



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

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE *AGAROPHYTON CHILENSIS*,
GIGARTINA SKOTTSBERGII, *PORPHYRA COLUMBINA* Y *ULVA*
RIGIDA PARA LA PRODUCCIÓN DE XILOOLIGOSACÁRIDOS A
PARTIR DE XILANO**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN
BIOTECNOLOGÍA E INGENIERO CIVIL QUÍMICO

NICOLÁS IGNACIO CARMONA RAMÍREZ

PROFESORA GUÍA:
MARÍA ORIANA SALAZAR AGUIRRE

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
LUCIANA SANTIBAÑEZ LEHUEDE
MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

SANTIAGO DE CHILE

2024

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE *AGAROPHYTON CHILENSIS*, *GIGARTINA SKOTTSBERGII*, *PORPHYRA COLUMBINA* Y *ULVA* *RIGIDA* PARA LA PRODUCCIÓN DE XILOOLIGOSACÁRIDOS A PARTIR DE XILANO

Los xilooligosacáridos (XOS) son cadenas de sacáridos con un grado de polimerización entre 2 y 6, conocidos por sus propiedades prebióticas. Se producen comúnmente a partir de biomasa lignocelulósica, que contiene alto porcentaje de lignina. Las algas son una posible nueva materia prima, ya que tienen menos lignina o incluso no la tienen, y no requieren de uso extensivo de suelo para cultivarlas. Por lo tanto, la extracción de xilano de alga para la producción de XOS podría ser una ventaja en comparación con la biomasa lignocelulósica.

Es en este contexto que se procede a evaluar la obtención de xilano a partir las hemicelulosas de *A. chilensis*, *G. skottsbergii*, *P. columbina* y *U. rigida*, algas rojas y verdes que crecen en las costas de Chile. Para ello se llevó a cabo la extracción de hemicelulosa, caracterización de la biomasa en término de sus componentes macromoleculares, y en particular, de sus azúcares estructurales principales (celulosa y xilano), caracterización de la hemicelulosa extraída, y finalmente, identificación y caracterización de XOS producidos.

La investigación muestra que *G. skottsbergii* tiene la mayor cantidad de xilano en su estructura (25,59%), pero *A. chilensis* y *U. rigida* tienen un mayor rendimiento en la recuperación de xilano en relación a la biomasa disponible, alrededor del 80%. El contenido de lignina en estas algas es bajo, comparado con la biomasa lignocelulósica, *G. skottsbergii* destaca por presentar un contenido de lignina de solo el 6,46%. Los contenidos de proteínas y cenizas son consistentes con resultados reportados en estudios anteriores.

Se comparó la extracción de xilooligosacáridos (XOS) utilizando un proceso convencional y otro con extracción previa de agar. Se demostró que la extracción de agar aumenta la disponibilidad enzimática del xilano y el rendimiento de XOS/biomasa, pero reduce el rendimiento de recuperación de xilano en relación con el xilano presente en la biomasa. Con base en lo mencionado, se recomienda usar una xilanasa de diferente, tal vez de origen marino.

Se logró identificar xilooligosacáridos con un grado de polimerización entre 2 y 6, derivados del xilano de alga, obteniendo rendimientos, en mg de XOS/g biomasa, de $9,07 \pm 0,9$ (*A. chilensis*), $5,8 \pm 2,0$ (*G. skottsbergii*), $3,55 \pm 0,31$ (*P. columbina*), $5,35 \pm 0,07$ (*U. rigida*), siendo estos rendimientos comparables a biomazas lignocelulósicas usadas en la industria poco eficientes.

A mi familia, amigos y amigas, pareja, y en especial a mi madre.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis profesoras, sobre a todo a la Profesora Oriana, por ser paciente y sabia a la hora de aconsejarme, guiarme y enseñarme, tanto en este trabajo de título, como cuando participé en sus cuerpos docentes, y a Luciana por enseñarme gran parte de lo que apliqué en este trabajo.

Agradezco a mi familia, tíos, abuelos, madre y padre, por ser el sustento material y emocional para que esto se llevara a cabo. A mis amigos y amigas por siempre ser fuente de apoyo, relajo y, muchas veces, consejo sabio. A mi pareja, Javiera, por estar ahí en mis mejores días y también en los peores.

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción	1
1.1. Antecedentes y Motivación	1
1.2. Marco Teórico	2
1.2.1. Algas: Pared Celular, Xilano y Especies en estudio	2
1.2.1.1. Generalidades, Estructura y Pared Celular	2
1.2.1.2. Origen, usos y composición de <i>Agarophyton chilensis</i> . .	4
1.2.1.3. Origen, usos y composición de <i>Gigartina skottsbergii</i> . .	6
1.2.1.4. Origen, usos y composición de <i>Porphyra columbina</i> . . .	7
1.2.1.5. Origen, usos y composición de <i>Ulva rigida</i>	8
1.2.2. Xilooligosacáricos: Rol, Extracción y Propiedades de Interés . . .	9
1.2.2.1. Materia lignocelulósica, xilano y tipos de xilano	9
1.2.2.2. Xilooligosacáridos y su estructura	13
1.2.2.3. Propiedades químicas y prebióticas de los XOS	13
1.2.2.4. Presencia de xilano en algas	14
1.2.2.5. Estrategias para la extracción de XOS	16
1.2.3. Agar: Estructura, extracción y relación con xilano	19
1.2.4. Producción, Industria y Mercado de los XOS	21
1.3. Objetivos	22
2. Metodología	23
2.1. Materiales	23
2.1.1. Algas	23
2.1.2. Reactivos y enzimas	23
2.1.3. Equipos	23
2.2. Metodología Experimental	24
2.2.1. Metodología experimental general	24

2.2.2.	Acondicionamiento de muestras	24
2.2.3.	Extracción de agar	25
2.2.4.	Pretratamiento alcalino y precipitación con etanol	25
2.2.5.	Análisis de azúcares reductores	26
2.2.6.	Hidrólisis ácida y determinación de lignina	27
2.2.7.	Caracterización de azúcares por HPLC	28
2.2.7.1.	Caracterización de azúcares estructurales	28
2.2.7.2.	Caracterización de XOS	29
2.2.8.	Determinación de cenizas	29
2.2.9.	Determinación de humedad	29
2.2.10.	Extracción y cuantificación de proteínas	30
3.	Resultados y Discusión	32
3.1.	Caracterización de Algas	32
3.1.1.	Humedad y evolución de la biomasa algal seca	32
3.1.2.	Porcentaje de cenizas	33
3.1.3.	Composición de lignina	34
3.1.4.	Composición de proteínas	35
3.1.5.	Caracterización de polisacáridos estructurales	35
3.1.6.	Análisis global: Caracterización de algas	39
3.2.	Efecto de las condiciones de extracción de hemicelulosa	39
3.2.1.	Composiciones de hemicelulosa extraída	40
3.2.2.	Rendimiento de xilano recuperado con respecto a xilano disponible en biomasa	44
3.2.3.	Digestibilidad de xilano extraído frente a la acción de enzima xilanasa	46
3.3.	Producción de XOS desde xilano de algas	52
3.3.1.	Identificación y cuantificación de XOS	52
3.3.2.	Rendimiento en la producción de XOS	54
3.3.3.	Análisis global: Producción de XOS	58
4.	Conclusiones, Recomendaciones y Proyecciones	62
4.1.	Conclusiones	62
4.2.	Proyecciones y recomendaciones	63
	Bibliografía	64
	Anexos	73
A.	Abreviaciones	73
B.	Reactivos y Equipos	74
B.1.	Reactivos	74
B.2.	Equipos	75
C.	Datos de hemicelulosa recuperadas posteriormente la tratamiento alcalino	76
C.1.	Para tratamiento alcalino	76
C.2.	Para tratamiento alcalino con previa extracción de agar	77

C.3.	Composición de xilano y celulosa en la hemicelulosa recuperada . . .	77
D.	Datos de la determinación de humedad	78
E.	Datos de la determinación del contenido de cenizas	80
F.	Datos, estándares y curvas de calibración de la cromatografía por intercambio iónico	81
F.1.	Caracterización de azúcares estructurales en la biomasa algal . . .	81
F.2.	Caracterización de hemicelulosa extraída	87
F.3.	Caracterización de XOS	99
G.	Datos y curva de calibración del ensayo DNS para la determinación de extremos reductores	104
H.	Datos y curva de calibración del análisis de lignina	110
I.	Datos y curva de calibración de la extracción y cuantificación de proteínas	114

ÍNDICE DE TABLAS

1.1.	Principales polisacáridos constituyentes de la pared celular de algas marinas [9, 10, 11].	3
1.2.	Composición bioquímica de <i>Agarophyton chilensis</i> (% peso seco) [17, 18]. .	6
1.3.	Composición bioquímica de <i>Gigartina chamissoi</i> (% peso seco) [18].	7
1.4.	Composición bioquímica de <i>Porphyra columbina</i> (% peso seco) [28, 29, 30, 31].	8
1.5.	Composición bioquímica de <i>Ulva rigida</i> (% peso seco) [39, 40, 41, 11].	9
1.6.	Tipos de xilano y sus características [2, 43, 44].	11
1.7.	Principales materias primas usadas para la obtención de XOS con sus composiciones porcentuales de celulosa (CEL), hemicelulosa (HEM), lignina (LIG), xilano (XIL), en g/100 g peso seco, y rendimiento de extracción de este último con respecto al xilano disponible [2, 43, 62].	21
3.1.	Humedad y masa seca porcentual con respecto a masa hidratada, medida en gramos divididos por gramos de masa algal húmeda.	32
3.2.	Composición de cenizas con respecto al peso seco. Medido en gramos de cenizas divididos por la biomasa algal seca.	34
3.3.	Composición de lignina soluble, lignina insoluble y lignina total con respecto al alga seca, medida en gramos de lignina divididos por gramos de biomasa algal seca.	34
3.4.	Composición de proteínas de algas en estudio. Medida en gramos de proteína con respecto a 100 gramos de biomasa algal seca.	35
3.5.	Relación xilano/celulosa en <i>A. chilensis</i> , <i>G. skottsbergii</i> , <i>P. columbina</i> y <i>U. rigida</i> , medida en gramos de xilano en la biomasa algal con respecto a los gramos de celulosa en la biomasa algal.	37

3.6.	Contenido porcentual de celulosa y xilano en la hemicelulosa extraída con previa extracción de agar y tratamiento alcalino a una concentración de 9 %p/v de NaOH. ND: No detectado. Medido en gramos de xilano o celulosa con respecto a gramos de hemicelulosa obtenida.	43
3.7.	Rendimiento de xilano extraído de algas con respecto a xilano disponible en biomasa. ND: No detectado. Medido en gramos de xilano recuperados versus gramos de xilano disponible en biomasa.	45
3.8.	Actividad asociada a la enzima. Medida en absorbancia a 550 nm.	50
3.9.	Masa de xilosa detectada tras la hidrólisis enzimática de hemicelulosa. Medida en miligramos de xilosa.	54
3.10.	Rendimientos esperados (REF) y experimentales para cada alga. Se reporta el rendimiento al trabajar con hemicelulosa no libre de agar (HEM) y hemicelulosa libre de agar (HEM-AGAR). Medido en miligramos de XOS producidos divididos por gramos de biomasa tratada.	57
3.11.	Parámetros relevantes en análisis de algas como fuente de xilano para producción de XOS a partir de hemicelulosa no libre de agar.	58
3.12.	Parámetros relevantes en análisis de algas como fuente de xilano para producción de XOS a partir de hemicelulosa libre de agar.	59
A.1.	Abreviaciones para la mejor comprensión de este documento.	73
B.1.	Reactivos e insumos usados durante la investigación.	74
B.2.	Equipos usados durante la investigación.	75
C.1.	Masa de hemicelulosa recuperada para distintas concentraciones de NaOH, y para cada alga en estudio. Medida en gramos.	76
C.2.	Masa de hemicelulosa recuperada para cada alga en estudio (con pretratamiento alcalino y extracción de agar). Medida en gramos.	77
C.3.	Contenido porcentual de celulosa y xilano en la hemicelulosa extraída con distintas concentraciones de NaOH. Medido en gramos de xilano o glucosa con respecto a gramos de hemicelulosa obtenida.	77
D.1.	Datos experimentales de la medición de humedad en gramos.	78
D.2.	Promedios de la medición de humedad en gramos.	78
D.3.	Errores asociados de la medición de humedad en gramos.	78
D.4.	Datos de humedad porcentual, medida en gramos de agua perdida dividida por gramos de biomasa húmeda.	79
D.5.	Error asociado a cada medición de humedad porcentual.	79
E.1.	Datos experimentales para la determinación del contenido de cenizas para cada alga. Medido en gramos.	80
F.1.	Datos para la caracterización de azúcares estructurales de <i>A. chilensis</i> . Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias. .	81
F.2.	Datos para la caracterización de azúcares estructurales de <i>G. skottsbergii</i> . Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.	81
F.3.	Datos para la caracterización de azúcares estructurales de <i>P. columbina</i> . Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.	82

F.4.	Datos para la caracterización de azúcares estructurales de <i>P. columbina</i> . Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.	82
F.5.	Promedios de los datos experimentales para la caracterización de azúcares estructurales de <i>A. chilensis</i> . Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.	83
F.6.	Promedios de los datos experimentales para la caracterización de azúcares estructurales de <i>A. chilensis</i> . Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.	83
F.7.	Promedios de los datos experimentales para la caracterización de azúcares estructurales de <i>P. columbina</i> . Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.	83
F.8.	Promedios de los datos experimentales para la caracterización de azúcares estructurales de <i>U. rigida</i> . Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.	83
F.9.	Error porcentual asociado a los promedios de los datos experimentales para la caracterización de azúcares estructurales de <i>A. chilensis</i> . Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.	84
F.10.	Error porcentual asociado a los promedios de los datos experimentales para la caracterización de azúcares estructurales de <i>G. skottsbergii</i> . Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.	84
F.11.	Error porcentual asociado a los promedios de los datos experimentales para la caracterización de azúcares estructurales de <i>P. columbina</i> . Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.	84
F.12.	Error porcentual asociado a los promedios de los datos experimentales para la caracterización de azúcares estructurales de <i>U. rigida</i> . Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.	84
F.13.	Estándares de tiempos de retención de xilosa, glucosa y arabinosa.	85
F.14.	Factores de conversión entre área del cromatograma y concentración de azúcares en mg/mL.	86
F.15.	Concentración detectada para cada alga.	87
F.16.	Factores de conversión entre azúcares monoméricos y su polímero correspondiente, unidades arbitrarias.	87
F.17.	Datos de la caracterización de hemicelulosa extraída de <i>A. chilensis</i> . Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.	88
F.18.	Datos de la caracterización de hemicelulosa extraída de <i>G. skottsbergii</i> . Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.	89
F.19.	Datos de la caracterización de hemicelulosa extraída de <i>P. columbina</i> . Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.	90
F.20.	Datos de la caracterización de hemicelulosa extraída de <i>U. rigida</i> . Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.	91
F.21.	Datos de la caracterización de hemicelulosa extraída (con previa extracción de agar) de <i>A. chilensis</i> , <i>G. skottsbergii</i> , <i>P. columbina</i> y <i>U. rigida</i> . Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.	92

F.22.	Promedios de los datos experimentales de la caracterización de hemicelulosa extraída de <i>A. chilensis</i> . Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.	93
F.23.	Promedios de los datos experimentales de la caracterización de hemicelulosa extraída de <i>G. skottsbergii</i> . Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.	93
F.24.	Promedios de los datos experimentales de la caracterización de hemicelulosa extraída de <i>P. columbina</i> . Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.	94
F.25.	Promedios de los datos experimentales de la caracterización de hemicelulosa extraída de <i>U. rigida</i> . Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.	94
F.26.	Errores asociados a los promedios de los datos experimentales de la caracterización de hemicelulosa extraída de <i>A. chilensis</i> . Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.	95
F.27.	Errores asociados a los promedios de los datos experimentales de la caracterización de hemicelulosa extraída de <i>G. skottsbergii</i> . Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.	95
F.28.	Errores asociados a los promedios de los datos experimentales de la caracterización de hemicelulosa extraída de <i>P. columbina</i> . Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.	96
F.29.	Errores asociados a los promedios de los datos experimentales de la caracterización de hemicelulosa extraída de <i>U. rigida</i> . Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.	96
F.30.	Promedios de los datos de la caracterización de hemicelulosa extraída (con previa extracción de agar) de <i>A. chilensis</i> , <i>G. skottsbergii</i> , <i>P. columbina</i> y <i>U. rigida</i> . Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.	97
F.31.	Errores porcentuales asociados a los promedios de los datos de la caracterización de hemicelulosa extraída (con previa extracción de agar) de <i>A. chilensis</i> , <i>G. skottsbergii</i> , <i>P. columbina</i> y <i>U. rigida</i> . Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.	97
F.32.	Concentraciones de azúcares estructurales en la hemicelulosa extraída identificados por cromatografía de intercambio iónico, medida en mg/mL.	98
F.33.	Concentraciones de azúcares estructurales en la hemicelulosa extraída (con previa extracción de agar) identificados por cromatografía de intercambio iónico, medida en mg/mL.	98
F.34.	Factores de conversión entre área y concentración en mg/mL, y tiempos de retención para cada XOS de grado de polimerización entre 1 y 6. Tiempo de retención medido en minutos.	99
F.35.	Datos de la caracterización de XOS obtenidos a partir de la hidrólisis de hemicelulosa sin extracción previa de agar. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.	99

F.36.	Datos de la caracterización de XOS obtenidos a partir de la hidrólisis de hemicelulosa con extracción previa de agar. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.	100
F.37.	Promedio de los datos experimentales de la caracterización de XOS obtenidos a partir de la hidrólisis de hemicelulosa sin extracción previa de agar. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias. . . .	101
F.38.	Promedio de los datos experimentales de la caracterización de XOS obtenidos a partir de la hidrólisis de hemicelulosa con extracción previa de agar. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.	101
F.39.	Error porcentual asociado a los promedio de los datos experimentales de la caracterización de XOS obtenidos a partir de la hidrólisis de hemicelulosa sin extracción previa de agar. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.	102
F.40.	Error porcentual asociado a los promedio de los datos experimentales de la caracterización de XOS obtenidos a partir de la hidrólisis de hemicelulosa con extracción previa de agar. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.	102
F.41.	Concentraciones de distintos XOS para las distintas algas. Concentración medida en mg/mL.	103
G.1.	Datos experimentales del ensayo DNS sobre la reacción enzimática hemicelulosa - xilanasa (2 horas de reacción), medición de absorbancia a 550 nm.	104
G.2.	Promedio de los datos experimentales del ensayo DNS sobre la reacción enzimática hemicelulosa - xilanasa (2 horas de reacción), medición de absorbancia a 550 nm.	104
G.3.	Error porcentual asociado del ensayo DNS sobre la reacción enzimática hemicelulosa - xilanasa (2 horas de reacción), medición de absorbancia a 550 nm.	105
G.4.	Datos experimentales del ensayo DNS sobre la reacción enzimática hemicelulosa - xilanasa (16 horas de reacción), medición de absorbancia a 550 nm.	105
G.5.	Promedio de los datos experimentales del ensayo DNS sobre la reacción enzimática hemicelulosa - xilanasa (16 horas de reacción), medición de absorbancia a 550 nm.	106
G.6.	Error porcentual asociado del ensayo DNS sobre la reacción enzimática hemicelulosa - xilanasa (16 horas de reacción), medición de absorbancia a 550 nm.	106
G.7.	Datos para la construcción de la curva de extremos reductores, medición de absorbancia a 550 nm.	107
G.8.	Datos para la construcción de la curva de calibración de extremos reductores con la respectiva concentración asociada en mg/mL, medición de absorbancia a 550 nm.	108

G.9.	Concentraciones de extremos reductores en las muestras con enzima (C_E) y muestras sin enzima (C_B) para cada alga en mg/mL con 2 horas de hidrólisis enzimática.	108
G.10.	Concentraciones de extremos reductores en las muestras con enzima (C_E) y muestras sin enzima (C_B) para cada alga en mg/mL con 16 horas de hidrólisis enzimática.	109
G.11.	Error absoluto asociados a las concentraciones de extremos reductores en las muestras con enzima (C_E) y muestras sin enzima (C_B) para cada alga en mg/mL con 2 horas de hidrólisis enzimática.	109
G.12.	Error absoluto asociados a las concentraciones de extremos reductores en las muestras con enzima (C_E) y muestras sin enzima (C_B) para cada alga en mg/mL con 16 horas de hidrólisis enzimática.	109
H.1.	Datos experimentales de la medición de lignina insoluble en gramos.	110
H.2.	Promedios de la medición de lignina insoluble en gramos.	110
H.3.	Errores asociados a los promedios de la medición de lignina insoluble en gramos.	110
H.4.	Datos experimentales de la medición de lignina soluble, medición de absorbancia en celdas de cuarzo a 205 nm.	111
H.5.	Promedios de la medición de lignina soluble, medición de absorbancia en celdas de cuarzo a 205 nm.	111
H.6.	Errores asociados a los promedios de la medición de lignina soluble, medición de absorbancia en celdas de cuarzo a 205 nm.	111
H.7.	Datos para la construcción de la curva de calibración de lignina soluble, medición de absorbancia en celdas de cuarzo a 205 nm.	112
H.8.	Datos para la construcción de la curva de calibración de lignina soluble con la respectiva concentración asociada en mg/mL, medición de absorbancia en celdas de cuarzo a 205 nm.	112
H.9.	Concentraciones de lignina soluble para cada alga en mg/mL.	113
I.1.	Datos experimentales de la cuantificación de proteínas, medición de absorbancia a 595 nm.	114
I.2.	Promedios de los datos de la cuantificación de proteínas, medición de absorbancia a 595 nm.	114
I.3.	Errores asociados a los datos de la cuantificación de proteínas, medición de absorbancia a 595 nm.	115
I.4.	Datos para la construcción de la curva de calibración de concentración de proteínas, medición de absorbancia a 595 nm.	115
I.5.	Datos para la construcción de la curva de calibración de proteínas mediante método de Bradford con la respectiva concentración asociada en mg/mL, medición de absorbancia a 595 nm.	116
I.6.	Concentraciones de proteínas para cada alga en mg/mL.	117
I.7.	Concentraciones de proteínas para cada alga en mg/mL, en consideración del rendimiento del método de extracción.	117

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

1.1.	Estructura de la pared celular algal [12].	4
1.2.	<i>A. chilensis</i> extraída del mar [16].	5
1.3.	<i>G. skottsbergii</i> en laboratorio [20].	6
1.4.	<i>Porphyra columbina</i> sobre roca en bajamar (izquierda) y herborizada (derecha) [27].	8
1.5.	<i>Ulva rigida</i> en fondo marino [35].	9
1.6.	Distintos tipos de xilano con respecto a los enlaces que forman [46].	12
1.7.	Distintos tipos de xilano con respecto a las sustituciones posibles de un esqueleto de xilano [47].	12
1.8.	Estructura y nombre de xilooligosacáridos desde grado de polimerización 1 a 6 [48].	13
1.9.	Otras algas en las que se ha reportado la obtención de XOS a partir de sus xilanos [57, 58].	16
1.10.	Producción química de XOS a partir de xilano [45].	17
1.11.	Producción enzimática de XOS a partir de xilano [45].	18
1.12.	Estructura de la molécula de agar [59].	20
1.13.	Precio y dosis recomendada de distintos alimentos con efecto prebiótico [65].	22
2.1.	Metodología experimental general. en los cuadros se indican los procedimientos y/o ensayos que se realizaron, mientras que en círculos se exhiben los productos y/o intermediarios.	24
2.2.	Metodología de extracción de proteínas.	30
3.1.	Evolución de masa algal seca durante el secado.	33
3.2.	Composición de celulosa y xilano de las algas estudiadas, medida en gramos de polímero con respecto a gramos de biomasa seca.	37

3.3.	Caracterización bioquímica de <i>A. chilensis</i> (AC), <i>G. skottsbergii</i> (GS), <i>P. columbina</i> (PC) y <i>U. rigida</i> (UR) en términos porcentuales. NI: No identificado. Medido en gramos por cada 100 gramos de biomasa seca.	39
3.4.	Contenido porcentual de xilano en la hemicelulosa extraída con distintas concentraciones de NaOH. Medido en gramos de xilano con respecto a gramos de hemicelulosa obtenida. AC: <i>A. chilensis</i> ; GS: <i>G. skottsbergii</i> ; PC: <i>P. columbina</i> y UR: <i>U. rigida</i>	40
3.5.	Contenido porcentual de celulosa en la hemicelulosa extraída con distintas concentraciones de NaOH. Medido en gramos de celulosa con respecto a gramos de hemicelulosa obtenida. AC: <i>A. chilensis</i> ; GS: <i>G. skottsbergii</i> ; PC: <i>P. columbina</i> y UR: <i>U. rigida</i>	41
3.6.	Proporción entre xilano y celulosa recuperados con distintas concentraciones de NaOH. Medido en gramos de xilano con respecto a gramos de celulosa recuperada. AC: <i>A. chilensis</i> ; GS: <i>G. skottsbergii</i> ; PC: <i>P. columbina</i> y UR: <i>U. rigida</i>	42
3.7.	Rendimiento de xilano frente a distintas concentraciones de NaOH. Medido en gramos de xilano recuperados versus gramos de xilano disponible en biomasa; concentración de NaOH medido en %p/v.	44
3.8.	Hidrólisis enzimática de xilano extraído de distintas algas. Medido en mg/mL de extremos reductores.	46
3.9.	Hidrólisis enzimática de xilano libre de agar extraído desde distintas algas. Medido en mg/mL de extremos reductores.	47
3.10.	Hidrólisis enzimática de biomasa expuesta directamente a la acción de la xilanasa. Medido en mg/mL de extremos reductores.	47
3.11.	Rendimientos de hidrólisis de xilano con respecto al xilano disponible en biomasa. Medido en miligramos de azúcares reductores divididos por gramos de xilano disponible en cada alga.	50
3.12.	Rendimientos de enzima con respecto a la hidrólisis de xilano. Medido en miligramos de azúcares reductores de hidrólisis de xilano divididos por miligramos de enzima xilanasa usada en la reacción.	51
3.13.	Masa de XOS producidos desde hemicelulosa algal por hidrólisis enzimática, proveniente de <i>A. chilensis</i> , <i>G. skottsbergii</i> , <i>P. columbina</i> y <i>U. rigida</i> . Medido en miligramos de XOS.	52
3.14.	Masa de XOS producidos desde hemicelulosa algal (libre de agar) por hidrólisis enzimática, proveniente de <i>A. chilensis</i> , <i>G. skottsbergii</i> , <i>P. columbina</i> y <i>U. rigida</i> . Medido en miligramos de XOS.	53
3.15.	Rendimiento de la producción de XOS totales con respecto a la biomasa tratada. Medido en miligramos de XOS con respecto a gramos de biomasa.	55
3.16.	Rendimiento de la producción de XOS con respecto a hemicelulosa recuperada. Medido en miligramos de XOS con respecto a gramos de hemicelulosa recuperada.	56

3.17.	Rendimientos de los procesos extractivos y de separación aplicados durante la producción de XOS a partir de algas rojas (<i>A. chilensis</i> , <i>G. skottsbergii</i> y <i>P. colmubina</i>).	60
3.18.	Rendimientos de los procesos extractivos y de separación aplicados durante la producción de XOS a partir del alga verde <i>U. rigida</i>	61
F.1.	Curva de calibración de concentración de xilosa para la cromatografía de intercambio iónico.	85
F.2.	Curva de calibración de concentración de glucosa para la cromatografía de intercambio iónico.	86
F.3.	Curva de calibración de concentración de arabinosa para la cromatografía de intercambio iónico.	86
G.1.	Curva de calibración de extremos reductores con xilosa como referencia. . .	107
H.1.	Curva de calibración de lignina soluble.	112
I.1.	Curva de calibración de proteínas mediante método de Bradford.	116

CAPÍTULO

1

INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes y Motivación

Dentro de los alimentos funcionales con propiedades bioactivas se encuentran aquellos con capacidad prebiótica, definidos como ingredientes de la comida no digeribles que son utilizados por la microbiota intestinal para estimular la proliferación de la flora bacteriana, lo que a su vez induce la disminución de patógenos [1, 2]. En cuanto al mercado de alimentos funcionales, dentro de los que se encuentran los prebióticos, en Chile desde el año 2015, se reporta un crecimiento a tasas superiores al 10 % anual [3]. Uno de los principales desafíos de esta industria (y de muchas otras) es buscar materias primas baratas, de fácil acceso y amigables con el medioambiente. Bajo este contexto, desde la biotecnología y la química, suena interesante el estudio del proceso de extracción de moléculas con propiedades prebióticas a partir de compuestos que cumplan con las características antes descritas.

