



## Aislamiento de microorganismos hidrolíticos de polisacáridos algales

### Isolation of hydrolytic microorganisms from algal polysaccharides

Catalán, N.<sup>a\*</sup>, Costa, M.<sup>b</sup>, Selaive, S.<sup>b</sup>, Contreras, C.<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Programa de Magíster en Ciencia de los Alimentos, Facultad de Agronomía, Universidad Austral de Chile.

<sup>b</sup> Instituto De Ciencia y Tecnología De Los Alimentos, Facultad de Agronomía, Universidad Austral de Chile.

<sup>c</sup> Laboratorio Ecofisiología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile..

#### ARTICLE INFO

*Article history:*  
Received 09.12.2017  
Accepted 11.05.2018

*Keywords:*  
*Macrocystis pyrifera*  
Laminarin  
Inmunoestimulantes  
β-Glucans  
Huiro  
Benthic algae

*Original Research Article,*  
Food Processing and Quality

*\*Corresponding author:*  
Nathaly Catalán  
*E-mail address:*  
[nathaly236@gmail.com](mailto:nathaly236@gmail.com)

#### ABSTRACT

The aim of this study was to understand the diversity of hydrolytic microorganisms (M.O.) associated with the brown alga *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Agardh during its advanced state of decomposition. Algae have great commercial interest mainly due to their use as gelling agent, their nutritional composition and their use as raw material in the pharmaceutical industry. In recent years it has been described that microorganisms associated with these algae have the ability to degrade algal polysaccharides. Therefore, this study evaluated the degradation capacity of 4 algal polysaccharides (laminarin, carrageenan, agar and alginate). Samples of *M. pyrifera* were taken from three coastal sites: Puerto Montt, Osorno and Niebla. The samples from Osorno and Niebla presented, within their biota of microorganisms, 64% bacteria, 21% molds and 15% yeasts. However, yeast was not present in samples from Puerto Montt. Furthermore, it was found that not all microorganisms have the same hydrolytic capacity according to the temperature at which they were incubated, suggesting that proliferation of these microorganisms is regulated by different abiotic factors such as pH, temperature and salinity.

#### RESUMEN

Esta investigación tuvo por objetivo conocer la diversidad de microorganismos (M.O.) hidrolíticos asociados al alga parda *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Agardh, cuando esta se encuentra en un avanzado estado de descomposición. Las algas presentan un gran interés a nivel comercial debido principalmente a su uso como gelificantes, composición nutricional y materia prima en la industria farmacéutica. En los últimos años se ha descrito que microorganismos asociados a estas algas presentan la capacidad de degradar polisacáridos algales. Por ello se evaluó la capacidad de degradación de 4 polisacáridos algales; laminarina, carragenina, agar y alginato. Para ello se tomaron 5 muestras de *M. pyrifera* de tres sitios costeros; Puerto Montt, Osorno y Niebla. Se encontró que, de las tres poblaciones muestreadas, tanto Osorno como Niebla presentaron dentro de su biota de microorganismos; 64% bacterias, 21% mohos y 15% levaduras, sin embargo, este último grupo no estuvo presente en las poblaciones de Puerto Montt. Por otro lado, se encontró que no todos los microorganismos presentan la misma capacidad hidrolítica según la temperatura a la cual son incubadas. Esto puede ser por que la proliferación de estos microorganismos es regulada por diferentes factores abióticos como pH, temperatura y salinidad.

*Palabras clave:* *Macrocystis pyrifera*, laminarina, inmunoestimulantes, β-glucanos, huiro, algas bentónicas.

#### INTRODUCCIÓN

El ecosistema marino es uno de los más importantes a nivel global, puesto que alberga biota que presenta fuente de diversidad y que participa en cadenas tróficas muy importantes para la productividad económica y de alimentación (Kaehler *et al.*, 2000).

Las algas marinas son un grupo grande y heterogéneo de organismos vegetales, unas 50.000 especies, en-

tre los que se cuentan desde especies unicelulares hasta plantas enormes que pueden medir alrededor de 50 metros (Ortiz, 2011). Estas presentan distribuciones de hábitat distintas: unas lo hacen flotando en las capas más superficiales del agua, son unicelulares y se las conoce con el nombre de algas plantónicas; las otras viven adheridas a rocas u otros sustratos, y se les conoce con el nombre de algas bentónicas (Hoffmann y Santelices, 1997). En Chile existen aproximadamente 550 especies

de algas bentónicas, aunque las conocidas ampliamente por la población representan menos del 1% de ellas.

Las algas de mayor utilización industrial corresponden a especies de los géneros *Gelidium*, *Euchema* y *Gracilaria*, ocupadas en la obtención de agar: clase *Rhodophyceae* (presente en algas rojas) e *Iridae*, para la obtención de carragenanos o *M. pyrifera*, *Laminaria hyperborea* G., *Laminaria digitata* H. y *Ascophyllum nodosum* L., para la producción de alginatos. En el caso de *M. pyrifera*, el producto extraído más importante es el ácido alginico, un polímero coloidal de ácido manurónico y gulurónico (Almanza y Buschmann, 2013).

