



TREBALL FINAL DE GRAU

“ EFECTE SOBRE LA SALUT INTESTINAL
D'EXTRACTES OBTINGUTS DE FONTS MARINES
PER A LA SEVA POTENCIAL APLICACIÓ COM A
INGREDIENTS EN LA ELABORACIÓ D'ALIMENTS
FUNCIONALS ”

AUTOR: ARNAU MOLINA OLVERA

TUTORA: ISABEL A. ODRIOZOLA SERRANO

GRAU EN CIÈNCIA I TECNOLOGIA D'ALIMENTS
ETSEAFIV

CURS 2022 - 2023



Universitat de Lleida



“ EFECTE SOBRE LA SALUT INTESTINAL
D’EXTRACTES OBTINGUTS DE FONTS MARINES
PER A LA SEVA POTENCIAL APLICACIÓ COM A
INGREDIENTS EN LA ELABORACIÓ D’ALIMENTS
FUNCIONALS ”

Lleida, 8 de Juny de 2023

Treball final de grau presentat per: Arnau Molina Olvera

RESUM

La sobreexplotació dels recursos terrestres empeny a la indústria alimentària a centrar-se en la biodiversitat marina, ja que els mars i oceans ocupen dues terceres parts de la superfície terrestre. Per això, s'entén les algues com el futur de la formulació d'aliments, sent una gran font alternativa de nutrients amb un alt contingut de fibra, podent ser considerats així com a prebiòtics.

L'objectiu de l'estudi va ser avaluar i comparar l'impacte sobre la salut colònica de diferents extractes d'algues rics en fibra soluble (alginats i carragenats). Per a assolir aquests objectius, es van realitzar fermentacions *in vitro* (48 hores) d'aquests extractes i després es van mesurar els pH, la producció d'àcids grassos de cadena curta (AGCC) com a subproducte de la fermentació de les fibres per part de la microbiota i, per últim, la variació de la població bacteriana.

Després de 48 hores de fermentació *in vitro* dels extractes, es va observar una baixada notable del pH en totes les mostres, a excepció de la mostra d'alginat no pretractada amb altes pressions. La producció d'àcids grassos de cadena curta va ser superior en les mostres d'alginats respecte a les mostres de carragenats. Per últim, per a tots dos extractes d'algues, es va produir una baixada en la proporció relativa de població microbiana respecte a les mostres sense fibra, incloent una baixada en les poblacions considerades prebiòtics.

L'extracte de *i*-carragenat és el que va aportar més beneficis per a la salut intestinal en comparació als altres extractes, ja que va produir una major reducció del pH, millorant el manteniment de la població microbiana de *Bifidobacterium*.

RESUMEN

La sobreexplotación de los recursos terrestres empuja a la industria alimentaria a enfocarse en la biodiversidad marina, puesto que los mares y océanos ocupan dos terceras partes de la superficie terrestre. Por eso, se entiende las algas como el futuro de la formulación de alimentos, siendo una gran fuente alternativa de nutrientes con un alto contenido de fibra, pudiendo ser considerados así como prebióticos.

El objetivo del estudio fue evaluar y comparar el impacto sobre la salud colónica de diferentes extractos de algas ricos en fibra soluble (alginatos y carragenados). Para alcanzar estos objetivos, se realizaron fermentaciones *in vitro* (48 horas) de estos extractos y después se midieron los pH, la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como subproducto de la fermentación de las fibras por parte de la microbiota y, por último, la variación de la población bacteriana.

Tras 48 horas de fermentación *in vitro* de los extractos, se observó una notable bajada del pH en todas las muestras, a excepción de la muestra de alginato no pretratada con altas presiones. La producción de ácidos grasos de cadena corta fue superior en las muestras de alginatos respecto a las muestras de carragenados. Por último, para ambos extractos de algas, se produjo una bajada en la proporción relativa de población microbiana respecto a las muestras sin fibra, incluyendo una bajada en las poblaciones consideradas prebióticos.

El extracto de *i*-carragenato es el que aportó mayores beneficios para la salud intestinal en comparación con los demás extractos, ya que produjo una mayor reducción del pH, mejorando el mantenimiento de la población microbiana de *Bifidobacterium*.

ABSTRACT

The overexploitation of terrestrial resources pushes the food industry to focus on marine biodiversity, since the seas and oceans occupy two thirds of the earth's surface. For this reason, seaweed is understood as the future of food formulation, being a great alternative source of nutrients with a high fiber content, which can also be considered as prebiotics.

The aim of the study was to evaluate and compare the impact on colonic health of different seaweed extracts rich in soluble fiber (alginates and carragenans). To achieve these objectives, *in vitro* fermentations (48 hours) were performed on these extracts, and then, the pH, the production of short-chain fatty acids (SCFA) as a by-product of fiber fermentation were measured by part of the microbiota and, finally, the variation of the bacterial population.

After 48 hours of *in vitro* fermentation of the extracts, a noticeable drop in pH was observed in all samples, with the exception of the alginate sample not pretreated with high pressures. The production of short-chain fatty acids was higher in the alginate samples than in the carrageenan samples. Finally, for both algae extracts, there was a drop in the relative proportion of the microbial population compared to the samples without fiber, including a drop in the populations considered as prebiotics.

The *i*-carrageenan extract is the one that provided the most benefits for intestinal health compared to the other extracts, as it produced a greater reduction in pH, improving the maintenance of the microbial population of *Bifidobacterium*.

ÍNDIX

1. INTRODUCCIÓ	7
1.1. LES ALGUES	9
1.2. LA FIBRA	13
1.2.1. TIPUS DE FIBRES I ELS SEUS EFECTES FISIOLÒGICS	14
1.2.2. FIBRA EN ALGUES.....	18
1.3. LA MICROBIOTA	22
1.3.1. COMPOSICIÓ DE LA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA.....	22
2. OBJECTIUS	25
3. MATERIAL I MÈTODES.....	26
3.1. MATERIAL	26
3.2. MÈTODES.....	27
3.2.1. PREPARACIÓ DE LA MATÈRIA FECAL.....	27
3.2.2. DIGESTIÓ COLÒNICA <i>IN VITRO</i>	28
3.2.3. MESURA DEL PH.....	28
3.2.4. ANÀLISI D'AGCC	29
3.2.5. EXTRACCIÓ D'ADN	30
3.2.6. QUANTIFICACIÓ DE POBLACIONS BACTERIANES	31
3.2.7. ESTADÍSTICA.....	33
4. RESULTATS I DISCUSIÓ	34
4.1. pH.....	34
4.2. ÀCIDS GRASSOS DE CADENA CURTA (AGCC)	35
4.3. VARIACIÓ DE LA MICROBIOTA.....	38
5. CONCLUSIÓ	44
6. BIBLIOGRAFÍA	46

1. INTRODUCCIÓ

El sistema alimentari global, té una gran contribució en la petjada ambiental, amb un aport significatiu d'emissió de gasos en totes les etapes de la cadena alimentària, començant per la producció agrícola, fins arribar a la ingesta dels aliments per part del consumidor final (Garnett, 2011; Smith et al., 2008). Aixó, indirectament també dona peu a altres impactes medioambientals com la pèrdua de biodiversitat o la pol·lució ambiental (Fao, 2013; Garnett et al., 2013).

L'augment generalitzat de temperatura, la contaminació de l'atmosfera amb gasos perjudicials tant per a humans com per a la resta d'éssers vius i d'efecte hivernacle, l'alteració general d'ecosistemes naturals i l'esgotament dels recursos naturals, són alguns dels factors que indiquen el ja present canvi climàtic (Myers et al., 2021). Davant l'amenaça de l'emergència climàtica ja es treballa per a adaptar les nostres dietes a prova de crisis alimentàries severes.

Per una altra banda, el creixement exponencial de la població mundial, que al 2050 es preveu arribar als 9700 milions d'individus (ONU, 2019), posa en manifest la necessitat d'augmentar la disponibilitat d'aliments, així com de satisfer els requeriments de les necessitats nutritives d'aquesta. També tenint en compte, la baixa qualitat dietètica i inseguretats alimentària donada per la limitació de recursos i la crisi econòmica, que afecta sobretot als països de la meitat sud global (Global Panel, 2016).

Per aixó, es treballa en la recerca d'aliments que siguin més nutritius i segurs, per així poder oferir a tota la població la possibilitat de satisfer les seves necessitats nutricionals, i contribuir el màxim en el manteniment de la salut.

Al 2050, s'estima que l'agricultura haurà de produir un 50% més dels recursos actuals per tal d'oferir els aliments necessaris a tota la població mundial. Per aquest motiu l'expansió de camps destinats a conreu, està sent en

conseqüència, un dels factors majoritaris de deforestació. Així doncs, la tendència a l'alça de crear terres de cultiu per a ser capaços d'oferir suficient aliment i la necessitat de crear terrenys urbanitzables degut al augment de població, resulta en una pèrdua de zones bosquoses amb les conseqüències medioambientals que provoca (FAO, 2017).

La sobreexplotació dels recursos terrestres empeny a la indústria alimentària a enfocar-se en la biodiversitat marina, ja que els mars i oceans ocupen dues terceres parts de la superfície terrestre, oferint així, gràcies a la tecnologia i coneixements actuals, una nova via per al desenvolupament de noves tècniques de cultiu d'aliments (FAO, 2018). En concret, és interessant l'estudi de l'utilització i implicació de les algues comestibles en la dieta, què, tot i que actualment estan poc valorades per a la indústria alimentària, escalen posicions com a una bona font alternativa de nutrients i proteïnes d'un alt valor nutricional (da Costa et al., 2019). Per això, s'entén les algues com el futur de la formulació d'aliments, sent una gran font alternativa de proteïnes, hidrats de carboni i amb un alt contingut de fibra, podent ser considerades així com a prebiòtics (Egea, 2021).

En la actualitat, un altre factor molt incident en la població, és l'increment de demanda d'aliments més ètics, com la no acceptació d'aliments obtinguts a partir de organismes genèticament modificats (OGM), o l'utilització d'aliments de font vegetal per tal de reduir el consum de carn i/o derivats (McClements and Grossmann, 2021).

Per tant, les algues es constituïràn en un futur, com a importants fonts alternatives de nutrients i compostos bioactius. En un context de transició ecològica i de previsió en etapes futures de manca d'aliments, poden a part, actuar com a possibles ingredients beneficiosos per a la salut (Alae-Carew et al., 2022).

1.1. LES ALGUES

Les algues són organismes fotosintètics complexos, per tant, són organismes autòtrofs. Dins la seva taxonomia són molt diversos tant morfològicament com funcionalment i s'acostumen a classificar segons la seva mida, podent diferenciar-se més generalment entre macroalgues i microalgues (Figura 1).

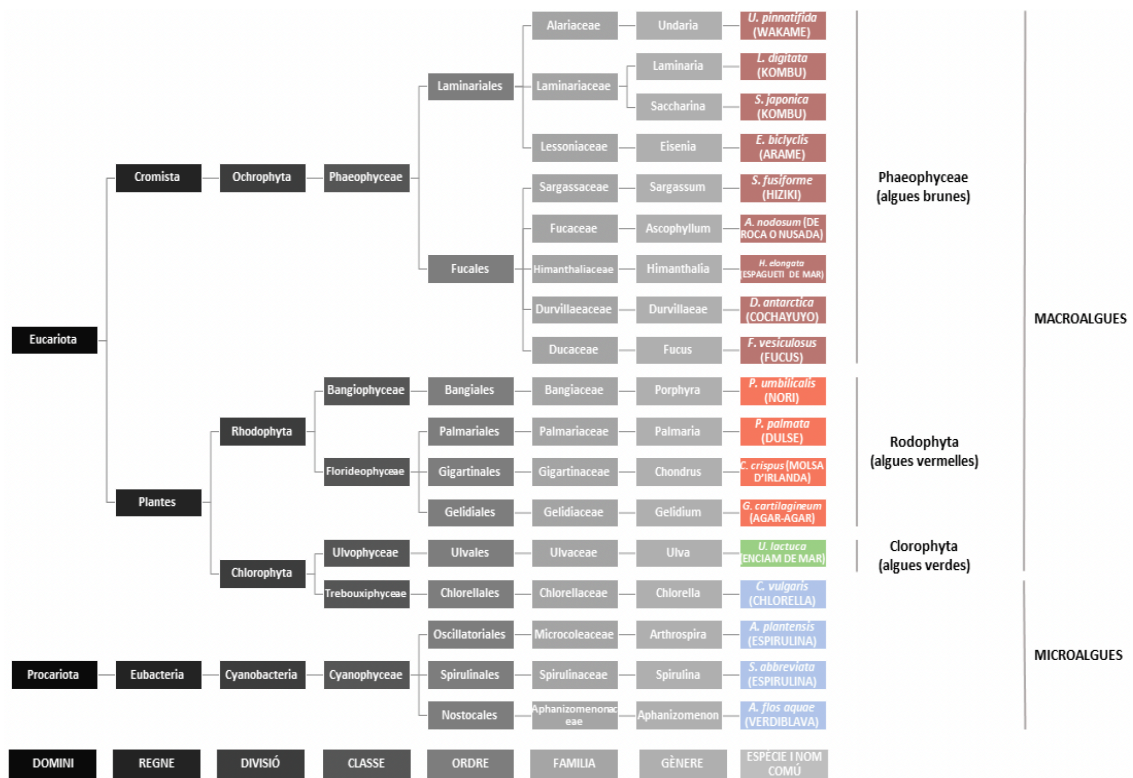


Figura 1.- Taxonomia de les algues (Egea, 2021).

Les microalgues comprenen un grup de microorganismes que acostumen a formar part del plàncton i que inclouen: cianobacteris o algues blaves (cèl·lules procariotes del domini bacteria), diatomees i dinoflagel·lats.