Dentro de los alimentos funcionales con presumibles propiedades prebióticas se encuentran los xilooligosacáridos (XOS) que son azúcares derivados de la molécula de xilano, cuyo monómero es la aldosa llamada xilosa. Esta se encuentra en la hemicelulosa de las paredes celulares de distintos organismos. En cuanto a los XOS, estos se reconocen como ingredientes alimentarios no digeribles, ya que no se metabolizan ni se absorben en el tracto gastrointestinal humano y, además, muestran varios efectos beneficiosos para la salud humana [4].

Por otro lado, en la búsqueda de materias primas baratas, de fácil acceso y amigables con el medioambiente, el estudio de algas para cumplir este rol parece interesante, ya que,

estas han sido usadas históricamente en diversos ámbitos, desde la alimentación como ingredientes en diversas recetas de gastronomía, hasta materia primera en la industria de los gelificantes y coloides para la industria cosmética, médica, alimenticia, entre otras [5]. Además, en comparación a las plantas terrestre, presentan una mayor cantidad de componentes que representan beneficios para la salud, como moléculas bioactivas [5]. Y en resonancia a lo comentado anteriormente, destaca el uso potencial de algas como fuente de alimentos funcionales, tales como polisacáridos, fenoles, carotenoides y oligosacáridos [6], lo que da indicios del potencial de las algas para la obtención de XOS.

Continuando esta línea, los beneficios del uso de algas como recurso productivo son diversos, entre ellos destaca que son fácilmente obtenibles en la naturaleza; su recolección no suele ser muy costosa, pudiendo incluso encontrarse en las playas del territorio nacional, además, en Chile hay una amplia variedad de algas verdes, rojas y pardas. Todo lo anteriormente enunciado representa una ventaja comparativa con respecto al uso de materias primas de origen mineral, químico y/o sintético, e incluso, podría presentar algunas ventajas sobre el uso de materia vegetal terrestre, la que suele ser la materia predilecta a la hora de la extracción de xilooligosacáridos.

Cabe destacar que se han realizado estudios que han reportado la obtención de XOS a partir de materias primas que presenten beneficios logísticos, económicos e incluso ambientales como lo puede ser la materia lignocelulosa vegetal terrestre, y también, de algas [2, 4]. Esto marca un antecedente de la viabilidad práctica de la obtención de moléculas con propiedades bioactivas, como lo son presumiblemente los XOS, a partir de algas que habitan las costas del país.

1.2. Marco Teórico

1.2.1. Algas: Pared Celular, Xilano y Especies en estudio

1.2.1.1. Generalidades, Estructura y Pared Celular

Las algas son uno de los organismos más comunes que habitan la Tierra, se estima que, considerando especímenes marinos y terrestres, la cantidad de especies de estos organismos se encuentra dentro del rango de 30.000 - 1.000.000 especies [7]. En cuanto a su morfología, sus tamaños van desde las algas unicelulares cuyo diámetro oscila entre el rango de 3 - 10 μm a algas pluricelulares que pueden superar las decenas de metros. En general, suelen ser células eucariotas con un núcleo definido, cloroplasto con pigmentación y pared celular, entre otros componentes típicos de las células eucariotas. Cabe mencionar, que la clasificación alga no es un término taxonómico formal, sino que hace referencia a un grupo de organismos que no comparten un origen común, no cohesivo y artificial de organismos fotosintéticos que sintetizan oxígeno molecular [8], un ejemplo de evolución convergente.

Las algas marinas contienen una gran cantidad de polisacáridos estructurales, siendo

los principales la celulosa y la hemicelulosa, y también, variados polisacáridos de almacenamiento, donde destacan el glucano, el fucoidano, el agar, entre otros. La mayoría de estos no son digeridos por humanos y, por lo tanto, pueden definirse como fibras funcionales, es decir, carbohidratos no digeribles fisiológicamente beneficiosos [8]. Estos polisacáridos pueden ser un constituyente de la pared celular en las algas rojas unicelulares como *Porphyridium sp.* y *Rhodella sp.* y en muchos otros taxones, o estar presente dentro de la célula, como en *Euglenophyceae*. Por otro lado, los polisacáridos de *Rhodophyta* están altamente sulfatados y consisten principalmente en xilosa, glucosa y galactosa.

Los polisacáridos que conforman la pared celular de algas marinas, y la composición en la que estos se encuentran, están determinados por la especie o taxón [9], el organelo o parte anatómica, la etapa de desarrollo y ciclo de vida, y agentes externos [10]. De esta manera, polisacáridos de la pared celular de varios grupos de algas marinas se pueden diferenciar entre *Clorophyta*, *Rhodophyta* y *Phaeophyta*, lo que se expone en la Tabla 1.1, donde se reportan los azúcares que forman la estructura cristalina, los que conforman la hemicelulosa y aquellos que son parte de la matriz de la pared celular.

Tabla 1.1: Principales polisacáridos constituyentes de la pared celular de algas marinas [9, 10, 11].

Polisacáridos	<i>Clorophyta</i>	<i>Rhodophyta</i>	<i>Phaeophyta</i>
Celulósicos (Cristalinos)	Celulosa	Celulosa - (1→4)- β -D-glucano, (1→4)- β -D-manano, (1→4)- β -D-xilano, (1→3)- β -D-xilano	Celulosa
Hemicelulosas	Xiloglucanos, Mananos, (1-4)- β -D-glucoronano, (1→3)(1→4)- β -D-glucano	Glucomanano, (1→3)(1→4)- β -D-xilano, Glucano de enlace mixto	Xilofucoglicanos sulfatados, Xilofucoglucuronanos sulfatados, (1→3)(1→4)- β -D-glucano
Matriz de la pared	Ulvano, Glicanos sulfatados	Galactanos sulfatados (ej. agar)	Alginatos, Fucoidanos

Las algas verdes sintetizan polisacáridos de pared celular sulfatados y/o carboxílicos de estructura específica. Mientras que las algas rojas tienen paredes celulares compuestas complejas hechas de fibrillas de celulosa, xilano o manano y galactanos sulfatados como los principales componentes de la matriz.

Así, las paredes celulares de las algas están compuestas por una red altamente integrada de biopolímeros, con una predominante presencia de polisacáridos, que interactúan con el

agua, los iones metálicos y otras moléculas del medio. Las especificidades estructurales, incluidos los patrones y grados de sustitución de ciertos grupos funcionales, como los sulfatos, definen en gran medida propiedades físicas y funcionales de los polisacáridos de la pared celular en las algas marinas.

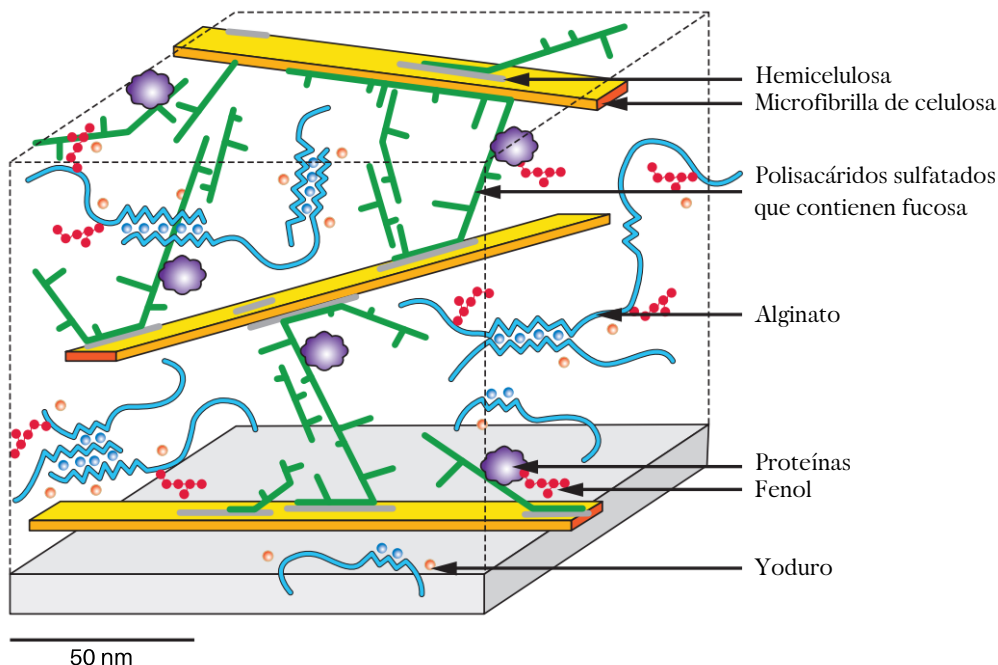


Figura 1.1: Estructura de la pared celular algal [12].

Las partes cristalinas y fibrosas como aquellas correspondientes a celulosa, xilanos y hemicelulosas se encuentran en una matriz gelatinosa compuesta por polisacáridos carboxílicos y/o sulfatados [10]. En particular, la hemicelulosa actúa como intermediario entre las microfibrillas de celulosa, principal componente de la pared celular, estructuras en forma de cadenas conformadas por polisacáridos sulfatados que contienen fucosa [12], tal como se puede ver en la Figura 1.1. Cabe destacar que las paredes celulares de las algas, en general, tienen la ventaja de contener poco o nada de lignina en comparación a la pared celular de la materia vegetal terrestre, lo que facilita la obtención de estos azúcares [13]. Otros biopolímeros como proteínas, proteoglicanos y fenoles también pueden participar en la formación de la pared celular.

Considerando lo anterior, la pared celular de estos organismos es de particular interés como fuente de XOS. Estos compuestos se obtienen a partir de la molécula de xilano, polímero del azúcar xilosa, que se conforma la estructura de la hemicelulosa de la pared celular [14].

1.2.1.2. Origen, usos y composición de *Agarophyton chilensis*

El alga *Agarophyton chilensis* (ex *Glacilaria chilensis*, y conocida comercialmente como *pelillo*) corresponde a un alga roja, es decir, pertenece al filo *rhodopyta*; y se ubica en las

costas de Chile y Nueva Zelanda. Por tanto, se trata de un alga nativa que se desarrolla a lo largo de la costa del país, en específico, entre la región de Antofagasta y la Isla de Chiloé. Se suele encontrar en el sustrato intermareal y submareal, pudiendo desarrollarse hasta los 25 metros de profundidad, el sustrato que emplea para crecer puede ser fangoso, arenoso, en incluso duro [15, 16].

En Chile se cultiva ampliamente con el fin de comercializarla para usarlo como materia prima en la producción del ficololoide agar, pues tiene una alta concentración de este, usada como materia prima en la producción del 80 % de exportaciones de dicho polímero a nivel nacional [16]. Además, es rica en fibra dietética, minerales, proteínas y compuestos fenólicos [17].



Figura 1.2: *A. chilensis* extraída del mar [16].

Crece en forma de fibrillas con organización de raíz relativamente firmes [15, 17], tal como se aprecia en la Figura 1.2, poseen una ramificación muy variable y pueden alcanzar hasta 2 m de longitud, pudiendo crecer en manojos o aisladamente [18]. Presenta una coloración rojiza parda al estar en el agua, pero al ser extraída de esta su color se acerca más a un marrón oscuro opaco.

La composición bioquímica de esta alga destaca por la alta concentración de carbohidratos, representando desde el 61,2 % al 63,4 % del peso seco [17, 18]. Luego, le sigue el porcentaje de cenizas, tomando valores entre 23,2 % y 24,8 %; finalmente, el tercer componente más importante en cuanto a composición es la fibra total, representando entre el 19,3 % - 24,1 % del peso seco [17]. Estos datos, y los de proteínas y lípidos, se exponen en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2: Composición bioquímica de *Agarophyton chilensis* (% peso seco) [17, 18].

Especie	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos	Cenizas	Fibra
<i>A. chilensis</i>	12,9-13,7	61,2 - 63,4	0,4 - 1,3	18,9 - 24,8	19,3 - 24,1

1.2.1.3. Origen, usos y composición de *Gigartina skottsbergii*

El alga *Gigartina skottsbergii*, también conocida como *Luga roja*, pertenece al filo *rhopryta*, por tanto, se define como un alga roja. Esta especie es endémica de América del sur, encontrándose en las costas de Chile, en particular, de zonas como Llanquihue y Chiloé. Suele crecer en la zona submareal libre de oleaje, donde se desarrolla junto a *Sarcotalia crispata* (Luga negra) y algas calcáreas [19, 20].

Las *Gigartina sp* se consideran algas comestibles con un potencial nutracéutico importante debido a los altos niveles de minerales, fibras dietéticas y proteínas [21]. En cuanto a su uso industrial, esta alga se utiliza como materia prima para producir el hidrocoloide denominado como carragenina [22].

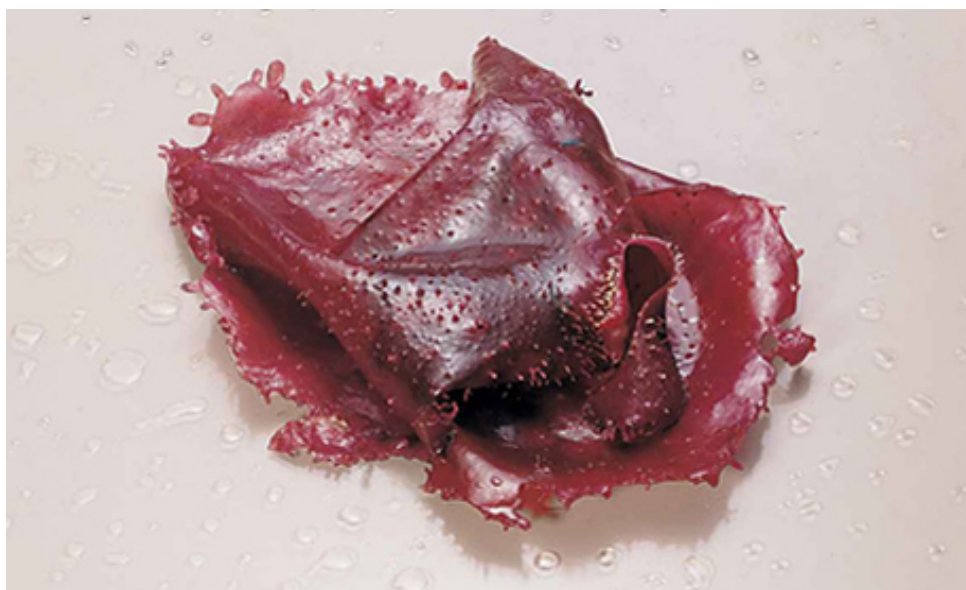


Figura 1.3: *G. skottsbergii* en laboratorio [20].

En cuanto a la estructura del alga, su talo es laminar, de contorno elipsoidal, además, presenta hapterios en la parte inferior y basal del centro umbilical que le sirven para adherirse al sustrato. Es un alga de color rojo intenso, gruesa y carnosa al tacto, y de hábito circular a semicircular, tal como se puede apreciar en la Figura 1.3. En plantas maduras las frondas (conjunto de hojas y ramas) alcanzan tamaños de 40 cm de alto por 60 cm de ancho, aunque plantas muy viejas pueden llegar a tener un talo de 1,30 m [22, 23].

No se hallaron antecedentes que den cuenta de la composición bioquímica de *Gigartina*

skottsbergii, pero sí se ha determinado la del alga perteneciente al mismo género llamada *Gigartina chamissoi*, lo que podría entregar cierta referencia sobre la composición del alga en estudio. Los porcentajes en peso seco de los componentes bioquímicos se presentan en la Tabla 1.3, donde destaca el porcentaje de cenizas, siendo este de 42,7% [18]. Cabe destacar que ni la composición de carbohidratos ni de fibra se ha reportado.

Tabla 1.3: Composición bioquímica de *Gigartina chamissoi* (% peso seco) [18].

Especie	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos	Cenizas	Fibra
<i>G. chamissoi</i>	14,0	-	0,8	42,5	-

1.2.1.4. Origen, usos y composición de *Porphyra columbina*

El alga *Porphyra columbina* pertenece a la división *Rhodophyta*, por tanto, se considera un alga roja, al igual que *A. chilensis* y *G. skottsbergii*, y además, comparte clase (*Bangiophyceae*) con un alga comestible muy popular, el nori.

Es un alga que suele crecer en los hábitats intermareales rocosos en aguas templadas de Chile, pero no es exclusiva del país, sino que crece en aguas frías del hemisferio sur, pudiéndose encontrar en Nueva Zelanda y Argentina, es decir, suele habitar entre el territorio antártico y los continentes del extremo sur [24, 25]. En el sur de Chile es conocida como alga *Luche*, aunque en ciertas ocasiones este nombre lleva a la confusión, ya que, a *Ulva lactuca* se le conoce por el mismo nombre.

Tienen una forma de crecimiento de roseta a ovalada, midiendo menos de 5 cm de alto y ancho, con una morfología laminar planta membranácea, aunque algunas especímenes crecen en forma de cinta. Los talos del alga son de color púrpura-marrón, morfología y color que se pueden ver en la Figura 1.4, aunque los especímenes más viejos tienen una apariencia claramente manchada de color rojo púrpura y áreas marginales doradas (espermatozoides) [25, 26].

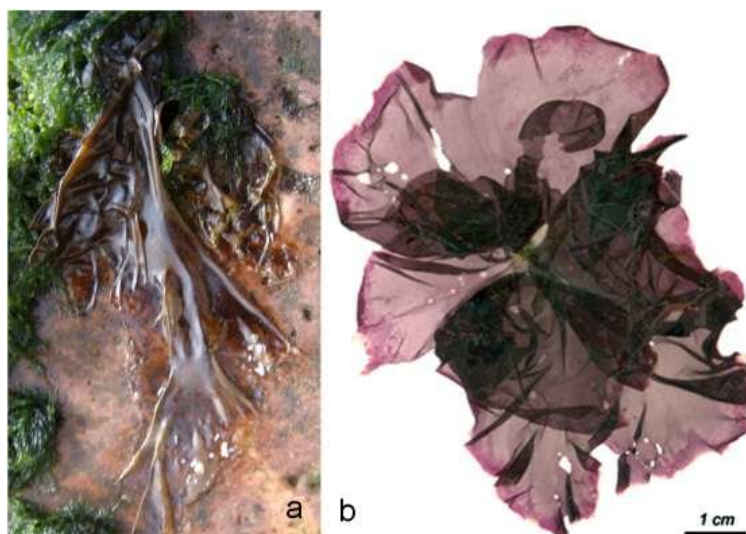


Figura 1.4: *Porphyra columbina* sobre roca en bajamar (izquierda) y herborizada (derecha) [27].

El alga destaca por su gran contenido de proteínas, siendo este su principal interés en términos nutricionales, y una de las razones por la que se ha empleado esta alga como fuente de proteínas con propiedades bioactivas [30]. Al igual que las demás algas, su contenido de lípidos es bajo, no superando el 1%. Aún así, el detalle de la composición bioquímica del alga puede revisarse en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4: Composición bioquímica de *Porphyra columbina* (% peso seco) [28, 29, 30, 31].

Especie	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos	Cenizas	Fibra
<i>P. columbina</i>	24,6 - 43,1	36,64 - 37,0	0,25 - 0,53	6,46 - 10,33	39,0 - 54,0

1.2.1.5. Origen, usos y composición de *Ulva rigida*

El alga *Ulva rigida* pertenece al filo *chlorophyta* y al género *Ulva*, por tanto, corresponde a un alga verde. Esta crece siguiendo una estructura parenquimatosa, es decir, las células del filamento primario se dividen en todas las direcciones y se pierde cualquier estructura filamentosa esencial, aunque su morfología dependerá de las concentraciones de sales del ambiente [8, 32]; suele presentar una fuerte coloración verde dada su concentración de pigmentos que reflejan luz visible en dicha longitud de onda; estas características se pueden observar en la Figura 1.5. El alga crece en las costas de diversas partes del mundo, incluido Chile, donde se suele desarrollar en las áreas submareales cercanas a rocas marinas sumergidas. Destaca por presentar un alto contenido de proteínas y carbohidratos, entre los que se incluye el xilano [33, 34].

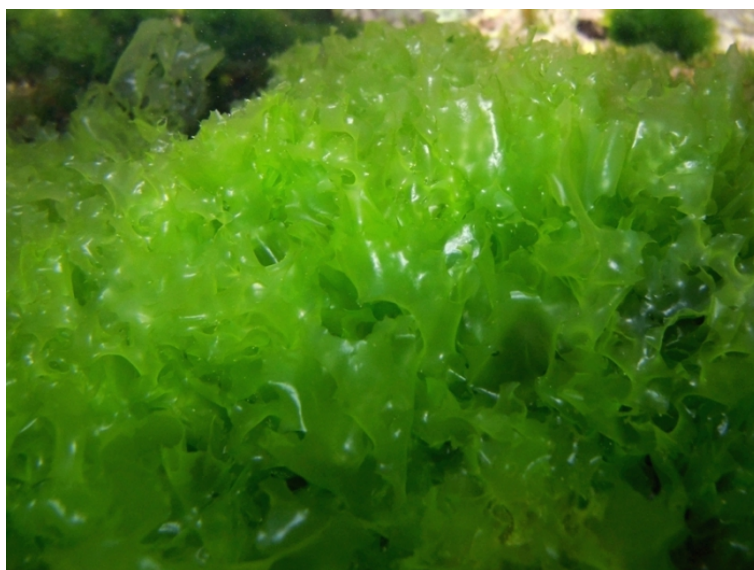


Figura 1.5: *Ulva rigida* en fondo marino [35].

Además de ser apta para el consumo humano, siendo popular su uso como alimento en Japón y algunos países Europeos, se ha usado para procesos de bioacumulación de metales para la remoción de contaminantes y también en la extracción de proteínas con principios bioactivos dada su relativa alta concentración de estas macromoléculas [36, 37, 38].

Su composición bioquímica destaca por la alta concentración de carbohidratos, representando hasta el 56,0% del peso seco del alga en algunos casos. Luego, le sigue muy de cerca el porcentaje de cenizas, tomando valores entre 11,0% y 28,6%; finalmente, el tercer componente más importante en cuanto a composición son las proteínas, representando entre el 18% - 27,6% del peso seco [39, 40]. Estos datos, y los de fibra y lípidos, se exponen en la Tabla 1.5.

Tabla 1.5: Composición bioquímica de *Ulva rigida* (% peso seco) [39, 40, 41, 11].

Especie	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos	Cenizas	Fibra
<i>Ulva rigida</i>	18,0 - 27,6	38,0 - 56,0	0,9 - 2,0	28,6	24,2 - 41,0

1.2.2. Xilooligosacáricos: Rol, Extracción y Propiedades de Interés

1.2.2.1. Materia lignocelulósica, xilano y tipos de xilano

La biomasa lignocelulósica se define como aquella biomasa vegetal seca que se encuentran conformada principalmente constituida por 3 macromoléculas: los azúcares celulosa y hemicelulosa, y por otro lado, una molécula de naturaleza aromática, la lignina. La proporción entre estos 3 compuestos suele variar, dependiendo del origen de la biomasa,

particularmente en algas la presencia de lignina suele ser muy baja. Se ha reportado que en biomasa lignocelulósica terrestre, en relación peso/peso, la celulosa representa entre un 30 % y un 50 %, la hemicelulosa un 20 % - 40 %, mientras que la lignina entre un 15 % - 25 %, aunque como se mencionó anteriormente, este porcentaje podría ser considerablemente menor en el caso de materia lignocelulósica algal [2, 13, 42].

