

Polisacáridos procedentes de la macroalga *Ulva ohnoi* como recurso funcional en acuicultura

Dra. Catalina Fernández Díaz

Investigadora Principal. IFAPA centro El Toruño. El Puerto de Santa María, Cádiz
Coordinadora del Área de Acuicultura y Recursos Marinos de IFAPA

IFAPA

Instituto de
Investigación y
Formación Agraria
y Pesquera



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL



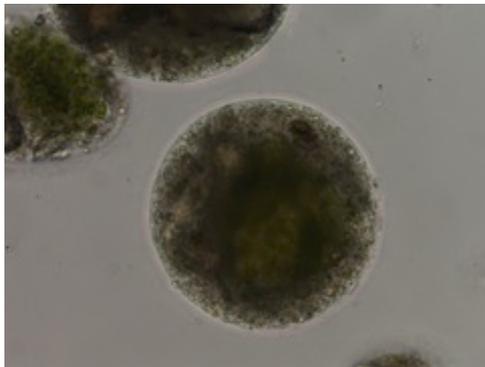
Líneas de investigación del grupo de nutrición de peces en IFAPA El Toruño relacionadas con el tema:



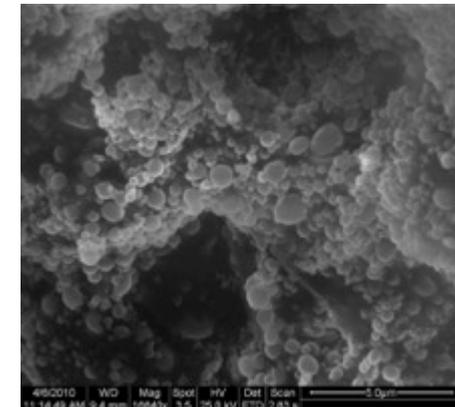
- Producción y aplicaciones de uso de algas marinas para alimentación funcional en acuicultura de peces



Valorización de productos de origen marino para aplicación en acuicultura: macroalgas



- Desarrollo de tecnologías de micro y nanoencapsulación para vehicular nutrientes y sustancias bioactivas



Recursos vivos marinos como proveedores de bioproductos

Hay un reciente y creciente interés por las algas verdes

Un problema convertido en una oportunidad

¿Están aún las Algas verdes infravaloradas?



Biomasa de un cultivo de *Ulva ohnoi*

Algas entera como **ingrediente funcional** en acuicultura

- Además de la función nutritiva puede aportar propiedades beneficiosas para la salud

Polisacáridos, proteínas, polifenoles, como **Nutraceuticos**

- Productos de origen natural con propiedades biológicas activas, con beneficios para la salud

Ingrediente funcional

- Características generales de la macroalga *Ulva* y potenciales usos
 - Alga *Ulva ohnoi* incorporada a un alimento para lenguados

Nutraceutico

- Características de los polisacáridos de *Ulva ohnoi*
 - Obtención del polisacárido “ulvan” a partir de *Ulva ohnoi*
 - Posibilidad de obtener oligosacáridos a partir del polisacárido “ulvan”
- Potenciales usos de Ulvan en acuicultura
 - Contribución de ulvan al sistema de defensa en peces marinos

Macroalga marina *Ulva ohnoi*



- ✓ Macroalga verde (Clorophyceae) familia Ulvaceae
- ✓ Abundante en zonas del litoral y esteros en costas andaluzas
- ✓ No necesita fijarse a sustrato



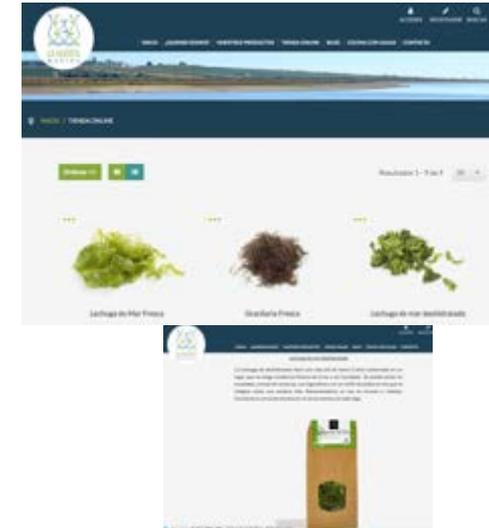
- ✓ Plasticidad
- ✓ Alta producción tanto en sistemas cerrados como abiertos
- ✓ Polisacáridos sulfatados

Macroalga marina *Ulva ohnoi*

Recurso importante...