Per una altra banda, les macroalgues són éssers macroscòpics que es diferencien per la seva morfologia, particularment pel color que otorguen determinats pigments. Dins d'aquest grup podem trobar les algues brunes o *Phaeophyceae* que contenen ficoxantina, les algues roges o *Rhodophyta* amb ficocitrina i ficocianina i per últim, les algues verdes *Chlorophyta* amb clorofil·la

Ila i lib (Egea, 2021; Ścieszka and Klewicka, 2019). Aquests vegetals marins, han estat utilitzats tradicionalment com a aliment a països orientals com el Japó, Corea o Xina. Amb el pas dels anys i l'increment de moviments migratòris de població arreu del món, s'ha anat expandint aquest ús de les algues com a recurs dins la cuina. Part d'aquest interès per a les algues, està relacionat amb la seva qualitat nutricional, ja que són una bona font de fibra, presenten bon equilibri en la proporció de proteïnes i aporten gran quantitat de vitamines i minerals.

L'augment de la demanda d'algues, ha suposat què les reserves naturals d'aquestes, no siguin suficients com per abastir la demanda total. Degut a això, actualment està creixent el cultiu industrial d'algues, cobrint el 90% de la demanda (Figura 2).

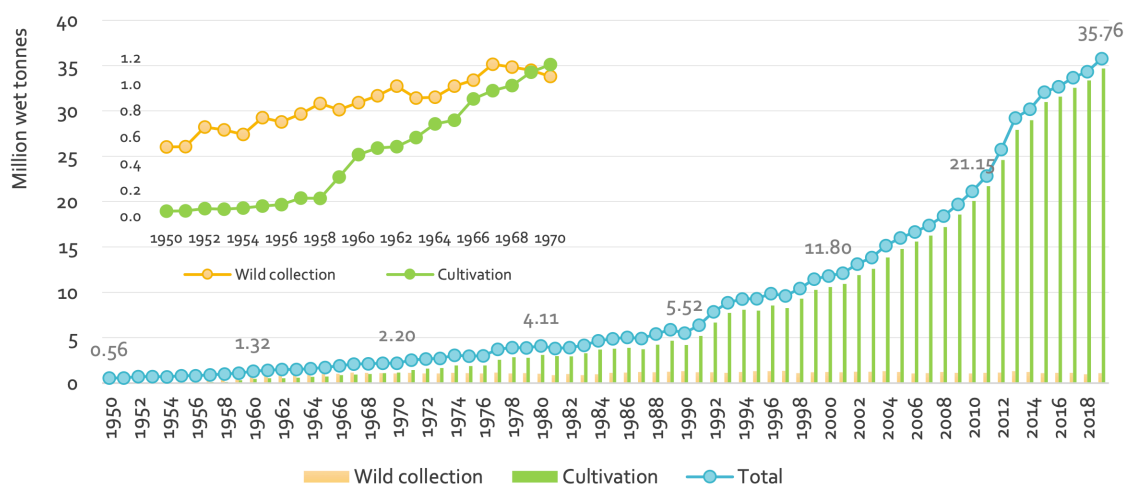


Figura 2.- Tendències en la producció d'algues (FAO, 2021).

Tal i com es pot veure en la (Figura 3), les algues més cultivades arreu del món són *Laminaria japonica* com a alga més destacada juntament amb *Euचेuma* spp, passant a l'alga *Gracilaria* spp i *Undaria pinnatifida* en tercer i quart lloc, i per últim, destacar el cinqué lloc, l'alga *Phorphyra* spp ja que és l'alga predominant en el cuinat de sushi.

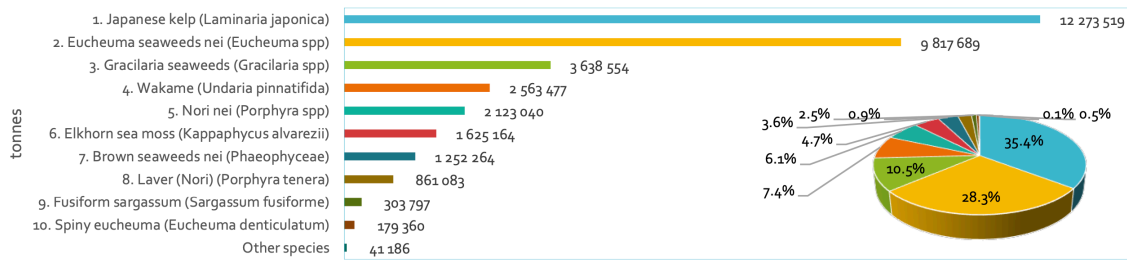


Figura 3.- Algues més cultivades arreu del món (FAO, 2021).

Tal i com es pot veure en la (Taula 1), la Xina és el major productor d'algues comestibles i hidrocoloides d'algues, produïnt fins a 5 milions de tones l'any, el que representa un 21,79% de la exportació mundial en conjunt. Corea s'encarrega de la producció d'aproximadament 800.000 tones, amb el 30,55% de la exportació d'algues mundial. Japó segueix d'aprop a Corea produïnt 600.000 tones l'any, tres quartes parts de la producció pertanyent a *Porphyra umbilicalis* (alga predominant en el cuinat de sushi) tot i no ser dels principals països en exportacions. Fora d'Àsia, el principal productor i exportador d'algues és Xile (Cai, 2021).

Xina tot i ser un dels màxims exportadors d'algues, ocupa també la posició de màxim importador (Taula 2). Després de la Xina, els països amb màxima importació són el Japó, Estats Units i Alemanya. Espanya ocupa una posició important en l'exportació de hidrocoloides provinents d'algues, essent el tercer país en l'àmbit (Taula 1), i la sisena posició en l'importació d'aquests productes i algues en conjunt (Taula 2).

Taula 1.- Exportacions d'algues i hidrocoloides a base d'algues (Cai, 2021).

Seaweeds and seaweed-based hydrocolloids			Seaweeds ¹			Seaweed-based hydrocolloids ²		
Exporter	Million USD	Share of world (%)	Exporter	Million USD	Share of world (%)	Exporter	Million USD	Share of world (%)
1. China	578	21.79	1. Rep. of Korea	278	30.55	1. China	523	30.00
2. Indonesia	329	12.39	2. Indonesia	218	24.01	2. Philippines	214	12.28
3. Rep. of Korea	320	12.08	3. Chile	86	9.43	3. Spain	138	7.91
4. Philippines	252	9.52	4. China	55	6.03	4. Chile	123	7.06
5. Chile	209	7.87	5. Philippines	38	4.23	5. France	114	6.53
6. Spain	145	5.48	6. Ireland	33	3.60	6. Indonesia	110	6.34
7. France	124	4.68	7. Peru	22	2.43	7. USA	84	4.82
8. USA	102	3.85	8. Japan	21	2.33	8. Germany	76	4.39
9. Germany	82	3.11	9. USA ³	18	1.98	9. UK	65	3.75
10. UK	78	2.93	10. Canada	18	1.97	10. South Korea	43	2.45
<i>Rest of the world</i>	<i>432</i>	<i>16.30</i>	<i>Rest of the world</i>	<i>36</i>	<i>3.93</i>	<i>Rest of the world</i>	<i>252</i>	<i>14.47</i>
World	2 652	100.00	World	909	100.00	World	1 743	100.00

Taula 2.- Importacions d'algues i hidrocoloides a base d'algues (Cai, 2021).

Seaweeds and seaweed-based hydrocolloids			Seaweeds ¹			Seaweed-based hydrocolloids ²		
Importer	Million USD	Share of world (%)	Importer	Million USD	Share of world (%)	Importer	Million USD	Share of world (%)
1. China	445	15.34	1. China	342	29.47	1. United States of America	225	12.96
2. Japan	341	11.76	2. Japan	241	20.80	2. Germany	112	6.44
3. United States of America	320	11.04	3. United States of America	95	8.17	3. China	103	5.93
4. Germany	124	4.27	4. Thailand	55	4.74	4. Spain	101	5.80
5. Spain	120	4.15	5. Taiwan Province of China	48	4.15	5. Japan	100	5.75
6. Russian Federation	116	3.99	6. France	35	3.02	6. Russian Federation	87	5.00
7. Thailand	112	3.86	7. Australia	30	2.57	7. United Kingdom	59	3.37
8. France	86	2.97	8. Russian Federation	29	2.47	8. Thailand	57	3.27
9. United Kingdom	80	2.76	9. Republic of Korea	29	2.46	9. Denmark	54	3.11
10. Denmark	67	2.32	10. United Kingdom	21	1.83	10. France	51	2.93
<i>Rest of the world</i>	<i>1 088</i>	<i>37.54</i>	<i>Rest of the world</i>	<i>236</i>	<i>20.34</i>	<i>Rest of the world</i>	<i>791</i>	<i>45.45</i>
World	2 899	100.00	World	1 159	100.00	World	1 740	100.00

Part d'aquest interès per les algues, està relacionat amb la seva qualitat nutricional, ja que aquestes són riques en carbohidrats no digeribles. També contenen elevades quantitats de proteïnes i minerals, i una petita proporció de lípids (Taula 3). En general les algues són aliments amb baix aport energètic (Gómez Ordóñez, 2012). El contingut en fibra dietètica pot variar entre el 33,5% i el 64% del pes sec d'una alga, mentre que la proteïna es troba en concentracions d'entre el 8% i el 35% en macroalgues, i entre el 46% i el 71% en microalgues. Les algues vermelles i verdes presenten un contingut major en

proteïna que les algues brunes. Aquesta proteïna es caracteritza per tenir una composició d'aminoàcids molt equilibrada (Keyimu and Abuduli, 2019).

Taula 3.- Composició nutricional de les algues (Egea, 2021).

		Carbohidrats	Proteïna	Lípids	Cendres
Microalgues	<i>Chlorella vulgaris</i>	12-17	51-58	14-22	
	<i>Arthrospira maxima</i>	13-16	60-71	6-7	4-20
	<i>Spirulina platensis</i>	8-14	46-63	4-9	
Macroalgues	Algues vermelles	36-66	8±35	1,64	7-29
	Algues brunes	35-70	8±15	0,3-4,5	14-45
	Algues verdes	15-65	10-21	0,3-1,6	11-55

Tots els valors representen el % respecte del pes sec d'alga.

Les algues en general presenten quantitats importants de minerals com per exemple el iode, el ferro, el magnesi o el clor. Això és degut a la seva capacitat per a absorbir substàncies inorgàniques de l'ambient. Les algues vermelles presenten més quantitat de minerals en forma de cations què els altres tipus d'algues (Keyimu and Abuduli, 2019). Pel que fa les vitamines, les algues presenten tant vitamines hidrosolubles, com vitamines de tipus liposoluble. Dins les vitamines, destaquen l'alta quantitat de vitamina C amb quantitats d'entre 500 i 3000 mg/Kg d'extracte sec d'alga. En les algues vermelles i brunes també trocem gran quantitat de vitamines del grup B com la riboflavina i la tiamina. Les vitamines liposolubles més destacades són la vitamina E i provitamines provinents de la vitamina A que aporten capacitat antioxidant per una part, i pigmentació per altra part (Keyimu and Abuduli, 2019).

1.2. LA FIBRA

S'entèn per fibra dietètica (FD) o alimentària: la part comestible dels aliments de procedència vegetal o els hidrats de carboni que són resistents a la digestió i/o absorció en l'intestí prim, amb fermentació completa o parcial en l'intestí gros. Químicament, la fibra dietètica inclou polisacàrids, oligosacàrids, lignina i substàncies associades de la planta (AACC, 2001).

Segons la FAO (Food and Agriculture Organisation), la fibra dietètica és un polisacàrid amb 10 o més monòmers que no pot ser hidrolitzat per enzims endògens a l'intestí prim (FAO, 2022). Altres definicions com la que aporta la "Sociedad Española de Dietética y Ciencias de la Alimentación", afegeix que té efectes beneficiosos per a la nostra salut (SEDCA, 2019). Altres autors com José Mataix, al llibre nutrición y alimentación humana, la defineix com el residu vegetal no digerible (Mataix et al., 2002).

Com es pot apreciar, la definició de fibra dietètica és molt diversa, totes les definicions coincidint amb la incapacitat de digestió pels enzims del propi cos humà, però cadascuna incloent o excloent alguns components o afirmacions sobre aquesta.

1.2.1. TIPUS DE FIBRES I ELS SEUS EFECTES FISIOLÒGICS

La fibra dietètica es pot classificar en fibra soluble i fibra insoluble, si tenim en compte la seva fermentabilitat i capacitat per a absorbir aigua per part dels microorganismes presents al final del nostre tracte digestiu.

La fibra soluble es dissol amb aigua i forma gels viscosos. No és digerida i en línies generals, es considera fàcilment fermentable per la microbiota del còlon. El consum d'aquesta fibra té nombrosos beneficis fisiològicament parlant com la producció d'àcids grassos de cadena curta (AGCC), la sensació de sacietat, la selecció i modificació de la massa bacteriana entre d'altres (Gidley and Yakubov, 2019; Guan et al., 2021).

La fibra insoluble no es dissol en aigua ni forma gels viscosos. No és digerida amb tanta facilitat com la fibra soluble per la massa bacteriana. Aquest tipus de fibra forma superfícies de xarxes polimèriques, gràcies a les quals es permet l'adhesió a certes partícules. També té nombrosos beneficis fisiològics com la mobilització de reserves energètiques, l'impediment de l'acció nociva d'alguns

compostos, l'augment de l'activitat peristàltica (Gidley and Yakubov, 2019; Guan et al., 2021).

Cal destacar també, que la fibra pot trobar-se associada amb components bioactius com polifenols o carotenoids, productes de les fonts vegetals, que tenen unes funcions específiques dins els organismes vegetals. Aquests compostos, al entrar dins l'organisme humà, poden ser alliberats i absorbits al llarg del tracte intestinal, i poden actuar com a benefici per a la salut humana (Padayachee et al., 2017).