La hemicelulosa está conformada principalmente de pentosas como la xilosa y arabinosa, de hexosas, tales como, manosa, fructosa, glucosa y galactosa; y de otros azúcares ácidos [42]. Se estima que la hemicelulosa se compone entre un 60 – 90 % p/p de xilano, polímero compuesto por una diversidad de azúcares ramificados y no ramificados, pero cuyo componente principal es la aldopentosa D-xilosa [2, 43].

Como se mencionó anteriormente, la molécula de xilano puede presentar ramificaciones, tales como acetilo, 4-O metil derivado, arabinofuranosilo y, en tal caso, podría denominarse xilano ramificado [43]. Estos a su vez, clasifican de acuerdo a la(s) ramificación(es) que se encuentre(n) en su estructura, existen los arabinoglucuronoxilanos, arabinoxilanos, glucuronoxilanos y homoxilanos [44]. Dentro de estas clasificaciones destaca el arabinoxilano, por ser el constituyente más abundante de las paredes celulares de las plantas [45]. Una clasificación más detallada se observa en la Tabla 1.6.

Tabla 1.6: Tipos de xilano y sus características [2, 43, 44].

Tipo de xilano	Características
Arabinoglucoroxilano	Polímero de xilano formado por un esqueleto de xilopirano que presenta una sustitución por arabinosa (α -L- arabinofuranosil) en la posición 3, y además, está altamente sustituido por 4-O-metil. Encontrado en madera, y dependiendo del tipo de esta, este puede representar hasta el 50 % de la hemicelulosa constituyente de la pared celular.
Arabinoxilano	Constituyente más abundante de las paredes celulares de plantas, y en particular, en cereales. Formado por un esqueleto de xilosa (D-xilopiranosil) con residuos de arabinosa (α -L- arabinofuranosil) ligados en su posiciones 2 y 3. Aquellos de mayor exposición pueden ser extraídos con agua, sin embargo, la gran mayoría es solo extraíble con soluciones alcalinas.
Glucronoarabinoxilano	Polímero de xilano formado por un esqueleto de xilopirano que presenta una sustitución por 4-O-metil en la posición 2, y además, presenta residuos de arabinosa (α -L- arabinofuranosil) en su posiciones 2 y 3.
Glucronoxilano	Polisacáridos de xilano con ramificaciones de ácido α -D-glucurónico y/o 4-O-metilo, un derivado del primero. El 4-O-metil-D-glucurono-D-xilano representa más del 90 % del componente hemicelulosa en maderas duras.
Heteroxilano	Polisacáridos que se encuentran altamente sustituidos, presentando cadenas laterales de distintos azúcares de largo variable.
Homoxilano	Polisacáridos lineales de D-xilopiranosil (Xylp) unidos por enlaces β -1,3 y/o enlaces β -1,4. Aquellos que presentan enlaces β -1,3 o enlaces mixtos son comunes en algunas algas rojas y verdes, donde sustituyen a la celulosa como polímero esquelético de las paredes celulares.

Complementando lo anterior, en la Figura 1.6 se muestra la estructura de xilanos con enlaces (1,3)- β , (1,4)- β y mixtos, notar que lo único que cambia es el tipo de enlace, y no se muestran sustituciones en el esqueleto de xilosa.

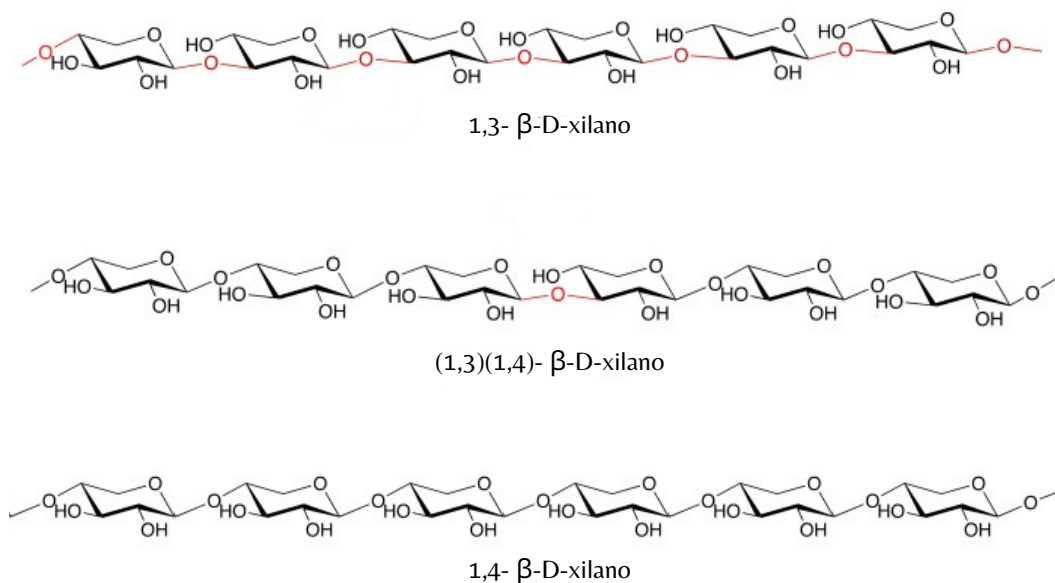


Figura 1.6: Distintos tipos de xilano con respecto a los enlaces que forman [46].

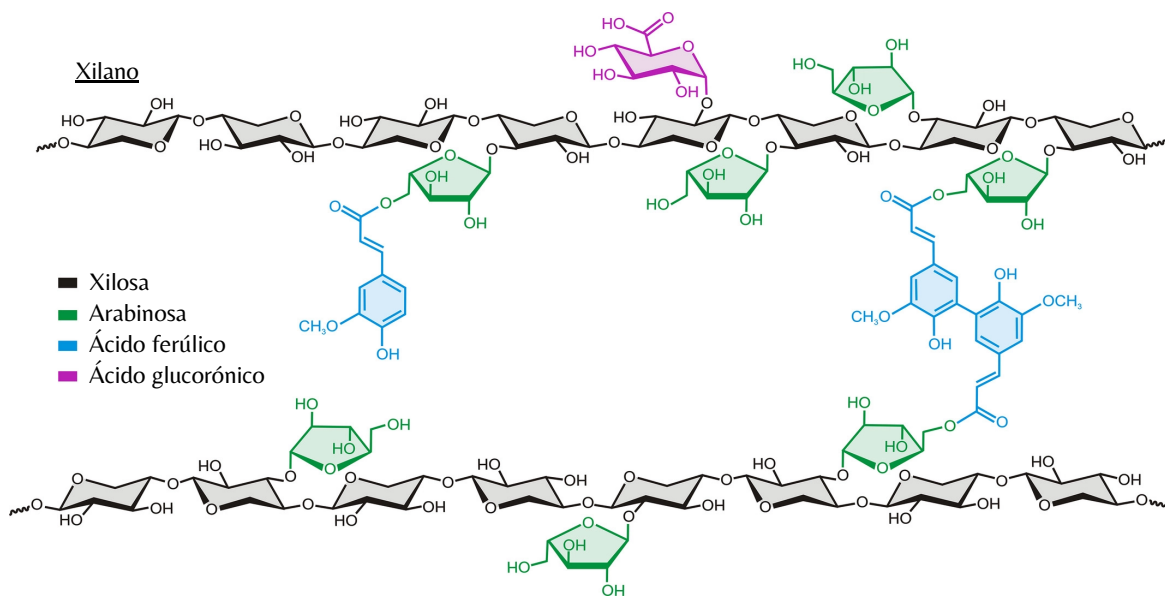


Figura 1.7: Distintos tipos de xilano con respecto a las sustituciones posibles de un esqueleto de xilano [47].

Por otro lado, en la Figura 1.7 se muestran las distintas ramificaciones posibles, entre las cuales se pueden ver arabinosas (arabinoxilano), ácido glucurónico (glucuronoxilano) y una mezcla de ambos (arabinoglucuronoxilano y glucuronoarabinoxilano).

1.2.2.2. Xilooligosacáridos y su estructura

El xilano se puede hidrolizar en monómeros, o bien, en xilooligosacáridos (XOS), estos últimos son oligómeros de azúcar compuestos de D-xilosa como componente principal, cuya estructura se puede observar en la Figura 1.8, donde se identifica que la unión de los monómeros se da por enlaces β -1,4, principalmente, aunque cabe mencionar que también puede darse por enlaces β -1,3 [48].

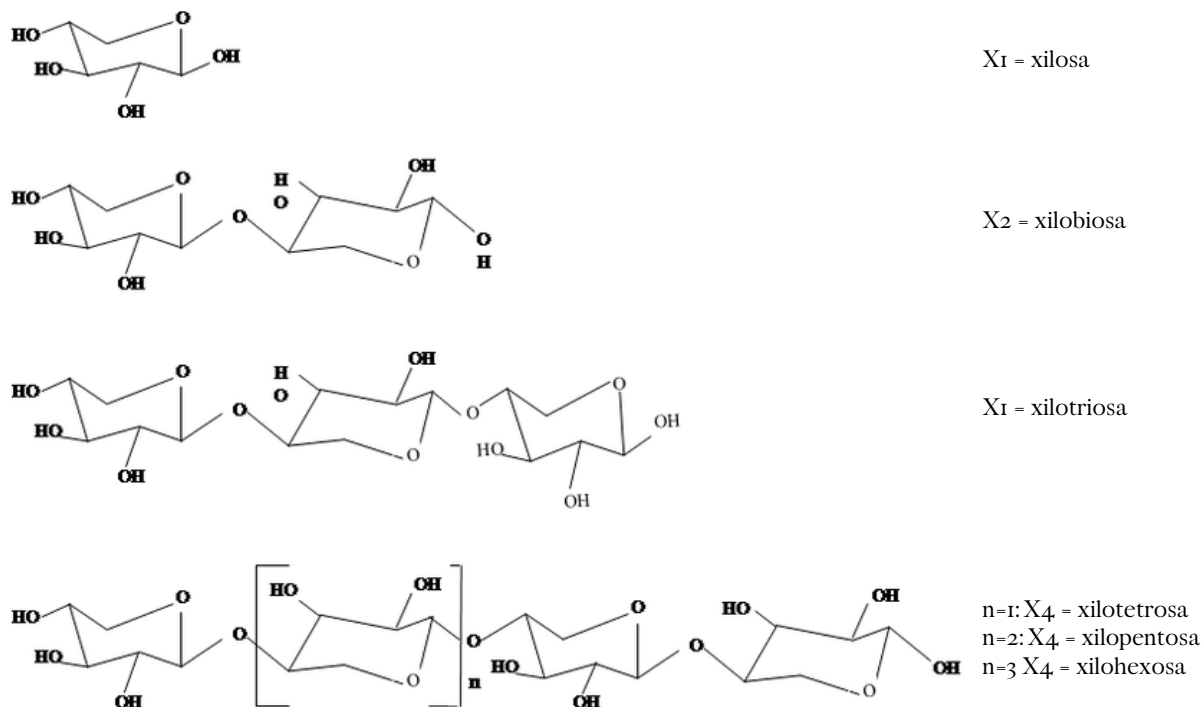


Figura 1.8: Estructura y nombre de xilooligosacáridos desde grado de polimerización 1 a 6 [48].

Los XOS de interés son aquellos de bajo peso molecular, los que presentan una mayor actividad prebiótica son las cadenas constituidas entre 2 y 6 D-xilosas. Además, se ha reportado que el tipo y grado de sustitución que presenta la cadena de xilano, y que pueden permanecer luego del proceso hidrólisis, influyen en su efecto prebiótico, los XOS no sustituidos y los arabinoxilooligosacáridos (producto de arabinoxilano) fermentan más rápido, comparados con los otros tipos de xilano, y sus respectivos XOS derivados [43, 49].

1.2.2.3. Propiedades químicas y prebióticas de los XOS

La estabilidad de los xilooligosacáridos varía según los tipos de oligosacáridos y residuos que se hallen en la estructura, enlaces, formas de anillos, entre otros factores. En general, los enlaces β son más fuertes que los enlaces α y las hexosas están más fuerte-

mente unidas que las pentosas [50].

Si comparamos con la mayoría de los oligosacáridos, estos se pueden hidrolizar (lo que implica pérdida de propiedades) a pH 4.0, o bien, al tratamiento con altas temperaturas. No obstante, los XOS son estables en un amplio rango de pH que va desde 2,5 a 8,0, pudiendo incluso resistir los jugos gástricos que se encuentran en el estómago. Además, estas moléculas son termoestable hasta los 100 °C [4, 50, 51].

Por otro lado, estos compuestos destacan por los beneficios para la salud, entre los se ha reportado una reducción del colesterol en sangre, un aumento en la absorción de calcio, efectos antioxidantes (molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas), el mantenimiento de la salud gastrointestinal (aportando con un efecto prebiótico), un menor riesgo de cáncer de colon, un efecto citotóxico en las células leucémicas humanas y beneficios para los pacientes con diabetes mellitus tipo dos al ser capaz de regular la secreción de insulina del páncreas, el aumento de la producción de ácidos grasos volátiles y la actividad para reducir las lesiones de úlcera estomacal [2, 14, 52]. Cabe destacar que estos efectos no son directos, sino, que prebióticos alimentan la flora intestinal, y son estos microorganismos, al producir cadenas cortas de ácidos grasos, los que aportan los beneficios antes mencionados.

Sin embargo, la propiedad por la que estos compuestos se suelen comercializar es la capacidad de actuar sobre la flora intestinal, favoreciendo la proliferación de bacterias benéficas para la salud, en particular bifidobacterias; y al mismo tiempo, evitando el crecimiento de patógenos. De hecho, la Asociación Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP) determina a los XOS como tal, oligosacáridos prebióticos [2, 50]. Lo anterior se explica porque los XOS no son digeridos por los humanos ya que estos carecen de las enzimas necesarias para hidrolizar los enlaces β que forman el esqueleto de xilanos y XOS, por lo que se consideran como fibra soluble (no se degradan en el estómago) [50].

1.2.2.4. Presencia de xilano en algas

Dentro de las algas verdes se encuentra el clado de las *Charophytas*, grupo taxonómicamente cercano a las plantas terrestres. Este tipo de alga contiene 1,4- β -D-heteroxilanos de estructura similar a los de las paredes celulares de las plantas terrestres [46, 53]. Por otro lado, si se habla del clado *Chlorophyte*, y en particular del orden *Bryopsidale*, destaca que las microfibrillas de la pared celular consisten en 1,3- β -D-xilanos (tipo homoxilano y que se estructuran en forma de triples hélices) o 1,4- β -D-mananos, con celulosa aparentemente completamente ausente; la presencia de xilano y manano está determinado por la especie en cuestión y el estadio de vida en el que se encuentra [46]. Otro orden que se ha estudiado es el *Dasycladales*, donde se ha reportado la presencia de 1,4- β -D-xilanos.

Respecto al género *Ulva*, al que pertenece *Ulva rigida*, se puede mencionar que la celulosa, el glucoxilano y el xilano (fibras solubles) se localizan en las paredes celulares y sus alrededores, mientras que el ulvano y el glucuronano (fibras insolubles) están presentes en

el espacio intercelular, es decir, en la matriz de la pared celular. Además, se ha informado que frente a la incubación con xilanasa, la pared celular del alga libera xilosa, y glucosa [41, 46].

En cuanto a algas rojas, se han identificado dos tipos de xilanos, de acuerdo a sus tipos de enlaces y al grado de ramificación que tiene la molécula :

- Xilano separado o combinado en un heteropolisacárido con enlaces 1,3- β y 1,4- β en una estructura que puede estar ramificada o lineal. La particularidad de este tipo de xilano es que, debido a la estructura mixta, la interacción entre xilanos es débil en comparación a un homoxilano, esto indica que el xilano de algas rojas tiene ventajas en la producción enzimática de XOS [14, 54].
- Xilano de estructura esencialmente lineal y que está completamente enlazado en 1,3- β o completamente enlazado en 1,4- β . Respecto a este, se estima que de la totalidad de moléculas de xilano, un 80 % está enlazada mediante enlaces 1,4- β , mientras que el restante 20 % hace uso de enlaces 1,3- β [54].

Además, cabe destacar que las microfibrillas de las algas rojas están compuestas de celulosa, a excepción de dos órdenes: Nemaliales y Palmariales, mientras que la fase matriz de las paredes de las algas rojas suelen ser galactanos sulfatados (agares y carragenanos). En estas algas es posible encontrar dos tipos de xilanos, ambos con características de homoxilanos; por un lado se tienen los 1,3- β -D-xilanos, presentando solo un tipo de enlace, y también están los 1,3;1,4- β -D-xilanos, que presentan en su estructura enlaces mixtos, estos últimos se encuentran en la fase matriz de la pared celular (lo que hace posible su extracción incluso con agua caliente, al menos en los órdenes antes mencionados), mientras que los 1,3- β -D-xilanos se presentan como triples hélices al igual que en el orden Bryopsidales en las clorofitas [46, 54].

Se ha reportado la presencia de pequeñas cantidades ($\sim 6\%$ p/p) de D-xilosa en los procesos de extracción de K-carragenanos (uno de los tres tipos de carragenina presente en algas rojas) a partir de *Gigartina skottsbergii* [55]. No se ha encontrado bibliografía que reporte algún indicio de la obtención de XOS a partir del xilano de *A. chilensis*.

Respecto a otras algas, se ha reportado la extracción de xilano y posterior obtención de XOS a partir de *Palmaria palmata*, alga roja (ver Figura 1.9.a) en la que se encuentra xilano como componente estructural de la pared celular, y además, con una baja cantidad de celulosa y lignina. La obtención de XOS se realizó mediante acción enzimática xilanasa al xilano extraído. De esta manera se ha demostrado que el xilano de algas rojas es un buen candidato para la producción de XOS [4]. Por otro lado, también se ha reportado la obtención de XOS a partir de 1,3- β -D-xilano extraído de *Caulerpa racemosa*, alga verde (ver Figura 1.9.b), mediante acción enzimática xilanasa sobre este [56]. Confirmando así que es posible la extracción de XOS a partir de xilano del alga verde *Caulerpa racemosa*.

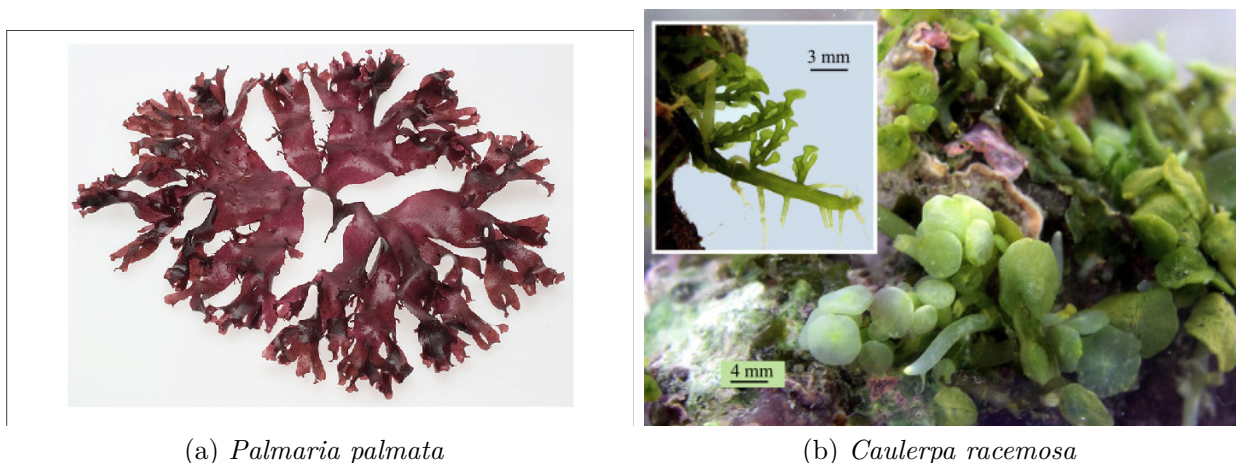


Figura 1.9: Otras algas en las que se ha reportado la obtención de XOS a partir de sus xilanos [57, 58].

1.2.2.5. Estrategias para la extracción de XOS

A partir de materia lignocelulósica terrestre

Para la obtención de XOS a partir de biomasa lignocelulósica terrestre se suele usar como materia prima desechos agrícolas como paja, desechos de maíz, cáscaras de cocos, y en general cualquier desperdicio lignoceluloso [43]. Un primer paso dentro de este proceso para obtener de XOS, es el pretratamiento alcalino, o bien, puede ser con agentes ácidos, de la materia prima lignocelulosa. Este procedimiento tiene como consecuencia la fragmentación de la pared celular, rompiendo los componentes macromoleculares, lo que provoca que el xilano y la lignina queden en contacto con la solución alcalina (o ácida) y se solubilicen [2, 43, 48].

En el pretratamiento ácido se solubiliza hemicelulosa, celulosa y lignina en una solución diluida de ácido, esto último es importante, ya que se debe evitar la hidrólisis de la hemicelulosa en monómeros, lo que aún así suele ocurrir [2]. La catálisis ácida ocurre en tres pasos consecutivos, iniciando con una protonación del átomo de oxígeno del enlace éter; luego le sigue la transferencia de la carga positiva al C1, provocando un desdoblamiento del enlace éter; y una adición rápida de agua al ion carbocatión (C1), lo que provoca la ruptura del enlace β -1,4 de la molécula de xilano [48]. Se suele usar ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido clorhídrico ácido fosfórico, ácido acético y ácido fórmico [2]. Cabe destacar que en un ambiente ácido, los monómeros de xilasa reaccionan formando furfural. En relación al pretratamiento alcalino, el tratamiento ácido tiene la ventaja de ser una estrategia rápida y sencilla, pero que corre el riesgo de producir monómeros de xilosa, los que no son de interés al no presentar propiedades prebiótica, aunque como se mencionó anteriormente, este monómero se puede emplear como endulcorante.

En lo que respecta al tratamiento alcalino, el principio en el que se basa es una saponificación del enlace éster, proceso que también está definido por tres partes, iniciando

con una adición nucleófila de un ion OH^- al enlace éster; luego, una eliminación del grupo alcoholatado; para finalizar con el ingreso de una molécula de agua (Brienzo et al., 2016). Esto provoca la separación de la hemicelulosa y la lignina, material descartable, y además, la ruptura de los enlaces de hidrógeno entre la hemicelulosa y la celulosa. Generalmente se emplean reactivos alcalinos como el hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio y el amoníaco. La principal ventaja de los métodos alcalinos frente a los métodos ácidos es la capacidad de separar selectivamente la hemicelulosa de la lignina sin degradar los otros componentes [2, 43].

Luego, existen dos métodos para la obtención de XOS a partir del xilano ya aislado: el proceso químico, que como bien dice su nombre, emplea agentes químicos; y proceso enzimático llevado a cabo por enzimas xilanasas con actividad endoxilanasas; cabe destacar que también está la posibilidad de emplear ambos métodos combinados. Por otro lado, la biomasa vegetal lignocelulosa rica en xilano también podría someterse a autohidrólisis directa en condiciones de altas temperaturas y presiones elevadas para producir XOS [43].

Producción ácida de XOSs de bajo grado de polimerización

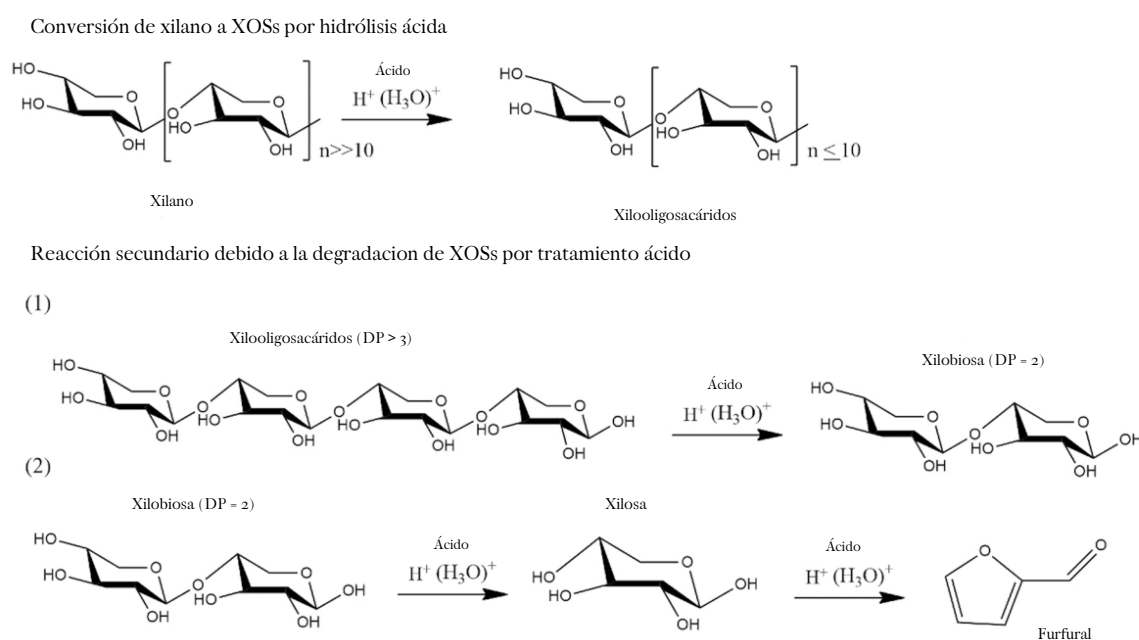
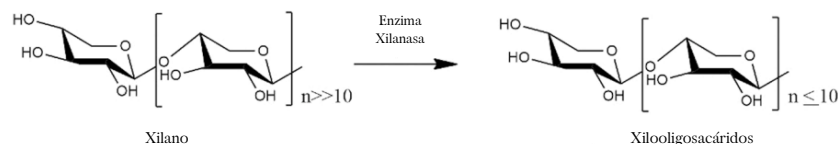


Figura 1.10: Producción química de XOS a partir de xilano [45].