- ✓ Alimentación humana y animal
- ✓ Productos gourmet, aditivos..
- ✓ Fertilizantes y biorefineria
- ✓ AMTI
- ✓ Cosmética y cosmecéutica
- ✓ Nutraceuticos



Incrementando la demanda ...

Iniciativas de investigación y comercialización

Demandas en acuicultura: dietas que aporten nutrientes y mejoren el estado de salud del pez

Actividad del alga *Ulva ohnoi* como ingrediente funcional en dietas para lenguados

- Pocos estudios de evaluación de ésta especie en la acuicultura de peces

Titulo del proyecto **INIA RTA2014-00023 C02**: “Aprovechamiento de macroalgas producidas en sistema multitrófico de acuicultura en dietas compuestas para lenguado. Estudio sobre el efecto de compuestos funcionales de *Ulva sp.* en la fisiología del lenguado *Solea senegalensis*” (Coordinado por IFAPA)



•**Subproyecto 1:** Coordinador IFAPA y entidades participantes: UCA, empresa Cupimar S.A

•**Subproyecto 2:** Coordinador UMA y entidad participante: UAL

“Caracterización de biomasa de *Ulva sp.* obtenida bajo diferentes condiciones de acuicultura. **Asimilación** e influencia de productos funcionales sobre el estado antioxidante y resistencia a patógenos de *S. senegalensis*”

Origen de la biomasa: Cultivo *Ulva ohnoi*



Tanques de 1000 L
Fotoperiodo natural
Temperatura media 25°C
Salinidad 30
Medio F2

- Cultivos semi controlados del alga en interior
- ^{13}C como fuente de carbono para lotes de alga cultivada
- Buen crecimiento del alga en cultivo
- ^{13}C Ulva: sistema de marcaje viable; eficiencia de marcaje del alga 92%

Cosecha



Secado y molienda

✓ Lotes de biomasa con huella isotópica diferenciada

Composición de la macroalga marina *Ulva ohnoi* en cultivo INIA RTA 2014

		(µg/g)	
Proteínas	18-26%	Ca	1.700
Carbohidratos solubles	23-30%	Mg	34.000
Lípidos	2,5-3,5%	Se	0
Cenizas	23-29%	Fe	450
		Zn	16
		Cu	6
		Mn	40
		Co	1,1
Capac Antiox (TAC)	5-6 µg equiv Trolox/mg p.seco ulva	Al	100
Comp. Fenólicos (TPC)	2,5-3 µg equiv floroglucinol/mg seco ulva	Cr	0,75
		Cd	0,1
Polisacáridos sulfatados	15-18%	Ni	3
		As	0,5
		Pb	1,5



Ulva ohnoi como ingrediente funcional en acuicultura



- Ensayos con piensos incluyendo un 5% de polvo de *Ulva ohnoi* sin tratamiento térmico
- 3 tipos de piensos ensayados:
 - Control sin ulva
 - Ulva con baja huella isotópica
 - Ulva con alta huella isotópica

Juveniles de *Solea senegalensis* cultivados en sistema de recirculación



!00% de supervivencia dp de 90 días

	P. Control	P. Ulva
FCR	1,03 ± 0,34	1,09 ± 0,35
SGR	1,65 ± 0,04	1,60 ± 0,03

El estado nutricional y las condiciones de cultivo influyen en el estado inmunológico del pez