Els components de la fracció insoluble es caracteritzen per la seva escassa capacitat per formar solucions viscoses a l'estómac i l'intestí prim, la seva baixa fermentabilitat al còlon ascendent i la seva baixa capacitat de retenció d'aigua al còlon distal. Afavoreix l'augment del tamany del bol fecal i incrementa la velocitat de trànsit, manifestant com un efecte laxant. La fracció soluble, forma solucions viscoses de gran volum a l'estómac i intestí prim, i constitueix un substrat altament fermentable per la microbiota colònica. Ara bé, la tendència de la fibra soluble a ser capaç de retenir l'aigua, després d'haver estat fermentada, es veu afectada, disminuint aquesta retenció d'aigua. Això influeix el pes del bol fecal que arrossega la fibra insoluble, que un cop atravesat aquest punt on s'ha fermentat la fibra soluble, part de l'aigua perduda per aquesta fracció soluble, l'arrossega la fibra insoluble (Mataix et al., 2002; McCleary and Prosky, 2000).

Pel que fa a la fermentabilitat de la fibra, existeixen i es coneixen nombroses fibres insolubles que deixant de banda el fet de ser insolubles, poden ser fàcilment fermentables, com per exemple midons resistents i cel·lulosa. Pel contrari, fibres solubles amb estructura química inaccessible per la microbiota, són difícilment fermentables. És a dir, la fermentabilitat no té perquè estar lligada a la solubilitat, tot i que la fibra soluble ocupa major rang de compostos fàcilment fermentables (Zaman and Sarbini, 2016).

La presi3 intraluminal es veu augmentada degut l'esforç muscular del c3lon en dietes pobres en fibra degut a l'estrenyiment. Aquest fet continuat genera una hipertr3fia muscular col3nica que anirà acompanyada d'un augment de la presi3 intracol3nica. Aquesta millora en el trànsit de la matèria fecal, condueix a una disminuci3 de la presi3 intraluminal del c3lon (Mataix et al., 2002).

A nivell d'est3mac, com a conseqüència de l'augment de viscositat, s'enlenteix el buidament gàstric i s'augmenta la seva distensió. Té com a resultat un augment de la sensaci3 de sacietat amb la conseqüent menor ingesta cal3rica (Escudero and González, 2006).

Aquest menor temps de trànsit intestinal i aquesta acumulaci3 d'aigua, produeixen un efecte de diluci3 impedit el contacte excessiu d'agents oncogènics. És per aix3, que s'associa amb la menor incidència de càncer colorrectal (Lattimer and Haub, 2010).

Al c3lon s'hi localitza la prèviament esmentada microbiota intestinal, que és composta de bacteris anaerobis estrictes fonamentalment, en una quantitat superior a les quatre-centes espècies. La microbiota al digerir la fibra, a part dels obligats fenòmens fermentatius, es produeixen altres efectes importants des del punt de vista fisiol3gic.

Hi ha un augment de la massa bacteriana total, incrementant la massa fecal, la capacitat de retenci3 d'aigua i la capacitat fermentativa. Es dona la producci3 de gasos, responsables de cert grau de flatulència (McCleary and Prosky, 2000).

També es dona la producci3 d'àcids grassos volàtils, responsables del manteniment del pH relativament baix de l'intestí gruixut d'entre 5,6 a 6,6. Aquests AGCC s'absorbeixen al llarg de l'intestí gruixut en un 90-95%, essent la resta excretats amb la femta.

Les funcions més importants d'aquests productes de la fermentació, i molt relacionades amb la disminució del pH com a causa, són: la inhibició del creixement d'espècies patògenes degut a la sensibilitat d'aquestes al pH àcid, estimulant la proliferació cel·lular i instauració de microbiota de tipus beneficiós. S'evitarà l'aparició de subproductes de microbiota alterant que podria arribar a ser cancerígena gràcies a l'estimulació d'una microbiota adequada al llarg de tot l'intestí (McCleary and Prosky, 2000). I la regulació de l'absorció d'aigua i intercanvi iònic, generant hidrogens al dissociar-se com a conseqüència de la seva entrada en l'enteròcit, i utilització d'aquests hidrogens per a la sortida al lumen per a l'intercanvi amb ions sodi (lligats a aigua) (Cui and Xie, 2023).

D'aquests AGCC, l'àcid butíric es metabolitza als enteròcits, constituïnt una magnífica font energètica per la mucosa colònica especialment distal i regulant el metabolisme d'àcids nucleics en aquestes cèl·lules. Aquest àcid és capaç d'inhibir el desenvolupament de tumors en el còlon i el recte, potenciat també per el baix pH de la zona. Aixó és degut a la seva acció per enlentir el metabolisme de les cèl·lules cancerígenes. En casos de malalties inflamatòries en l'intestí, s'acostuma a observar una pèrdua de cèl·lules productores de butirat, què a la vegada coincideix amb un augment exponencial del creixement d'espècies oportunistes com *Clostridioides difficile*. També, la pèrdua d'aquestes cèl·lules productores de butirat, s'ha associat tant amb episodis previs de prediabetis com en diabetes tipo 2 (Álvarez et al., 2021). L'àcid butíric, s'utilitza també per a controlar la infecció per *Salmonella* (Agudelo-Ochoa et al., 2016).

L'àcid propiònic es metabolitza a nivell hepàtic podent ser servit com a precursor de síntesi hidrocarbonada i lipídica, ademés, s'ha associat amb capacitat d'inhibició de síntesis de colesterol. En indústria alimentària, l'àcid propiònic s'està utilitzant com a additiu antimicrobià (Agudelo-Ochoa et al., 2016).

L'àcid acètic, pot ser metabolitzat en teixits perifèrics, proporcionant energia o, ser utilitzat a nivell hepàtic per a síntesi d'àcids grassos de cadena llarga o

cossos cetònics (Cui and Xie, 2023). És l'àcid gras de cadena curta que es troba en més proporció a l'hora de la síntesi d'aquests per la metabolització de la fibra dietètica. S'estima que un 10% del total de l'energia absorbida a partir de la nostra dieta, prové de la síntesi lipídica en el fetge a partir d'àcids grassos de cadena curta provinents de la fermentació colònica. Donat que aquest àcid és el que ocupa major part de la producció d'AGCC, es pot concloure que forma part d'un aport energètic important per al nostre organisme (Chávez, 2013).

1.2.2. FIBRA EN ALGUES

Com es pot veure en la (Taula 4), en macroalgues verdes i vermelles, un 56% de la fibra total acostuma a ser fibra soluble, en canvi, en macroalgues brunes, es pot arribar fins a un 85% de fibra soluble respecte a la fibra total. Per tant, dins de l'alt contingut en fibra de les algues, gran part d'aquesta fibra és soluble (MacArtain et al., 2007).

Taula 4.- Contingut en fibra de les macroalgues (Holdt and Kraan, 2011).

Macroalga	Contingut total de polisacàrids	Fibra total	Fibra soluble	Fibra insoluble
Algues vermelles				
• <i>Porphyra</i>	18-76	35-49	18	17-31*
• <i>Palmaria</i>	38-74	-	-	-
• <i>Chondrus</i>	55-66	-	-	-
Algues brunes				
• <i>Ascophyllum</i>	42-70	40-42,6*	38	2-4,6
• <i>Laminaria i Saccharina</i>	38-61	36	27-31,5*	4,5-9
• <i>Undaria</i>	35-45	35-46	30	5-16*
• <i>Sargassum</i>	4-68	49-62	33	16-29*
Algues verdes				
• <i>Ulva</i>	15-65	38	21	9

* són calculats sumant o restant la fibra soluble i insoluble de la fibra total.

Els valors amb – no són disponibles.

Tots els valors representen el % del pes sec d'alga.

En les microalgues els carbohidrats tenen funcions tant estructurals com metabòliques i es poden trobar units a proteïnes (formant glicoproteïnes) o lípids (formant glicolípid). En general, els polisacàrids complexos formen la paret cel·lular, mentre que la glucosa o el midó són utilitzats per a l'obtenció i emmagatzematge energètic.

Les macroalgues es diferencien per la composició de polisacàrids estructurals que es troben en la paret cel·lular i en la reserva de les cèl·lules. La major part d'aquests, no són digerits pels enzims humans, però sí pels enzims de les bacteries presents al còlon (Egea, 2021; Ścieszka and Klewicka, 2019).

Els tipus de fibra soluble més importants en les algues són els laminarans, els alginats, l'agar-agar, els carragenats i els ulvans entre d'altres. Entre els tipus de fibra insoluble més presents en les algues, destaquen la cel·lulosa i els xilans entre d'altres (Taula 5).

Taula 5.- Principals polisacàrids en les macroalgues i composició dels mateixos (Egea, 2021).

	Fibra soluble	Fibra insoluble
Algues brunes	<u>Laminarans</u> Polisacàrids lineals formats la unió de (1,3)- β -glucosa i (1,6)- β -glucosa <u>Alginats</u> Polisacàrids lineals formats per la unió dels monosacàrids β (1,4)-àcid manurònic i (1,4)- àcid gulurònic <u>Fucans/Fuoidans/Furans</u> Polisacàrids formats majoritàriament per L-fucosa sulfatada unida amb enllaços α -1,2.	<u>Cel·lulosa</u> Polisacàrids lineals formats per unitats de β -(1,4) glucosa
Algues vermelles	<u>Agar-agar</u> Polisacàrids sense ramificacions formats per una barreja de dos polisacàrids, l'agarpectina i l'agarosa. <u>Carragenans</u> Polisacàrids lineals formats pels monosacàrids D-galactosa i (3,6)-anhidro-L-galactosa sulfat.	<u>Cel·lulosa</u> Polisacàrids lineals formats per unitats de β -(1,4) glucosa <u>Xilans</u> Polímers de xilosa amb ramificacions de xilosa, arabinosa, glucosa, galactosa i àcids urònics
Algues verdes	<u>Ulvans</u> Polisacàrids sulfatats formats pels monosacàrids ramnosa i xilosa i per àcids urònics. <u>Galactans sulfatats</u> Polisacàrids lineals sulfatats formats per la unió de galactoses.	

Algunes fibres solubles candidates a ser incorporades en processos tecnològics en la indústria alimentària per a la creació de nous aliments funcionals són els alginats i els carragenats. De fet, aquests dos tipus de fibres s'han evaluat per al seu ús com a ingredients en la formulació de productes de pastisseria (Camino Martínez, 2016) (Sweetit, 2020).

Els alginats són polisacàrids lineals formats per la unió dels monosacàrids: $\beta(1,4)$ -àcid manurònic i $\beta(1,4)$ -àcid gulurònic (Figura 4).

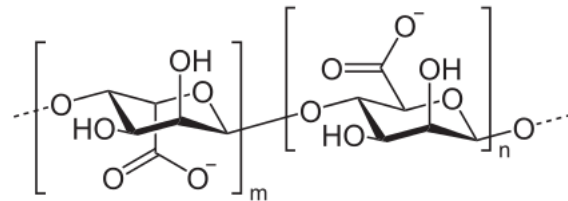


Figura 4.- Estructura química d'un polímer d'alginat.

El grup d'alginats, forma part de la fibra soluble de les algues brunes. Aquest polisacàrid és el polisacàrid estructural predominant en les algues brunes i s'utilitza com a substrat pels bacteris del colòn actuant com a prebiòtic i estimula la formació de AGCC (àcids grassos de cadena curta) (Brownlee et al., 2005). S'han observat efectes relacionats amb la possible prevenció de càncer de colòn degut a l'augment de massa fecal a través de la retenció d'aigua i disminució del temps de trànsit intestinal. També disminueix l'absorció de colesterol, reduint el colesterol en sang degut a la menor absorció d'aquest a nivell intestinal amb la conseqüent menor formació a nivell hepàtic (Holdt and Kraan, 2011; Wells et al., 2017)

Els carragenats són polisacàrids lineals formats per la unió dels monosacàrids:

D-galactosa i (3,6)-anhidro-L-galactosa sulfat (Figura 5).

El grup dels carragenats, forma part de la fibra soluble de les algues vermelles. Són uns polisacàrids sulfats que poden presentar fins a 15 tipus diferents depenent del grau de sulfatació i la posició del grup funcional. Com el grup dels alginats, i al formar part de la fibra

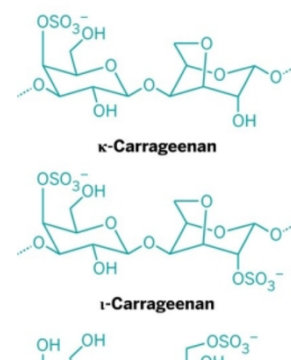


Figura 5.- Diferents estructures químiques que poden presentar els carragenats.

soluble de les algues, s'utilitza com a substrat pels bacteris del colòn actuant com a prebiòtic i estimula la formació de AGCC (àcids grassos de cadena curta). També s'han observat efectes relacionats amb la possible prevenció de càncer de colòn degut a l'augment de massa fecal a través de la retenció d'aigua i disminució del temps de trànsit intestinal (Yuan et al., 2006). També s'ha suggerit la seva possible actuació com a antiviral, atrapant mitjançant interaccions superficials amb virus (Figuerola et al., 2021).

Altres exemples de fibra soluble presents a les algues són els laminarans, els fucans o els ulvans.

Els laminarans són els polisacàrids de reserva predominants en algues brunes. Són polisacàrids lineals formats per la unió de (1,3)- β -glucosa i (1,6)- β -glucosa. Acostuma a ser utilitzat com a substrat pels bacteris del colòn, actuant així com a prebiòtic. Existeixen evidències també d'activitat antitumoral, anticoagulant i reductor del colesterol en ratolins.