La producción química se basa en un tratamiento ácido, en particular se suele usar ácido sulfúrico débil, que es aplicado al xilano directamente. Gracias al efecto del ácido el xilano se hidroliza en oligosacáridos con grados de polimerización entre 1 y 3 [45]. Si bien, el tiempo de hidrólisis tiene un efecto positivo en la degradación de xilano y XOS, se ha reportado que por sobre los 30 minutos de reacción, las moléculas obtenidas son en su mayoría xilosas, es decir, monómeros de xilano [43]. La producción química de XOS se puede separar en dos pasos (ver Figura 1.10), una de obtención de XOS a partir de xilano, y otra en la que se produce xilosa por degradación de XOS.

La producción enzimática es similar al tratamiento químico, pues usa enzimas con actividad endoxilanasas (se intenta evitar que la enzima presente actividad exoxilanasas, ya que, esto generaría monómeros de xilano y no xilooligosacáridos) para catalizar una reacción de hidrólisis del xilano [2, 45], y de esta manera obtener cadenas de XOS de largo variable. En la Figura 1.11 se muestra una esquematización de la producción enzimática de XOS, donde se observa cómo la xilanasas con actividad *endo* va generando oligómeros en una primera etapa, y también como una enzima β -xilosidasas es capaz de degradar xilobiosa en xilosa.

Producción enzimática de XOSs de bajo grado de polimerización



Descripción general de la reacción posterior según la enzima presente en la reacción

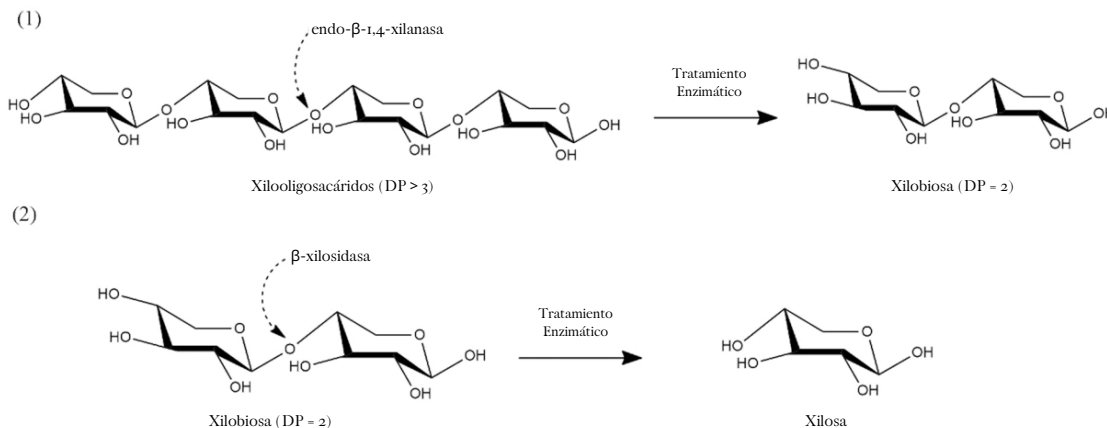


Figura 1.11: Producción enzimática de XOS a partir de xilano [45].

Por otro lado, el proceso de autohidrólisis inicia con la biomasa vegetal rica en materia lignocelulosica, es decir, omite el paso de un pretratamiento alcalino o ácido. El procedimiento consiste en introducir la biomasa en un tanque con agua, el cual es sometido a condiciones de altas temperatura (150 - 230°C) y altas presiones (4,9-20 [bar]) [2, 45], particulares para cada tipo de biomasa. Los iones hidronios (H^+) actúan catalizando la despolimerización mediante una reacción de hidrólisis de los enlaces β -1,4 de la molécula de xilano, obteniendo XOS y D-xilosa [43].

Finalmente, el proceso productivo termina con una etapa de purificación, pues se obtienen XOS de largo variable que incluyen aquellos de grado de polimerización que no despiertan interés, y otros componentes no deseados como trazas de celulosa. Para lograr una correcta pureza (75 % - 95 %), necesaria para la comercialización de XOS como suplemento alimenticio con acción prebiótica, se suelen emplear distintos procesos, entre ellos se encuentran la separación por cromatografía, separación por membrana, y la adsorción

por materiales tensoactivos [2].

Para la separación por membrana se han reportado buenos resultados en lo que respecta a separar XOS de alto grado de polimerización, en particular, sobre 6 unidades monoméricas, pero no ha obtenido los mismos resultados para separar monómeros. Por otro lado, para la separación por cromatografía se han evaluado técnicas cromatográficas como la cromatografía de filtración en gel y la adsorción en cromatografía en columna de carbón activado, para ambos tipos de purificación se han reportado purezas sobre 70 %, pero obtenido en base a una recuperación de un gran espectro de XOS en cuanto a sus grados de polimerización. Con respecto a la adsorción por materiales tensoactivos, se han empleado materiales como el carbón activado, arcilla ácida, tierra de diatomeas, titanio, sílice, entre otros [2, 43].

A partir de materia algal

Para la extracción de xilano a partir de biomasa algal se han reportado al menos dos procedimientos distintos, siendo uno de ellos el mismo que se aplica a la materia lignocelulósica terrestre, pasando el alga por un pretratamiento alcalino de NaOH acompañado de una precipitación con etanol [56], para luego poder aplicar una etapa de hidrólisis ácida o enzimática.

Un procedimiento alternativo [4] consiste de una primera etapa de desengrasado, donde se busca extraer ácidos grasos mediante el uso de solventes orgánicos, en particular, una mezcla de cloroformo-metanol seguido de una suspensión con acetona para finalizar con un secado, obteniendo así una biomasa algal libre de grasas y aceites. Luego, el alga desengrasada es calentada en presencia de vapor saturado (autoclave), y posteriormente es tratada con úrea y dializada frente a agua. Así, la solución obtenida es liofilizada y se reporta como la fracción rica en xilano algal [4]. La muestra liofilizada se resuspende en agua destilada y se lleva a cabo una precipitación de xilano con etanol [14], al igual que en el tratamiento para biomasa lignocelulósica terrestre. Una vez obtenido este producto de xilano se puede aplicar una etapa de hidrólisis ácida o hidrólisis enzimática. Esta metodología fue reportada para algas rojas.

1.2.3. Agar: Estructura, extracción y relación con xilano

Los principales coloides que se obtienen de las algas marinas son: alginato, agar y carragenina. En particular, el agar, el principal polisacárido lineal de la pared celular de algunas algas está formado por unidades de 3,6-anhidro-L-galactosa (AHGal) y D-galactosa unidas alternativamente por enlaces glucosídicos α -(1→3) y β -(1→4), estructura que se puede revisar en la Figura 1.12. El principal uso del agar, y de los demás coloides antes mencionados, es en las industrias alimenticia, farmacéutica y biotecnológica, entre otras, debido a su capacidad para formar soluciones y geles altamente viscosos [7, 59].

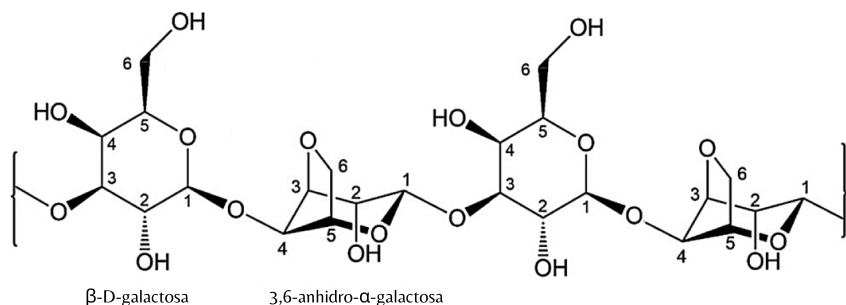


Figura 1.12: Estructura de la molécula de agar [59].

Además del componente gelificante, la galactosa, el agar nativo está formado por un compuesto llamado agaropectina, la que consiste principalmente de principalmente de moléculas de ácido D-glucarónico y ácido pirúvico; la principal característica de la agaropectina es que se trata de un elemento no gelificante dentro de la estructura del agar, por tanto, este suele ser un compuesto descartado en la producción de agar comercial [7, 60].

La función biológica de este compuesto es proporcionar cierta elasticidad resistente a las tensiones de las mareas y las olas. Otra propiedad de interés es su termorreversibilidad, ya que, se funde a 85 °C o a una temperatura levemente superior, dependiendo de las propiedades y composiciones propias de cada agar, pero después de enfriarse tiene la capacidad de volver a convertirse en un gel incoloro e inodoro. Cabe destacar que la gran diferencia entre los puntos de gelificación y de fusión es una característica casi exclusiva de la molécula de agar [7, 59].

El principal interés por el agar en el presente estudio tiene como origen el hecho de que las partes cristalinas y fibrosas de la pared celular algal (celulosa, xilanos, hemicelulosas) están inmersas en una matriz gelatinosa compuesta por polisacáridos carboxílicos y/o sulfatados, encontrándose entre estos últimos la molécula de agar, y de hecho, siendo el principal componente de la matriz en algas rojas [59, 60]. Por tanto, se presume que el agar podría interferir en la extracción de xilano, además, es de interés aprovechar la mayor cantidad de compuestos con valor agregado, por tanto, es atractiva la idea de acoplar el proceso de extracción de agar con la extracción de xilano para la producción XOS, e incluso, la extracción de ficobiliproteínas.

Con respecto al tratamiento alcalino que se aplica en la recuperación de xilano, el agar solubiliza en soluciones alcalinas convirtiéndose la L-galactosa en 3, 6-anhidrogalactosa [61]; y también en agua. Así, la extracción de agar debe llevarse a cabo previo al pretratamiento alcalino.

Cabe destacar que el agar no tiene propiedades bioactivas debido a su carácter polimérico y baja solubilidad en agua. No obstante, los oligómeros de agar presenta una mayor solubilidad en agua y propiedades prebióticas [59].

1.2.4. Producción, Industria y Mercado de los XOS

La materia primera empleada para la obtención de XOS suele ser materia lignocelulósica terrestre, dicho lo anterior, en la Tabla 1.7 se presentan las principales materias primas que se emplean para la producción de XOS, y la composición de xilano y el rendimiento del xilano obtenido relativo al xilano original.

Tabla 1.7: Principales materias primas usadas para la obtención de XOS con sus composiciones porcentuales de celulosa (CEL), hemicelulosa (HEM), lignina (LIG), xilano (XIL), en g/100 g peso seco, y rendimiento de extracción de este último con respecto al xilano disponible [2, 43, 62].

Biomasa	CEL	HEM	LIG	XIL	Rendimiento
Maíz	30-42	31-38	18-22	34,8	83
Trigo	38-41	22-28	20-22	21,2	49,3
Arroz	35	25	12	24,5	-
Tabaco	40,4	-	20,7	21,8	-
Girasol	42,3	-	26,5	19,1	-
Caña de azúcar	40-43	25-28	23-28	21,2	85
Algodón	30,5	-	26,6	20	-

Destaca la mazorca de maíz (también conocido como choclo) la cual presenta un 34,8% de xilanos con relación al peso seco, en segundo lugar se tiene la paja de arroz con una composición de 24,5% de xilanos, finalmente, los tallos de tabaco también presentan una composición importante de xilanos, alcanzando un 21,8% [2, 43, 62]. Notar que la variedad de materia primas para la obtención de xilano corresponden a desechos de la industria agrícola, esto permite bajar costos de producción y darle viabilidad a la producción de XOS [64].

En términos de regulación, y dada la etapa en la que se encuentra el mercado de XOS, se espera que la aprobación regulatoria regional determine en gran medida su evolución, que a su vez dependerá en gran medida de la inversión en investigación y desarrollo [65].

Por otro lado, se espera que el mercado mundial de XOS crezca de 93 millones de dólares en 2017 a 130 millones de dólares en 2023 [65], aunque otros estudios han entregado datos más conservadores, por ejemplo, también se evaluó en 61 millones de dólares en 2019 y se proyectó que alcance los 81 millones de dólares hasta 2026 [66], pero ambos coinciden en que el mercado de los xilooligosacáridos está en crecimiento.

La particularidad de los XOS dentro de los alimentos con propiedades prebióticas es la baja dosis recomendada para producir efectos sobre la flora intestinal, teniendo uno

de los menores valores en su relación precio-dosis, tal como se puede ver en la Figura 1.13, donde se compara el precio y la dosis recomendada de distintos prebióticos como la lactulosa, los XOS, la inulina, entre otros; además, se puede ver que el precio de los XOS ronda los 27 dólares por cada kilogramo producido [65], aunque otras fuentes sitúan su precio a 22 dólares por kilogramo (en el año 2004) [67].

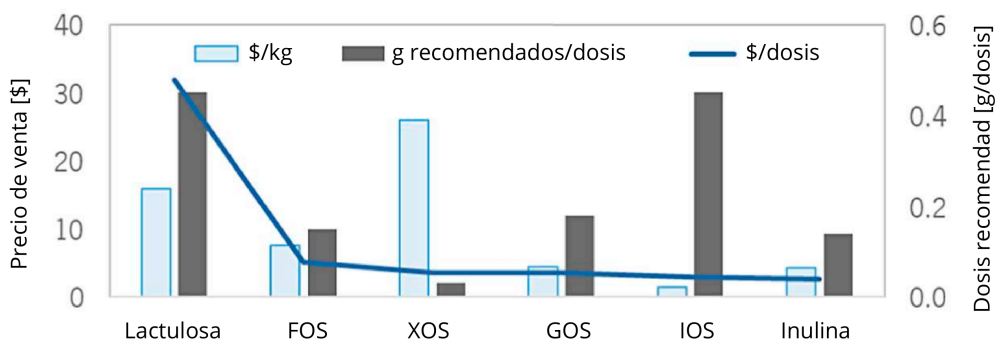


Figura 1.13: Precio y dosis recomendada de distintos alimentos con efecto prebiótico [65].

Actualmente, Japón lidera como el mayor productor y consumidor de XOS a nivel mundial [2], siendo los principales productores: Longlive, Kangwei, Henan, YuHua, Shun-Tian, entre otros [45].

1.3. Objetivos

El objetivo principal del presente estudio es evaluar el potencial de *Agarophyton chilensis*, *Gigartina skottsbergii*, *Porphyra columbina* y *Ulva rigida* como fuente de xilano para la obtención de xilooligosacáridos con potencial prebiótico.

Para llevar a cabo el objetivo principal se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar *P. columbina*, *Ulva rigida*, *Agarophyton chilensis*, *Gigartina skottsbergii* en términos de humedad, cenizas, y componentes macromoleculares.
- Evaluar diferentes condiciones de pretratamiento y extracción de hemicelulosa desde la biomasa algal.
- Caracterizar el contenido de xilano y otros azúcares estructurales de la hemicelulosa extraída de *Agarophyton chilensis*, *Gigartina skottsbergii*, *Porphyra columbina* y *Ulva rigida*.
- Determinar la digestibilidad e hidrólisis enzimática del xilano extraído frente a la acción de una enzima xilanasa, identificando los XOS producidos.

CAPÍTULO

2

METODOLOGÍA

2.1. Materiales

2.1.1. Algas

Las alga *Ulva rigida* y *Agarphyton chilensis* fueron facilitadas por el CeBiB, fueron recibidas deshidratadas y envasadas. Mientras que las algas *Porphyra columbina* y *Gigartina skotsbergii* fueron adquiridas en la Granja Orgánica Budi, tienda que ofrece productos orgánicos y deshidratados del sur de Chile, también fueron recibidas deshidratadas y envasadas.

2.1.2. Reactivos y enzimas

El detalle de los reactivos usados durante la presenta investigación, junto a la(s) etapa(s) en la que se emplearon cada uno de ellos, se puede revisar en el Anexo B.1. La totalidad de reactivos, soluciones y enzimas que se usaron en la metodología experimental fueron facilitados por el CeBiB.

2.1.3. Equipos

Todos los equipos usados en la elaboración de esta investigación se especifican en el Anexo B.2, además, se incluye el detalle de en cuál etapa fueron usados. cada uno de los equipos que se usaron en la metodología experimental fueron facilitados por el CeBiB.

2.2. Metodología Experimental

2.2.1. Metodología experimental general

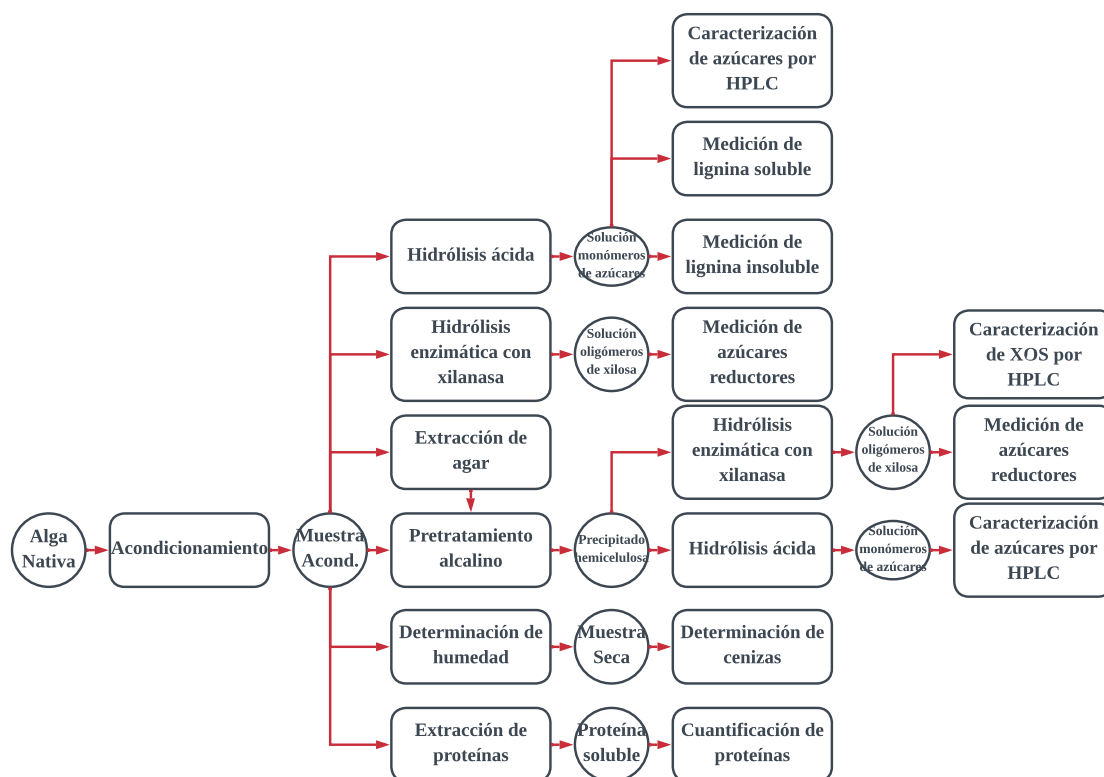


Figura 2.1: Metodología experimental general. en los cuadros se indican los procedimientos y/o ensayos que se realizaron, mientras que en círculos se exhiben los productos y/o intermediarios.

A modo de resumen, y para una mejor comprensión global del estudio que se presenta en este documento, en la Figura 2.1 se muestra un diagrama de la metodología general, donde se exponen las distintas etapas del proceso y cómo estas se relacionan entre sí. Cabe mencionar que todos los datos experimentales empleados para la sección de Resultados se presentan entre el Anexo C y el Anexo I.

2.2.2. Acondicionamiento de muestras

Previo a la etapa de extracción de agar y recuperación de xilano se llevó a cabo un acondicionamiento de muestras que consistió, en primera instancia, en el lavado con agua destilada en vasos precipitados, donde se dispusieron 30 g de alga seca y se llenaba hasta hasta completar los 400 mL de volumen aproximadamente. Se dejó descansar por 10 minutos para posteriormente, con ayuda de una gasa y envolviendo el alga hidratada, remover el exceso de agua por presión. Luego, las algas fueron secadas en una estufa a 60 °C durante 48 horas.

Finalmente, las algas lavadas y secadas fueron procesadas en una trituradora y luego tamizadas, considerando para el presente estudio solo la fracción entre 20 y 60 Mesh. Las algas tratadas se almacenaron en envases cerrados, y en un lugar oscuro y seco.

2.2.3. Extracción de agar

Para la extracción de agar [68] se incubaron 10 g de muestras acondicionadas con NaOH al 3% p/v en una proporción de 1:20 (alga a la solución alcalina) a 25 °C durante 5 horas con una agitación de 150 rpm. Luego, las muestras se calentaron a baño maría a 85 °C durante 1 hora con agitación constante. El alga tratada se filtró a presión con gasa, y luego se lavó con 1 volumen de agua destilada. Posteriormente se resuspendió en 20 volúmenes de una solución de H_2SO_4 al 0,025% durante 2 horas, luego se filtró a presión con una gasa.

La muestra neutralizada se colocó en 20 volúmenes de agua destilada a 80 °C y se calentó hasta alcanzar los 90 °C con agitación constante de 150 rpm durante 90 minutos. La muestra se dejó enfriar y se filtró mediante presión con un tamizado a través de una gasa hasta que escurrió todo el líquido. El filtrado libre de agar fue secado a 60 °C hasta peso constante.

Destacar que se busca evaluar si la extracción de agar tiene un efecto significativo sobre la recuperación de xilano, por tanto, se llevaron a cabo dos líneas de investigación paralelas, una que tiene una extracción previa de agar, y otra que inicia directamente con el pretratamiento alcalino.

2.2.4. Pretratamiento alcalino y precipitación con etanol

En primer lugar, se incubaron 5,0 g de muestras acondicionadas en 100 mL de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) a distintas concentraciones: 3%, 6%, 9% y 12% durante 16 horas; cabe dejar en claro que desde ahora en adelante se describe la metodología que se aplicó a cada una de las cuatro líneas experimentales (una por cada concentración de NaOH). Luego, se expuso la muestra a vapor saturado de alta presión en un autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

La precipitación inicia con la centrifugación de la muestra tratada con hidróxido de sodio a 10.000 rpm durante 30 minutos, descartando el precipitado y conservando el sobrenadante. Este último fue neutralizado con ácido clorhídrico (HCl) a 3 [M] hasta llegar a un pH 5,0. Una vez neutralizada la muestra, se añaden tres volúmenes de etanol frío y se procede a centrifugar a 10.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Finalmente el sobrenadante se descarta, mientras que el precipitado es secado a 60 °C hasta peso constante; y una vez seco el precipitado de xilano se pulverizó en un mortero y masó, siendo almacenado en un lugar oscuro y seco a temperatura ambiente para posteriores análisis.

Cabe destacar que para aquellas muestras a las que se les aplicó una extracción de agar

previa solo fueron tratadas con una concentración de NaOH del 9%p/v, no se evaluaron concentraciones distintas.

2.2.5. Análisis de azúcares reductores

Para la cuantificación y corroboración de la presencia de xilano digerible se llevó a cabo un análisis de azúcares reductores mediante un ensayo con DNS. Se prepararon reacciones enzimáticas con xilanasa ENZECO y la hemicelulosa extraída del pretratamiento alcalino sin extracción previa de agar y con extracción previa de agar, también se preparó la misma reacción, pero esta vez teniendo como sustrato directamente la biomasa previamente tamizada y considerando solo fracción >60 Mesh. Todas las reacciones fueron preparadas considerando una concentración de sustrato (hemicelulosa o biomasa) de 10 mg/mL en buffer de acetato de sodio 50 mM a pH 5,0; por otro lado, la solución enzimática fue preparada con 10 $\mu\text{g/mL}$ en el mismo buffer; finalmente, la reacción enzimática se preparó tomando 1,5 mL de la solución sustrato y mezclándola con 0,5 mL de la solución enzimática, esta muestra fue incubada a 50 °C durante 16 horas con agitación constante. Cabe destacar que la hemicelulosa seleccionada para este análisis fue aquella que había sido tratada con una concentración de NaOH del 9%p/v.

Al cabo de 2 y 16 horas, respectivamente, se centrifugaron las soluciones a 11.000 rpm durante 5 minutos, se tomaron muestras de 40 μL y se mezclaron con 40 μL de reactivo DNS, incubando la solución a 99,0 °C durante 5 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se midió absorbancia a 550 nm. Con estos datos, y aplicando la correspondiente curva de calibración (revisar Anexo G) se obtuvo la concentración de azúcares reductores.

Junto a las muestras previamente analizadas, también lo fueron muestras preparadas y tratadas de igual manera, pero sin enzima, por tanto, se pudo evaluar la concentración de azúcares reductores atribuible a la reacción xilanasa - xilano (por la liberación de extremos reductores en la solución), C_{AR} , como la resta (ver Ecuación 2.1) entre ambas concentraciones. El aporte de la enzima como extremo reductor se determinó despreciable, por tanto, no se considera en la ecuación.

$$C_{AR} = C_{AR,enz} - C_{AR,0} \quad (2.1)$$

Donde $C_{AR,enz}$ corresponde a la concentración de azúcares reductores de la muestra con reacción enzimática, mientras que $C_{AR,0}$ es la misma concentración, pero correspondiente a la muestra sin enzima, es decir, el blanco correspondiente.

Por otro lado, a partir de las concentraciones recién descritas, se calculó el rendimiento porcentual de extremos reductores con respecto al xilano disponible [69], $Y_{AR,xil}$, de acuerdo a la Ecuación 2.2.

$$Y_{AR,xil} = \frac{C_{AR} \cdot V \cdot \left(\frac{M_0}{M_m}\right)}{M_{alga} \cdot X_{xil} \cdot 1,13} \quad (2.2)$$

Donde V corresponde al volumen de la muestra que se tomó para el ensayo DNS, 40 μL ; M_0 corresponde a la masa total de hemicelulosa original, es decir, aquella que se obtuvo después del tratamiento alcalino; M_m es la masa de hemicelulosa usada para este ensayo, 20 mg; M_{alga} corresponde a la biomasa usada originalmente para la obtención de la hemicelulosa; X_{xil} es porcentaje de xilano en la biomasa; y finalmente, el factor 1,13 es el valor numérico de la proporción entre los pesos moleculares de la xilosa y el xilano.

