	1,00
HUMEDAD (%) * HUMEDAD (%)	0,0416	0,0107	3,87	0,001	1,00

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

Azúcares = 1,186 - 0,0441 HUMEDAD (%) + 0,000416 HUMEDAD (%) * HUMEDAD (%)

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	Azúcares	Ajuste	Resid	Resid est.
4	0,23537	0,13875	0,09661	3,52 R

Residuo grande R

Modelo general sin refinar:

Regresión de superficie de respuesta: Pentosas vs. DOSIS (µl); TIEMPO (h); HUMEDAD (%)

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	9	0,130045	0,014449	19,77	0,000
Lineal	3	0,120651	0,040217	55,01	0,000
DOSIS (µl)	1	0,000132	0,000132	0,18	0,676
TIEMPO (h)	1	0,015244	0,015244	20,85	0,000
HUMEDAD (%)	1	0,105275	0,105275	144,01	0,000
Cuadrado	3	0,004642	0,001547	2,12	0,130
DOSIS (µl) * DOSIS (µl)	1	0,000029	0,000029	0,04	0,845
TIEMPO (h) * TIEMPO (h)	1	0,001051	0,001051	1,44	0,244
HUMEDAD (%) * HUMEDAD (%)	1	0,003871	0,003871	5,30	0,032
Interacción de 2 factores	3	0,004783	0,001594	2,18	0,122
DOSIS (µl) * TIEMPO (h)	1	0,002515	0,002515	3,44	0,078
DOSIS (µl) * HUMEDAD (%)	1	0,000268	0,000268	0,37	0,552
TIEMPO (h) * HUMEDAD (%)	1	0,002000	0,002000	2,74	0,114
Error	20	0,014621	0,000731		
Falta de ajuste	3	0,002421	0,000807	1,12	0,367
Error puro	17	0,012200	0,000718		
Total	29	0,144666			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	(ajustado)	R-cuad.	(pred)
0,0270380	89,89%	85,35%	76,18%	

Coefficientes codificados

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	0,0756	0,0110	6,85	0,000	
DOSIS (µl)	0,00287	0,00676	0,42	0,676	1,00

TIEMPO (h)	0,03087	0,00676	4,57	0,000	1,00
HUMEDAD (%)	0,08112	0,00676	12,00	0,000	1,00
DOSIS (µl)*DOSIS (µl)	0,00197	0,00995	0,20	0,845	1,01
TIEMPO (h)*TIEMPO (h)	0,01193	0,00995	1,20	0,244	1,01
HUMEDAD (%)*HUMEDAD (%)	0,02290	0,00995	2,30	0,032	1,01
DOSIS (µl)*TIEMPO (h)	-0,01773	0,00956	-1,85	0,078	1,00
DOSIS (µl)*HUMEDAD (%)	-0,00579	0,00956	-0,61	0,552	1,00
TIEMPO (h)*HUMEDAD (%)	0,01581	0,00956	1,65	0,114	1,00

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

$$\text{Pentosas} = 0,446 + 0,00229 \text{ DOSIS } (\mu\text{l}) - 0,00824 \text{ TIEMPO (h)} - 0,0210 \text{ HUMEDAD } (\%) \\ + 0,000003 \text{ DOSIS } (\mu\text{l}) * \text{DOSIS } (\mu\text{l}) + 0,000147 \text{ TIEMPO (h)} * \text{TIEMPO (h)} \\ + 0,000229 \text{ HUMEDAD } (\%) * \text{HUMEDAD } (\%) - 0,000074 \text{ DOSIS } (\mu\text{l}) * \text{TIEMPO (h)} \\ - 0,000022 \text{ DOSIS } (\mu\text{l}) * \text{HUMEDAD } (\%) + 0,000176 \text{ TIEMPO (h)} * \text{HUMEDAD } (\%)$$

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	Pentosas	Ajuste	Resid	Resid	est.
8	0,0578	0,1055	-0,0477	-2,23	R
10	0,0925	0,1353	-0,0428	-2,00	R

Residuo grande R

Modelo simplificado:

