



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNOLOGÍA Y  
MATERIALES

**CARACTERIZACIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS DE ALGINATO  
PROVENIENTE DE LA FERMENTACIÓN DEL ALGA *DURVILLAEA SP.*  
CON HONGOS MARINOS**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

ANÍBAL ANDRÉS AHUMADA OSORIO

PROFESORA GUÍA:  
MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:  
MARÍA ORIANA SALAZAR AGUIRRE  
CATALINA LANDETA SALGADO

Este trabajo ha sido financiado por:  
Centro de Biotecnología y Bioingeniería, CEBIB.  
Fondo FB0001

SANTIAGO DE CHILE  
2023

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR  
AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN  
BIOTECNOLOGÍA  
POR: ANÍBAL ANDRÉS AHUMADA OSORIO  
FECHA: 2023  
PROF. GUÍA: MARÍA ELENA LIENQUEO

## **CARACTERIZACIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS DE ALGINATO PROVENIENTE DE LA FERMENTACIÓN DEL ALGA *DURVILLAEA SP.* CON HONGOS MARINOS**

Debido a las proyecciones de crecimiento poblacional y crisis climática a nivel mundial, es necesario la búsqueda de alimentos nutritivos que puedan producirse de manera sustentable. Los hongos marinos pueden ser una alternativa a la proteína de origen animal y vegetal, al considerarse un alimento alto en fibras, proteínas y bajos en grasas, los que utilizan el alginato de las algas como fuente de carbono gracias a las alginato liasas, produciendo en su fermentación micoproteína y sobrenadante. El alginato es un carbohidrato compuesto por monómeros de ácidos gulurónico y manurónico, y éste se encuentra presente principalmente en las algas pardas. Las limitantes que tiene el alginato de alto peso molecular para sus aplicaciones se pueden superar al disminuir su grado de polimerización (DP), produciendo oligoalginatos, cuyos beneficios son variados y se encuentran ligados a su estructura, por ello, caracterizarlos es de gran interés comercial. Los métodos de caracterización más usados son caros y difíciles de implementar, por lo que es necesario encontrar métodos más sencillos y baratos que permitan obtener información relevante sobre los compuestos.

Esta memoria tiene como objetivo caracterizar parcialmente los oligoalginatos producidos por la fermentación del alga *Durvillaea sp.* con el hongo *P. salina* utilizando los métodos de ensayos DNS y FTIR. Para ello, se utilizaron muestras obtenidas de ensayos de fermentación de cuatro tratamientos distintos. El tratamiento de menor temperatura (22°C) es el que presenta una menor cantidad de azúcares reductores en la micoproteína (1,45 %) y una mayor cantidad en el sobrenadante (7,26 %). Caracterizar el DP mediante DNS resultó en que la muestra control (alginato comercial) presenta un grado de polimerización de 13,2, el cual es el menor entre todas las muestras analizadas y es contrario a lo esperado. El análisis mediante FTIR muestra que las fuentes de carbono tienen mayor presencia de ácido manurónico, mientras que los carbohidratos de la micoproteína tienen mayor presencia de ácido gulurónico. El estudio biofuncional antimicrobiano mediante antibiograma resultó negativo para los oligoalginatos de la micoproteína frente a una cepa de *E. coli*, pero no se puede descartar que puedan presentar actividad frente a otros microorganismos.

Se propone que la menor concentración de azúcares reductores en la micoproteína para el tratamiento a 22°C no se debe a menor actividad de las alginato liasas, por ello el resultado distinto entre las concentraciones de su sobrenadante y micoproteína, además, que los oligoalginatos sean principalmente compuestos por ácido gulurónico es lo esperado considerando la especificidad enzimática de la *P. salina*. Se sugiere continuar la caracterización con estudios particulares para las biofunciones de interés, esto debido a la limitada bibliografía y registro de las biofunciones de estos compuestos según su estructura.

# Agradecimientos

Primero que todo, quiero agradecer a mis padres por todo el apoyo incondicional que me han dado desde que inicié este camino, sobre todo en los primeros años que estoy seguro fueron difíciles para los tres. También agradecer a mis abuelos y a mis tíos que siempre estuvieron preocupados por mi y me acompañaron de una manera u otra durante la carrera.

Quiero también agradecer a los amigos que hice en el camino, sobre todo a Ulises y Rodolfo, y a las incontables tardes de juegos de mesa y roleos intensos que ni la pandemia detuvo, les prometo que volveremos a salvar a Arkham pronto. También quiero agradecerles a los amigos que hice en la especialidad, y en especial a la Cata, la mejor compañera que pude tener, y la que me hizo recaer en los anime cuando orgullosamente pensaba que no los necesitaba. Solo nos faltó dar el examen juntos, pero ahora te puedo confirmar que hay un final, así que te estaré esperando.

Quiero agradecerle también a la profesora María Elena, por la oportunidad que me dió de trabajar en esta memoria. Estoy seguro que gracias a su infinita paciencia y comprensión hizo de este momento mucho menos estresante de lo que pudo haber sido. A Catalina Landeta por hacer sentirme bienvenido desde el día uno, y por todos esos errores que evitó que cometiera gracias a su ayuda durante el trabajo. Finalmente agradecer a Pachi, por todo lo que me enseñó de la vida en laboratorio, porque las risas no faltaron nunca, y ser parte de este apoyo moral mutuo que tanta falta hizo, hablando sobre doramas, mangas y de la vida en general. Gracias a todos.

# Tabla de Contenido

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Motivación . . . . .	1
1.2. Antecedentes generales . . . . .	2
1.2.1. Carbohidratos . . . . .	2
1.2.1.1. Principales funciones para el ser humano . . . . .	2
1.2.1.1.1 Tipos de carbohidratos . . . . .	2
1.2.1.1.2 Nutrición de los carbohidratos . . . . .	3
1.2.2. Alginato . . . . .	3
1.2.2.1. Principales usos del alginato . . . . .	4
1.2.2.2. Fuente de alginatos . . . . .	4
1.2.3. Oligoalginatos . . . . .	5
1.2.3.1. Caracterización de los oligosacáridos de alginato . . . . .	5
<b>2. Objetivos y Limitaciones</b>	<b>6</b>
2.1. Objetivos . . . . .	6
2.2. Alcances y limitaciones . . . . .	6
<b>3. Estado del arte</b>	<b>7</b>
3.1. Oligoalginatos . . . . .	7
3.1.1. Vía de obtención de oligoalginatos . . . . .	7
3.1.2. Principales métodos de caracterización de oligoalginatos . . . . .	8
3.1.3. Biofunciones de los oligoalginatos . . . . .	9
3.1.4. Beneficios de oligosacáridos en los alimentos . . . . .	10
3.2. <i>D. antarctica</i> . . . . .	10
3.2.1. Composición de las algas del género <i>Durvillaea</i> . . . . .	10
3.3. <i>Paradendryphiella salina</i> . . . . .	11
3.3.1. Actividad enzimática de <i>Paradendryphiella salina</i> . . . . .	11
3.3.2. Azúcares reductores . . . . .	12
3.4. Producción de un alimento llamado micoproteína obtenido desde la biomasa del hongo <i>P. salina</i> . . . . .	12
3.5. Métodos . . . . .	13
3.5.1. Método de caracterización mediante ensayo DNS . . . . .	13
3.5.2. Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier . . . . .	14
3.5.2.1. Asignaciones vibracionales en espectros de muestras de alginato . . . . .	15
<b>4. Materiales y Metodología</b>	<b>16</b>
4.1. Materiales y equipos . . . . .	16
4.1.1. Liofilización y almacenamiento de las muestras . . . . .	16

4.1.2.	Reactivo para estimación de azúcares reductores . . . . .	16
4.1.3.	Elaboración de la curva de calibración . . . . .	16
4.1.4.	Medición de absorbancia . . . . .	16
4.1.5.	Extracción de carbohidratos . . . . .	17
4.1.6.	Medición espectro infrarrojo de las muestras . . . . .	17
4.1.7.	Antibiograma . . . . .	17
4.1.8.	Análisis de resultados . . . . .	17
4.2.	Metodología . . . . .	17
4.2.1.	Obtención de las muestras . . . . .	17
4.2.2.	Preparación curva de calibración para azúcares reductores . . . . .	18
4.2.3.	Estudios de sobrenadante: Medición de azúcares reductores y grado de polimerización oligoalginatos . . . . .	18
4.2.4.	Estudio de microproteína: Extracción de carbohidratos . . . . .	19
4.2.5.	Medición de azúcares reductores . . . . .	19
4.2.6.	Medición del espectro infrarrojo . . . . .	19
4.2.7.	Antibiograma . . . . .	20
4.2.7.1.	Método de McFarland . . . . .	20
4.2.7.2.	Preparación de las muestras . . . . .	20
4.2.7.3.	Sembrado de bacterias . . . . .	20
4.2.8.	Análisis estadístico . . . . .	20
<b>5.</b>	<b>Resultados y discusión</b>	<b>21</b>
5.1.	Curva de calibración de ácido-D-glucurónico . . . . .	21
5.2.	Medición de la concentración de azúcares reductores en las muestras de los sobrenadantes . . . . .	22
5.2.1.	Factor de dilución de las muestras . . . . .	22
5.2.2.	Ensayo DNS . . . . .	23
5.2.3.	Estimación del grado de polimerización de los oligoalginatos del sobre- nadante mediante ensayo DNS . . . . .	26
5.3.	Extracción de los carbohidratos en la Microproteína . . . . .	27
5.4.	Medición de la concentración de azúcares reduc- tores en las muestras de las micoproteínas . . . . .	29
5.5.	Medición del espectro infrarrojo de las muestras de sobrenadante y micoproteínas	31
5.6.	Análisis de la biofunción antimicrobiana de los oligoalginatos obtenidos por fermentación de alginato con <i>P. salina</i> . . . . .	34
<b>6.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>36</b>
	<b>Bibliografía</b>	<b>38</b>
	<b>Anexos</b>	<b>44</b>
A.	Tablas experimentales . . . . .	44
A.1.	Absorbancias curva de calibración . . . . .	44
A.2.	Absorbancias de sobrenadantes para cada ensayo de fermentación . .	45
A.3.	Masa tubos liofilizado carbohidratos . . . . .	48
A.4.	Absorbancias de azúcares reductores en la microproteína . . . . .	50
B.	Análisis de varianza . . . . .	51
B.1.	Análisis de las varianzas: Azúcares reductores sobrenadante . . . . .	51

B.2.	Análisis de las varianzas: Extracción de carbohidratos . . . . .	56
B.3.	Análisis de las varianzas: Azúcares reductores de la microproteína . .	57
C.	Ejemplo de cálculo . . . . .	59
C.1.	Cálculo de la concentración de azúcar reductor en las muestras de sobrenadante . . . . .	59
C.2.	Cálculo de grado de polimerización de los oligoalginatos en las muestras de sobrenadante . . . . .	60

# Índice de Tablas

3.1.	Algunas de las biofunciones publicadas de los oligoalginatos. . . . .	9
3.2.	Composición de alginato alga <i>D. antarctica</i> . . . . .	10
3.3.	Número de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ ) y su asignación en el espectro infrarrojo. . . . .	15
5.1.	Valor de absorbancia medido a 540 nanómetros para los tres sets de muestras a distintos factores de dilución (Valor de blanco ya sustraído). . . . .	22
5.2.	Agrupación de ensayos según parámetro de fermentación característico. . . . .	23
5.3.	Valores de la concentración de azúcares reductores promedio en el sobrenadante, calculada para cada tratamiento. . . . .	25
5.4.	Grado polimerización (DP) oligoalginatos del sobrenadante para cada tratamiento y muestra control (alginato). . . . .	27
5.5.	Valores de la concentración de carbohidratos totales promedio sobre masa total de microproteína calculada para cada tratamiento. . . . .	28
5.6.	Valores para la concentración de azúcares reductores promedio en la microproteína calculada para cada tratamiento. . . . .	29
A.1.	Absorbancias medidas a 540 nanómetros de muestras con concentraciones fijas de Ácido-D-Glucurónico. Curva A fueron quitadas muestras al azar. Curva B fueron quitadas la mayoría de las menores concentraciones y algunas intermedias. Curva C tiene todos los puntos. . . . .	44
A.2.	Valores de absorbancia obtenidos al medir a 540 nanómetros los sobrenadantes de cada ensayo y la concentración de azúcares reductores calculada. Primer día del ensayo. . . . .	45
A.3.	Valores de absorbancia obtenidos al medir a 540 nanómetros los sobrenadantes de cada ensayo y la concentración de azúcares reductores calculada. Segundo día del ensayo. . . . .	46
A.4.	Valores de absorbancia obtenidos al medir a 540 nanómetros los sobrenadantes de cada ensayo y la concentración de azúcares reductores calculada. Tercer día del ensayo. . . . .	47
A.5.	Masa carbohidratos post-liofilizado. Primer set de muestras. . . . .	48
A.6.	Masa carbohidratos post-liofilizado. Segundo set de muestras. . . . .	48
A.7.	Masa carbohidratos post-liofilizado. Tercer set de muestras. . . . .	49
A.8.	Absorbancias medidas a 540 nanómetros para los carbohidratos extraídos de la microproteína. Primer set de muestras. . . . .	50
A.9.	Absorbancias medidas a 540 nanómetros para los carbohidratos extraídos de la microproteína. Segundo set de muestras. . . . .	50
B.1.	Valor datos estadísticos primer ensayo DNS. . . . .	51
B.2.	Suma de cuadrados, grados de libertad y significancia entre grupos primer ensayo DNS. . . . .	51
B.3.	Subconjuntos homogéneos entre los tratamientos, primer ensayo DNS. . . . .	51

B.4.	Valor datos estadísticos segundo ensayo DNS. . . . .	52
B.5.	Suma de cuadrados, grados de libertad y significancia entre grupos segundo ensayo DNS. . . . .	52
B.6.	Subconjuntos homogéneos entre los tratamientos, segundo ensayo DNS. . . . .	53
B.7.	Valor datos estadísticos tercer ensayo DNS. . . . .	53
B.8.	Suma de cuadrados, grados de libertad y significancia entre grupos tercer ensayo DNS. . . . .	54
B.9.	Subconjuntos homogéneos entre los tratamientos, tercer ensayo DNS. . . . .	54
B.10.	Valor datos estadísticos ensayo DNS datos acumulados. . . . .	55
B.11.	Suma de cuadrados, grados de libertad y significancia entre grupos ensayo DNS datos acumulados. . . . .	55
B.12.	Subconjuntos homogéneos entre los tratamientos, ensayo DNS datos acumulados. . . . .	55
B.13.	Valor datos estadísticos extracción de carbohidratos de la microproteína. . . . .	56
B.14.	Suma de cuadrados, grados de libertad y significancia entre grupos extracción carbohidratos de la microproteína. . . . .	56
B.15.	Subconjuntos homogéneos entre los tratamientos, extracción de carbohidratos de la microproteína. . . . .	57
B.16.	Valor datos estadísticos ensayo DNS carbohidratos de la microproteína. . . . .	57
B.17.	Suma de cuadrados, grados de libertad y significancia entre grupos ensayo DNS carbohidratos de la microproteína. . . . .	58
B.18.	Subconjuntos homogéneos entre los tratamientos, ensayo DNS carbohidratos de la microproteína. . . . .	58



# Índice de Ilustraciones

1.1.	Polihidroxialdehído (izq.) y Polihidroxicetona (der.). . . . .	2
1.2.	Ácido $\alpha$ -L-Gulurónico (izq.) y Ácido $\beta$ -D-Manurónico (der.) [13]. . . . .	3
1.3.	Bloques PolyMG, PolyG y PolyM [13]. . . . .	4
1.4.	<i>Macrocystis pyrifera</i> (izq.) y <i>Durvillaea antarctica</i> (der.). . . . .	5
3.1.	Distintos métodos de obtención para oligosacáridos de alginato [23]. . . . .	8
3.2.	Hongo marino del género <i>Paradendryphiella</i> . . . . .	11
3.3.	Pasos de la isomerización de cetona a aldosa [63]. . . . .	12
3.4.	Producción de Micoproteína en un biorreactor de 5 litros. A) Medio de cultivo con <i>Durvillaea sp.</i> B) Fermentación sumergida en un biorreactor de 5 litros. C) Controladores de temperatura, agitación y oxígeno del biorreactor de 5 litros. D) Suspensión de micelio de <i>P. salina</i> en el biorreactor de 5 litros, después de la fermentación sumergida. E) Productos resultantes de la filtración de la suspensión: biomasa micelial de <i>P. salina</i> (der.) y sobrenadante (izq.) F) Biomasa micelial o micoproteína liofilizada y molida. [67] . . . . .	13
3.5.	Relación entre el grado de polimerización (DP) y la concentración de azúcar reductor [69]. . . . .	14
3.6.	Comparación del grado de polimerización (DP) caracterizado mediante ensayo DNS y NMR [69]. . . . .	14
5.1.	Curva de calibración del método de detección de ácido-D-glucurónico con DNS. . . . .	21
5.2.	Muestras en placa de 96 pocillos agregadas por triplicado, ensayos de fermentación del 3 al 11 y muestra control (alginato). . . . .	23
5.3.	Concentración de azúcares reductores en el sobrenadante para cada tratamiento, y ANOVA entre grupos de tratamientos distintos y diferencias significativas entre ellos (mayor diferencia representada con un mayor número de *): Mayor concentración de azúcares reductores (Azul), y menor concentración (Rosado). A) Grupos con diferencias significativas para datos del primer ensayo DNS. B) Grupos con diferencias significativas para datos del segundo ensayo DNS. C) Grupos con diferencias significativas para datos del tercer ensayo DNS. . . . .	24
5.4.	Concentración de azúcares reductores promedio en el sobrenadante para cada tratamiento, y análisis de varianza acumulado entre los 3 días de ensayos, agrupados por diferencias no significativa entre tratamientos: Mayor concentración de azúcares reductores (Azul), y menor concentración de azúcares reductores (Rosado). . . . .	25
5.5.	Tratamientos agrupados por diferencias significativas para concentración de carbohidratos totales comparado a la masa total de la micoproteína: Mayor concentración de carbohidratos en la micoproteína (Azul), y menor concentración de carbohidratos (Rosado). . . . .	28

5.6.	Concentración de azúcares reductores en las muestras de micoproteína para cada tratamiento y ANOVA entre los distintos tratamientos, agrupados por diferencias no significativa. . . . .	30
5.7.	Comparación espectro infrarrojo para carbohidratos de la micoproteína proveniente del tratamiento 1 (22°C, línea naranja), tratamiento 2 (25°C, línea gris), tratamiento 3 (1vvm, línea azul) y tratamiento 4 (1,5vvm, línea amarilla). . .	31
5.8.	FT-IR de los carbohidratos presentes en la micoproteína proveniente del tratamiento 2 (25°C), medidos a temperatura ambiente y con sus picos relevantes identificados. . . . .	32
5.9.	FT-IR carbohidratos provenientes de una fermentación del tratamiento 2 (línea gris), junto al espectro infrarrojo de su sobrenadante (línea amarilla), <i>Durvillaea</i> seca (línea naranja) y alginato comercial (línea azul). . . . .	32
5.10.	Resultados antibiograma sobre la cepa <b><i>E. coli</i> top10</b> utilizando los oligosacáridos obtenidos de los tratamientos T1, T3 y T4. Control positivo es ampicilina 100 µg/ml. Vista superior de la placa (der.) y vista inferior de la placa (izq.) .	34
B.1.	Gráfico intervalos de confianza 95 % test de Tukey, primer ensayo DNS. . . . .	52
B.2.	Gráfico intervalos de confianza 95 % test de Tukey, segundo ensayo DNS. . . . .	53
B.3.	Gráfico intervalos de confianza 95 % test de Tukey, tercer ensayo DNS. . . . .	54
B.4.	Gráfico intervalos de confianza 95 % test de Tukey, datos acumulados ensayo DNS sobrenadante. . . . .	56
B.5.	Gráfico intervalos de confianza 95 % test de Tukey, extracción de carbohidratos. . . . .	57
B.6.	Gráfico intervalos de confianza 95 % test de Tukey, ensayo DNS micoproteína. . . . .	58

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Motivación

Los avances científicos y tecnológicos han permitido al ser humano mejorar su calidad y expectativa de vida, aumentando considerablemente la población actual mundial, y según la ONU esta crecerá hasta los 10 billones de habitantes para el año 2050 [1]. El crecimiento poblacional será también acompañado por el crecimiento del ingreso per cápita, lo que aumentará la demanda de alimentos altamente requirente en recursos, como las proteínas de origen animal, las que están asociadas a enfermedades alimenticias como enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cánceres [2]. Además, para producir proteína animal se utiliza una superficie de 40 millones Km<sup>2</sup> (77 % de la superficie total utilizada para la agricultura), y se emite 6,3 Gigatoneladas de gases de efecto invernadero (18 % de los gases de origen antropogénico) [3], sólo contribuyendo en un 37 % de la ingesta de proteínas a nivel mundial [4]. Es por todo esto que existe la necesidad de encontrar formas de producir alimentos de alto aporte nutritivo de manera segura y amigable con el medio ambiente, para asegurar fuentes de alimentos para la creciente población y sin empeorar la actual crisis climática que enfrenta el planeta.

La producción de micoproteínas con alto valor nutritivo, utilizando algas marinas como fuente de carbono, es una vía efectiva de producir alimentos que pueden reemplazar en un porcentaje el consumo de las proteínas de origen animal y vegetal. En general, las declaraciones nutricionales que se pueden hacer para las micoproteínas son que es un alimento alto en proteínas, bajo en grasas y alto en fibras [5]. Por su parte, las algas pardas son alimentos ricos en yodo, minerales y ácidos grasos omega 3 y 6, además de ser ricos en carbohidratos con beneficios para la salud, como el alginato, fucanos y laminarina [6].

Los hongos marinos que se alimentan de algas tienen enzimas que hidrolizan el alginato, las alginato liasas, produciendo moléculas de menor tamaño llamadas oligoalginatos. Diversos estudios le han atribuido a los oligoalginatos beneficios en la salud al ser utilizados en la farmacéutica o en alimentos. La caracterización de estos compuestos es importante para identificar sus posibles usos y valorización, sin embargo, requiere de costosas metodologías, tales como cromatografía líquida con espectrometría de masas o resonancia magnética nuclear, por lo que se propone en este trabajo desarrollar metodologías para caracterizar oligoalginatos de manera sencilla con procesos menos complicados y baratos de utilizar, como la espectroscopia de infrarrojos con transformada de Fourier.

## 1.2. Antecedentes generales

### 1.2.1. Carbohidratos

Los carbohidratos son las moléculas más abundantes en la tierra, cuya producción se debe a las plantas mediante el uso de dióxido de carbono y la luz solar como fuente de energía. Sus moléculas están compuestas por átomos de carbono, nitrógeno y oxígeno, y las más simples son llamadas monosacáridos, las que pueden ser polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas (Figura 1.1). Las moléculas formadas por dos de estos monómeros son llamadas disacáridos, y la unión de tres o más de estas forman cadenas llamadas polisacáridos (aunque en el rango de tres a diez monómeros estas pueden ser conocidas como oligosacáridos). [7]



Figura 1.1: Polihidroxialdehído (izq.) y Polihidroxicetona (der.).