Los alginatos están constituidos por ácido D-manúrico y L-gulurónico y que son extraídos de algas pardas conocidas como *Phaeophyceae*, son ampliamente utilizados en la industria de textil (42%), alimentos (34%), papel (9,4%), farmacéutica y productos dentales (5,3%), y otras actividades productivas (3,2%) (Vásquez, 1999). Por sus características, de gelificar en el agua fría diferencia a los alginatos de las gomas derivadas de las algas rojas; muchos alginatos son usados, frecuentemente, como espesantes, estabilizantes de emulsiones, gelificantes, inhibidores de sinéresis, entre otros (Iturriaga y Hope, 1977; Kajiwara et al., 1990).

Las carrageninas son un grupo de polisacáridos sulfatados, que constituyen la estructura principal de ciertas variedades de algas rojas, polímeros, son fuertemente aniónicos debido a la presencia de grupos sulfatos, lo que facilita su interacción con moléculas catiónicas y anfotéricas, como las proteínas. Se caracterizan por ser solubles en agua, formando soluciones de alta viscosidad y/o geles, tanto la extracción de las diferentes carrageninas como su estandarización se pueden ver facilitadas con el uso y aplicación de enzimas carragenolíticas.

El agar es un hidrato de carbono unido al ácido sulfúrico, que se define como éster sulfúrico de un galactano lineal y que en el alga se presenta como sal de Ca, o una mezcla de sales de Ca y Mg del ácido libre (ácido agarínico).

La laminarina es un polisacárido de glucano, de 20 a 40 unidades de glucosa (Choi et al., 2011) unidas principalmente por enlaces  $\beta$  (1,3) glucosídico, con algunas ramificaciones  $\beta$  (1,6). Aunque la laminarina es un polímero de glucosa, no puede ser utilizado por el hombre o los animales domésticos, debido a la falta de laminarinasas (enzimas hidrolíticas) que permiten la degradación de esta enzima, a excepción de los rumiantes, que lo pueden utilizar como fuente de energía metabólica. Sin embargo, algunos animales marinos que usan esta fuente de recursos alimentarios poseen este tipo de enzimas hidrolíticas que le permiten degradar laminarina (Suzuki et al., 1987).

La laminarinasas es una enzima específica, que actúa sobre el sustrato laminarina, la cual genera los productos de hidrólisis del betaglucano; estos son: glucosa, laminaritríosa y laminaritetraosa.

De la extracción de laminarina queda un extracto rico en polisacáridos, los 1,3/1,6 glucanos actualmente utilizados en la industria farmacológica. Dentro de las propiedades que se les concede a los 1,3/1,6 glucanos se encuentran los siguientes: realza la protección contra una infección generada por virus, bacterias, hongos y parásitos, son promotores de regresión de tumores, neutraliza la toxicidad de toxinas bacterianas, acelera la curación de heridas, potencia vacunas y protege el daño en contra la irradiación mortal (Díaz, 2014).

Existe evidencia científica que oligosacáridos  $\beta$  (1,3-1,6) glucanos (Dalmo et al., 1994) tienen un efecto estimulante sobre los macrófagos de peces *in vivo* e *in vitro*. Para la obtención de oligosacáridos bioactivos resulta crucial la acción de enzimas específicas que hidrolicen laminarina, siendo éstas las  $\beta$ -1,3-glucanasas conocidas como laminarinasas, las que generan oligómeros con ramificaciones  $\beta$ -1,6 que son los que presentan un mayor efecto inmunoestimulante (Kim et al., 2006; Elyakova et al., 2007).

El alga marina gigante *Macrocystis*, es una especie de valor comercial de significación con grandes perspectivas de expansión futura, comúnmente denominada "huido", "sargazo" o "chascón", es un alga perteneciente a la división *Phaeophyta*, más conocida como algas pardas (Piel, 2003). En el plano ecológico, las poblaciones de algas bentónicas en general y de *M. pyrifera*, en su disco de fijación, permiten un ambiente que provee de alimento, protección y sustrato de asentamiento a numerosas otras plantas, invertebrados y peces marinos (Westermeier et al., 2005; Almanza y Buschmann, 2013).

Burtseva et al. (2006) describieron que algas marinas son colonizadas por microorganismos y hongos que tienen la capacidad de degradar polisacáridos algales por enzimas  $\beta$ -glucanasas microbianas, cumpliendo un rol importante en la degradación de macroalgas. Así también, se ha descrito que estas macroalgas poseen polisacáridos algales, los cuales tienen la capacidad de ser inmunoestimuladores. Las propiedades inmunoestimulantes de los  $\beta$ -glucanos se atribuyen a su capacidad para elevar las concentraciones de anticuerpos y estimular la actividad de los macrófagos. De hecho, Robertsen et al. (1990), encontraron que los  $\beta$ -glucanos aumentan de manera no específica la respuesta inmune y la resistencia de salmón del Atlántico contra infecciones bacterianas y aumentar la resistencia de los peces a infecciones virales, bacterianas, hongos y parásitos. Por lo cual han sido definidos como sustancias que potencian el sistema inmunitario y aumentan la resistencia frente a las enfermedades infecciosas (Rodríguez et al., 2003). En este sentido, se le ha dado amplio uso para la salud de humanos y animales terrestres, y así también, como herramienta en programas de gestión de la salud de peces (Carrington y Seccombe, 2006).