Regresión de superficie de respuesta: Pentosas vs. TIEMPO (h); HUMEDAD (%)

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	0,124071	0,041357	52,21	0,000
Lineal	2	0,120489	0,060244	76,06	0,000
TIEMPO (h)	1	0,015227	0,015227	19,22	0,000
HUMEDAD (%)	1	0,105261	0,105261	132,89	0,000
Cuadrado	1	0,003582	0,003582	4,52	0,043
HUMEDAD (%)*HUMEDAD (%)	1	0,003582	0,003582	4,52	0,043
Error	26	0,020595	0,000792		
Falta de ajuste	9	0,008395	0,000933	1,30	0,306
Error puro	17	0,012200	0,000718		
Total	29	0,144666			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,0281445	85,76%	84,12%	80,83%

Coefficientes codificados

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	0,08358	0,00752	11,11	0,000	
TIEMPO (h)	0,03085	0,00704	4,38	0,000	1,00
HUMEDAD (%)	0,08111	0,00704	11,53	0,000	1,00
HUMEDAD (%)*HUMEDAD (%)	0,0219	0,0103	2,13	0,043	1,00

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

$$\text{Pentosas} = 0,334 + 0,003428 \text{ TIEMPO (h)} - 0,0182 \text{ HUMEDAD } (\%)$$

$$+ 0,000219 \text{ HUMEDAD (\%)*HUMEDAD (\%)}$$

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	Pentosas	Ajuste	Resid	Resid est.	
8	0,05781	0,11443	-0,05662	-2,16	R
19	0,11159	0,05273	0,05886	2,25	R

Residuo grande R

Modelo general sin refinar:

Regresión de superficie de respuesta: Aa totales vs. DOSIS (µl); TIEMPO (h); HUMEDAD (%)

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	9	0,650720	0,072302	41,16	0,000
Lineal	3	0,630304	0,210101	119,62	0,000
DOSIS (µl)	1	0,000068	0,000068	0,04	0,846
TIEMPO (h)	1	0,007315	0,007315	4,16	0,055
HUMEDAD (%)	1	0,622922	0,622922	354,65	0,000
Cuadrado	3	0,014880	0,004960	2,82	0,065
DOSIS (µl)*DOSIS (µl)	1	0,000468	0,000468	0,27	0,611
TIEMPO (h)*TIEMPO (h)	1	0,000457	0,000457	0,26	0,616
HUMEDAD (%)*HUMEDAD (%)	1	0,013721	0,013721	7,81	0,011
Interacción de 2 factores	3	0,005486	0,001829	1,04	0,396
DOSIS (µl)*TIEMPO (h)	1	0,004090	0,004090	2,33	0,143
DOSIS (µl)*HUMEDAD (%)	1	0,000271	0,000271	0,15	0,699
TIEMPO (h)*HUMEDAD (%)	1	0,001125	0,001125	0,64	0,433
Error	20	0,035129	0,001756		
Falta de ajuste	3	0,001013	0,000338	0,17	0,916
Error puro	17	0,034116	0,002007		
Total	29	0,685849			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,0419098	94,88%	92,57%	89,80%

Coefficientes codificados

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	0,1838	0,0171	10,74	0,000	
DOSIS (µl)	-0,0021	0,0105	-0,20	0,846	1,00
TIEMPO (h)	-0,0214	0,0105	-2,04	0,055	1,00
HUMEDAD (%)	0,1973	0,0105	18,83	0,000	1,00
DOSIS (µl)*DOSIS (µl)	-0,0080	0,0154	-0,52	0,611	1,01
TIEMPO (h)*TIEMPO (h)	0,0079	0,0154	0,51	0,616	1,01
HUMEDAD (%)*HUMEDAD (%)	0,0431	0,0154	2,80	0,011	1,01
DOSIS (µl)*TIEMPO (h)	-0,0226	0,0148	-1,53	0,143	1,00
DOSIS (µl)*HUMEDAD (%)	0,0058	0,0148	0,39	0,699	1,00
TIEMPO (h)*HUMEDAD (%)	-0,0119	0,0148	-0,80	0,433	1,00