#### 1.2.1.1. Principales funciones para el ser humano

La importancia de los carbohidratos está en su participación en varios procesos vitales para el ser humano, como en el metabolismo, soporte estructural, almacenamiento de energía, reconocimiento inmunológico, etc [8]. Los carbohidratos han sido relevantes para la dieta humana durante milenios por ser la fuente principal de energía metabólica, un tracto gastrointestinal saludable, y por razones culinarias al dotar a comidas vegetales de volumen y textura [9].

##### 1.2.1.1.1. Tipos de carbohidratos

Dependiendo del largo de su cadena los carbohidratos como alimentos esenciales son divididos en tres categorías[10][11]:

- Azúcares: Moléculas individuales de azúcar o cadenas cortas de éstas, entre las que se encuentran la glucosa, fructosa, galactosa, sacarosa. Se encuentran intrínsecamente en frutas y productos lácteos, aunque pueden ser agregados en alimentos durante el proceso (azúcares extrínsecos o adicionados) como conservantes, endulzantes, agregar textura, entre otros.
- Almidones: Formado por monómeros de glucosa unidos entre sí. Estas moléculas son degradadas por enzimas digestivas y son la fuente principal de carbohidratos para las personas. Entre sus principales fuentes se encuentran vegetales como la papa, legumbres, y granos como el arroz y el trigo.

- Fibras: Formado por varios monómeros de carbohidratos unidos en una cadena. No pueden ser degradados por las enzimas digestivas humanas, como por ejemplo la celulosa y hemicelulosa, entre otros. Estas fibras pueden ser fibras dietéticas (naturalmente en la comida) o fibras funcionales, las que son aisladas y tienen beneficios para la salud.

### 1.2.1.1.2. Nutrición de los carbohidratos

Solo los monosacáridos pueden ser directamente absorbidos por el intestino delgado del ser humano, por lo que carbohidratos de mayor tamaño deben ser digeridos o parcialmente digeridos, lo que está sujeto a la disponibilidad enzimática. Sin embargo, la microbiota puede hacer uso de carbohidratos de mayor tamaño, por lo que los productos de sus metabolismos pueden de igual manera ser absorbidos por el intestino grueso y colón, aunque no tan efectivos como si se tratasen de moléculas inicialmente de menor tamaño. La efectividad de este metabolismo microbiano está sujeto al tiempo que el alimento demora en transitar por el tracto digestivo, por lo que de igual manera carbohidratos de gran tamaño no pueden ser totalmente aprovechados. [9]

Instituciones mundiales y regionales han publicado informes sobre la ingesta necesaria de carbohidratos. Para carbohidratos totales se recomienda un mínimo de 40 % y un máximo de 75 % de la energía calórica diaria considerando el óptimo para evitar enfermedades. La ingesta de fibra se recomienda que sea sobre los 30 gr/día en adultos para evitar riesgos moderados al sobrepeso, enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo II, aunque no existe consenso sobre su protección contra el cáncer colorrectal. Con respecto a los azúcares adicionados, no existe evidencia ni consenso sobre la ingesta máxima recomendada, algunos planteando un máximo de 25 % de la energía calórica diaria en base a no reemplazar otras fuentes más importantes, y aludiendo a evidencia de caries, diabetes y sobrepeso por su sobreconsumo. [12]

### 1.2.2. Alginato

El ácido algínico (alginato) es un polisacárido o copolímero lineal compuesto por hasta dos monómeros distintos, el Ácido  $\beta$ -D-Manurónico (Derivado de la manosa, abreviado como M) y el Ácido  $\alpha$ -L-Gulurónico (Derivado de la glucosa, abreviado como G), unidos entre sí por enlaces 1-4 glucosídicos (Figura 1.2). Dependiendo de la secuencia de estos monómeros en la cadena, se pueden formar hasta 3 bloques distintos según los monómeros presentes: Bloques polyG si es que solo se encuentran unidos ácidos gulurónicos de manera secuencial, bloques polyM si solo se encuentran unidos ácidos manurónicos de manera secuencial, y bloques polyMG (o polyGM) si es que estos se encuentran unidos alternadamente en la cadena (Figura 1.3). [13]

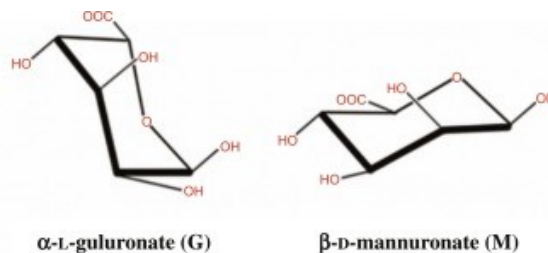


Figura 1.2: Ácido  $\alpha$ -L-Gulurónico (izq.) y Ácido  $\beta$ -D-Manurónico (der.) [13].

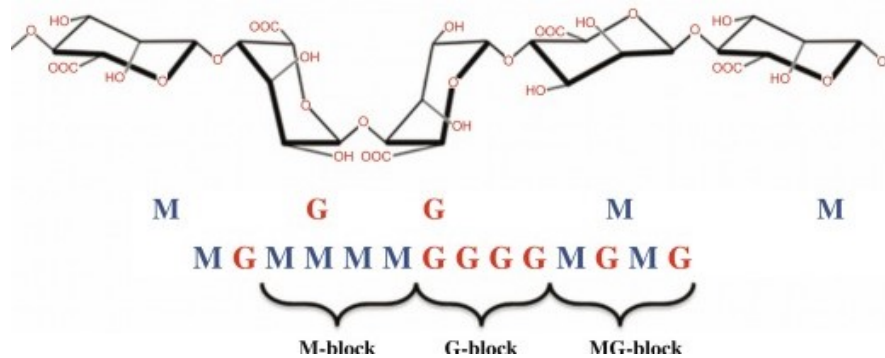


Figura 1.3: Bloques PolyMG, PolyG y PolyM [13].

La composición de las cadenas de alginato pueden variar según cual de los monómeros tiene mayor presencia en ella. Este parámetro se conoce como la razón M/G, e indica si en la cadena se encuentra mayormente ácidos manurónicos (razón  $> 1$ ), o si se encuentran en mayor cantidad ácidos gulurónicos (razón  $< 1$ ). Según este parámetro también se puede inferir cual de los 3 tipos de bloques pueden ser predominantes en el alginato [14]. El valor de esta razón además afecta algunas de las propiedades del alginato debido a los enlaces que predominantemente se formen, ya que por ejemplo se sabe que alginatos con mayor presencia de ácidos gulurónicos forman geles más rígidos que el caso contrario [15].

### 1.2.2.1. Principales usos del alginato

El alginato es un biopolímero degradable, el cual una vez hidratado es capaz de formar geles de porosidad controlable, altamente viscoso, hidrófilo y termoestable. Sus aplicaciones pueden variar dependiendo de la industria, pudiendo ser utilizados como medio de cultivo o inmovilizador de células, así como también para tratar heridas y regenerar tejidos por sus propiedades homeostáticas [16]. En el área farmacéutica es empleado como antiácido debido a su propiedad de formar geles estables en pH bajos como los del estómago, es también utilizado como componente en cosméticos [17], como aditivo en alimentos [18], o en el área de la ortodoncia, donde es utilizado como gel para obtener moldes dentales [19]. Finalmente, también puede ser utilizado como fuente de carbono en algunas industrias de procesos, como por ejemplo, para la obtención de etanol [20], entre otros.

### 1.2.2.2. Fuente de alginatos

La principal fuente de obtención de alginato es a partir de las algas pardas encontradas en los océanos y costas del mundo, las que utilizan el alginato como principal polímero estructural de sus paredes. La razón M/G de una cadena puede variar entre algas, y entre las características que afectan la mayor presencia de uno u otro de estos monómeros se debe a factores genotípicos, como el género y la especie a la que pertenezca la alga, y a factores fenotípicos, como la localización geográfica exacta y estación del año en la que fue cosechada. [21]

Las algas pardas en general pueden presentar hasta el 40 % de su peso seco como alginato, y entre los géneros que más se utilizan para su obtención se encuentran los de *Laminaria*, *Macrocystis* y *Durvillaea* (Figura 3), los cuales son cosechados en gran parte del mundo [22].



Figura 1.4: *Macrocystis pyrifera* (izq.) y *Durvillaea antarctica* (der.).

### 1.2.3. Oligoalginatos

El alginato tiene potenciales aplicaciones que se ven impedidas debido a su característica de gel viscoso, lo que no lo hace ideal para situaciones que requieran de mayor movilidad o consistencia menos densa. Es por lo anterior que surge el interés por los oligoalginatos (AOS por sus siglas en inglés). Los oligoalginatos son polisacáridos de cadenas considerablemente más cortas, de entre 2 y hasta 25 monómeros, lo que le confiere un menor peso molecular que el alginato convencional [23]. Los oligosacáridos son de notable menor viscosidad, lo que les confiere propiedades físico-químicas distintas a las del alginato de mayor tamaño.

#### 1.2.3.1. Caracterización de los oligosacáridos de alginato

Han sido reportadas las potenciales propiedades nutricionales y biofunciones que tienen los oligoalginatos [24], y estas propiedades están fuertemente relacionadas a la estructura de estos compuestos. Caracterizar la composición mayoritaria de bloques de los oligoalginatos, así como su grado de polimerización, entre otros, puede entregar información importante para conocer sus propiedades, establecer sus posibles beneficios a las personas y valorizarlos comercialmente.

Los oligoalginatos al igual que el resto de los carbohidratos son particularmente difíciles de caracterizar debido a su complejidad estructural, y diferencias tan sutiles entre moléculas como isomerismos o quiralidad producen moléculas con distintas actividades biológicas, lo que representa un desafío para los investigadores [25].

Para lograr dilucidar la estructura de estos carbohidratos se recurren a métodos complejos que requieren de equipos y reactivos de alto costo. Entre los métodos de caracterización más utilizados se encuentra la espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TOF-MS), resonancia magnética nuclear (NMR) [26], espectrometría infrarroja [27] y cromatografía [28].

De los métodos anteriores destaca la resonancia magnética nuclear como el más utilizado en caracterizaciones que entregan la mayor información posible sobre la composición de las cadenas de oligoalginatos, sin embargo, lo costoso del proceso evita que sea masivamente utilizado y limita una mayor investigación sobre estas moléculas. Es por esto que es necesario encontrar maneras más sencillas y baratas de caracterizar de la mejor manera posible los oligoalginatos.

# Capítulo 2

## Objetivos y Limitaciones

### 2.1. Objetivos

Los objetivos general y específicos de este trabajo son los siguientes:

- Caracterizar parcialmente los oligosacáridos de alginato obtenidos por fermentación de las algas pardas *Durvillaea sp* con el hongo marino *Paradendryphiella salina*, mediante ensayo DNS y espectroscopia de infrarrojos con transformada de Fourier.

Para lograr el objetivo general, se plantean los siguientes objetivos particulares:

- Establecer un protocolo de laboratorio para extraer los carbohidratos presentes en la micoproteína
- Establecer un protocolo de laboratorio para cuantificar azúcares reductores presentes en la micoproteína y en el sobrenadante de la fermentación.
- Establecer las diferencias en la producción de oligosacáridos de alginato para los diferentes parámetros de fermentación utilizadas mediante análisis estadístico de los resultados de extracción de carbohidratos y de ensayos de DNS, además caracterizar los oligosacáridos estudiando el espectro infrarrojo de las muestras mediante FTIR.
- Evaluar la capacidad biofuncional antimicrobiana de los oligosacáridos obtenidos de la micoproteína mediante antibiograma contra una cepa de *E. coli*.

### 2.2. Alcances y limitaciones

La etapa de fermentación de las algas no es considerada en este trabajo, por lo que no se realizará investigación relacionada con los parámetros de fermentación ni se buscará optimizar la obtención de micoproteínas. Además, el estudio de los posibles usos de los oligosacáridos obtenidos estará sujeto a su disponibilidad bibliográfica, esto pues los experimentos en laboratorio serán generales y limitados.



# Capítulo 3

## Estado del arte

### 3.1. Oligoalginatos

Los oligoalginatos son polisacáridos de cadenas entre 2 y hasta 25 monómeros, lo que le confiere un menor peso molecular y nuevas biofunciones que los hace de interés comercial.

#### 3.1.1. Vía de obtención de oligoalginatos

Los oligoalginatos pueden ser obtenidos directamente de las cadenas más grandes de este polisacárido, y para lograrlo existe más de una vía (Figura 3.1), de los cuales destacan:

- **Métodos Químicos:** Entre los reagentes químicos de mayor uso se encuentran el ácido clorhídrico (HCL) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Para el primero se ha logrado degradar alginato de sodio y ácido algínico a pH entre 2.8 y 4.5, sin embargo, debido a su relativa resistencia al ácido, es necesario sumar un tratamiento térmico sobre los  $80^\circ C$  por más de una hora [29]. Para el segundo, es un proceso verde al tener agua como único producto secundario. La degradación del alginato se acelera con el tiempo y esta ocurre entre los pH 5 y 7 [30].
- **Métodos Físicos:** Mediante radiación gama es reportado que se pueden obtener AOS de distinto peso molecular, dependiendo sólo de la dosis y no de temperatura o aditivos [31]. Otros tratamientos como tratamiento de plasma y tratamiento hidrotermal han reportado ser efectivos al romper los enlaces glucosídicos del alginato [32][33].
- **Método enzimático:** El alginato puede ser degradado por enzimas polisacárido liasas llamadas alginato liasas. Estas enzimas se encuentran naturalmente en organismos bio-productores de alginato como las algas pardas, o en organismos que aprovechan este compuesto como fuente de carbono, como microorganismos marinos [34].

Debido a su complejidad estructural, los organismos producen más de un tipo de alginato liasa. Las alginato liasas pueden ser clasificadas en dos grandes grupos según especificidad, liasas PolyG y PolyM, grupos ampliamente aceptados por la comunidad científica a pesar de que algunas enzimas pueden presentar ambas especificidades a la vez. Las familias de las alginato liasas pueden ser agrupadas generalmente en 7 familias, donde las PL5 y PL7 son las más comunes en cuanto a actividad endolítica de corte, mientras que las pertenecientes a PL15 y PL17 presentan actividad exolítica, produciendo monómeros en vez de cadenas. [35]

Actualmente la fermentación utilizando microorganismos que presentan actividad de alginato lisas es efectiva para la obtención de AOS, ya sea mediante cepas aisladas o consorcios. [36][37]

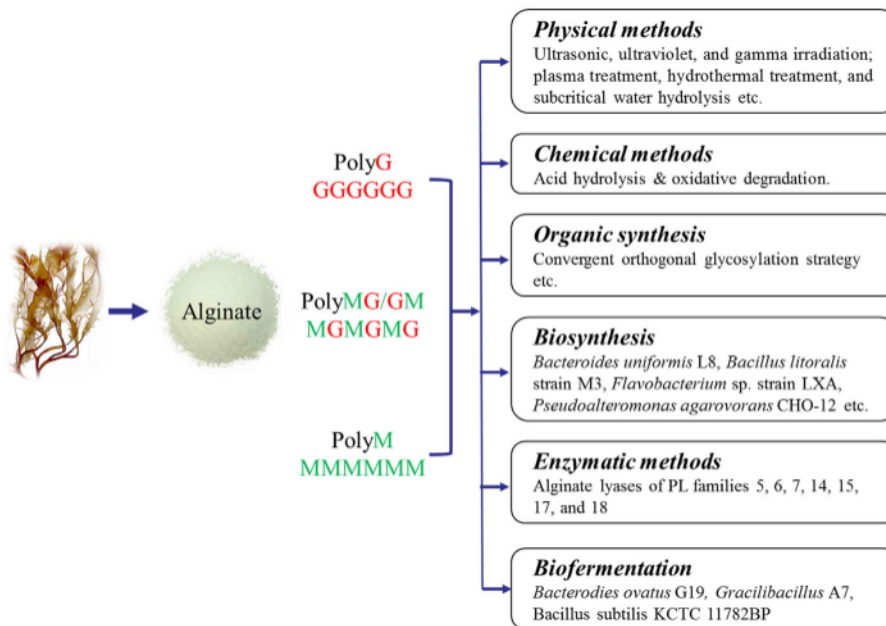


Figura 3.1: Distintos métodos de obtención para oligosacáridos de alginato [23].

### 3.1.2. Principales métodos de caracterización de oligoalginatos

- **Resonancia magnética nuclear:** La resonancia magnética nuclear (NMR por sus siglas en inglés) es un método por el cual se puede obtener información para la identificación de moléculas al dilucidar sus propiedades magnéticas y mecanico-cuánticas [38]. La información que entrega de las moléculas de alginato y sus derivados es la razón M/G y la composición de los bloques.

Para procesar muestras de alginatos estas deben ser lo más solubilizadas posible, para ello, se debe recurrir a hidrolizar las moléculas de mayor tamaño y realizar las espectrometría a altas temperaturas (sobre 300°K), esto con el fin de disminuir la viscosidad y a su vez disminuir la contaminación que la presencia del agua aporta a la información. Muestras intactas de alginato pueden ser análisis para saber su razón M/G, pero la información obtenida sobre sus bloques no es fidedigna, a su vez, se puede obtener información sobre los monómeros de oligoalginatos, pero el mayor tiempo de análisis la impide ser un método de análisis rutinario. [39]

- **Cromatografía líquida:** El método de cromatografía líquida ha sido utilizado exitosamente para separar oligoalginatos de muestras en ensayos de actividad enzimática de alginato liasas. En particular, es reportado que una columna de filtración en gel y una fase móvil de bicarbonato de amonio 0,2 M a un flujo de 0,4 ml/min es exitosa en separar alginato hidrolizado [40].

Si bien se puede cuantificar el contenido de alginato de muestras utilizando cromatografía líquida [41], este método es insuficiente para dilucidar mayor información estructural del alginato y sus derivados, por lo que en general es complementado con espectrometría de masas de tiempo de vuelo o de tipo electrospray para obtener el peso molecular, razón M/G y composición de sus bloques [40].

### 3.1.3. Biofunciones de los oligoalginatos

Como fue mencionado anteriormente, por su particular menor tamaño los oligoalginatos poseen cualidades distintas a las cadenas de mayor peso molecular, lo que ha inspirado el estudio de las posibles aplicaciones que estos puedan tener. A continuación en la tabla 3.1 se presenta un resumen de algunos de los resultados publicados hasta la fecha:

Tabla 3.1: Algunas de las biofunciones publicadas de los oligoalginatos.

Biofunción	Actividad	Referencia
Probiótica	Disminuye la inflamación gastrointestinal y el estreñimiento	Wang, Pan, et al., 2017 [42]
	Preveen el crecimiento de bacterias oportunistas como la <i>Shigella</i>	Han, Zhen Lian, et al., 2019 [43]
Vegetales	Cadenas entre 2 y 8 monómeros estimula el crecimiento de las raíces de la lechuga	Hien, Naotsugu, et al., 2000 [44]
	Oligoalginatos PolyM y PolyG de grado 3 promueven germinación de semillas de maíz	Hu, Jiang, et al., 2004 [45]
Antioxidante	Presentan actividad antioxidante por su capacidad de eliminación de radicales biológicos	Falkeborg, Mia, et al., 2014 [46]
Anticancerígena	Oligoalginatos presentan actividad antitumoral en casos de osteosarcoma	Jiayu Chen, et al., 2017 [47]
Antimicrobiana	Oligosacáridos PolyG facilita las vías de activación de macrófagos	Jia Fang, et al., 2017 [48]
	Oligoalginatos pueden actuar en sinergia con antibióticos para enfrentar bacterias resistentes a antibióticos	He, Xiaojia, et al., 2014 [49]
Antidiabética	Oligosacáridos PolyM pueden ser útiles para prevenir y tratar diabetes tipo II al promover la biogénesis mitocondrial	Hao, Jiejie, et al., 2015 [50]
Cosmetología	Oligoalginatos de grado 10 utilizados como compuestos para prevenir el envejecimiento de la piel	Patente comercial [51]

Los oligoalginatos como agentes antimicrobianos son de particular interés al considerar la creciente cantidad de patógenos resistentes a antibióticos que se están generando en el último tiempo. Otros estudios han revelado la efectividad de los oligoalginatos contra enfermedades humanas y animales producidas por las bacterias *S. aureus* y *B. streptococcus* [52]. También se ha estudiado y reportado la actividad de oligoalginatos contra patógenos que afectan a las plantas (fitopatógenos), como por ejemplo, *R. solanacearum*, *P. syringae* y *A. tumefaciens* [53].

### 3.1.4. Beneficios de oligosacáridos en los alimentos

El rompimiento de los polisacáridos en moléculas más pequeñas permiten la obtención de fibras más bioactivas, actuando como probióticos con potencial beneficios en la microbiota intestinal y los metabolitos que son producidos por ella. Como fue mencionado en la tabla 3.1, estos probióticos tienen efectos que pueden ir desde ayudar contra la inflamación intestinal, mejorar la inmunidad y alterar la composición de la microbiota.

La formulabilidad o solubilidad que tienen los oligosacáridos es otra de las ventajas sobre los polisacáridos. Su menor dulzor que la azúcar tradicional y propiedades benéficas mencionadas anteriormente las hacen un excelente candidato para abultar y producir masas en la industria del pan, así como su adhesión a jugos naturales que por problemas de solubilidad no incluyen altas cantidades de fibras, ofreciendo alimentos con mayores beneficios para la salud de las personas. [54]

## 3.2. *D. antarctica*

La *D. antarctica*, también conocida localmente como cochayuyo, es un alga nativa de las costas del hemisferio sur como Chile y Nueva Zelanda. Esta alga parda es rica en Yodo y ha formado parte de la gastronomía nacional desde los pueblos indígenas americanos, siendo utilizada en sopas, pasteles, ensaladas, etc. [55]

Su extracción ocurre durante todo el año, pero esta tiene mayor rendimiento fuera del periodo Mayo-Septiembre debido a las condiciones climáticas más favorables. Su principal método de extracción es la pesca artesanal, donde son cosechadas durante baja marea o en botes pesqueros mediante redes, y estas son amarradas en empaques y dejadas secar al sol para su posterior comercialización. Hoy en día su importancia nutritiva la hace deseable en el mercado alimenticio y como fuente de obtención de alginato principalmente para el mercado asiático. [56]

### 3.2.1. Composición de las algas del género *Durvillaea*

El género de las algas pardas *Durvillaea* ha sido extensamente estudiado por su importancia a nivel comercial y la industria. Estudios sobre la razón M/G y presencia total de los bloques PolyG, PolyM y PolyMG han sido publicados utilizando métodos de resonancia magnética nuclear. La tabla 3.2 muestra la composición del alga *D. antarctica* [21]:

Tabla 3.2: Composición de alginato alga *D. antarctica*.