2.2.6. Hidrólisis ácida y determinación de lignina

Se depositaron 300 mg de muestra (este procedimiento se aplicó tanto para las algas acondicionadas con el fin de caracterizar el contenido de xilano y celulosa, como también para la hemicelulosa extraída después del pretratamiento alcalino, contrastando las distintas concentraciones de NaOH probadas) en un tubo de ensayo al que se le agregaron 3 mL de ácido sulfúrico al 72 %. Luego, los tubos fueron puestos en una gradilla, y se agitaron durante 1 hora en baño maría a 30 °C. Una vez transcurrido ese tiempo, se diluyó la solución hasta una concentración de ácido del 4 %. Luego, se expuso la muestra diluida a vapor saturado de alta presión en un autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Una vez enfriada la muestra, esta se filtró con un papel filtro de celulosa con poros de 25-30 μm previamente masado; se usó una cámara de filtrado que emplea vacío para generar una diferencia de presiones. Una vez llevada a cabo la filtración se reserva el sobrenadante, mientras que el filtro se lavó con abundante agua, para posteriormente ser secado en estufa a 105 °C hasta peso constante. La diferencia de masa entre el papel filtro previo y posterior a la filtración se reporta como la masa de lignina insoluble. Por otra parte, el sobrenadante se aforó hasta los 100 mL, luego, se tomó una muestra de 200 μl y se agregaron 1.800 μl de buffer, teniendo así una dilución x10 de 2 mL, con esta muestra se procedió a medir absorbancia a 205 nm en celdas de cuarzo contra un blanco preparado con 1 mL de buffer y, la concentración de lignina se determina empleando una curva de calibración (revisar Anexo H), y en consideración del factor de dilución, se reporta la lignina soluble.

Finalmente, la composición de la lignina total presente en cada alga se calcula como la suma de ambas composiciones (lignina soluble e insoluble), y estas se calculan de acuerdo a lo descrito en la Ecuación 2.3, la que da cuenta de cuánta masa de lignina se determinó con respecto a la biomasa usada en el ensayo.

$$\%lignina_{total} = \%Lignina_{sol} + \%Lignina_{ins} = \left[\left(\frac{D \cdot C_{lig,sol}}{C_{biomasa}} \right) + \left(\frac{\Delta M_{lig,ins}}{C_{biomasa} \cdot V} \right) \right] \cdot 100 \quad (2.3)$$

Donde $C_{lig,sol}$ en mg/mL corresponde a la concentración de lignina soluble, D , es el factor de dilución, que en este caso toma el valor de 10; por otro lado, $\Delta M_{lig,ins}$ en mg corresponde a la diferencia de masas entre el papel filtro previo y posterior a la filtración,

y V al volumen al que fue aforada la muestra original, 100 mL; finalmente, $C_{biomasa}$ corresponde a la concentración final de alga, siendo esta de 3 mg/mL.

2.2.7. Caracterización de azúcares por HPLC

2.2.7.1. Caracterización de azúcares estructurales

Con el sobrenadante de la determinación de lignina soluble fue posible determinar monómeros de azúcares por HPLC y estimar la concentración de celulosa y hemicelulosa con sus componentes, además, de determinar la presencia de otros carbohidratos presentes.

Se filtraron 1,5 mL de solución ácida de monómeros de azúcares a través de un filtro de 0,22 micras en viales de 1,5 mL, estas muestras fueron analizadas utilizando una columna de intercambio catiónico fuerte (Aminex HPX-87H, 300×7,8 mm). Se operó a una temperatura de 65 °C, con un flujo de 0,4 mL/min, y con una fase móvil de H_2SO_4 a una concentración de 5 mM. Para la determinación de tiempos de retención y factores de conversión entre área y concentración se usaron estándares y curvas de calibración, las que se pueden revisar en el Anexo F.

Con las concentraciones de azúcares se obtuvo la composición de xilano y glucosa en relación a la biomasa seca (ver Ecuación 2.4) de cada alga, $\%M_{biomasa}$. Por otro lado, también se determinó la composición de celulosa y xilano en cada hemicelulosa recuperada después del tratamiento alcalino, con respecto también a la biomasa seca, $\%M_{hemi}$, y para cada una de las distintas concentraciones probadas (ver Ecuación 2.5).

$$\%M_{biomasa} = \left(\frac{C_{m,biomasa}}{D_{m,M} \cdot C_{biomasa}} \right) \cdot 100 \quad (2.4)$$

$$m = \{xilosa, glucosa\} ; M = \{xilano, celulosa\}$$

Donde $C_{m,biomasa}$ corresponde a la concentración determinada por análisis de HPLC del monómero del azúcar m en la biomasa tratada con ácido, $D_{m,M}$ corresponde al factor de conversión entre monómero del azúcar m a su propio polímero, M ; y finalmente, $C_{biomasa}$ corresponde a la concentración de biomasa usada en el ensayo, siendo esta de 3 mg/mL.

$$\%M_{hemi} = \left(\frac{C_{m,hemi}}{D_{m,M} \cdot C_{hemi}} \right) \cdot \left(\frac{M_{hemi}}{M_{alga}} \right) \cdot 100 \quad (2.5)$$

$$m = \{xilosa, glucosa\} ; M = \{xilano, celulosa\}$$

Donde $C_{m,hemi}$ corresponde a la concentración determinada por análisis de HPLC del monómero del azúcar $m = \{xilosa, glucosa\}$ en la hemicelulosa trata con ácido, M_{hemi} es la masa de hemicelulosa total que se obtuvo después del tratamiento alcalino, siendo esta variable; M_{alga} corresponde a la masa usada al inicio del proceso de extracción, siendo esta de 2,5 g para todas las muestras, excepto para ellas a las que se les extrajo el

agar previamente (10 g), aún así, esa diferencia se compensa con la inclusión del segundo término de la ecuación; y finalmente, C_{hemi} corresponde a la concentración de hemicelulosa usada en el ensayo, siendo esta de 3 mg/mL, salvo aquellos los casos en los que la masa recuperada era menor a 300 mg (revisar Anexo C).

$$Y_M = \frac{\%M_{hemi}}{\%M_{biomasa}} \quad M = \{xilano, celulosa\} \quad (2.6)$$

Finalmente, también se calcularon los rendimientos del xilano recuperado para cada alga, y cada concentración de NaOH usada en el pretratamiento, con respecto al xilano disponible en la biomasa, Y_M , este cálculo se plasma en la Ecuación 2.6.

2.2.7.2. Caracterización de XOS

Para la caracterización de XOS se tomó el sobrenadante de la reacción enzimática descrita en Análisis de Azúcares Reductores y se filtraron 1,5 mL de solución de oligómeros de xilosa a través de un filtro de 0,22 micras en viales de 1,5 mL, estas muestras fueron analizadas utilizando una columna Phenomenex. Se operó a una temperatura de 85,0 °C, con un flujo de 0,3 mL/min, y con una fase móvil que consiste en agua ultrapura. Para la determinación de tiempos de retención y factores de conversión entre área y concentración se usaron estándares y curvas de calibración, las que se pueden revisar en el Anexo F.

2.2.8. Determinación de cenizas

Se calcinó un crisol para asegurarse que este esté libre de cualquier contaminante que pueda dar un error a la hora de masar. Luego, se agrega 1 g de muestra, tamizada y seca, y se calcina en una mufla a 100 °C aumentan la temperatura gradualmente hasta llegar a los 600 °C, una vez se alcanzó dicha temperatura se deja ahí durante 1 horas. Luego, se llevó a la desecadora durante 15 minutos mientras se enfría.

El porcentaje de ceniza fue determinado de acuerdo a la Ecuación 2.7:

$$\% \text{ cenizas} = \left(\frac{M_c - M_{crisol}}{M_{0,c} - M_{crisol}} \right) \cdot 100 \quad (2.7)$$

Donde M_c corresponde a la masa del crisol y la muestra calcinada, M_{crisol} corresponde a la masa del crisol, y $M_{0,c}$ corresponde a la masa del crisol y la muestra previo a la calcinación.

2.2.9. Determinación de humedad

Se secaron vasos precipitados de 500 mL durante 4 horas a 105 °C y se masaron. Luego, se agregó una muestra de 5 g de muestra acondicionada en cada vaso y se secaron en la estufa a 105 °C hasta peso constante (270 minutos aproximadamente), reportando la masa cada 45 minutos una vez iniciado el secado.

El porcentaje de humedad fue determinado de acuerdo a la Ecuación 2.8:

$$\% \text{ humedad} = \left(\frac{M_h - M_s}{M_h - M_v} \right) \cdot 100 \quad (2.8)$$

Donde M_h corresponde a la masa del vaso y la muestra húmeda, M_v corresponde a la masa del vaso, y M_s corresponde a la masa del vaso y la muestra posterior al secado.

2.2.10. Extracción y cuantificación de proteínas

El método de extracción de proteínas consta de 3 etapas consecutivas (ver Figura 2.2), lo que tiene como objetivo solubilizar la mayor cantidad de material proteico.

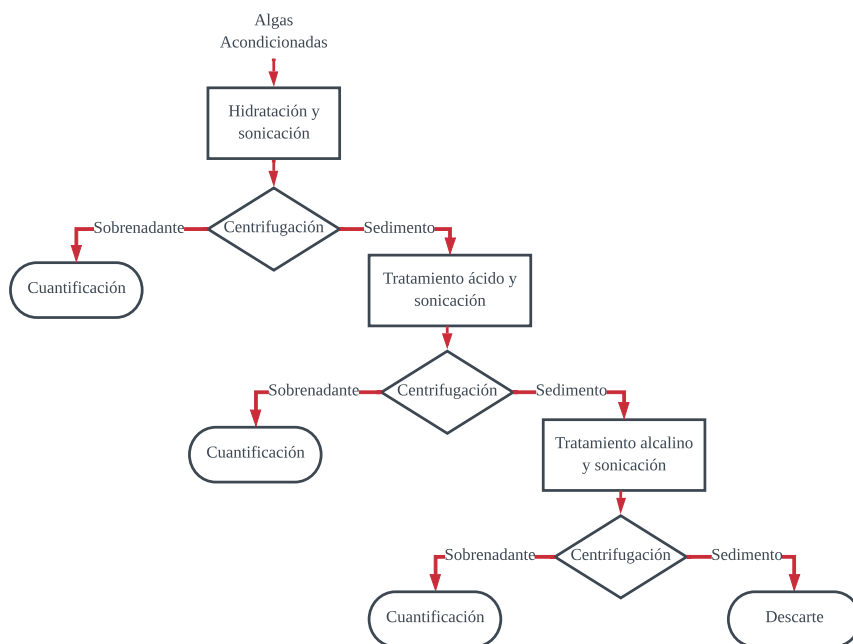


Figura 2.2: Metodología de extracción de proteínas.

Se inicia con una muestra de 100 mg de alga seca tamizada tomando solo fracción >60 Mesh, se resuspende en 2 mL de agua destilada y se somete a sonicación durante 25 minutos, para luego ser centrifugada a 14.000 rpm durante 10 minutos, se toma una muestra del sobrenadante y se cuantifica la concentración de proteínas mediante el Método de Bradford, con la respectiva curva de calibración (revisar Anexo I). Luego, en una segunda etapa, el sedimento que quedó de la etapa anterior es resuspendido en 2 mL de una solución ácida de HCl 0,1 M, y nuevamente se sonica durante 25 minutos, se centrifuga a 14.000 rpm durante 10 minutos y se toma el sobrenadante para determina la composición de proteínas empleando Bradford. Finalmente, el sedimento de la etapa ácida se resuspende en 2 mL de NaOH 0,1 M, se sonica durante 25 minutos, se centrifuga a 14.000 rpm durante 10 minutos y se toma el sobrenadante para determina la composición de proteínas.

La composición porcentual de proteínas de la biomasa se determina con base en la

Ecuación 2.9.

$$\%proteínas = \left(\frac{C_{proteinas}}{C_{biomasa} \cdot Y_{extraccion}} \right) \cdot 100 \quad (2.9)$$

Donde $C_{proteinas}$ corresponde a la concentración de proteínas determinada mediante Bradford, $C_{biomasa}$ a la concentración de biomasa algal seca que se solubilizó, en este caso particular tomando el valor de 50 mg/mL, y finalmente, $Y_{extraccion}$ corresponde al rendimiento del método de extracción con respecto a las proteínas reales de la biomasa, siendo este un 59,76 % [70].

CAPÍTULO

3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización de Algas

Con el fin de obtener información sobre los otros componentes macromoleculares de las algas, como pueden ser proteínas y lignina; y también, para conocer componentes inorgánicos como cenizas y humedad, se llevó a cabo una caracterización de estas propiedades de las algas en estudio. La caracterización de carbohidratos tiene como objetivo identificar y cuantificar el xilano presente en la biomasa, y con ello, poder determinar rendimientos de extracción, entre otras variables.

3.1.1. Humedad y evolución de la biomasa algal seca

La humedad registrada en relación al alga hidratada se detalla en la Tabla 3.1, destacando que las cuatro especies estudiadas presentan una humedad de entre 75-80% aproximadamente. En particular, *A. chilensis* tiene un 77,73% de humedad, *G. skottsbergii* un 80,85%, *P. columbina* un 80,77%, y finalmente, *U. rigida* un 76,22%.

Tabla 3.1: Humedad y masa seca porcentual con respecto a masa hidratada, medida en gramos divididos por gramos de masa algal húmeda.

	Humedad (%)	Masa seca (%)
<i>A. chilensis</i>	77,73 ± 7,33	22,27 ± 7,33
<i>G. skottsbergii</i>	80,85 ± 5,41	19,15 ± 5,41
<i>P. columbina</i>	80,77 ± 3,06	19,23 ± 3,06
<i>U. rigida</i>	76,22 ± 8,14	23,78 ± 8,14

Notar que no existen diferencias significativas entre algas rojas ($79,78 \pm 9,61\%$) y algas verdes ($76,22 \pm 8,14\%$).

El comportamiento de las cuatro algas al momento del secado fue similar (ver Figura 3.1), se asume que las pequeñas variaciones significativas en la evolución del secado se deben a propiedades intrínsecas de las algas como son su morfología, capacidad de retención de humedad, entre otros. Pero en general, presentan un comportamiento homogéneo en términos de secado.

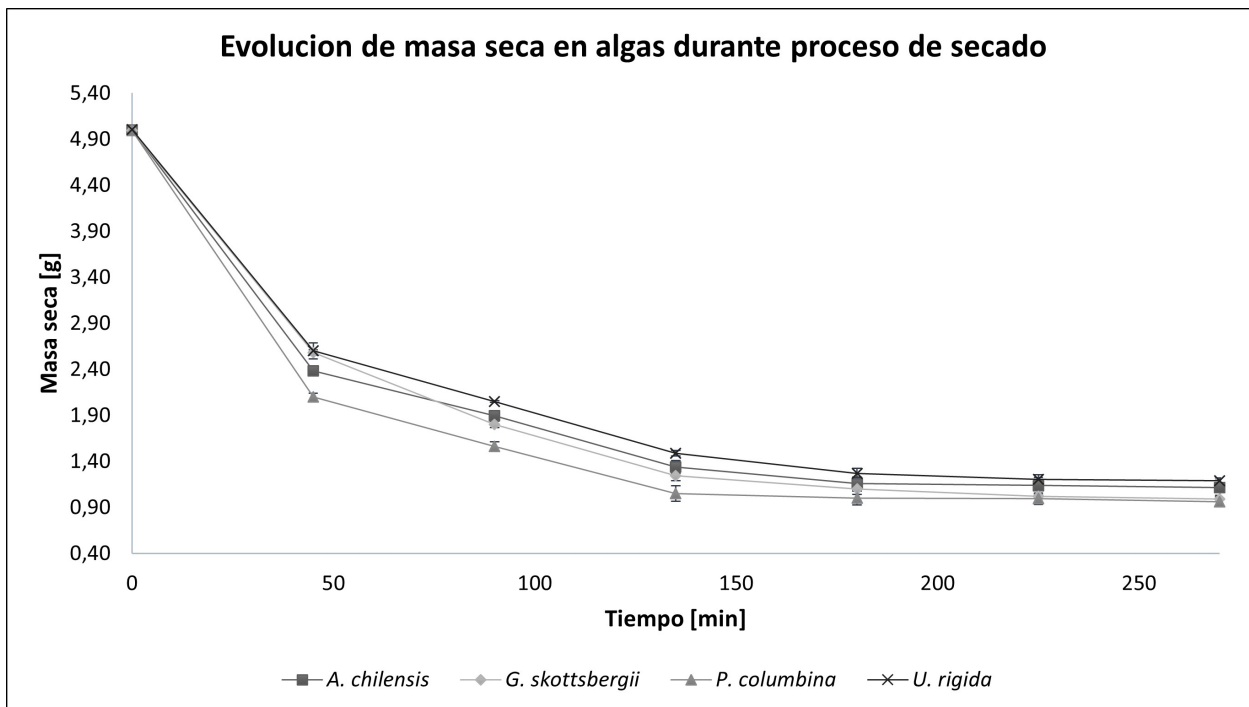


Figura 3.1: Evolución de masa algal seca durante el secado.

Notar que la humedad del alga no influye directamente en la extracción de hemicelulosa, pero sí puede tener un efecto indirecto, afectando la logística del tratamiento de materias primas. Si se desean revisar los datos con mayor detenimiento revisar Anexo D. En general, las algas hidratadas tiene la capacidad de retener agua, alcanzado alrededor del 80% de su peso húmedo, lo que es punto importante a la hora de pensar en la aplicabilidad de este procedimiento, considerando en cuánta agua se debe retirar de la biomasa

3.1.2. Porcentaje de cenizas

Salvo el caso de *P. columbina*, las demás algas se encuentran dentro del rango esperable (ver Tablas 1.2 1.5) en cuanto a su contenido de cenizas con respecto al peso seco (ver Tabla 3.2). En particular, *A. chilensis* tiene un $19,88 \pm 3,35\%$ de contenido de cenizas, *G. skottsbergii* tiene un $30,25 \pm 1,42\%$, *P. columbina* un $11,66 \pm 1,28\%$, mientras que *U. rigida* un $30,11 \pm 2,16\%$.

Tabla 3.2: Composición de cenizas con respecto al peso seco. Medido en gramos de cenizas divididos por la biomasa algal seca.

	Contenido de cenizas (%)
<i>A. chilensis</i>	19,88 ± 3,35
<i>G. skottsbergii</i>	30,25 ± 1,42
<i>P. columbina</i>	11,66 ± 1,28
<i>U. rigida</i>	30,11 ± 2,16

El alga roja *P. columbina* presenta una mayor composición de cenizas a la reportada en estudios anteriores, esto se podría explicar por la sencilla razón del efecto de la estacionalidad sobre las composiciones bioquímicas de las algas [11]. Si se desea ahondar en estos resultados se puede revisar el Anexo E.

3.1.3. Composición de lignina

La lignina insoluble es prácticamente despreciable en cuanto a su aporte a la composición, esta diferencia más que significativa entre lignina soluble e insoluble para las cuatro algas en estudio da cuenta de que prácticamente la totalidad de la lignina algal se logra solubilizar frente a un ambiente altamente ácido. Estas diferencias y los datos de lignina soluble, insoluble y total se presentan en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3: Composición de lignina soluble, lignina insoluble y lignina total con respecto al alga seca, medida en gramos de lignina divididos por gramos de biomasa algal seca.

	Lig. insoluble (%)	Lig. soluble (%)	Lig. total (%)
<i>A. chilensis</i>	0,73 ± 0,01	15,66 ± 0,13	16,40 ± 0,13
<i>G. skottsbergii</i>	0,31 ± 0,01	6,46 ± 0,02	6,77 ± 0,02
<i>P. columbina</i>	0,32 ± 0,02	18,60 ± 0,08	18,92 ± 0,08
<i>U. rigida</i>	0,17 ± 0,01	16,87 ± 0,30	17,04 ± 0,30

Notar que, salvo la paja de arroz ($\sim 12\%$), todas las demás biomásas que se usan para la producción industrial de XOS sobrepasan el 20% de composición de lignina [2][43][62]. Esto es consistente con lo reportado anteriormente, las algas presentan un menor porcentaje de lignina en su estructura [13]; esto se puede fundamentar desde un punto de vista estructural influenciado por el ambiente, ya que, las algas en un entorno marino requieren de una flexibilidad mayor [7], así, por un lado se tiene una menor presencia de un agente que aporte rigidez, como la lignina, y por otro, hay presencia de agar en la matriz de las pared celular, compuesto que dota de cierta flexibilidad resistente, propiedad que entregan los azúcares sulfurados como el agar.

Cabe destacar que la menor presencia de lignina se puede interpretar como una ventaja frente a materias con un mayor porcentaje de esta molécula [13], ya que facilita la recuperación de azúcares de la pared celular al estar estos en una estructura con menor rigidez y presentar menos interacciones con las moléculas de lignina.

3.1.4. Composición de proteínas

La composición de proteínas fue determinada experimentalmente aplicando el método de Bradford. En cuanto a los resultados de esta caracterización, se obtuvo que *A. chilensis* tiene un $12,05 \pm 1,56\%$ de proteínas, *G. skottsbergii* tiene un $16,82 \pm 1,35\%$, *P. columbina* un $18,94 \pm 1,57\%$, mientras que *U. rigida* un $18,41 \pm 1,77\%$.

Tabla 3.4: Composición de proteínas de algas en estudio. Medida en gramos de proteína con respecto a 100 gramos de biomasa algal seca.

Alga	Proteínas (%)	Proteínas ref. (%)	Referencia
<i>A. chilensis</i>	$12,05 \pm 1,56$	$13,57 \pm 0,38$	[17, 18, 39]
<i>G. skottsbergii</i>	$16,82 \pm 1,35$	$15,28 \pm 0,20$	[17, 63]
<i>P. columbina</i>	$18,94 \pm 1,57$	$26,91 \pm 0,21$	[24, 28, 63]
<i>U. rigida</i>	$18,41 \pm 1,77$	$17,32 \pm 0,71$	[11, 39, 40, 41, 63]

En la Tabla 3.4 se comparan los valores determinados en el presente estudio, junto a valores de composición de proteínas que han sido reportados en literatura. Se observa que no existen diferencias significativas entre la composición de proteínas determinada en el presente estudio frente a la composición reportada en otros estudios, a excepción de la composición de *P. columbina*, esta diferencia se puede atribuir a cambios en al estacionalidad del alga. El caso de *G. skottsbergii* es particular, ya que no se tenían antecedentes sobre la composición de proteínas de esta alga, así, la única referencia para comparar era la composición de *G. chamissoi*; por tanto, se presenta el $16,82 \pm 1,35\%$ de proteína del alga como un resultado sin contrapunto para comparar, y en consecuencia, exclusivo de la presente investigación.

Las proteínas no tienen un papel significativo en la extracción de hemicelulosa y no afectan al proceso de obtención de xilano a partir de biomasa lignocelulósica o algal. Aún así, es deseable que la cantidad de otros componentes en el material a ser procesado sea lo más baja posible. Aunque pensando en el mayor aprovechamiento de materias primas, sería interesante analizar eventualmente lo que ocurre con proteínas de interés comercial, como por ejemplo, ficobiliproteínas.

3.1.5. Caracterización de polisacáridos estructurales

Para la caracterización de celulosa y xilano se hidrolizó a completitud el alga con ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) y se midieron los monómeros liberados, en este caso de

glucosa y xilosa, respectivamente. A partir de esa información se calculó el contenido de celulosa (glucano) y xilano mediante cromatografía de intercambio catiónico fuerte (Aminex HPX-87H, 300×7,8 mm).

Para la identificación de estos monómeros se emplearon los tiempos de retención reportados en Anexo F.1, siendo estos de $12,96 \pm 0,001$ minutos para la glucosa y $13,91 \pm 0,002$ minutos para la xilosa. La columna Aminex HPX-87H, 300×7,8 mm, se operó con un flujo de 0,4 mL, una temperatura de 65 °C y con una fase móvil de H_2SO_4 a una concentración de 5 mM.

Por otro lado, los tiempos de retención reportados para el xilano medido en las muestras, tanto de biomasa como de hemicelulosa, oscilaron entre 13,74 y 13,88 minutos; siendo estos menores que el tiempo medido para una solución de xilosa estándar, según bibliografía. Así, ante la sospecha de que lo que se estaba midiendo no fuera xilano, sino otros compuestos con tiempos de retención similares, como por ejemplo, xilosa modificada con alguna ramificación, galactosa (principal compuesto del agar) y manosa (otro azúcar estructural de paredes celulares algales), que tienen tiempos de retención de 13,76 y 13,74 minutos, respectivamente. La primera de ellas se descartó, ya que el tratamiento ácido produce que el agar libere galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa [71], y a su vez, la galactosa en medio ácido reacciona de manera tal que forma ácido galactárico, e incluso, ácido múxico [72], lo que se evidenciaría en un cambio en su tiempo de retención. Por otro lado, para el caso de la hemicelulosa, que fue extraída con un tratamiento alcalino, la misma galactosa, en presencia de alcalí, reacciona convirtiéndose en 3,6-anhidro-L-galactosa [61]. Respecto a la manosa, se tiene el antecedente que los métodos de hidrólisis ácida con H_2SO_4 en algas solubilizan glucosa, xilosa, ramnosa y manitol; pero no manosa [73], y este parece ser el punto definitivo para apoyar la hipótesis que lo que se está determinando por cromatografía de intercambio iónico no es galactosa, ni manosa, sino xilosa.

Cabe decir que los tiempos de retención de la glucosa (entre 12,99 y 12,66 minutos) también tuvieron variaciones con respecto al estándar; pero en este caso, de los azúcares candidatos a formar parte de la pared celular, ninguno se encontraba cerca del peak de elución de este azúcar, por tanto, se asume que estas variaciones, y también las experimentadas en los tiempo de retención de la xilosa, son atribuibles a interacciones y/o cambios conformacionales en las moléculas de glucosa y xilosa, respectivamente. Además, el mismo uso continuo de la columna de cromatografía se puede percibir en estos pequeños cambios en los tiempos de elución.

