

**Universidad de Almería**  
**Facultad de Ciencias Experimentales**  
**Máster en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria**



**Trabajo de Fin de Máster**

**Evaluación de la hidrólisis *in vitro* de cuatro especies  
de microalgas por la acción de productos  
extracelulares bacterianos (ECPs)**

**Autora:**

Paola Lissette Díaz Gamboa

**Directores:**

Dr. Francisco Javier Alarcón López

Dra. Alba Galafat Díaz

**21 de julio de 2022**

**Almería, España**

**2021 – 2022**

## AGRADECIMIENTOS

Mi eterno agradecimiento a la Universidad de Almería por permitirme continuar con mi formación profesional y alcanzar este Máster en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria.

Agradezco infinitamente a mis tutores del trabajo de fin de máster, los doctores PhD. Francisco Javier Alarcón y PhD. Alba Galafat Díaz por su confianza, ayuda y sobre todo por el tiempo dedicado en el desarrollo del presente trabajo de titulación. A todos los docentes a quienes tuve el agrado de conocer durante mi experiencia académica en el Máster en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria, y que impartieron sus conocimientos a lo largo de mi formación académica.

Agradezco a la empresa “*LifeBioencapsulation*”, especialmente a la doctora María Isabel Sáez Casado por darme la oportunidad de alcanzar nuevos conocimientos y experiencia académica durante mi estadía en la empresa. Además, agradezco a las personas que de distintas maneras han estado implicadas en la elaboración de este trabajo; los técnicos del Laboratorio de Zoología, en especial y reiteradamente a la doctora Alba Galafat Díaz por su participación en el diseño de la investigación y trabajo de laboratorio.

Agradezco a la base emocional y motor de mi vida, mi familia, especialmente a mis padres, que con sus consejos fueron mi constante motivación, muchas gracias por su comprensión y confianza. Un especial agradecimiento a mis amigos, que a pesar de la distancia he sentido su apoyo constante y palabras alentadoras para alcanzar esta nueva meta en un país distinto.

Esta investigación ha sido financiada por el proyecto *AquaTech4Feed* (PCI2020-112204) BLUEBIO-ERAMET-cofund financiado por la Agencia Estatal de Investigación (Ministerio de Ciencia e Innovación) y los fondos FEDER, y el proyecto “*Búsqueda de productos extracelulares bacterianos con potencial postbiótico. Aplicación en forma de nanopartículas funcionalizadas para piensos con algas de dorada P20\_00085*”.

# ÍNDICE GENERAL

PORTADA

AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE GENERAL.....	iii
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	8
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
2.1 Microalgas.....	11
2.2 Productos extracelulares bacterianos (ECPs).....	12
2.3 Determinación de actividad proteasa de los ECPs.....	13
2.4 Evaluación de hidrólisis <i>in vitro</i> por acción de los ECPs.....	13
2.5 Análisis estadístico.....	17
3. RESULTADOS.....	18
3.1 Determinación del contenido proteico de la biomasa microalgal.....	18
3.2 Actividad proteasa alcalina total de los ECPs.....	18
3.3 Caracterización secuencial del ensayo de hidrólisis <i>in vitro</i> mediante electroforesis SDS-PAGE.....	19
3.4 Determinación del Coeficiente de Degradación Proteica (CDP) y la liberación de aminoácidos durante la hidrólisis <i>in vitro</i> .....	24
3.5 Determinación de la cantidad de proteína soluble durante el proceso de hidrólisis <i>in vitro</i> .....	27
3.6 Evolución de la liberación de azúcares reductores durante la hidrólisis <i>in vitro</i> .....	28
4. DISCUSIÓN.....	35
5. CONCLUSIONES.....	39
6. BIBLIOGRAFÍA.....	40
7. ANEXOS.....	46

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Contenido de proteína de las biomasas algales utilizadas en el estudio.....	18
<b>Tabla 2.</b> Actividad proteasa alcalina total medida en los productos extracelulares bacterianos (ECPs). .....	19
<b>Tabla 3.</b> Relación entre el coeficiente de degradación proteica (CPD) y el total de aminoácidos liberados durante el proceso de hidrólisis <i>in vitro</i> .....	26
<b>Tabla 4.</b> Resumen de los valores obtenidos en todos los parámetros evaluados al final del ensayo <i>in vitro</i> para las diferentes biomasas algales hidrolizadas por los distintos ECPs (NANNO 169, NANNO 216; CHL 216; TSA 216).....	30
<b>Tabla 5.</b> Resumen de los resultados del análisis discriminante de los distintos ECPs utilizados para la realización de las hidrólisis <i>in vitro</i> y las diferentes microalgas utilizadas en los ensayos, como variables predictoras. ....	34

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación del sistema y proceso de hidrólisis de proteínas <i>in vitro</i> para diferentes microalgas.....	14
<b>Figura 2.</b> Evolución de la proteólisis <i>in vitro</i> de <i>T. galbana</i> , <i>C. vulgaris</i> , <i>A. platensis</i> , <i>N. gaditana</i> y la mezcla de microalgas por el extracto NANNO 169.....	20
<b>Figura 3.</b> Evolución de la proteólisis <i>in vitro</i> de <i>T. galbana</i> , <i>C. vulgaris</i> , <i>A. platensis</i> , <i>N. gaditana</i> y la mezcla de microalgas por el extracto NANNO 216.....	21
<b>Figura 4.</b> Evolución de la proteólisis <i>in vitro</i> de <i>T. galbana</i> , <i>C. vulgaris</i> , <i>A. platensis</i> , <i>N. gaditana</i> y la mezcla de microalgas por el extracto CHL 216. ....	22
<b>Figura 5.</b> Evolución de la proteólisis <i>in vitro</i> de <i>T. galbana</i> , <i>C. vulgaris</i> , <i>A. platensis</i> , <i>N. gaditana</i> y la mezcla de microalgas por el extracto TSA 216.....	23
<b>Figura 6.</b> Evolución del coeficiente de degradación proteica (CDP) durante la hidrólisis de las diferentes microalgas por la acción de distintos ECPs (NANNO 169, NANNO 216; CHL 216; TSA 216). ....	25
<b>Figura 7.</b> Evolución de la liberación de aminoácidos al medio durante la hidrólisis de las diferentes microalgas por la acción de los distintos ECPs ensayados.....	25
<b>Figura 8.</b> Evolución de la concentración de proteína soluble a lo largo del proceso de hidrólisis por acción de los distintos ECPs ensayados .....	28
<b>Figura 9.</b> Evolución de la concentración de azúcares reductores liberados desde las microalgas durante el ensayo <i>in vitro</i> por la acción de los ECPs .....	28
<b>Figura 10.</b> Gráfico de las dos primeras funciones discriminantes establecidas por el análisis discriminante de los distintos ECPs .....	33
<b>Figura 11.</b> Análisis de componentes principales (PCA) realizado en los datos obtenidos tras la hidrólisis <i>in vitro</i> de la biomasa de las microalgas en función de los distintos ECPs (A) y de las microalgas utilizadas ensayadas (B). ....	34

## RESUMEN

En este estudio se evaluó la hidrólisis proteica *in vitro* de la biomasa de cuatro microalgas (*Tisochrysis galbana*, *Chlorella vulgaris*, *Arthrospira platensis* y *Nannochloropsis gaditana* y la mezcla de todas ellas) por las proteasas presentes en los productos extracelulares (ECP) de *Bacillus pumillus* aisladas de intestino de dorada y cultivadas en diferentes medios de cultivos (NANNO 169, NANNO 216, CHL 216 y TSA 216). En general, las proteasas presentes en los ECPs hidrolizaron la proteína de las distintas biomásas microalgales, observándose diferencias significativas entre los extractos NANNO 169 y NANNO 216, respecto a CHL 216 y TSA 216. Los primeros extractos presentaron una actividad proteasa alcalina mayor, obteniéndose los mayores coeficientes de degradación proteica y una liberación de aminoácidos más elevada, principalmente cuando se hidrolizaba la biomasa de *T. galbana* y *A. platensis*. Además, se observó una relación lineal entre el porcentaje de degradación proteica y la liberación de aminoácidos, lo que supone una buena bioaccesibilidad y actividad de las enzimas endo y exoproteasas en estos extractos. Por otro lado, se evaluó la liberación de azúcares reductores como herramienta para evaluar el grado de degradación de la pared celular de las microalgas, pero en este caso los resultados obtenidos fueron poco significativos, con valores de liberación inferiores a 2,5 g de glucosa por cada 100 g de biomasa. Por último, se llevó a cabo un análisis de componentes principales, con el objetivo de obtener una visión general de los ECPs y microalgas utilizadas en el proceso de hidrólisis, pudiendo agruparlas en función de la similitud de sus características. Los resultados obtenidos agruparon los ECPs en dos grupos principales: el primero formado por NANNO 169 y NANNO 216 y el segundo por CHL 216 y TSA 216. Por su parte, las microalgas fueron agrupadas en tres grupos: por un lado *N. gaditana* y *C. vulgaris*; un segundo grupo formado por *A. platensis* y la mezcla de microalgas; y un tercero formado por *T. galbana*. El presente estudio proporciona información valiosa sobre la biodisponibilidad y bioaccesibilidad de la proteína de las microalgas evaluadas, así como de la capacidad de los distintos extractos bacterianos para hidrolizar la proteína de estas, lo que brinda información útil para la posible inclusión de estos ECPs en pienso de acuicultura.

**Palabras claves:** microalgas, acuicultura, hidrólisis *in vitro*, degradación proteica, extracto bacteriano.

## ABSTRACT

This study evaluated the *in vitro* protein hydrolysis of the biomass of four microalgae (*Tisochrysis galbana*, *Chlorella vulgaris*, *Arthrospira platensis* and *Nannochloropsis gaditana* and the mixture of all of them) by the proteases present in the extracellular products (ECP) of *Bacillus pumillus* isolated from the intestine of sea bream and cultured in different culture media (NANNO 169, NANNO 216, CHL 216 and TSA 216). In general, the proteases present in the ECPs hydrolyzed the protein of the different microalgal biomasses, with significant differences between the NANNO 169 and NANNO 216 extracts, compared to CHL 216 and TSA 216. The first extracts presented a higher alkaline protease activity, resulting in the highest coefficients of protein degradation and a higher release of amino acids, mainly in the hydrolysis of *T. galbana* and *A. platensis*. In addition, a linear relationship was observed between the percentage of protein degradation and the release of amino acids, which implies good bioaccessibility and activity of endo- and exoprotease enzymes in these extracts. On the other hand, the release of reducing sugars was evaluated as a tool to assess the degree of degradation of the cell wall of microalgae, but in this case the results obtained were not very significant, with release values lower than 2.5 g of glucose per each 100 g of biomass. Finally, a principal component analysis was carried out, with the aim of obtaining an overview of the ECPs and microalgae used in the hydrolysis process, being grouped according to the similarity of their characteristics. The results obtained grouped the ECPs into two main groups: the first formed by NANNO 169 and NANNO 216 and the second by CHL 216 and TSA 216. On the other hand, the microalgae were grouped into three main groups: on the one hand *N. gaditana* and *C. vulgaris*; a second group formed by *A. platensis* and the mixture of microalgae; and a third formed by *T. galbana*. The present study provides valuable information on the bioavailability and bioaccessibility of the protein of the microalgae evaluated, as well as the ability of the different bacterial extracts to hydrolyze their protein, which provides useful information for the possible inclusion of these ECPs in aquaculture feed.

**Key words:** microalgae, aquaculture, *in vitro* hydrolysis, protein degradation, bacterial extract.

## 1. INTRODUCCIÓN

El constante y acelerado crecimiento de la población mundial, el cambio de hábitos alimentarios, encaminados a la búsqueda de alimentos más sanos, y el estancamiento de la pesca extractiva y la sobreexplotación de los caladeros, han provocado un aumento de la demanda de pescado que está siendo asegurada por el incremento de la producción acuícola (Ahmad *et al.*, 2021; Shen *et al.*, 2021). La acuicultura se ha convertido en el sector alimentario de más rápido crecimiento superior al 5% anual (FAO, 2020). De hecho, se estima que la producción de especies acuicultivadas alcanzará 109 millones de toneladas en 2030, lo que supone un aumento de un 32% respecto a los datos de 2018 (82,1 millones de toneladas) (FAO, 2020).

Actualmente, alrededor del 70% de toda la producción acuícola corresponde a especies de consumo humano directo, lo que equivale aproximadamente a 35,7 millones de toneladas de producto al año (Tacon y Metian, 2015). De estas especies de consumo directo, el cultivo del 68% de ellas depende en su alimentación de piensos inertes, convirtiendo a la alimentación en el factor económico de mayor incidencia en los costes globales de la producción de peces (FAO, 2020; Tacon y Metian, 2015). Es por ello, que cualquier estrategia destinada a mejorar la eficiencia en la utilización nutritiva de los piensos por parte de los animales puede suponer una mejora importante para el sector acuícola.

En este sentido y, a pesar de que en los últimos años se ha reducido el uso de la harina y el aceite de pescado en la elaboración de piensos de acuicultura, su inclusión en las fórmulas acuícolas sigue siendo muy significativa, sobre todo en el cultivo de peces carnívoros (Shah *et al.*, 2017). Este hecho se debe a su elevado contenido en proteína de alta biodisponibilidad y en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA) de la serie omega-3 (Shah *et al.*, 2017; Turchini *et al.*, 2009). Dado que la harina de pescado se produce en buena parte a partir de pesquerías salvajes, su producción es limitada y la sobreexplotación de este recurso genera graves consecuencias para los ecosistemas (Shah *et al.*, 2017), reduciendo significativamente la biodiversidad de los medios marinos e, incluso amenazando a la propia seguridad alimentaria humana entendida como una menor disponibilidad de pescado procedente de la pesca extractiva (FAO, 2012). En este sentido, la búsqueda de ingredientes alternativos, más sostenibles y respetuosos con el medio ambiente que reemplacen a las materias primas derivadas de la pesca extractiva, y que



permitan la expansión de la industria acuícola, se ha convertido en uno de los grandes desafíos actuales en materia de nutrición acuícola (FAO, 2012).

Por otra parte, son numerosos los trabajos que han evaluado proteínas y aceites vegetales como alternativa a la harina y aceite de pescado, observándose mejoras en el crecimiento de los peces, mayores niveles de ciertos ácidos grasos en los músculos de los animales, y una adecuada biodisponibilidad de los nutrientes de origen vegetal que son utilizados relativamente bien como fuente energética por los peces (Stubhaug *et al.*, 2007; Turchini *et al.*, 2009). Sin embargo, algunas materias primas de origen vegetal suelen presentar perfiles nutricionales desequilibrados, con deficiencias en ciertos aminoácidos esenciales, y también contienen factores antinutritivos que dificultan los procesos digestivos y la biodisponibilidad de algunos nutrientes, que pueden reducir las tasas de crecimiento del pez y mermar la calidad del producto final (Li *et al.*, 2009; Turchini *et al.*, 2009).