Especie	$F_{MM}$	$F_{MG}, F_{GM}$	$F_{GG}$	$F_{GGM} \cdot F_{MGG}$	$F_{MGM}$	$F_M$	$F_G$	M/G
<i>D. antarctica</i>	0.64	0.16	0.04	0.03	0.13	0.8	0.2	4

De los datos se destaca que para la *D. antarctica* se tiene que la razón M/G es de 4, vale decir, un 80% de los monómeros que componen su alginato son ácidos manurónicos y solo un 20% corresponde a ácido gulurónico. La presencia de los bloques PolyM es del 64% del total, el 16% corresponde a los bloques PolyMG y apenas un 4% de bloques PolyG. El porcentaje restante se divide entre monómeros de ácido gulurónico que interrumpen bloques PolyM (13%), y del caso contrario (3%).

Cabe destacar que este estudio fue realizado utilizando algas recolectadas en las costas de Nueva Zelanda, y como se mencionó anteriormente, las características fenotípicas son relevantes para definir la composición de las cadenas de alginato de éstas, por lo que se esperaría variaciones con respecto a algas de la misma especie recolectadas en otro lugar.

### 3.3. *Paradendryphiella salina*

La *P. salina* (Figura 3.2) es un hongo marino perteneciente a la clase *Dothideomycetes* y al grupo filamentoso de las *Ascomycetas*, considerado una especie sapotrófica de algas pardas [57].

Este hongo puede ser aislados de algas vivas o en descomposición, en bosques sumergidos o algas flotantes de diversos lugares geográficos [58]. Se ha confirmado que este hongo utiliza como fuente de carbono la lamiranina, celulosa y alginato de las algas pardas [59]. Además, por su color se puede caracterizar como un hongo negro (por acumulación de melanina), lo que le confiere alta resistencia a estresores como radiación UV o condiciones de bajos nutrientes [60].



Figura 3.2: Hongo marino del género *Paradendryphiella*.

#### 3.3.1. Actividad enzimática de *Paradendryphiella salina*

El hongo marino *Paradendryphiella salina* ha sido estudiado en escenarios de fermentación de algas pardas, por lo que se tiene un mayor conocimiento de sus vías metabólicas. En particular se encontró que este hongo secreta principalmente alginasas pertenecientes a las familias PL7 y PL8, de las cuales dos (PsAlg7B y PsAlg7C) son secretadas en las etapas iniciales de la fermentación, pero las enzimas PsAlg7A y PsMan8A son secretadas en considerable cantidad posterior al inicio del proceso, indicadas como las más relevantes [61]. Se especula que esto se debe al cambio de pH dominante en la reacción, donde en la etapa inicial el hongo se encuentra en un ambiente donde el pH del mar es el dominante (pH 8), para en las etapas posteriores encontrarse en el interior de las algas, donde domina un pH más ácido (pH 5).

Las actividades específicas de las enzimas mencionadas también fueron estudiadas y clasificadas, en donde se concluyó que la PsAlg7A tiene preferencia por los bloques PolyG y PolyM, mientras que la PsMan8A es específica para bloques PolyM. Se encontró una relación

de sinergia entre ambas enzimas, sin embargo, no se sabe con claridad el mecanismo por el que ocurre [61].

### 3.3.2. Azúcares reductores

Los azúcares reductores son cualquier sacárido que posea un carbono anomérico que no haya formado un enlace glucósido, presentando un grupo funcional aldehído que puede actuar como agente reductor. Todos los monosacáridos son azúcares reductores, en cambio, sólo algunos disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos son azúcares reductores, como por ejemplo, la lactosa, maltosa, etc [62]. En base a esta definición, los monosacáridos pertenecientes al grupo de las aldosas son los que pueden actuar directamente como agentes reductores, sin embargo, las cetonas también son considerados azúcares reductores al poder taumerizar a aldosas (Figura 3.3).

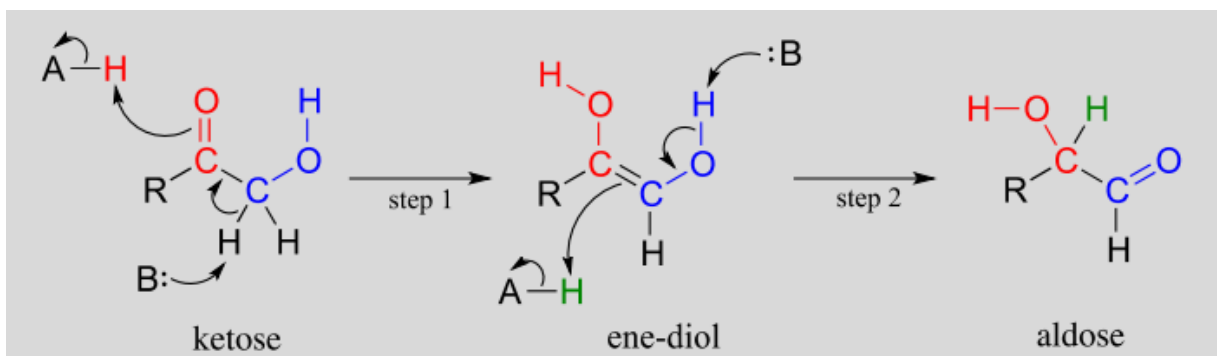


Figura 3.3: Pasos de la isomerización de cetona a aldosa [63].

En el ámbito alimenticio, los azúcares reductores son de gran importancia debido a la reacción de Maillard, la que ocurre entre los grupos carbonilos de los azúcares reductores y aminoácidos libres a altas temperaturas. Esta reacción es la responsable de cambios de olor, textura, color y sabor de alimentos durante la cocción, a cambio de la disminución de su valor nutricional [64].

Varios estudios se han centrado en los beneficios que los productos de la reacción de Maillard (MRP por sus siglas en inglés) tienen para el cuerpo humano [64], los que incluyen efectos antioxidantes, antibacteriales y prebióticos en el sistema digestivo [65]. Sin embargo, también esta reacción puede generar productos tóxicos para el cuerpo, relacionados a la diabetes, enfermedades cardiovasculares y renales [66].

## 3.4. Producción de un alimento llamado micoproteína obtenido desde la biomasa del hongo *P. salina*

La producción de un ingrediente alimenticio a partir de la biomasa entera (micelio) de *P. salina*, comienza con la inoculación aséptica del medio de cultivo estéril, y que contiene el alga parda *Durvillaea sp.* como fuente de carbono (Fig. 3.4A). Este cultivo líquido necesita suministro de agitación, temperatura y aireación en un biorreactor controlado (Fig. 3.4B), mientras se mantienen las condiciones estériles (Fig. 3.4C). El cultivo resultante es una suspensión líquida densa y dispersa del micelio de *P. salina* (Fig. 3.4D). El micelio se cosecha y

se separa de la solución líquida, está última denominada sobrenadante (Fig. 3.4E). La parte sólida (micelio) se enjuaga, se deshidrata, y se muele, lo que da como resultado una harina de micelio (Fig. 3.4F). El producto final, que en este documento se denomina micoproteína, es un ingrediente estable en almacenamiento y que se puede usar en varias aplicaciones para reemplazar, ampliar, o mejorar la calidad nutricional de diferentes productos, como galletas, barras de proteína, hamburguesas, sopas instantáneas, entre otros. [67]

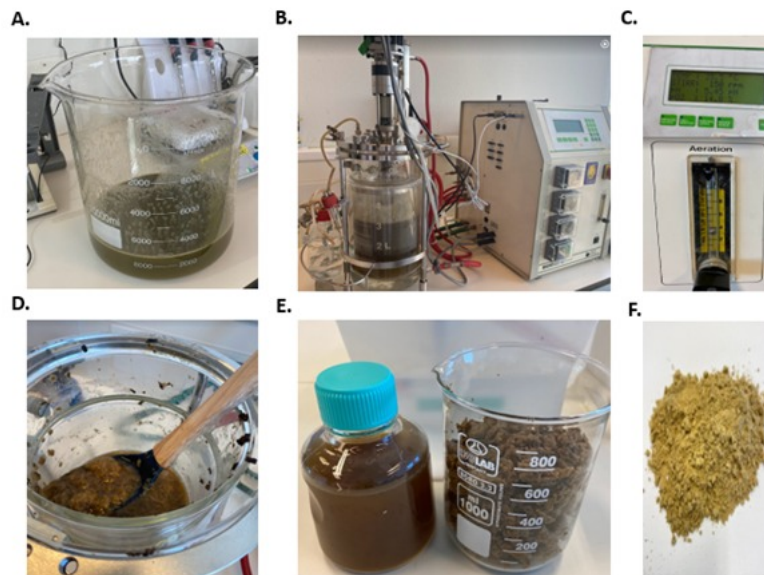


Figura 3.4: Producción de Micoproteína en un biorreactor de 5 litros. A) Medio de cultivo con *Durvillaea sp.* B) Fermentación sumergida en un biorreactor de 5 litros. C) Controladores de temperatura, agitación y oxígeno del biorreactor de 5 litros. D) Suspensión de micelio de *P. salina* en el biorreactor de 5 litros, después de la fermentación sumergida. E) Productos resultantes de la filtración de la suspensión: biomasa micelial de *P. salina* (der.) y sobrenadante (izq.) F) Biomasa micelial o micoproteína liofilizada y molida. [67]

## 3.5. Métodos

### 3.5.1. Método de caracterización mediante ensayo DNS

El DNS (Ácido 3,5-dinitrosalicílico en español), es un reactivo ampliamente utilizado y recomendado para la medición de azúcares reductores y en algunas actividades enzimáticas. La base de este método es la reducción de este reactivo en ácido 3-amino-5-nitro salicílico y la oxidación del grupo aldehído de la azúcar a su respectivo ácido carboxílico. Este proceso es evidenciado a simple vista por el cambio de color amarillo a una tonalidad más oscura y cercana al color café, y puede ser medida en espectrofotómetro a longitudes de onda de 540-550 nanómetros. [68]

La caracterización de las cadenas de alginato es un tema complejo debido a lo sofisticado de los equipos necesarios para obtener resultados robustos, además de impedimentos técnicos de analizar alginatos de alto peso molecular debido a la viscosidad que estos presentan, lo

que imposibilita el uso de equipos como la resonancia magnética nuclear.

Si bien este no es el caso para los AOS, sigue siendo un impedimento para laboratorios el no contar con los equipos necesarios por restricciones presupuestarias. Han habido estudios que buscan solucionar esta problemática, buscando formas más sencillas de lograr la caracterización de AOS. En particular en este trabajo se comprobará la utilidad del método reportado por bibliografía en *Ming Sun* (2019)[69], donde se indica que se encontró una relación directa entre el grado de polimerización y la concentración de azúcar reductor obtenida en ensayos DNS de muestras de oligoalginatos. La relación es indicada en la figura 3.5:

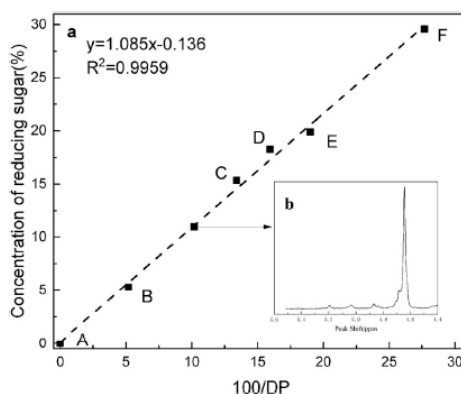


Figura 3.5: Relación entre el grado de polimerización (DP) y la concentración de azúcar reductor [69].

En la imagen 5.9 se muestra una tabla comparativa del grado de polimerización obtenido a partir de este método y el método convencional de resonancia magnética nuclear:

Samples	B	C	D	E	F	Standard
Concentration of reducing sugar	5.29%	15.33%	18.27%	19.89%	29.57%	10.96%
DP from DNS	19.76	6.94	5.83	5.36	3.61	9.67
DP from $^1\text{H}$ NMR	19.23	7.45	6.27	5.26	3.60	9.80

Figura 3.6: Comparación del grado de polimerización (DP) caracterizado mediante ensayo DNS y NMR [69].

A partir de los datos, se concluyó que los resultados son lo suficientemente similares (con diferencias menores al 5%) como para afirmar que la relación es válida. Finalmente, cabe destacar que esta metodología fue probada con cadenas de hasta 30 monómeros, esto debido a impedimentos de utilizar la resonancia magnética nuclear en cadenas de mayor tamaño por su viscosidad.

### 3.5.2. Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier

En la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés) radiación infrarroja pasa por una muestra, registrando las longitudes de ondas absorbidas y transmitidas por la muestra, creando una auténtica huella molecular irreproducible entre dos



estructuras moleculares únicas. El espectro infrarrojo en sus picos representan la longitud de onda absorbidas en que los enlaces atómicos vibran. [70]

Este método permite realizar el análisis cualitativo de la muestra de dos maneras[71]:

- Elucidación estructural: Grupos funcionales tienden a dar una absorción infrarroja específica en ciertos rangos angostos del espectro infrarrojo, sin importar su relación a la molécula.
- Identificación de compuesto: Por la unicidad del espectro infrarrojo de las moléculas, se pueden identificar los compuestos desconocidos de las muestras comparando y calzando con espectros de referencia de compuestos conocidos.

Los compuestos orgánicos absorben en la región media del espectro infrarrojo, la cual abarca desde los 3  $\mu\text{m}$  a los 30  $\mu\text{m}$  de longitud de onda, presentando marcadas bandas de absorción en el espectro incluso utilizando una pequeña cantidad de muestra, lo que facilita la diferenciación. A lo anterior se suma la gran cantidad de datos de grupos funcionales característicos ya registrados durante los años, lo que facilita la identificación de los compuestos desconocidos. [72]

### 3.5.2.1. Asignaciones vibracionales en espectros de muestras de alginato

El previo conocimiento de los números de onda asignados a moléculas es de vital importancia para estudiar un espectro infrarrojo de un compuesto desconocido. Para el caso de compuestos relacionados con hongos, alginato y sus derivados estos son los números de onda más importantes a considerar [24][73]:

Tabla 3.3: Número de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ ) y su asignación en el espectro infrarrojo.

Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Asignación
780	Ácido gulurónico
820	Ácido manurónico
890	Ác. manurónico. C1-H
932	Ác. gulurónico. Estiramiento C-O
1032-1024	Ác. manurónico. Estiramiento C-O-C piranosa.
1080-1076	Ác. gulurónico. Estiramiento C-O-C piranosa.
1312-1296	Alginato. Deformación de C-C-H
1379-1371	Quitina. Flexión C-H
1416-1412	Alginato. Deformación COH ác. urónico

# Capítulo 4

## Materiales y Metodología

En esta sección se presentan los materiales y equipos utilizados y la metodología aplicada para cada uno de los estudios realizados:

### 4.1. Materiales y equipos

#### 4.1.1. Liofilización y almacenamiento de las muestras

Para liofilizar el sobrenadante y la micoproteína obtenidas de la fermentación se utilizó un liofilizador Freeze Dryer MFD-1850M (Mundolab, China). Para moler las muestras se utilizó un mortero, para tamizar se utilizó una malla de 200 micras y para almacenar las muestras a  $-40^{\circ}\text{C}$  se utilizaron tubos Falcon de 50 ml.

#### 4.1.2. Reactivo para estimación de azúcares reductores

Para medir azúcares reductores se utiliza el método de DNS, por su capacidad de medir grupos carbónicos libres que actúan como agentes reductores. Este reactivo (8gr de NaOH, 150g de tartrato de sodio y 5 gramos de DNS, aforados hasta 0,5L con agua destilada) se adiciona a las muestras liofilizadas resuspendidas en agua destilada. Las muestras fueron comparadas con una muestra control de sal sódica de ácido algínico de algas pardas (Sigma-Aldrich, CAS 9005-38-3).

#### 4.1.3. Elaboración de la curva de calibración

Para establecer la curva de calibración para estimar la concentración de azúcares reductores de las muestras, se utilizó el reactivo Ácido-D-Glucurónico (Sigma-Aldrich, CAS 6556-12-3). Para realizar el ensayo DNS se utilizaron tubos Eppendorf de 1,5 ml y para alcanzar los  $100^{\circ}\text{C}$  requeridos se utilizó un equipo termomezclador HM100-Pro (DLAB Scientific, China).

#### 4.1.4. Medición de absorbancia

Para medir la absorbancia de las muestras a 540 nanómetros, se utilizó el espectrofotómetro SPECTROstar Omega (BMGLabtech, Alemania). Las muestras fueron colocadas en Placas de 96 pocillos Thermo Scientific y procesadas por el software *Omegacontrol V. 5,5 R4*. Los resultados fueron visualizados utilizando el software *Omega MARS V. 3,32 R5*, y los datos fueron guardados en una hoja de cálculo de *Excel* para su posterior análisis.

#### 4.1.5. Extracción de carbohidratos

Los carbohidratos de la micoproteína fueron extraídos para realizar estudios de composición y cantidad de azúcares reductores. Para extraer los carbohidratos se utilizó un equipo de Baño Térmico SW20 (Julabo, Alemania), con muestras en tubos Falcon de 15 ml resuspendidas en etanol al 80 %, preparado con agua destilada y etanol absoluto (PanReac AppliChem, CAS 64-17-5). La centrifugación se realizó en un equipo Centrifuge 5804 R (Eppendorf SE, Alemania). La resuspensión de los carbohidratos en agua destilada se facilita utilizando un equipo de baño ultrasonicador SB-5200 DTD 10L (Scientz, China).

#### 4.1.6. Medición espectro infrarrojo de las muestras

El análisis de espectro de infrarrojos con transformada de Fourier fue utilizado para realizar el análisis cualitativo de los componentes de los carbohidratos de la micoproteína y sobrenadante liofilizado. Se utilizó un equipo espectrometro Nicolet iS50 (Thermo Scientific, USA), equipado con un detector MCT y una celda Thermo Scientific Omni-Transmission ®.

#### 4.1.7. Antibiograma

Se realizó un antibiograma para estudiar las posibles biofunciones antimicrobiales de los oligoalginatos frente a una cepa de bacteria en particular. Para este estudio se utilizó la cepa *E. coli* top10, placas con Agar Müller-Hinton (AMH), Dimetil Sulfóxido (DMSO), papel filtro Whatmann®N°2 y Ampicilina (Sigma-aldrich, CAS 69-52-3).

#### 4.1.8. Análisis de resultados

En el análisis de los resultados, para el manejo de tablas de datos, cálculo de concentraciones y graficar curvas se utiliza el software *Excel*. Por otro lado, para realizar los análisis de varianza (ANOVA) se utilizó el software *IBM SPSS Statistics 29*, y la producción de gráficos de barras comparativos se utilizó el software *Graphpad Prism 8*.

### 4.2. Metodología

El trabajo se puede dividir en dos etapas, una común para los estudios de sobrenadante y micoproteína, la que consiste en la obtención de las muestras y elaboración de la curva de calibración, y otra etapa que difiere dependiendo del estudio realizado con las muestras.

#### 4.2.1. Obtención de las muestras

Los productos de la fermentación de la alga con *P. salina* son obtenidos tras haber sido manualmente separados, filtrados y almacenados en recipientes a 4°C. Las muestras fueron liofilizadas a -64°C y a una presión de 150 psi hasta estar visiblemente secas (Aproximadamente 48 horas continuas de liofilizado). Finalmente, éstas fueron molidas en un mortero hasta tener la consistencia de polvo fino, en donde las muestras de sobrenadante fueron directamente almacenadas a -40°C en tubos Falcon de 50 ml rotulados según el ensayo de fermentación de procedencia, mientras que las muestras de micoproteína fueron primero tamizadas utilizando una malla de 200 micras previo a ser almacenadas en las mismas condiciones.

## 4.2.2. Preparación curva de calibración para azúcares reductores

Para elaborar la curva de calibración, se prepara un stock madre de 1 ml de Ácido-D-Glucurónico a una concentración de 2,22 mg/ml. Para preparar cada punto de la curva, se realizan diluciones seriadas para preparar 0,5 ml de muestras con concentraciones que van desde los 0,05 mg/ml a los 0,5 mg/ml con un aumento de 0,05 mg/ml para cada punto. Se prepara una muestra blanco (0,5 ml de agua destilada), y luego se le adiciona 0,375 ml de reactivo DNS a cada tubo Eppendorf hasta alcanzar un volumen de 0,875 ml para cada muestra. Se agitan los tubos en un agitador tipo vórtex y se centrifuga brevemente en una mini centrífuga de velocidad fija para retirar el líquido de las paredes del tubo.

Los tubos son colocados a reaccionar por 10 minutos a 100°C, y una vez acabado son retirados y dejados a enfriar a temperatura ambiente. Cada muestra es agregada por triplicado en una placa de 96 pocillos (0,15 ml de muestra en cada pocillo) y se realiza una lectura de absorbancia a una longitud de onda de 540 nanómetros.[69]

Los resultados son guardados en una hoja de cálculo de *Excel*, y los puntos son graficados en una curva. Una curva con un  $R^2$  superior a 0,99 es considerada satisfactoria para este estudio.

## 4.2.3. Estudios de sobrenadante: Medición de azúcares reductores y grado de polimerización oligoalginatos

Para este estudio se sacaron de refrigeración las muestras de sobrenadante de cada ensayo de fermentación disponible y se llevaron a temperatura ambiente. Luego, se preparan en tubos Falcon de 15 ml soluciones de sobrenadante resuspendido en 5 ml de agua destilada a una concentración de 20 mg/ml. Paralelamente se prepara una muestra control de alginato de 2 mg/ml en agua destilada.

Se toman 0,5 ml de cada muestra y se adiciona 0,375 ml de reactivo DNS a cada tubo Eppendorf, los que se dejan reaccionar a 100°C durante 10 minutos bajo los mismos parámetros que los utilizados para la curva. Cada muestra es diluida por un factor de 3,33, resuspendida, y finalmente cargada por quintuplicado en una placa de 96 pocillos (0,15 ml en cada pocillo) para medir su absorbancia a 540 nanómetros. Este estudio se realizó tres veces, con el último set de muestras siendo sólo medido por triplicado.

Los datos obtenidos son guardados en una hoja de cálculo de *Excel*, y las concentraciones fueron calculadas utilizando la siguiente relación:

$$C = \frac{(A + n)}{m} \cdot f \quad (4.1)$$

Donde  $C$  es la concentración de azúcares reductores en mg/ml,  $A$  es la absorbancia medida,  $m$  y  $n$  son la pendiente y coeficiente de intersección obtenidos a partir de la curva de calibración, y  $f$  es el factor de dilución de la muestra. Se calcula el porcentaje de azúcares reductores sobre masa total de sobrenadante. Finalmente se estima el grado de polimerización de los oligoalginatos obtenidos de cada muestra utilizando la relación reportada en la sección 3.5.1 del documento.

#### 4.2.4. Estudio de microproteína: Extracción de carbohidratos

Se comienza masando 40 mg de cada microproteína disponible, los que son resuspendidos en 5 ml de etanol al 80 % en tubos Falcon de 15 ml rotulados según el ensayo de fermentación al que pertenecen. Los tubos son colocados a calentar en baño María a 80°C y agitados a 150 rpm durante 3 horas [74]. Transcurrido ese tiempo, los tubos son retirados y puestos a enfriar a temperatura ambiente, para luego ser centrifugados a 10.000 RCF y a 24°C durante 15 minutos. Paralelamente se masan tubos Falcon vacíos aptos para ser liofilizados, para luego trasvasijar en ellos 4 ml de sobrenadante centrifugado. Se sellan con parafilm y son almacenados a -80°C, mientras que el resto del líquido y microproteína es desechado.