Plaza *et al.* (2008) han descrito efectos positivos para la salud por el consumo de algas, lo cual está relacionado con los componentes químicos derivados de la biosíntesis de las células vegetales, estos productos son objeto de acuciosos estudios, por lo cual son buscados incesantemente para ser utilizados como base de alimentos funcionales y saludables (Mayer y Panick, 1984; Lahaye, 1991; Chan *et al.*, 1997; Cheung *et al.*, 2002; Khotimchenko *et al.*, 2002). La gran variedad de componentes nutricionales que conforman las algas propicia la formulación y desarrollo de nuevos alimentos, los cuales por sus propiedades físicas, químicas y biológicas pueden ayudar a una nutrición adaptada a cada caso o situación fisiológica individual, contribuyendo a mejorar la salud y bienestar, además de prevenir o hacer más tolerable muchas enfermedades como el cáncer de colon, arteriosclerosis, obesidad y problemas cardiovasculares (Sanz, 2000).

El presente trabajo estudió los microorganismos que rodean el ambiente natural de *M. pyrifera*, cuando ésta se encuentra en estado de descomposición (Pitson *et al.*, 1993). Una vez aislados los microorganismos hidrolíticos circundantes del alga en descomposición y de su ambiente natural, se procedió a determinar la capacidad hidrolítica del microorganismo aislado frente a 4 polisacáridos marinos: laminarina, agar, alginato y carragenina, a dos temperaturas 5 °C y 25 °C. Se esperó encontrar distintas especies de M.O. que interactúan con el alga y probar su capacidad de hidrólisis, frente a los distintos polisacáridos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se recolectaron 6 muestras de *M. pyrifera* de tres lugares: Pucatrihue en la costa de Osorno (40°32'38"S 73°43'04"O) y Puerto Montt (41°28'00"S 72°56'00"O), de la Región de Los Lagos; y Niebla, en la costa de Valdivia, (39°51'0" S, 73°24'0" W), de la Región de los Ríos.

Se seleccionaron algas que se encontraban en avanzado estado de descomposición, (sobre arena y rocas). Se cortó un trozo de alga, las que fueron tomadas y envasadas en un frasco de urocultivo. Posteriormente, se realizó un frotis directo del alga la que se depositó en tubos Eppendorf, las muestras fueron mantenidas a 4 °C y trasladadas al Laboratorio de Microbiología del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL).

### Aislamiento y obtención de cepas

Bajo una campana de flujo laminar (s- II-17.10.) se realizó un frotis de cada muestra, en cuadruplicado, las que se estiraron sobre placas de agar papa dextrosa y de agar sin inhibidores, se incubaron en una cámara de cultivo (ict 5.4) a 25 °C durante 48 horas. Transcurrido el periodo de incubación, cada una de las colonias fue-

ron observadas mediante observación directa. Luego, transferidas y sembradas sobre placas de agar papa dextrosa (Cloranfenicol 0,5 g x 500 ml) y de agar con inhibidores (cloruro de litio 2,5 g x 500 ml); para obtener colonias aisladas, se realizó una nueva incubación de las cepas por 24 horas a 25 °C. Posterior a esto, se realizó un frotis de las colonias y se observó bajo microscopio (marca Carl Zeiss, modelo Axiostar Plus, Alemania) mediante la tinción de Gram, con azul de metileno (para bacterias), y tinción con lactofenol (para los mohos). Mediante esta observación, las muestras se separaron en cultivos de agar para bacterias, y agar papa dextrosa para mohos y levaduras, sin inhibidores.

### Siembra en microplatos

De cada cultivo puro, se sembró en cuadruplicado en microplatos que contenían 200 µl de agua de mar sintética según Kester *et al.* (1967) para asegurar la ausencia de otras fuentes de carbono como azúcares, sustancias orgánicas e inorgánicas disueltas, lo cual garantiza que las cepas a evaluar sólo tendrán disponibles las cantidades conocidas de polisacáridos, de forma tal que el crecimiento de estos microorganismos no será alterado por sustancias presentes en el agua de mar, esta a su vez fue enriquecida con vitaminas y 10 mg ml<sup>-1</sup> de cada polisacárido a estudiar (laminarina, carragenina, agar y alginato) como única fuente de carbono y se incubó a 25 °C (temperatura superficial del agua de mar) y 5 °C (temperatura en profundidad) durante 2 semanas, efectuándose una observación diaria. Se consideró como resultado positivo a aquel que evidenciaba una opacidad o turbidez en los microplatos en todas sus repeticiones, lo cual indica que el microorganismo fue capaz de hidrolizar los polisacáridos en cuestión.

### Análisis estadístico

Se evaluó la presencia de los M.O. en el alga *M. pyrifera* de las distintas localidades muestreadas y las diferencias en la capacidad hidrolítica. Se presentan los valores porcentuales de los datos analizados en el programa Sigma Stat versión 3.5.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En general, los océanos presentan variaciones anuales de temperatura en las capas superficiales que dependen de la absorción del calor recibido del exterior, registrándose un máximo al comienzo del otoño y un mínimo al inicio de la primavera. También se presentan cambios debido a la profundidad de las aguas, observándose que las modificaciones son mayores en la superficie, y conforme aumenta la profundidad las variaciones se atenúan progresivamente hasta no registrar ninguna variación anual. Cuando en los océanos

se alcanzan profundidades de 1.500 metros o mayores, la temperatura del agua puede ser menor de 4 °C en cualquier parte del mundo, independientemente de la temperatura superficial, que puede alcanzar los 26 °C (Weihaupt, 1984).