Luego, se determinó la composición porcentual (en gramos de polímero por cada 100 gramos de biomasa seca) de celulosa y xilano, de acuerdo a lo planteado en la Ecuación 2.4. Se obtuvo que *A. chilensis* tiene un $6,59 \pm 0,7\%$ de celulosa y un $9,26 \pm 1,11\%$ de xilano; *G. skottsbergii* $1,5 \pm 0,02\%$ de celulosa y $25,59 \pm 0,07\%$ de xilano; *P. columbina* un $0,81 \pm 0,09\%$ de celulosa y $12,6 \pm 1,51\%$ de xilano, y finalmente, *U. rigida* $6,61 \pm 0,15\%$ de celulosa y un $0,97 \pm 0,19\%$ de xilano. Estos datos se exhiben en la Figura 3.2,

y cuya obtención se puede revisar en el Anexo F.1.

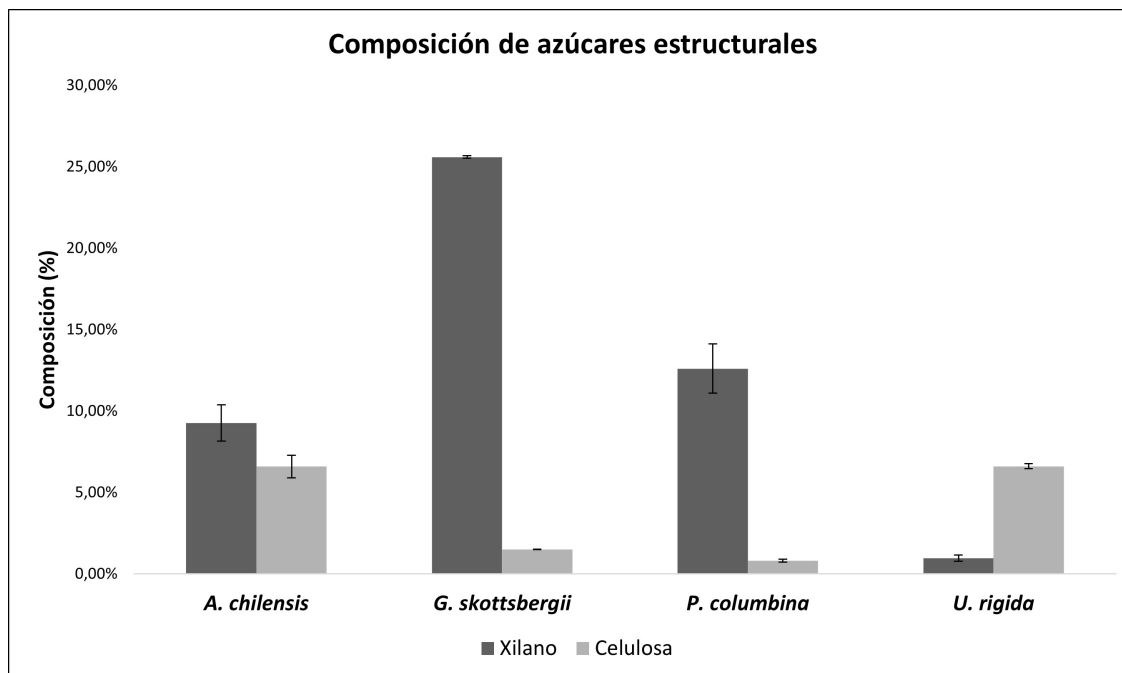


Figura 3.2: Composición de celulosa y xilano de las algas estudiadas, medida en gramos de polímero con respecto a gramos de biomasa seca.

Para las algas rojas *A. chilensis*, *G. skottsbergii* y *P. columbina* se evidencia una predominancia, en términos de composición, del xilano contra la celulosa como azúcar estructural (ver Tabla 3.5), donde *G. skottsbergii* presenta la mayor proporción entre estos dos azúcares, teniendo en su estructura 17 veces más, aproximadamente, xilano que celulosa. Por otro lado, *U. rigida*, alga verde, presenta una relación opuesta al identificar en su estructura casi 7 veces más celulosa que xilano (relación xilano/celulosa de 0,15). Un aspecto a destacar de las composiciones carbohidratos en algas es que tanto los porcentajes totales y específicos de azúcares están fuertemente influenciados por la estacionalidad [11].

Tabla 3.5: Relación xilano/celulosa en *A. chilensis*, *G. skottsbergii*, *P. columbina* y *U. rigida*, medida en gramos de xilano en la biomasa algal con respecto a los gramos de celulosa en la biomasa algal.

	Relación Xilano/Celulosa
<i>A. chilensis</i>	1,41
<i>G. skottsbergii</i>	17,03
<i>P. columbina</i>	15,53
<i>U. rigida</i>	0,15

Los resultados obtenidos son consistentes con investigaciones previas, ya que las algas verdes se caracterizan por su complejidad en términos de la diversidad de azúcares y

polisacáridos sulfatados [11], lo que amplía la gama de posibles azúcares estructurales presentes en la pared celular. Por otra parte, la menor presencia de moléculas con xilano en las algas verdes puede explicarse por el hecho de que los compuestos que contienen xilano (o D-xilosa) en su estructura son principalmente xiloglucanos, los cuales funcionan como azúcares estructurales y se encuentran en menor cantidad en comparación con otros azúcares estructurales como el ulvano y la celulosa insoluble [9, 11]. Asimismo, la presencia relativamente alta de celulosa puede estar relacionada con la presencia de almidón, polímero que está formado por glucosa, como fuente de reserva energética en este tipo de algas [11]. Por lo tanto, existe la posibilidad de que la cantidad de celulosa esté sobreestimada, ya que podría incluir celulosa hidrolizada que originalmente correspondía a almidón, lo cual está fuertemente influenciado por factores ambientales. En estudios previos, se reporta que la composición de xilosa en algas verdes oscila entre un 2,1 % y un 12,0 % [11], cifra mayor a la determinada en el presente estudio ($0,98 \pm 0,19\%$), lo que podría indicar que la hidrólisis ácida no logró monomerizar todo el xilano o que este resultado está influenciado por factores estacionales o intrínsecos al cultivo del alga en particular.

En el caso de las algas rojas, el xilano se encuentra en la matriz en forma de (1→3)(1→4)- β -D-xilano y también como componente de la fase cristalina de la hemicelulosa, donde puede existir en forma de (1→3)-D-xilano o (1→4)-D-xilano. Es importante mencionar que los xilanos con enlaces β -(1→3) se han encontrado en algas con una baja o nula presencia de celulosa en sus paredes celulares [11, 46]. El contenido de celulosa reportado en algas rojas varía entre un 3,8 % y un 17,2 % [11, 74], mientras que el contenido de xilano es altamente variable, principalmente debido al método de extracción utilizado, con un rango de 3,0 % a 34,0 %.

Las composiciones obtenidas para *A. chilensis*, *G. skottsbergii* y *P. columbina* ($9,26 \pm 1,11\%$, $25,59 \pm 0,29\%$ y $12,60 \pm 1,51\%$, respectivamente) se encuentran dentro de este espectro. Además, estudios anteriores han demostrado que la celulosa en las algas rojas se encuentra en cantidades mucho menores en comparación con otras fuentes [11], y también es menor en comparación con el contenido de xilano [75]. Estas son consideradas como las principales razones del alto contenido de xilano en las algas rojas en relación con su composición de celulosa. Sin embargo, es importante tener en cuenta que estos resultados podrían verse influenciados por una posible hidrólisis incompleta, ya que las composiciones de celulosa para *G. skottsbergii* y *P. columbina* ($1,5 \pm 0,02\%$ y $0,81 \pm 0,09\%$ respectivamente) son más bajas de lo reportado anteriormente, o bien, pueden estar afectados por el efecto de la estacionalidad.

En comparación con otras biomásas lignocelulósicas utilizadas en la producción industrial de xilooligosacáridos, todas las algas estudiadas presentan un contenido de celulosa inferior (oscilando entre el 30 % y el 42 %) [2, 43, 62]. Además, en cuanto al contenido de xilano (que varía entre el 19 % y el 35 %) [2, 43, 62], se observa que *G. skottsbergii* podría ser la más adecuada para la posible producción de XOS, ya que presenta un 25,59

$\pm 0,07\%$ de xilano en su estructura, dentro del rango de las biomásas lignocelulósicas y significativamente más alto que las otras algas estudiadas. Sin embargo, es importante tener en cuenta que este factor no debe ser el único considerado al evaluar el potencial para la producción de XOS.

3.1.6. Análisis global: Caracterización de algas

Finalmente, se puede formar un perfil parcial de la composición bioquímica de las cuatro algas en estudio, esto se muestra en la Figura 3.3, donde se observa la composición de xilano, celulosa, proteínas, lignina y cenizas.

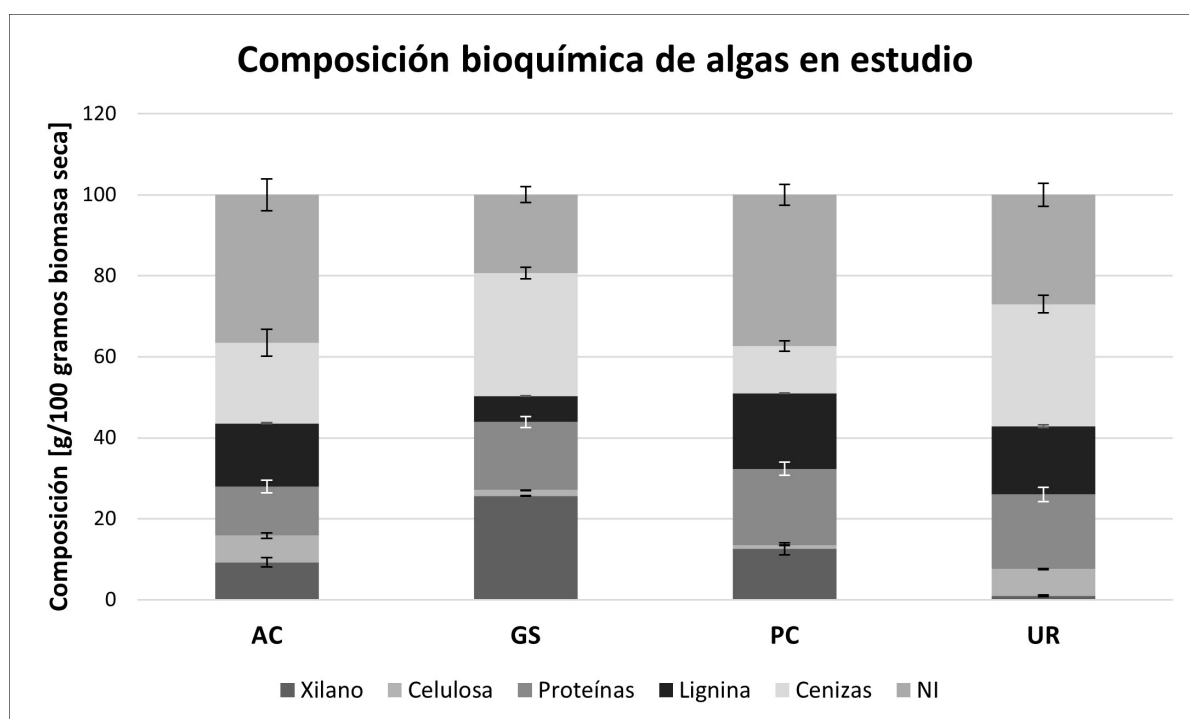


Figura 3.3: Caracterización bioquímica de *A. chilensis* (AC), *G. skottsbergii* (GS), *P. columbina* (PC) y *U. rigida* (UR) en términos porcentuales. NI: No identificado. Medido en gramos por cada 100 gramos de biomasa seca.

El porcentaje de biomasa no identificada en términos bioquímicos se asocia a lípidos y otros azúcares que conforman molecularmente a la célula algal.

3.2. Efecto de las condiciones de extracción de hemicelulosa

Con tal de saber cuánto xilano fue recuperado tras el proceso de extracción con alcali, se llevó a cabo una hidrólisis ácida completa de la hemicelulosa extraída y se identificaron y cuantificaron los monómeros de xilosa.

3.2.1. Composiciones de hemicelulosa extraída

La composición de celulosa y xilano con respecto a la hemicelulosa extraída a partir del pretratamiento alcalino se muestran en las Figuras 3.4 y 3.5 (los datos tabulados se encuentran en el Anexo C.3), respectivamente.

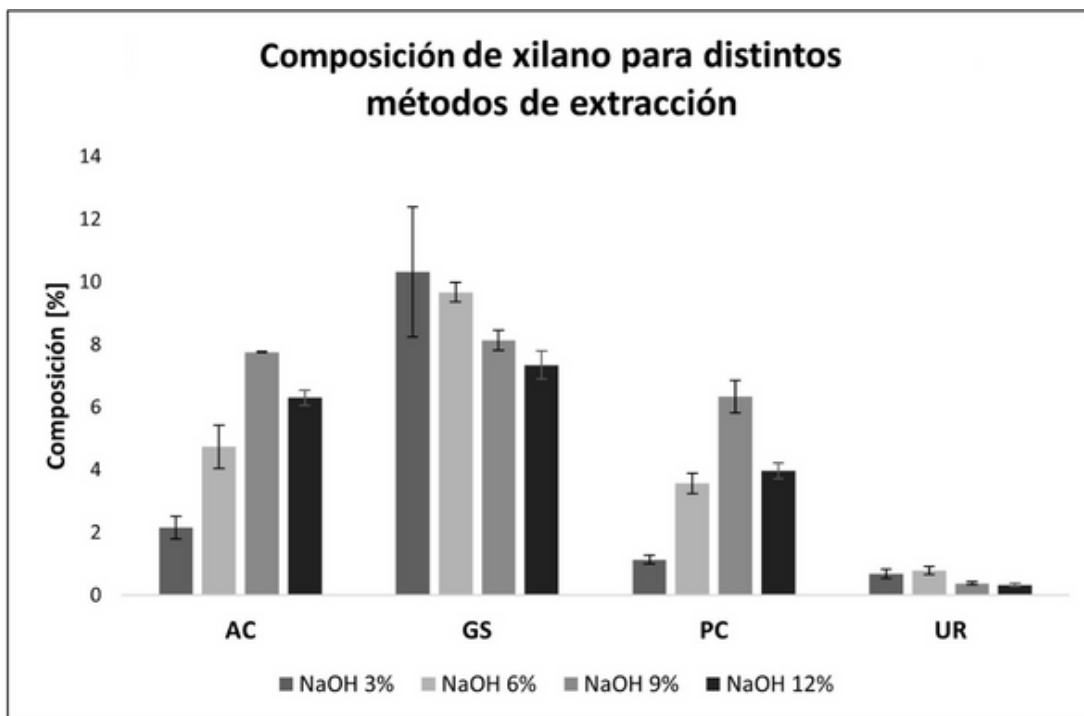


Figura 3.4: Contenido porcentual de xilano en la hemicelulosa extraída con distintas concentraciones de NaOH. Medido en gramos de xilano con respecto a gramos de hemicelulosa obtenida. AC: *A. chilensis*; GS: *G. skottsbergii*; PC: *P. columbina* y UR: *U. rigida*.

La hemicelulosa que presenta una mayor composición de xilano es aquella que se extrajo a partir de *G. skottsbergii* con un 7,35 - 10,32 %p/p, dependiendo de la concentración de NaOH que se usó en el pretratamiento, obteniendo el mayor valor al usar NaOH 3%, cabe mencionar que las diferencias de composición al usar un tratamiento con NaOH 6% y NaOH 3% no presentan diferencias significativas. Por otro lado, los valores para *A. chilensis* y *P. columbina* oscilan entre 2,16 - 7,76 %p/p, y 1,14 - 6,34 %p/p, respectivamente; alcanzando su valor máximo al ser tratados con alcali al 9%. Finalmente, para *U. rigida* estos resultados se encuentran entre un 0,33 y un 0,79 %p/p, al presentar una baja composición de xilano en comparación a las otras algas, los análisis posteriores de esta sección no ponderan en demasía los resultados obtenidos para esta alga. Por tanto, la concentración óptima de NaOH, en términos de extracción de xilano, varía dependiendo del alga que se está tratando; obteniendo los mejores resultados para concentraciones de NaOH de un 6% y 9%.

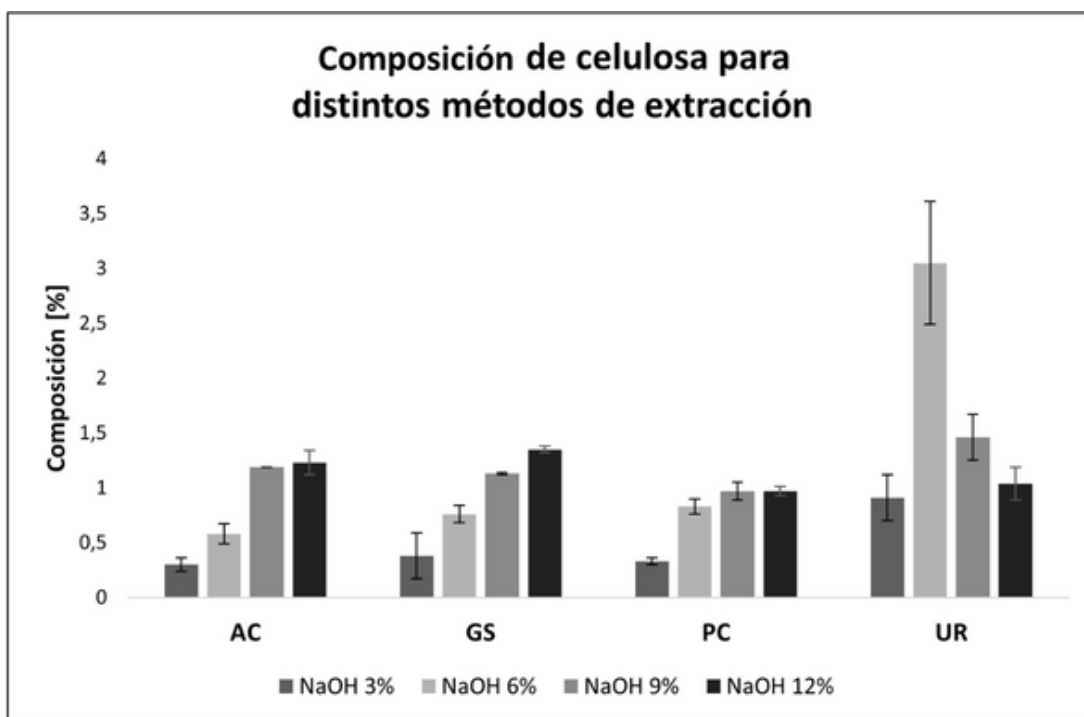


Figura 3.5: Contenido porcentual de celulosa en la hemicelulosa extraída con distintas concentraciones de NaOH. Medido en gramos de celulosa con respecto a gramos de hemicelulosa obtenida. AC: *A. chilensis*; GS: *G. skottsbergii*; PC: *P. columbina* y UR: *U. rigida*.

Para algas rojas se observa un comportamiento común, la composición de celulosa en la hemicelulosa recuperada aumenta a medida que la concentración de NaOH se hace mayor. En cambio, la hemicelulosa del alga verde, *U. rigida*, presenta otro comportamiento, pues la máxima composición de celulosa se alcanza para un alcali a concentración 6 %p/v, siendo este valor, además, considerablemente alto con respecto a cualquier otro valor de composición de celulosa para cualquier alga en estudio y cualquier otra concentración de alcali empleada.

Es deseable, en términos de la pureza de nuestro xilano, que la composición de celulosa sea lo más bajo posible. En esta línea, el tratamiento con un alcali de NaOH 3% es el mejor procedimiento, ya que los porcentajes de celulosa son los menores para las cuatro algas analizadas. El segundo mejor tratamiento corresponde a aquel que emplea una concentración de NaOH de 6%. El comparar la proporción entre xilano y celulosa recuperados se puede evidenciar qué tan selectivo es el tratamiento alcalino con respecto al xilano por sobre la celulosa (ver Figura 3.6).

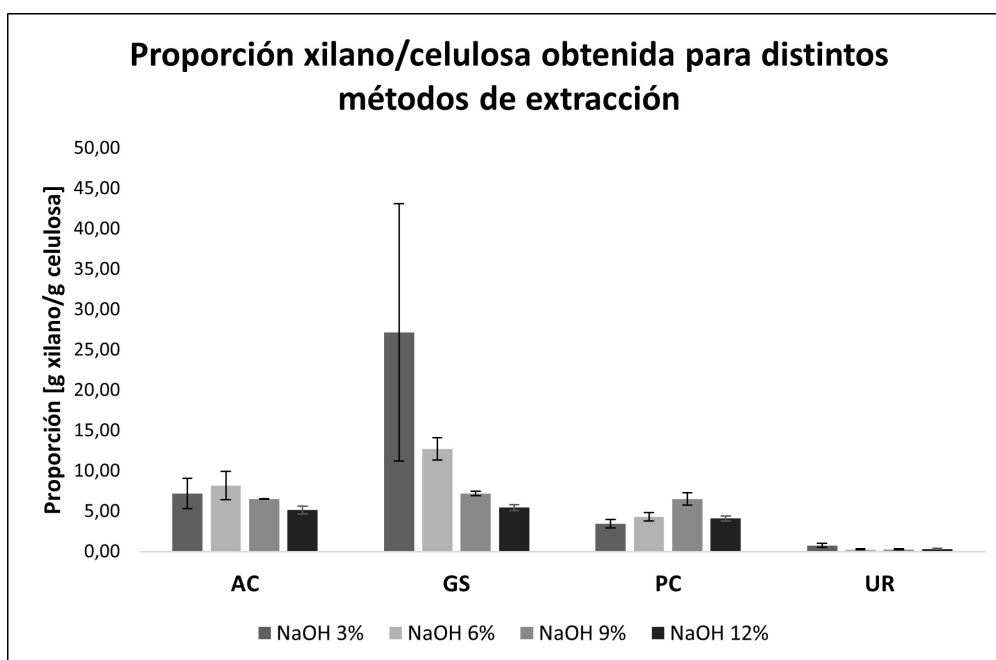


Figura 3.6: Proporción entre xilano y celulosa recuperados con distintas concentraciones de NaOH. Medido en gramos de xilano con respecto a gramos de celulosa recuperada. AC: *A. chilensis*; GS: *G. skottsbergii*; PC: *P. columbina* y UR: *U. rigida*.

Para *G. skottsbergii* la mayor proporción se obtiene al ser tratado con NaOH 3% y 6% sin diferencias significativas, mientras que *A. chilensis* y *P. columbina* obtienen sus valores máximos para NaOH 9%. Por tanto, en términos de xilano recuperado con respecto a celulosa recuperada, el mejor tratamiento alcalino es aquel con NaOH 6% (*G. skottsbergii*) y 9% (*A. chilensis* y *P. columbina*).

En consideración de todas las observaciones, la mejor concentración de NaOH en el tratamiento alcalino es de 6%. Por otro lado, las algas *A. chilensis* y *P. columbina* presentan una mejor extracción al ser tratadas con un alcali de NaOH 9%.

En cuanto a la procedencia de la celulosa, lo primero en aclarar es que la celulosa identificada no corresponde a monómeros hidrolizados provenientes de los componentes cristalinos de la pared celular (ya que estos deberían ser removidos en el tratamiento alcalino), por tanto, se postula que su origen serían los xiloglucanos en algas verdes, mientras que para algas rojas estos podrían provenir de glucanos de enlaces mixtos que conforman la hemicelulosa de algunas algas de este tipo [11]. Otra hipótesis respecto a esto es la procedencia de alguna posible contaminación que haya ocurrido en el proceso.

En general, la hemicelulosa de *U. rigida* tiene un menor contenido de xilano (0,33 - 0,79%) en relación a las demás hemicelulosas, y además, un mayor contenido de celulosa, oscilando entre 0,91 - 3,05%, nuevamente, dependiendo de la concentración de álcali. Por otro lado, para algas rojas se ve que la relación anterior se invierte, teniendo un mayor

porcentaje de xilano en la hemicelulosa extraída. Ambos resultados son consistentes con los resultados de composición de biomasa.

Comparando las algas, *G. skottsbergii* es la que presenta una mayor composición de xilano, con valores entre 7,35 % y 10,32 %, siendo estos superiores a cualquier otra alga en estudio, con cualquier concentración de NaOH usada en el tratamiento alcalino. En síntesis, la mejor opción, en términos de rendimiento del pretratamiento alcalino, es el uso de *G. skottsbergii* con un alcali de NaOH 6 %.

Por otro lado, los resultados de contenido porcentual de xilano y celulosa, al haberse aplicado un proceso previo (al tratamiento alcalino) de extracción de agar, se exhiben en la Tabla 3.6. Cabe recordar que las algas solo fueron tratadas con una concentración de 9%p/v de NaOH.

Tabla 3.6: Contenido porcentual de celulosa y xilano en la hemicelulosa extraída con previa extracción de agar y tratamiento alcalino a una concentración de 9%p/v de NaOH. **ND:** No detectado. Medido en gramos de xilano o celulosa con respecto a gramos de hemicelulosa obtenida.

Alga	Composición [g / 100 g biomasa seca]	
	Xilano	Celulosa
<i>A. chilensis</i>	3,84	1,26
<i>G. skottsbergii</i>	ND	ND
<i>P. columbina</i>	0,77	0,06
<i>U. rigida</i>	0,05	0,53

En todos los casos, el contenido de xilano baja en comparación con el proceso sin extracción de agar (Figura 3.4 o Tabla C.3), este fenómeno se podría deber en gran medida a la pérdida de biomasa en el proceso de extracción de agar (punto que se profundiza en la siguiente Sección). Como resultado interesante destaca el hecho de que la la composición de *A. chilensis* es la menos afectada en términos relativos, tanto de xilano como de celulosa. Por tanto, la extracción de agar, si bien es beneficiosa en términos de aumentar la cantidad de xilano disponible (ver Sección 3.2.2), tiene como contrapunto la pérdida de biomasa en el proceso.