Los tubos congelados son puestos a liofilizar a -64°C y una presión de 150 psi hasta que el líquido sublima completamente (alrededor de 96 horas de liofilización discontinua). Una vez finalizada, nuevamente se masa el tubo con una balanza analítica y se obtiene la masa total de carbohidratos extraída de la microproteína utilizando la siguiente relación:

$$m_c = (m_{t2} - m_{t1}) \cdot 1,25 \quad (4.2)$$

En donde  $m_c$  es la masa total de los carbohidratos estimada en gramos,  $m_{t2}$  es la masa del tubo con carbohidratos,  $m_{t1}$  es la masa del tubo vacío, y 1,25 es la ponderación que representa el mililitro no recuperado en la etapa de centrifugado, suponiendo que la solución de etanol posterior al baño María presenta una concentración de carbohidratos homogénea en su volumen total de 5 ml. Finalmente se calcula el porcentaje de carbohidratos recuperados sobre la masa total de microproteína.

#### 4.2.5. Medición de azúcares reductores

Se agregan 0,5 ml de agua destilada en los tubos con carbohidratos liofilizados, y estos fueron ultrasonificados en el baño sonicador 4 veces a una frecuencia de 40 KHz durante 5 minutos a 25°C con 1 minuto de descanso. Las muestras sonicadas fueron posteriormente mezclada en un agitador tipo vórtex para homogeneizar la solución. Se adicionaron 0,375 ml de reactivo DNS y la reacción ocurrió bajo los mismos parámetros utilizados para la curva de calibración.

Las muestras fueron medidas por triplicado en una placa de 96 pocillos, esta vez sin un factor de dilución, a una longitud de onda de 540 nanómetros. Los datos fueron guardados en una hoja de cálculo de *Excel*, y las concentraciones fueron calculadas utilizando la ecuación 4.1, con un valor para  $f$  de 1. Finalmente se calcula el porcentaje de azúcares reductores sobre el total de carbohidratos extraídos.

#### 4.2.6. Medición del espectro infrarrojo

Aproximadamente 10 mg de todas las muestras liofilizadas de carbohidratos de la microproteína y de las muestras de sobrenadante de tres ensayos de fermentación fueron mezcladas con bromuro de potasio hasta homogeneizar el polvo y producir pastillas a alta presión para ser analizadas por el espectrofotómetro.

El espectro fue medido a temperatura ambiente en el rango de 650-4000  $\text{cm}^{-1}$ , y los datos fueron almacenados en hojas de cálculo de *Excel* para su análisis. Los datos obtenidos

fueron divididos por 1.000.000 para disminuir su magnitud y llevarlos a la escala de  $\text{cm}^{-1}$ , y finalmente fueron graficados con la transmitancia relativa en función del número de onda. Los número de ondas de interés expuestos en la sección 3.5.2.1 fueron identificados visualmente en los gráficos y con ayuda de los valores de transmitancia obtenidos en las tablas almacenadas en *Excel*.

#### 4.2.7. Antibiograma

Se siembran colonias de la cepa *E. coli top10* en placas de agar durante 24 horas a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ . Una vez transcurrido el tiempo, se cuantifican los microorganismos utilizando el método de McFarland.

##### 4.2.7.1. Método de McFarland

Se toma una colonia de bacteria del agar utilizando un rastrillo y es resuspendida en 1 ml de agua destilada. Luego, se toman 100  $\mu\text{l}$  de esta suspensión y se mide absorbancia a 625 nanómetros en espectrofotómetro. Se considera suficiente si la absorbancia medida se encuentra entre los 0,08 a 0,1. [75]

##### 4.2.7.2. Preparación de las muestras

Las muestras son resuspendidas en DMSO a una concentración de 20 mg/ml, para luego ser filtradas con una membrana estéril de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro. Como control positivo se prepara una muestra de ampicilina con una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

##### 4.2.7.3. Sembrado de bacterias

100  $\mu\text{l}$  de la suspensión con la bacteria son sembrados con un rastrillo en la placa AMH, luego, se realizan perforaciones de 6mm en el gel, las que son rellenadas con 100  $\mu\text{l}$  de los extractos de oligosacáridos resuspendidos en DMSO, además de la muestra control positivo (ampicilina).

La placa se deja incubando a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas para luego realizar una comprobación visual de la susceptibilidad de la bacteria a los extractos, al comparar el radio de efecto de los extractos con el control positivo. [76]

#### 4.2.8. Análisis estadístico

Todos los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico para identificar diferencias significativas entre las muestras. Se utilizó el software *IBM SPSS Statistics 29* para realizar un análisis de varianza (ANOVA) tanto para los porcentajes de carbohidratos extraídos como los azúcares reductores obtenidos en sobrenadante y microproteína, con el test de Tukey con un intervalo de confianza del 95%. Los resultados fueron agrupados si no presentaban diferencias significativas y graficados utilizando el software *GraphPad Prism 8*. Finalmente, se concluye como los diferentes parámetros de fermentación afectaron los resultados.

# Capítulo 5

## Resultados y discusión

### 5.1. Curva de calibración de ácido-D-glucurónico

Para poder estimar la concentración de azúcares reductores con ensayos DNS en las muestras de sobrenadante y microproteína, se elaboró una curva de calibración utilizando como estándar ácido-D-glucurónico. Se realizaron diluciones seriadas para obtener 11 puntos con concentraciones conocidas entre 0 a 0,5 mg/ml de éste ácido, y sus absorbancias fueron medidas y graficadas. Debido a la baja cantidad de estándar disponible, solo se prepara un set completo de puntos, mientras que otros dos sets incompletos de puntos fueron preparados para comparar y escoger la curva que tuviese el mejor  $R^2$  (La tabla completa con las absorbancias medidas para elaborar la curva de calibración se puede visualizar en el anexo A.1.) La curva de calibración final obtenida se muestra en la figura 5.1:

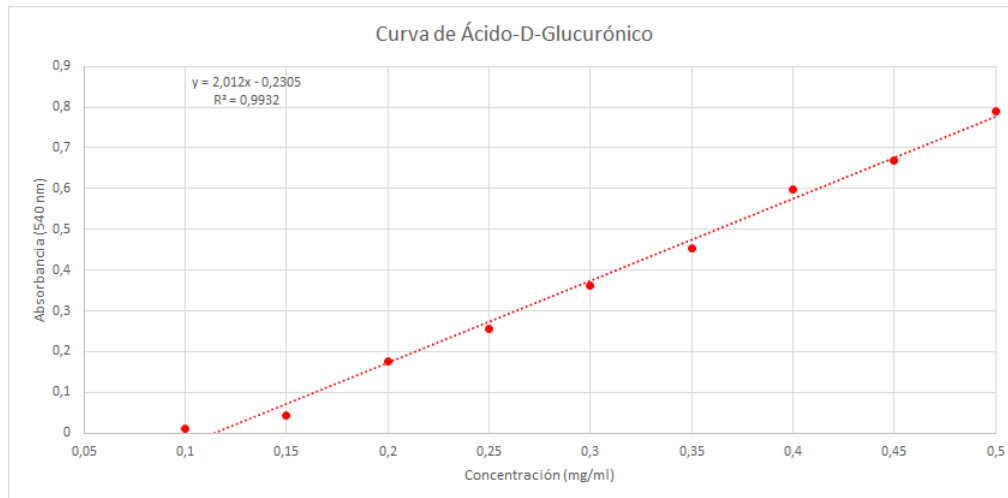


Figura 5.1: Curva de calibración del método de detección de ácido-D-glucurónico con DNS.

Para ajustar la curva al  $R^2$  deseado (superior a 0,99) se elimina el punto asociado a la concentración de 0,05 mg/ml de ácido glucurónico, esto debido a que por su baja concentración el valor de absorbancia medido es similar al punto blanco y no se encuentra en la recta. Se considera además que la información que puede aportar este punto no lo hace necesario para los efectos prácticos de este trabajo, al esperar medir concentraciones que debiesen ser superiores a él al tener presente la composición alta en fibra del hongo y de la alga. De la

ecuación de la recta se obtiene la relación para la concentración de azúcares reductores en función de la absorbancia:

$$C_{az.red.} = \frac{(Abs_r + 0,2305)}{2,012} \quad (5.1)$$

Donde  $C_{az.red.}$  es la concentración de azúcares reductores en mg/ml, y  $Abs_r$  es el valor de la absorbancia medida menos el valor de la absorbancia del punto blanco. Debido a las concentraciones que la conforman, esta ecuación será utilizada para valores de absorbancia medidos (sin sustraer el blanco) iguales o superiores a 0,2, e iguales o inferiores a 0,87, diluyendo las muestras en el caso de superar este valor. La curva de calibración final tiene un  $R^2$  de 0,9932, considerado suficientemente bueno como para continuar con los ensayos DNS.

## 5.2. Medición de la concentración de azúcares reductores en las muestras de los sobrenadantes

### 5.2.1. Factor de dilución de las muestras

En una primera instancia, se realizan ensayos para establecer el factor de dilución óptimo necesario para obtener valores de absorbancia que se encuentren en la curva mostrada anteriormente. Para ello, se realiza un ensayo DNS por triplicado para el sobrenadante liofilizado de 8 ensayos de fermentación (rotulados por los ensayos de procedencia del 3 al 10), agregando agua destilada post reacción de reducción en cada tubo para probar las siguientes configuraciones:

- Primer set de muestras: No se le agrega agua destilada.
- Segundo set de muestras: Se agrega agua destilada hasta alcanzar un 60 % del volumen total de la muestra (Factor de dilución  $f = 2,5$ )
- Tercer set de muestras: Se agrega agua destilada hasta alcanzar un 70 % del volumen total de la muestra (Factor de dilución  $f = 3,33$ )

Los valores obtenidos para los 3 sets de muestras se visualizan en la tabla 5.1:

Tabla 5.1: Valor de absorbancia medido a 540 nanómetros para los tres sets de muestras a distintos factores de dilución (Valor de blanco ya sustraído).

Factor dilución/Abs.	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
<b>Normal</b>	1,758	2,457	2,486	2,226	1,904	2,199	2,21	1,583
<b>Factor de 2,5</b>	0,609	1,028	0,978	0,735	0,78	0,823	0,855	0,688
<b>Factor de 3,3</b>	0,661	0,651	0,781	0,575	0,417	0,6	0,619	0,462

El único set de datos que se encuentra completamente dentro de la curva es el diluido con un factor de 3,3, además, estos valores se encuentran en la mitad superior de esta curva de calibración, lo que es preferido al tener un comportamiento más similar a la recta que para valores más bajos y cercanos al punto blanco. Por lo anterior, se define un factor de dilución de 3,3 como suficiente para poder emplear la curva de calibración obtenida.



## 5.2.2. Ensayo DNS

Una vez definido el factor de dilución, se realiza un ensayo DNS para estimar la concentración de azúcares reductores de las muestras de sobrenadante de los ensayos de fermentación. Se realiza la metodología de ensayo DNS anteriormente descrita en la sección de Metodología, diluyendo las muestras en un factor de 3,3 posterior a la reacción de reducción, y 0,15 ml de cada muestra es depositada en la placa de 96 pocillos por triplicado para cada ensayo de fermentación (Figura 5.2) y medida en el espectrofotómetro a 540 nanómetros (la tabla completa de las absorbancias medidas se encuentra en el anexo A.2).

La concentración de azúcares reductores de cada medición es calculada tal y como es mostrada en el anexo C.1. Para realizar el análisis estadístico de los datos, se agrupan los ensayos de fermentación acorde al principal parámetro de fermentación indicado que los diferencia del resto de los ensayos. Estos grupos son categorizados como se muestra en la tabla 5.2:

Tabla 5.2: Agrupación de ensayos según parámetro de fermentación característico.

Tratamiento 1 (T1)			
Menor temperatura durante fermentación (22°C)			
Ensayos	R4		

Tratamiento 2 (T2)			
Mayor temperatura durante fermentación (25°C)			
Ensayos	R3	R5	R10

Tratamiento 3 (T3)			
Menor vol. aire/minuto durante fermentación (1 vvm)			
Ensayos	R7	R8	

Tratamiento 4 (T4)			
Mayor vol. aire/minuto durante fermentación (1,5 vvm)			
Ensayos	R6	R9	R11

Los resultados del análisis estadístico obtenidos para cada día de ensayo DNS se muestran en la figura 5.3:

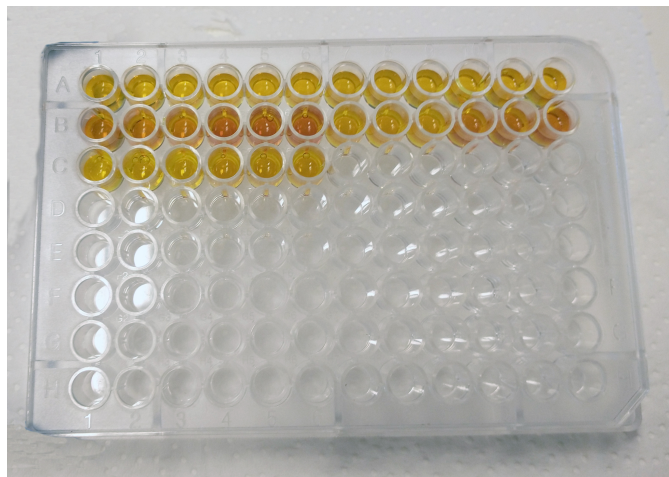
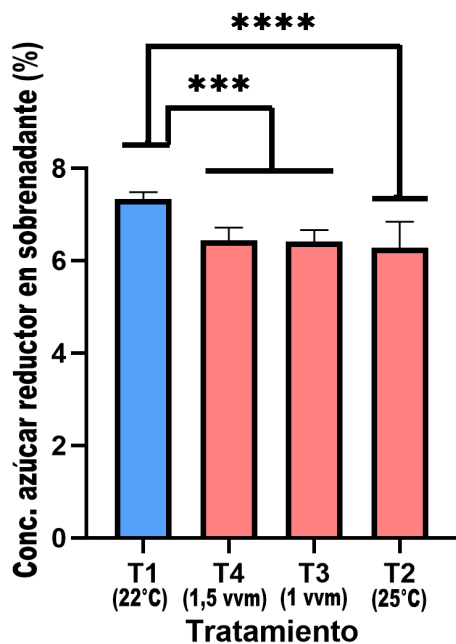
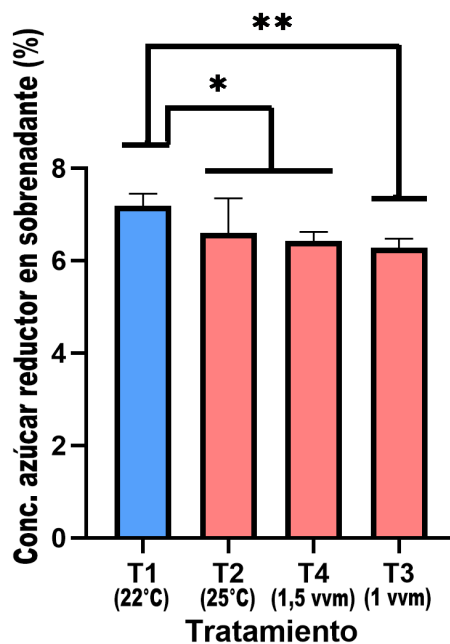


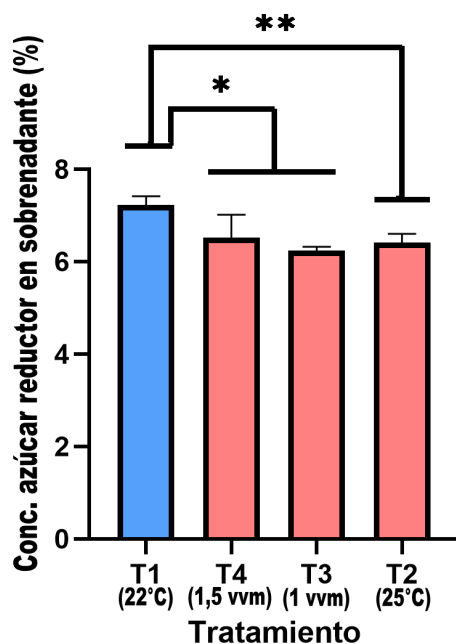
Figura 5.2: Muestras en placa de 96 pocillos agregadas por triplicado, ensayos de fermentación del 3 al 11 y muestra control (alginato).



(a)



(b)



(c)

Figura 5.3: Concentración de azúcares reductores en el sobrenadante para cada tratamiento, y ANOVA entre grupos de tratamientos distintos y diferencias significativas entre ellos (mayor diferencia representada con un mayor número de \*): Mayor concentración de azúcares reductores (Azul), y menor concentración (Rosado). A) Grupos con diferencias significativas para datos del primer ensayo DNS. B) Grupos con diferencias significativas para datos del segundo ensayo DNS. C) Grupos con diferencias significativas para datos del tercer ensayo DNS.

Para disminuir el error en cada grupo se realiza el análisis para todas las concentraciones calculadas durante los tres días y agrupadas todas a la vez según su tratamiento. El resultado obtenido del análisis se ilustra en la figura 5.4 y la concentración promedio en la tabla 5.3:

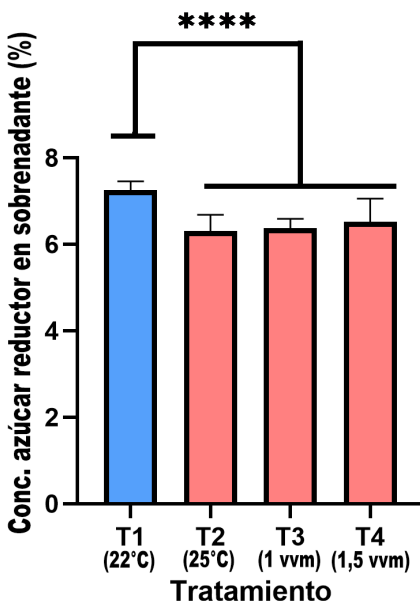


Figura 5.4: Concentración de azúcares reductores promedio en el sobrenadante para cada tratamiento, y análisis de varianza acumulado entre los 3 días de ensayos, agrupados por diferencias no significativa entre tratamientos: Mayor concentración de azúcares reductores (Azul), y menor concentración de azúcares reductores (Rosado).

Tabla 5.3: Valores de la concentración de azúcares reductores promedio en el sobrenadante, calculada para cada tratamiento.

Tratamiento	T1 (22°C)	T2 (25°C)	T3 (1vvm)	T4 (1,5vvm)
Concentración azúcares reductores (%)	7,26 ± 0,06	6,31 ± 0,07	6,38 ± 0,04	6,51 ± 0,1

El análisis estadístico de los datos en cada día presenta ambas diferencias entre los días pero también resultados en común. El resultado en común muestra que el tratamiento 1 (22°C) es el que consistentemente contiene una mayor concentración de azúcares reductores, valor cercano al 7% de la masa total del sobrenadante en cada día. Otro resultado común es que el tratamiento 1 tiene diferencia estadística significativa con los otros tres tratamientos.

Por otro lado, si bien los tratamientos 2, 3 y 4 pertenecen al mismo subconjunto homogéneo (sin diferencia significativa), la diferencia de cada tratamiento con el tratamiento 1 varía dependiendo del día del ensayo. Se estima que el hecho que cada grupo de tratamiento excepto el 1 este compuesto por más de un ensayo de fermentación sea la principal razón de esta diferencia, ya que al pertenecer a distintos lotes de fermentación, se pueden introducir variables que afecten la concentración de azúcares reductores (temperatura ambiente, fallos puntuales de equipo, etc) y que no se encuentran dentro de los alcances de este trabajo. Además, pequeños errores, particularmente humanos o de equipos, pueden ser parte de esta

diferencia, como por ejemplo la calibración de la balanza analítica entre los diferentes días, la cantidad de cifras significativas con las que se preparan las concentraciones de sobrenadante, posible evaporación durante el ensayo DNS por la apertura de los tubos, u homogeneización no perfecta al depositar las muestras en la placa de 96 pocillos, entre otros.

Con el propósito de disminuir el efecto que errores particulares en el procedimiento puedan aportar al análisis estadístico, es que se decide analizar de manera conjunta todos los datos de concentraciones obtenidos para el sobrenadante. La cantidad total de muestras analizadas fue de 87, y el error estándar en cada tratamiento se estabiliza cerca de 5%, y es en general más bajo que en los casos de días individuales (tabla B.11 en anexos), por lo que se considera un análisis estadístico más confiable que sus partes individuales. Esto también se puede inferir en base al gráfico mostrado en la figura 5.4 y la tabla 5.3, del que se puede concluir que el tratamiento 1 es efectivamente el que presenta una mayor concentración de azúcares reductores con un valor de  $7,26\% \pm 0,06\%$ , y los otros tres tratamientos perteneces al mismo subconjunto homogéneo y presentan la misma diferencia significativa con el tratamiento 1, lo que se podía inferir al combinar los gráficos de los tres días por separado.

La diferencia de porcentaje de concentración en los sobrenadantes entre los tratamientos no significa un resultado mayor por si solo, ya que el producto principal de la fermentación es la micoproteína, la que será analizada más adelante en este trabajo. Sin embargo, estos resultados serán útiles una vez se pueda contrastar con las concentraciones de azúcares en la micoproteína, además de posibles estudios para valorizar este residuo del proceso, como es el caso del siguiente estudio.

### 5.2.3. Estimación del grado de polimerización de los oligoalginatos del sobrenadante mediante ensayo DNS

Como se mencionó anteriormente, se intentó caracterizar el grado de polimerización de los oligoalginatos presentes en el sobrenadante mediante el método reportado en *Ming S. (2019)*, esto para poder identificar los posibles usos que los oligosacáridos en este residuo pueda tener en el mercado, como el mercado farmacéutico o cosmético entre otros. Para ello, se realiza un ensayo de DNS para muestras de 2 mg/ml de alginato y se compara el porcentaje de azúcares reductores con los obtenidos en los sobrenadantes utilizando la ecuación 5.2, obtenida a partir del despeje de  $x$  de la ecuación de la recta mostrada en la figura 3.5 en la sección 3.5.1:

$$\frac{100\%}{DP} = \frac{(\%_{az.redox.} + 0,136)}{1,085} \quad (5.2)$$

Donde DP es el valor del grado de polimerización de los oligoalginatos en el sobrenadante, y  $\%_{az.redox.}$  es el porcentaje de azúcares reductores en la muestra de sobrenadante para cada tratamiento, indicada en la sección anterior del documento. En el anexo C.2 se ejemplifica como se calcularon los grados de polimerización a partir de los datos obtenidos y la relación anteriormente reportada. Se tienen los siguientes grados de polimerización para cada uno de los tratamientos:

Tabla 5.4: Grado polimerización (DP) oligoalginatos del sobrenadante para cada tratamiento y muestra control (alginato).