En la superficie de las aguas marinas tropicales, la temperatura mínima es de 20 °C, la máxima de 30 °C y la media de 26 °C; en las subtropicales 16 °C como mínima, 27 °C como máxima y 22 °C como media; en las aguas boreales y antiboreales, la mínima es de 1 °C,

la máxima de 17 °C y la media de 11 °C; en el Ártico y Antártico, la mínima oscila entre -3 °C a 1 °C, la máxima es de 9 °C y la media de -1 °C a 5 °C (Weihaupt, 1984).

De las tres poblaciones muestreadas de *M. pyrifera*, se cuantificó el mayor número de aislamiento de microorganismos en la zona costera de Osorno y Niebla (Figura 1). En ambas poblaciones de *M. pyrifera* se encontró presencia de bacterias, mohos y levaduras. Sin embargo, esta última no estuvo presente en la población de esta alga en Puerto Montt (Figura 2).

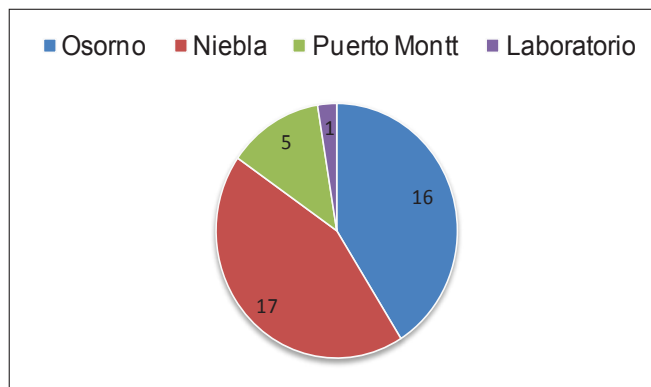


Figura 1. Número de microorganismos aislados de cada población original del alga *M. pyrifera*.

Figure 1. Number of microorganisms isolated from each original population of *M. pyrifera*.

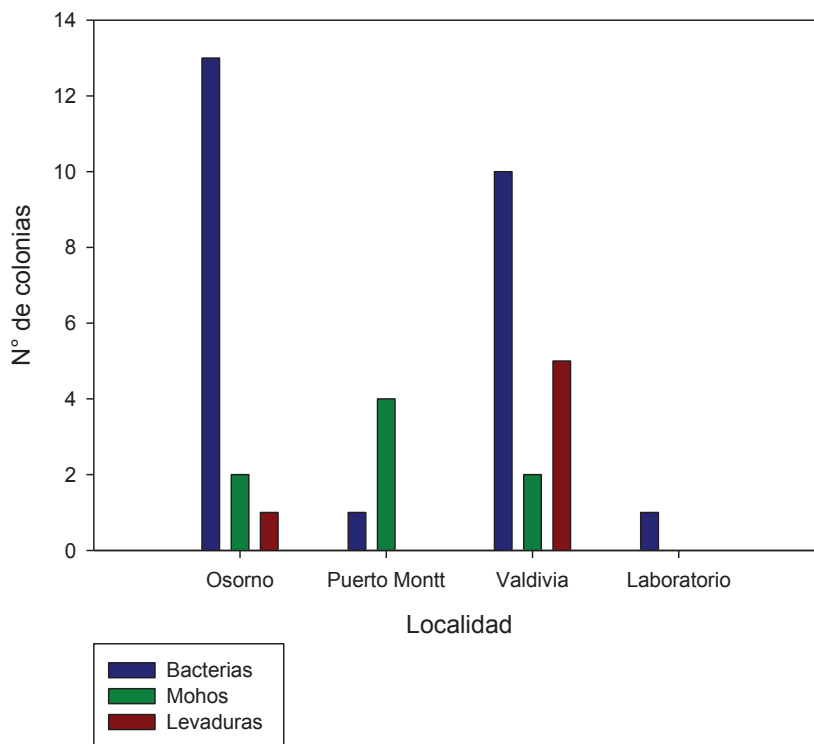
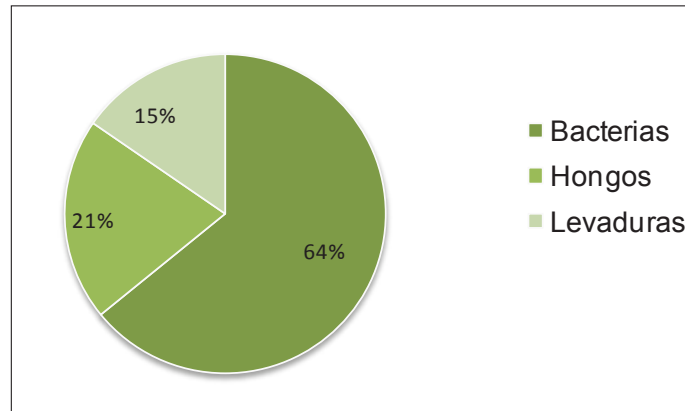


Figura 2. Número de colonias aislados del alga *M. pyrifera* para las poblaciones de distintas localidades.

Figure 2. Number of isolated colonies of *M. pyrifera* for populations of different localities.