Una posible explicación de esta baja en el contenido de xilano, al menos en algas rojas, y sin considerar la pérdida de biomasa, puede ser la etapa de solubilización de agar en agua a 80°, ya que, en este tipo de algas, el xilano se presenta como componente de la matriz de la pared celular, la que se encuentra débilmente interactuando con los demás componentes, además, el (1→4)-D-xilano es altamente soluble en agua, sobre todo a temperatura altas, al igual que la agarosa, por tanto, se plantea que parte del xilano fue arrastrado con el agar en el proceso de extracción [11, 76].

3.2.2. Rendimiento de xilano recuperado con respecto a xilano disponible en biomasa

Un factor clave para evaluar el potencial de estas algas en la obtención de XOS es el rendimiento de xilano con respecto al xilano de la biomasa, es decir, qué fracción del xilano que se encuentra en el alga se logra recuperar tras el tratamiento alcalino, (ver Figura 3.7) en el proceso de extracción de hemicelulosa.

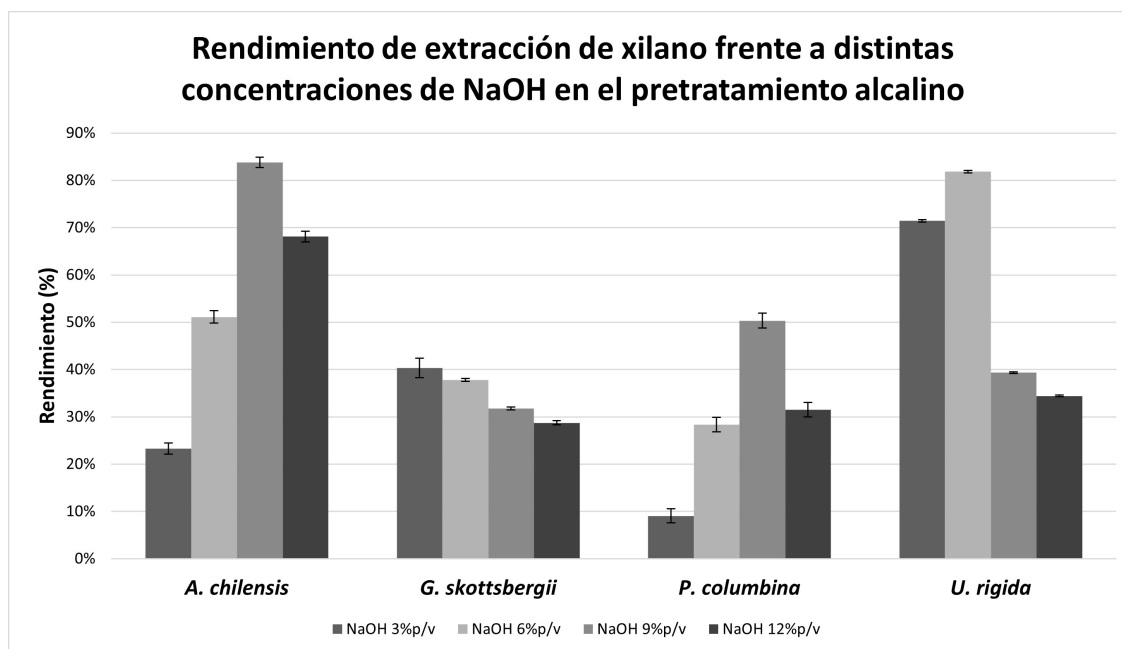


Figura 3.7: Rendimiento de xilano frente a distintas concentraciones de NaOH. Medido en gramos de xilano recuperados versus gramos de xilano disponible en biomasa; concentración de NaOH medido en %p/v.

Nuevamente, se evidencia que la concentración del alcali tiene un efecto considerable en la recuperación del polímero. Para *A. chilensis* se pasa de un $23,29 \pm 1,16$ % al tratarlo con una concentración de de 3%p/v, a un $83,78 \pm 1,11$ % para la concentración de 9%p/v, implicando un aumento de casi 3 veces el valor con la concentración menor, luego este valor desciende, asumiendo que el óptimo para esta alga se encuentra en 9%p/v de NaOH; el valor máximo de rendimiento para esta alga se equipara al que presentan materias primas lignocelulósica como el maíz (83 %) y la caña de azúcar (85 %), lo que da cuenta de una buena recuperación de xilano. La hemicelulosa de *P. columbina* describe un comportamiento análogo, pasando de un rendimiento del $9,06 \pm 1,51$ % con un tratamiento de 3%p/v a un $50,34 \pm 1,6$ % al ser tratado con un álcali de 9%p/v, exhibiendo el óptimo en esta concentración.

Por otro lado, *G. skottsbergii* es el alga que menos parece verse influenciada por la concentración de NaOH en el proceso de extracción, teniendo un comportamiento descendiente a medida que aumenta la concentración, iniciando con un $40,31 \pm 2,07$ % de rendimiento cuando fue tratada con 3%p/v de hidróxido, llegando a un $28,73 \pm 0,45$ %

para la concentración de 12 %p/v. Finalmente, *U. rigida* ve su máximo rendimiento a una concentración de 6 %p/v, llegando a un valor de $81,82 \pm 0,23$ %.

En resumen, cada alga parece tener un óptimo, en términos de recuperación de xilano, de concentración de NaOH empleada en el pretratamiento alcalino, siendo esta de 9 % para *A. chilensis* y *P. columbina*, 6 %p/v para *U. rigida*, y de 3 %p/v para el alga *G. skottsbergii*. En esta línea, siempre será una ventaja el empleo de la menor cantidad posible de reactivos, por tanto, *G. skottsbergii* parece tener una ventaja en este sentido, aunque en términos de rendimientos absolutos *A. chilensis* es el alga que presenta un mayor atractivo.

En cuanto al proceso que incluye recuperación de agar, los rendimientos obtenidos para una concentración de 9 %p/v de NaOH, e incluyendo una etapa de extracción previa al pretratamiento alcalino, se reportan en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7: Rendimiento de xilano extraído de algas con respecto a xilano disponible en biomasa. **ND:** No detectado. Medido en gramos de xilano recuperados versus gramos de xilano disponible en biomasa.

	Rendimiento xilano %p/p
<i>A. chilensis</i>	$41,49 \pm 2,24$
<i>G. skottsbergii</i>	ND
<i>P. columbina</i>	$6,1 \pm 0,01$
<i>U. rigida</i>	$4,93 \pm 0,08$

En primer lugar, un hecho que se observó al llevar a cabo el proceso de extracción de agar, es que este se lleva una fracción más que considerable de la biomasa original, lo que podría influir negativamente en la recuperación del xilano correspondiente, lo que a su vez tendría un efecto sobre los valores de rendimientos obtenidos; esto se atribuye principalmente a la etapa de filtración por gasa, donde ocurrió una pérdida de biomasa que no era retenida por dicho material.

Se evidencia también una disminución de todos los rendimientos de xilano recuperado, lo que podría estar influenciado por la pérdida de biomasa antes comentada, este surge como un punto crítico a la hora de implementar un proceso que incluya la extracción de agar, si es que se desea mantener el rendimiento lo más alto posible. Otra posible razón de la disminución de rendimiento es la solubilización de xilano en agua, ya que, el tratamiento de agar emplea agua a elevadas temperaturas, lo que puede producir que monómeros de xilosa se solubilizan en ella y se vayan en el proceso de extracción.

Notar que *A. chilensis* es el alga que se ve menos afectada (en comparación a las otras algas), pasando de un $83,78 \pm 1,11$ % a un $41,49 \pm 2,24$ %, ambas tras un tratamiento alcalino con NaOH 9 %p/v. Aún así, pese a ser la que describe una menor disminución

en cuanto al rendimiento de extracción de xilano con respecto al xilano disponible en biomasa, este valor se ve disminuido prácticamente a la mitad.

3.2.3. Digestibilidad de xilano extraído frente a la acción de enzima xilanasa

Con el fin de determinar la digestibilidad del xilano extraído se planteó un ensayo que tenía como principio el exponer la hemicelulosa a la acción de una enzima xilanasa con la capacidad de atacar enlaces (1→4). Así, los extremos reductores, determinados por ensayo DNS, corresponden a una medida de la hidrólisis del polímero. Se tomaron muestras para analizar a las 2 y 16 horas de haber iniciado la reacción enzimática (ver Figura 3.8).

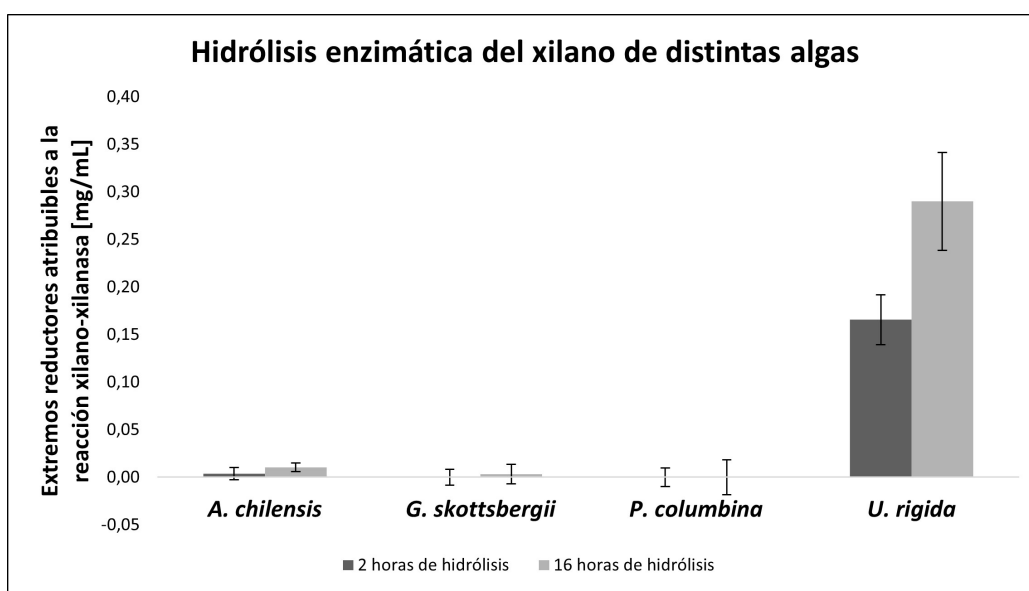


Figura 3.8: Hidrólisis enzimática de xilano extraído de distintas algas. Medido en mg/mL de extremos reductores.

En la hidrólisis enzimática del xilano se aprecia que *U. rigida* es la que destaca considerablemente, llegando a valores de $0,17 \pm 0,03$ mg/mL y $0,29 \pm 0,05$ mg/mL de extremos reductores tras 2 y 16 horas de hidrólisis respectivamente; *A. chilensis* para los mismos tiempos, libera $0,003 \pm 0,006$ mg/mL y $0,01 \pm 0,004$ mg/mL de extremos reductores, respectivamente; para *G. skottsbergii* solo se detectan indicios de hidrólisis tras 16 horas llegando a un valor de $0,003 \pm 0,01$ mg/mL; finalmente, *P. columbina* no reporta resultados que indiquen hidrólisis de xilano para ninguno de los dos tiempos. En términos prácticos no se evidencia hidrólisis en estas dos últimas.

Para comparar la digestibilidad del xilano de hemicelulosa no libre de agar versus hemicelulosa libre de agar, se planteó la misma metodología anteriormente mencionada y se comparan los resultados obtenidos en términos de la digestibilidad del xilano a 2 y 16 horas (ver Figura 3.9). Obteniendo, a grandes rasgos, que hay una diferencia significativa

entre el xilano disponible para la acción enzimática entre ambas muestras.

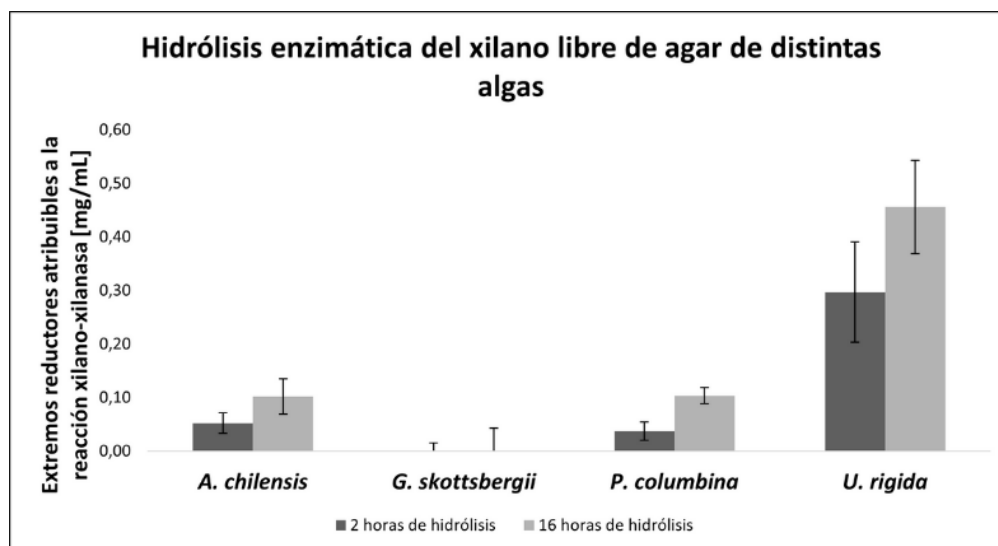


Figura 3.9: Hidrólisis enzimática de xilano libre de agar extraído desde distintas algas. Medido en mg/mL de extremos reductores.

La hidrólisis de xilano libre de agar exhibe que *U. rigida* sigue siendo la que presenta mejores resultados en términos del xilano digerible, con valores de $0,30 \pm 0,09$ mg/mL y $0,46 \pm 0,09$ mg/mL de extremos reductores tras 2 y 16 horas de hidrólisis respectivamente; *A. chilensis* reporta $0,05 \pm 0,02$ mg/mL y $0,10 \pm 0,03$ mg/mL respectivamente; *P. columbina* llega a concentraciones de $0,03 \pm 0,02$ mg/mL y $0,10 \pm 0,04$ mg/mL, respectivamente; nuevamente, *G. skottsbergii* no reporta resultados que indiquen hidrólisis de xilano para ninguno de los dos tiempos.

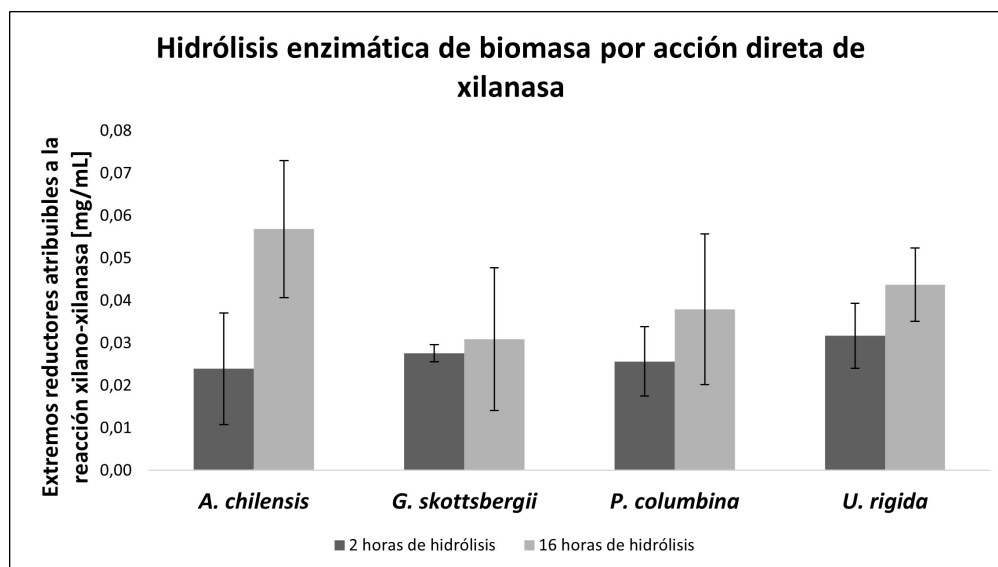


Figura 3.10: Hidrólisis enzimática de biomasa expuesta directamente a la acción de la xilanasa. Medido en mg/mL de extremos reductores.

Como tercer punto de comparación, se expone una muestra de biomasa directamente a la acción enzimática de la xilanasa sin ningún proceso extractivo previo y se midió la cantidad de extremos reductores liberados (ver Figura 3.10), es decir, se está evaluando si la biomasa tiene xilano disponible sin aun haber aplicado algún proceso extractivo.

Los resultados de la hidrólisis de xilano frente a la acción de la xilanasa sobre la biomasa muestran que *A. chilensis* alcanza valores de $0,023 \pm 0,013$ mg/mL y $0,056 \pm 0,016$ mg/mL de liberación de extremos reductores tras 2 y 16 horas de hidrólisis respectivamente; estos valores para *G. skottsbergii* son $0,028 \pm 0,002$ mg/mL y $0,031 \pm 0,016$ mg/mL, respectivamente; *P. columbina* registra valores de $0,025 \pm 0,008$ mg/mL y $0,038 \pm 0,017$ mg/mL; finalmente, *U. rigida* alcanza $0,032 \pm 0,008$ mg/mL y $0,044 \pm 0,009$ mg/mL de extremos reductores asociados a la hidrólisis de xilano. Notar que estos valores son considerablemente (entre 5 a 10 veces) menores a los asociados al proceso de hidrólisis enzimática de xilano libre de agar; por tanto, se confirma que el proceso extractivo aporta a la hora de recuperar una mayor cantidad de xilano digerible.

A las 16 horas de haber iniciado la hidrólisis enzimática se ve claramente que *U. rigida* presenta los mejores resultados en términos de hidrólisis de xilano, alcanzando un valor de $0,29 \pm 0,05$ mg/mL de extremos reductores cuando se suministró como sustrato la hemicelulosa no libre de agar, y $0,46 \pm 0,09$ mg/mL de extremos reductores cuando se suministró la hemicelulosa libre de agar. Por tanto, en esta alga, la extracción de agar se traduce en un aumento de la disponibilidad de xilano digerible, se plantea que esto se debe al desarme de la matriz galacto-sulfatada (agar y otros azúcares sulfatados, como ulvanos) que sufre el alga en el proceso de extracción de agar, descubriendo así la hemicelulosa cristalina conformada por xilano y otros azúcares, y permitiendo que la enzima acceda con mayor facilidad a este. Por tanto, se ve que en *U. rigida* la extracción de agar, si bien, implica una gran pérdida de biomasa, tiene como beneficio una mayor disponibilidad de los xilanos digeribles que se encuentran en la pared celular. Se plantea que la procedencia de este aumento está asociado a la liberación de xilosas provenientes de xiloglucanos presentes en algas verdes.

El alga *A. chilensis* pasa de $0,01 \pm 0,004$ mg/mL de extremos reductores a $0,1 \pm 0,03$ mg/mL al analizar la hidrólisis de hemicelulosa con extracción de agar, respectivamente, siendo estos dos diferencias significativas. Al igual que para *U. rigida*, la extracción de agar se traduce en un aumento de la disponibilidad de xilano digerible, se plantea que esto se debe al desarme de la matriz galacto-sulfatada (agar). Luego, *P. columbina* presenta un comportamiento análogo.

Por otro lado, *G. skottsbergii* no presentó indicios de hidrólisis de xilano por acción de la enzima xilanasa, aún cuando en su hemicelulosa sí se había determinado la presencia de xilano. Esto da cuenta de dos posibles hipótesis: por un lado, podría ser que lo caracterizado en esta hemicelulosa de *P. columbina* no es xilano, lo que a su vez, daría cuenta de la alta especificidad de la enzima, al no hidrolizar esta enzima, confirmando así la

presencia de xilano en las demás algas; o bien, que hubieran factores que no permitieron a la enzima acceder y/o degradar el xilano presente, como puede ser la predominancia de enlaces (1→3) en la estructura del xilano, enlaces que se han reportado en algas con un bajo contenido de celulosa como azúcar estructural, lo que sería consistente con los resultados de caracterización de biomasa, pues, esta alga es la que presentó la segunda menor composición de celulosa. Suena interesante extender el análisis de *G. skottsbergii* para corroborar o refutar el potencial de esta alga para la producción de XOS, ya que, no sería viable analizando solo estos resultados.

En cuanto a la hidrólisis de xilano obtenida tras la exposición de la biomasa a la enzima, esta es significativamente menor con relación al proceso con involucra extracción de agar, lo que da indicios de que el proceso de extracción alcalina y extracción de agar sí estaría aportando un efecto considerable en el aumento de disponibilidad de xilano disponible. El caso de *G. skottsbergii* es interesante, ya que, frente a ambos tratamientos, tanto el que incluye la extracción de agar como el que no, los valores son inferiores en términos de xilano hidrolizado tras la acción de la enzima, evidenciando un posible efecto negativo de estos procesos extractivos para esta alga en particular.

Luego de 16 horas de hidrólisis enzimática, se observa una mayor producción de extremos reductores para todas las algas y todos los sustratos analizados (hemicelulosa y biomasa), manteniendo la predominancia de *U. rigida*, situándose como el alga que presentó mayor hidrólisis de xilano, destacando con $0,28 \pm 0,05$ y $0,46 \pm 0,09$ mg/mL de extremos reductores para los procesos con y sin extracción de agar, respectivamente. Concerniente a estos últimos, se puede ver que se sigue manteniendo una diferencia significativa entre ellos. El xilano que está presente en algas verdes del género *Ulvophyceae* se suele encontrar en forma de xiloglucano, moléculas conformadas por un esqueleto de celulosa con sustituciones monoméricas de D-xilosa enlazadas con enlaces (1→6), por tanto, no es esperable que la enzima tenga la capacidad de digerir estos enlaces; así, la otra forma de xilano presente en estas algas es como (1→3)(1→4)-D-xilano que tiene la función de remplazar a la celulosa como componente estructural en ciertas algas verdes o en ciertas etapas de la vida de dichas algas, se presume este xilano como la fuente de los azúcares reductores cuantificados en este ensayo por acción enzimática de la xilanasa.

La digestión de las hemicelulosas de *A. chilensis* y *P. columbin* tras aplicarles solo el tratamiento alcalino pasa de $0,01 \pm 0,004$ mg/mL y "No detectado." a $0,10 \pm 0,03$ y $0,10 \pm 0,04$ mg/mL de extremos reductores al analizar la hidrólisis de hemicelulosa con extracción de agar, respectivamente. Lo que exhibe un aumento del xilano digerible por la enzima al aplicar una extracción previa de agar, resultados consistente con la hidrólisis de 2 horas; y también, un aumento con respecto a los resultados obtenidos para ese mismo tiempo.

La determinación de la actividad atribuible a la acción enzimática xilanasa - xilano se detalla en el Anexo G, aunque es importante destacar, para que no quede duda alguna,

que la enzima no aporta actividad medida por el espectrofotómetro, esto se concluyó a partir de comparar las absorbancias entre una muestra blanco (buffer) y una muestra que contenía buffer y enzima a la misma concentración empleada para las demás muestras (ver Tabla 3.8), observando que no existen diferencias significativas.

Tabla 3.8: Actividad asociada a la enzima. Medida en absorbancia a 550 nm.

	Blanco	Enzima
Absorbancia	0,062 ± 0,021	0,068 ± 0,024

Posteriormente, se obtuvieron los rendimientos de azúcares reductores atribuibles a la acción de la enzima, los que dan cuenta de la hidrólisis de xilano, con respecto al xilano disponible en cada biomasa, es decir, se está determinando qué fracción del xilano disponible originalmente se está hidrolizando, resultados que se muestran en la Figura 3.11. Y junto a esto, también se expone el rendimiento de la enzima en la hidrólisis de xilano en términos de los mg de azúcares reductores por cada mg de enzima usado en la hidrólisis (ver Figura 3.12). Ambas variables se obtuvieron en base a los resultados de la hidrólisis de 16 horas.

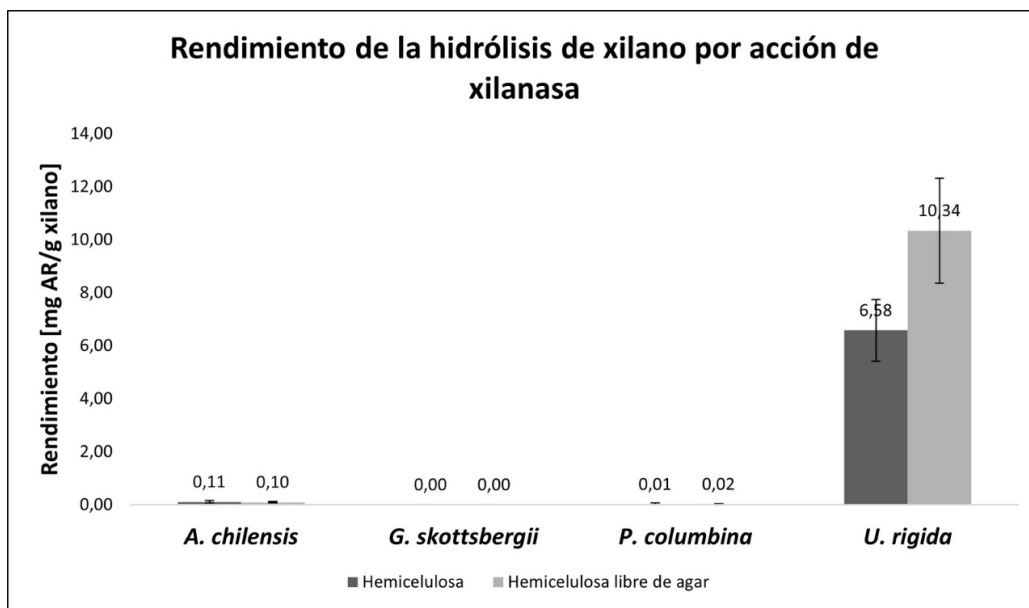


Figura 3.11: Rendimientos de hidrólisis de xilano con respecto al xilano disponible en biomasa. Medido en miligramos de azúcares reductores divididos por gramos de xilano disponible en cada alga.