Tratamiento	Control	T1 (22°C)	T2 (25°C)	T3 (1vvm)	T4 (1,5vvm)
DP	13,2	14,5	17,7	16,5	16,6

De la tabla 5.4 se concluye que el menor grado de polimerización pertenece a la muestra control, lo que es contrario a lo esperado al compararlo con alginato hidrolizado. Al hidrolizar un alginato de cierto grado de polimerización con enzimas alginato liasas, se espera obtener como producto dos oligoalginatos de grado de polimerización inferior que el original y ambos presentando extremos reductores, lo que aumenta la concentración de azúcares reductores y con ello la absorbancia de la muestra al realizar ensayo DNS. Si bien, en *Ming S.* se logra identificar una relación entre el grado de polimerización y la absorbancia, respaldándola con los métodos de caracterización más certeros como la resonancia magnética nuclear, es necesario recordar que el ambiente controlado de su experimento no contiene microorganismos ni otras variables que puedan afectar la concentración final de oligoalginatos.

Para el caso particular de este trabajo, esta metodología no entregó resultados que representen la realidad del proceso, por lo que no se puede caracterizar el grado de polimerización de los oligoalginatos obtenidos. Se propone que este método no es efectivo para caracterizar oligoalginatos provenientes de fermentación debido a las diferencias de condiciones expuestas en el párrafo anterior, ya que es posible que la *P. salina* utilizara el alginato hidrolizado para la formación de moléculas estructurales más complejas como quitinas y  $\beta$ -glucanos [61], las que disminuyen la cantidad de extremos reductores presentes. Se supone también que la composición del sobrenadante utilizado es un impedimento para utilizar esta metodología, ya que éste contiene todos los compuestos del medio de cultivo y los posibles productos extracelulares de la fermentación, lo que no permite establecer la masa real de los carbohidratos y puede subestimar la concentración de azúcares reductores al no compararlo solamente a la masa de carbohidratos totales.

A pesar de que se puede considerar una etapa de separación del sobrenadante para obtener solamente los carbohidratos a partir de él, al tratarse de una fermentación no se cree que esto represente una mejora que permita utilizar este método de caracterización. Se espera que la degradación y consumo de las algas por la *P. salina* para su metabolismo no permita replicar las condiciones controladas de hidrolización del alginato, ya que éste es utilizado para formar otras moléculas y el ensayo DNS no es capaz de representar este proceso.

### 5.3. Extracción de los carbohidratos en la Microproteína

La extracción de carbohidratos de la microproteína es una etapa importante del trabajo debido a la baja solubilidad de la microproteína y como esto imposibilita utilizar las muestras directamente en el ensayo de DNS. Además, es importante poder masar la cantidad de carbohidratos para poder establecer el porcentaje de azúcares reductores sobre carbohidratos totales del hongo.

Se logra extraer los carbohidratos de manera exitosa para tres sets de muestras entre los

ensayos de fermentación del 3 al 13. Los tubos utilizados para liofilizar las muestras fueron masados antes y después del proceso (tablas A.5, A.6 y A.7 en el anexo A.3). Los porcentajes de masa de carbohidratos totales con respecto al peso neto de la microproteína utilizado son mostrados en la figura 5.5 y la tabla 5.5:

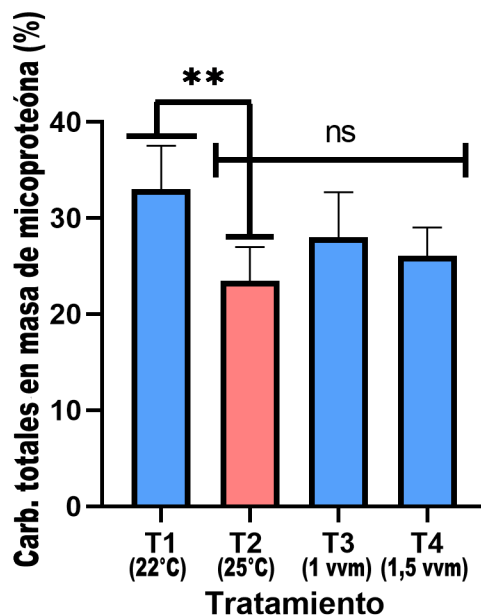


Figura 5.5: Tratamientos agrupados por diferencias significativas para concentración de carbohidratos totales comparado a la masa total de la microproteína: Mayor concentración de carbohidratos en la microproteína (Azul), y menor concentración de carbohidratos (Rosado).

Tabla 5.5: Valores de la concentración de carbohidratos totales promedio sobre masa total de microproteína calculada para cada tratamiento.

Tratamiento	T1 (22°C)	T2 (25°C)	T3 (1vvm)	T4 (1,5vvm)
Concentración carbohidratos totales (%)	30 ± 2,6	23,49 ± 1,32	28,02 ± 1,90	26,05 ± 1,05

De estos resultados se puede concluir que solo entre los tratamientos 1 y 2 existe una diferencia estadística significativa, pero también se da el caso de que la diferencia entre el tratamiento 1 y los tratamientos 3 y 4 no es significativa, de igual forma que la diferencia no es significativa entre los tratamientos 2, 3 y 4, lo que da espacio a interpretaciones.

La cantidad de datos total analizados es de 24 (tabla B.14 en anexos), y para el caso del tratamiento 1 este solo cuenta con 3 datos, por lo que es difícil considerar estos resultados estadísticos como representativos de la realidad. Como conclusión que se puede obtener a partir de estos resultados es que la cantidad de carbohidratos totales en una primera instancia se encontrarían entre los 25-30 % del total de la micoproteína, lo que es esperado considerando que este tipo de alimento es considerado ser alto en fibra. No se descarta la posibilidad de que este porcentaje varíe al utilizar otras metodologías o una mayor cantidad de datos de muestras, debido a que este trabajo no contempló la optimización de su obtención, lo que permite el espacio a mejoras en el proceso. Sin embargo, para la necesidad práctica de este

trabajo, estos resultados se consideran suficientes para continuar con los ensayos DNS para la microproteína.

Cabe mencionar que diversas metodologías fueron consideradas como alternativa a liofilizar las muestras, debido a los problemas de disponibilidad del equipo y el tiempo que tarda en promedio la sublimación (alrededor de 5 días de uso discontinuo). En una primera instancia se consideró evaporar el solvente al colocar los extractos directamente sobre un mechero a una distancia considerada segura, lamentablemente los carbohidratos se caramelizaron antes de que se lograra evaporar el solvente. Luego, se intentó disminuir el contacto directo con calor y se probó exponer las muestras a una temperatura ambiente de 60°C en una estufa, sin embargo, tampoco se logró evaporar el solvente antes de que los carbohidratos sufrieran los efectos del calor. Finalmente, se utilizó un equipo de baño María a 40°C y agitación para evitar la adhesión de los carbohidratos a las paredes del tubo, efectivamente logrando que los carbohidratos no se caramelizaran. Sin embargo, tras cuatro horas no se evidenció disminución del volumen del solvente, posiblemente debido a que el etanol evaporado no logra salir del tubo antes de ser recondensado en las paredes por el gradiente de temperatura en el material.

Debido a todo lo anterior, se considera que el liofilizador es la mejor alternativa para retirar el solvente del extracto en ausencia de otros equipos como el secador rotatorio, además de que debido a la baja cantidad de masa de carbohidratos obtenida, el masado de los tubos posterior al liofilizado es altamente sensible y requiere de métodos que retiren de manera efectiva el solvente. Para mejorar el proceso, se recomienda investigar alternativas para evaporar parcialmente el solvente, lo que disminuiría el tiempo necesario de liofilizado.

## 5.4. Medición de la concentración de azúcares reductores en las muestras de las micoproteínas

Al igual que para el caso del sobrenadante, se realizaron ensayos DNS para estimar las concentraciones de azúcares reductores sobre los carbohidratos totales presentes en la microproteína extraídos anteriormente. En este caso fue necesario adicionar una etapa de ultrasonido debido a que los carbohidratos liofilizados se encontraban fuertemente adheridos a las paredes del tubo, los que los hacía difícil de solubilizar, incluso utilizando el agitador tipo vórtex y la ayuda de la pipeta para ello.

Por restricciones de tiempo en la etapa de liofilizado, solo tres sets completos de muestras desde el ensayo 3 al ensayo 11 fueron exitosamente liofilizadas, de las cuales, un set fue destinado a análisis de espectrometría infrarroja, y los dos sets restantes fueron destinados para realizar ensayo DNS. Las tablas A.8 y A.9 en el anexo A.4 presentan los resultados de absorbancia para cada muestra. Tras realizar el análisis de varianza de las muestras y agruparlas según tratamiento, se muestra el resultado obtenido en la tabla 5.6 y la figura 5.6:

Tabla 5.6: Valores para la concentración de azúcares reductores promedio en la microproteína calculada para cada tratamiento.

Tratamiento	T1 (22°C)	T2 (25°C)	T3 (1vvm)	T4 (1,5vvm)
Concentración azúcares reductores (%)	1,45 ±0,03	1,97 ±0,05	1,90 ±0,16	2,09 ±0,18

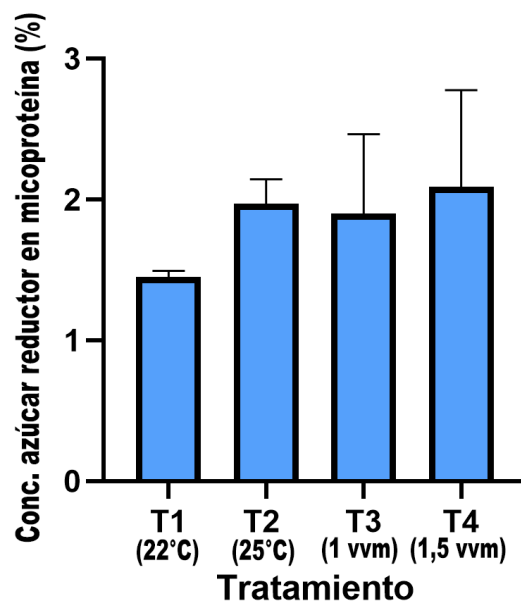


Figura 5.6: Concentración de azúcares reductores en las muestras de micoproteína para cada tratamiento y ANOVA entre los distintos tratamientos, agrupados por diferencias no significativa.

De estos resultados destaca que en una primera instancia no hay diferencias significativas entre los tratamientos. También destaca que los errores entre los datos de los tratamientos 3 y 4 asciende hasta casi un 10 %, lo que se considera elevado. Los datos totales analizados fueron 42, lo que hace inferir que la diferencia podría no deberse necesariamente a la falta de datos.

Considerando lo anterior, se concluye que utilizando solamente los resultados estadísticos mostrados será insuficiente para alcanzar una conclusión satisfactoria. Se estima que una mayor cantidad de pruebas (posiblemente el doble de las realizadas), podría mostrar una diferencia significativa entre los tratamientos 2, 3 y 4 con el tratamiento 1. Esto es el caso opuesto al estudio realizado con el sobrenadante de los tratamientos.

Lo anterior abre la posibilidad de que una menor temperatura en la fermentación afecta negativamente la cantidad de fibra en el hongo, lo que podría no estar relacionado a la hidrólisis del alginato (una mayor concentración de azúcares reductores en el sobrenadante podría indicar un menor uso de la fuente de carbono y no de mayor actividad de alginato liasas). Estudios que escapan del alcance de este trabajo son necesarios para comprobar esta hipótesis, por lo que solo se puede concluir que el tratamiento 1 (22°C) es el que menor concentración de oligoalginatos presenta en la micoproteína.

Con respecto a las concentraciones estimadas, estas son en su máximo un 2 % de los carbohidratos de la micoproteína. Lo anterior se puede deber a que la *P. salina* utiliza los monómeros u oligoalginatos como base para las formación de moléculas estructurales más complejas, lo que disminuiría los extremos reductores medibles. Sin embargo, la presencia de azúcares reductores no permite descartar la opción de que haya presencia de oligosacáridos de alginato en la micoproteína. El estudio de espectro infrarrojos detallado más adelante



permitirá confirmar su presencia, mientras que no se podrá caracterizar el grado de polimerización de estos debido al fallo de la metodología DNS empleada anteriormente, bajo la hipótesis de no ser viable al tratarse de fermentaciones.

## 5.5. Medición del espectro infrarrojo de las muestras de sobrenadante y micoproteínas

Para analizar cualitativamente los compuestos relacionados con el alginato encontrados en los carbohidratos de la micoproteína, se realizó un análisis del espectro infrarrojo de las muestras obtenidas para los cuatro tratamientos. En la figura 5.7 se comparan los espectros infrarrojos para los cuatro tratamientos, la figura 5.8 muestra los picos identificados en el espectro infrarrojo de los carbohidratos de una micoproteína provenientes de un ensayo del tratamiento 2. Finalmente la figura 5.9 muestra la comparación entre el tratamiento 2 con el espectro de su sobrenadante y con las fuentes de carbono.

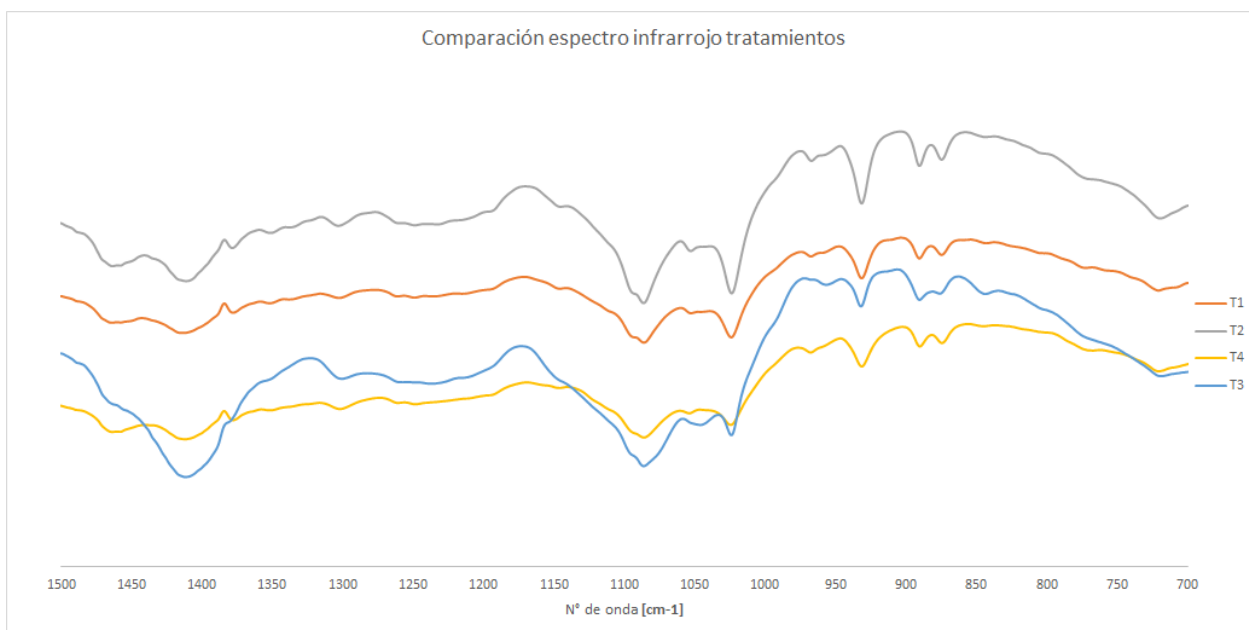


Figura 5.7: Comparación espectro infrarrojo para carbohidratos de la micoproteína proveniente del tratamiento 1 (22°C, línea naranja), tratamiento 2 (25°C, línea gris), tratamiento 3 (1vvm, línea azul) y tratamiento 4 (1,5vvm, línea amarilla).

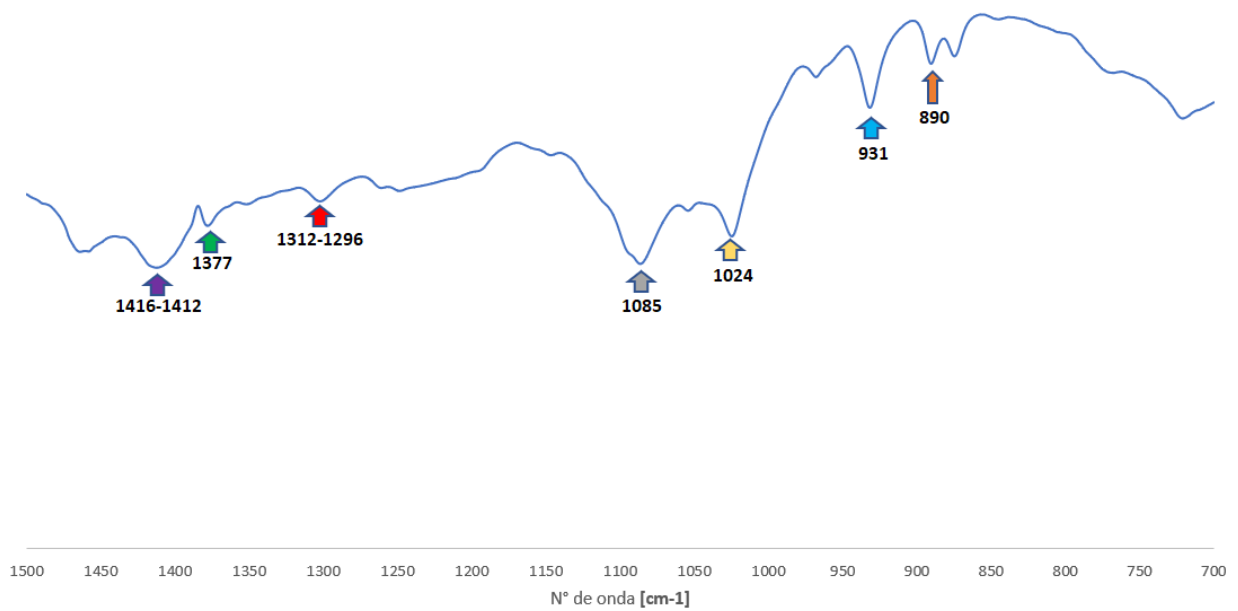


Figura 5.8: FT-IR de los carbohidratos presentes en la micoproteína proveniente del tratamiento 2 (25°C), medidos a temperatura ambiente y con sus picos relevantes identificados.

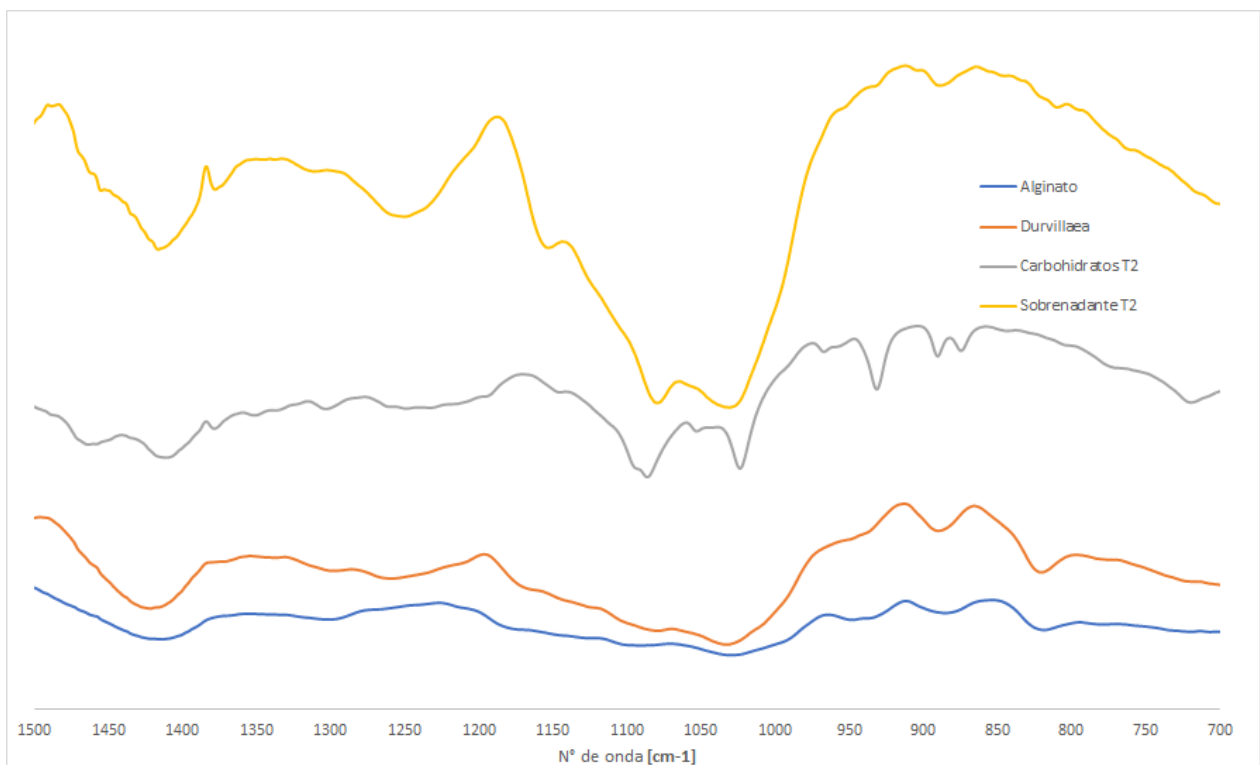


Figura 5.9: FT-IR carbohidratos provenientes de una fermentación del tratamiento 2 (línea gris), junto al espectro infrarrojo de su sobrenadante (línea amarilla), *Durvillaea* seca (línea naranja) y alginato comercial (línea azul).

De la figura 5.7 se puede concluir que a pesar de las diferencias de intensidad, los cuatro tratamientos comparten relativamente los mismos picos en sus espectros infrarrojos. En el rango entre 850 y 1100  $\text{cm}^{-1}$  (el cual es el más relevante para los efectos de este trabajo) tanto los picos como la intensidad de estos son similares, mientras que para el rango entre 1100 y 1500  $\text{cm}^{-1}$  la diferencia entre el tratamiento 3 y el resto es más notable, aún así no es considerado lo suficientemente relevante como para realizar su estudio aparte, al tratarse del rango de menor interés. Es por esto que se decide continuar con el espectro del tratamiento 2 para profundizar el análisis de los compuestos.

Para identificar los picos de la figura 5.8 se utilizó tanto los rangos relevantes conocidos expuestos en la sección 3.5.2.1 de este documento, como de la ayuda visual del gráfico y las tablas de datos entregadas por el espectrómetro. El pico en el número de onda 890  $\text{cm}^{-1}$  (flecha naranja) indica la presencia de ácido manurónico, mientras que el pico en 931  $\text{cm}^{-1}$  (flecha celeste) representa el estiramiento del enlace C-O del ácido gulurónico. Los picos en 1024  $\text{cm}^{-1}$  (flecha amarilla) y 1085  $\text{cm}^{-1}$  (flecha gris) indican la presencia de bloques de oligoalginatos, representando las vibraciones de enlaces C-C del anillo de piranosa. Considerando sus intensidades se puede concluir que los carbohidratos de la microproteína poseen mayor cantidad de bloques PolyG (flecha gris) que PolyM. Para los últimos tres picos, el rango 1296-1312  $\text{cm}^{-1}$  (flecha roja) se asocia a la deformación del enlace C-C-H del alginato, el pico 1377  $\text{cm}^{-1}$  (flecha verde) es asociado a la quitina, y finalmente el rango 1412-1416  $\text{cm}^{-1}$  es asociado a la deformación del enlace C-O-H del ácido urónico (alginato).