En este escenario, las microalgas se presentan como alternativa para reducir parcialmente el uso de materias primas convencionales en la elaboración de piensos de acuicultura, dada su composición química, que está caracterizada por un elevado contenido en proteínas, con perfiles de aminoácidos bastante equilibrados (Becker, 2007; Shah *et al.*, 2017). Además, también poseen compuestos bioactivos que ejercen efectos beneficiosos sobre las especies acuicultivadas (Becker, 2007; Shah *et al.*, 2017). De acuerdo con estudios previos, la mayoría de microalgas presentan entre un 30-55% de proteína (González López *et al.*, 2010) y un 20-50% de lípidos en peso seco de la biomasa, aunque en especies de los géneros *Arthrospira* (Cyanobacteria), *Scenedesmus* y *Chorella*, los valores pueden llegar a ser de un 70% y 80% de proteína y lípidos, respectivamente (Roy & Pal, 2015). Sin embargo, el contenido en estos nutrientes puede variar dependiendo de la especie, método y condiciones específicas de cultivo y cosecha (Teuling *et al.*, 2017). En cuanto al contenido en hidratos de carbono, las microalgas presentan entre un 5-30% en peso seco, y su composición varía drásticamente entre especies (Brown *et al.*, 1997). La mayoría de estos carbohidratos se encuentran en forma de almidón, o celulosa y otros polisacáridos estructurales formando parte de la pared celular (Roy & Pal, 2015).

En general, numerosos estudios han evaluado el potencial uso de las microalgas en piensos de acuicultura, observándose un incremento en el crecimiento, un aumento del contenido en lípidos y proteína, una retención selectiva de los ácidos grasos poliinsaturados de la serie omega-3 en el músculo, un aumento de la resistencia a determinadas

enfermedades, y una mejora del estado de condición general del animal (Becker, 2007; Gong *et al.*, 2018; Haas *et al.*, 2016; Reyes-Becerril *et al.*, 2013).

Sin embargo, a pesar de las ventajas citadas asociadas a la utilización de microalgas, su uso generalizado está condicionado por una serie de limiantes que deben solventarse para su aplicación a nivel industrial generalizada (Galafat *et al.*, 2022). En este sentido, algunas microalgas, entre ellas las pertenecientes a los géneros *Chlorella* y *Nannochloropsis*, presentan una pared celular compleja y recalcitrante, rica en celulosa y otros componentes, que puede actuar como una barrera física que reduce la bioaccesibilidad a sus nutrientes y la biodisponibilidad de las sustancias de interés presentes en el interior de la célula (Galafat *et al.*, 2020; Shi *et al.*, 2017; Teuling, Wierenga, *et al.*, 2017; Teuling *et al.*, 2019). Además, esta pared celular presenta particularidades asociadas a cada cepa específica, así como a las condiciones de cultivo y manejo (Teuling, Wierenga, *et al.*, 2017). Asimismo, la eficiencia de los peces para digerir las paredes celulares depende, principalmente, de la composición y estructura química de los polisacáridos que las componen, y de la existencia de enzimas digestivas concretas en el tubo digestivo de los peces (Galafat *et al.*, 2020; Tibbetts *et al.*, 2017). Las enzimas digestivas juegan un papel importante en el proceso de digestión del alimento, hidrolizando las macromoléculas en sus monómeros para permitir su absorción a través de la mucosa intestinal (Assan *et al.*, 2022). Por ejemplo, a diferencia de las especies herbívoras y omnívoras que poseen una amplia y variada gama de enzimas con actividad carbohidrasa, las especies carnívoras carecen de la mayoría de éstas, y esto dificulta la digestión de la biomasa de microalgas (Shi *et al.*, 2017). Por tanto, la utilización de estrategias destinadas a mejorar la capacidad digestiva y la actividad de las enzimas presentes en los procesos de digestión podría suponer una ventaja para la incorporación de la biomasa de microalgas en los piensos.

En este sentido, es bien conocido que las bacterias intestinales ayudan a la digestión de los nutrientes, aumentando la capacidad de digestión y mejorando la utilización del alimento (Assan *et al.*, 2022). El tracto gastrointestinal de los peces alberga una comunidad microbiana compleja (Wu *et al.*, 2020), capaz de sintetizar enzimas hidrolíticas importantes, como proteasas, amilasas y lipasas, que se suman a las enzimas propias de los peces, potenciando la capacidad del conjunto de enzimas que actúan en el tracto gastrointestinal (Suzer *et al.*, 2008), y con ello mejorando la eficiencia en la hidrólisis global del alimento, (Afrilasari *et al.*, 2016; Assan *et al.*, 2022). Además, los microorganismos probióticos desempeñan un papel importante en la protección contra patógenos y la modulación de las

respuestas fisiológicas e inmunológicas en los peces, todo ello a través de la producción de compuestos postbióticos (Balcázar *et al.*, 2006).

Los postbióticos corresponden a productos solubles o subproductos metabólicos secretados por bacterias probióticas vivas, o liberados después de la lisis bacteriana, que brindan beneficios fisiológicos al huésped (Aguilar-Toalá *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2020). Como parte de la acción de los postbióticos tiene lugar una estimulación de la síntesis de enzimas hidrolíticas que incrementa la eficiencia alimenticia y el crecimiento del animal (Assan *et al.*, 2022; Suzer *et al.*, 2008).

Con todo ello, queda reflejada la importancia del uso de postbióticos en la acuicultura dado el papel importante que pueden jugar en aspectos importantes relacionados con la nutrición durante las distintas fases del cultivo de los organismos acuicultivados.

Dadas estas consideraciones, el objetivo principal de este estudio es la evaluación de la hidrólisis proteica *in vitro* de la biomasa de cuatro microalgas (*Tisochrysis galbana*, *Chlorella vulgaris*, *Arthrospira platensis* y *Nannochloropsis gaditana*) por la acción de distintos productos extracelulares (ECPs) obtenidos a partir de bacterias potencialmente probióticas. El objetivo general se desglosa en varios objetivos específicos que incluyen el seguimiento y estudio de la hidrólisis *in vitro* mediante técnicas de electroforesis y por análisis densitométría de los geles, y la cuantificación de los nutrientes liberados, aminoácidos y azúcares reductores. Además, el fin último del Trabajo Fin de Máster es seleccionar el ECP que posea mayor capacidad hidrolítica para su posterior evaluación en un estudio de alimentación *in vivo* en ejemplares juveniles dorada que serán alimentados con piensos suplementados con microalgas.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Microalgas**

En este estudio se utilizó biomasa liofilizada de cuatro especies de distintas de microalgas, *Tisochrysis galbana*, *Chlorella vulgaris*, *Arthrospira platensis*. y *Nannochloropsis gaditana*, además de un pool de microalgas compuesto por una mezcla de las cuatro anteriores a partes iguales. Las microalgas fueron proporcionadas por la empresa LifeBioencapsulation SL (Spin-off de la Universidad de Almería). Se llevó a cabo la

determinación de la proteína bruta ( $N \times 6,25$ ) mediante análisis elemental (C: H: N) con un analizador Fisons EA 1108 (Fisons Instruments, EE. UU.).

## 2.2 Productos extracelulares bacterianos (ECPs)

Las cepas UMA-169 y UMA-216 (ambas *Bacillus pumilus*, aunque filogenéticamente distintas), se aislaron de intestino de doradas (*Sparus aurata*) que se alimentaron durante 108 días con una dieta experimental (45% proteína, 15% lípidos) en la que se sustituyó parcialmente la harina de pescado, el concentrado de soja y la harina de trigo por un 25% de un mix de algas (*Tisochrysis galbana*, *Chlorella vulgaris*, *Arthrospira platensis* y *Nannochloropsis gaditana*). La relación de ingredientes de las dietas se encuentra en el Anexo I. Estas dos cepas se seleccionaron en base a su capacidad para hidrolizar factores antinutritivos, y por capacidad antagonista frente a diversos microorganismos patógenos de peces.

La obtención de los productos extracelulares (ECPs) con potencial postbiótico se llevó a cabo a partir de cultivos de las cepas seleccionadas (UMA-169 y UMA-216) en placas de medio sólido. Las condiciones que se establecieron fueron las siguientes:

- **NANNO 169:** Cepa UMA-169 crecida en medio mínimo M9 suplementado con agar (1,5% de agar) y con un 5% *Nannochloropsis* sp.
- **NANNO 216:** Cepa UMA-216 crecida en medio mínimo M9 suplementado con agar (1,5% de agar) y con 5% *Nannochloropsis* sp.
- **CHL 216:** Cepa UMA-216 crecida en medio mínimo M9 suplementado con agar (1,5% de agar) y con 5% *Chlorella* sp.
- **TSA 216:** Cepa UMA-216 crecida en medio sólido TSA suplementado al 1,5% de NaCl.

Sobre las placas de medio sólido se depositó una membrana estéril de celofán y se inoculó una suspensión de los cultivos de las 2 cepas en fase exponencial (36 h de incubación a 23 °C). Tras la incubación, se recogió el crecimiento bacteriano junto a los ECPs mediante la adición de 2 mL de tampón fosfato salino (PBS) estéril. La suspensión obtenida se centrifugó (10.000 rpm, 20 min, 4 °C) y el sobrenadante se filtró a través de membranas de 0,22 µm de diámetro de poro, según lo especificado por Lee & Ellis (1990).

## 2.3 Determinación de actividad proteasa de los ECPs

La actividad proteasa alcalina total se evaluó mediante el método de Alarcón *et al.* (1998) basado en el ensayo de actividad a tiempo final en la que se emplea caseína al 1% (p/v) tamponada en Tris-HCl 100 mM a pH 9 como sustrato. Brevemente, se incubó 1 mL de la solución del sustrato tamponado con 10 µL de extracto bacteriano durante 30 minutos a 37 °C. Pasado este tiempo, se detuvo la reacción agregando 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 20% (p/v). A continuación, se centrifugaron las muestras (12.000 rpm, 15 min a 4 °C) y se midió la absorbancia del sobrenadante en un espectrofotómetro a 280 nm. Para todas las muestras se realizó un triplicado y se incluyó un ensayo blanco al cual se añadió TCA al 20% antes de iniciar la reacción.

La actividad enzimática se calculó a partir de los valores de absorbancia mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad}(\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}) = \frac{\text{Abs} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{V} \cdot 1000 \cdot \text{D}}{\text{CEM} \cdot \text{Ti} \cdot \text{V}_m}$$

Abs min<sup>-1</sup> = incremento de absorbancia descontando el blanco,

V = volumen final de reacción en mL,

D = dilución empleada,

CEM = coeficiente de extinción molar de la tirosina (0,008 mL µg<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>),

Ti: tiempo de incubación en minutos,

V<sub>m</sub> = volumen de extracto enzimático para cada ensayo.

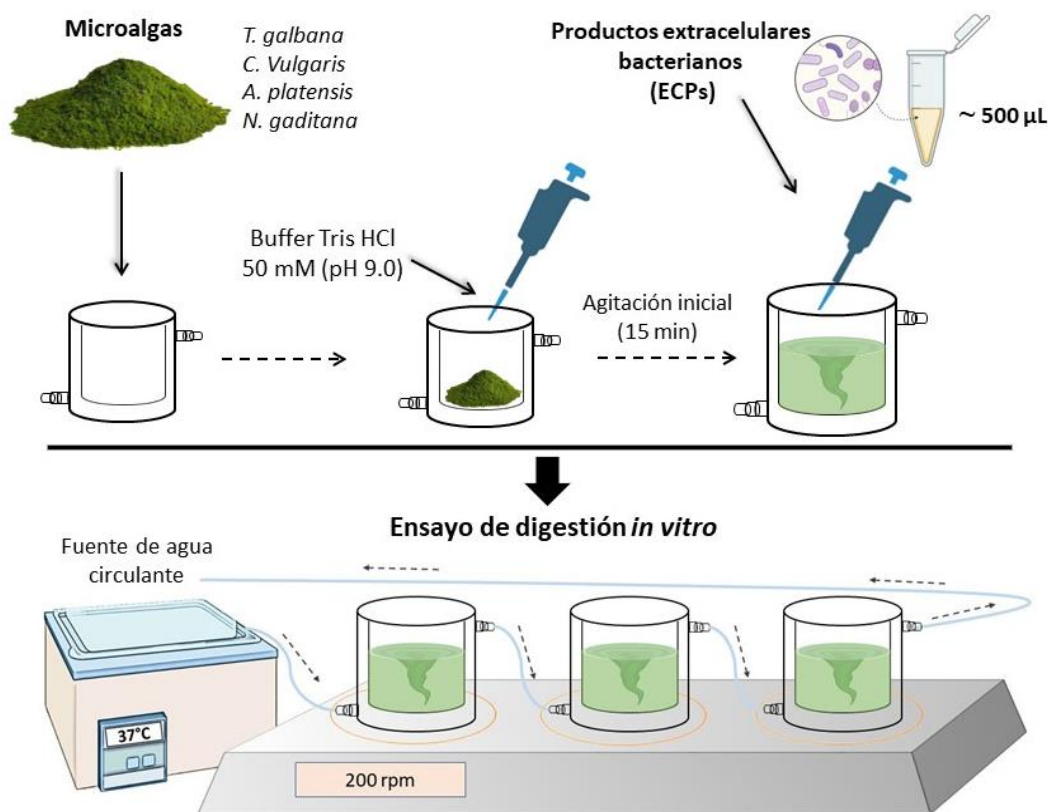
Los valores obtenidos al sustituir los datos en la ecuación se expresaron en Unidades de Actividad (U) por mL, entendiendo como una unidad de actividad a la cantidad de enzima que libera 1 µg de tirosina por minuto en la mezcla de reacción, empleando como coeficiente de extinción molar de la tirosina 0,008 mL µg<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

## 2.4 Evaluación de hidrólisis *in vitro* por acción de los ECPs

### 2.4.1 Hidrólisis *in vitro*

La hidrólisis *in vitro* de la biomasa de las microalgas se llevó a cabo en vasos de reacción de doble camisa de 10 mL conectados a un baño de recirculación de agua que permitió mantener una temperatura constante de 37 °C (**Figura 1**). Todo el sistema se mantuvo bajo agitación continua mediante un agitador magnético. Para cada ensayo, se

suspendió una cantidad conocida de biomasa de microalgas que proporcionaba 80 mg de proteína en tampón TRIS HCl 50 mM, pH 9,0. Antes de iniciar la hidrólisis *in vitro*, la mezcla se mantuvo en agitación durante 15 minutos con el objetivo de homogenizar la biomasa algal en el medio de reacción. Después de este tiempo, se añadieron 0,5 mL de extracto extracelular bacteriano (ECP) para comenzar la reacción. Los controles se llevaron a cabo utilizando una mezcla de reacción con la misma cantidad de microalga, pero sin el producto extracelular bacteriano. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura y agitación constante durante 120 minutos. Durante el transcurso de la hidrólisis enzimática se tomaron muestras a distintos tiempos (0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos), que se almacenaron a -20 °C hasta su posterior uso. Cada ensayo se realizó por triplicado para cada especie de microalga y para cada uno de los ECPs ensayados.