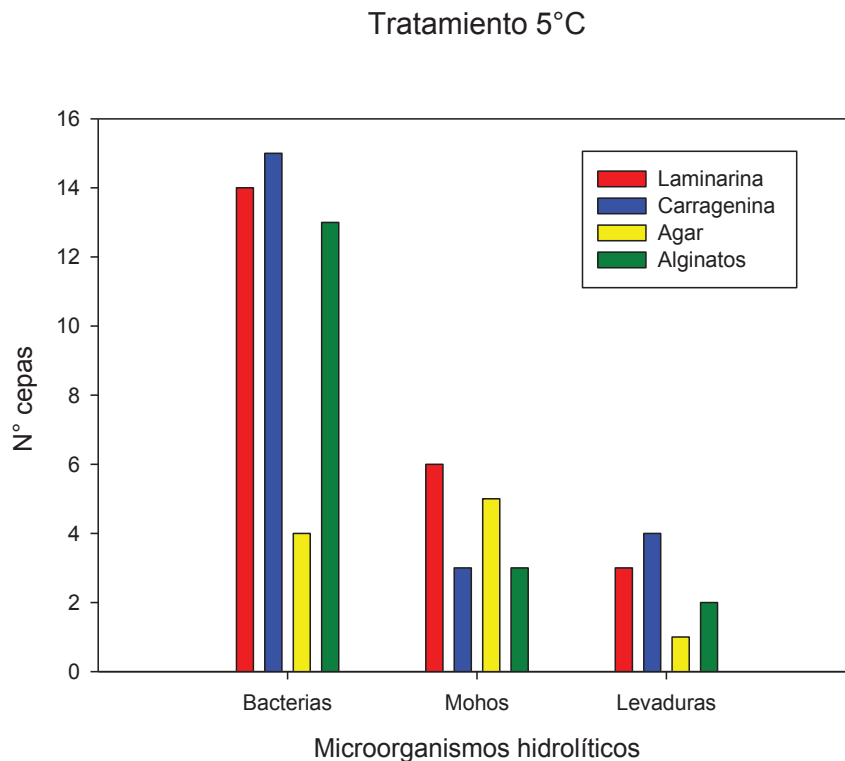
Los M.O. aislados de todas las poblaciones del alga *M. pyrifera*, se encontró un 15% de levaduras, 21% de mohos, y 64% de bacterias (Figura 3). De estos M.O. dos colonias de bacterias provenientes de la población de Niebla fueron capaces de hidrolizar tanto a 5 °C como 25 °C, los 4 polisacáridos utilizados como fuente de carbono. Por otro lado, hubo dos cepas de bacteria que no

hidrolizaron ningún polisacárido. No obstante, otros grupos de microorganismos como mohos poseen la capacidad de hidrolizar las cuatro fuentes de polisacáridos a 5 °C y al menos 3 °C a 25 °C (Figura 4). De los cuatro polisacáridos, el agar fue el que presentó menor hidrólisis frente a los microorganismos estudiados, aunque cuando se encontró hidrólisis de este, sólo fue por



**Figura 3.** Porcentajes totales de los microorganismos aislados de las poblaciones de Puerto Montt, Niebla y Osorno del alga *M. pyrifera*.

**Figure 3.** Total percentages of microorganisms isolated from populations of Puerto Montt, Niebla and Osorno of *M. pyrifera*.



**Figura 4.** Número de cepas aisladas de *M. pyrifera* que fueron capaces de hidrolizar los 4 polisacáridos a 5 °C.

**Figure 4.** Number of strains isolated from *M. pyrifera* hydrolyzed by the 4 polysaccharides at 5 °C.

bacterias y mohos a 5 °C. Sin embargo, sólo una colonia de levaduras fue capaz de hidrolizar este polisacárido (Figura 4). Por el contrario, este polisacárido a 25 °C sí puede ser hidrolizado por levaduras y bacterias, aunque en menor frecuencia por mohos (Figura 5).

Otro de los polisacáridos estudiados, laminarina fue un polisacárido con mayor frecuencia de hidrólisis por los M.O. tanto a 5 °C como a 25 °C (Figura 4 y 5, respectivamente). Basado en los resultados obtenidos se puede evidenciar un patrón de crecimiento bacteriano influenciado por la temperatura. Esto ya había sido documentado por Shaekh *et al.* (2013), quienes estudiaron cinco colonias bacterianas a distinta temperatura ambiente, las cuales mostraron un crecimiento diferencial. Los microorganismos estudiados mostraron una mejor capacidad hidrolítica cuando fueron expuestos a 25 °C en comparación con los ensayos a 5 °C (refrigeración); esto se puede observar en la Figura 5. La capacidad de hidrólisis podría estar explicada porque a menor temperatura la actividad es más lenta, por la velocidad de la reacción y al cambio de estado de los lípidos de la membrana celular, que pasan de ser fluidos a cristalinos impidiendo el funcionamiento de la membrana celular (Gallardo *et al.*, 2004). Estas bacterias pertenecen al grupo térmico de bacterias psicrótrofas según Gallardo *et al.* (2004). Las bacterias psicrótrofas pueden desarrollarse de 0 a 5 °C, pero crecen mejor a una temperatura entre 20 a 30 °C. A razón de esto, el 56% de las cepas evidenciaron un mejor resultado a 25 °C, mientras que a 5 °C el crecimiento se redujo a