De la comparación entre los espectros en la figura 5.9 destaca que para el alginato comercial, y por sobre todo para la *Durvillaea*, tienen sus picos más notorios en el rango de interés para los números de onda 820  $\text{cm}^{-1}$ , 890  $\text{cm}^{-1}$  y el rango 1024-1032  $\text{cm}^{-1}$ , los que se asocian a la presencia de ácido manurónico y bloques PolyM. Lo anterior era lo esperado, ya que como se dijo anteriormente, las algas pardas y en particular el género de las *Durvillaea* tienen característicamente una razón M/G superior a 1, indicando una mayor cantidad de ácido manurónico y bloques PolyM en su alginato estructural. El espectro infrarrojo del sobrenadante presenta picos con intensidades relativamente similares para bloques PolyG y polyM, esto siendo lo esperado al tratarse de una fermentación, representando el alginato hidrolizado y no consumido por el hongo.

Realizando la comparación entre los espectros, se puede concluir que la fuente de carbono está mayoritariamente compuesta por ácido manurónico y bloques PolyM, mientras que los oligosacáridos presentes en la microproteína están compuestos mayoritariamente por ácido gulurónico y bloques PolyG. Se propone que durante la fermentación, las enzimas alginato liasas de la *P. salina* que son mayoritariamente preferentes de bloques PolyM (PsAlg7B, PsAlg7C y PsMan8A), comienzan con la hidrólisis de la fuente de carbono, y los productos son transformados o utilizados como base para otras moléculas por el metabolismo del hongo, mientras que el ácido gulurónico y los bloques PolyG son aprovechados en menor medida y son asimilados por el hongo de manera más íntegra.

De este estudio se puede concluir que la microproteína efectivamente contiene oligoalginatos producto de la fermentación de las algas pardas, y que estos son en su mayoría compuestos por ácido gulurónico y bloques PolyG. Lo anterior sugiere que los resultados de concentración de azúcares reductores anteriores efectivamente miden oligoalginatos. Debido a la naturaleza

cualitativa de este método, no se puede concluir con respecto a la cantidad de oligoalginatos en la microproteína ni el grado de polimerización que estos poseen, sin embargo se logró detectar estas moléculas en una muestra de composición mayoritariamente desconocida y con un método más simple que los alternativos.

## 5.6. Análisis de la biofunción antimicrobiana de los oligoalginatos obtenidos por fermentación de alginato con *P. salina*

Como alternativa para caracterizar una biofunción de los oligoalginatos de la microproteína, se realizó un antibiograma para la cepa *E. coli top10* utilizando los oligosacáridos obtenidos de los ensayos de fermentación 4 (T1, 22°C), 8 (T3, 1vvm) y 11 (T4, 1,5vvm). El objetivo de este estudio es comprobar *in vitro* la susceptibilidad de esta bacteria Gram negativa a la exposición de oligoalginatos y comprobar si existe actividad antimicrobiana, comparando su efecto a los producidos al exponer esta cepa a 100µg/ml de ampicilina como control positivo. El resultado del ensayo se muestra en la figura 5.10:

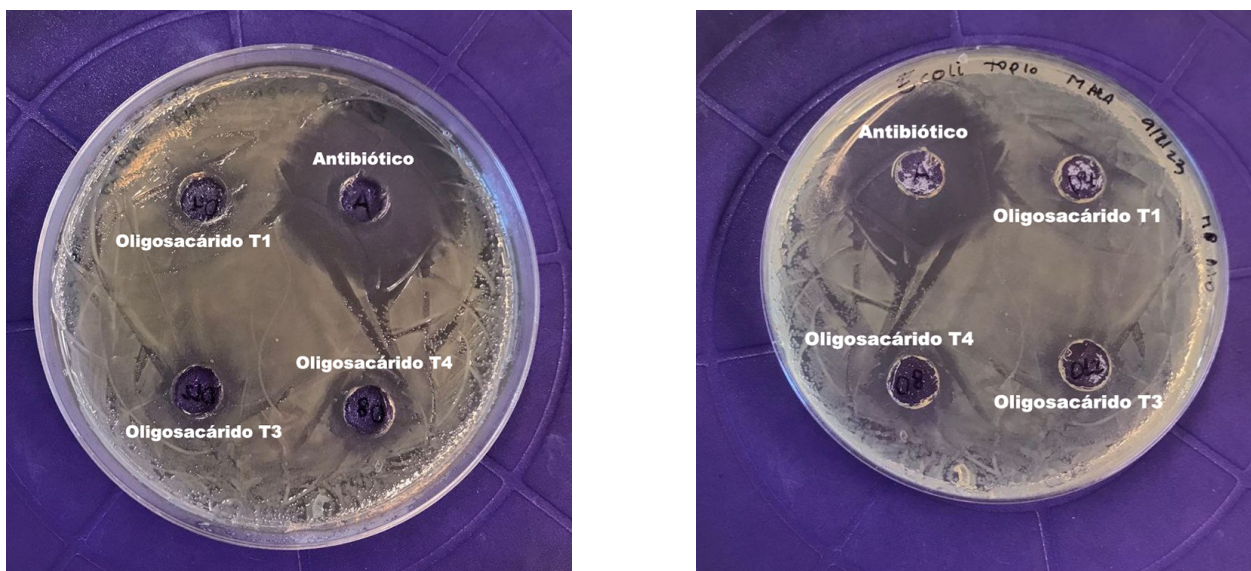


Figura 5.10: Resultados antibiograma sobre la cepa *E. coli top10* utilizando los oligosacáridos obtenidos de los tratamientos T1, T3 y T4. Control positivo es ampicilina 100 µg/ml. Vista superior de la placa (der.) y vista inferior de la placa (izq.)

A partir de los resultados, se puede concluir que los oligoalginatos presentes en tres de los tratamientos no presentan actividad antimicrobiana para la cepa *E. coli* utilizada, una bacteria bacilo Gram negativo. Algunos de los bacilos Gram negativos están a menudo asociados con enfermedades comensales, como la shigelosis [77], por lo que una actividad antimicrobial para enfermedades alimenticias en la micoproteína es deseada para potenciar sus beneficios para la salud y valor como producto.

Si bien los resultados fueron negativos para esta combinación tratamiento-bacteria, no se

puede descartar la posible actividad antimicrobiana que los oligosacáridos en la microproteína puedan tener contra otros tipos de bacterias. En futuras instancias, se puede probar aumentar la concentración de oligosacáridos, para investigar si a mayores concentraciones se obtiene el efecto antimicrobiano. Además, se puede realizar este estudio para otras bacterias, como por ejemplo, *S. aureus* y *P. aureginosa*, las que no necesariamente están asociadas a enfermedades alimentarias, pero que se tiene igual interés de encontrar alternativas a antibióticos. También se pueden realizar estudios para identificar posibles sinergias entre antibióticos y oligosacáridos contra bacterias resistentes a antibióticos. Este estudio también se puede replicar para el sobrenadante de la fermentación, ya que como se mencionó anteriormente, éste también tiene presencia de oligoalginatos, además de otros compuestos no identificados hasta el momento, los que pueden tener el potencial antimicrobiano, entre otros.

# Capítulo 6

## Conclusiones

Se lograron los objetivos específicos de este trabajo. Se establecieron protocolos para extracción de carbohidratos de la microproteína y para la estimación de concentración de azúcares reductores en sobrenadante y microproteína. Se probó la metodología de caracterización de grado de polimerización de los oligoalginatos mediante ensayo DNS, y se estudió el espectro infrarrojo de las muestras de carbohidratos. Finalmente, se realizó un estudio bibliográfico de las posibles biofunciones de los oligoalginatos, probando una de éstas mediante un antibiograma. Finalmente, se logró el objetivo general de caracterización parcial de oligoalginatos obtenidos de la fermentación de *Durvillaea* con *P. salina*. El uso de metodologías sencillas y baratas como DNS y FTIR entregaron información relevante para el estudio de un alimento novedoso, y se plantea que continuar con estudios para las biofunciones importantes para el producto sea de mayor beneficio que la caracterización completa con NMR y estudio bibliográfico.

Los valores de carbohidratos totales en la micoproteína de la *P. salina* se encontraron en el rango de 25-30 % de la masa total de la microproteína, lo que se encuentra dentro de lo esperado para un alimento considerado alto en fibra. Se sugiere estudiar el efecto del tiempo de extracción en el baño térmico y la variación de temperatura como posibles variables para optimizar este procedimiento.

Para la cuantificación de azúcares reductores, se establece que la reacción con el reactivo DNS durante 10 minutos a 100°C y una dilución por un factor de 3,3 es suficiente para cuantificar los azúcares en muestras de sobrenadante a una concentración de 20 mg/ml. Las muestras de carbohidratos de la microproteína deben ser primero tamizadas para luego ser resuspendidas a concentraciones similares, además, la menor concentración de azúcares reductores en la microproteína no las hace requerir de dilución tras la reacción con DNS. Los ensayos de fermentación fueron agrupados en cuatro tratamientos, de los cuales destaca el grupo de menor temperatura de fermentación (22°C) como el que presenta la mayor concentración de azúcares reductores en su sobrenadante, con un porcentaje de 7,26 %  $\pm$  0,06 % sobre la masa total del sobrenadante y con diferencia significativa con el resto de tratamientos. Este tratamiento también destaca por ser el que presenta la menor concentración de azúcares reductores en la microproteína, con un porcentaje de 1,45 %  $\pm$  0,03 % sobre la masa total de carbohidratos, pero sin diferencia significativa con el resto de tratamientos.

Se propone que la menor temperatura de fermentación (22°C) no tiene un efecto significa-

tivo en la actividad de las alginato liasas de la *P. salina*, sin embargo, si hay un efecto sobre la asimilación de la fuente de carbono en ella. Dentro de los alcances de este trabajo, no se identificaron diferencias significativas entre las concentraciones de azúcares reductores para los otros tres tratamientos.

Se propone que la metodología planteada en *Ming Sung* para caracterizar DP utilizando ensayo DNS no es adecuada para analizar productos de fermentación. Esto debido a la presencia de otras enzimas que pueden consumir el alginato para el metabolismo de la *P. salina*, lo que disminuye la concentración de azúcares reductores en la muestra y afecta el resultado de la metodología.

Los espectros infrarrojos de los carbohidratos de las microproteínas obtenidas de los cuatro tratamientos fueron analizados junto a los sobrenadantes y las fuentes de carbono. Los picos presentes en el espectro de los carbohidratos de las microproteínas fueron los asociados principalmente al ácido gulurónico y bloques PolyG, mientras que para las fuentes de carbono se identificaron los picos de ácido manurónico y bloques PolyM. Se propone, bajo las condiciones particulares de este trabajo, que las alginato liasas de la *P. salina*, mayoritariamente preferentes de bloques PolyM, hidrolizan y consumen estos bloques para su metabolismo y la producción de moléculas más complejas, mientras que el ácido gulurónico y bloques PolyG son asimilados más íntegramente en la microproteína.

Una de las biofunciones de interés de los oligoalginatos investigada es la de actividad antimicrobiana. Se realizó un antibiograma utilizando la cepa *E. coli* top10 y muestras de tres tratamientos distintos, cuyo resultado fue negativo para actividad antimicrobial. No se descarta que los oligoalginatos puedan presentar actividad contra otros tipos de bacterias, hongos o incluso sinergia con antibióticos contra bacterias resistentes a antibióticos, por lo que se propone continuar con estudios similares contra otros microorganismos o estudiando el efecto de la concentración de los oligoalginatos como antimicrobiano.

La bibliografía disponible sobre la biofunciones de oligoalginatos es acotada y específica. Se sabe que para oligoalginatos PolyG hay beneficios para la salud al activar rutas importantes para los macrófagos, así como promover la germinación de ciertas semillas en el ámbito de la agricultura. Sin embargo, la caracterización completa de los oligoalginatos obtenidos mediante métodos más complejos y caros no necesariamente llevará al completo entendimiento de sus biofunciones, sobre todo en el ámbito de oligoalginatos como alimento. Se recomienda continuar con estudios específicos para las biofunciones de interés, como por ejemplo continuar con antibiogramas considerando un espectro más amplio de bacterias u hongos a analizar, o realizar ensayos de presencia de antioxidantes, de esta manera obteniendo la información atingente a la micoproteína como producto alimenticio.

# Bibliografía

- [1] Naciones Unidas, “Población | naciones unidas.”, <https://www.un.org/es/global-issues/population> (visitado el 20 de Noviembre 2022).
- [2] World Cancer Research Fund International, “Meat, fish, dairy and cancer risk - wcrf international.”, <https://www.wcrf.org/diet-activity-and-cancer/risk-factors/meat-fish-dairy-and-cancer-risk/> (visitado el 16 de Febrero 2023).
- [3] Cusack, D. F., Kazanski, C. E., Hedgpeth, A., Chow, K., Cordeiro, A. L., Karpman, J., y Ryals, R., “Reducing climate impacts of beef production: A synthesis of life cycle assessments across management systems and global regions,” *Global Change Biology*, vol. 27, pp. 1721–1736, 2021.
- [4] Clark, M. y Tilman, D., “Comparative analysis of environmental impacts of agricultural production systems, agricultural input efficiency, and food choice,” *Our World in Data*, vol. 12, 2017.
- [5] Derbyshire, E. y Ayoob, K. T., “Mycoprotein: Nutritional and health properties,” *Nutrition Today*, vol. 54, pp. 7–15, 2019.
- [6] Pacific Harvest, “Learn about brown seaweeds their benefits | pacific harvest.”, <https://pacificharvest.co.nz/seaweed-blog/about-seaweeds/brown-seaweeds/> (visitado el 17 de Noviembre 2022).
- [7] Tester, R. y Karkalas, J., “Carbohydrates | classification and properties,” *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, pp. 862–875, 2003.
- [8] Guillén, D., Sánchez, S., y Rodríguez-Sanoja, R., “Carbohydrate-binding domains: Multiplicity of biological roles,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 85, pp. 1241–1249, 2010.
- [9] BeMiller, J. N., “Carbohydrate nutrition, dietary fiber, bulking agents, and fat mimetics,” *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists*, pp. 323–350, 2019.
- [10] Slavin, J. y Carlson, J., “Carbohydrates,” *Advances in Nutrition*, vol. 5, p. 760, 2014.
- [11] Mantantzis, K., Schlaghecken, F., Sünram-Lea, S., y Maylor, E., “Sugar rush or sugar crash? a meta-analysis of carbohydrate effects on mood,” *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, vol. 101, pp. 45–67, 2019.
- [12] Buyken, A. E., Mela, D. J., Dussort, P., Johnson, I. T., Macdonald, I. A., Stowell, J. D., y Brouns, F. J., “Dietary carbohydrates: a review of international recommendations and the methods used to derive them,” *European Journal of Clinical Nutrition* 2018 72:12, vol. 72, pp. 1625–1643, 2018.
- [13] Vani, A., Rutika, S., Manpreet, K., y Reena, G., “31 - Commercialization of bionanocomposites,” *Bionanocomposites in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*,



- pp. 587–610, 2021.
- [14] Minghou, J., e. a., “Studies on the M:G ratios in alginate,” Eleventh International Seaweed Symposium. Developments in Hydrobiology, vol. 22, 1984.
- [15] Alejandro, G.-V., Anilú, M.-M., Luis, P.-P., María, G.-H., y María, S.-G., “Diseño de una planta productora de ácido algínico y alginatos a partir de azotobacter vinelandii,” Tecnología, Ciencia, Educación, 2008.
- [16] Lee, K. y Mooney, D., “Alginate: Properties and biomedical applications,” Progress in polymer science, vol. 37, pp. 106–126, 2012.
- [17] Tucci, M., Mattioli, M. B., Ricotti, G., y Biagini, G., “Polysaccharides: Health-environment binomial,” J. Appl Cosmetol, vol. 17, pp. 94–104.
- [18] Pepe Sedano, “Sargazo: Alginato y aditivos alimentarios,” <https://noticias.radioturquesa.fm/vivir-entre-el-sargazo/> (visitado el 15 de Febrero 2023).
- [19] Chinchilla-Soto, G. y Dobles-Jiménez, A., “Evolución de la ortopedia prequirúrgica en pacientes con labio y/o paladar fisurado: revisión de literatura,” Revista Científica Odontológica, vol. 12, no. 1, 2016.
- [20] Takagi, T. e. a., “Construction of bioengineered yeast platform for direct bioethanol production from alginate and mannitol,” Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 101, p. 6627–6636, 2017.
- [21] J. Brasch, R. P., “Composition and block structure of alginates from New Zealand brown seaweeds,” Carbohydrate Research, vol. 293, pp. 119–132, 1996.
- [22] Saji, S., Hebden, A., Goswami, P., y Du, C., “A brief review on the development of alginate extraction process and its sustainability,” Sustainability, vol. 14, 2022.
- [23] Jun Liu, e. a., “Alginate Oligosaccharides: Production, Biological Activities, and Potential Applications,” Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, vol. 18, pp. 1859–1881, 2019.
- [24] Salgado, C. L., Muñoz, R., Blanco, A., y Lienqueo, M. E., “Valorization and upgrading of the nutritional value of seaweed and seaweed waste using the marine fungi paradendryphiella salina to produce mycoprotein,” Algal Research, vol. 53, p. 102135, 2021.
- [25] Kailemia, M. J., Ruhaak, L. R., Lebrilla, C. B., y Amster, I. J., “Oligosaccharide analysis by mass spectrometry: a review of recent developments,” Analytical chemistry, vol. 86, pp. 196–212, 2014.
- [26] He, X., min Hwang, H., Aker, W. G., Wang, P., Lin, Y., Jiang, X., y He, X., “Synergistic combination of marine oligosaccharides and azithromycin against pseudomonas aeruginosa,” Microbiological research, vol. 169, pp. 759–767, 2014.
- [27] Shiroma, R., Uechi, S., Tawata, S., y Tako, M., “Isolation and characterization of alginate from hizikia fusiformis and preparation of its oligosaccharides,” Journal of applied glycoscience, vol. 54, pp. 85–90, 2007.
- [28] Xu, X., Iwamoto, Y., Kitamura, Y., Oda, T., y Muramatsu, T., “Root growth-promoting activity of unsaturated oligomeric uronates from alginate on carrot and rice plants,” Bioscience, biotechnology, and biochemistry, vol. 67, pp. 2022–2025, 2003.
- [29] Yamasaki, Y., Yokose, T., Nishikawa, T., Kim, D., Jiang, Z., Yamaguchi, K., y Oda, T., “Effects of alginate oligosaccharide mixtures on the growth and fatty acid composition of

- the green alga *chlamydomonas reinhardtii*,” *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 113, pp. 112–116, 2012.
- [30] Mao, S., Zhang, T., Sun, W., y Ren, X., “The depolymerization of sodium alginate by oxidative degradation,” *Pharmaceutical Development and Technology*, vol. 17, pp. 763–769, 2012.
- [31] El-Mohdy, H. L., “Radiation-induced degradation of sodium alginate and its plant growth promotion effect,” *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 10, pp. S431–S438, 2017.
- [32] Watthanaphanit, A. y Saito, N., “Effect of polymer concentration on the depolymerization of sodium alginate by the solution plasma process,” *Polymer Degradation and Stability*, vol. 98, pp. 1072–1080, 2013.
- [33] Aida, T. M., Yamagata, T., Watanabe, M., y Smith, R. L., “Depolymerization of sodium alginate under hydrothermal conditions,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 80, pp. 296–302, 2010.
- [34] Wong, T. Y., Preston, L. A., y Schiller, N. L., “Alginate lyase: Review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications,” *Annual Review of Microbiology*, vol. 54, pp. 289–340, 2000.
- [35] Zhu B, Y. H., “Alginate lyase: Review of major sources and classification, properties, structure-function analysis and applications,” *Bioengineered*, vol. 6, pp. 125–131, 2015.
- [36] Bang, M. A., Seo, J. H., Seo, J. W., Jo, G. H., Jung, S. K., Yu, R., Park, D. H., y Park, S. J., “*Bacillus subtilis* kctc 11782bp-produced alginate oligosaccharide effectively suppresses asthma via t-helper cell type 2-related cytokines,” *PLOS ONE*, vol. 10, 2015.
- [37] Moen, E., Horn, S., y Østgaard, K., “Alginate degradation during anaerobic digestion of *laminaria hyperborea* stipes,” *Journal of Applied Phycology*, vol. 9, pp. 157–166, 1997.
- [38] Benitez, M. L. R., “Espectroscopia de resonancia magnética nuclear,” 2020, <https://bo.nga.unisimon.edu.co/handle/20.500.12442/7989> (visitado el 18 de Febrero 2023).
- [39] Jensen, H. M., Larsen, F. H., y Engelsen, S. B., “Characterization of alginates by nuclear magnetic resonance (nmr) and vibrational spectroscopy (ir, nir, raman) in combination with chemometrics,” *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 1308, pp. 347–363, 2015.
- [40] Chen, P., Zhu, Y., Men, Y., Zeng, Y., y Sun, Y., “Purification and characterization of a novel alginate lyase from the marine bacterium *bacillus* sp. alg07,” *Marine Drugs* 2018, Vol. 16, Page 86, vol. 16, p. 86, 2018.
- [41] Awad, H. y Aboul-Enein, H. Y., “A validated hplc assay method for the determination of sodium alginate in pharmaceutical formulations,” *Journal of Chromatographic Science*, vol. 51, pp. 208–214, 2013.
- [42] Wang, L., Pan, M., Li, D., Yin, Y., Jiang, T., Fang, S., Wang, G., Zhao, J., Zhang, H., y Chen, W., “Metagenomic insights into the effects of oligosaccharides on the microbial composition of cecal contents in constipated mice,” *Journal of Functional Foods*, vol. 38, pp. 486–496, 2017.
- [43] Han, Z. L., Yang, M., Fu, X. D., Chen, M., Su, Q., Zhao, Y. H., y Mou, H. J., “Evaluation of prebiotic potential of three marine algae oligosaccharides from enzymatic hydrolysis,” *Marine Drugs*, vol. 17, 2019.

