

E.3.2.1 Informe sobre la extracción de polisacáridos de las especies seleccionadas y caracterización

ALGALUP - Alternativa integral para la explotación de macroalgas en la zona del Galicia y Portugal

0558_ALGALUP_6_E

Marzo 2021

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	3
2. MATERIALES Y MÉTODOS	4
2.1. Materiales	4
2.2. Métodos analíticos	5
2.3. Procedimiento	5
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	6
4. BIBLIOGRAFÍA	11

1. INTRODUCCIÓN

La extracción y obtención de compuestos funcionales de macroalgas ha sido ampliamente desarrollada desde hace varias décadas ya que presentan diversas aplicaciones interesantes desde un punto de vista comercial. Una de las principales puestas en valor que se han conseguido con las macroalgas marinas es la extracción y el empleo de diversos componentes de algas como aditivos tecnológicos para usos alimentarios o cosméticos. Así, los alginatos o las carrageninas están muy presentes en este tipo de mercados, siendo obtenidos a partir de algas pardas y rojas, respectivamente. Sin embargo, no existe en el mercado presencia de componentes análogos a partir de macroalgas verdes. Los resultados de anteriores proyectos desarrollados por ANFACO-CECOPECA han mostrado que es posible obtener fracciones con alto poder gelificante y espesante, a partir de algas verdes de arribazón retiradas en los bancos marisqueros.

Entre los componentes de interés presentes en las algas verdes, se encuentran los polisacáridos sulfatados (ulvanos), que también han sido estudiados en cuanto a otro tipo de actividades funcionales más relevantes. Así, han mostrado actividad antiproliferativa de apoptosis en células cancerígenas (Abd El-Baky et al 2009, Matloub et al 2018), actividad inmunomoduladora, (Abd-Elatef et al 2017, Song et al 2016) y anticoagulante (Mao et al 2006, Cui et al 2018). Pese a la evidencia de la funcionalidad biológica de los ulvanos en aplicaciones relacionadas con la salud, no hay una significativa explotación industrial de estos componentes, al contrario de lo que ocurre con otros compuestos estructuralmente análogos, como el ácido hialurónico o el condroitín sulfato. De este hecho se deriva que el precio en el mercado de unos pocos gramos de ulvano pueda alcanzar los 1.000 €.

Entre las posibles aplicaciones derivadas de la funcionalidad de estas moléculas se puede encontrar su empleo en la elaboración de dietas funcionales para personas y/o animales, incluyendo algunas especies acuícolas. No obstante, a pesar de que el empleo de macroalgas o microalgas en la elaboración de piensos acuícolas, ha sido y sigue siendo estudiado, no se tiene constancia del empleo de algas tratadas enzimáticamente y fraccionadas, para obtener componentes que puedan ser considerados como constituyentes de piensos acuícolas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

Se emplearon dos especies de macroalgas: *Codium* spp. y *Osmundea pinnatifida*, ambas adquiridas secas a una empresa comercializadora, posicionada en el mercado de consumo alimentario humano.

En la Tabla 1 se muestran las características de ambas algas.

Tabla 1. Características de las algas empleadas

Alga	Estado	Fibra total	Fibra soluble	Cenizas	
A1	<i>Codium</i>	seca	29%	2%	41%
A2	<i>Laurencia</i>	seca	29%	13%	39%

Las enzimas empleadas para la hidrólisis de las algas fueron suministradas por una empresa fabricante de enzimas para usos industriales. Se emplearon dos enzimas, una con actividad proteasa (que denominaremos Enzima A) y otra con actividad celulasa, hemicelulasa y pectinasa (Enzima B). Por confidencialidad respecto a desarrollos que se están llevando a cabo en trabajos con algas, susceptibles de algún tipo de protección industrial, se omitirán datos más específicos sobre las enzimas.

Para la realización de los ensayos, se empleó el siguiente material:

- Agitador orbital INNOVA 40 (New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, USA)-
- Máquina Stephan UM12 (Stephan Food Service Equipment GmbH, Hameln, Alemania).
- Reactor de vidrio encamisado, de 5l.
- Centrífuga Thermo Heraeus Multifuge X3
- Sistema de filtración tangencial Pall Omega Centramate OS300T12, con sistema de bombeo Watson Marlow 520S, operado con membranas de 30, 10 y 1 kD.
- Atomizador Büchi mini Spray Dryer B 290 (Büchi Labortechnik AG, Suiza)
- Estufa de secado convectivo Selecta Digitronic.

2.2. Métodos analíticos

La humedad se determinó mediante secado del material a 105 °C hasta peso constante y diferencia gravimétrica, de acuerdo con el método AOACi. El Contenido de cenizas se determinó gravimétricamente por calcinación de la muestra seca a 550°C.