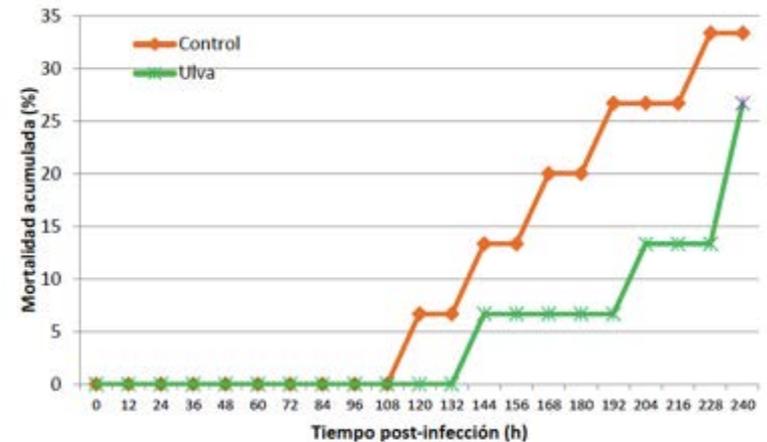
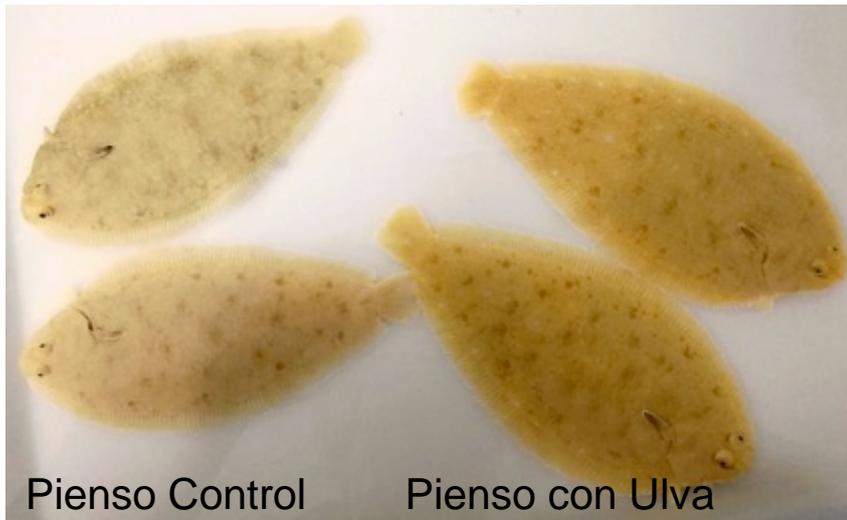


Figura 21. Mortalidad observada en los ejemplares de *S. senegalensis* alimentados con la dieta control y conteniendo *Ulva* sp. sometidos a infección con *P. damsela* subsp. *piscicida* por vía intraperitoneal.

- ✓ El lenguado asimila la ulva incluida en el pienso. Un 53% del C de *Ulva ohnoi* incorporado al músculo de lenguado
- ✓ Modificación de la microbiota del lenguado
- ✓ Efecto positivo sobre el desarrollo y sistema de defensa

¿Tratamiento térmico al alga?

¿< % de Ulva incorporado en el pienso?

Ulva ohnoi como ingrediente funcional en acuicultura

Interés de *Ulva ohnoi* por la singularidad de sus polisacáridos como nutraceuticos