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

$$\text{Aa totales} = 0,467 + 0,00103 \text{ DOSIS (\mu l)} + 0,0068 \text{ TIEMPO (h)} - 0,0310 \text{ HUMEDAD (\%)}$$

$$\begin{aligned}
& - 0,000011 \text{ DOSIS } (\mu\text{l}) * \text{DOSIS } (\mu\text{l}) + 0,000097 \text{ TIEMPO (h)} * \text{TIEMPO (h)} \\
& + 0,000431 \text{ HUMEDAD } (\%) * \text{HUMEDAD } (\%) - 0,000095 \text{ DOSIS } (\mu\text{l}) * \text{TIEMPO (h)} \\
& + 0,000022 \text{ DOSIS } (\mu\text{l}) * \text{HUMEDAD } (\%) - 0,000132 \text{ TIEMPO (h)} * \text{HUMEDAD } (\%)
\end{aligned}$$

Modelo simplificado:

Regresión de superficie de respuesta: Aa totales vs. HUMEDAD (%)

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	2	0,63684	0,318418	175,41	0,000
Lineal	1	0,62296	0,622957	343,17	0,000
HUMEDAD (%)	1	0,62296	0,622957	343,17	0,000
Cuadrado	1	0,01388	0,013878	7,64	0,010
HUMEDAD (%) * HUMEDAD (%)	1	0,01388	0,013878	7,64	0,010
Error	27	0,04901	0,001815		
Falta de ajuste	10	0,01490	0,001490	0,74	0,678
Error puro	17	0,03412	0,002007		
Total	29	0,68585			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,0426065	92,85%	92,32%	91,36%

Coefficientes codificados

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	0,1837	0,0114	16,13	0,000	
HUMEDAD (%)	0,1973	0,0107	18,52	0,000	1,00
HUMEDAD (%) * HUMEDAD (%)	0,0431	0,0156	2,76	0,010	1,00

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

Aa totales = 0,552 - 0,0320 HUMEDAD (%) + 0,000431 HUMEDAD (%) * HUMEDAD (%)

Modelos para MEC

Modelo general sin refinar:

Regresión de superficie de respuesta: TEAC (µM)/10 vs. Bloques; DOSIS (µl); TIEMPO (h); HUMEDAD (%)

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	10	2738,46	273,85	9,84	0,000
Bloques	1	469,81	469,81	16,89	0,001
Lineal	3	1822,19	607,40	21,83	0,000
DOSIS (µl)	1	0,44	0,44	0,02	0,901
TIEMPO (h)	1	1199,52	1199,52	43,12	0,000
HUMEDAD (%)	1	622,23	622,23	22,37	0,000
Cuadrado	3	70,61	23,54	0,85	0,486
DOSIS (µl) * DOSIS (µl)	1	8,32	8,32	0,30	0,591
TIEMPO (h) * TIEMPO (h)	1	24,14	24,14	0,87	0,363
HUMEDAD (%) * HUMEDAD (%)	1	37,11	37,11	1,33	0,262
Interacción de 2 factores	3	375,84	125,28	4,50	0,015
DOSIS (µl) * TIEMPO (h)	1	0,00	0,00	0,00	0,991

DOSIS (µl)*HUMEDAD (%)	1	46,91	46,91	1,69	0,210
TIEMPO (h)*HUMEDAD (%)	1	328,93	328,93	11,82	0,003
Error	19	528,59	27,82		
Falta de ajuste	15	447,97	29,86	1,48	0,380
Error puro	4	80,62	20,16		
Total	29	3267,05			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
5,27452	83,82%	75,31%	57,07%