- [44] Iwasaki, K. I. y Matsubara, Y., “Purification of alginate oligosaccharides with root growth-promoting activity toward lettuce,” *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, vol. 64, pp. 1067–1070, 2000.
- [45] Hu, X., Jiang, X., Hwang, H., Liu, S., y Guan, H., “Promotive effects of alginate-derived oligosaccharide on maize seed germination,” *Journal of Applied Phycology*, vol. 16, pp. 73–76, 2004.
- [46] Falkeborg, M., Cheong, L. Z., Gianfico, C., Sztukiel, K. M., Kristensen, K., Glasius, M., Xu, X., y Guo, Z., “Alginate oligosaccharides: enzymatic preparation and antioxidant property evaluation,” *Food chemistry*, vol. 164, pp. 185–194, 2014.
- [47] Chen, J., Hu, Y., Zhang, L., Wang, Y., Wang, S., Zhang, Y., Guo, H., Ji, D., y Wang, Y., “Alginate oligosaccharide dp5 exhibits antitumor effects in osteosarcoma patients following surgery,” *Frontiers in Pharmacology*, vol. 8, p. 623, 2017.
- [48] Fang, W., Bi, D., Zheng, R., Cai, N., Xu, H., Zhou, R., Lu, J., Wan, M., y Xu, X., “Identification and activation of tlr4-mediated signalling pathways by alginate-derived guluronate oligosaccharide in raw264.7 macrophages,” *Scientific Reports 2017 7:1*, vol. 7, pp. 1–13, 2017.
- [49] He, X., min Hwang, H., Aker, W. G., Wang, P., Lin, Y., Jiang, X., y He, X., “Synergistic combination of marine oligosaccharides and azithromycin against pseudomonas aeruginosa,” *Microbiological research*, vol. 169, pp. 759–767, 2014.
- [50] Hao, J., Hao, C., Zhang, L., Liu, X., Zhou, X., Dun, Y., Li, H., Li, G., Zhao, X., An, Y., Liu, J., y Yu, G., “Om2, a novel oligomannuronate-chromium(iii) complex, promotes mitochondrial biogenesis and lipid metabolism in 3t3-l1 adipocytes via the ampk-pgc1 $\alpha$  pathway,” *PLOS ONE*, vol. 10, 2015.
- [51] Florence, T., Hines, M., y Gan, D., “Cosmetic compositions and food components neuroprotective comprising oligoalginate having a polymerization degree of 10 to prevent aging of the skin. (u.s n $^{\circ}$  patente: Us2014/0328957 a1) u.s. patent and trademark office,” 2014, <https://patents.google.com/patent/US20140328957A1/en>.
- [52] Asadpoor, M., Ithakisiou, G.-N., van Putten, J. P. M., Pieters, R. J., Folkerts, G., y Braber, S., “Antimicrobial activities of alginate and chitosan oligosaccharides against staphylococcus aureus and group b streptococcus,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 12, 2021.
- [53] Tania, V., Felix, C., Felix, R., Valentão, P., y Lemos, M., “Seaweed as a natural source against phytopathogenic bacteria,” *Marine Drugs*, vol. 21, 2022.
- [54] Vitafood’s Insights, “Bcd bioscience reinvents the category with precision prebiotics.”, <https://www.vitafoodsinsights.com/startups/bcd-bioscience-reinvents-category-precision-prebiotics> (visitado el 20 de Noviembre 2022).
- [55] iNaturalist Chile, “Cochayuyo (*durvillaea antarctica*).”, <https://inaturalist.mma.gob.cl/taxa/197107-Durvillaea-antarctica> (visitado el 17 de Febrero 2023).
- [56] Velásquez, M., Fraser, C. I., Nelson, W. A., Tala, F., y Macaya, E. C., “Concise review of the genus *durvillaea bory de saint-vincent*, 1825,” *Journal of Applied Phycology*, vol. 32, pp. 3–21, 2020.
- [57] Schaumann, K. y Weide, G., “Enzymatic degradation of alginate by marine fungi,” *Hydrobiologia*, vol. 204-205, pp. 589–596, 1990.

- [58] Cruz, T. E. D., Wagner, S., y Schulz, B., “Physiological responses of marine dendryphiella species from different geographical locations,” *Mycological Progress*, vol. 5, pp. 108–119, 2006.
- [59] Edison-Dela-Cruz, T., Schulz, B. E., Kubicek, C. P., y Druzhinina, I. S., “Carbon source utilization by the marine dendryphiella species *d. arenaria* and *d. salina*,” *FEMS microbiology ecology*, vol. 58, pp. 343–353, 2006.
- [60] Gostinçar, C., Muggia, L., y Grube, M., “Polyextremotolerant black fungi: Oligotrophism, adaptive potential, and a link to lichen symbioses,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 3, p. 390, 2012.
- [61] Pilgaard, B., “Systematic enzyme discovery targeting fungal and algal biomass. DTU Bioengineering,” 2021, <https://backend.orbit.dtu.dk/ws/portalfiles/portal/257060230/Thesis.pdf> (visitado el 22 de Noviembre 2022).
- [62] Pilatasig, M. y Maribel, M., “Determinación de azúcares reductores y su relación con carbohidratos no absorbidos en niños (a) del centro de educación inicial “maría montessori” del cantón latacunga en el período 2014- 2015.” Universidad Técnica de Ambato, 2015.
- [63] LibreTexts Español, “12.3: Isomerización en el  $\alpha$ -carbono.”, [https://espanol.libretexts.org/Quimica/Quimica%20Orgnica/Quimica%20Orgnica%20con%20nfasis%20Biolgica/%28Soderberg%29/12%3A\\_Reacciones\\_en\\_el\\_%CE%B1-carbono%2C\\_Parte\\_I/12.03%3A\\_Isomerizaci%C3%B3n\\_en\\_el\\_%CE%B1-carbono](https://espanol.libretexts.org/Quimica/Quimica%20Orgnica/Quimica%20Orgnica%20con%20nfasis%20Biolgica/%28Soderberg%29/12%3A_Reacciones_en_el_%CE%B1-carbono%2C_Parte_I/12.03%3A_Isomerizaci%C3%B3n_en_el_%CE%B1-carbono) (visitado el 10 de Noviembre 2022).
- [64] Jiang, Z., Wang, L., Wu, W., y Wang, Y., “Biological activities and physicochemical properties of maillard reaction products in sugar-bovine casein peptide model systems,” *Food chemistry*, vol. 141, pp. 3837–3845, 2013.
- [65] Wang, H. Y., Qian, H., y Yao, W. R., “Melanoidins produced by the maillard reaction: Structure and biological activity,” *Food Chemistry*, vol. 128, pp. 573–584, 2011.
- [66] Tessier, F. J. y Birlouez-Aragon, I., “Health effects of dietary maillard reaction products: The results of icare and other studies,” *Amino Acids*, vol. 42, pp. 1119–1131, 2012.
- [67] Landeta, C., “comunicación personal,” 10 de abril de 2023.
- [68] Saqib, A. A. N. y Whitney, P. J., “Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (dns) reagent towards mono- and di-saccharide sugars,” *Biomass and Bioenergy*, vol. 35, pp. 4748–4750, 2011.
- [69] Ming Sun, e. a., “A simple method to calculate the degree of polymerization of alginate oligosaccharides and low molecular weight alginates,” *Carbohydrate Research*, vol. 486, 2019.
- [70] Dutta, A., “Fourier transform infrared spectroscopy,” *Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization*, vol. 2, pp. 73–93, 2017.
- [71] Technology Networks, “Ir spectroscopy and ftir spectroscopy: How an ftir spectrometer works and ftir analysis.”, <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/ir-spectroscopy-and-ftir-spectroscopy-how-an-ftir-spectrometer-works-and-ftir-analysis-363938#D7> (visitado el 20 de Febrero 2023).
- [72] Mwanga, E. P., Mapua, S. A., Siria, D. J., Ngowo, H. S., Nangacha, F., Mgando, J.,

- Baldini, F., Jiménez, M. G., Ferguson, H. M., Wynne, K., Selvaraj, P., Babayan, S. A., y Okumu, F. O., “Using mid-infrared spectroscopy and supervised machine-learning to identify vertebrate blood meals in the malaria vector, *Anopheles arabiensis*,” *Malaria Journal*, vol. 18, pp. 1–9, 2019.
- [73] Beratto, A., Agurto, C., Freer, J., Peña-Farfal, C., Troncoso, N., Agurto, A., y del P. Castillo, R., “Chemical characterization and determination of the anti-oxidant capacity of two brown algae with respect to sampling season and morphological structures using infrared spectroscopy and multivariate analyses,” *Applied spectroscopy*, vol. 71, pp. 2263–2277, 2017.
- [74] Sawangwan, T., Wansanit, W., Pattani, L., y Noysang, C., “Study of prebiotic properties from edible mushroom extraction,” *Agriculture and Natural Resources*, vol. 52, pp. 519–524, 2018.
- [75] Zamora-Lahuerta, L. y Pérez-Gracia, M., “Using digital photography to implement the mcfarland method,” *Interface*, vol. 9, p. 1892–1897, 2012.
- [76] Troung, W., Hidayat, L., Bolaris, M., Nguyen, L., y Yamaki, J., “The antibiogram: key considerations for its development and utilization,” *JAC-Antimicrobial Resistance*, vol. 3, 2021.
- [77] Marcoleta, A., Toro, C., Prado, V., Serrano, M., Fernández, P., Benadof, D., Camponovo, R., Campos, V., Porte, L., Zamorano, J., Ortega, C., Urqueta, B., y Ulloa, M. T., “Antibiotic susceptibility patterns among *Shigella sonnei*, isolated during three different periods in región metropolitana, Chile,” *Revista chilena de infectología*, vol. 30, 2013.

# Anexos

## Anexo A. Tablas experimentales

### A.1. Absorbancias curva de calibración

A continuación se presenta la tabla A.1 con los valores de absorbancia medidas para las distintas concentraciones de Ácido-D-Glucurónico preparadas para los puntos de la curva de calibración:

Tabla A.1: Absorbancias medidas a 540 nanómetros de muestras con concentraciones fijas de Ácido-D-Glucurónico. Curva A fueron quitadas muestras al azar. Curva B fueron quitadas la mayoría de las menores concentraciones y algunas intermedias. Curva C tiene todos los puntos.

ug/ul	0	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5
A	0,074	-	0,152	-	0,207	0,33	0,382	0,463	-	0,692	0,797
B	0,07	-	-	0,272	0,343	-	0,574	0,687	0,79	-	0,637
C	0,07	0,074	0,082	0,113	0,245	0,326	0,431	0,523	0,668	0,74	0,86

La curva C fue la utilizada para esta memoria, donde finalmente se removió el punto para la concentración de 0,05 mg/ml para ajustar el  $R^2$ .

## A.2. Absorbancias de sobrenadantes para cada ensayo de fermentación

A continuación se presentan los valores de absorbancias obtenidos para los sobrenadantes y la muestra control (alginato) y la concentración calculada a partir de ésta. La tabla A.2 presenta los datos obtenidos durante el primer día de ensayo.

Tabla A.2: Valores de absorbancia obtenidos al medir a 540 nanómetros los sobrenadantes de cada ensayo y la concentración de azúcares reductores calculada. Primer día del ensayo.

Absorbancia	Control	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
Set 1	0,168	0,513	0,72	0,642	0,566	0,599	0,604	0,602	0,496
Set 2	0,179	0,546	0,741	0,662	0,653	0,589	0,633	0,636	0,498
Set 3	0,141	0,549	0,714	0,664	0,579	0,582	0,651	0,645	0,526
Set 4	0,171	0,535	0,706	0,663	0,604	0,597	0,647	0,641	0,498
Set 5	0,162	0,536	0,748	0,679	0,591	0,595	0,68	0,63	0,524
Abs - Blanco	Control	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
Set 1	0,098	0,443	0,65	0,572	0,496	0,529	0,534	0,532	0,426
Set 2	0,109	0,476	0,671	0,592	0,583	0,519	0,563	0,566	0,428
Set 3	0,071	0,479	0,644	0,594	0,509	0,512	0,581	0,575	0,456
Set 4	0,101	0,465	0,636	0,593	0,534	0,527	0,577	0,571	0,428
Set 5	0,092	0,466	0,678	0,609	0,521	0,525	0,61	0,56	0,454
Concentración (ug/ul)	Control	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
Set 1	0,16	1,11	1,46	1,33	1,20	1,26	1,27	1,26	1,09
Set 2	0,17	1,17	1,49	1,36	1,35	1,24	1,31	1,32	1,09
Set 3	0,15	1,17	1,45	1,36	1,22	1,23	1,34	1,33	1,14
Set 4	0,16	1,15	1,43	1,36	1,27	1,25	1,34	1,33	1,09
Set 5	0,16	1,15	1,50	1,39	1,24	1,25	1,39	1,31	1,13
Porcentaje concentración azúcares reductores sobre masa sobrenadante para cada muestra.	8,16 %	5,57 %	7,29 %	6,64 %	6,01 %	6,29 %	6,33 %	6,31 %	5,43 %
	8,44 %	5,85 %	7,46 %	6,81 %	6,73 %	6,20 %	6,57 %	6,59 %	5,45 %
	7,49 %	5,87 %	7,24 %	6,82 %	6,12 %	6,14 %	6,72 %	6,67 %	5,68 %
	8,24 %	5,76 %	7,17 %	6,81 %	6,33 %	6,27 %	6,68 %	6,63 %	5,45 %
	8,01 %	5,76 %	7,52 %	6,95 %	6,22 %	6,25 %	6,96 %	6,54 %	5,66 %
Porcentaje Promedio	8,07 %	5,76 %	7,33 %	6,81 %	6,28 %	6,23 %	6,65 %	6,55 %	5,54 %

La tabla A.3 presenta los datos obtenidos para el segundo día de ensayo DNS.

Tabla A.3: Valores de absorbancia obtenidos al medir a 540 nanómetros los sobrenadantes de cada ensayo y la concentración de azúcares reductores calculada. Segundo día del ensayo.

<b>Absorbancia</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<b>R5</b>	<b>R6</b>	<b>R7</b>	<b>R8</b>	<b>R9</b>	<b>R10</b>
<b>Set 1</b>	0,598	0,69	0,696	0,642	0,573	0,659	0,589	0,497
<b>Set 2</b>	0,513	0,757	0,717	0,647	0,588	0,583	0,586	0,503
<b>Set 3</b>	0,616	0,672	0,707	0,633	0,598	0,588	0,59	0,527
<b>Set 4</b>	0,516	0,715	0,744	0,637	0,587	0,593	0,596	0,521
<b>Set 5</b>	0,537	0,707	0,72	0,625	0,606	0,612	0,611	0,517
<b>Abs - Blanco</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<b>R5</b>	<b>R6</b>	<b>R7</b>	<b>R8</b>	<b>R9</b>	<b>R10</b>
<b>Set 1</b>	0,528	0,62	0,626	0,572	0,503	0,589	0,519	0,427
<b>Set 2</b>	0,443	0,687	0,647	0,577	0,518	0,513	0,516	0,433
<b>Set 3</b>	0,546	0,602	0,637	0,563	0,528	0,518	0,52	0,457
<b>Set 4</b>	0,446	0,645	0,674	0,567	0,517	0,523	0,526	0,451
<b>Set 5</b>	0,467	0,637	0,65	0,555	0,536	0,542	0,541	0,447
<b>Concentración (ug/ul)</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<b>R5</b>	<b>R6</b>	<b>R7</b>	<b>R8</b>	<b>R9</b>	<b>R10</b>
<b>Set 1</b>	1,26	1,41	1,42	1,33	1,21	1,36	1,24	1,09
<b>Set 2</b>	1,11	1,52	1,45	1,34	1,24	1,23	1,24	1,10
<b>Set 3</b>	1,29	1,38	1,44	1,31	1,26	1,24	1,24	1,14
<b>Set 4</b>	1,12	1,45	1,50	1,32	1,24	1,25	1,25	1,13
<b>Set 5</b>	1,15	1,44	1,46	1,30	1,27	1,28	1,28	1,12
<b>Porcentaje concentración azúcares reductores sobre masa sobrenadante para cada muestra.</b>	6,28 %	7,04 %	7,09 %	6,64 %	6,07 %	6,78 %	6,20 %	5,44 %
	5,57 %	7,59 %	7,26 %	6,68 %	6,19 %	6,15 %	6,18 %	5,49 %
	6,43 %	6,89 %	7,18 %	6,57 %	6,28 %	6,19 %	6,21 %	5,69 %
	5,60 %	7,25 %	7,49 %	6,60 %	6,19 %	6,24 %	6,26 %	5,64 %
	5,77 %	7,18 %	7,29 %	6,50 %	6,34 %	6,39 %	6,38 %	5,61 %



La tabla A.4 presenta los datos obtenidos para el tercer día de ensayo DNS.

Tabla A.4: Valores de absorbancia obtenidos al medir a 540 nanómetros los sobrenadantes de cada ensayo y la concentración de azúcares reductores calculada. Tercer día del ensayo.

<b>Absorbancia</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<b>R5</b>	<b>R6</b>	<b>R7</b>	<b>R8</b>	<b>R9</b>	<b>R10</b>
<b>Set 1</b>	0,532	0,676	0,733	0,63	0,601	0,588	0,599	0,492
<b>Set 2</b>	0,617	0,671	0,699	0,627	0,586	0,611	0,588	0,49
<b>Set 3</b>	0,588	0,712	0,708	0,646	0,59	0,582	0,594	0,507
<b>Abs - Blanco</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<b>R5</b>	<b>R6</b>	<b>R7</b>	<b>R8</b>	<b>R9</b>	<b>R10</b>
<b>Set 1</b>	0,462	0,606	0,663	0,56	0,531	0,518	0,529	0,422
<b>Set 2</b>	0,547	0,601	0,629	0,557	0,516	0,541	0,518	0,42
<b>Set 3</b>	0,518	0,642	0,638	0,576	0,52	0,512	0,524	0,437
<b>Concentración (ug/ul)</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<b>R5</b>	<b>R6</b>	<b>R7</b>	<b>R8</b>	<b>R9</b>	<b>R10</b>
<b>Set 1</b>	1,15	1,38	1,48	1,31	1,26	1,24	1,26	1,08
<b>Set 2</b>	1,29	1,38	1,42	1,30	1,24	1,28	1,24	1,08
<b>Set 3</b>	1,24	1,44	1,44	1,33	1,24	1,23	1,25	1,10
<b>Porcentaje concentración az. reductores sobre masa sobrenadante para cada muestra.</b>	5,73 %	6,92 %	7,39 %	6,54 %	6,30 %	6,19 %	6,29 %	5,40 %
	6,43 %	6,88 %	7,11 %	6,52 %	6,18 %	6,38 %	6,19 %	5,38 %
	6,19 %	7,22 %	7,19 %	6,67 %	6,21 %	6,14 %	6,24 %	5,52 %

### A.3. Masa tubos liofilizado carbohidratos

A continuación se presenta la tabla de datos con la masa total de los carbohidratos extraídos de la microproteína. El valor de masa final fue obtenidos al multiplicar la masa por 1,25 para considerar el mililitro extra de etanol no recuperado tras centrifugar. Algunas muestras no fueron alcanzadas a ser completamente liofilizadas, por lo que no se tienen datos al respecto (representadas por el color naranja).

Tabla A.5: Masa carbohidratos post-liofilizado. Primer set de muestras.

<b>1 Prueba (Muestras)</b>	Masa tubo (gr)	Peso post-lio. (gr)	Masa Carb. (gr)	Masa final (gr)	% del total
3	5,0638	5,0737	0,0099	0,012375	31 %
4	5,0474	5,0588	0,0114	0,01425	36 %
5	5,034	5,0408	0,0068	0,0085	21 %
6	4,9465	4,9548	0,0083	0,010375	26 %
7	4,9495	4,9591	0,0096	0,012	30 %
8	5,0006	5,0081	0,0075	0,009375	23 %
9	5,0667	5,0739	0,0072	0,009	23 %
10	5,0967	5,104	0,0073	0,009125	23 %
DE1	5,0037	5,0114	0,0077	0,009625	24 %
DE2	5,0485	5,0551	0,0066	0,00825	21 %
DE3	5,0401	5,0497	0,0096	0,012	30 %

Tabla A.6: Masa carbohidratos post-liofilizado. Segundo set de muestras.

<b>2 Prueba (Muestras)</b>	Masa tubo (gr)	Peso post-lio. (gr)	Masa Carb. (gr)	Masa final (gr)	% del total
3	-	-	-	-	-
4	5,025	5,0364	0,0114	0,01425	36 %
5	5,0025	5,0099	0,0074	0,00925	23 %
6	4,9492	4,9592	0,01	0,0125	31 %
7	5,0399	5,0514	0,0115	0,014375	36 %
8	4,9971	5,0049	0,0078	0,00975	24 %
9	4,8738	4,8818	0,008	0,01	25 %
10	5,0626	5,0702	0,0076	0,0095	24 %
DE1	4,9187	4,927	0,0083	0,010375	26 %
DE2	5,0246	5,0316	0,007	0,00875	22 %
DE3	5,0508	5,0599	0,0091	0,011375	28 %

Tabla A.7: Masa carbohidratos post-lioofilizado. Tercer set de muestras.

<b>3 Prueba (Muestras)</b>	Masa tubo (gr)	Peso post-lio. (gr)	Masa Carb. (gr)	Masa final (gr)	% del total
<b>3</b>	-	-	-	-	-
4	4,9372	4,9461	0,0089	0,011125	28 %
5	5,0292	5,0356	0,0064	0,008	20 %
6	4,969	4,9785	0,0095	0,011875	30 %
7	5,1058	5,1151	0,0093	0,011625	29 %
8	4,9701	4,9782	0,0081	0,010125	25 %
<b>9</b>	-	-	-	-	-
10	5,071	5,0782	0,0072	0,009	23 %
DE1	5,0507	5,0584	0,0077	0,009625	24 %
DE2	5,0384	5,0459	0,0075	0,009375	23 %
DE3	5,0596	5,0682	0,0086	0,01075	27 %

## A.4. Absorbancias de azúcares reductores en la microproteína

A continuación se presentan en las tablas A.8 y A.9 las absorbancias medidas en el ensayo DNS de los carbohidratos extraídos a partir de la microproteína, resuspendidos en 0,5 ml. El color naranja indica muestras que no fueron analizadas por diversos motivos o impedimentos. La concentración fue calculada tomando como base la masa total de la muestra obtenida (no supuesta) en 0,5 ml de agua.

Tabla A.8: Absorbancias medidas a 540 nanómetros para los carbohidratos extraídos de la microproteína. Primer set de muestras.

Muestras	3	4	5	6	7	8	9	10	DE1	DE2	DE3
Masa Carb. (mg)	9,9	11,4	6,8	8,3	9,6	7,5	7,2	7,3	7,7	6,6	9,6
Conc. (mg/ml)	19,8	-	13,6	16,6	19,2	15	14,4	14,6	15,4	13,2	19,2
<b>Absorbancia 1</b>	0,241	-	0,278	0,271	0,258	0,425	0,624	0,285	0,606	0,2	0,296
Masa Az. Redox 1 (mg)	0,117	-	0,126	0,125	0,121	0,163	0,212	0,128	0,208	0,107	0,131
% Sobre Carb. Total. 1	1,18 %	-	1,86 %	1,50 %	1,26 %	2,17 %	2,95 %	1,75 %	2,70 %	1,62 %	1,36 %
<b>Absorbancia 2</b>	0,241	-	0,251	0,276	0,27	0,442	0,712	0,291	0,5	0,204	0,3
Masa Az. Redox 2 (mg)	0,117	-	0,120	0,126	0,124	0,167	0,234	0,130	0,182	0,108	0,132
% Sobre Carb. Total. 2	1,18 %	-	1,76 %	1,52 %	1,30 %	2,23 %	3,25 %	1,78 %	2,36 %	1,64 %	1,37 %
<b>Absorbancia 3</b>	0,264	-	0,263	0,274	0,372	0,444	0,67	0,343	0,644	0,195	0,336
Masa Az. Redox 3 (mg)	0,123	-	0,123	0,125	0,150	0,168	0,224	0,143	0,217	0,106	0,141
% Sobre Carb. Total. 3	1,24 %	-	1,80 %	1,51 %	1,56 %	2,23 %	3,11 %	1,95 %	2,82 %	1,60 %	1,47 %

Tabla A.9: Absorbancias medidas a 540 nanómetros para los carbohidratos extraídos de la microproteína. Segundo set de muestras.