**Figura 1.** Representación del sistema y proceso de hidrólisis de proteínas *in vitro* para diferentes microalgas.

#### 2.4.2 Caracterización secuencial de la hidrólisis *in vitro* mediante electroforesis SDS-PAGE.

Con el objetivo de evaluar el grado de hidrólisis de las principales fracciones proteicas presentes en la biomasa liofilizada de las microalgas se recogieron muestras de 50 µL de la mezcla de reacción en los distintos intervalos de tiempo que se diluyeron (1:1) con

tampón de muestra (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 4% (p/v) SDS; 10% (v/v) 2-mercaptoetanol; 20% (v/v) glicerol; 0,04% (p/v) azul de bromofenol) y se hirvieron durante 5 min con el objetivo de detener la reacción enzimática, y desnaturalizar las proteínas. Siguiendo la metodología descrita por Laemmli (1970), se realizaron electroforesis SDS-PAGE utilizando geles de poliacrilamida al 12% con dimensiones de 8×10×0,075 cm, utilizando un voltaje constante de 100V por gel durante 60 minutos a 4 °C. Adicionalmente, en cada gel se incluyó un volumen determinado de marcador de peso molecular (S-84445 SigmaMarker™, St. Louis, USA) preparada de acuerdo con las instrucciones del fabricante, que consiste en doce proteínas de peso molecular conocido, localizado entre los 200 kDa (miosina de músculo cardíaco porcino) y los 6,5 kDa (aprotinina de pulmón bovino). Tras la electroforesis, los geles obtenidos se lavaron con agua destilada y se tiñeron durante la noche con una solución de tinción (indicar porcentaje de este colorante en la mezcla, azul brillante de Coomassie R, metanol, ácido acético glacial y agua). Posteriormente, la decoloración se realizó en una solución de metanol-ácido acético-agua (35:10:55). Se estimó la movilidad electroforética relativa (Rf) de las principales fracciones observadas en el carril del marcador s, y se calculó el peso molecular mediante la relación lineal entre el Rf y el log<sub>10</sub> del peso molecular de las proteínas patrón utilizando el software específico MyImageAnalysis™ (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). El grado de hidrólisis proteica se evaluó mediante análisis densitométrico de los geles, utilizando el software informático MyImageAnalysis™ (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

### 2.4.3 Cálculo del coeficiente de degradación de proteínas

El grado de hidrólisis proteica obtenido tras el proceso de hidrólisis *in vitro* de la biomasa de microalgas por la acción de los extractos bacterianos se expresó mediante un valor numérico obtenido a partir del porcentaje de disminución de la densidad óptica de cada banda a lo largo del proceso de hidrólisis y la proporción relativa que dicha banda representa en la proteína total separada, siguiendo la metodología descrita por Alarcón *et al.* (2001). Para realizar esta determinación solo se consideraron las bandas que representaban al menos el 10% del total de proteína en la muestra al inicio del ensayo. El valor obtenido se denominó Coeficiente de Degradación Proteica (CDP) y se determinó de acuerdo con la siguiente expresión matemática:

$$CDP = \sum_{i=1}^n \left[ \frac{DO_i(t = 0) - DO_i(t = 120 \text{ min})}{DO_i(t = 0)} \times 100 \right] \times \frac{DO_i(t = 0)}{\sum_{i=1}^n DO_i(t = 0)}$$

donde  $i$  es la banda proteica principal de  $1$  a  $n$ ,  $DO_i$  es la densidad óptica de la banda de proteínas  $i$  y  $t$  es el tiempo de reacción.

#### **2.4.4 Cuantificación de los aminoácidos liberados durante el proceso de hidrólisis**

La cantidad de aminoácidos liberados durante el proceso de hidrólisis *in vitro* por acción de los extractos bacterianos se determinó espectrofotométricamente a 340 nm, utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 (Shimadzu, Kyoto, Japan), de acuerdo con la metodología descrita por Church *et al.* (1983), usando L-leucina como estándar. Esta técnica consiste en la reacción del ortophenilaldehído (OPA) y el  $\beta$ -mercaptoetanol con las aminas primarias de los aminoácidos libres. Los grupos  $\alpha$ -amino liberados en la hidrólisis proteica reaccionan con el OPA y el  $\beta$ -mercaptoetanol para dar lugar a un complejo que absorbe a 340 nm. Las muestras previamente obtenidas en los diferentes intervalos de tiempo (0, 15, 30, 60, 90 y 120 min) se diluyeron (1:1) con TCA al 20% (p/v) con el objetivo de detener la reacción enzimática, y se centrifugaron a 10000 rpm, durante 10 min a 4 °C. Una vez centrifugado, se dispuso de 10  $\mu$ L del sobrenadante y 190  $\mu$ L de reactivo OPA para su posterior cuantificación en microplaca a 340 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado y, adicionalmente, se llevaron a cabo controles con el objetivo de cuantificar la cantidad de aminoácidos libres de las suspensiones de microalgas en ausencia de ECPs, lo que permitió determinar la liberación neta de aminoácidos atribuible a la hidrólisis enzimática generada por las enzimas presentes en los productos extracelulares bacterianos. Previo a la cuantificación de las muestras, se realizó una curva patrón con L-leucina para posteriormente extrapolar los resultados obtenidos. Estos resultados se expresaron como gramos de aminoácidos libres liberados (g de equivalentes de L-leucina)  $100 \text{ g proteína}^{-1}$  en la mezcla de reacción.

#### **2.4.5 Cuantificación de azúcares reductores liberados**

Con el propósito de evaluar el grado hidrólisis de los polisacáridos presentes en las algas, se cuantificó la liberación de azúcares reductores a lo largo de la hidrólisis *in vitro*. La cuantificación de los azúcares reductores liberados durante el proceso se determinó utilizando el método descrito por Miller (1959), utilizando ácido dinitrosalicílico (DNS) y una solución de glucosa  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  como estándar. Una vez que las muestras fueron centrifugadas (10000 rpm, 10 min a 4 °C), el mismo volumen de sobrenadante y reactivo DNS se incubaron durante 5 min a 100 °C. Posteriormente, se añadieron 200  $\mu$ L de agua



destilada y se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de placas. Los ensayos se realizaron por triplicado y, adicionalmente, se llevaron a cabo controles con el objetivo de cuantificar los azúcares reductores liberados de microalgas en ausencia de ECPs.

#### **2.4.6 Determinación del contenido de proteína soluble**

Para cuantificar el contenido de proteínas solubles presente durante el proceso de hidrólisis, se utilizó el método descrito por Bradford (1976), utilizando seroalbúmina bovina ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) como estándar. Para el análisis de las muestras, se ensayaron  $10 \text{ }\mu\text{L}$  del sobrenadante y  $190 \text{ }\mu\text{L}$  del reactivo de Bradford, y se midieron mediante espectrofotometría a 595 nm.

### **2.5 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos en todos los ensayos realizados fueron representados en gráficas y tablas con la correspondiente media  $\pm$  desviación estándar (SD) de al menos tres réplicas. Previo a la realización de la estadística, los datos tratados y representados como porcentajes se normalizaron mediante arcoseno ( $x^{1/2}$ ) y, posteriormente, se comprobó su normalidad (Shapiro-Wilk). El análisis estadístico se llevó a cabo con un ANOVA simple en los datos que describían una distribución paramétrica o con Kruskal-Wallis en aquellas variables con distribución no paramétrica.

En el caso de que las variables mostraran diferencias significativas entre los valores de los distintos tratamientos, estos últimos fueron analizados mediante un test de comparación múltiple; i) test de Tukey para los datos paramétricos, o ii) mediante una gráfica de cajas y bigotes (Box and Whisker Plot) para los no paramétricos. Además, la relación entre la CDP y los aminoácidos liberados se examinó mediante la prueba de correlación de rangos de Spearman, y las correlaciones se consideraron significativas en ( $p < 0,05$ ). Por otra parte, se aplicó un análisis de componentes principales (PCA) y su representación en un biplot para identificar que parámetros (Bradford, OPA, CDP y DNS) explican la mayor proporción de variabilidad y para evaluar los patrones de distribución entre los ECPs. En sí, se describió la estructura e interrelación de variables involucradas en relación con las microalgas y los ECPs, agrupando variables que tienen información semejante (altamente correlacionadas). Finalmente, con el fin de evaluar la viabilidad del ensayo *in vitro* para discriminar la capacidad hidrolítica de los distintos ECPs, se llevó a cabo un Análisis de Componentes Principales (PCA). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software *Stagraphics Plus 4.0* (Rockville, Maryland, EE. UU.).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Determinación del contenido proteico de la biomasa microalgal.

Antes de realizar la hidrólisis *in vitro* de la biomasa microalgal, se evaluó el contenido de proteína total de cada una de ellas (**Tabla 1**). Los resultados pusieron de manifiesto que *A. platensis* mostraba los valores más elevados de contenido en proteína similares, con valores superiores al 60%, mientras que el resto de microalgas mostró valores entorno al 45% de proteína.

**Tabla 1.** Contenido de proteína de las biomazas algales utilizadas en el estudio

Microalgas	Proteína total (%)
<i>Tisochrysis galbana</i>	48,68 ± 0,08 <sup>b</sup>
<i>Chlorella vulgaris</i>	42,68 ± 1,07 <sup>a</sup>
<i>Arthrospira platensis</i>	61,53 ± 0,73 <sup>c</sup>
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	41,40 ± 0,16 <sup>a</sup>
Mix microalgas	49,57 ± 0,54 <sup>b</sup>
<i>p</i>	< 0.001

Los valores representan la media ± SD de las determinaciones por triplicado. Diferentes letras minúsculas en la misma columna indican diferencia significativa entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

#### 3.2 Actividad proteasa alcalina total de los ECPs

De igual manera, se determinó la actividad proteasa alcalina total de cada uno de los productos bacterianos extracelulares utilizados para la realización de las hidrólisis *in vitro*. En general, se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los ECPs, siendo NANNO 169 y NANNO 216 los extractos que presentaron mayor actividad proteasa alcalina total, respecto a lo observado en el resto de los extractos.

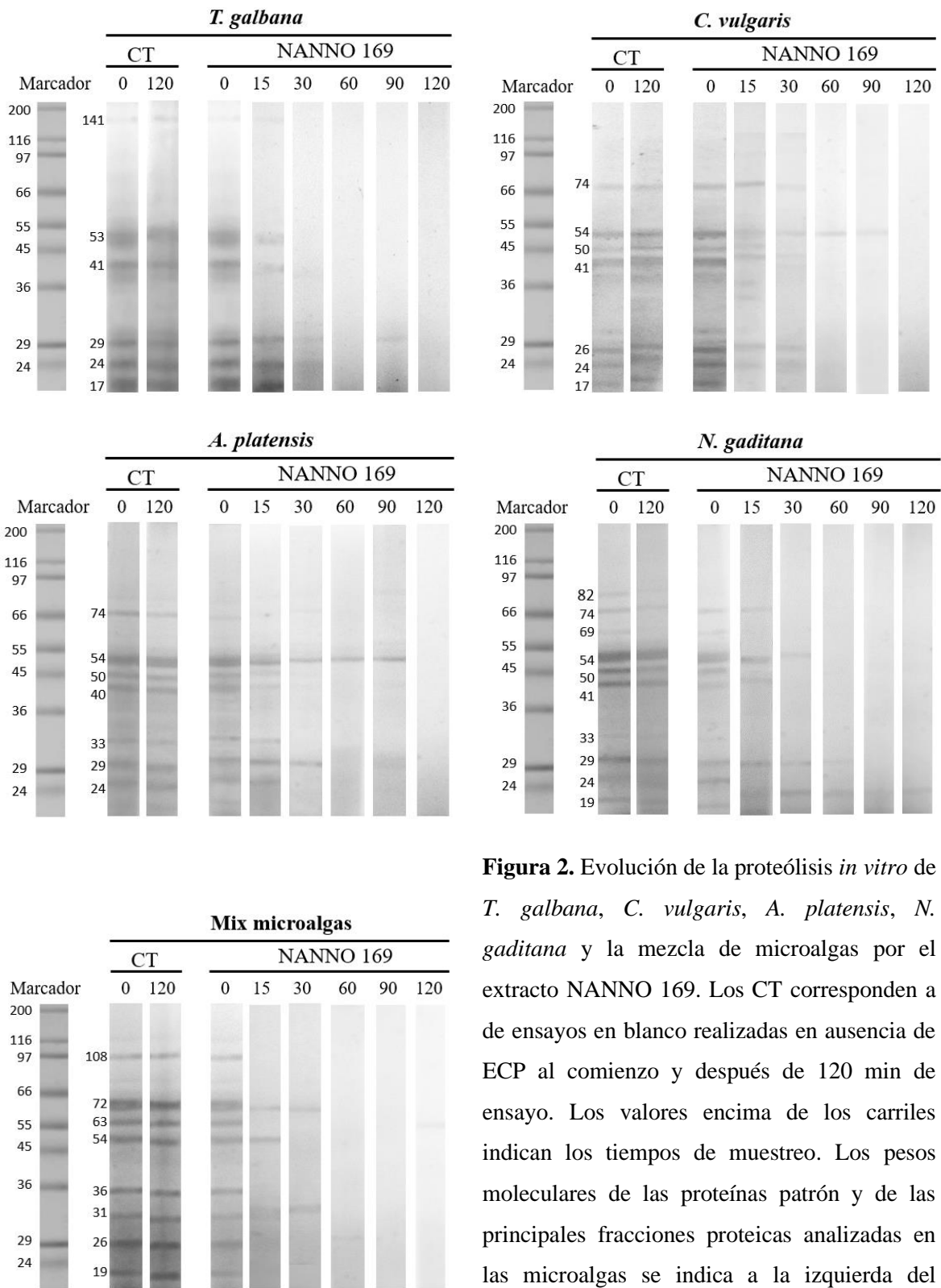
**Tabla 2.** Actividad proteasa alcalina total medida en los productos extracelulares bacterianos (ECPs).