Els fucans són uns polisacàrids sulfatats presents principalment en algues brunes. Són polisacàrids formats majoritàriament per la unió de L-fucosa sulfatada unida amb enllaços α -1,2. Alguns dels efectes beneficiosos amb els que es relacionen són l'activitat antiinflamatòria, antioxidant, antiviral, entre d'altres.

Els ulvans es troben en les algues verdes. Són polisacàrids sulfatats formats pels monosacàrids ramnosa i xilosa juntament amb àcids urònics. Tenen capacitat anticoagulant i antibacteriana entre d'altres.

Per altra banda, la cel·lulosa és la fibra insoluble que predomina a les algues. Aquesta està formada per polisacàrids lineals formats per unitats de β -(1,4)-glucosa. Impedeix l'acció nociva d'alguns compostos i augmenta l'activitat peristàltica de l'intestí entre d'altres efectes beneficiosos.

1.3. LA MICROBIOTA

El tracte digestiu dels humans està colonitzat per un gran nombre de microorganismes, coneguts com a microbiota. La formen en gran part bacteris, però també arqueus fongs, protists i virus. Es calcula que el nombre de microorganismes que formen la microbiota, supera en deu vegades, el nombre de cèl·lules somàtiques dels humans.

Existeix una relació de mutualisme simbiòtic entre humans i microbiota en la qual, els humans aporten l'ambient perfecte per a que els microorganismes siguin capaços de créixer i desenvolupar-se i, els microorganismes a canvi, duen a terme accions i generen productes que acabaran sent beneficiosos per al nostre organisme (Turnbaugh et al., 2007).

La majoria de microorganismes es troben a l'intestí gruixut o el còlon. Allí, poden arribar a sumar bilions d'unitats formadores de colònies (UFC). La distribució d'aquests microorganismes al llarg del còlon, segueix una tendència en augment progressiu del nombre de bacteris des del segment proximal fins al segment distal. Es calcula que el recompte de cèl·lules viables a la matèria fecal arriba a ser de fins a 10^{11} i 10^{12} UFC/g, el recompte de cèl·lules viables a la matèria fecal. En conjunt conviuen més de 1000 espècies diferents (Rajilić-Stojanović and de Vos, 2014). Part de les bacteries es troben permanentment dins el nostre tracte digestiu, altres arriben via ingesta o per via ambiental, i s'hi troben de forma transitòria. Gran nombre de bacteris present es consideren inocus i beneficiosos. Altra part, es consideren perillosos en quantitats importants, però la seva presència en petites quantitats ajuden al manteniment de l'equilibri de la flora bacteriana saludable en conjunt (Gomaa and Antonie, 2020).

1.3.1. COMPOSICIÓ DE LA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA

Taxonòmicament parlant, més del 90% dels microorganismes presents en l'intestí, pertanyen a 2 de les 70 branques filogèniques existents del domini *Bacteria*: *Bacteroidetes* i *Firmicutes*. Si es parla de gèneres dins aquest domini,

Bacteroides, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus* i diferents cocs gram-positius anaeròbics com *Enterococcus*, són els gèneres més predominants (Cresci and Bawden, 2015).

També s'hi poden trobar presents gèneres més atípics com *Streptococcus*, *Escherichia coli* o *Enterobacteriaceae*. Altres espècies poden aparèixer de manera transitòria com podrien ser alguns llevats i algunes bacteries làctiques (Figura 6).

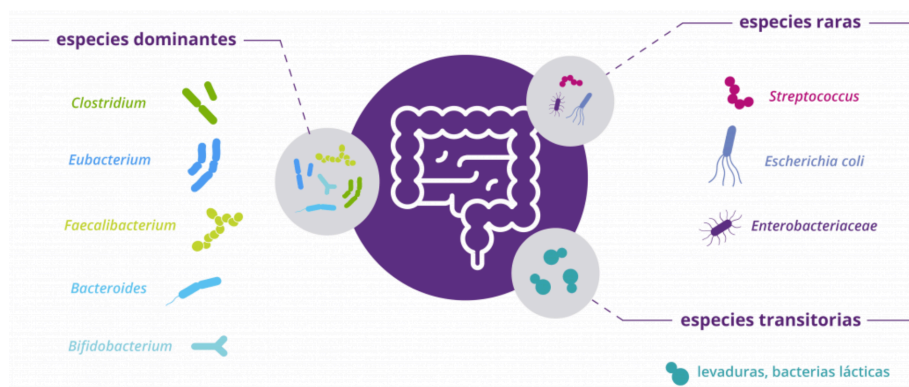


Figura 6.- Composició de la microbiota intestinal (Biocodex Microbiota Institute, 2022)

La composició d'aquesta microbiota no és idèntica al llarg del temps de vida d'una persona, i també varia entre persones. La microbiota pot variar depenent de factors com: la genètica, les secrecions digestives, la immunitat (tant innata com adquirida), les malalties que pugui patir algú al llarg de la seva vida, l'ús de medicaments i antibiòtics, la dieta, entre d'altres. Factors com el pH, la disponibilitat de substrat, la competència i associació entre microorganismes i factors ambientals, també juguen un paper important en la composició de la microbiota (Shapira, 2016).

Com s'ha esmentat anteriorment, la microbiota canvia en funció de l'edat (Figura 7). En edat infantil, factors com la lactància, l'ambient, el tipus de naixement o l'edat gestacional, tenen ja influència sobre el desenvolupament de la microbiota en l'infant. En aquesta etapa destaquen els gèneres de *Proteobacteria* i

Bifidobacterium. En infants es va diversificant la microbiota avançant en el temps fins a arribar a l'adolescència, en què s'arriba a un punt màxim en quant a diversitat filogenètica.

En edat adulta es produeix un equilibri en la població de microorganismes destacant els gèneres de microorganismes esmentats anteriorment. Arribat ja a una edat avançada, és quan es produeix una pèrdua progressiva d'aquesta microbiota. És degut a canvis en l'estil de vida, dieta, disminució de l'activitat fisiològica general, entre d'altres factors. Aquest fet, té com a conseqüència la pèrdua de diversitat filogenètica de la microbiota, en especial, afectant als gèneres de *Firmicutes* i *Bacteroidetes*. Aquest fet pot desencadenar en el desenvolupament de condicions patològiques com infeccions o malnutrició (Salazar et al., 2014).



Figura 7.- Evolució de la microbiota intestinal en funció de l'edat (Biocodex Microbiota Institute, 2022)

Es coneix l'important funció d'aquesta microbiota en l'organisme humà, i per tant, cal conservar un equilibri saludable d'aquesta, per tal de maximitzar els beneficis que ens aporta. El consum de fibra en la dieta, és un dels factors què més influencia en el manteniment i obtenció de beneficis a partir d'aquesta. La creació de nous aliments funcionals a partir de components d'algues pot suposar una millora en la problemàtica medioambiental i una solució per a possibles efectes negatius d'un consum baix en fibra.

2. OBJECTIUS

L'objectiu del present treball és avaluar l'impacte sobre la salut intestinal de diferents extractes d'algues rics en fibra soluble (alginats i carragenats). També es compararan aquests efectes entre els diferents tipus d'algues per determinar quina afavoreix més la salut colònica *in vitro*.

Per això es portaran a terme els següents objectius específics:

1. Determinar els canvis en el pH del medi després de la digestió colònica *in vitro* dels extractes marins.
2. Establir la quantitat total d'AGCC produïts com a metabòlits secundaris després de la digestió colònica dels extractes d'algues.
3. Determinar la variació de les poblacions bacterianes clau per a la salut intestinal després de la digestió colònica dels extractes obtinguts de fonts marines.
4. Comparar l'estructura i puresa dels diferents extractes d'algues per a establir quin afavoreix més la salut intestinal.

3. MATERIAL I MÈTODES

3.1. MATERIAL

Per a la realització d'aquest estudi es van utilitzar extractes obtinguts a partir de macroalgues *Phaeophyceae* (el polisacàrid alginat) i *Rhodophyta* (el polisacàrid carragenat).

Concretament els extractes utilitzats van ser:

Per una part, dos tipus d'algins, sotmesos al mateix tipus d'extracció però, aplicant a una de les mostres un pretractament d'altres presions, i per tant, donant mostres de diferent puresa:

- Extracte d'alga *A. nodosum* extret juntament amb altres components com polifenols i/o polisacàrids sulfatats, amb un rendiment en la extracció del 14,1% i amb la següent composició: 3,3% proteïna, 19,4% cendres i 68,8% carbohidrats, els quals són en un 2,8% fucosa, 1,9% xilosa, 22,9% àcid gulurònic, 1,5% àcid glucurònic i 39,6% àcid manurònic. Aquest alginat es va anomenar Alginat (AFA)
- Extracte d'alga *A. nodosum* extret juntament amb altres components com polifenols i/o polisacàrids sulfatats, el qual ha estat sotmés a un pretractament a una pressió de 350 MPa durant 5 minuts a 20°C. Amb un rendiment en la extracció del 23,0% i amb la següent composició: 2,8% proteïna, 20,9% cendres i 70,0% carbohidrats, els quals són en un 4,3% fucosa, 2,7% xilosa, 24,2% àcid gulurònic, 1,2% àcid glucurònic i 38,1% àcid manurònic. Aquest alginat es va anomenar Alginat (HPP)

Per una altra banda, quatre tipus d'extracte de carragenats de la empresa (CEAMSA, As Gándaras, Espanya), els quals es diferencien segons la seva estructura:

- Extracte comercial d'alga λ -carragenat d'alta viscositat (λ CA)

- Extracte comercial d'alga λ -carragenat de baixa viscositat (λ CB)
- Extracte comercial d'alga k-carragenat (KC)
- Extracte comercial d'alga *i*-carragenat (*i*C)

3.2. MÈTODES

3.2.1. PREPARACIÓ DE LA MATÈRIA FECAL

Les mostres de femta emprades a l'estudi s'obtenen de 5 individus sans, 2 homes i 3 dones d'entre 22-45 anys. Els participants de l'estudi no van haver de modificar la seva dieta i es van seleccionar seguint els següents criteris d'inclusió: el no consum d'antibiòtics i laxants, i no haver patit cap patologia gastrointestinal en els darrers sis mesos. La femta es va recollir en un recipient estèril i el processat es va dur a terme en les posteriors 2 h a la recollida.

Primerament, es van preparar la solució tampó i la solució d'elements traça per després poder elaborar el medi mineral (Durand i col. 1988), compost per dues solucions principals: La solució d'elements traça es va preparar afegint a 1 L d'aigua Mili-Q: 3680 mg/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1159 mg/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 440 mg/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 120 mg/L de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 98 mg/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ i 17.4 mg/L de $\text{Mo}_7(\text{NH}_4)_6\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. La solució tampó es va preparar afegint a 1L d'aigua Mili-Q: 9.24 g/L de NaHCO_3 , 3.54 g/L de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.47 g/L de NaCl , 0.45 g/L de KCl , 0.23 g/L de $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 0.06 g/L de CaCl_2 , 0.1 g/L de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ i 0.4 g/L d'Urea.

Per a obtenir el medi mineral es van barrejar 99 mL de solució tampó i 1 mL de solució traça. Després, el medi mineral es va autoclavar amb el Presoclave 75 L (J.P. Selecta, Abrera, Barcelona).

Per a congelar la matèria fecal, primer es va pesar un *pull* de femta que es va dissoldreen medi mineral amb glicerol (10%) sonicat prèviament amb l'Ultrasons-H (J.P. Selecta, Abrera, Barcelona) en un ràtio 1:10 (p/v). Aquest últim component és l'únic que va diferir lleugerament del mètode proposat per Bas-27 de 52

Bellver et al (2020), en tant que la concentració de glicerol es va ajustar, per a evitar interferències en la quantificació posterior dels AGCC. Seguidament, es va homogeneïtzar amb l'ajuda d'un stomacher Lab Blender (Steward medical Londres, Anglaterra) durant 60 s. Per últim, la barreja es va distribuir en endorffs d'1,5 mL i es va congelar a -80 °C Ultrafreezer 120 (Fiocchetti, Itàlia).

3.2.2. DIGESTIÓ COLÒNICA *IN VITRO*

Primerament, es van col·locar 1 ml de la suspensió fecal descongelada en tubs estèrils de 50 mL i es van afegir 0,1g dels extractes d'alga, per tal d'incubar-lo durant 48 hores. Finalment, es va preparar un tub que només contenia la matèria fecal sense cap extracte ric en fibra i que es va emprar com a blanc. La preparació de les mostres es va realitzar en una cambra de flux laminar (Telstar® S.A., Terrasa, Barcelona, Espanya) en condicions d'esterilitat, per tal d'evitar una possible contaminació.

Un cop preparats els diferents tubs, es van homogeneïtzar amb un vòrtex. Seguidament, es van col·locar en bosses d'anaerobiosi "GENbag anaer" (bioMérieux®S.A., Marcy-l'Étoile, França). A l'interior de la bossa també es va afegir un generador d'anaerobiosi (bioMérieux®S.A., Marcy-l'Étoile, França) i una tira indicadora d'anaerobiosi "Anaerotest®" (Sigma-Aldrich, Sant Louis, EE.UU). D'aquesta manera es va assegurar l'ambient anaerobi propi del còlon.

A continuació, es van col·locar les bosses dins una cambra incubadora I10-OE (OVAN, Badalona, Barcelona), a una temperatura de 37 °C amb agitació continuada de 100 rpm durant 48 hores exactes.

3.2.3. MESURA DEL PH

Una vegada finalitzada la digestió, es va mesurar el pH per duplicat, amb un pH-metre pH 700 (Thermo scientific™, Eutech Instruments™, Waltham, EE.UU) i els tubs es van preservar a -80 °C en un congelador (Ing Climas, Barcelona).