Macroalga marina *Ulva sp.*

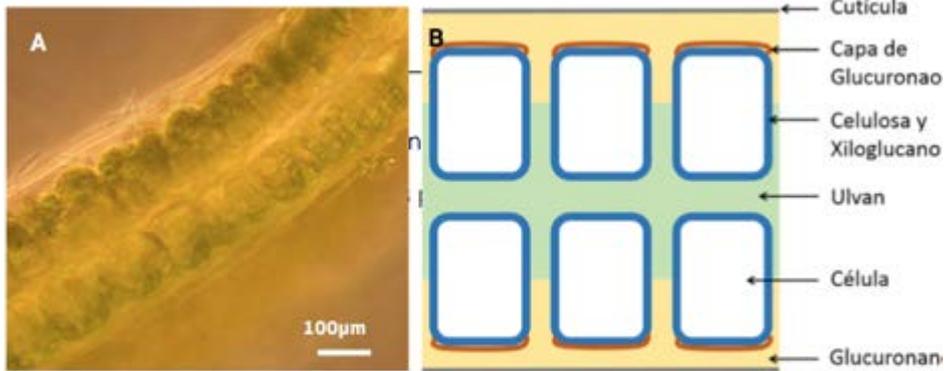
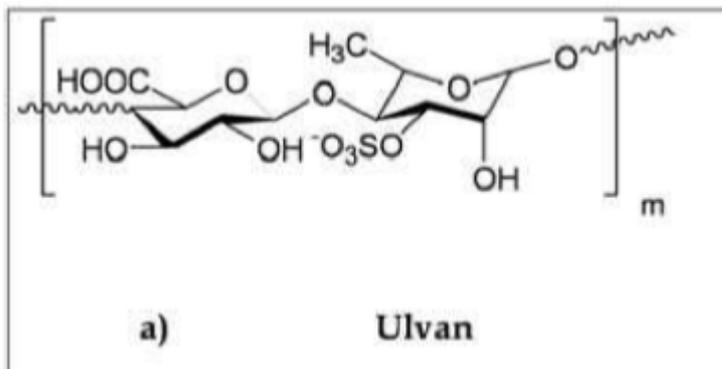


Figura 1.4 : A. Fotografía por microscopía óptica del corte transversal de un talo de *Ulva sp.* en la que se puede apreciar la doble capa celular con la pared que las rodea. B. esquema de la repartición de los polisacáridos en el alga según Lahaye, 2007.



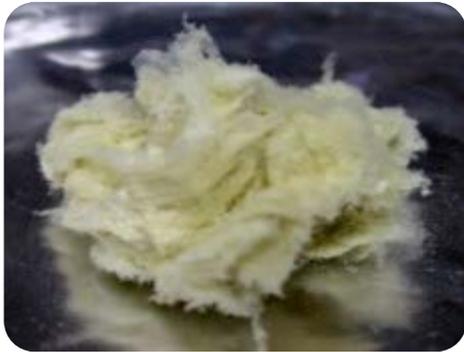
Dos capas de células mantenidas por una pared celular

- La pared celular representa 38%-54% del peso seco del alga
- Compuesta por: celulosa insoluble; glucuronano; xiloglucano soluble en solución alcalina y **ulvan soluble en agua**

- El **ulvan** puede representar entre un 8 y un 23% del peso seco del alga

“Ulvan”

- ✓ Componente bioactivo en *Ulva ohnoi* es un heteropolisacárido sulfatado “ulvan”
- ✓ Cadenas de azucres simples (monosacáridos) ligados por enlaces glucosídicos



L-Ramnosa

Ácido glucurónico

Xilosa

Ácido idurónico

Glucosa, galactosa, ribosa

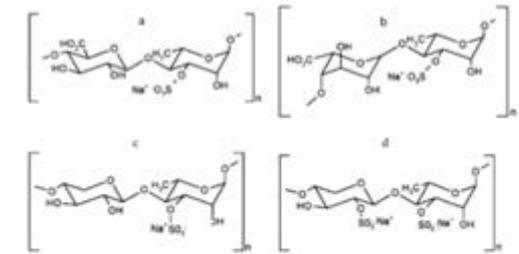


Figure 1. Structure of repeating disaccharides in ulvan from *Ulva* sp.

a. A₁₁ b. B₁
c. U₁ d. U_{1,2}

Source: Robić et al. 2009

Principales disacáridos que se repiten en ulvan: Ácido ulvanobiouronico

- ✓ Compuesto de azucres raros como ramnosa (aromas) y acidos urónicos (heparina)
 - ✓ Extracto soluble en agua
 - ✓ Capacidad de formar geles. Geles termoreversibles
- ✓ La estructura del polisacárido puede variar. Conformación no ordenada

✓ El efecto biológico de un producto esta correlacionado con una estructura molecular determinada

Recomendaciones FAO para evaluar y comprobar las propiedades de un producto extraído...