Muestras	3	4	5	6	7	8	9	10	DE1	DE2	DE3
Masa Carb. (mg)	-	8,9	6,4	9,5	9,3	8,1	-	7,2	7,7	7,5	8,6
Conc. (mg/ml)	-	17,8	12,8	19	18,6	16,2	-	14,4	15,4	15	17,2
<b>Absorbancia 1</b>	-	0,307	0,336	0,371	0,282	0,617	-	0,37	0,25	0,311	0,273
Masa Az. Redox 1 (mg)	-	0,134	0,141	0,149	0,127	0,211	-	0,149	0,119	0,135	0,125
% Sobre Carb. Total. 1	-	1,50 %	2,20 %	1,57 %	1,37 %	2,60 %	-	2,07 %	1,55 %	1,79 %	1,45 %
<b>Absorbancia 2</b>	-	0,282	0,311	0,345	0,292	0,633	-	0,356	0,35	0,229	0,289
Masa Az. Redox 2 (mg)	-	0,127	0,135	0,143	0,130	0,215	-	0,146	0,144	0,114	0,129
% Sobre Carb. Total. 2	-	1,43 %	2,10 %	1,51 %	1,40 %	2,65 %	-	2,02 %	1,87 %	1,52 %	1,50 %
<b>Absorbancia 3</b>	-	0,278	0,334	0,379	0,307	0,619	-	0,391	0,249	0,342	0,302
Masa Az. Redox 3 (mg)	-	0,126	0,140	0,151	0,134	0,211	-	0,154	0,119	0,142	0,132
% Sobre Carb. Total. 3	-	1,42 %	2,19 %	1,59 %	1,44 %	2,61 %	-	2,15 %	1,55 %	1,90 %	1,54 %

La muestra 4 de la tabla A.8 fue utilizada para comprobar la metodología, por lo que no se tienen resultados mas allá de la masa de carbohidratos.

## Anexo B. Análisis de varianza

En esta sección se presenta los datos y gráficos adjuntos a los gráficos ANOVA presentados en la sección de resultados.

### B.1. Análisis de las varianzas: Azúcares reductores sobrenadante

A continuación se presentan las tablas con los valores descriptivos, comparativos y subconjuntos homogéneos para cada análisis realizado de los sobrenadantes: Primer ensayo DNS sobrenadante:

Tabla B.1: Valor datos estadísticos primer ensayo DNS.

Tratamiento	N	Media	Desv. estándar	Error estándar	95% de intervalo de confianza para la media	
					Límite inferior	Límite superior
T1	5	7,3360	,14843	,06638	7,1517	7,5203
T2	10	6,2840	,56072	,17731	5,8829	6,6851
T3	10	6,4410	,27294	,08631	6,2457	6,6363
T4	10	6,4150	,25034	,07917	6,2359	6,5941
Total	35	6,5166	,49142	,08307	6,3478	6,6854

Tabla B.2: Suma de cuadrados, grados de libertad y significancia entre grupos primer ensayo DNS.

Concentracion	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4,058	3	1,353	10,100	<,001
Dentro de grupos	4,152	31	,134		
Total	8,211	34			

Tabla B.3: Subconjuntos homogéneos entre los tratamientos, primer ensayo DNS.

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
T2	10	6,2840	
T4	10	6,4150	
T3	10	6,4410	
T1	5		7,3360
Sig.		,826	1,000

### 95% Confidence Intervals (Tukey)

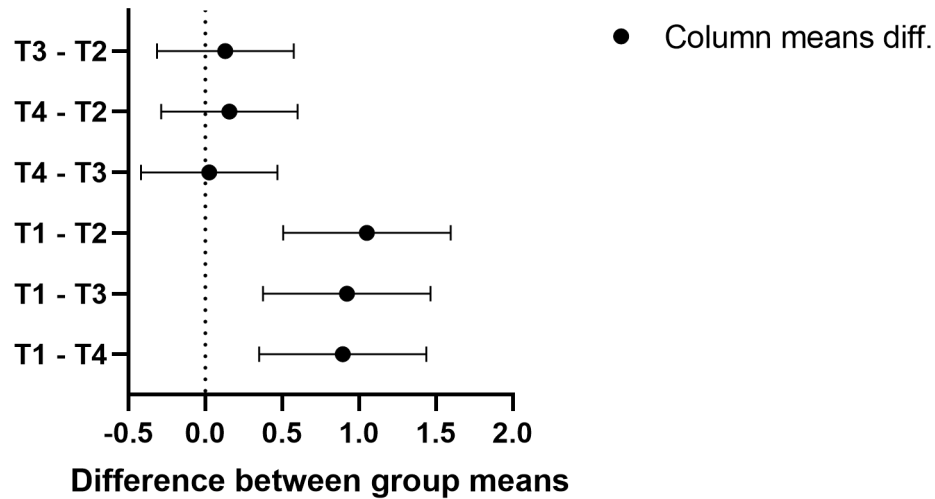


Figura B.1: Gráfico intervalos de confianza 95 % test de Tukey, primer ensayo DNS.

Segundo ensayo de DNS sobrenadante:

Tabla B.4: Valor datos estadísticos segundo ensayo DNS.

Tratamiento	N	Media	Desv. estándar	Error estándar	95 % de intervalo de confianza para la media	
					Límite inferior	Límite superior
T1	5	7,1900	,26277	,11752	6,8637	7,5163
T2	10	6,5960	,75728	,23947	6,0543	7,1377
T3	10	6,2820	,19792	,06259	6,1404	6,4236
T4	10	6,4220	,19848	,06277	6,2800	6,5640
Total	35	6,5414	,51715	,08741	6,3638	6,7191

Tabla B.5: Suma de cuadrados, grados de libertad y significancia entre grupos segundo ensayo DNS.

Concentracion	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2,949	3	,983	4,959	,006
Dentro de grupos	6,145	31	,198		
Total	9,093	34			

Tabla B.6: Subconjuntos homogéneos entre los tratamientos, segundo ensayo DNS.

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
T2	10	6,2820	
T4	10	6,4220	
T3	10	6,5960	6,5960
T1	5		7,3360
Sig.		,502	,055

### 95% Confidence Intervals (Tukey)

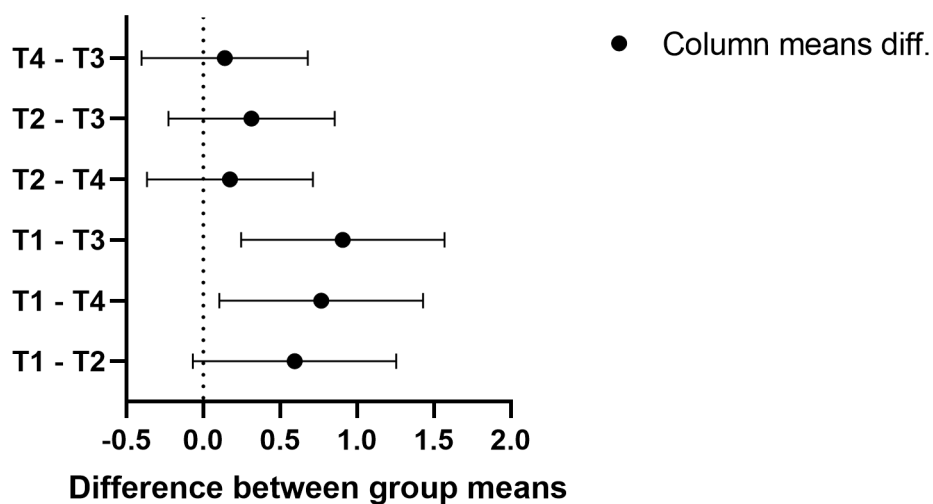


Figura B.2: Gráfico intervalos de confianza 95 % test de Tukey, segundo ensayo DNS.

Tercer ensayo de DNS sobrenadante:

Tabla B.7: Valor datos estadísticos tercer ensayo DNS.

Tratamiento	N	Media	Desv. estándar	Error estándar	95% de intervalo de confianza para la media	
					Límite inferior	Límite superior
T1	3	7,2300	,18520	,10693	6,7699	7,6901
T2	6	6,5217	,49793	,20328	5,9991	7,0442
T3	6	6,2333	,08937	,03648	6,1395	6,3271
T4	6	6,4083	,19405	,07922	6,2047	6,6120
Total	21	6,5081	,42507	,09276	6,3146	6,7016

Tabla B.8: Suma de cuadrados, grados de libertad y significancia entre grupos tercer ensayo DNS.

Concentracion	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2,077	3	,692	7,661	,002
Dentro de grupos	1,536	17	,090		
Total	3,614	20			

Tabla B.9: Subconjuntos homogéneos entre los tratamientos, tercer ensayo DNS.

		Subconjunto para alfa = 0.05	
Tratamiento	N	1	2
T2	6	6,2333	
T4	6	6,4083	
T3	6	6,5217	
T1	3		7,2300
Sig.		,467	1,000

### 95% Confidence Intervals (Tukey)

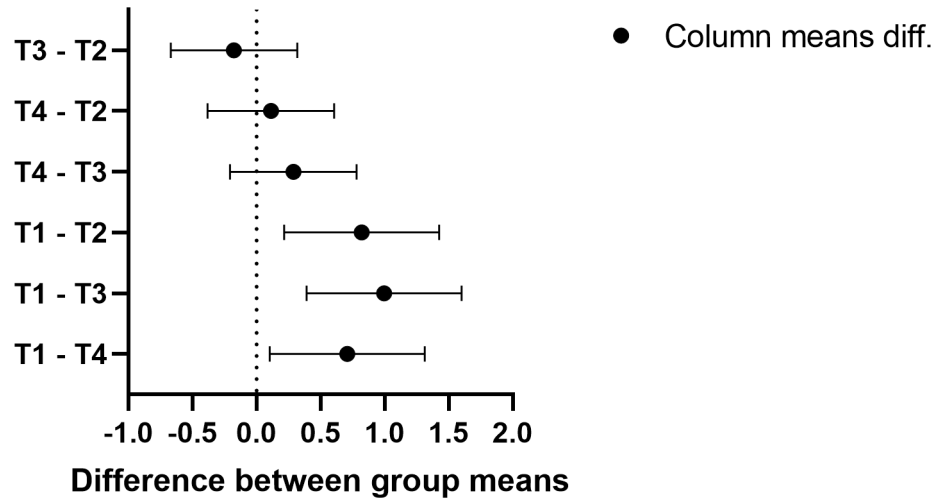


Figura B.3: Gráfico intervalos de confianza 95 % test de Tukey, tercer ensayo DNS.

Ensayo de DNS acumulado (datos totales):



Tabla B.10: Valor datos estadísticos ensayo DNS datos acumulados.

Tratamiento	N	Media	Desv. estándar	Error estándar	95% de intervalo de confianza para la media	
					Límite inferior	Límite superior
T1	12	7,2733	,19965	,05763	7,1465	7,4002
T2	25	6,3216	,37540	,07508	6,1666	6,4766
T3	25	6,3652	,20861	,04172	6,2791	6,4513
T4	25	6,5288	,54513	,10903	6,3038	6,7538
Total	87	6,5249	,48692	,05220	6,4212	6,6287

Tabla B.11: Suma de cuadrados, grados de libertad y significancia entre grupos ensayo DNS datos acumulados.

Concentracion	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	8,393	3	2,798	19,355	<,001
Dentro de grupos	11,997	83	,145		
Total	20,390	86			

Tabla B.12: Subconjuntos homogéneos entre los tratamientos, ensayo DNS datos acumulados.

		Subconjunto para alfa = 0.05	
Tratamiento	N	1	2
T2	25	6,3216	
T4	25	6,3652	
T3	25	6,5288	
T1	12		7,2733
Sig.		,325	1,000

## 95% Confidence Intervals (Tukey)

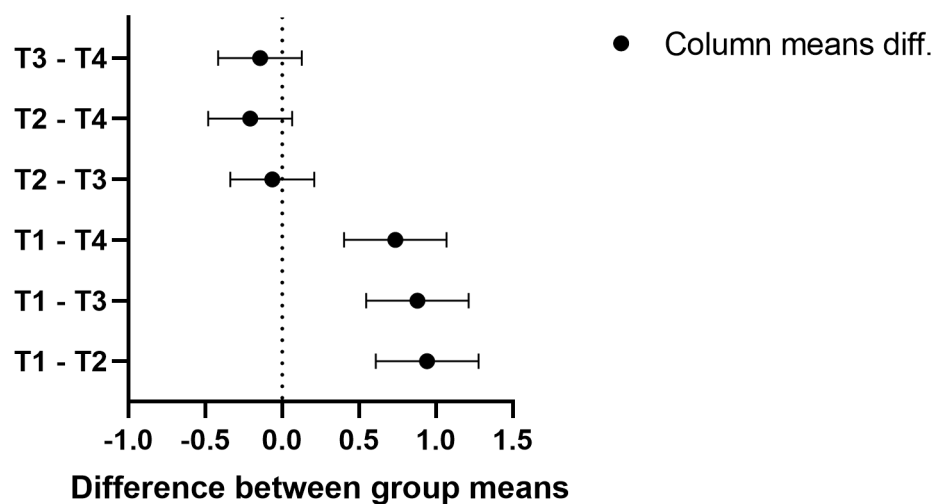


Figura B.4: Gráfico intervalos de confianza 95 % test de Tukey, datos acumulados ensayo DNS sobrenadante.

## B.2. Análisis de las varianzas: Extracción de carbohidratos

A continuación se presentan las tablas con los valores descriptivos, comparativos y subconjuntos para la extracción de carbohidratos de la microproteína:

Tabla B.13: Valor datos estadísticos extracción de carbohidratos de la microproteína.

Tratamiento	N	Media	Desv. estándar	Error estándar	95 % de intervalo de confianza para la media	
					Límite inferior	Límite superior
T1	3	33,0000	4,50333	2,60000	21,8131	44,1869
T2	7	23,4857	3,50211	1,32367	20,2468	26,7246
T3	6	28,0167	4,66965	1,90638	23,1162	32,9172
T4	8	26,0500	2,95683	1,04540	23,5780	28,5220
Total	24	26,6625	4,61338	,94170	24,7144	28,6106

Tabla B.14: Suma de cuadrados, grados de libertad y significancia entre grupos extracción carbohidratos de la microproteína.

Concentracion	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	205,139	3	68,380	4,809	,011
Dentro de grupos	284,377	20	14,219		
Total	489,516	23			

Tabla B.15: Subconjuntos homogéneos entre los tratamientos, extracción de carbohidratos de la microproteína.

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
T2	7	23,4857	
T4	8	26,0500	
T3	6	28,0167	28,0167
T1	3		33,0000
Sig.		,244	,177

### 95% Confidence Intervals (Tukey)

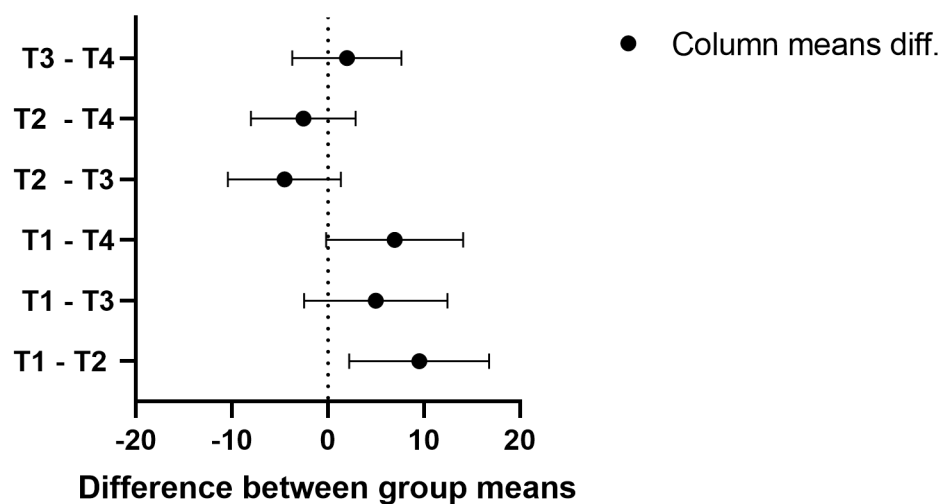


Figura B.5: Gráfico intervalos de confianza 95 % test de Tukey, extracción de carbohidratos.

### B.3. Análisis de las varianzas: Azúcares reductores de la microproteína

A continuación se presentan las tablas con los valores descriptivos, comparativos y subconjuntos homogéneos para los datos de ensayos DNS carbohidratos de la microproteína:

Tabla B.16: Valor datos estadísticos ensayo DNS carbohidratos de la microproteína.

Tratamiento	N	Media	Desv. estándar	Error estándar	95 % de intervalo de confianza para la media	
					Límite inferior	Límite superior
T1	3	1,4500	,04359	,02517	1,3417	1,5583
T2	12	1,9692	,17401	,05023	1,8586	2,0797
T3	12	1,9017	,56206	,16225	1,5446	2,2588
T4	15	2,0907	,68667	,17730	1,7104	2,4709
Total	42	1,9562	,52940	,08169	1,7912	2,1212

Tabla B.17: Suma de cuadrados, grados de libertad y significancia entre grupos ensayo DNS carbohidratos de la microproteína.

Concentracion	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1,078	3	,359	1,311	,285
Dentro de grupos	10,413	38	,274		
Total	11,491	41			

Tabla B.18: Subconjuntos homogéneos entre los tratamientos, ensayo DNS carbohidratos de la microproteína.

		Subconjunto para alfa = 0.05
Tratamiento	N	1
T2	3	1,4500
T4	12	1,9017
T3	12	1,9692
T1	15	2,0907
Sig.		,116

### 95% Confidence Intervals (Tukey)

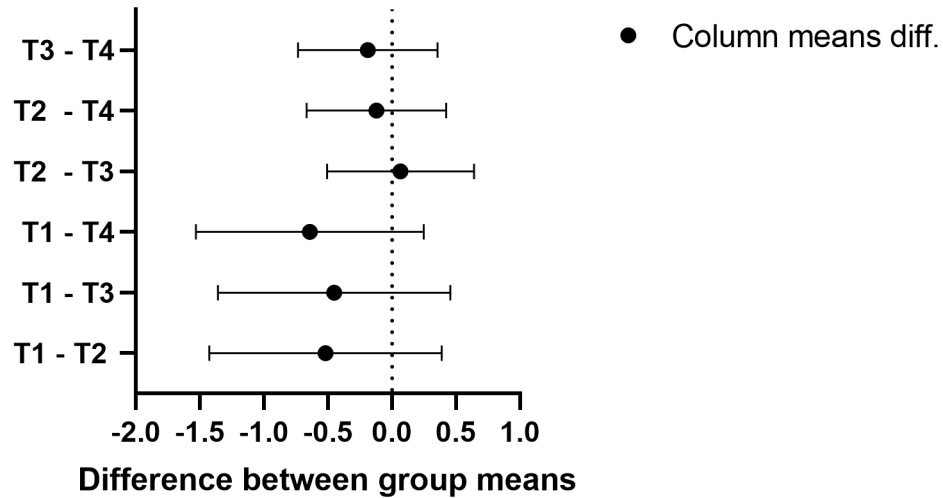


Figura B.6: Gráfico intervalos de confianza 95 % test de Tukey, ensayo DNS microproteína.

## Anexo C. Ejemplo de cálculo

### C.1. Cálculo de la concentración de azúcar reductor en las muestras de sobrenadante

A continuación se presenta la metodología seguida para calcular la concentración de azúcares reductores en las muestras de sobrenadante, para ello, se utilizará el dato de absorbancia para el set 1 del ensayo de fermentación 3 mostrada en la tabla A.2 del anexo A.2:

Se comienza restandole al valor de la absorbancia el valor medido para la muestra blanco:

$$\begin{aligned}Abs_{R_3} &= Abs_{R_3Medida} - Abs_{Blanco} \\Abs_{R_3} &= 0,513 - 0,07 \\Abs_{R_3} &= 0,443\end{aligned}\tag{C.1}$$

Luego, se utiliza la ecuación de la recta mostrada en 5.2, con  $y$  igual al valor encontrado anteriormente, y todo eso multiplicado por el factor de dilución de 3,3:

$$\begin{aligned}C_{R_3} &= \frac{Abs_{R_3} + 0,2305}{2,012} \cdot f \\C_{R_3} &= \frac{0,443 + 0,2305}{2,012} \cdot 3,33 \\C_{R_3} &= 1,11[mg/ml]\end{aligned}\tag{C.2}$$

Una vez conseguido el valor de la concentración utilizando la curva de calibración, se calcula el porcentaje de azúcares reductores sobre masa total del sobrenadante, utilizando la concentración con la que se resuspendió el sobrenadante (20 mg/ml):

$$\begin{aligned}\%_{R_3} &= \frac{C_{R_3}}{C_{Sn_3}} \cdot 100 \\ \%_{R_3} &= \frac{1,1}{20} \cdot 100 \\ \%_{R_3} &= 5,57 \%\end{aligned}\tag{C.3}$$

De esta manera llegando al resultado buscado. El cálculo del resto de muestras de sobrenadante y microproteína se realizó de manera análoga al presentado.

## C.2. Cálculo de grado de polimerización de los oligoalginatos en las muestras de sobrenadante

En este anexo se presenta la metodología para calcular el grado de polimerización. Se escogen los datos para el tratamiento 2 presentado en la tabla A.2 para este ejemplo.

Primero, se calcula el porcentaje de concentración de azúcar reductor promedio para el ensayo 3.

$$\begin{aligned}\%_{promedio_{R3}} &= \frac{0,0557 + 0,0585 + 0,0587 + 0,0576 + 0,0576}{5} \cdot 100 \\ \%_{promedio_{R3}} &= 5,76\% \end{aligned} \tag{C.4}$$

Con este valor, se utiliza la ecuación 5.2 mostrada en la sección de resultados para despejar y obtener el valor del grado de polimerización (DP):

$$\begin{aligned}\frac{100}{DP} &= \frac{5,76 + 0,136}{1,085} \\ DP &= \frac{1,085 \cdot 100}{5,76 + 0,136} \\ DP &= 18,4 \end{aligned} \tag{C.5}$$

Se realizar el cálculo análogo para el resto de los ensayos de fermentación pertenecientes al tratamiento 2, y finalmente se obtiene el grado de polimerización del tratamiento al calcular el promedio de los ensayos:

$$\begin{aligned}DP_{T_2} &= \frac{18,4 + 15,6 + 19,1}{3} \\ DP_{T_2} &= 17,2 \end{aligned} \tag{C.6}$$

Siendo el cálculo análogo para el resto de los tratamientos.