un 44%. Laminarina fue uno de los mejores sustratos para exponer crecimiento bacteriano. En carragenina no existe una diferencia en el crecimiento, al utilizar una de las dos temperaturas para incubación; mientras que en alginato se debería utilizar 25 °C para evidenciar un crecimiento positivo, y en agar la respuesta fue menor en cuanto a crecimiento. Por otra parte, en el aislamiento de los microorganismos influyen variables que dependen de las características del medio de cultivo utilizado, como por ejemplo: la salinidad y el pH, que son los que cubren los requerimientos nutricionales de distintos tipos de bacterias, además de las condiciones de incubación (atmósfera, tiempo y temperatura), por estas variables el medio agar fue uno de los menos eficiente a la hora de comprobar crecimiento bacteriano. También existen pocos organismos que metabolizan el agar o que elaboren enzimas capaces de metabolizarlo. Finalmente, los M.O. aislados de algas pardas, poseen enzimas capaces de metabolizar en alta proporción los cuatro polisacáridos a los que fueron sometidas, el crecimiento de estas cepas se manifestó en muchos casos por el desarrollo de turbidez. Como indican Alderkamp *et al.* (2007) un crecimiento positivo será determinado por una turbidez visual evidente en los microplatos.

En un estudio realizado por García (2013) en el alga *Durvillaea antarctica* C., fue reportado que se logró aislar 16 cepas y, mediante análisis morfológico y observación microscópica, se logró determinar que ocho cepas correspondían a hongos, siete a bacterias y una cepa a levadura, por ende, es posible aislar microorga-

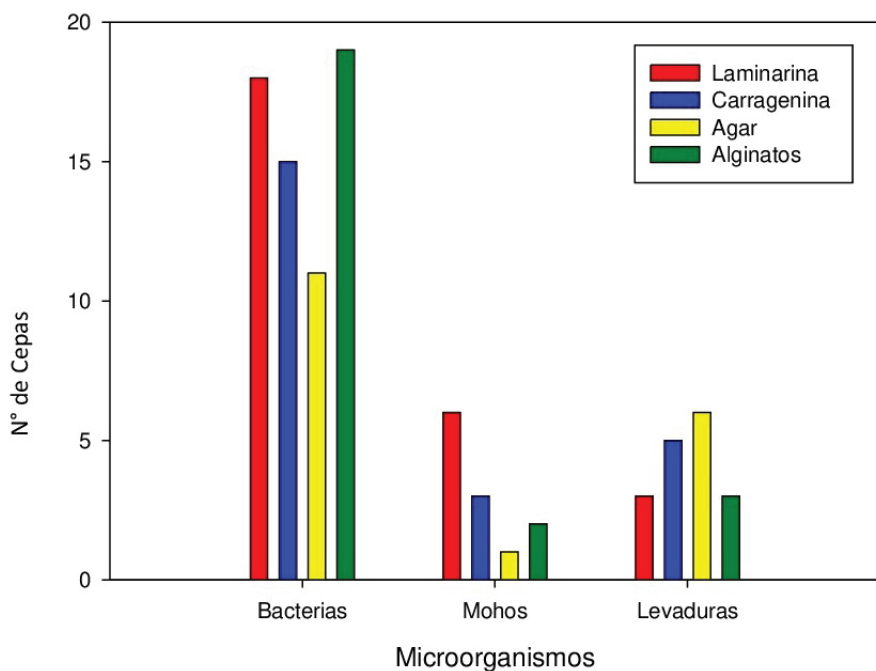


Figura 5. Número de cepas de *M. pyrifer* que fueron capaces de hidrolizar los 4 polisacáridos a 25 °C.

Figure 5. Number of strains of *M. pyrifer* hydrolyzed by the 4 polysaccharides at 25 °C.

nismos marinos con capacidad de hidrolizar laminarina, los cuales crecen mejor a 25 °C y pH 3,5, obteniendo el mejor crecimiento un hongo filamentoso del género *Trichoderma*. Los extractos de *D. antarctica* son ricos en laminarina, por lo cual se evidenció actividad laminarinasica extracelular; esta actividad se presentó teniendo como máximo 120 horas de cultivo. En este sentido tanto *D. antarctica* como *M. pyrifer* presentan microorganismos con capacidad de hidrolizar los polisacáridos en cuestión.

Sería interesante evaluar microorganismos de otras algas de gran importancia en las costas chilenas, para comprender el rol de los microorganismos que albergan. En cuanto a diversidad y abundancia, convendría evaluar la capacidad de hidrólisis de éstas. Otro aspecto interesante, sería identificar las cepas específicas que presentan estas algas con capacidad hidrolítica (Flores, 2012). Por último, sería interesante desarrollar un producto inmunoestimulador en base de oligosacáridos ( $\beta$  1,3/1,6) glucano, obtenidos de la hidrólisis enzimática de laminarina extraída de algas pardas de poblaciones naturales, otorgando un importante valor agregado al cultivo de las algas pardas y la fabricación de un producto inmunoestimulante algal. Además de obtener nuevos métodos de control biológicos, al producir un inmunoestimulante administrado en el alimento o inyectado que refuerza el sistema inmune, tanto en peces como moluscos, (Raa, 2000) permitiendo disminuir el uso de antibióticos, antiparasitarios y vacunas, así, los derivados de laminarina, extraída de algas pardas se podrían comercializar a un precio competitivo y razonable margen de rentabilidad.