- Procedencia del alga: **Origen** y fuente de obtención que evite variabilidad en la calidad
- Métodos de **extracción** adecuados: extracción suave
- **Purificación**: pureza del producto final (<5% proteína)
- **Caracterización** adecuada (peso molecular, % sulfatos,...)
- **Composición azúcares** (métodos análisis)

Evaluar *in vitro* e *in vivo*

Obtención de "ulvan" a partir de *ulva ohnoi*

Ulva en polvo



Extracción
80-90°C



Oxalato sódico

Aislamiento y Purificación



Ultrafiltración 1/10 KDalt



Liofilización

Polisacárido **Ulvan**

Caracterización



Análisis de azúcares

El medio de extracción influye en las características finales de las moléculas

Extracción CIH: ulvan con bajo peso molecular y mayor contenido en Ramnosa

Composición azucres de ulvan (según bibliografía)

Ramnosa 16,8-45%

Ác. Urónicos: 6,5-29%

Xilosa 2,1-12%

Glucosa 0,5-6,4%

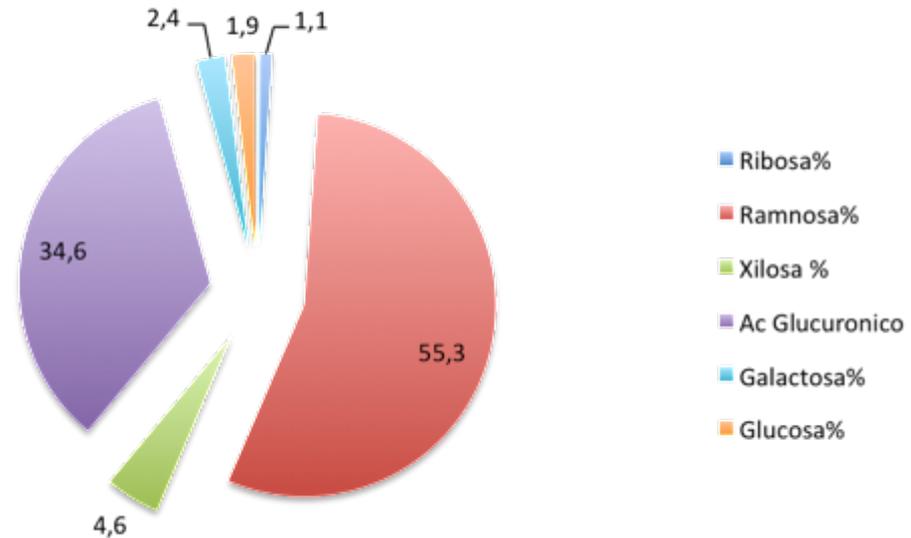
Galactosa, ribosa <5%

Rendimiento 8-29%

Sulfatos 16-23,2%

Peso molecular 150-800 KDalt

Azucres Ulvan de *Ulva ohnoi*



Rendimiento 15%

Sulfatos 17%

Peso molecular 200 KDalt

- Biomasa **controlada**
- Métodos de extracción (**oxalato sódico**)
- Purificación (**<3% prot**)

(Fuente proyecto INIA RTA 2014. Datos en fase de publicación)

Propiedades y potenciales usos de Ulvan



Degradación

Polisacáridos sulfatados (Ulvan)

- F. Cardiovascular, Anticoagulante (similar heparina)
- Acción quimiopreventiva (Antitumoral)
- Antibacteriano, antivirico
- Metabolismo lípidos (disminuye la absorción)
- Estimula sistema inmune

Oligosacáridos (Oligoulvans)

Bajo peso molecular y alto contenido en sulfatos

- Fuerte actividad antioxidante

Ulva ohnoi: moléculas con actividad biológica

¿Cómo obtener oligosacáridos a partir del polisacárido “ulvan”?