3.2.4. ANÀLISI D'AGCC

Per l'extracció d'AGCC, es va preparar l'àcid fosfòric (H_3PO_4) al 5% amb el patró intern (PI) d'àcid 4-metilvalèric en concentració 25 mg/mL. Per a preparar una dissolució 1:10 (V/V) es va partir d'1 mL d'àcid fosfòric al 5% amb PI i de 9 mL de la mostra obtinguda després de la digestió colònica. La barreja es va vortejar durant 1 minut i després es va agitar a 250 rpm durant 15min a temperatura ambient (cambra incubadora OVAN I10-OE). En acabant es va centrifugar a una velocitat de 6000 rpm i 4 °C durant 10 minuts. El sobrenedant aconseguit es va tornar a centrifugar a 14000 rpm, 4 °C i durant 10 minuts. Finalment el sobrenedant va passar-se per un filtre de 0,45 µm nailon amb una xeringa i es va preservar en una cambra de refrigeració (Window Celaya, Barcelona) fins a la quantificació AGCC.

Els extractes d'AGCC de totes les mostres es van injectar a un cromatògraf 7890A GC System d'Agilent Technologies™ a través de la columna DB – FFAP (J&W, Agilent). Aquesta tècnica analítica consisteix a volatilitzar la mostra i fer-la passar juntament un gas a través d'una columna cromatogràfica a altes temperatures per tal de separar els diferents components a determinar. Les dades es van processar mitjançant el programari d'Agilent Technologies™, ChemStation™. Les especificacions de l'equip van ser:

- Columna: 30mx0,25mx0,25µm.
- Fase mòbil: gas heli (He)
- Xeringa 10 µL, injecció 1 µL. Split 1:100
- Temperatura de l'injector: 250 °C.
- Temperatura del detector (FID): 257 °C
- Flux d'He: 1 mL/min.
- Flux d'aire: 350 mL/min.
- Flux d'H2: 35 mL/min
- Make up: N2 25 mL/min
- Temps d'anàlisi: 14,5 min

- Temperatura del forn: 90 °C, (hold time 0); 15 °C/min fins 150 °C (hold time 0); 5° C/min fins 170 °C (hold time 0); 20° C/min fins 240° C (hold time 3 minuts)

3.2.5. EXTRACCIÓ D'ADN

L'objectiu d'aquesta operació és separar l'ADN de l'interior de les cèl·lules bacterianes, d'altres continguts cel·lulars com membranes biològiques i orgànuls per a la posterior anàlisi per qPCR. Per a l'extracció s'utilitza el kit comercial QIAamp® PowerFecal® Pro DNA Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanya).

Primerament, es va procedir a la liofilització de les mostres (Telstar, Terrassa, Espanya). A continuació, es va procedir a seguir els passos marcats per el protocol del kit comercial QIAamp® PowerFecal® Pro DNA Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanya) (figura 8). El protocol inclou procediments de lisi, centrifugació i filtrat i reactius com tampons de lisi i elució, detergents i solucions d'adhesió. Els equips necessaris van ser una centrifuga 5424R (Eppendorf ®, Hamburg, Alemanya) i un termoblock confort (Eppendorf ®, Hamburg, Alemanya). Com a producte final es va obtenir una solució d'ADN de 100 µL que es va congelar a -20 °C.

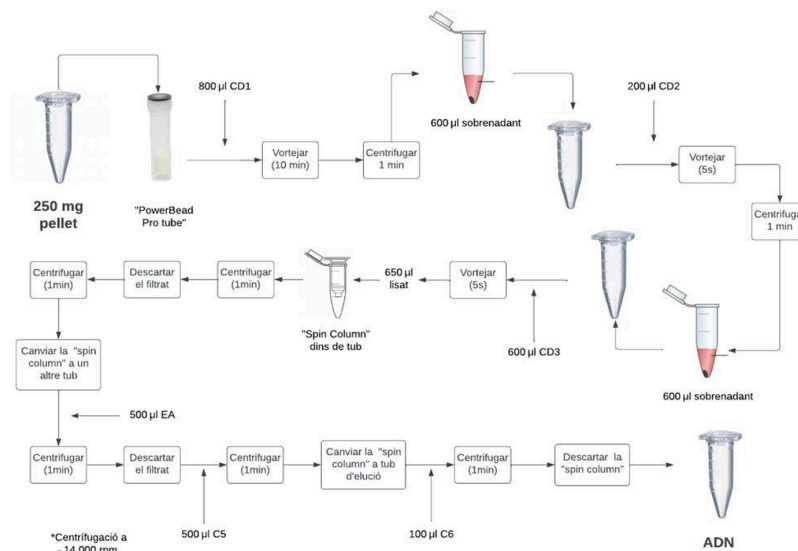


Figura 8.- Protocol d'extracció d'ADN segons QIAamp® PowerFecal® Pro DNA Kit.

3.2.6. QUANTIFICACIÓ DE POBLACIONS BACTERIANES

El mètode triat per a determinar quantitativament les diferents poblacions bacterianes d'interés va ser el Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR). La qPCR és una variant de la PCR tradicional que permet, en temps real, no només conèixer si un determinat gen s'expressa sota certes condicions, sinó estimar la quantitat relativa en què s'expressa l'esmentat gen. Això es fa calculant l'expressió del gen d'interés en relació amb un gen estructural o housekeeping gene. D'aquesta manera, a més a més, la qPCR ens permet estimar indirectament la quantitat de cadascuna d'aquestes poblacions bacterianes. L'anàlisi es va fer de manera individual per cadascuna de les poblacions d'interés, utilitzant encebadors, també específics, que amplifiquen regions determinades i molècules de fluorescència que s'intercalen a la doble hèlix d'ADN com el SYBR® green i que permeten la seua detecció i quantificació.

La placa de PCR es va carregar amb cadascuna de les mostres d'ADN, els encebadors anversos i reversos (IDT, Coralville, EE.UU) de les poblacions bacterianes a estudiar (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Bacteroidaceae*, *Enterobacteriaceae* i *Eubacteria*) i l'enzim de fluorescència SYBR® green (Applied Biosystems®, Waltham, EE.UU). En concret, amb *Eubacteria* es va amplificar l'esmentat gen estructural o Housekeeping, molt conservat evolutivament i que va permetre la quantificació relativa de la resta de poblacions. Per últim, aquesta placa, es va introduir i analitzar a l'equip de qPCR: CFX96 (Bio-Rad, Hercules, EE.UU).

L'equip de qPCR funciona realitzant una sèrie de 40 cicles seqüencials en què la temperatura es modifica per afavorir primer la desnaturalització i separació de les dues cadenes d'ADN, permetre després la unió dels encebadors a les seqüències d'interés i finalment ajudar a la síntesi o elongació de les noves cadenes. La temperatura, en particular d'elongació, va ser també específica dels encebadors de cadascuna de les poblacions (Taula 6).

Taula 6.- Seqüència i temperatura d'alineament utilitzada per a determinar les espècies de població microbiana.

Població microbiana	Cebador	Seqüència (5'-3')	T° d'alineament
<i>Firmicutes</i>	FIR-F	GGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCA	60°C
	FIR-R	AGCTGACGACAACCATGCAC	
<i>Bacteroidetes</i>	BACTE-F	GGAACATGTGGTTTAATTCGATGAT	60°C
	BACTE-R	AGCTGACGACAACCATGCAG	
<i>Bifidobacterium</i>	BIF-F	TCGCGTCYGGTGTGAAAG	63°C
	BIF-R	CCACATCCAGCRTCCAC	
<i>Enterococcus</i>	ENT-F	CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT	61°C
	ENT-R	ACTCGTTGTACTTCCCATTGT	
<i>Lactobacillus</i>	LAC-F	AGCAGTAGGGAATCTTCC	61°C
	LAC-R	CACCGCTACACATGGAG	
<i>Bacteroidaceae</i>	BAC-F	GGTGTCGGCTTAAGTGCCAT	61°C
	BAC-R	CGGAYGTAAGGGCCGTGC	
<i>Enterobacteriaceae</i>	ent-F	CATGACGTTACCCGCAGAAGAAG	61°C
	ent-R	CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	
<i>Clostridium</i>	CLO-F	CGCATAACGTTGAAAGATGG	56°C
	CLO-R	CCTTGGTAGGCCGTTACCC	
<i>Eubacteria</i>	EUB-F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	56°C
	EUB-R	ATTACCGCGGCTGCTGG	

Al llarg dels diferents cicles i en proporció a la presència d'ADN de la població bacteriana a analitzar, la polimerasa treballa amplificant exponencialment el gen a quantificar. L'amplificació es detecta per la quantitat de fluorescència que s'uneix a aquesta regió de manera específica. Si la quantitat inicial de l'ADN objectiu és més alta, l'amplificació es detecta en un nombre menor de cicles. En concret, el paràmetre llindar de cicle (C_t), mesura això, la quantitat mínima de fluorescència detectada per quantitat de cicles. C_t més baixos, per exemple, indicarien una quantitat superior d'ADN en la mostra original.

Els valors de Ct de totes les mostres i del gen estructural d'Eubacteria, es van utilitzar en el càlcul de $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, que és un valor de l'expressió dels gens analitzats i indirectament de la presència de les poblacions bacterianes. Per tal d'avaluar les diferents fluctuacions en la nostra particular microbiota, es van emprar les mostres de matèria fecal com a blanc de referència (100%). Així, es van poder comparar amb els resultats de les mostres d'extractes de fibra d'algues i establir quins han estat els canvis (proliferació, inhibició o sense canvis) en totes les poblacions sobre el 100%.

3.2.7. ESTADÍSTICA

Es van realitzar deu repeticions per a cada digestió colònica *in vitro*. Els resultats de pH i àcids grassos de cadena curta es van expressar amb la mitjana i la desviació estàndard. En el cas de les qPCR els resultats es van expressar comparant el valor de " $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ " dels extractes, amb el blanc de suspensió fecal. Sobre aquest blanc, que representava el 100% de les diferents poblacions bacterianes, es van calcular les variacions percentuals de tots els extractes. Un cop es van obtenir tots els resultats es van analitzar amb el programa estadístic Statgraphics Plus v.5.1. per a Windows (Statistical Graphics Co., Rockville, Md). Es va realitzar l'anàlisi de variància (ANOVA) per a la comparació de les dades obtingudes amb un nivell de significació del 95 %. Alhora, es van realitzar proves de rang múltiple per tal d'identificar diferències significatives entre les mitjanes obtingudes, seguint el criteri de la mínima diferència significativa (Least Significant Difference – LSD).

4. RESULTATS I DISCUSIÓ

4.1. pH

La reducció del pH està directament relacionada amb l'activitat de la microbiota i els seus processos metabòlics durant la fermentació colònica de les fibres (Li et al., 2021).

En la determinació del pH de les mostres després de 48 hores de fermentació, els extractes amb un menor pH van ser el λ -carragenat de baixa viscositat (λ CB), el k-carragenat (KC) i el *i*-carragenat, amb uns valor de $6,252 \pm 0,176$; $6,346 \pm 0,161$; $6,378 \pm 0,238$ respectivament. L'extracte d'alginat (AFA), va ser el que va presentar el valor més gran de pH que va ser de $6,962 \pm 0,081$. La mostra de λ -carragenat d'alta viscositat (λ CA) i la mostra d'alginat HPP no van mostrar diferències entre elles presentant uns valors al voltant de 6,500 (Figura 9).

Es pot veure gran variació entre una mostra i altra, però segons Clifton and Topping (2001), els valors normals després d'haver-se produït una fermentació colònica, són d'uns pHs d'entre 6,14 i 6,87. Així doncs, els valors obtinguts per les mostres són dins els valors normals exceptuant el pH de l'alginat AFA, el qual és superior.

Aquesta variació pot ser degut a la influència d'alguns components dietètics com per exemple el Calci, els quals poden modificar el pH fent que aquest tingui una variació més alta o, es mantingui més estable (Clifton and Topping, 2001). En aquest cas, la diversitat de mètodes d'extracció utilitzats en les diferents mostres, podria haver arrossegat més o menys compostos que podrien estar actuant de tampó en la variació de pH.

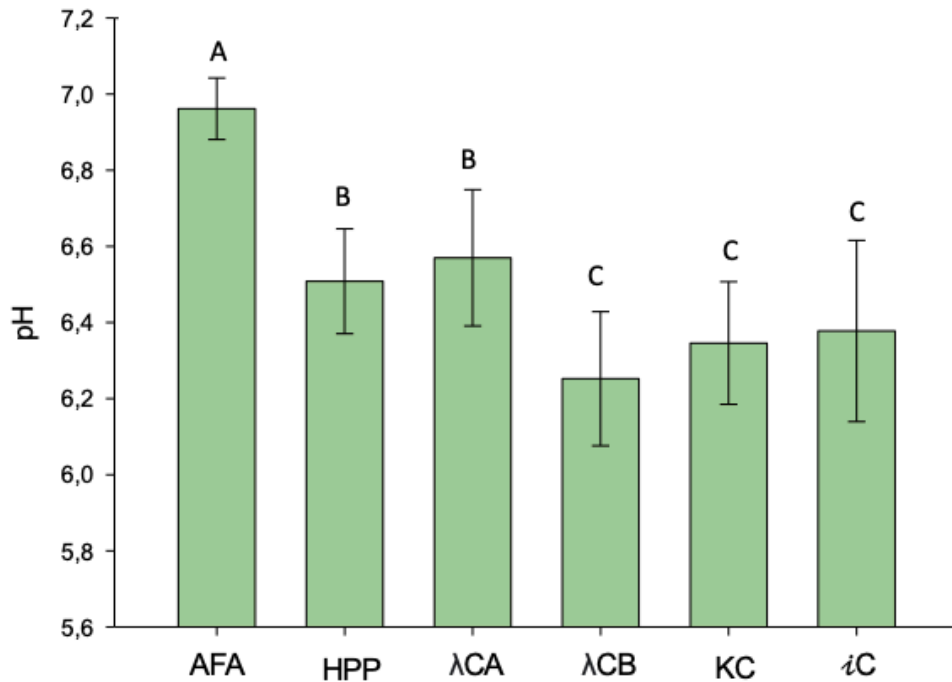


Figura 9.- Resultats de pH per a cada extracte d'alga després de la digestió colònica de les fibres: λ-carragenat d'alta viscositat (λCA), λ-carragenat de baixa viscositat (λCB), k-carragenat (KC), *i*-carragenat (*i*C), alginat (AFA), alginat (HPP). Resultats expressats com a mitjana ± desviació estàndard.