La determinación de la proteína se realizó mediante la determinación del Nitrógeno Total Kjeldhal (NTK), aplicando un factor de conversión de 6,25. El análisis del NTK se llevó a cabo mediante digestión de la muestra a 400 °C durante 4 horas, en medio ácido, empleando cobre como catalizador. Posteriormente, la muestra digerida se lleva a medio alcalino (mediante adición de NaOH), pasando a amoníaco el amonio resultante de la digestión de la muestra. El procedimiento está basado en los Métodos Normalizados AOACi. Para llevar a cabo la determinación, se empleó un digestor y destilador marca Selecta, estandarizados para la determinación de NTK.

La cuantificación de grasas y aceites se realizó con éter etílico. Para la extracción con éter se empleó un equipo de extracción Selecta, modelo Det. Grass 4000842. El procedimiento seguido está descrito en los Métodos Normalizados AOACi.

La fibra alimentaria se determinó por un procedimiento interno acreditado, basado en el método 985.29 de los Métodos Normalizados AOACi.

La actividad antioxidante de los extractos se determinó por el método DPPH y el contenido de compuestos fenólicos totales por el método Folin Ciocalteu.

Los fenólicos individuales fueron analizados por HPLC-DAD.

2.3. Procedimiento

Los ensayos de hidrólisis enzimática se llevaron a cabo en un reactor de vidrio de 5l termostaticado. Se emplearon dos enzimas simultáneamente, una con actividad proteasa y otra con actividad celulasa, hemicelulasa y pectinasa. Tras la hidrólisis se inactivó el medio por calentamiento a 90 °C durante 5 min. Posteriormente, se realizó la separación del sólido no hidrolizado y el líquido, mediante el tamizado del medio, centrifugación y filtración y se fraccionó el líquido mediante membranas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las condiciones experimentales en las que se llevaron a cabo los ensayos para la extracción de la fibra de las algas, mediante hidrólisis enzimática, se muestran en la Tabla 2. Se llevaron a cabo dos ensayos con cada especie de alga, siendo el primero de ellos de carácter exploratorio, mientras que el segundo se dirigió a obtener la máxima cantidad posible de extracto, con el alga disponible. En la Figura 1. puede verse el sistema en el que se llevaron a cabo los procesos de hidrólisis.

Así, en un primer ensayo se observó que, en el caso de *O. pinnatifida*, el medio resultante tras la hidrólisis era tan viscoso que no se pudo fraccionar con las membranas. En el caso del alga *Codium*, en el primer ensayo (A1.1) se llevaron a cabo dos procesos de ultrafiltración (a 10 y 1 kD), pudiéndose apreciar que la mayor parte de la fibra se encontraba en el concentrado de 10 kD, por ello, en el siguiente ensayo únicamente se consideró esta fracción como objetivo.

Para el secado se probaron los procesos de secado convectivo y secado por atomización y, si bien, este último proporcionó un producto en polvo más adecuado, el bajo rendimiento invitó a decantarnos por el secado convectivo, a pesar de que generase un producto laminado que era necesario triturar, sin llegar a alcanzar una textura polvo.

En la Tabla 2 se muestran los resultados alcanzados en los distintos ensayos ejecutados. En la Figura 2 se muestran imágenes del proceso de Ultrafiltración a 10 kD del ensayo A1.1 y en la Figura 3 se puede ver el aspecto del extracto A2.2.

De los resultados alcanzados se puede concluir que los extractos obtenidos con ambas especies mostraron unas características similares, con un contenido de materia mineral del 40-50%, aproximadamente (en el caso del alga *Codium*, únicamente consideramos la fracción de extracto con peso molecular superior a 10 kD) y un contenido de fibra en torno al 30%. Para enriquecer los extractos en fibra y reducir el contenido de materia mineral sería necesario un proceso de diafiltración, es decir, diluir el extracto con agua dulce y ultrafiltrar, si bien, en el caso del extracto de *O. pinnatifida*, el proceso se vería limitado en su rendimiento por la alta viscosidad que impediría concentrar el medio hasta los niveles deseables o llevar a cabo un calentamiento para disminuir su viscosidad.



Tabla 2. Condiciones y resultados de los ensayos de hidrólisis enzimática de las algas.