Coefficientes codificados

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	13,14	2,15	6,10	0,000	
Bloques					
1	-3,957	0,963	-4,11	0,001	1,00
DOSIS (µl)	-0,17	1,32	-0,13	0,901	1,00
TIEMPO (h)	-8,66	1,32	-6,57	0,000	1,00
HUMEDAD (%)	6,24	1,32	4,73	0,000	1,00
DOSIS (µl)*DOSIS (µl)	1,06	1,94	0,55	0,591	1,01
TIEMPO (h)*TIEMPO (h)	-1,81	1,94	-0,93	0,363	1,01
HUMEDAD (%)*HUMEDAD (%)	-2,24	1,94	-1,16	0,262	1,01
DOSIS (µl)*TIEMPO (h)	0,02	1,86	0,01	0,991	1,00
DOSIS (µl)*HUMEDAD (%)	-2,42	1,86	-1,30	0,210	1,00
TIEMPO (h)*HUMEDAD (%)	-6,41	1,86	-3,44	0,003	1,00

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

$$\text{TEAC } (\mu\text{M})/100\text{mg alga seca} = -180,6 + 0,599 \text{ DOSIS } (\mu\text{l}) + 3,98 \text{ TIEMPO (h)} + 4,79 \text{ HUMEDAD (\%)} + 0,00328 \text{ DOSIS } (\mu\text{l}) * \text{DOSIS } (\mu\text{l}) - 0,0223 \text{ TIEMPO (h)} * \text{TIEMPO (h)} - 0,0224 \text{ HUMEDAD (\%)} * \text{HUMEDAD (\%)} + 0,0001 \text{ DOSIS } (\mu\text{l}) * \text{TIEMPO (h)} - 0,0135 \text{ DOSIS } (\mu\text{l}) * \text{HUMEDAD (\%)} - 0,0712 \text{ TIEMPO (h)} * \text{HUMEDAD (\%)}$$

Ecuación promediada sobre los bloques.

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	TEAC (µM)/100mg alga seca	Ajuste	Resid	Resid est.	R
17	6,12	16,83	-10,71	-2,64	

Modelo simplificado:

Regresión de superficie de respuesta: TEAC (µM)/100mg vs. Bloques; TIEMPO (h); HUMEDAD (%)

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	4	2620,49	655,12	25,33	0,000
Bloques	1	469,81	469,81	18,17	0,000
Lineal	2	1821,75	910,88	35,22	0,000
TIEMPO (h)	1	1199,52	1199,52	46,38	0,000
HUMEDAD (%)	1	622,23	622,23	24,06	0,000
Interacción de 2 factores	1	328,93	328,93	12,72	0,001
TIEMPO (h)*HUMEDAD (%)	1	328,93	328,93	12,72	0,001
Error	25	646,56	25,86		

Falta de ajuste	21	565,93	26,95	1,34	0,430
Error puro	4	80,62	20,16		
Total	29	3267,05			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
5,08549	80,21%	77,04%	69,89%

Coefficientes codificados

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	11,550	0,928	12,44	0,000	
Bloques					
1	-3,957	0,928	-4,26	0,000	1,00
TIEMPO (h)	-8,66	1,27	-6,81	0,000	1,00
HUMEDAD (%)	6,24	1,27	4,91	0,000	1,00
TIEMPO (h)*HUMEDAD (%)	-6,41	1,80	-3,57	0,001	1,00

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

$$\text{TEAC } (\mu\text{M})/100\text{mg alga seca} = -75,6 + 3,31 \text{ TIEMPO (h)} + 1,692 \text{ HUMEDAD (\%)} - 0,0712 \text{ TIEMPO (h)*HUMEDAD (\%)}$$

Ecuación promediada sobre los bloques.

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	TEAC (uM)/100mg alga seca	Ajuste	Resid	Resid est.	
12	32,12	21,74	10,38	2,19	R

Residuo grande R

Modelo sin refinar:

Regresión de superficie de respuesta: Azúcares vs. Bloques; DOSIS (µl); TIEMPO (h); HUMEDAD (%).