4.2. ÀCIDS GRASSOS DE CADENA CURTA (AGCC)

Com ja s'ha esmentat anteriorment, els àcids grassos de cadena curta són un dels principals metabòlits produïts en la digestió colònica de la fibra.

El total d'AGCC produïts en la fermentació de l'alginat AFA va ser de 46,670 mM i per a l'alginat HPP de 43,150 mM. Pel que fa a les mostres de carragenats, la quantitat d'AGCC totals han mostrat uns valors que oscil·len entre 18,992 mM i 24,031 mM. En alguns estudis relacionats amb la digestió colònica de diferents fibres, com el de Ramnani et al. (2012) i Zhang et al. (2020), es va observar un augment de la producció d'aquests compostos respecte a les digestions colòniques sense fibra. Aquest fet demostra que la microbiota utilitza la fibra aportada en la dieta per al seu metabolisme, donant com a components secundaris aquests AGCC entre d'altres components. Tots els valors són significativament més alts que la mostra control sense fibra.

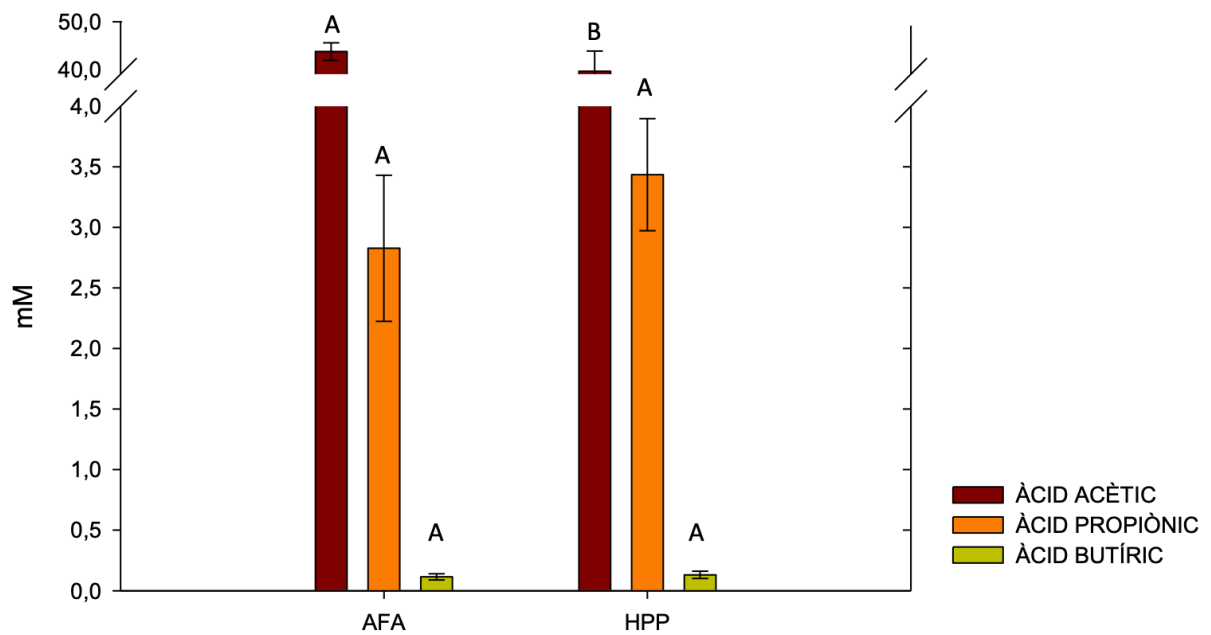


Figura 10.- Resultats de la producció d'àcids grassos de cadena curta (AGCC) per a extractes d'alginsats després de la digestió colònica de les fibres: alginat (AFA), alginat (HPP). Resultats expressats com a mitjana \pm desviació estàndard.

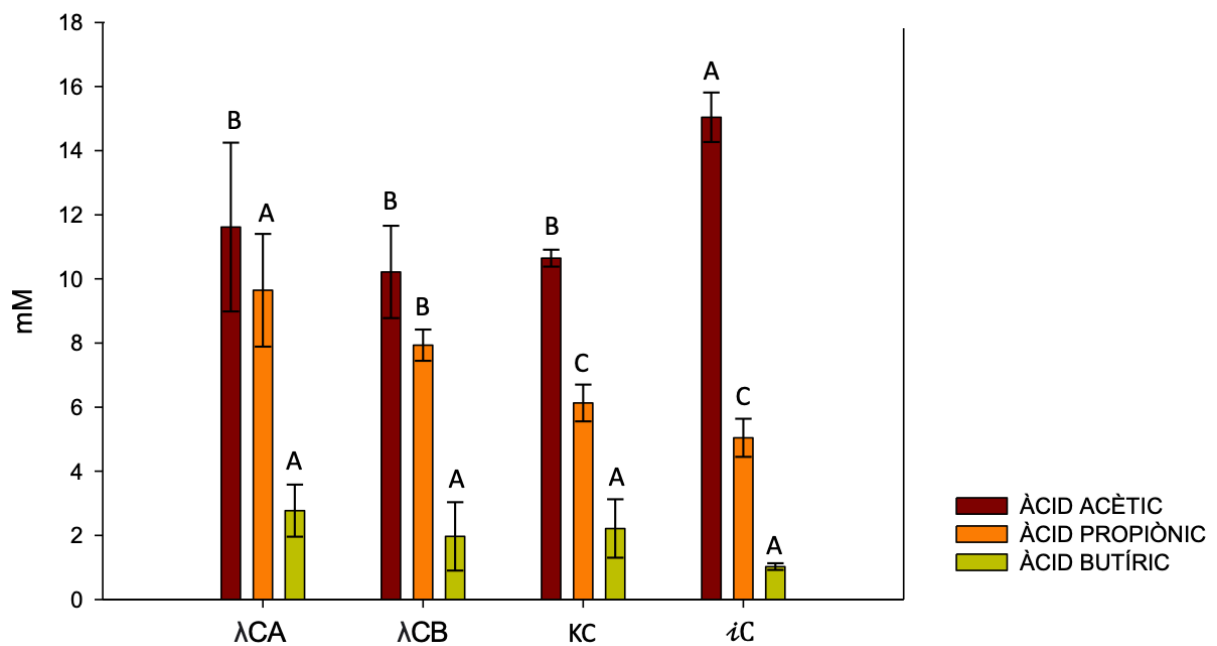


Figura 11.- Resultats de la producció d'àcids grassos de cadena curta (AGCC) per a extractes de carragenats després de la digestió colònica de les fibres: λ-carragenat d'alta viscositat (λCA), λ-carragenat de baixa viscositat (λCB), k-carragenat (KC), i-carragenat (iC). Resultats expressats com a mitjana \pm desviació estàndard.

L'àcid acètic, pot ser metabolitzat en teixits perifèrics, proporcionant energia o, ser utilitzat a nivell hepàtic per a la síntesi d'àcids grassos de cadena llarga o cossos cetònics (Cui and Xie, 2023). Com es pot veure en les Figures 10 i 11 aquest àcid gras de cadena curta es va trobar en major quantitat després de la metabolització de la fibra dietètica per part de la microbiota. Els resultats van mostrar, un valor major per a l'àcid acètic en l'alginat (AFA), corresponent a $43,738 \pm 1,829$ mM. Pel que fa a l'extracte amb una menor proporció d'àcid acètic, van ser el λ -carragenat d'alta viscositat (λ CA), el λ -carragenat de baixa viscositat (λ CB) i el k-carragenat amb uns valors al voltant de 11,000 mM. Dins el grup d'extractes d'alginats, es van observar diferències significatives entre els dos tipus d'extractes, essent l'alginat AFA, l'extracte amb major producció d'àcid acètic. Dins el grup de carragenats, el *i*-carragenat, va ser l'extracte amb major producció i no es van mostrar diferències entre els altres tipus de carragenats.

Pel que fa a l'àcid propiònic, aquest àcid gras de cadena curta es metabolitza a nivell hepàtic i pot servir com a precursor de síntesi hidrocarbonada i lipídica. Es van mostrar diferències significatives entre algues en la producció d'àcid propiònic. L'extracte que va presentar un valor major d'aquest AGCC va ser el λ -carragenat d'alta viscositat (λ CA), amb una quantitat de $9,646 \pm 1,757$ mM. Pel que fa als extractes amb una menor proporció d'àcid propiònic, van ser els alginats HPP i AFA, amb unes quantitats al voltant de 3,000 mM. Dins el grup d'extractes d'alginats, no van mostrar diferències entre mostres. Dins del grup de carragenats, no es van veure diferències entre els carragenats *i*C i KC, donant els valors més petits (Figura 10; Figura 11).

Per últim, l'àcid butíric es metabolitza als enteròcits, constituint una magnífica font energètica per la mucosa colònica especialment distal i regulant el metabolisme d'àcids nucleics en aquestes cèl·lules, essent l'àcid gras de cadena curta més important a nivell de salut colònica. L'extracte que va presentar major quantitat d'àcid butíric, va ser el λ -carragenat d'alta viscositat (λ CA), donant un valor de $2,771 \pm 0,814$ mM. I l'extracte amb menor quantitat d'àcid butíric

determinat va ser l'alginat AFA amb $0,115 \pm 0,025$ mM. Pel que fa a la producció d'àcid butíric, es van mostrar diferències entre els dos tipus d'algues, però no entre extractes de la mateixa alga (Figura 10; Figura 11).

En l'estudi de Ramnani et al. (2011), on es van fermentar *in vitro* diferents polisacàrids entre ells extractes d'alginat, van obtenir quantitats similars de producció d'AGCC a les obtingudes en el nostre estudi. En els resultats de l'estudi de Ferguson and Jones (2000), van observar una menor producció d'AGCC en les mostres de carragenats, després de simular la fermentació colònica *in vitro*, respecte a altres tipus de polisacàrids com la pectina o la cel·lulosa, els quals coincideixen amb els resultats del nostre estudi.

Tot i que alguns estudis com el de Li et al. (2021) relacionen la major baixada de pH amb una major producció d'AGCC, en el nostre estudi no es va observar aquesta relació. La mostra d'alginat (AFA), va ser la mostra amb menor baixada de pH i la que va presentar una major producció d'AGCC va mostrar. Es va observar el comportament oposat en les mostres de carragenats. Això pot estar relacionat amb la diferent puresa de les mostres, ja que les mostres d'alginats que no són pures poden contenir compostos secundaris que afectin a la fermentabilitat de les fibres i al seu comportament.

4.3. VARIACIÓ DE LA MICROBIOTA

La diversitat de la microbiota i la relació entre microorganismes és clau per a la salut de l'intestí i del nostre organisme en general. Moltes patologies digestives venen donades per l'alteració de la microbiota en l'intestí, produïnt disbiosi o sobrecreixement, on un o varis organismes predominen sobre els altres i/o es produeix la presència de microorganismes diferents a la que existeix habitualment (Magne et al., 2020).

Taxonòmicament parlant, més del 90% dels microorganismes presents en l'intestí, pertanyen a 2 de les 70 branques filogèniques existents del domini *Bacteria*: *Bacteroidetes* i *Firmicutes*. La proporció en que aquests microorganismes apareixen en l'intestí, ha estat demostrada que pot ésser acompanyada d'algun tipus de malalties. Quant més alt és la ratio *Firmicutes*/*Bacteroidetes*, més relacionat i acompanyat de malalties està, com per exemple la obesitat (Čoklo et al., 2020; Magne et al., 2020). En la Figura 12, es representa la ratio entre les poblacions de *Bacteroidetes* i *Firmicutes*. En la mostra sense fibra, considerada com el blanc, es va determinar un ratio de 0,996. En totes les mostres d'extractes d'alginats i carragenats, es va detectar una ratio menor al blanc, essent aquestes ratios d'uns valors que oscil·len entre 0,385 per al *i*-carragenat i un valor de 0,107 per a l'alginat AFA. Cal destacar el valor de 0,761 per a l'alginat HPP que va mostrar un valor bastant més alt respecte als altres. Per tant, la ratio *Firmicutes*/*Bacteroidetes* en tots els extractes, denota una millora respecte al blanc.