	Ensayo	A1.1	A1.2	A2.1	A2.2
Condiciones experimentales	Alga	<i>Codium</i>	<i>Codium</i>	<i>Laurencia</i>	<i>Laurencia</i>
	Masa (g)	300	600	300	600
	p/v	1:15	1:15	1:15	1:15
	Enzima A (%)	2	2	2	2
	Enzima B (%)	2	2	2	2
	t (h)	18	18	18	18
	T (°C)	55	55	55	55
	pH	6	6	6	6
Productos	Fracción	>10 kD 1-10 kD	>10 kD	Integral	Integral
	Producto (g)	7,6 16,3	61	47	225
	Ceniza (%MS)	45% 62%	45%	48%	38%
	Fibra (%MS)	30% 2,40%	30%	31%	28%
	Extracto	A1.1+10 A1.1+1	A1.2	A2.1	A2.2



Figura 1. Imagen del proceso de hidrólisis enzimática, llevado a cabo con el alga *Codium*.



Figura 2. Proceso de ultrafiltración, a 10 kD, del hidrolizado de Codium, y aspecto del concentrado (corriente más oscura y el permeado (corriente más clara).



Figura 3. Aspecto del extracto A2.2.

Respecto a los rendimientos, atendiendo a los resultados alcanzados en los ensayos A1.2 y A2.2, que son aquellos ejecutados para alcanzar la mayor eficiencia de extracción, haciendo un balance de masa referido a la fibra (considerando también la fibra soluble del alga inicial), obtenemos los resultados expresados en la

Tabla 3, que indican un mejor rendimiento de extracción de fibra en el caso de la *O. pinnatifida*, si bien, en el caso de la *O. pinnatifida* llega a extraerse toda la fibra soluble, mientras que con el *Codium* parece que sí se extrae toda la fibra soluble (que en este caso es una fracción mucho menor de la fibra total) y además una parte de la fibra insoluble.

Tabla 3. Balance de masa realizado a la fibra y rendimientos de extracción, para los ensayos A1.2 y A2.2.

	<i>Codium</i>	<i>Laurencia</i>
Fibra del alga (g)	174	174
Fibra soluble del alga(g)	12	78
Fibra en el extracto (g)	18,3	63
Rendimiento extracción de fibra	11%	36%
Rendimiento extracción de fibra soluble	153%	81%

Estos extractos fueron empleados en los ensayos con alevines de rodaballo de la Actividad 3.3, para lo cual fueron caracterizados más en detalle. Asimismo, los refinados generados en el ensayo A1.2 (fracción de alga que permaneció tras el proceso de extracción) fueron secados y enviados a UCP para su caracterización.

Para el análisis de compuestos fenólicos, el hidrolizado de *Codium* spp. presenta menos compuestos *fenólicos* que el resto sólido de la extracción ($0,014 \pm 0,001$ y $0,051 \pm 0,0001$ mg equivalentes de ácido gálico/mg de muestra seca). El alga *O. pinnatifida* presentó un total de compuestos fenólicos de $0,065 \pm 0,006$). Los resultados mostraron que la extracción de hidrólisis puede haber sido efectiva para los polisacáridos, sin embargo, no fue efectiva para la extracción de compuestos fenólicos.

Los resultados de los compuestos individuales confirman los resultados anteriores, por lo que los valores estuvieron por debajo del límite de detección y no fue posible identificar los fenólicos individuales presentes en la muestra. En cuanto a la actividad antioxidante de los extractos se encontró que el *Codium* spp. *hidrolizado* presentan una actividad antioxidante de $430,25 \pm 33,13$ μmol trolox equivalente /L, mientras que el residuo de extracción presentó $43,92 \pm 4,42$ μmol trolox equivalente /L. para el hidrolizado de *Osmundea pinnatifida* presentó $1013,06 \pm 76,43$ μmol equivalente de trolox/L.