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	10	0,096725	0,009673	3,67	0,007
Bloques	1	0,000111	0,000111	0,04	0,839
Lineal	3	0,090252	0,030084	11,41	0,000
DOSIS (µl)	1	0,004985	0,004985	1,89	0,185
TIEMPO (h)	1	0,007613	0,007613	2,89	0,106
HUMEDAD (%)	1	0,077654	0,077654	29,45	0,000
Cuadrado	3	0,002753	0,000918	0,35	0,791
DOSIS (µl)*DOSIS (µl)	1	0,002070	0,002070	0,79	0,387
TIEMPO (h)*TIEMPO (h)	1	0,000180	0,000180	0,07	0,796
HUMEDAD (%)*HUMEDAD (%)	1	0,000393	0,000393	0,15	0,704
Interacción de 2 factores	3	0,003610	0,001203	0,46	0,716
DOSIS (µl)*TIEMPO (h)	1	0,002043	0,002043	0,77	0,390
DOSIS (µl)*HUMEDAD (%)	1	0,000456	0,000456	0,17	0,682
TIEMPO (h)*HUMEDAD (%)	1	0,001110	0,001110	0,42	0,524
Error	19	0,050092	0,002636		
Falta de ajuste	15	0,046703	0,003114	3,68	0,109
Error puro	4	0,003389	0,000847		

Total 29 0,146817

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,0513459	65,88%	47,92%	5,76%

Coefficientes codificados

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	0,1293	0,0210	6,17	0,000	
Bloques					
1	0,00193	0,00937	0,21	0,839	1,00
DOSIS (µl)	0,0177	0,0128	1,38	0,185	1,00
TIEMPO (h)	0,0218	0,0128	1,70	0,106	1,00
HUMEDAD (%)	0,0697	0,0128	5,43	0,000	1,00
DOSIS (µl)*DOSIS (µl)	0,0167	0,0189	0,89	0,387	1,01
TIEMPO (h)*TIEMPO (h)	0,0049	0,0189	0,26	0,796	1,01
HUMEDAD (%)*HUMEDAD (%)	-0,0073	0,0189	-0,39	0,704	1,01
DOSIS (µl)*TIEMPO (h)	0,0160	0,0182	0,88	0,390	1,00
DOSIS (µl)*HUMEDAD (%)	0,0076	0,0182	0,42	0,682	1,00
TIEMPO (h)*HUMEDAD (%)	-0,0118	0,0182	-0,65	0,524	1,00

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

Azúcares = -0,555 - 0,00612 DOSIS (µl) + 0,0055 TIEMPO (h) + 0,0164 HUMEDAD (%) + 0,000052 DOSIS (µl)*DOSIS (µl) + 0,000061 TIEMPO (h)*TIEMPO (h) - 0,000073 HUMEDAD (%)*HUMEDAD (%) + 0,000099 DOSIS (µl)*TIEMPO (h) + 0,000042 DOSIS (µl)*HUMEDAD (%) - 0,000131 TIEMPO (h)*HUMEDAD (%)

Ecuación promediada sobre los bloques.

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	Azúcares	Ajuste	Resid	Resid est.	
1	0,0901	0,2048	-0,1147	-2,90	R
21	0,3197	0,2086	0,1111	2,81	R

Residuo grande R

Modelo simplificado:

Regresión de superficie de respuesta: Azúcares vs. Bloques; HUMEDAD (%)

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	2	0,077765	0,038883	15,20	0,000
Bloques	1	0,000111	0,000111	0,04	0,836
Lineal	1	0,077654	0,077654	30,36	0,000
HUMEDAD (%)	1	0,077654	0,077654	30,36	0,000
Error	27	0,069052	0,002557		
Falta de ajuste	23	0,065663	0,002855	3,37	0,123
Error puro	4	0,003389	0,000847		
Total	29	0,146817			

Resumen del modelo

R-cuad. R-cuad.

S R-cuad. (ajustado) (pred)
 0,0505715 **52,97%** **49,48%** **41,07%**

Coefficientes codificados

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	0,13701	0,00923	14,84	0,000	
Bloques					
1	0,00193	0,00923	0,21	0,836	1,00
HUMEDAD (%)	0,0697	0,0126	5,51	0,000	1,00

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

$$\text{Azúcares} = -0,2810 + 0,00697 \text{ HUMEDAD (\%)}$$

Ecuación promediada sobre los bloques.