## CONCLUSIONES

De esta investigación se puede concluir que es posible aislar microorganismos hidrolíticos del alga *M. pyrifer* en descomposición. En este sentido se pudo obtener bacterias, mohos y levaduras. Estos microorganismos a diferentes temperaturas son capaces de hidrolizar los cuatro polisacáridos de manera diferencial.

Sólo el 21% de los M.O. de la biota de *M. pyrifer*, ocho cepas de los microorganismos expuestos a un cultivo de 25 °C, pudieron hidrolizar los cuatro polisacáridos y; sólo 13%, cinco cepas de los microorganismos, tuvieron la capacidad de hidrolizar estos polisacáridos a menores temperaturas (5 °C). Así también, de los polisacáridos utilizados la laminarina resultó ser la mejor fuente de carbono para un número importante de cepas en ambas temperaturas, por el contrario, el agar no presentó ninguna afinidad con los microorganismos, ya que no se evidenció mayor crecimiento.

Es importante señalar que la tendencia en relación con el contenido de laminarina puede variar según la zona, el periodo estacional y el tipo de alga desde donde se extraiga. La variación de la concentración de lamina-

rina en poblaciones naturales, expuestas (Pucatrihue) y protegidas (Niebla) es diferente según la época del año. Desde el otoño hasta el verano se detecta una disminución del contenido de laminarina, concentrándose en otoño el periodo estacional donde se obtiene un mayor contenido de laminarina, que es la época además donde las plantas presentan el mayor tamaño y peso.

## REFERENCIAS

- Alderkamp, A.C., Van Rijssel, M., Bolhuis, H., 2007. Characterization of marine bacteria and the activity of their enzyme systems involved in degradation of the algal storage glucan laminarin. *FEMS Microbiology Ecology* 59(1), 108-117. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00219.x>
- Almanza, V., Buschmann, A., 2013. The ecological importance of *Macrocystis pyrifer* (Phaeophyta) forests towards a sustainable management and exploitation of Chilean coastal benthic co-management areas. *International Journal Environment and Sustainable Development* 12(4), 341-360. <https://doi.org/10.1504/IJESD.2013.056331>
- Burtseva, Y., Verigina, N., Sova, V., Pivkin, M., Zvyagintseva, T., 2006. Comparative characterization of Laminarinases from the filamentous marine fungi *Chaetomium indicum* corda and *Trichoderma aureviride* rifai. *Journal of Applied Phycology* 18, 375-380. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9043-9>
- Carrington, A., Secombes, C., 2006. A review of CpGs and their relevance to aquaculture. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 112(3-4), 87-101. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.03.015>
- Chan, J., Cheung, P., Ang, P., 1997. Comparative studies on the effect of three drying methods on the nutritional composition of seaweed *Sargassum hemiphyllum* (Turn.) C. Ag. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(8), 3056-3059. <https://doi.org/10.1021/jf9701749>
- Cheung, N., Modak, S., Vickers, A., Knuckles, B., 2002. Orally administered beta-glucans enhance anti-tumor effects of monoclonal antibodies. *Cancer Immunology Immunother* 51(10), 557-564. <https://doi.org/10.1007/s00262-002-0321-3>
- Choi, J., Kim, H., Lee, J., 2011. Structural feature and antioxidant activity of low molecular weight laminarin degraded by gamma irradiation. *Food Chemistry* 129(2), 520-523. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.078>
- Dalmo, R., Ingebrigtsen, K., Horsberg, T., Seljelid, R., 1994. Intestinal absorption of immunomodulatory laminaran and derivatives in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 17(6), 579-589. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1994.tb00256.x>
- Díaz, O., 2014. Extracción, caracterización parcial y determinación de propiedades fisiológicas *in vitro* de fucoidina y laminarina a partir de *Macrocystis pyrifer* y *Durvillaea antarctica*. Tesis de Grado Bioquímica, Universidad Austral de Chile. 32 p.
- Elyakova, L., Isakov, V., Lapshina, L., Nagorskaya, V., Likhatskaya, G., Zvyagintseva, T., Reunov, A., 2007. Enzymatic transformation of biologically active 1,3; 1,6- $\beta$ -D-