D. Química

- Fácil de obtener, directa y rápida
- Proceso agresivo
- Ruptura aleatoria. No patrón estructural

D. Enzimática

- Difícil obtener enzimas comerciales
- Proceso suave
- Ruptura con patrón estructural determinado

Tamaños molécula <5 KDalt



✓ Obtención de oligosacáridos de ulvan por métodos enzimáticos

✓ Se describe por primera vez una actividad ulvan-liasas por parte de una bacteria del género *Alteromonas* aislada del intestino de *Gammarus insensibilis*.

Identificada bajo el código *Alteromonas* sp. GIUL2 en la base de datos GenBank

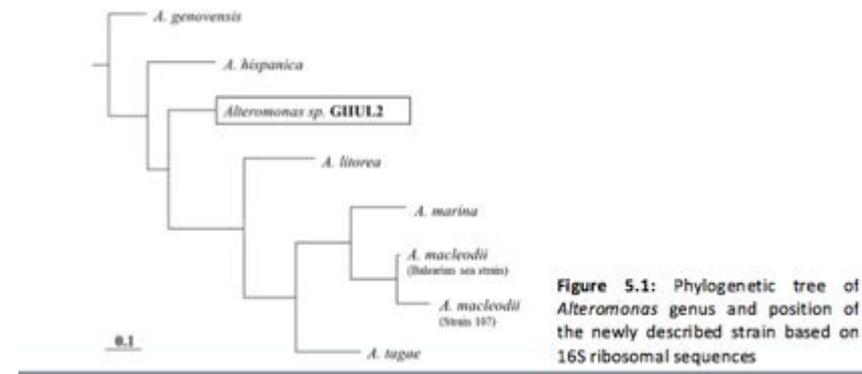


Figure 5.1: Phylogenetic tree of *Alteromonas* genus and position of the newly described strain based on 16S ribosomal sequences

- Aislamiento bacteria, purificación coctel enzimas, degradación de ulvan y caracterización de sus oligosacáridos.
- Enzimas ulvan-liasas capaces de degradar ulvan en oligoulvans sulfatados.

Oligoulvans sulfatados como potenciales nutraceuticos

Productos origen marino para la prevención de enfermedades en peces

- Polisacáridos extraídos de la macroalga *Ulva ohnoi* y su contribución al sistema de defensa

Ulvan extraído de *Ulva sp.* como inmunoestimulantes

- ✓ Se ha comprobado el poder inmunoestimulante del ulvan extraído de *Ulvaceas*
 - *In vitro* en macrófagos de rodaballo *Psetta máxima*
 - *In vivo* en lisas (*Mugil cephalus*)
 - En macrófagos de ratón y en cultivos *in vitro* de células intestinales de cerdo

- ✓ Hemos comprobado la capacidad inmunoestimulante del ulvan extraído de *Ulva ohnoi*.
 - Efecto *in vitro* de ulvan sobre macrófagos del lenguado *S. senegalensis*. Evaluación de diferentes formas de suministrar ulvan para maximizar dicha actividad

- Efecto de diferentes fracciones de ulvan en células macrófagos de *S. senegalensis*



- ✓ Los resultados confirman el poder inmunoestimulante del polisacárido ulvan sobre macrófagos de lenguado
- ✓ Los oligosacáridos (oligoulvans) independientemente del método de obtención no ejercen efecto estimulante en las células



Ulvan soluble en agua. Con carga negativa

- Nanopartículas por gelación ionotrópica (quitosano/TPP) para vehicular productos extraídos de *Ulva ohnoi*