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	Azúcares	Ajuste	Resid	Resid est.	
1	0,0901	0,2048	-0,1146	-2,43	R
14	0,2621	0,1351	0,1270	2,60	R
21	0,3197	0,2086	0,1111	2,35	R

Residuo grande R

Modelo sin refinar:

Regresión de superficie de respuesta: Pentosas vs. Bloques; DOSIS (µl); TIEMPO (h); HUMEDAD (%)

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	10	0,670065	0,067007	31,59	0,000
Bloques	1	0,006928	0,006928	3,27	0,087
Lineal	3	0,620524	0,206841	97,53	0,000
DOSIS (µl)	1	0,028530	0,028530	13,45	0,002
TIEMPO (h)	1	0,064572	0,064572	30,45	0,000
HUMEDAD (%)	1	0,527421	0,527421	248,69	0,000
Cuadrado	3	0,026376	0,008792	4,15	0,020
DOSIS (µl)*DOSIS (µl)	1	0,002845	0,002845	1,34	0,261
TIEMPO (h)*TIEMPO (h)	1	0,000151	0,000151	0,07	0,793
HUMEDAD (%) * HUMEDAD (%)	1	0,022124	0,022124	10,43	0,004
Interacción de 2 factores	3	0,016237	0,005412	2,55	0,086
DOSIS (µl)*TIEMPO (h)	1	0,000505	0,000505	0,24	0,631
DOSIS (µl)*HUMEDAD (%)	1	0,002130	0,002130	1,00	0,329
TIEMPO (h)*HUMEDAD (%)	1	0,013603	0,013603	6,41	0,020
Error	19	0,040295	0,002121		
Falta de ajuste	15	0,033902	0,002260	1,41	0,401
Error puro	4	0,006393	0,001598		
Total	29	0,710360			

Resumen del modelo

S R-cuad. (ajustado) R-cuad. (pred)
 0,0460522 **94,33%** **91,34%** **85,60%**

Coefficientes codificados

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	0,3633	0,0188	19,33	0,000	
Bloques					
1	-0,01520	0,00841	-1,81	0,087	1,00
DOSIS (µl)	0,0422	0,0115	3,67	0,002	1,00
TIEMPO (h)	0,0635	0,0115	5,52	0,000	1,00
HUMEDAD (%)	0,1816	0,0115	15,77	0,000	1,00
DOSIS (µl)*DOSIS (µl)	-0,0196	0,0169	-1,16	0,261	1,01
TIEMPO (h)*TIEMPO (h)	0,0045	0,0169	0,27	0,793	1,01
HUMEDAD (%)*HUMEDAD (%)	0,0547	0,0169	3,23	0,004	1,01
DOSIS (µl)*TIEMPO (h)	-0,0079	0,0163	-0,49	0,631	1,00
DOSIS (µl)*HUMEDAD (%)	0,0163	0,0163	1,00	0,329	1,00
TIEMPO (h)*HUMEDAD (%)	0,0412	0,0163	2,53	0,020	1,00

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

$$\begin{aligned} \text{Pentosas} = & 1,580 + 0,00128 \text{ DOSIS } (\mu\text{l}) - 0,0206 \text{ TIEMPO (h)} - 0,0571 \text{ HUMEDAD } (\%) \\ & - 0,000061 \text{ DOSIS } (\mu\text{l}) * \text{DOSIS } (\mu\text{l}) + 0,000056 \text{ TIEMPO (h)} * \text{TIEMPO (h)} \\ & + 0,000547 \text{ HUMEDAD } (\%) * \text{HUMEDAD } (\%) - 0,000049 \text{ DOSIS } (\mu\text{l}) * \text{TIEMPO (h)} \\ & + 0,000091 \text{ DOSIS } (\mu\text{l}) * \text{HUMEDAD } (\%) + 0,000458 \text{ TIEMPO (h)} * \text{HUMEDAD } (\%) \end{aligned}$$

Ecuación promediada sobre los bloques.