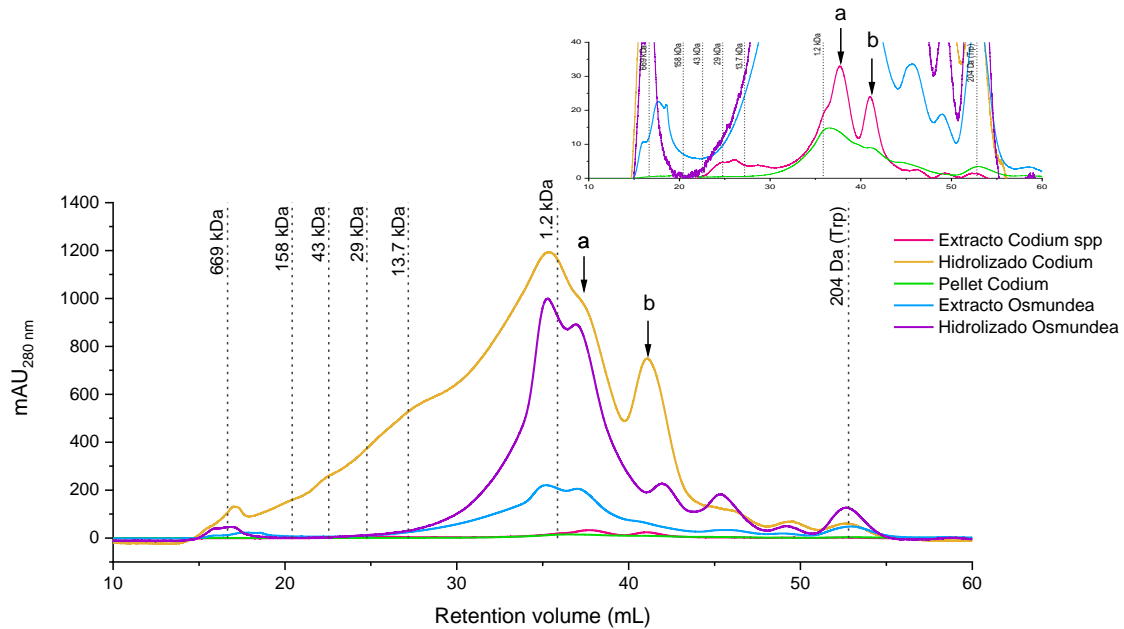


Figura 4 – Cromatograma do perfil proteico de las muestras de *Codium spp.* y *Osmundea pinnatifida*.

El perfil proteico de las muestras de *Codium spp.* y *O. pinnatifida* y sus hidrolizados se evaluó mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC, por sus siglas en inglés). Este tipo de cromatografía nos permite ver una elución decreciente en tamaños moleculares de la conformación nativa de los compuestos proteicos, es decir, a mayor retención en la columna, menor el tamaño molecular. Para todas las muestras se observó un perfil rico en oligopéptidos, con una distribución de tamaños centrada alrededor de los 1000 Da. Para el caso de *O. pinnatifida*, el perfil fue idéntico entre el hidrolizado y el extracto, presentando el primero una mayor intensidad de absorbancia. Para el caso de *Codium spp.* no se observó el mismo perfil, pero si algunos picos conservados (a y b). El extracto de *Codium spp.* presentó una distribución de tamaños menores, dando cuentas de ser rico en pequeños péptidos, mientras que el hidrolizado permitió obtener proteínas de tamaños mayores, entre los 669 y 13,7 kDa. La diferencia entre la absorbancia del hidrolizado y extracto de *Codium spp.* fue mayor que en el caso de *O. pinnatifida*. También observamos que el pellet resultante de la hidrólisis de *Codium spp.* presentó la menor cantidad de péptidos solubles remanentes. Claramente, estos resultados nos permiten ver la mayor eficiencia extractiva de compuestos proteicos mediante la hidrólisis para ambas microalgas.

4. BIBLIOGRAFÍA

A.A. Matloub, A.H. Salama, H.A. Aglan, M.M. AbouSamra, S.S.M. ElSouda, H.H. Ahmed, Exploiting bilosomes for delivering bioactive polysaccharide isolated from *Enteromorpha intestinalis* for hacking hepatocellular carcinoma, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 44 (2018) 523–534.

A.O.A.C. 1995. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemist -Washington D.C. 13th ed.

G.E.F. Abd-ellatef, O.M. Ahmed, E.S. Abdel-Reheim, A.H.Z. Abdel-Hamid, *Ulva lactuca* polysaccharides prevent Wistar rat breast carcinogenesis through the augmentation of apoptosis, enhancement of antioxidant defense system, and suppression of inflammation, *Breast Cancer: Targets and Therapy* 9 (2017) 67–83.

H.H. Abd El-Baky, F.K. El Baz, G.S. El Baroty, Potential biological properties of sulphated polysaccharides extracted from the macroalgae *Ulva lactuca* L, *Academic Journal of Cancer Research* 2 (2009) 1–11.

J. Cui, Y. Li, S. Wang, Y. Chi, H. Hwang, P. Wang, Directional preparation of anticoagulant-active sulfated polysaccharides from *Enteromorpha prolifera* using artificial neural networks, *Sci. Rep.* 8 (2018) 3062.

L. Song, X. Chen, X. Liu, F. Zhang, L. Hu, Y. Yue, K. Li, P. Li, Characterization and comparison of the structural features, immune-modulatory and anti-avian influenza virus activities conferred by three algal sulfated polysaccharides, *Marine Drugs* (2016) 14.

W. Mao, X. Zang, Y. Li, H. Zhang, Sulfated polysaccharides from marine green algae *Ulva conglobata* and their anticoagulant activity, *J. Appl. Phycol.* 18 (2006) 9–14