✓ Nanopartículas de quitosano/TPP/Ulvan

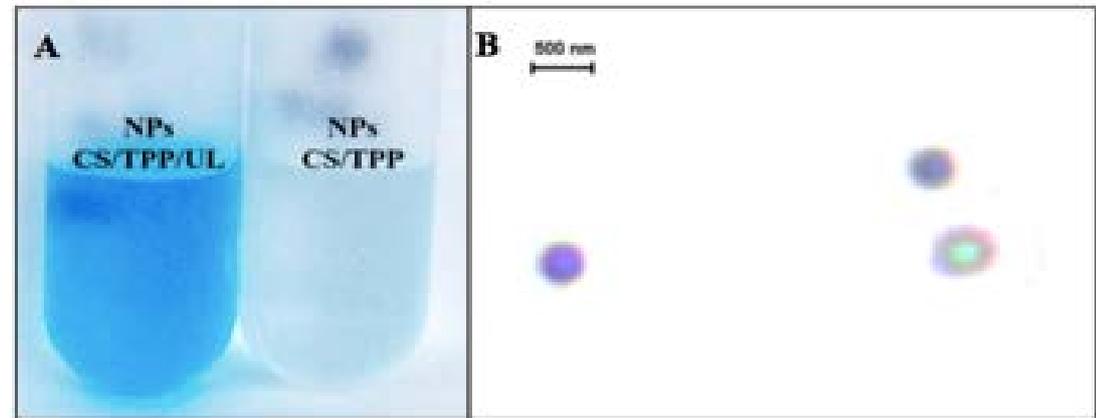
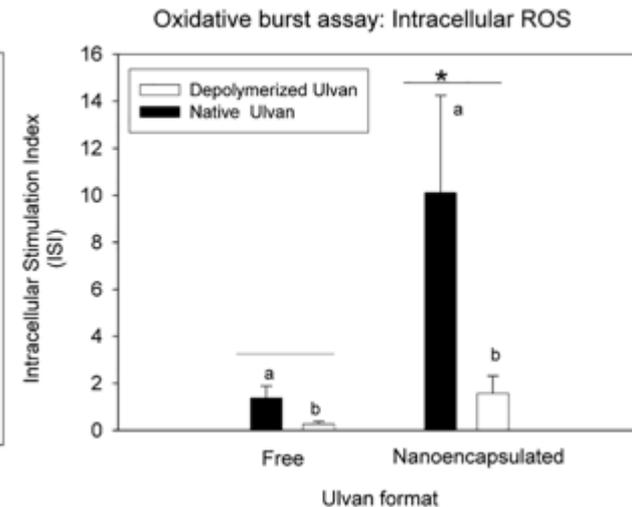
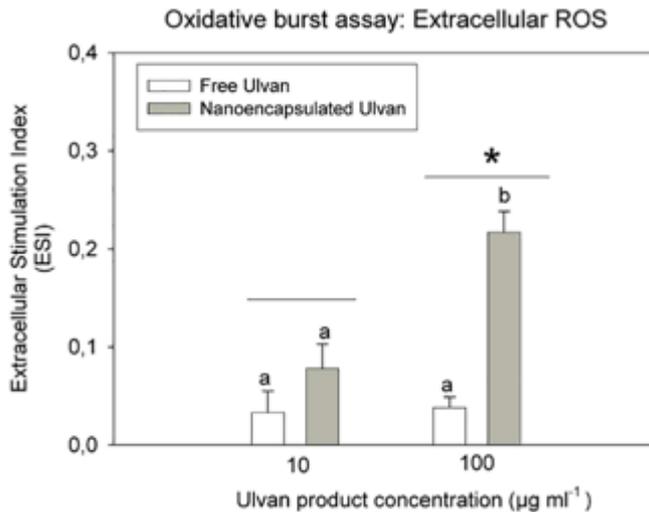


Figura 0.3: Characterization of nanoparticles (NPs). A) Representative picture of a suspension of Alcian Blue tainted NPs with and without enriched ulvan extract. B) Microscopic view of ulvan nanoparticles.

✓ NPs estables, 300nm y carga positiva

✓ Mejor rendimiento de encapsulación de ulvan sin despolimerizar

Potencial de Nanopartículas de ulvan como inmunoestimulantes para peces de acuicultura



✓ Efecto de la dosis de NPs a la que se expone la célula

✓ Mayor efecto inmunoestimulante del ulvan cuando va incorporado en nanopartículas

✓ El mayor efecto inmunoestimulante del ulvan se consigue al incorporar el polisacárido en nanopartículas