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	Pentosas	Ajuste	Resid	Resid est.
21	0,7720	0,6937	0,0783	2,21 R

Residuo grande R

Modelo simplificado:

Regresión de superficie de respuesta: Pentosas vs. Bloques; DOSIS (µl); TIEMPO (h); HUMEDAD (%)

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	6	0,664316	0,110719	55,31	0,000
Bloques	1	0,006928	0,006928	3,46	0,076
Lineal	3	0,620524	0,206841	103,32	0,000
DOSIS (µl)	1	0,028530	0,028530	14,25	0,001
TIEMPO (h)	1	0,064572	0,064572	32,25	0,000
HUMEDAD (%)	1	0,527421	0,527421	263,45	0,000
Cuadrado	1	0,023261	0,023261	11,62	0,002
HUMEDAD (%)*HUMEDAD (%)	1	0,023261	0,023261	11,62	0,002
Interacción de 2 factores	1	0,013603	0,013603	6,79	0,016
TIEMPO (h)*HUMEDAD (%)	1	0,013603	0,013603	6,79	0,016
Error	23	0,046045	0,002002		
Falta de ajuste	19	0,039652	0,002087	1,31	0,439
Error puro	4	0,006393	0,001598		
Total	29	0,710360			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,0447431	93,52%	91,83%	88,72%

Coefficientes codificados

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	0,3547	0,0120	29,66	0,000	
Bloques					
1	-0,01520	0,00817	-1,86	0,076	1,00
DOSIS (µl)	0,0422	0,0112	3,78	0,001	1,00
TIEMPO (h)	0,0635	0,0112	5,68	0,000	1,00
HUMEDAD (%)	0,1816	0,0112	16,23	0,000	1,00
HUMEDAD (%) * HUMEDAD (%)	0,0558	0,0164	3,41	0,002	1,00
TIEMPO (h) * HUMEDAD (%)	0,0412	0,0158	2,61	0,016	1,00

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

$$\text{Pentosas} = 1,511 + 0,002346 \text{ DOSIS } (\mu\text{l}) - 0,0204 \text{ TIEMPO (h)} - 0,0557 \text{ HUMEDAD } (\%) + 0,000558 \text{ HUMEDAD } (\%) * \text{HUMEDAD } (\%) + 0,000458 \text{ TIEMPO (h)} * \text{HUMEDAD } (\%)$$

Ecuación promediada sobre los bloques.

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	Pentosas	Ajuste	Resid	Resid est.	R
17	0,4422	0,5347	-0,0925	-2,34	R
21	0,7720	0,6817	0,0904	2,50	R

Residuo grande R

Modelo sin refinar:

Regresión de superficie de respuesta: Aa totales vs. Bloques; DOSIS (µl); TIEMPO (h); HUMEDAD (%)

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	10	0,604553	0,060455	46,85	0,000
Bloques	1	0,010171	0,010171	7,88	0,011
Lineal	3	0,571232	0,190411	147,55	0,000
DOSIS (µl)	1	0,007986	0,007986	6,19	0,022
TIEMPO (h)	1	0,004172	0,004172	3,23	0,088
HUMEDAD (%)	1	0,559073	0,559073	433,23	0,000
Cuadrado	3	0,020870	0,006957	5,39	0,007
DOSIS (µl) * DOSIS (µl)	1	0,003874	0,003874	3,00	0,099
TIEMPO (h) * TIEMPO (h)	1	0,004286	0,004286	3,32	0,084
HUMEDAD (%) * HUMEDAD (%)	1	0,011137	0,011137	8,63	0,008
Interacción de 2 factores	3	0,002280	0,000760	0,59	0,630
DOSIS (µl) * TIEMPO (h)	1	0,000274	0,000274	0,21	0,650
DOSIS (µl) * HUMEDAD (%)	1	0,001933	0,001933	1,50	0,236
TIEMPO (h) * HUMEDAD (%)	1	0,000073	0,000073	0,06	0,815
Error	19	0,024519	0,001290		
Falta de ajuste	15	0,020129	0,001342	1,22	0,467
Error puro	4	0,004390	0,001098		
Total	29	0,629073			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,0359234	96,10%	94,05%	89,78%