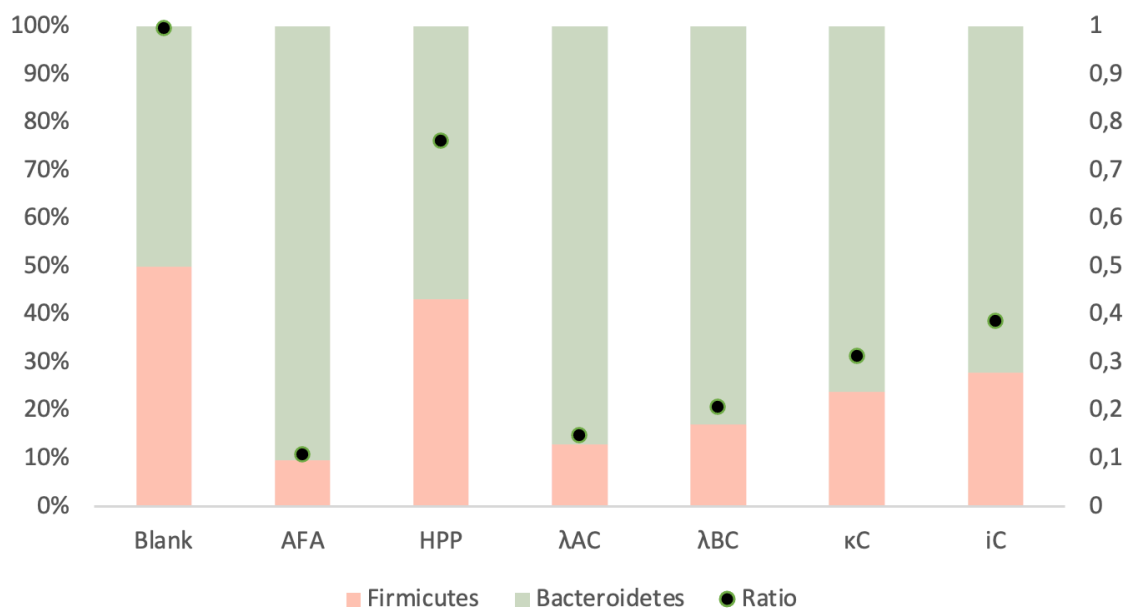


Figura 12.- Ratio *Firmicutes*/*Bacteroidetes*. Es mostra la proporció de població dels dominis de *Firmicutes* i *Bacteroidetes* en les columnes apilades i es mostra el ratio en format de punt per als diferents extractes d'alga i el blanc. Els resultats estan expressats segons la proporció relativa en % trobada pel mètode " $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ ".

En el grup de carragenats, es destaquen diferències en l'estructura en funció del nombre de sulfatacions. Per al λ -carragenat d'alta viscositat (λ CA) i el λ -carragenat de baixa viscositat (λ CB), trobem tres grups sulfats. Per al *i*-carragenat, trobem dos grups sulfats. Per al k-carragenat, trobem un grup sulfat. Els grups sulfat, posseeixen una certa toxicitat sobre la microbiota (Joanne, 2012). En els estudis de Tobacman (2012) i Yin et al. (2021) es posa en dubte la seguretat de l'ús de carragenats en la formulació d'aliments. Aquests autors conclouen que durant la fermentació colònica d'aquests tipus d'algues es produeix una reducció de la població bacteriana i s'observa una inflamació intestinal. Aquests resultats concorden amb els resultats obtinguts en el nostre estudi.

Com es pot veure a la Figura 13, l'extracte amb major número de sulfatacions és el que va presentar una menor proporció de població microbiana degut a la seva major toxicitat. De fet, el λ -carragenat d'alta viscositat (λ CA) va mostrar una reducció del 41% de la població microbiana respecte a la mostra sense fibra, mentre que per al λ -carragenat de baixa viscositat (λ CB) el resultat va ser d'una reducció del 52%. En els extractes de k-carragenat (KC) i *i*-carragenat (*i*C) la reducció va ser del 15% i 16% de la població, respectivament.

Estudis recents destaquen que la població microbiana al còlon, és capaç de degradar l'alginat, augmentant la producció d'àcids grassos de cadena curta però, no es destaca un increment de la població microbiana al fermentar extractes d'alginat, i en alguns casos, la població inclús disminueix (Cherry et al., 2019).

En el nostre estudi, la població microbiana relativa en percentatge respecte a la fermentació sense fibra, es va reduir un 38% per a l'alginat (AFA). Per a l'alginat (HPP), aquesta reducció va ser d'un 74% respecte al blanc (Figura 13). Com es pot observar en la Figura 13, en la mostra d'alginat (HPP), ha estat sotmesa a un pretractament a altes presions que ha arrossegat además de la fibra, altres

components sulfatats els quals han actuat d'inhibidors per al creixement microbià. En concordància amb Álvarez and Plaza (2022), van concloure que la presència de components sulfatats limiten la fermentabilitat de la fibra per part de la microbiota i incrementen la toxicitat.

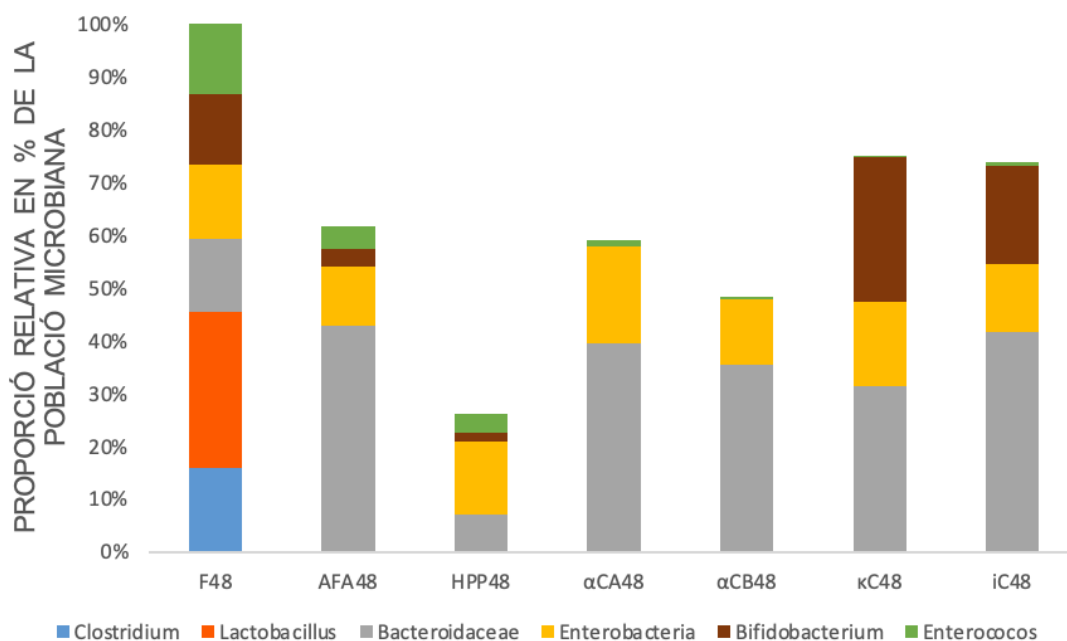


Figura 13.- Perfil microbià. Proporció relativa de microbiota en cada extracte segons la quantitat trobada per a les poblacions de *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bacteroidaceae*, *Enterobacteria*, *Bifidobacterium* i *Enterococos*. Els resultats s'expressen segons la proporció relativa en % respecte al blanc, trobada pel mètode "2^{-ΔΔCT}".

El gènere *Lactobacillus*, va disminuir un 100% la població respecte al blanc per a totes les mostres de carragenat (Figura 13). És a dir, aquest tipus de microorganismes ha desaparegut completament. Per a *Bifidobacterium*, hi va haver una disminució del 100% respecte al blanc en les mostres de λ-carragenat de baixa viscositat (λCB) i de λ-carragenat d'alta viscositat (λCA). Per una altra banda, es va donar un augment del 14% en el κ-carragenat i un augment del 6% en el i-carragenat per a aquest gènere. La baixada de microorganismes probiòtics com poden ser *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* en els extractes de carragenats, pot ser deguda a l'estructura d'aquest tipus de polisacàrids. De fet, alguns estudis que han demostrat que extractes de carragenats presenten un

efecte tòxic i perjudicial per a algun tipus de cèl·lules intestinals, promouen inclús el càncer colorectal (Joanne 2012; Wang et al., 2022). En l'estudi de Cinquin et al. (2004) es va demostrar una disminució en la població de *Lactobacillus* i un augment en la població de *Bifidobacterium* després de simular la fermentació colònica *in vitro*, coincidint amb els resultats obtinguts en el nostre estudi en les mostres de *i*-carragenat i k-carragenat. La població microbiana relativa de *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* respecte a la fermentació sense fibra, per a les mostres d'alginat, ha estat d'una disminució del 100% (Figura 13).

Estudis *in vivo* destaquen que els microorganismes *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* no són capaços de fermentar l'alginat possiblement degut a la seva complexa estructura. També s'observa que l'alginat no posseeix un efecte prebiòtic en comparació amb altres tipus de fibres com podria ser *Gelidium*. Es destaca també la possibilitat de que degut a la complexa estructura dels polisacàrids d'alginat, aquests no afavoreixin l'alimentació de cap microorganisme en concret, induïnt gran quantitat de interaccions i donant un creixement equitatiu fent que cap grup específic de microorganismes destaquí sobre els altres. Per últim, a pesar d'aquest poc creixement en la població de probiòtics, es pot dir que l'alginat sí és fermentable per la microbiota, ja que s'observa un augment de la producció d'àcids grassos de cadena curta (Ramnani et al., 2012).

Les mostres amb major producció d'AGCC, estan relacionades amb majors quantitats de població microbiana i, a la vegada, amb major quantitat de població de microorganismes beneficiosos respecte a microorganismes no beneficiosos. No es va observar aquest comportament en la majoria de mostres en el nostre estudi. En el cas de l'alginat (AFA), sí es va observar una major producció d'AGCC i un millor manteniment de la proporció relativa de la microbiota. En el cas de l'alginat (HPP), tot i tenir una molt bona producció d'AGCC, no es va mostrar un bon manteniment de la població microbiana. Per últim, en el cas dels carragenats, tot i no tenir tant bona producció d'AGCC, el perfil microbià va ser

en alguns casos millor que en les mostres d'alginat. Tot i que en les mostres de k-carragenat i *i*-carragenat, es va mantenir la població de *Bifidobacterium* respecte al blanc, la qual, hauria d'estimular la producció d'AGCC al ser un microorganisme considerat com a beneficiós, aquest fet no es va observar en el nostre estudi.

Cal destacar que la població de *Enterobacteria* va ser l'única població que es va mantenir en la mateixa proporció en quasi totes les mostres respecte a la mostra sense fibra, fins i tot, va augmentar en alguns casos. A part, destacar també que els extractes de k-carragenat (KC) i *i*-carragenat (*i*C) van ser els dos extractes que van mostrar comportaments més similars en quant a perfil microbià (Figura 13).

Per últim, es va estudiar la proporció relativa del gènere *Clostridium* respecte al blanc després de les 48 hores de fermentació. Els *Clostridium* és un gènere que no interessa que es mantingui al còlon, ja que s'ha demostrat que molts microorganismes que pertanyen a aquest grup, com *C. perfringens* per exemple, són perjudicials per a la salut. Per a totes les mostres, el *Clostridium* va disminuir un 100% respecte a la fermentació sense fibra. És a dir, es va eliminar completament aquest gènere de microorganismes (Figura13).

5. CONCLUSIÓ

Pel que fa a la variació de pH després de les fermentacions *in vitro*, totes les mostres, exceptuant la mostra d'alginat AFA, van mostrar una baixada significativa del pH.

Relacionat amb la producció d'àcids grassos de cadena curta (AGCC), les mostres d'alginat van mostrar una producció total d'AGCC bastant superior a les mostres de carragenats. D'altra banda, en la producció d'àcid butíric, l'AGCC més important per a la salut colònica, va ser més alta en les mostres de carragenats que en les mostres d'alginat.

Els resultats de l'estudi van mostrar per a tots dos tipus d'extractes d'algues, una baixada en la proporció relativa de població microbiana respecte a les mostres sense fibra. Aquesta reducció significativa de població microbiana total, coincideix amb una reducció significativa de la població de *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, fet considerat negatiu ja que són poblacions considerades com a beneficioses per a l'organisme. La població de *Clostridium*, també es va veure reduïda a zero, el que es va considerar positiu degut a la relació d'aquesta població amb efectes negatius en l'organisme.

Comparant les dos mostres d'alginat, l'alginat AFA és el que va mostrar una menor reducció en la població microbiana i va tenir un molt millor ratio *Firmicutes*/*Bacteroidetes*. Aixó demostra que el pretractament a altes presions en l'obtenció dels extractes d'alginat afavoreix la presència de components indesitjables.

Entre les quatre mostres de carragenats, el *i*-carragenat va ser el que més va conservar la població microbiana, mantenint una bona proporció del gènere *Bifidobacterium* i presentant un bon ratio *Firmicutes*/*Bacteroidetes*. A més, durant la fermentació d'aquests extractes es va produir una reducció significativa del pH i una alta producció d'AGCC.

De tots els extractes analitzats, el que més podria millorar la salut colònica seria el *i*-carragenat, ja que té una millor baixada de pH, i té un millor manteniment de la població microbiana tot mantenint una bona proporció del gènere *Bifidobacterium*.

Per tant, cal continuar buscant nous ingredients rics en fibra provinents de fonts marines, per a la seva avaluació i per al seu ús en formulació de nous aliments funcionals, tot millorant la salut colònica del consumidor.