- glucan: structure and activity of resulting fragments. *Biochemistry (Moscow)* 72(1), 29-36. <https://doi.org/10.1134/S0006297907010038>
- Flores, R., 2012. Efecto inmunoestimulador y tecnología de producción de oligosacáridos ( $\beta$  (1,3-1,6) glucanos) extraídos de algas pardas cultivadas y su evaluación en cultivos de peces y moluscos. Informe Final Proyecto FONDEF de Investigación y Desarrollo D0711095, Universidad de Los Lagos, Chile.
- García, Y., 2013. Aislamiento y selección de microorganismos marinos productores de Laminarinasas: estudios preliminares de crecimiento y producción. Tesis de Grado Ingeniería en Alimentos, Universidad Austral de Chile. 54 p.
- Gallardo, A., Riso, S., Fajardo, M., Esteveo, B., 2004. Caracterización de poblaciones microbianas presentes en la macroalga comestible *Monostroma undulatum* Wittrock. *Archivos Latinoamericanos Nutrición* 54(3), 337-345.
- Hoffmann, A., Santelices, B., 1997. Flora Marina de Chile Central. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.
- Iturriaga, R., Hoppe, H., 1977. Observations of heterotrophic activity on photoassimilated organic matter. *Marine Biology* 40(2), 101-108. <https://doi.org/10.1007/BF00396254>
- Kaehler, S., Pakhomov, E., McQuaid, C., 2000. Trophic structure of the marine food web at the Prince Edward Islands (Southern Ocean) determined by  $\delta^{13}C$  and  $\delta^{15}N$  analysis. *Marine Ecology Progress Series* 208, 13-20. <https://doi.org/10.3354/meps208013>
- Kajiwara, T., Kashibe, M., Matsui, K., Hatanaka, A., 1990. Volatile compounds and long-chain aldehydes formation in conchocelis filaments of a red alga, *Porphyra tenera*. *Phytochemistry* 29(7), 2193-2195. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)83036-Z](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)83036-Z)
- Kester, D., Duedall, I., Connors, D., Pytkowicz, R., 1967. Preparation of artificial seawater. *Limnology and Oceanography* 12(1), 176-179. <https://doi.org/10.4319/lo.1967.12.1.0176>
- Khotimchenko, S., Vaskovsky, V., Titlyanova, T., 2002. Fatty acids of marine algae from Pacific coast of North California. *Botanica Marina* 45(1), 17-22. <https://doi.org/10.1515/BOT.2002.003>
- Kim, K.H., Kim, Y.W., Kim, H.B., Lee, D.S., 2006. Anti-apoptotic activity of laminarin polysaccharides and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from laminaria japonica. *Biotechnology Letters* 28(6), 439-446. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-6177-9>
- Mayer, A., Panick, B., 1984. Antitumor evaluation of marine algae in Argentina, in: Bird, C., Ragan, M. (Eds.), Eleventh International Seaweed Symposium. *Developments in Hydrobiology*, volume 22. Springer, Dordrecht, pp. 529-533.
- Lahaye, M., 1991. Marine algae as sources of fibres: determination of soluble and insoluble dietary fibre contents in some sea vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 54(4), 587-594. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740540410>
- Ortiz, J., 2011. Composición nutricional y funcional de algas pardas chilenas: *Macrocystis pyrifera* y *Durvillaea antarctica*. Laboratorio de Química y Análisis de Alimentos, Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. 35 p.
- Piel, M., 2003. Estudios experimentales en el cultivo de *Macrocystis pyrifera* (L. C. Agardh), a partir de gametofitos procedentes de cuatro localidades del sur de Chile (X-XII regiones). Tesis de Grado Biología Marina, Universidad Austral de Chile. 46 p.
- Pitson, S., Seviour, R., McDougall, B., 1993. Noncellulolytic fungal beta-glucanases: their physiology and regulation. *Enzyme and Microbial Technology* 15(3), 178-192. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(93\)90136-P](https://doi.org/10.1016/0141-0229(93)90136-P)
- Plaza, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E., 2008. In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in Food Science & Technology* 19(1), 31-39. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.07.012>
- Raa, J., 2000. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds, in: Cruz-Suárez, L., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M., Civera-Cerecedo, R. (Eds.), *Avances en Nutrición Acuicola. Memorias del V Simposio Internacional de Nutrición Acuicola*. 19-22 Noviembre del 2000, Mérida, Yucatán, México, pp. 47-56. [http://www.uanl.mx/utillerias/nutricion\\_acuicola/V/archivos/raa.pdf](http://www.uanl.mx/utillerias/nutricion_acuicola/V/archivos/raa.pdf)
- Robertsen, B., Rorstad, G., Engstad, R., Raa, J., 1990. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *Journal of Fish Diseases* 13(5), 391-400. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1990.tb00798.x>
- Rodríguez, F., Esteban, M., Meseguer, J., Bravo, M., Gómez, G., Rojas-Luna, T., Jiménez, G., Balcázar, J., 2003. Estrategias de control de enfermedades en Acuicultura II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura CIVA. Universidad de Zaragoza, 1 de septiembre a 30 de octubre de 2003, Zaragoza, España, pp. 624-654.
- Sanz, B., 2000. Monografía VI: Alimentos y Salud. Instituto de España, Real Academia de Farmacia, Madrid, España.
- Shaekh, M., Mondol, A., Islam, M., Kabir, A., Saleh, M., Salah, M., Hoque, K., Ekram, A., 2013. Isolation, characterization and identification of an antagonistic bacterium from *Penaeus monodon*. *International Journal of Scientific & Engineering Research* 4(10), 254-261.
- Suzuki, M., Horii, T., Kikuchi, R., Ohnishi, T., 1987. Purification of Laminarinase from Antarctic Krill *Euphausia superba*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 53(2), 311-317. <https://doi.org/10.2331/suisan.53.311>
- Vásquez, J., 1999. Effect of harvesting of brown seaweeds: a social, ecological and economical important resource. *World Aquaculture* 30(1), 19-22.
- Weihaupt, J., 1984. Exploración de los océanos: introducción a la oceanografía. Compañía Editorial Continental, México.
- Westermeyer, R., Patiño, D., Piel, M., Müller, D., 2005. Manual de cultivo de alga parda *Macrocystis pyrifera* (huirto), Chile. Proyecto FONDEF D0011144. Universidad Austral de Chile.