Coeficientes codificados

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	0,2084	0,0147	14,21	0,000	
Bloques					
1	0,01841	0,00656	2,81	0,011	1,00
DOSIS (µl)	0,02234	0,00898	2,49	0,022	1,00
TIEMPO (h)	-0,01615	0,00898	-1,80	0,088	1,00
HUMEDAD (%)	0,18693	0,00898	20,81	0,000	1,00
DOSIS (µl)*DOSIS (µl)	-0,0229	0,0132	-1,73	0,099	1,01
TIEMPO (h)*TIEMPO (h)	-0,0241	0,0132	-1,82	0,084	1,01
HUMEDAD (%)*HUMEDAD (%)	0,0388	0,0132	2,94	0,008	1,01
DOSIS (µl)*TIEMPO (h)	0,0059	0,0127	0,46	0,650	1,00
DOSIS (µl)*HUMEDAD (%)	0,0155	0,0127	1,22	0,236	1,00
TIEMPO (h)*HUMEDAD (%)	-0,0030	0,0127	-0,24	0,815	1,00

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

$$\begin{aligned}
 \text{Aa totales} = & 0,486 - 0,00024 \text{ DOSIS } (\mu\text{l}) + 0,0081 \text{ TIEMPO (h)} - 0,0300 \text{ HUMEDAD } (\%) \\
 & - 0,000071 \text{ DOSIS } (\mu\text{l}) * \text{DOSIS } (\mu\text{l}) - 0,000297 \text{ TIEMPO (h)} * \text{TIEMPO (h)} \\
 & + 0,000388 \text{ HUMEDAD } (\%) * \text{HUMEDAD } (\%) + 0,000036 \text{ DOSIS } (\mu\text{l}) * \text{TIEMPO (h)} \\
 & + 0,000086 \text{ DOSIS } (\mu\text{l}) * \text{HUMEDAD } (\%) - 0,000033 \text{ TIEMPO (h)} * \text{HUMEDAD } (\%)
 \end{aligned}$$

Ecuación promediada sobre los bloques.

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	Aa totales	Ajuste	Resid	Resid est.
14	0,2372	0,1551	0,0821	2,97 R

Residuo grande R

Modelo simplificado:

Regresión de superficie de respuesta: Aa totales vs. Bloques; DOSIS (µl); HUMEDAD (%)

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	4	0,590523	0,147631	95,74	0,000
Bloques	1	0,010171	0,010171	6,60	0,017
Lineal	2	0,567059	0,283530	183,87	0,000
DOSIS (µl)	1	0,007986	0,007986	5,18	0,032
HUMEDAD (%)	1	0,559073	0,559073	362,57	0,000
Cuadrado	1	0,013292	0,013292	8,62	0,007
HUMEDAD (%)*HUMEDAD (%)	1	0,013292	0,013292	8,62	0,007
Error	25	0,038550	0,001542		
Falta de ajuste	21	0,034160	0,001627	1,48	0,383
Error puro	4	0,004390	0,001098		
Total	29	0,629073			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,0392682	93,87%	92,89%	91,23%

Coeficientes codificados

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	0,1816	0,0105	17,30	0,000	
Bloques					
1	0,01841	0,00717	2,57	0,017	1,00
DOSIS (µl)	0,02234	0,00982	2,28	0,032	1,00
HUMEDAD (%)	0,18693	0,00982	19,04	0,000	1,00
HUMEDAD (%) * HUMEDAD (%)	0,0422	0,0144	2,94	0,007	1,00

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

$$\mathbf{Aa\ totales = 0,542 + 0,001241\ DOSIS\ (\mu l) - 0,0319\ HUMEDAD\ (\%)} \\ \mathbf{+ 0,000422\ HUMEDAD\ (\%)*HUMEDAD\ (\%)}$$

Ecuación promediada sobre los bloques.

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	Aa totales	Ajuste	Resid	Resid est.	
9	0,0663	0,1408	-0,0745	-2,08	R
30	0,1423	0,2223	-0,0801	-2,23	R

Residuo grande R