ECPs	Proteasa alcalina (U mL <sup>-1</sup> )
NANNO 169	946,90 ± 41,80 <sup>a</sup>
NANNO 216	853,15 ± 32,25 <sup>a</sup>
CHL 216	242,44 ± 29,55 <sup>c</sup>
TSA 216	363,87 ± 8,59 <sup>b</sup>
<i>p</i>	< 0.0001

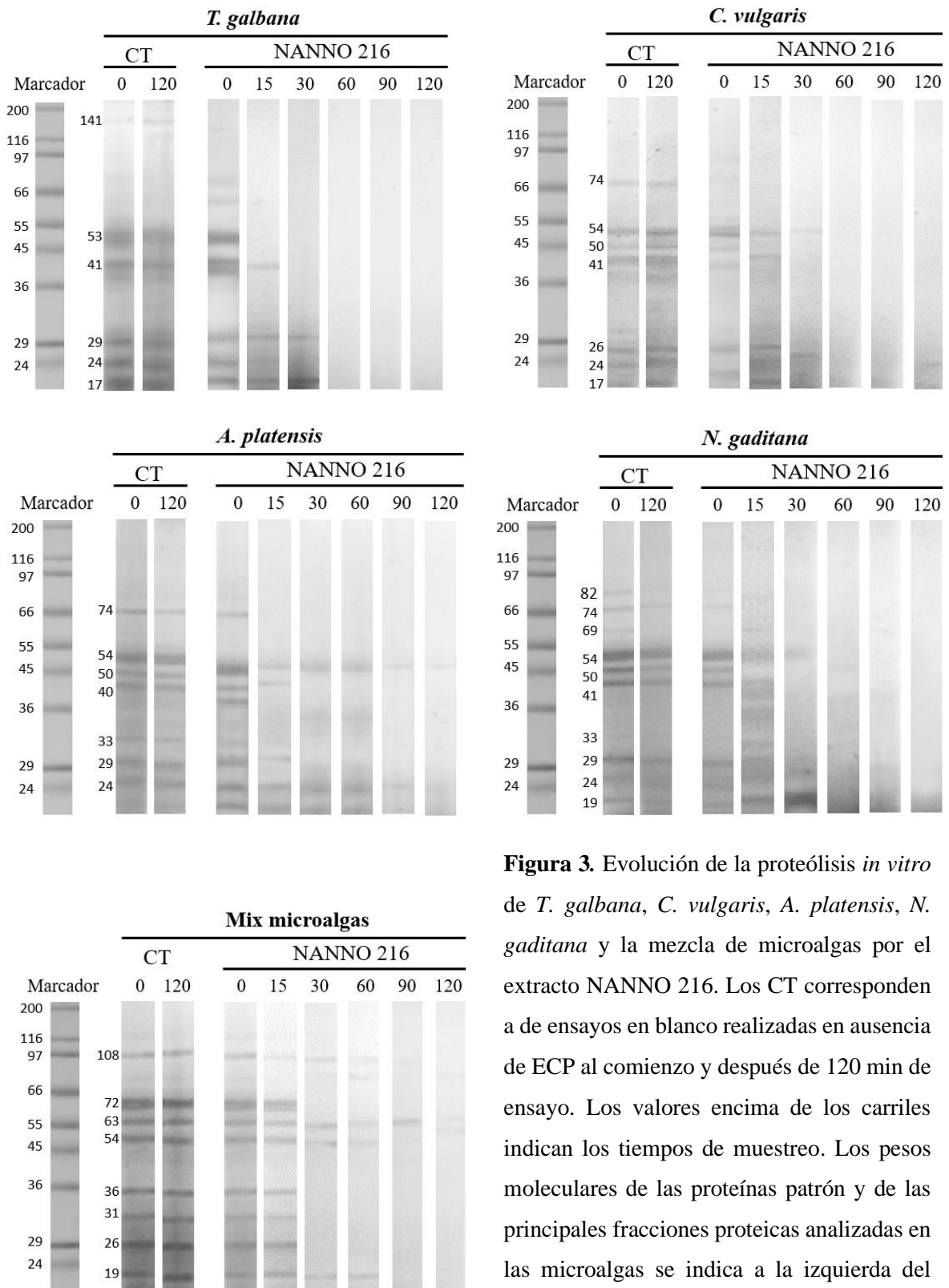
Los valores representan la media ± SD de las determinaciones por triplicado. Diferentes letras minúsculas en la misma columna indican diferencia significativa entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

### 3.3 Caracterización secuencial del ensayo de hidrólisis *in vitro* mediante electroforesis SDS-PAGE.

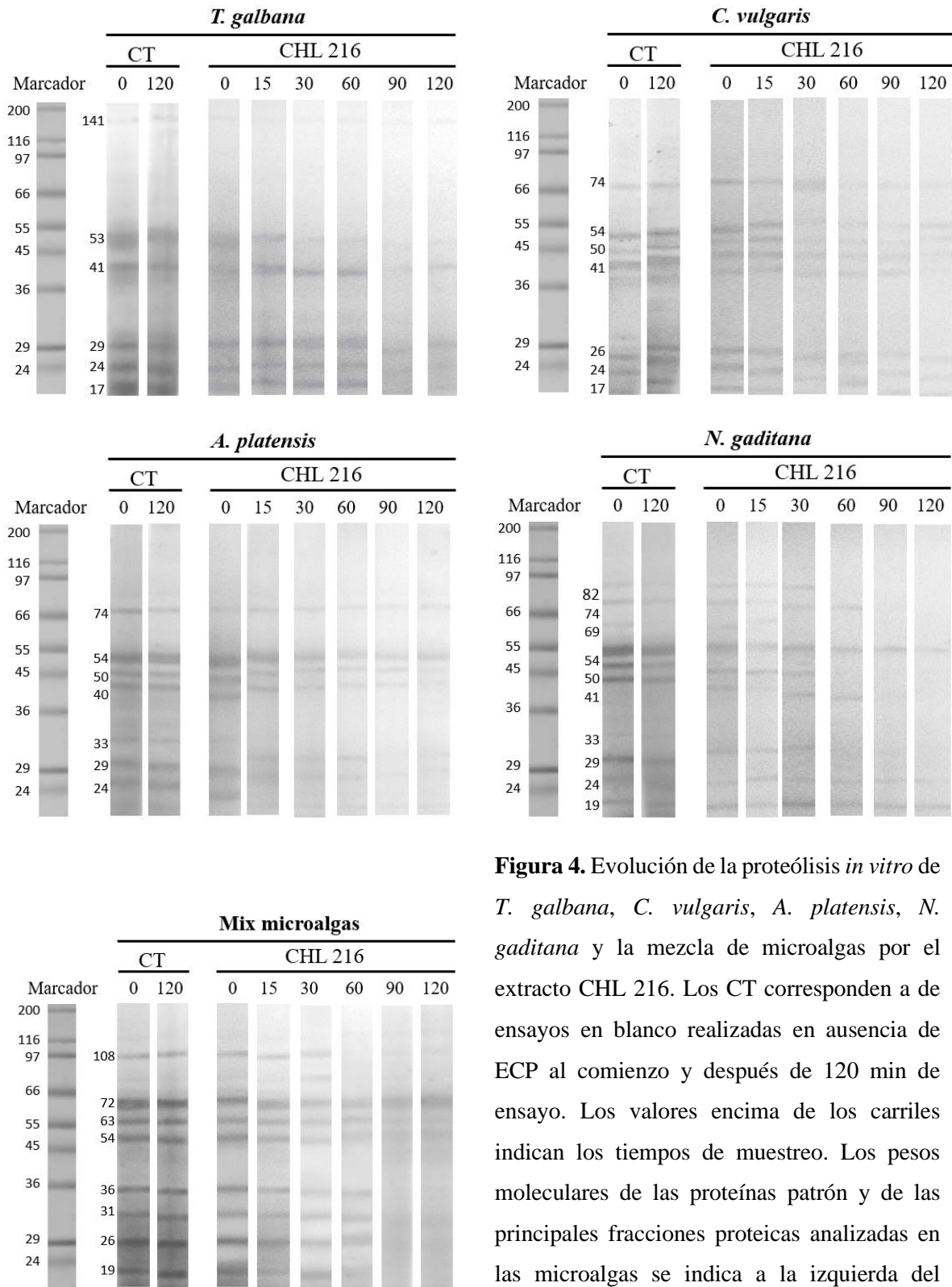
Las **Figuras 2-5** se muestran la evolución de la hidrólisis proteica por acción de productos extracelulares bacterianos durante el transcurso del ensayo *in vitro*. En general, las microalgas mostraron un perfil proteico complejo, formado por varias fracciones con un amplio rango de peso molecular. Concretamente, *T. galbana* mostró seis fracciones de proteína con pesos moleculares comprendidos entre 17 y 141 kDa, mientras que *C. vulgaris* y *A. platensis* mostraron siete fracciones de entre 17 a 74 kDa y 24 a 74 kDa, respectivamente. *N. gaditana* mostró un patrón caracterizado por proteínas con pesos moleculares comprendidos entre 19 a 82 kDa. En todos los casos se observó una degradación progresiva de la mayoría de las fracciones proteicas tras 120 minutos de hidrólisis enzimática. La biomasa de microalgas tratada con los extractos NANNO 169 y NANNO 216 presentaron una proteólisis más rápida y evidente, principalmente en el caso de *N. gaditana* y *A. platensis* que mostraron una rápida degradación a los 30 min, llegando a ser hidrolizadas a los 120 min de reacción. Por último, no se observó hidrólisis de proteína en las muestras de microalgas cuando se realizaron ensayos *in vitro* en ausencia de extractos bacterianos.



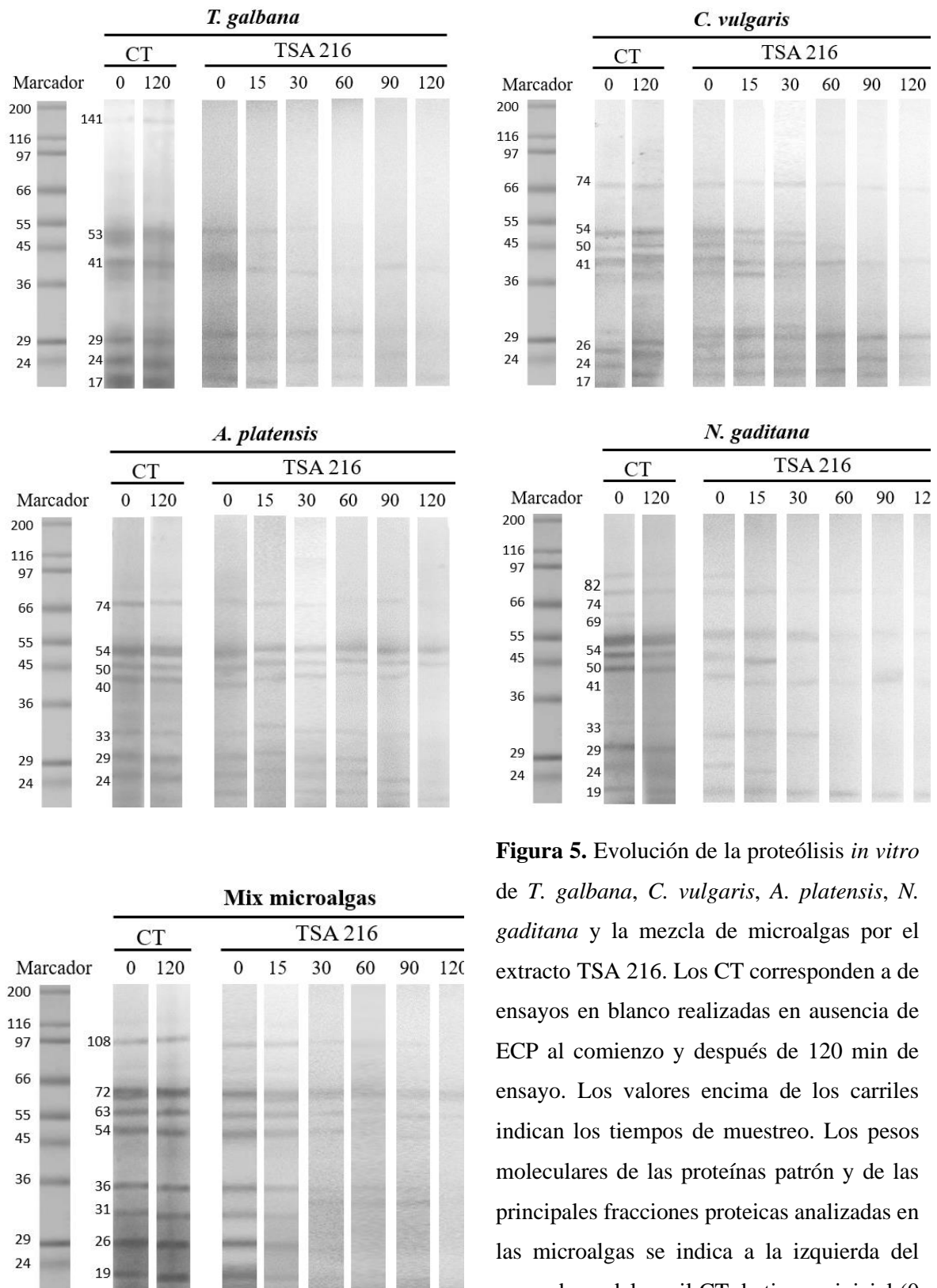
**Figura 2.** Evolución de la proteólisis *in vitro* de *T. galbana*, *C. vulgaris*, *A. platensis*, *N. gaditana* y la mezcla de microalgas por el extracto NANNO 169. Los CT corresponden a de ensayos en blanco realizadas en ausencia de ECP al comienzo y después de 120 min de ensayo. Los valores encima de los carriles indican los tiempos de muestreo. Los pesos moleculares de las proteínas patrón y de las principales fracciones proteicas analizadas en las microalgas se indica a la izquierda del marcador y del carril CT de tiempo inicial (0 min).



**Figura 3.** Evolución de la proteólisis *in vitro* de *T. galbana*, *C. vulgaris*, *A. platensis*, *N. gaditana* y la mezcla de microalgas por el extracto NANNO 216. Los CT corresponden a de ensayos en blanco realizadas en ausencia de ECP al comienzo y después de 120 min de ensayo. Los valores encima de los carriles indican los tiempos de muestreo. Los pesos moleculares de las proteínas patrón y de las principales fracciones proteicas analizadas en las microalgas se indica a la izquierda del marcador y del carril CT de tiempo inicial (0 min).



**Figura 4.** Evolución de la proteólisis *in vitro* de *T. galbana*, *C. vulgaris*, *A. platensis*, *N. gaditana* y la mezcla de microalgas por el extracto CHL 216. Los CT corresponden a de ensayos en blanco realizadas en ausencia de ECP al comienzo y después de 120 min de ensayo. Los valores encima de los carriles indican los tiempos de muestreo. Los pesos moleculares de las proteínas patrón y de las principales fracciones proteicas analizadas en las microalgas se indica a la izquierda del marcador y del carril CT de tiempo inicial (0 min).



**Figura 5.** Evolución de la proteólisis *in vitro* de *T. galbana*, *C. vulgaris*, *A. platensis*, *N. gaditana* y la mezcla de microalgas por el extracto TSA 216. Los CT corresponden a de ensayos en blanco realizadas en ausencia de ECP al comienzo y después de 120 min de ensayo. Los valores encima de los carriles indican los tiempos de muestreo. Los pesos moleculares de las proteínas patrón y de las principales fracciones proteicas analizadas en las microalgas se indica a la izquierda del marcador y del carril CT de tiempo inicial (0 min).

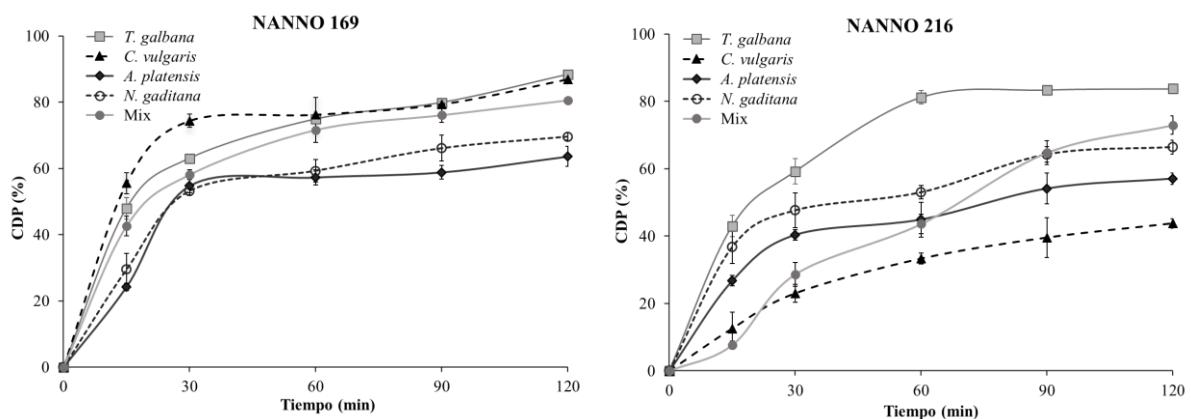
### 3.4 Determinación del Coeficiente de Degradación Proteica (CDP) y la liberación de aminoácidos durante la hidrólisis *in vitro*

La **Figura 6** muestra la evolución del Coeficiente de Degradación Proteica (CDP) estimado a partir del análisis densitométrico de los geles de electroforesis durante el transcurso de la hidrólisis *in vitro*. En general, las microalgas hidrolizadas con los ECPs NANNO 169 y NANNO 216 presentaron valores más altos en su CDP que cuando fueron hidrolizadas por los extractos CHL 216 y TSA 216. En todos los casos se observó una rápida proteólisis durante los primeros 30 min de hidrólisis seguida de una estabilización de este parámetro hasta el final del ensayo.