6. BIBLIOGRAFÍA

- AACC, 2001. American Association of Cereal Chemists [WWW Document]. URL <https://www.omicsonline.org/societies/american-association-of-cereal-chemists-aacc/>
- Agudelo-Ochoa, G.M., Giraldo-Giraldo, N.A., Barrera-Causil, C.J., Valdés-Duque, B.E., Agudelo-Ochoa, G.M., Giraldo-Giraldo, N.A., Barrera-Causil, C.J., Valdés-Duque, B.E., 2016. Microbiota intestinal y ácidos grasos de cadena corta en pacientes críticos. *Perspectivas en Nutrición Humana* 18, 205–222. <https://doi.org/10.17533/UDEA.PENH.V18N2A06>
- Alae-Carew, C., Green, R., Stewart, C., Cook, B., Dangour, A.D., Scheelbeek, P.F.D., 2022. The role of plant-based alternative foods in sustainable and healthy food systems: Consumption trends in the UK. *Sci Total Environ* 807. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.151041>
- Álvarez, J., Fernández Real, J.M., Guarner, F., Gueimonde, M., Rodríguez, J.M., Saenz de Pipaon, M., Sanz, Y., 2021. Microbiota intestinal y salud. *Gastroenterol Hepatol* 44, 519–535. <https://doi.org/10.1016/J.GASTROHEP.2021.01.009>
- Álvarez-Mercado, A.I., Plaza-Díaz, J., 2022. Dietary Polysaccharides as Modulators of the Gut Microbiota Ecosystem: An Update on Their Impact on Health. *Nutrients* 14. <https://doi.org/10.3390/NU14194116>
- Biocodex Microbiota Institute, 2022. La microbiota intestinal | [WWW Document]. URL <https://www.biocodexmicrobiotainstitute.com/es/la-microbiota-intestinal>
- Brownlee, I.A., Allen, A., Pearson, J.P., Dettmar, P.W., Havler, M.E., Atherton, M.R., Onsøyen, E., 2005. Alginate as a source of dietary fiber. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45, 497–510. <https://doi.org/10.1080/10408390500285673>
- Cai, J., 2021. Global status of seaweed production, trade and utilization.
- Camino Martínez, 2016. Reformulación de panes y galletas de masa corta sin gluten: cambios en la reología de las masas y en la calidad de los productos [WWW Document]. URL

<https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/22459/Tesis1234-170303.pdf;jsessionid=3D26E7E3FBBFA205C1B8D37B13E992A4?sequence=1>

- Chávez, 2013. Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Rev Gastroenterol Mex* 78, 240–248. <https://doi.org/10.1016/J.RGMX.2013.04.004>
- Cherry, P., Yadav, S., Strain, C.R., Allsopp, P.J., Mcsorley, E.M., Ross, R.P., Stanton, C., 2019. Prebiotics from Seaweeds: An Ocean of Opportunity? *Mar Drugs* 17. <https://doi.org/10.3390/MD17060327>
- Cinquin, C., Le Blay, G., Fliss, I., Lacroix, C., 2004. Immobilization of infant fecal microbiota and utilization in an in vitro colonic fermentation model. *Microb Ecol* 48, 128–138. <https://doi.org/10.1007/S00248-003-2022-7/FIGURES/3>
- Clifton, P.M., Topping, D.L., 2001. Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* 81, 1031–1064. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.2001.81.3.1031/ASSET/IMAGES/LARGE/9J0310145003.JPEG>
- Čoklo, M., Maslov, D.R., Kraljević Pavelić, S., 2020. Modulation of gut microbiota in healthy rats after exposure to nutritional supplements. *Gut Microbes* 12, 1–28. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1779002>
- Cresci, G.A., Bawden, E., 2015. Gut Microbiome: What We Do and Don't Know. *Nutr Clin Pract* 30, 734–746. <https://doi.org/10.1177/0884533615609899>
- Cui, Xie, 2023. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre [WWW Document]. URL <https://www.sciencedirect.com/journal/bioactive-carbohydrates-and-dietary-fibre>
- da Costa, E., Domingues, P., Melo, T., Coelho, E., Pereira, R., Calado, R., Abreu, M.H., Domingues, M.R., 2019. Lipidomic Signatures Reveal Seasonal Shifts on the Relative Abundance of High-Valued Lipids from the Brown Algae *Fucus vesiculosus*. *Mar Drugs* 17. <https://doi.org/10.3390/MD17060335>
- Egea, C., 2021. Valor i composició nutricional de les algues. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

- Escudero, González, 2006. La fibra dietética [WWW Document]. URL https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112006000500007
- FAO, 2022. . FAO publications catalogue 2022 - Dietary Fiber. <https://doi.org/10.4060/CC2323EN>
- FAO, 2021. PERSPECTIVAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ALGAS MARINAS EN LOS PAÍSES EN DESARROLLO [WWW Document]. URL <https://www.fao.org/3/y3550s/Y3550S02.htm>.
- FAO, 2018. The future of food and agriculture. Alternative pathways to 2050. [WWW Document]. URL <https://www.fao.org/3/CA1553EN/ca1553en.pdf>.
- FAO, 2017. The future of food and agriculture and challenges.
- Fao, 2013. Food wastage footprint: Impacts on natural resources - Summary report.
- Ferguson, M.J., Jones, G.P., 2000. Production of short-chain fatty acids following in vitro fermentation of saccharides, saccharide esters, fructo-oligosaccharides, starches, modified starches and non-starch polysaccharides - Journal of the Science of Food and Agriculture [WWW Document]. URL [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000101\)80:1%3C166::AID-JSFA512%3E3.0.CO;2-K](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0010(20000101)80:1%3C166::AID-JSFA512%3E3.0.CO;2-K)
- Figuroa, J.M., Lombardo, M., Dogliotti, A., Flynn, L.P., Giugliano, R.P., Simonelli, G., Valentini, R., Ramos, A., Romano, P., Marcote, M., Michelini, A., Salvado, A., Sykora, E., Kniz, C., Kobelinsky, M., Salzberg, D., Jerusalinsky, D., Uchitel, O., Trial, C.-C.G., 2021. Efficacy of a nasal spray containing Iota-Carrageenan in the prophylaxis of COVID-19 in hospital personnel dedicated to patients care with COVID-19 disease A pragmatic multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial (CARR-COV-02). medRxiv 2021.04.13.21255409. <https://doi.org/10.1101/2021.04.13.21255409>
- Garnett, T., 2011. Where are the best opportunities for reducing greenhouse gas emissions in the food system (including the food chain)? Food Policy 36, S23–S32. <https://doi.org/10.1016/J.FOODPOL.2010.10.010>

- Garnett, T., al, al, al, 2013. Food sustainability: problems, perspectives and solutions. *Proceedings of the Nutrition Society* 72, 29–39. <https://doi.org/10.1017/S0029665112002947>
- Gidley, M.J., Yakubov, G.E., 2019. Functional categorisation of dietary fibre in foods: Beyond ‘soluble’ vs ‘insoluble.’ *Trends Food Sci Technol* 86, 563–568. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2018.12.006>
- Global Panel, 2016. Food systems and diets: Facing the challenges of the 21st century.
- Gomaa, E.Z., Antonie, van L., 2020. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review 113, 2019–2040. <https://doi.org/10.1007/S10482-020-01474-7>
- Gómez Ordóñez, E., Gómez Ordóñez, E., 2012. Evaluación nutricional y propiedades biológicas de algas marinas comestibles. Estudios “in vitro” e “in vivo.”
- Guan, Z.W., Yu, E.Z., Feng, Q., 2021. Soluble Dietary Fiber, One of the Most Important Nutrients for the Gut Microbiota. *Molecules* 26. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26226802>
- Holdt, S.L., Kraan, S., 2011. Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation. *J Appl Phycol* 23, 543–597. <https://doi.org/10.1007/S10811-010-9632-5>
- Joanne K. Tobacman, 2012. Review of Harmful Gastrointestinal Effects of Carrageenan in Animal Experiments.
- Keyimu, X.G., Abuduli, M., 2019. Seaweed Composition and Potential Uses. *Int J Chemtech Res* 12, 105–111. <https://doi.org/10.20902/IJCTR.2019.120112>
- Lattimer, J.M., Haub, M.D., 2010. Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. *Nutrients* 2, 1266–1289. <https://doi.org/10.3390/NU2121266>
- Li, Y., Li, T., Zhang, W., Fan, M., Zhang, K., Qian, H., Zhang, H., Qi, X., Wang, L., 2021. Comparison of Different Soluble Dietary Fibers during the in Vitro Fermentation Process. *J Agric Food Chem* 69, 7446–7457.

https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.1C00237/ASSET/IMAGES/LARGE/JF1C00237_0007.JPEG

- MacArtain, P., Gill, C.I.R., Brooks, M., Campbell, R., Rowland, I.R., 2007. Nutritional value of edible seaweeds. *Nutr Rev* 65, 535–543. <https://doi.org/10.1301/NR.2007.DEC.535-543>
- Magne, F., Gotteland, M., Gauthier, L., Zazueta, A., Pessoa, S., Navarrete, P., Balamurugan, R., 2020. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? *Nutrients* 12. <https://doi.org/10.3390/NU12051474>
- Mataix, J., al, al, al, al, 2002. Nutrición y alimentación humana. Situaciones fisiológicas y patológicas 820–833.
- McCleary, Prosky, 2000. Advanced Dietary Fibre Technology. *Advanced Dietary Fibre Technology*. <https://doi.org/10.1002/9780470999615>
- McClements, D.J., Grossmann, L., 2021. The science of plant-based foods: Constructing next-generation meat, fish, milk, and egg analogs. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 20, 4049–4100. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12771>
- Myers, K.F., Doran, P.T., Cook, J., Kotcher, J.E., Myers, T.A., 2021. Consensus revisited: Quantifying scientific agreement on climate change and climate expertise among Earth scientists 10 years later. *Environmental Research Letters* 16. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/AC2774>
- ONU, 2019. World Population Prospects 2019 Highlights.
- Padayachee, A., Day, L., Howell, K., Gidley, M.J., 2017. Complexity and health functionality of plant cell wall fibers from fruits and vegetables. *Crit Rev Food Sci Nutr* 57, 59–81. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.850652>
- Rajilić-Stojanović, M., de Vos, W.M., 2014. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev* 38, 996–1047. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12075>
- Ramnani, P., Chitarrari, R., Tuohy, K., Grant, J., Hotchkiss, S., Philp, K., Campbell, R., Gill, C., Rowland, I., 2012a. In vitro fermentation and prebiotic potential of novel low molecular weight polysaccharides derived from agar

- and alginate seaweeds. *Anaerobe* 18, 1–6.
<https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2011.08.003>
- Ramnani, P., Chitarrari, R., Tuohy, K., Grant, J., Hotchkiss, S., Philp, K., Campbell, R., Gill, C., Rowland, I., 2012b. In vitro fermentation and prebiotic potential of novel low molecular weight polysaccharides derived from agar and alginate seaweeds. *Anaerobe* 18, 1–6.
<https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2011.08.003>
- Ramnani, P., Chitarrari, R., Tuohy, K., Grant, J., Hotchkiss, S., Philp, K., Campbell, R., Gill, C., Rowland, I., 2011. Clinical microbiology In vitro fermentation and prebiotic potential of novel low molecular weight polysaccharides derived from agar and alginate seaweeds.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.08.003>
- Ścieszka, S., Klewicka, E., 2019. Algae in food: a general review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 59, 3538–3547. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1496319>
- SEDCA, 2019. Sociedad Española de Dietética y Ciencias de la Alimentación (S.E.D.C.A.) [WWW Document]. URL <https://nutricion.org/portfolio-item/fibra-%20dietetica/>.
- Shapira, M., 2016. Gut Microbiotas and Host Evolution: Scaling Up Symbiosis. *Trends Ecol Evol* 31, 539–549. <https://doi.org/10.1016/J.TREE.2016.03.006>
- Smith, P., Martino, D., Cai, Z., Gwary, D., Janzen, H., Kumar, P., McCarl, B., Ogle, S., O'Mara, F., Rice, C., Scholes, B., Sirotenko, O., Howden, M., McAllister, T., Pan, G., Romanenkov, V., Schneider, U., Towprayoon, S., Wattenbach, M., Smith, J., 2008. Greenhouse gas mitigation in agriculture. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363, 789–813. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2007.2184>
- Sweetit, 2020. Gelificantes: Carragenatos, Agar-Agar y pectinas - Sweetit Academy escuela de repostería y pastelería online [WWW Document]. URL <https://www.sweetit.es/blog/gelificantes-carragenatos-agar-agar-y-pectinas/>.

- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C.M., Knight, R., Gordon, J.I., 2007. The Human Microbiome Project. *Nature* 2007 449:7164–7169, 804–810. <https://doi.org/10.1038/nature06244>
- Wang, X., Fang, Y., Liang, W., Liang, M., Xu, L., Yu, J., 2022. IDDF2022-ABS-0253 Dietary additive carrageenan metabolized by human GUT microbiota and promoting colorectal cancer. *Gut* 71, A66–A66. <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2022-IDDF.79>
- Wells, M.L., Potin, P., Craigie, J.S., Raven, J.A., Merchant, S.S., Helliwell, K.E., Smith, A.G., Camire, M.E., Brawley, S.H., 2017. Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *J Appl Phycol* 29, 949–982. <https://doi.org/10.1007/S10811-016-0974-5>
- Yin, Y., Li, M., Gu, W., Zeng, B., Liu, W., Zhu, L., Pi, X., Primerano, D.A., Yu, H.D., Wei, H., Yu, G., Wang, X., 2021. Carrageenan oligosaccharides and associated carrageenan-degrading bacteria induce intestinal inflammation in germ-free mice. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2021.08.001>
- Yuan, H., Song, J., Li, X., Li, N., Dai, J., 2006. Immunomodulation and antitumor activity of kappa-carrageenan oligosaccharides. *Cancer Lett* 243, 228–234. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2005.11.032>
- Zaman, S.A., Sarbini, S.R., 2016. The potential of resistant starch as a prebiotic. *Crit Rev Biotechnol* 36, 578–584. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.993590>
- Zhang, X., Aweya, J.J., Huang, Z.X., Kang, Z.Y., Bai, Z.H., Li, K.H., He, X.T., Liu, Y., Chen, X.Q., Cheong, K.L., 2020. In vitro fermentation of *Gracilaria lemaneiformis* sulfated polysaccharides and its agaro-oligosaccharides by human fecal inocula and its impact on microbiota. *Carbohydr Polym* 234, 115894. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.115894>