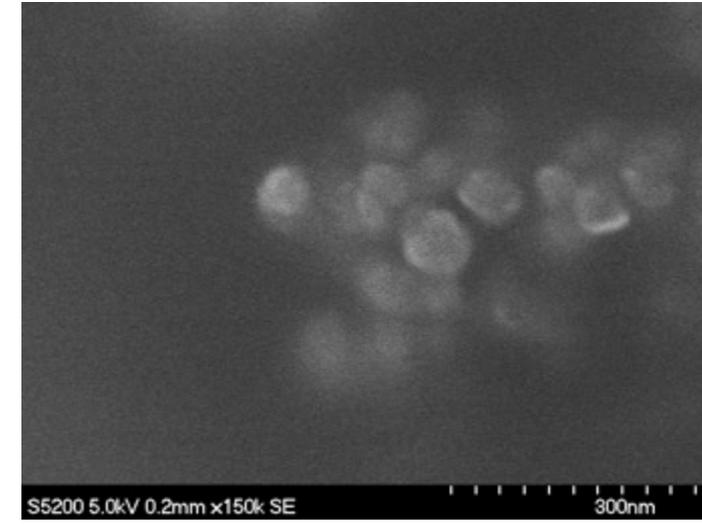
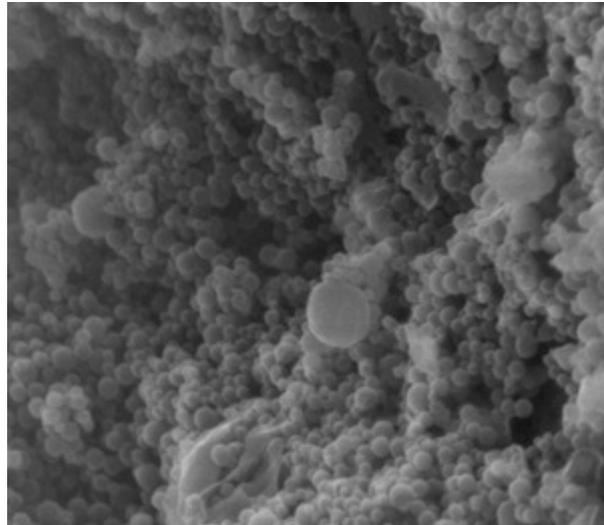
- Nanoencapsulación mejora la actividad de productos extraídos de *Ulva ohnoi*

Prioridades en acuicultura: Vacunas orales para peces

La capacidad de **ulvan** de enlazarse específicamente con receptores del sistema inmune hace de éstos un posible adyuvante para el suministro oral de vacunas

Gran potencial de las **nanopartículas** de quitosano y ulvan para hacer diana con células del sistema inmune y poder transportar fármacos o vacunas

Proyecto FEMP
Desarrollo de **nanovacunas de ADN** frente a *Photobacterium damsela subsp. piscicida* y su evaluación en lenguado.



- Elaboración de nanopartículas híbridas a base de polisacáridos naturales como **quitosano-ulvan** que incorporarán en su interior plásmidos de ADN

...Continuemos investigando para hacer un uso eficiente de nuestros recursos marinos



Nuevo horizonte de investigación: Nutrición-Salud-Nuevas tecnologías de encapsulación

Equipo de investigación nutrición e innovación tecnológica Investigación cofinanciada con Fondos Europeos

Investigadora titular: **Catalina Fernández Díaz**

EI.AVA.AVA201301.5

Investigador titular: **J. Pedro Cañavate**

Contratada postdoctoral: **Marian Ponce**

INIA RTA2011-00032-00-00

Contratado predoctoral: **Pablo Cárdenas Camacho**

*INIA RTA2014-00023-C02

Técnico especialista: **M^a Victoria Anguis**

Técnicos de laboratorio: **M^a del Mar Landi y Eugenia Zuasti**

*FEMP NANOVACSOL

Agradecimiento especial a **Olivier B. Coste** y al Dr **Erik J. Malta**

Proyectos relacionados con el tema



Muchas gracias por su atención

IFAPA

Instituto de
Investigación y
Formación Agraria
y Pesquera

catalina.fernandez.diaz@juntadeandalucia.es
www.ifapa.es
www.servifapa.es



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL