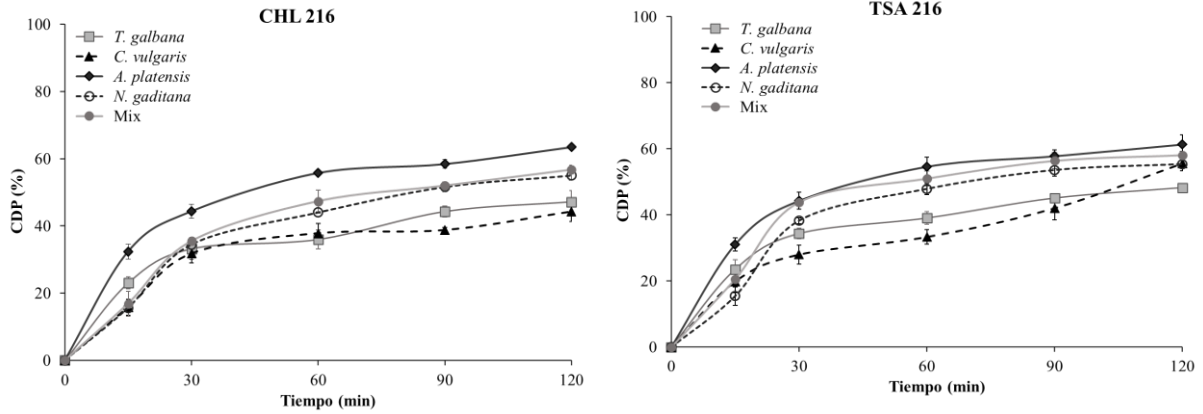
Concretamente, en el proceso hidrolítico realizado con NANNO 169, la biomasa de *C. vulgaris* y *T. galbana* fueron las que mostraron los mayores valores de degradación proteica, llegando a ser superiores al 85% en ambos casos. *A. platensis* mostró un valor más bajo, con un CDP de 63,6%.

En el caso de las hidrólisis realizadas con NANNO 216, nuevamente *Tisochrysis* presentó los valores más elevados (83,8%), seguida de la mezcla de microalgas y la biomasa de *Nannochloropsis*. Sin embargo, la biomasa de *Chlorella* mostró valores más bajos, con un 43,8% de degradación proteica después de 120 min de hidrólisis.

Por último, en las hidrólisis llevadas a cabo utilizando los extractos CHL 216 y TSA 216, la biomasa de *A. platensis* mostró los valores más elevados para este coeficiente, por encima del 60%, mientras que *T. galbana* mostró valores más bajos en ambos casos.



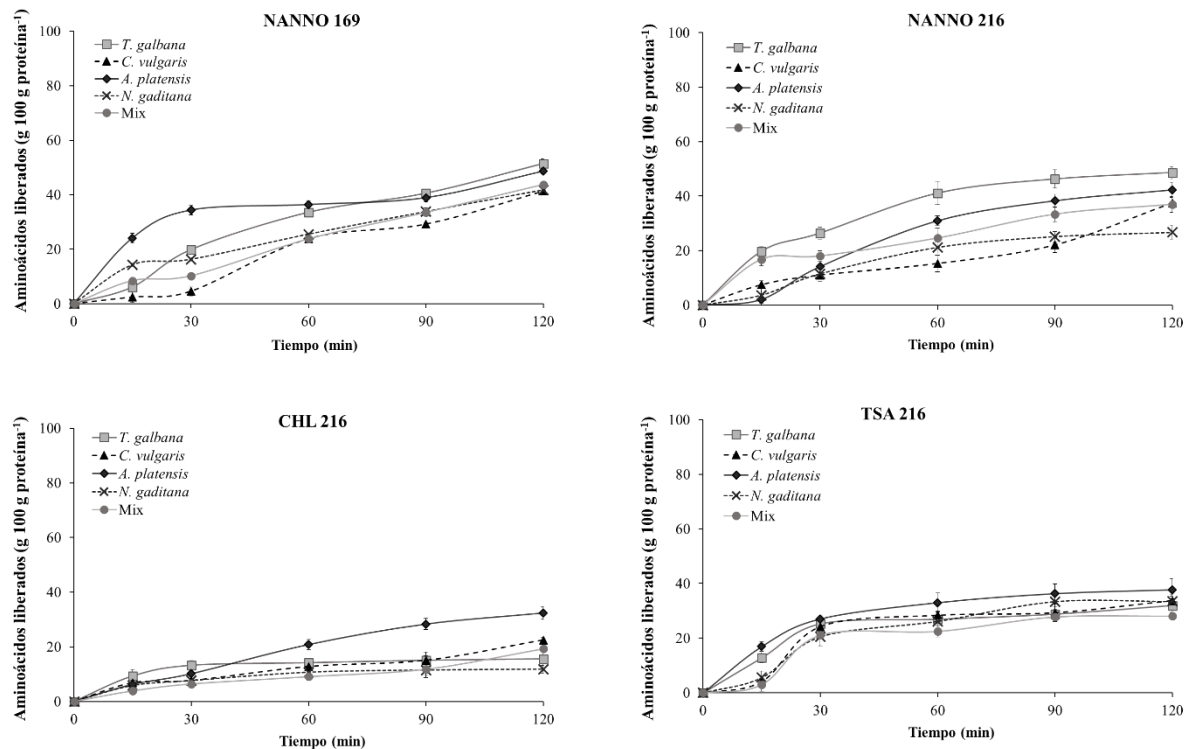




**Figura 6.** Evolución del coeficiente de degradación proteica (CDP) durante la hidrólisis de las diferentes microalgas por la acción de distintos ECPs (NANNO 169, NANNO 216; CHL 216; TSA 216). Los valores representan la media  $\pm$  SD de las determinaciones por triplicado.

### 3.5. Cuantificación de aminoácidos liberados durante el proceso de hidrólisis *in vitro*.

La **Figura 7** muestra los valores de liberación de aminoácidos obtenidos durante el proceso de hidrólisis *in vitro* por acción de los ECPs. En general, se observó una liberación progresiva a lo largo del tiempo de ensayo en todos los casos.



**Figura 7.** Evolución de la liberación de aminoácidos al medio durante la hidrólisis de las diferentes microalgas por la acción de los distintos ECPs ensayados (NANNO 169, NANNO 216; CHL 216; TSA 216). Los valores representan la media  $\pm$  SD de las determinaciones por triplicado.

En general, la liberación de aminoácidos fue superior con los ECPs NANNO 169 y NANNO 216, obteniéndose en torno a 50 g de aminoácidos liberados por cada 100 g de proteína, respecto a los 30 g obtenidos con los otros dos ECPs. Más concretamente, la biomasa de *A. platensis* y *T. galbana* fueron las que mostraron una mayor liberación de aminoácidos al digerirlas con los ECPs, NANNO 169 y NANNO 216, con valores superiores a 40 g de aminoácidos liberados por cada 100 g de proteína. Del mismo modo, *A. platensis* presentó mayores valores por acción de CHL 216 y TSA 216, respecto a lo observado en el resto de microalgas.

Además, se encontró una clara relación lineal entre la evolución de la CDP y la liberación de aminoácidos durante el proceso de hidrólisis en todos los ensayos realizados (Tabla 3), obteniéndose valores de  $R^2$  que oscilaron entre 0,70 y 0,99.

**Tabla 3.** Relación entre el coeficiente de degradación proteica (CPD) y el total de aminoácidos liberados durante el proceso de hidrólisis *in vitro*.

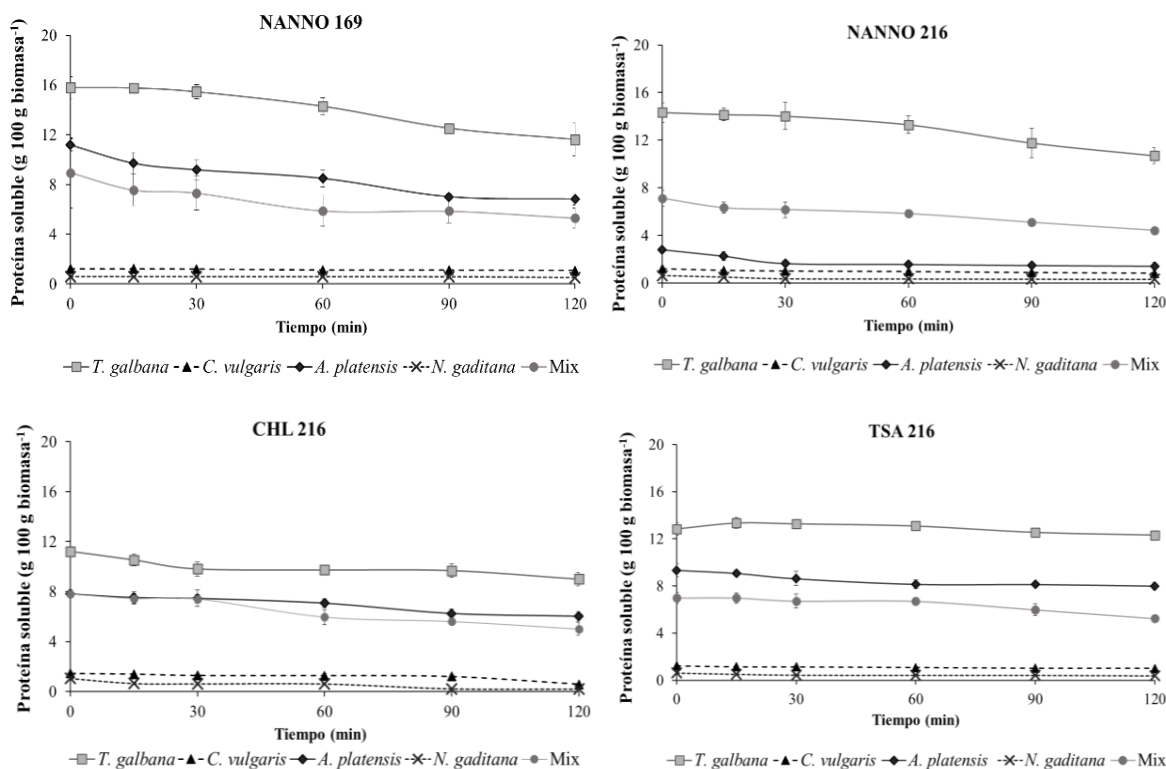
Microalgas	Relación lineal	$R^2$	$p$
<b>NANNO 169</b>			
<i>T. galbana</i>	$y = 0,89x + 44,00$	0,9932	0,0077
<i>C. vulgaris</i>	$y = 0,59x + 62,61$	0,7083	0,0323
<i>A. platensis</i>	$y = 0,57x + 35,98$	0,9613	0,0423
<i>N. gaditana</i>	$y = 0,66x + 42,63$	0,9890	< 0,001
MIX	$y = 0,63x + 54,38$	0,9560	< 0,001
<b>NANNO 216</b>			
<i>T. galbana</i>	$y = 1,41x + 18,80$	0,9575	0,0006
<i>C. vulgaris</i>	$y = 0,81x + 59,28$	0,6900	0,0173
<i>A. platensis</i>	$y = 0,69x + 26,91$	0,9505	0,0104
<i>N. gaditana</i>	$y = 1,21x + 32,36$	0,9461	0,0091
MIX	$y = 2,35x - 13,85$	0,9998	< 0,001
<b>CHL 216</b>			
<i>T. galbana</i>	$y = 3,65x - 12,55$	0,9163	0,0003
<i>C. vulgaris</i>	$y = 0,82x + 26,28$	0,9748	0,0053
<i>A. platensis</i>	$y = 0,81x + 36,87$	0,9663	0,0143
<i>N. gaditana</i>	$y = 5,87x - 15,55$	0,9526	0,0007
MIX	$y = 2,32x + 18,24$	0,7491	0,0191

## TSA 216

<i>T. galbana</i>	$y = 1,28x + 5,80$	0,9318	0,0077
<i>C. vulgaris</i>	$y = 2,98x - 46,44$	0,9280	0,0294
<i>A. platensis</i>	$y = 1,54x + 2,94$	0,9873	< 0,001
<i>N. gaditana</i>	$y = 1,40x + 8,62$	0,9891	0,0002
MIX	$y = 1,48x + 15,70$	0,9842	0,0011

### 3.5 Determinación de la cantidad de proteína soluble durante el proceso de hidrólisis *in vitro*

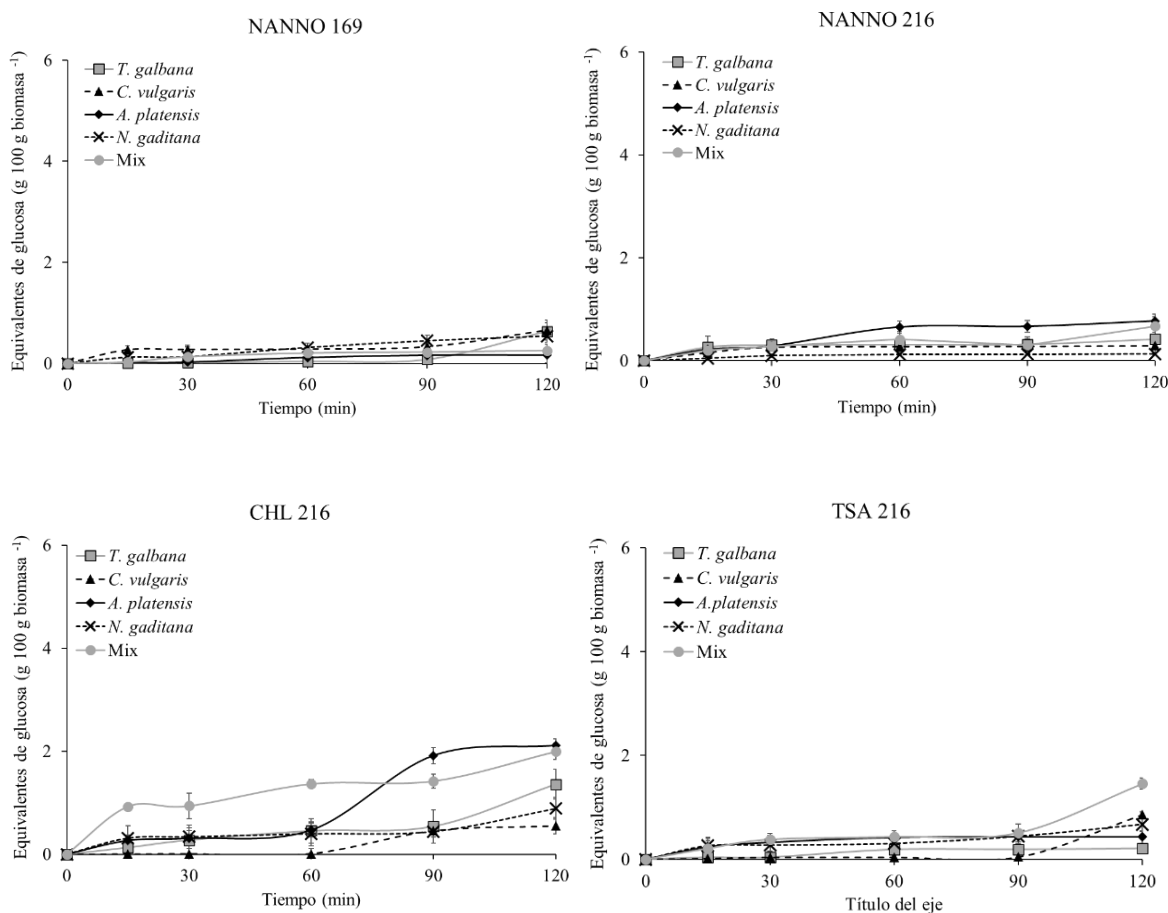
En la **Figura 8** se muestra la cuantificación de la cantidad de proteína soluble a lo largo de los distintos ensayos *in vitro* realizados. En general, se observó que la microalga *T. galbana* presentó una mayor concentración de proteína soluble, seguida de *A. platensis* y de la mezcla de microalgas. *N. gaditana* y *C. vulgaris* mostraron los valores más bajos. Además, se evidenció una disminución de la concentración de proteína soluble a lo largo del transcurso del ensayo *in vitro*, principalmente en el caso de *T. galbana*, *A. platensis* y de la mezcla de microalgas, cuando fueron hidrolizadas por NANO 169 y NANO 216, respecto a lo observado con los otros dos ECPs evaluados, donde esta variación fue menos marcada.



**Figura 8.** Evolución de la concentración de proteína soluble a lo largo del proceso de hidrólisis por acción de los distintos ECPs ensayados (NANNO 169, NANNO 216; CHL 216; TSA 216). Los valores representan la media  $\pm$  SD de las determinaciones por triplicado.

### 3.6 Evolución de la liberación de azúcares reductores durante la hidrólisis *in vitro*.

La **Figura 9** muestra la evolución de la liberación de azúcares reductores durante los 120 minutos de hidrólisis *in vitro*. En general, se observó una liberación muy reducida de azúcares por acción de los ECPs, obteniéndose valores inferiores a 2,5 g de equivalentes de glucosa liberados por cada 100 g de biomasa algal en todos los casos. Los valores más altos fueron obtenidos para los ECPs TSA y CHL 216, mientras que para los ECPs NANNO 169 y NANNO 216 los valores fueron más bajos en todas las microalgas.



**Figura 9.** Evolución de la concentración de azúcares reductores liberados desde las microalgas durante el ensayo *in vitro* por la acción de los ECPs (NANNO 169, NANNO 216; CHL 216; TSA 216). Los valores representan la media  $\pm$  SD de las determinaciones por triplicado.

Finalmente, la **Tabla 4** resume los valores finales obtenidos tras el proceso de hidrólisis *in vitro* en todos los parámetros evaluados, teniendo en cuenta el tipo de microalga y ECPs utilizados. En todos los casos se evidenciaron diferencias significativas atribuibles tanto al tipo de microalga como al ECP utilizado en el ensayo *in vitro*. En general, los valores más elevados de CDP se obtuvieron cuando la biomasa de *T. galbana*, *C. vulgaris* y la mezcla de microalgas fue hidrolizada con NANNO 169, mientras que los valores más bajos fueron los obtenidos en la hidrólisis de *C. vulgaris* y *T. galbana* por el extracto CHL 216.

Por otro lado, *T. galbana* hidrolizada con NANNO 169 mostró los valores más elevados de liberación de aminoácidos, mientras que de nuevo *C. vulgaris*, *T. galbana* y *N. gaditana* hidrolizadas con CHL 216 mostraron los valores más bajos para esta determinación.

En cuanto a la cuantificación de la proteína soluble, en general se observó que la biomasa de *N. gaditana* mostraba los valores más elevados, mientras que *T. galbana* revelaba los peores resultados, independientemente del extracto utilizado para la realización de la hidrólisis *in vitro*.

Por último, y aunque los resultados fueron poco significativos, el extracto CHL 216 provocó la mayor liberación de azúcares reductores al hidrolizar la biomasa *T. galbana* y *A. platensis*.

**Tabla 4.** Resumen de los valores obtenidos en todos los parámetros evaluados al final del ensayo *in vitro* para las diferentes biomazas algales hidrolizadas por los distintos ECPs (NANNO 169, NANNO 216; CHL 216; TSA 216).

CDP (%)						
ECPs	<i>T. galbana</i>	<i>C. vulgaris</i>	<i>A. platensis</i>	<i>N. gaditana</i>	Mix	<i>p</i>
NANNO 169	88,35 ± 0,178 <sup>dB</sup>	86,89 ± 0,04 <sup>dC</sup>	63,60 ± 3,03 <sup>a</sup>	69,57 ± 1,00 <sup>bB</sup>	80,51 ± 0,65 <sup>cC</sup>	<0,001
NANNO 216	83,77 ± 0,17 <sup>dB</sup>	43,77 ± 1,44 <sup>aA</sup>	57,04 ± 1,67 <sup>b</sup>	66,44 ± 2,07 <sup>cB</sup>	72,97 ± 2,80 <sup>cB</sup>	<0,001
CHL 216	47,16 ± 3,33 <sup>aA</sup>	44,26 ± 3,00 <sup>aA</sup>	63,47 ± 0,04 <sup>c</sup>	55,00 ± 1,40 <sup>bA</sup>	56,69 ± 1,39 <sup>bA</sup>	0,0017
TSA 216	48,27 ± 0,57 <sup>aA</sup>	55,57 ± 1,46 <sup>bB</sup>	61,33 ± 2,89 <sup>b</sup>	55,35 ± 1,92 <sup>abA</sup>	58,09 ± 1,16 <sup>bA</sup>	0,0058
<i>p</i>	< 0,001	0,0001	0,1183	0,0018	0,0004	
OPA (g aminoácidos liberados 100 g proteína <sup>-1</sup> )						
NANNO 169	51,47 ± 0,96 <sup>bC</sup>	41,35 ± 1,42 <sup>aB</sup>	48,64 ± 2,79 <sup>bC</sup>	41,72 ± 2,10 <sup>aD</sup>	43,72 ± 0,55 <sup>aD</sup>	0,001
NANNO 216	48,66 ± 2,79 <sup>cC</sup>	37,51 ± 1,92 <sup>bAB</sup>	42,27 ± 2,22 <sup>bcB</sup>	26,67 ± 2,48 <sup>aB</sup>	36,96 ± 2,92 <sup>bc</sup>	<0,001
CHL 216	15,62 ± 2,36 <sup>abA</sup>	22,51 ± 1,05 <sup>cB</sup>	32,42 ± 2,62 <sup>dB</sup>	11,81 ± 1,39 <sup>aC</sup>	19,30 ± 2,66 <sup>bB</sup>	<0,001
TSA 216	31,94 ± 4,07 <sup>abB</sup>	33,71 ± 1,76 <sup>abA</sup>	37,72 ± 2,54 <sup>bA</sup>	33,45 ± 2,47 <sup>abA</sup>	28,09 ± 0,86 <sup>aA</sup>	0,0132
<i>p</i>	<0,001	<0,001	0,0003	<0,001	<0,001	
Bradford (g proteína soluble 100 g biomasa <sup>-1</sup> )						

NANNO 169	11,61 ± 1,31 <sup>e</sup>	1,07 ± 0,06 <sup>bb</sup>	6,82 ± 0,48 <sup>d</sup>	0,52 ± 0,04 <sup>a</sup>	5,30 ± 0,80 <sup>cAB</sup>	0,0090
NANNO 216	10,70 ± 0,68 <sup>d</sup>	0,84 ± 0,22 <sup>bAB</sup>	1,47 ± 0,30 <sup>b</sup>	0,32 ± 0,07 <sup>a</sup>	4,43 ± 0,19 <sup>cA</sup>	0,0091
CHL 216	9,00 ± 0,53 <sup>e</sup>	0,58 ± 0,03 <sup>aA</sup>	6,02 ± 0,38 <sup>d</sup>	0,20 ± 0,05 <sup>a</sup>	5,00 ± 0,52 <sup>bAB</sup>	<0,001
TSA 216	12,30 ± 0,33 <sup>d</sup>	1,01 ± 0,0 <sup>bb</sup>	7,99 ± 0,34 <sup>d</sup>	0,39 ± 0,04 <sup>a</sup>	5,24 ± 0,26 <sup>cB</sup>	<0,001
<i>p</i>	0,0981	0,0055	0,0520	0,0711	0,0346	

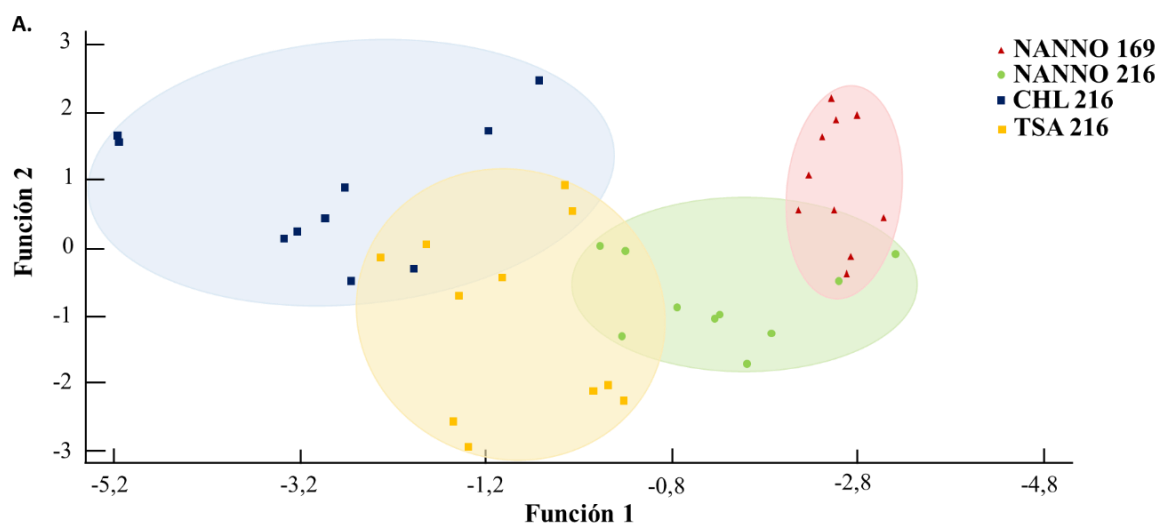
**DNS (g equivalentes glucosa liberados 100 g biomasa<sup>-1</sup>)**

NANNO 169	0,63 ± 0,22 <sup>bA</sup>	0,66 ± 0,15 <sup>bb</sup>	0,16 ± 0,15 <sup>aA</sup>	0,54 ± 0,08 <sup>bb</sup>	0,25 ± 0,12 <sup>aA</sup>	<0,001
NANNO 216	0,42 ± 0,13 <sup>bA</sup>	0,29 ± 0,13 <sup>bA</sup>	0,77 ± 0,16 <sup>cC</sup>	0,13 ± 0,02 <sup>aA</sup>	0,67 ± 0,18 <sup>cB</sup>	<0,001
CHL 216	1,36 ± 0,29 <sup>cB</sup>	0,55 ± 0,16 <sup>aAB</sup>	2,18 ± 0,13 <sup>dD</sup>	0,89 ± 0,21 <sup>aD</sup>	1,99 ± 0,16 <sup>dD</sup>	<0,001
TSA 216	0,21 ± 0,01 <sup>aA</sup>	0,86 ± 0,06 <sup>dC</sup>	0,43 ± 0,12 <sup>bb</sup>	0,67 ± 0,14 <sup>cC</sup>	1,46 ± 0,11 <sup>eC</sup>	<0,001
<i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	

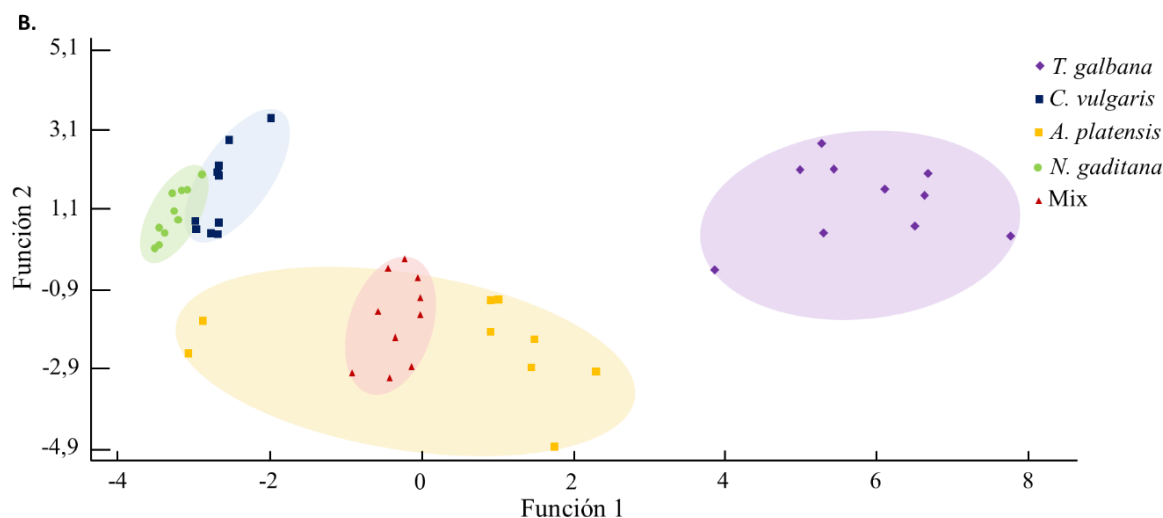
Los valores representan la media ± SD de las determinaciones por triplicado. Las letras minúsculas colocadas en una misma fila indican diferencias significativas entre la biomasa de las distintas microalgas para un determinado ECP. Las letras mayúsculas colocadas en una misma columna indican diferencias significativas en la acción de los distintos ECPs para una determinada microalga.

Finalmente, todos los parámetros estudiados se analizaron mediante un análisis discriminante con el objetivo de establecer distintas categorías de ECPs y de microalgas evaluadas en base a los resultados obtenidos (**Figura 10**). El agrupamiento se realizó estableciendo como criterio de clasificación el tipo de ECP utilizado en el ensayo *in vitro* (A) y la especie concreta de microalga utilizada (B). En el caso de la clasificación en función de los ECPs, el análisis discriminante confirmó que la Función 1 fue capaz de discriminar dos grupos principales, el primero formado por NANNO 169 y NANNO 216, siendo NANNO 169 el más alejado, y el segundo formado por CHL 216 y TSA 216. La Función 2 proporcionó una discriminación menos evidente de CHL 216 respecto a TSA 216, y de NANNO 169 respecto a NANNO 216.

Por otro lado, en el caso de la clasificación en función de la especie de microalga evaluada, se obtuvieron tres grupos claros, el primero de ellos formado por *C. vulgaris* y *N. gaditana*, el segundo formado por *A. platensis* y el Mix de microalgas, y un tercer grupo formado por *T. galbana*. En este caso, la Función 1 discriminó claramente entre el grupo formado por *C. vulgaris* y *N. gaditana*, y *T. galbana*, quedándose *A. platensis* y la mezcla de microalgas en una posición intermedia. Sin embargo, la Función 2, discriminó dos grupos, uno formado por *C. vulgaris*, *N. gaditana* y *T. galbana* y un segundo formado por *A. platensis* y la mezcla de microalgas.

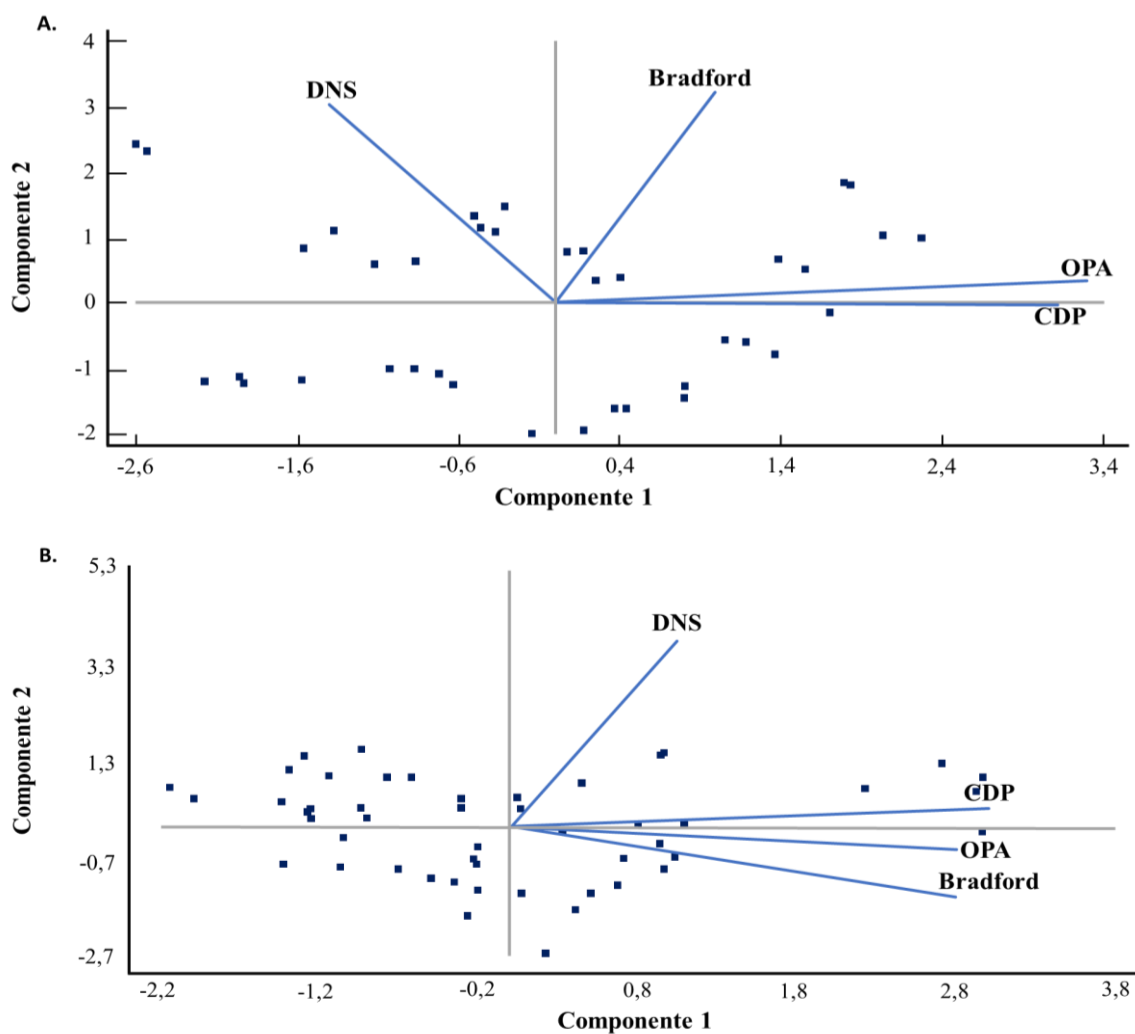






**Figura 10.** Gráfico de las dos primeras funciones discriminantes establecidas por el análisis discriminante de los distintos ECPs utilizados para la realización de las hidrólisis *in vitro* (A) y de las distintas microalgas evaluadas (B).

Además, se utilizó un análisis de componentes principales (PCA) como método simple para establecer los factores que más influyeron en las agrupaciones obtenidas (**Figura 11**). Los valores de CDP y OPA presentaron una gran influencia para explicar la variación del componente 1 en el caso de la agrupación en función de los ECPs utilizados, mientras que, en el caso de la agrupación en función de la microalga ensayada, la proteína soluble fue también decisiva para explicar la variación de este componente. Por otro lado, los azúcares reductores liberados y la proteína soluble fueron los factores más influyentes para la agrupación de los datos en ambos componentes en el caso de la agrupación en función de los ECPs, si bien con coeficientes más bajos respecto al componente 1, mientras que la cuantificación de azúcares reductores fue la variable más influyente para explicar la variación en la componente 2 cuando los datos se evaluaron en función de la especie de microalga evaluada. Los resultados del PCA permitieron explicar el 84,29% y el 79,25% de la varianza observada a partir de la primera función discriminante en el caso de la agrupación en función de los ECPs y las microalgas utilizadas, respectivamente (**Tabla 5**).



**Figura 11.** Análisis de componentes principales (PCA) realizado en los datos obtenidos tras la hidrólisis *in vitro* de la biomasa de las microalgas en función de los distintos ECPs (A) y de las microalgas utilizadas ensayadas (B).

**Tabla 5.** Resumen de los resultados del análisis discriminante de los distintos ECPs utilizados para la realización de las hidrólisis *in vitro* y las diferentes microalgas utilizadas en los ensayos, como variables predictoras.

Función discriminante	Eigenvalor	Porcentaje relativo	Correlación canónica	$\lambda$ de Wilk	$X^2$	GL	$p$
<b>ECPs</b>							
1	4,94	84,29	0,91	0,086	85,94	12	<0,0001
2	0,87	14,87	0,22	0,051	23,60	6	0,0006
<b>Microalgas</b>							
1	11,91	79,25	0,96	0,017	177,55	16	<0,0001
2	2,96	19,71	0,86	0,218	66,26	9	<0,0001

## 4. DISCUSIÓN

El conocimiento y optimización del uso de las materias primas, los nutrientes y la digestibilidad de estos son elementos clave en el desarrollo y éxito de la acuicultura como industria de producción de alimentos. En este sentido, algunas especies de microalgas tienen el potencial para reducir la dependencia de las materias primas convencionales utilizadas en nutrición acuícola debido, principalmente, a su contenido en proteínas, lípidos, vitaminas y carotenoides (Shah *et al.*, 2017). Aunque, más allá de la composición general y el perfil de aminoácidos esenciales, la digestibilidad de la proteína es uno de los criterios más importantes que define el valor nutricional de los ingredientes del alimento (Tibbetts *et al.*, 2017). Por tal razón, se ha incrementado el número de estudios destinados a identificar posibles estrategias que permitan mejorar el uso de microalgas como materia prima para la elaboración de piensos de acuicultura. Como parte de estas estrategias aparece la utilización de probióticos y postbióticos, que se presenta como una potencial táctica para mejorar y aumentar la biodisponibilidad y aprovechamiento de los ingredientes destinados a la acuicultura. Respecto a esto, el tracto gastrointestinal de un pez sano se considera una fuente idónea para el aislamiento de probióticos y posterior obtención de postbióticos, lo que hace que tengan un gran interés para su utilización en la obtención de estos productos (Lazado & Caipang, 2014; Liu *et al.*, 2020; Ramesh *et al.*, 2015). Concretamente, se llevó a cabo el aislamiento de *Bacillus pumilus* del intestino de los peces que habían sido alimentados con un pienso suplementado con una mezcla de microalgas. *Bacillus* sp. es una bacteria con capacidad para producir una amplia gama de enzimas, entre ellas amilasas, lipasas y proteasas, que podrían mejorar la digestión y utilización del alimento en el pez, y con ello, el rendimiento del crecimiento (Liu *et al.*, 2012; Thy *et al.*, 2017). Esta bacteria ya había sido evaluada como probiótico en otros trabajos, obteniéndose mejoras en el crecimiento, la eficiencia alimenticia y la respuesta inmune no específica en palometa (*Trachinotus ovatus*) y tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Hassaan *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2020), pero el estudio de los productos extracelulares (ECP) obtenidos a partir de este probiótico no ha sido abordado previamente. En este sentido, se caracterizó la capacidad de diferentes ECPs, aislado del intestino de dorada, para hidrolizar la proteína de las microalgas. Se observó que todos los ECPs evaluados mostraban actividad proteasa alcalina, si bien los ECPs NANNO 169 y NANNO 216 mostraban una mayor actividad.

La hidrólisis *in vitro* es un procedimiento sencillo, barato y que brinda una gran cantidad de información acerca de la capacidad hidrolítica de un extracto concreto (Silva *et*

*al.*, 2015). De hecho, esta técnica ha sido ampliamente probada en distintas especies de peces acuicultivos como trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), orada (*S. aurata*) o lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) (Alarcón *et al.*, 1998; Galafat *et al.*, 2020; Tibbetts *et al.*, 2017; Vizcaíno *et al.*, 2019), y proporciona información cuantitativa acerca de la susceptibilidad de la proteína de un ingrediente concreto para ser hidrolizada por las proteasas digestivas del animal. Sin embargo, los estudios que usan de extractos bacterianos como postbióticos para la degradación proteica de microalgas son limitados.

La susceptibilidad de una proteína para ser hidrolizada por proteasas viene determinada por una serie de factores, entre los que se encuentra la complejidad estructural y el perfil de aminoácidos (Galafat *et al.*, 2020; Tibbetts *et al.*, 2017). En este estudio, se llevó a cabo una hidrólisis *in vitro* de la biomasa de cuatro microalgas y la mezcla de ellas con los ECPs extraídos del probiótico *Bacillus pumilus*. El análisis de proteinogramas y posterior cálculo del coeficiente de degradación proteica (CDP) a partir de las fracciones proteicas observadas en los geles, mostró que la proteína de la biomasa de las distintas microalgas evaluadas fue fácilmente hidrolizada por las proteasas presentes en los ECPs, observándose una clara disminución de la densidad óptica de las bandas del gel de electroforesis, unida a un incremento rápido del CDP en los primeros minutos de hidrólisis, lo que pone de manifiesto una buena bioaccesibilidad de la proteína contenida en la biomasa de microalgas. Si bien se observaron diferencias en la capacidad hidrolítica de los extractos bacterianos, de manera que NANNO 169 y NANNO 216 produjeron valores más altos en el grado de hidrólisis de la proteína, lo que refleja una mayor actividad endoproteasa en estos extractos, responsable de hidrolizar los enlaces peptídicos internos en la proteína, generando péptidos de menos tamaño (Sáenz de Rodríguez *et al.*, 2011; Vizcaíno *et al.*, 2019).

La existencia de microalgas con diferentes tasas de hidrólisis proteica y su relación con la liberación de aminoácidos es de gran interés en el sector acuícola, especialmente en la nutrición de los peces. Esta importancia radica en el hecho de que la eficiencia de absorción de los aminoácidos depende, en gran medida, de las concentraciones de aminoácidos específicos disponibles en el intestino (Ahmad *et al.*, 2021; Gómez-Requeni *et al.*, 2003). En este sentido, aquellas proteínas que presentan una hidrólisis elevada, liberan aminoácidos con facilidad y rapidez, lo que resulta en una mejora en los procesos de digestión y absorción intestinal, así como en una estimulación del metabolismo (Gómez-Requeni *et al.*, 2003; Vizcaíno *et al.*, 2019). Pero el grado de proteólisis no sólo depende de

la buena bioaccesibilidad de la proteína, sino que también depende de que exista la batería de exoproteasas adecuadas en el extracto bacteriano, capaces de degradar cadenas polipeptídicas de mayor tamaño en aminoácidos libres, que pueden ser absorbidos en el intestino del animal. En este sentido, la cuantificación de aminoácidos liberados supone una herramienta para la estimación, no sólo de la biodisponibilidad de la proteína de las distintas microalgas evaluadas, sino también de la capacidad de las exoproteasas del extracto para liberar aminoácidos de los extremos amino y carboxilo de las cadenas polipeptídicas (Sáenz de Rodríguez *et al.*, 2011; Vizcaíno *et al.*, 2019).

En el presente trabajo, las exoproteasas presentes en los ECPs fueron capaces de liberar cerca 50 g de aminoácidos por cada 100 gramos de proteína de microalga tras 120 min de hidrólisis *in vitro*, siendo las biomasas de *T. galbana* y *A. platensis* aquellas que mostraron los valores más elevados de hidrólisis. Estas diferencias observadas en el grado de liberación de aminoácidos podrían deberse a las variaciones en la composición de las proteínas de las distintas especies de microalgas, así como a la bioaccesibilidad de las mismas. Esto permitiría o dificultaría el acceso de las enzimas peptidasas, y determinará la biodisponibilidad posterior de aminoácidos libres para su absorción a través de los enterocitos del intestino de los peces (Román-Gavilanes *et al.*, 2015; Vizcaíno *et al.*, 2019; Galafat *et al.*, 2020). Pero, además, se observó que nuevamente la liberación de aminoácidos mayor ocurrió cuando las microalgas fueron hidrolizadas con los ECPs NANNO 216 y NANNO 169, lo que pone de manifiesto una mayor actividad de las enzimas exopeptidasas en estos dos extractos, respecto a TSA y CHL 216.

Sin embargo, es la acción combinada entre las endopeptidasas y exopeptidasas la que determina el grado de hidrólisis final de las proteínas, pues las primeras proporcionan el sustrato sobre el que las segundas van a actuar. En este sentido, se encontró una relación lineal entre el CDP y los aminoácidos liberados para todas las microalgas evaluadas bajo la acción de los distintos ECPs, lo que sugiere que en todos los extractos existe una buena equilibrada entre la acción de las endo y exoproteasas (Sáenz de Rodríguez *et al.*, 2011; Vizcaíno *et al.*, 2019).

Por otro lado, las microalgas presentan una pared celular compleja y recalcitrante, compuesta, principalmente por celulosa, que actúa como barrera, dificultando la accesibilidad y biodisponibilidad de los nutrientes contenidos en el interior celular (Galafat *et al.*, 2020; Shi *et al.*, 2017; Teuling *et al.*, 2019; Teuling, Schrama, *et al.*, 2017). En este

sentido, la capacidad de los ECPs para hidrolizar las paredes celulares de las microalgas es de gran interés, pues podrían mejorar y facilitar la accesibilidad que tienen las enzimas digestivas de los peces a los compuestos intracelulares, pudiendo mejorar con ello su aprovechamiento. Es por ello por lo que la cuantificación de azúcares reductores liberados podría dotar de información valiosa acerca de la capacidad de las enzimas carbohidrasas contenidas en estos ECPs. En este sentido, la cuantificación de azúcares reductores liberados durante el proceso de hidrólisis no mostró una liberación relevante, obteniéndose valores inferiores a 2 g de equivalentes de glucosa por cada 100 gramos de biomasa. Estos resultados sugieren una escasa actividad de enzimas carbohidrasas en los ECPs evaluados.

Finalmente, la realización de un análisis de componentes principales permitió obtener una visión holística de todos los resultados obtenidos en el presente trabajo, agrupando los distintos extractos por su similitud sus características hidrolíticas. Los ECPs se agruparon de manera que NANNO 169 y NANNO 216 formaron un primer grupo y TSA 216 y CHL 216 formaron un segundo grupo. En general, los ECPs NANNO 169 y NANNO 216 revelaron los mejores valores en prácticamente todos los análisis realizados, principalmente NANNO 169, lo que sugiere que estos dos extractos podrían tener un mayor poder proteolítico. Por su parte, las microalgas se agruparon formando tres grupos, el primero de ellos formado por *N. gaditana* y *C. vulgaris*, el segundo formado por *A. platensis* y la mezcla de microalgas, y un tercero, claramente diferenciado, formado por *T. galbana*.

## 5. CONCLUSIONES

1. Los ensayos de simulación digestiva *in vitro* son una herramienta útil para conocer la capacidad que poseen los compuestos bacterianos postbióticos para hidrolizar nuevos ingredientes para alimentación de especies de acuicultura.

2. Las enzimas presentes en los extractos extracelulares de *Bacillus pumillus* han demostrado ser útiles para hidrolizar las proteínas de las microalgas, si bien se encontraron diferencias significativas en la capacidad hidrolítica de cada uno de ellos que parecen estar asociadas al nivel de actividad proteasa que contienen.

3. En base a los resultados obtenidos se concluye que los extractos bacterianos NANNO 169 y NANNO 216 son los candidatos más adecuados para su uso en la suplementación de piensos acuícolas que incorporen microalgas.

4. Dada la escasez de estudios relacionados con el uso de extractos bacterianos para facilitar la digestión proteica de microalgas, se sugiere la realización de ensayos *in vivo* con animales alimentados con estos postbióticos para determinar qué efectos biológicos producen en los animales. Además, de forma previa es necesario evaluar qué estrategia sería la más recomendable para su inclusión en el pienso para garantizar la estabilidad de su actividad biológica durante el proceso de elaboración y almacenamiento del mismo.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Afrilasari, W., Widanarni, & Meryandini, A. (2016). Effect of Probiotic *Bacillus megaterium* PTB 1.4 on the Population of Intestinal Microflora, Digestive Enzyme Activity and the Growth of Catfish (*Clarias* sp.). *HAYATI Journal of Biosciences*, 23(4), 168–172. <https://doi.org/10.1016/J.HJB.2016.12.005>
- Aguilar-Toalá, J. E., Garcia-Varela, R., Garcia, H. S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., & Hernández-Mendoza, A. (2018). Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 105–114. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2018.03.009>
- Ahmad, I., Ahmed, I., Fatma, S., & Peres, H. (2021). Role of branched-chain amino acids on growth, physiology and metabolism of different fish species: A review. *Aquaculture Nutrition*, 27(5), 1270–1289. <https://doi.org/10.1111/ANU.13267>
- Alarcón, F. J., Díaz, M., Moyano, F. J., & Abellán, E. (1998). Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). *Fish Physiology and Biochemistry* 1998 19:3, 19(3), 257–267. <https://doi.org/10.1023/A:1007717708491>
- Alarcón, F. J., Moyano, F. J., & Díaz, M. (2001). Use of SDS-page in the assessment of protein hydrolysis by fish digestive enzymes. *Aquaculture International* 2001 9:3, 9(3), 255–267. <https://doi.org/10.1023/A:1016809014922>
- Assan, D., Kuebutornye, F. K. A., Hlordzi, V., Chen, H., Mraz, J., Mustapha, U. F., & Abarike, E. D. (2022). Effects of probiotics on digestive enzymes of fish (finfish and shellfish); status and prospects: a mini review. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 257, 110653. <https://doi.org/10.1016/J.CBPB.2021.110653>
- Balcázar, J. L., Blas, I. de, Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., & Múzquiz, J. L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114(3–4), 173–186. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2006.01.009>
- Becker, W. (2007). Microalgae in Human and Animal Nutrition. *Handbook of Microalgal Culture*, 312–351. <https://doi.org/10.1002/9780470995280.CH18>
- Bradford. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities



- of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. <https://doi.org/10.1006/ABIO.1976.9999>
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K., & Dunstan, G. A. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151(1–4), 315–331. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01501-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01501-3)
- FAO. (2012). *The State of World Fisheries and Aquaculture - 2012*. <https://www.fao.org/3/i2727e/i2727e.pdf>
- FAO. (2020). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action*. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- Galafat, A., Vizcaíno, A. J., Sáez, M. I., Martínez, T. F., Arizcun, M., Chaves-Pozo, E., & Alarcón, F. J. (2022). Assessment of dietary inclusion of crude or hydrolysed *Arthrospira platensis* biomass in starter diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 548, 737680. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2021.737680>
- Galafat, A., Vizcaíno, A. J., Sáez, M. I., Martínez, T. F., Jérez-Cepa, I., Mancera, J. M., & Alarcón, F. J. (2020). Evaluation of *Arthrospira* sp. enzyme hydrolysate as dietary additive in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Journal of Applied Phycology*, 32(5), 3089–3100. <https://doi.org/10.1007/S10811-020-02141-0/TABLES/6>
- Gómez-Requeni, P., Mingarro, M., Kirchner, S., Calduch-Giner, J. A., Médale, F., Corraze, G., Panserat, S., Martin, S. A. M., Houlihan, D. F., Kaushik, S. J., & Pérez-Sánchez, J. (2003). Effects of dietary amino acid profile on growth performance, key metabolic enzymes and somatotropic axis responsiveness of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 220(1–4), 749–767. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00654-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00654-3)
- Gong, Y., Guterres, H. A. D. S., Huntley, M., Sørensen, M., & Kiron, V. (2018). Digestibility of the defatted microalgae *Nannochloropsis* sp. and *Desmodesmus* sp. when fed to Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture Nutrition*, 24(1), 56–64. <https://doi.org/10.1111/ANU.12533>
- González López, C. V., Cerón García, M., Carmen, D., Fernández, F. G. A., Bustos, C. S., Chisti, Y., & Sevilla, J. M. F. (2010). Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresource Technology*, 101(19), 7587–7591. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2010.04.077>

- Haas, S., Bauer, J. L., Adakli, A., Meyer, S., Lippemeier, S., Schwarz, K., & Schulz, C. (2016). Marine microalgae *Pavlova viridis* and *Nannochloropsis* sp. as n-3 PUFA source in diets for juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Journal of Applied Phycology*, 28(2), 1011–1021. <https://doi.org/10.1007/S10811-015-0622-5/FIGURES/3>
- Hassaan, M. S., Mohammady, E. Y., Soaudy, M. R., Elashry, M. A., Moustafa, M. M. A., Wassel, M. A., El-Garhy, H. A. S., El-Haroun, E. R., & Elsaied, H. E. (2021). Synergistic effects of *Bacillus pumilus* and exogenous protease on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth, gut microbes, immune response and gene expression fed plant protein diet. *Animal Feed Science and Technology*, 275, 114892. <https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2021.114892>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970 227:5259, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lazado, C. C., & Caipang, C. M. A. (2014). Mucosal immunity and probiotics in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 39(1), 78–89. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2014.04.015>
- Lee, K. K., & Ellis, A. E. (1990). Glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase complexed with lipopolysaccharide (LPS) is a major lethal exotoxin and cytolysin of *Aeromonas salmonicida*: LPS stabilizes and enhances toxicity of the enzyme. *Journal of Bacteriology*, 172(9), 5382–5393. <https://doi.org/10.1128/JB.172.9.5382-5393.1990>
- Li, P., Mai, K., Trushenski, J., & Wu, G. (2009). New developments in fish amino acid nutrition: Towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids*, 37(1), 43–53. <https://doi.org/10.1007/S00726-008-0171-1/TABLES/2>
- Liu, C. H., Chiu, C. H., Wang, S. W., & Cheng, W. (2012). Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish and Shellfish Immunology*, 33(4), 699–706. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.06.012>
- Liu, S., Wang, S., Cai, Y., Li, E., Ren, Z., Wu, Y., Guo, W., Sun, Y., & Zhou, Y. (2020). Beneficial effects of a host gut-derived probiotic, *Bacillus pumilus*, on the growth, non-specific immune response and disease resistance of juvenile golden pompano, *Trachinotus ovatus*. *Aquaculture*, 514, 734446.

<https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2019.734446>

- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. [https://doi.org/10.1021/AC60147A030/ASSET/AC60147A030.FP.PNG\\_V03](https://doi.org/10.1021/AC60147A030/ASSET/AC60147A030.FP.PNG_V03)
- Ramesh, D., Vinothkanna, A., Rai, A. K., & Vignesh, V. S. (2015). Isolation of potential probiotic *Bacillus* spp. and assessment of their subcellular components to induce immune responses in *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*, 45(2), 268–276. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2015.04.018>
- Reyes-Becerril, M., Guardiola, F., Rojas, M., Ascencio-Valle, F., & Esteban, M. Á. (2013). Dietary administration of microalgae *Navicula* sp. affects immune status and gene expression of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish & Shellfish Immunology*, 35(3), 883–889. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2013.06.026>
- Román-Gavilanes, A. I., Martínez-Montaña, E., & Viana, M. T. (2015). Comparative Characterization of Enzymatic Digestion from Fish and Soybean Meal from Simulated Digestive Process of Pacific Bluefin Tuna, *Thunnus orientalis*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 46(4), 409–420. <https://doi.org/10.1111/JWAS.12204>
- Roy, S. Sen, & Pal, R. (2015). Microalgae in Aquaculture: A Review with Special References to Nutritional Value and Fish Dietetics. *Proceedings of the Zoological Society*, 68(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/S12595-013-0089-9/TABLES/2>
- Sáenz de Rodrigáñez, M. Á., Medina, E., Moyano, F. J., & Alarcón, F. J. (2011). Evaluation of protein hydrolysis in raw sources by digestive proteases of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) using a combination of an *in vitro* assay and sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis analysis of products. *Aquaculture Research*, 42(11), 1639–1652. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2109.2010.02758.X>
- Shah, M. R., Lutz, G. A., Alam, A., Sarker, P., Kabir Chowdhury, M. A., Parsaeimehr, A., Liang, Y., & Daroch, M. (2017). Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. *Journal of Applied Phycology* 2017 30:1, 30(1), 197–213. <https://doi.org/10.1007/S10811-017-1234-Z>
- Shi, X., Luo, Z., Chen, F., Wei, C. C., Wu, K., Zhu, X. M., & Liu, X. (2017). Effect of fish meal replacement by *Chlorella* meal with dietary cellulase addition on growth performance, digestive enzymatic activities, histology and myogenic genes' expression

- for crucian carp *Carassius auratus*. *Aquaculture Research*, 48(6), 3244–3256. <https://doi.org/10.1111/ARE.13154>
- Silva, D. M., Valente, L. M. P., Sousa-Pinto, I., Pereira, R., Pires, M. A., Seixas, F., & Rema, P. (2015). Evaluation of IMTA-produced seaweeds (*Gracilaria*, *Porphyra*, and *Ulva*) as dietary ingredients in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., juveniles. Effects on growth performance and gut histology. *Journal of Applied Phycology*, 27(4), 1671–1680. <https://doi.org/10.1007/S10811-014-0453-9/TABLES/5>
- Stubhaug, I., Lie, & Torstensen, B. E. (2007). Fatty acid productive value and  $\beta$ -oxidation capacity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed on different lipid sources along the whole growth period. *Aquaculture Nutrition*, 13(2), 145–155. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2095.2007.00462.X>
- Suzer, C., Çoban, D., Kamacı, H. O., Saka, Ş., Firat, K., Otgucuoğlu, Ö., & Küçüksari, H. (2008). *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture*, 280(1–4), 140–145. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2008.04.020>
- Tacon, A. G. J., & Metian, M. (2015). Feed Matters: Satisfying the Feed Demand of Aquaculture. <Http://Dx.Doi.Org/10.1080/23308249.2014.987209>, 23(1), 1–10. <https://doi.org/10.1080/23308249.2014.987209>
- Teuling, E., Schrama, J. W., Gruppen, H., & Wierenga, P. A. (2017). Effect of cell wall characteristics on algae nutrient digestibility in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African catfish (*Clarus gariepinus*). *Aquaculture*, 479, 490–500. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2017.06.025>
- Teuling, E., Wierenga, P. A., Agboola, J. O., Gruppen, H., & Schrama, J. W. (2019). Cell wall disruption increases bioavailability of *Nannochloropsis gaditana* nutrients for juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 499, 269–282. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2018.09.047>
- Teuling, E., Wierenga, P. A., Schrama, J. W., & Gruppen, H. (2017). Comparison of Protein Extracts from Various Unicellular Green Sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(36), 7989–8002. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01788>
- Tibbetts, S. M., Yasumaru, F., & Lemos, D. (2017). *In vitro* prediction of digestible protein

content of marine microalgae (*Nannochloropsis granulata*) meals for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Algal Research*, 21, 76–80. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2016.11.010>

Truong Thy, H. T., Tri, N. N., Quy, O. M., Fotedar, R., Kannika, K., Unajak, S., & Arechon, N. (2017). Effects of the dietary supplementation of mixed probiotic spores of *Bacillus amyloliquefaciens* 54A, and *Bacillus pumilus* 47B on growth, innate immunity and stress responses of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 60, 391–399. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2016.11.016>

Turchini, G. M., Torstensen, B. E., & Ng, W. K. (2009). Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture*, 1(1), 10–57. <https://doi.org/10.1111/J.1753-5131.2008.01001.X>

Vizcaíno, A. J., Sáez, M. I., Martínez, T. F., Acién, F. G., & Alarcón, F. J. (2019). Differential hydrolysis of proteins of four microalgae by the digestive enzymes of gilthead sea bream and Senegalese sole. *Algal Research*, 37, 145–153. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2018.11.018>

Wu, X., Teame, T., Hao, Q., Ding, Q., Liu, H., Ran, C., Yang, Y., Zhang, Y., Zhou, Z., Duan, M., & Zhang, Z. (2020). Use of a paraprobiotic and postbiotic feed supplement (HWF<sup>TM</sup>) improves the growth performance, composition and function of gut microbiota in hybrid sturgeon (*Acipenser baerii* x *Acipenser schrenckii*). *Fish & Shellfish Immunology*, 104, 36–45. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2020.05.054>

## 7. ANEXOS

**Anexo 1.** Ingredientes de los piensos experimentales de dorada (*Sparus aurata*).

<b>Ingredientes (g kg<sup>-1</sup> materia seca, MS)</b>	<b>Mix microalgas</b>
Harina de pescado LT94	20,00
lisina	1,20
metionina	0,50
Harina de calamar	2,00
CPSP90	1,00
Harina de Krill	2,00
Gluten de trigo	9,00
concentrado de soja	16,00
<b>Microalgas</b>	25,00
Aceite pescado	8,00
Aceite de soja	4,00
Lecitina de soja	1,00
Harina de trigo	5,70
Betaina	0,50
Vitaminas y minerales	2,00
Vitamina C	0,10
Goma guar	2,00