Los resultados de rendimientos de hidrólisis que se obtuvieron al usar la hemicelulosa como sustrato proveniente de *A. chilensis*, *G. skottsbergii*, *P. columbina* y *U. rigida* son $0,11 \pm 0,04$, $0,01 \pm 0,04$, $0,0$, $6,58 \pm 1,17 \text{ mg}_{AR}/\text{g}_{xilano}$ tras 16 horas de hidrólisis, respectivamente. Por otro lado, al usar hemicelulosa libre de agar como sustrato, los re-

sultados para las mismas algas fueron $0,10 \pm 0,03$, $0,0$, $0,02 \pm 0,01$, $10,34 \pm 1,98$ mg/mL de extremos reductores tras 16 horas de hidrólisis, respectivamente.

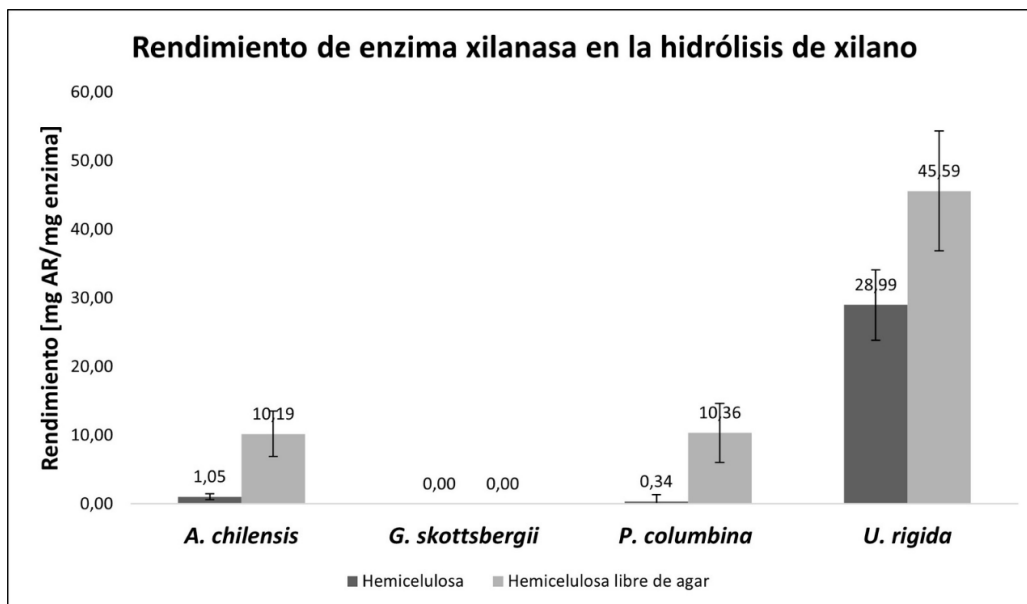


Figura 3.12: Rendimientos de enzima con respecto a la hidrólisis de xilano. Medido en miligramos de azúcares reductores de hidrólisis de xilano divididos por miligramos de enzima xilanasa usada en la reacción.

En cuanto a los resultados concernientes al uso de la enzima, usando hemicelulosa como sustrato proveniente de *A. chilensis*, *G. skottsbergii*, *P. columbina* y *U. rigida* los resultados son $1,05 \pm 0,43$, $0,0$, $0,34 \pm 1,03$, $28,99 \pm 5,14$ mg_{AR}/mg_{enzima} , respectivamente. Mientras que al usar hemicelulosa libre de agar, estos resultados cambian a $10,19 \pm 3,31$, $10,36 \pm 4,28$, $0,0$, $45,59 \pm 8,73$ mg_{AR}/mg_{enzima} , respectivamente.

Desde un punto de vista de valores absolutos, los rendimientos de todas la hidrólisis de xilano de distintas algas, en términos de los azúcares reductores liberados, es considerablemente bajo, encontrándose bajo los valores reportados anteriormente, aunque cabe mencionar que este rango es bastante amplio, obteniendo rendimientos de entre $12,6 - 841$ mg_{AR}/g_{xilano} [65]. Una posible explicación para este fenómeno puede deberse a la complejidad y diversidad de los compuestos que forma el xilano dentro de las paredes celulares algales, y además, a la presencia de enlaces $\beta - (1 \rightarrow 3)$, enlaces que no son preferiblemente digeribles por la enzima podría estar hidrolizando moléculas de xilano con grado de polimerización elevados (mayores a los que demuestran interés por sus propiedades prebióticas y a los que son detectables por la columna de cromatografía), esto sería consistente con los grandes peaks que se pueden encontrar entre los minutos 7 y 11 de los cromatogramas para estas muestras, estos podrían corresponder a moléculas poliméricas de xilano que no se adhieren a la columna, y por tanto, eluyen a tiempos tempranos de la cromatografía.

Por otro lado, los rendimientos para las 3 algas rojas, *A. chilensis*, *G. skottsbergii* y

P. columbina no evidencian diferencias significativas entre la hidrólisis que usa como sustrato la hemicelulosa, en comparación a la hidrólisis que emplea la hemicelulosa libre de agar. Mientras que para el alga verde *U. rigida* se ve una tendencia al alza comparando ambas hemicelulosa.

En resumen, los rendimientos de hidrólisis enzimática, si bien aumentan con la extracción de agar, en general siguen siendo muy bajos, siendo el más destacable el que se alcanza con la hemicelulosa de *U. rigida*, alcanzando solo el 1,03% de rendimiento con respecto al xilano disponible en el alga, es decir, casi el 99% del xilano no se estaría hidrolizando, lo que da cuenta de que la enzima no está actuando sobre el xilano, ya sea porque este no está estereológicamente disponible (especialmente la enzima no puede acceder), o bien, accede, pero no es capaz de degradarlo, esto posiblemente por la presencia de enlaces 1,3- β y/o 1,6- β .

3.3. Producción de XOS desde xilano de algas

3.3.1. Identificación y cuantificación de XOS

En la Figura 3.13 se muestran los XOS producidos desde hemicelulosa algal por hidrólisis enzimática, mientras que en la Figura 3.14 se presentan los XOS producidos desde hemicelulosa algal libre de agar por hidrólisis enzimática. Cabe mencionar que la identificación y cuantificación de cada xilooligosacárido se llevó a cabo usando los tiempos de retención y factores de conversión expuestos en el Anexo F.3, además, para las concentraciones de la Tabla F.41 se considera un volumen inicial de 250 mL.

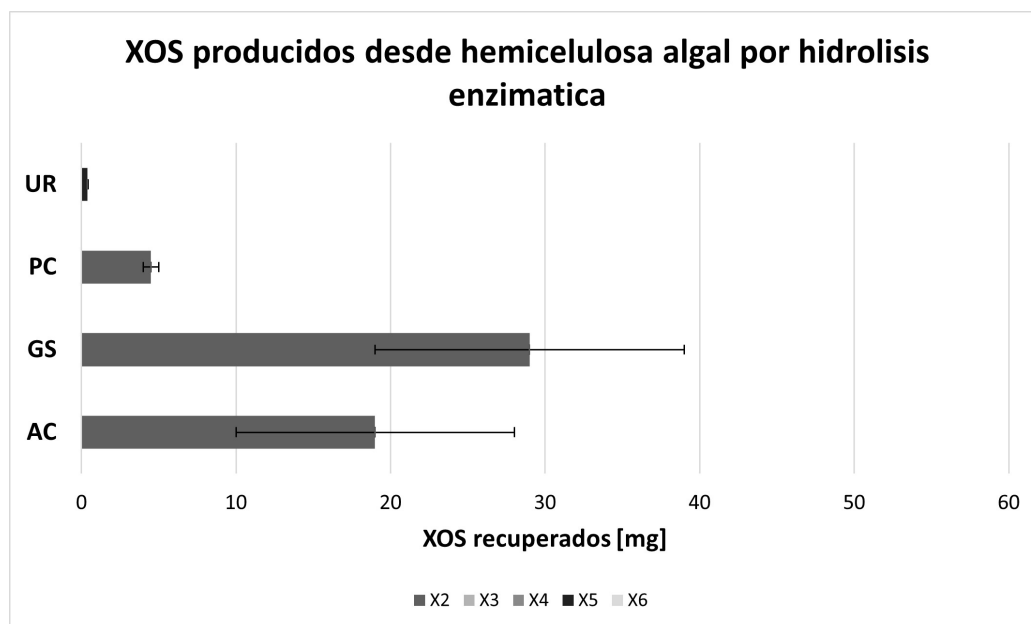


Figura 3.13: Masa de XOS producidos desde hemicelulosa algal por hidrólisis enzimática, proveniente de *A. chilensis*, *G. skottsbergii*, *P. columbina* y *U. rigida*. Medido en miligramos de XOS.

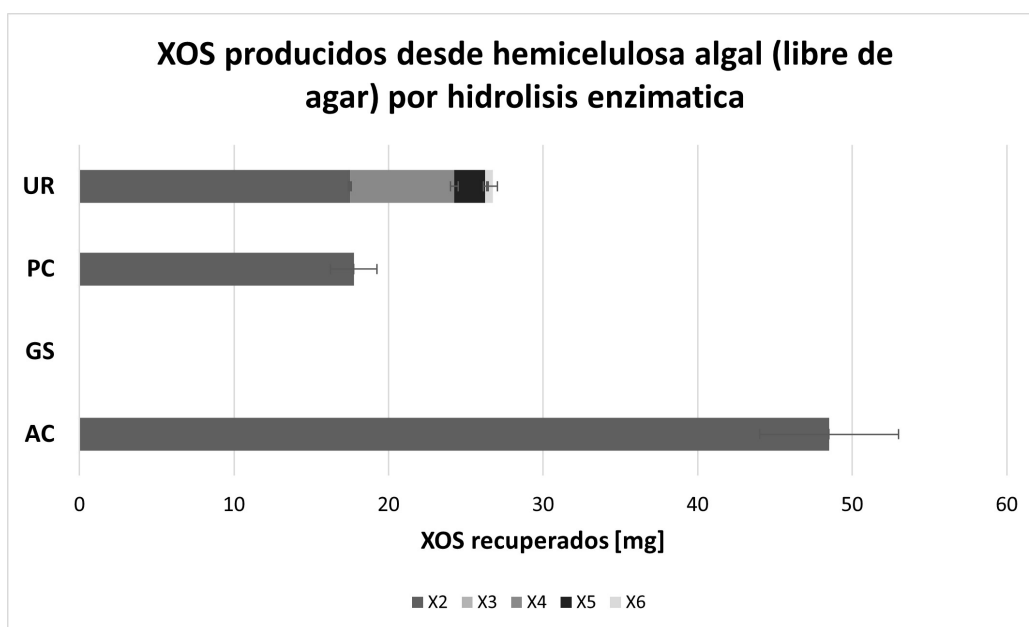


Figura 3.14: Masa de XOS producidos desde hemicelulosa algal (libre de agar) por hidrólisis enzimática, proveniente de *A. chilensis*, *G. skottsbergii*, *P. columbina* y *U. rigida*. Medido en miligramos de XOS.

La masa de XOS producidos a partir de hemicelulosa algal para cada alga es: *U. rigida* $0,38 \pm 0,05 \text{ mg}_{XOS}$, *P. columbina* $4,5 \pm 0,5 \text{ mg}_{XOS}$, *G. skottsbergii* $29,1 \pm 10,1$ y *A. chilensis* $19,11 \pm 9,0 \text{ mg}_{XOS}$. Solo se detectó dímeros de xilosa (X2).

Por otro lado, la masa de XOS producidos a partir de hemicelulosa algal libre de agar para cada alga es: *U. rigida* $17,5 \pm 0,1 \text{ mg}_{XOS}$, $6,75 \pm 0,25 \text{ mg}_{XOS}$, $2,0 \pm 0,11 \text{ mg}_{XOS}$, $0,5 \pm 0,3 \text{ mg}_{XOS}$ (X2, X4, X5 y X6, respectivamente); *P. columbina* $17,75 \pm 1,5 \text{ mg}_{XOS}$, *G. skottsbergii* no se detectaron XOS y *A. chilensis* $48,5 \pm 4,51 \text{ mg}_{XOS}$. A excepción de los XOS obtenidos a partir de la hemicelulosa de *U. rigida*, solo se detectaron dímeros de xilosa (X2).

Los resultados muestran que 3 de las 4 algas en estudio, *A. chilensis*, *P. columbina* y *U. rigida* presentan un comportamiento similar en términos de aumentar la producción másica de XOS si se comparan los miligramos obtenidos a partir de la hemicelulosa libre de agar, con respecto a la hemicelulosa no libre de agar. Además, para el caso particular de XOS producidos a partir de *U. rigida*, también aumenta la variedad de estos, pasando de producir solo X2 a producir X2, X4, X5 y X6.

En cuanto a *G. skottsbergii* se aprecia el caso contrario, ya que al determinar la masa de XOS producida a partir de hemicelulosa libre de agar no se detecta producción alguna de estos compuestos, y por el contrario, sí se evidencia la liberación de XOS cuando la materia prima fue hemicelulosa no libre de agar. Las posibles razones de este fenómeno se explican más adelante.

Para complementar los resultados anteriores, también se presentan la masa de xilosa (X_1) obtenida para cada alga y para cada sustrato, estas se reportan en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9: Masa de xilosa detectada tras la hidrólisis enzimática de hemicelulosa. Medida en miligramos de xilosa.

	AC	GS	PC	UR
HEM	10,1 ± 1,5	87,5 ± 59,9	115 ± 0,25	112,5 ± 15,4
HEM-AGAR	17,5 ± 0,5	2,5 ± 0,03	7,45 ± 0,25	159 ± 7,5

Al usar hemicelulosa no libre de agar como sustrato, la producción másica de xilosa alcanzó valores de $10,1 \pm 1,5$, $87,5 \pm 59,9$, $115 \pm 0,25$ y $112,5 \pm 15,4$ mg_{XOS} para las algas *A. chilensis*, *G. skottsbergii*, *P. columbina* y *U. rigida*, respectivamente. Mientras que al usar hemicelulosa libre de agar, estos valores cambiaron a $17,5 \pm 0,5$, $2,5 \pm 0,03$, $7,45 \pm 0,25$ y $159 \pm 7,5$ mg_{XOS} para cada alga antes mencionada.

Se evidencia que a partir de la hemicelulosa de todas las algas se obtuvo xilosa en concentraciones variables, *U. rigida* con $112,5 \pm 15,4$ mg_{XOS} podría evidenciar que la masa de xilosa recuperada tras la hidrólisis enzimática es consistente con una de las formas en las que se encuentra la xilosa en la pared celular de esta alga, el xiloglucano, molécula cuya estructura consiste en un esqueleto de glucosas unidas con enlaces 1,4 y con sustituciones de D-xilosas unidas a este esqueleto mediante enlaces 1,6; por tanto, se presume que la relativamente alta concentración de X_1 tiene origen en esas xilosas que fueron hidrólizadas. Un punto importante en esta hipótesis es evaluar qué tan capaz es la enzima xilanasa, que tiene afinidad por enlaces 1,4, de degradar enlaces xilosa-glucosa 1,6.

Con respecto *G. skottsbergii* ($87,5 \pm 59,9$ mg_{XOS}), este resultado podría ser consistente con lo exhibido en el ensayo de azúcares reductores, ya que, para esta misma alga no se había percibido un aumento de extremos reductores en presencia de xilanasa, lo que podría explicarse al hecho de que desde un inicio la xilosa se encontraba en forma de monómeros, aunque esta apreciación carece de justificación teórica, ya que, el comportamiento esperado de esta alga debiese ser análoga al de las otras algas rojas; o bien, el xilano presente en esta alga no se ve afectado por la acción enzimática de la xilanasa usada en el presente estudio.

3.3.2. Rendimiento en la producción de XOS

Finalmente, el mejor indicador de qué tan eficiente y productiva es la obtención de XOS a partir de la hemicelulosa algal es el rendimiento con respecto a la biomasa y con respecto a la hemicelulosa extraída. En la Figura 3.15 se exponen los miligramos de xilooligosacáridos obtenidos (incluye todos los grados de polimerización en estudio) por cada gramo de alga procesado. Mientras que, en la Figura 3.16 se exponen los miligramos

de xilooligosacáridos obtenidos (incluye todos los grados de polimerización en estudio) por cada gramo de hemicelulosa recuperada.

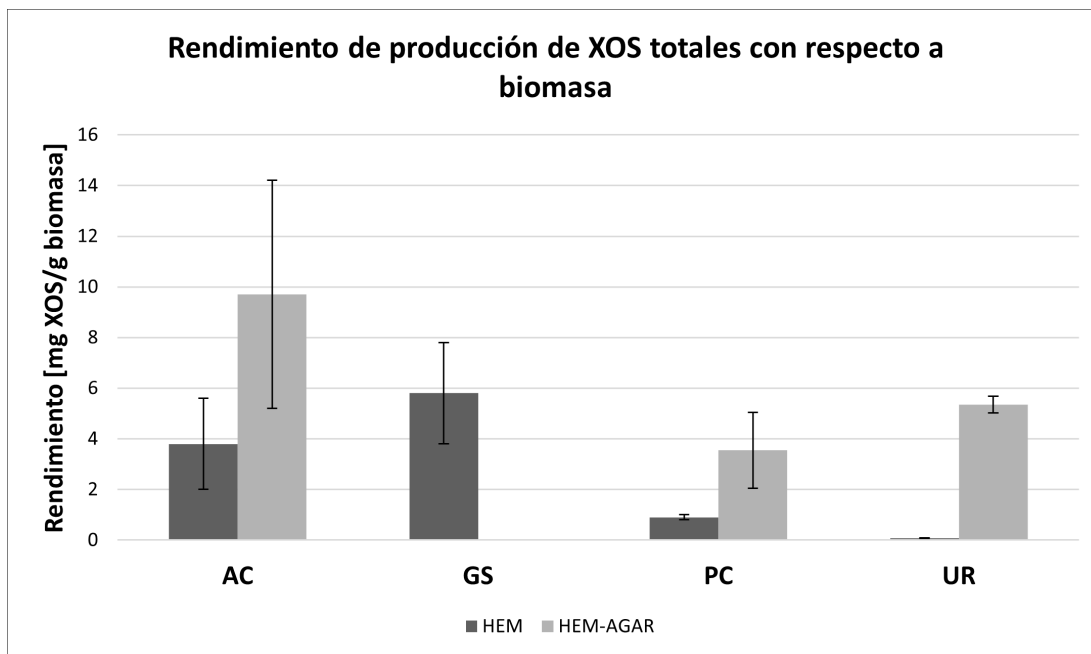


Figura 3.15: Rendimiento de la producción de XOS totales con respecto a la biomasa tratada. Medido en miligramos de XOS con respecto a gramos de biomasa.

Con respecto a la hemicelulosa no libre de agar, *A. chilensis* tiene un rendimiento de $3,8 \pm 1,8$, *G. skottsbergii* $5,8 \pm 2,0$, *P. columbina* $0,9 \pm 0,1$ y *U. rigida* $0,08 \pm 0,01$ $mg_{XOS}/g_{biomasa}$. Mientras que los resultados con respecto a hemicelulosa libre de agar son: *A. chilensis* $9,7 \pm 0,9$, *G. skottsbergii* no se detectaron XOS, *P. columbina* $3,55 \pm 0,3$ y *U. rigida* $5,35 \pm 0,07$ $mg_{XOS}/g_{biomasa}$.

Sin considerar los resultados asociados a *G. skottsbergii*, la extracción de agar tiene un efecto positivo sobre el rendimiento de todas las otras algas en estudio, estos sería consistente con lo expuesto en el análisis de azúcares reductores, ya que en dicho experimento se evidenciaba que el proceso de extracción de agar aumentaba la disponibilidad de xilano digerible, por tanto, era esperable que si se compara el proceso que no incluye una extracción de agar versus el que sí incluye este proceso, se exhibiera un aumento en la producción de XOS.

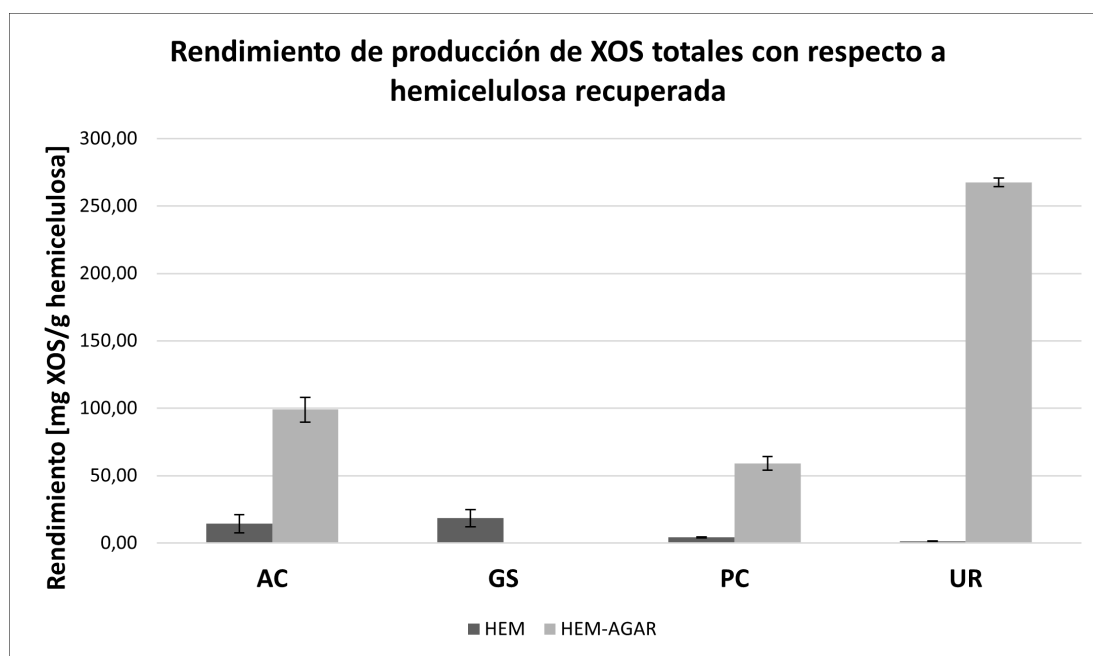


Figura 3.16: Rendimiento de la producción de XOS con respecto a hemicelulosa recuperada. Medido en miligramos de XOS con respecto a gramos de hemicelulosa recuperada.

Luego, viendo los resultados de rendimiento con respecto a la hemicelulosa extraída, al ocupar hemicelulosa no libre de agar, *A. chilensis* tiene un rendimiento de $14,29 \pm 6,77$, *G. skottsbergii* $18,47 \pm 6,37$, *P. columbina* $4,13 \pm 0,46$ y *U. rigida* $1,21 \pm 0,16$ $mg_{XOS}/g_{hemicelulosa}$. Mientras que los resultados con respecto a hemicelulosa libre de agar son: *A. chilensis* $98,98 \pm 9,18$, *G. skottsbergii* no se detectaron XOS, *P. columbina* $59,17 \pm 5,0$ y *U. rigida* $267,5 \pm 3,32$ $mg_{XOS}/g_{hemicelulosa}$.

Los resultados indican que el proceso de extracción de agar tiene un efecto positivo en el rendimiento de la producción de XOS con respecto a la hemicelulosa, a excepción de *G. skottsbergii*. El caso de *G. skottsbergii* tiene un comportamiento contrario, evidenciando un rendimiento relativamente alto (con respecto a otras algas) cuando se hidroliza la hemicelulosa con agar y no detectando XOS cuando se analiza la hemicelulosa libre de agar.

Por literatura, el rendimiento de producción de XOS con respecto al xilano disponible tiene un amplio rango que va desde 12,6 a 481 mg_{XOS}/g_{xilano} [65], esto dependiendo del tipo de biomasa lignocelulósica que se está analizando. Notar que a partir de la composición de xilano en biomasa se pueden obtener los rendimientos esperados de producción de XOS con respecto a biomasa. Así, usando este rango y las composiciones de xilano previamente determinadas, en la Tabla 3.10, se exponen los rendimientos esperados para cada alga y el valor determinado experimentalmente en el presente estudio.

Tabla 3.10: Rendimientos esperados (REF) y experimentales para cada alga. Se reporta el rendimiento al trabajar con hemicelulosa no libre de agar (HEM) y hemicelulosa libre de agar (HEM-AGAR). Medido en miligramos de XOS producidos divididos por gramos de biomasa tratada.

	Rendimiento [$mg_{XOS}/g_{biomasa}$]		
	HEM	HEM-AGAR	REF
<i>A. chilensis</i>	3,8	9,7	1,17 - 77,29
<i>G. skottsbergii</i>	5,8	-	3,22 - 215,23
<i>P. columbina</i>	0,9	3,55	1,59 - 106,01
<i>U. rigida</i>	0,08	5,35	0,12 - 8,14

El rendimiento de producción de XOS a partir de *A. chilensis*, tanto si se aplicó o no el tratamiento de extracción de agar, se encuentra dentro del rango esperado, pero muy cercano al límite inferior (menor rendimiento), esto hace que, en términos de rendimientos, esta alga presente un rendimiento comparable a las biomásas menos eficientes a la hora de producir XOS.

Luego, el rendimiento de *G. skottsbergii* solo fue obtenido para el caso de trabajar con hemicelulosa no libre de agar, y dicho valor, sí se encuentra dentro del rango esperado, pero nuevamente muy cercano al límite inferior (menor rendimiento), esto hace que, en términos de rendimientos, esta alga presente un rendimiento comparable a las biomásas menos eficientes a la hora de producir XOS.

En cuanto al rendimiento de *P. columbina*, al usar la hemicelulosa no libre de agar el valor obtenido no cae dentro del rango esperado, mientras que al emplear hemicelulosa libre de agar este sí se encuentra dentro del rango esperado. Pero, al igual que las otras algas, este último valor se sitúa muy cercano al límite inferior (menor rendimiento), esto hace que, en términos de rendimientos, esta alga presente un rendimiento comparable a las biomásas menos eficientes a la hora de producir XOS.

Finalmente, en lo que respecta al rendimiento de *U. rigida*, al usar la hemicelulosa no libre de agar el valor obtenido no cae dentro del rango esperado, mientras que al emplear hemicelulosa libre de agar este sí se encuentra dentro del rango esperado. Esta vez, a diferencia de las otras tres algas, el valor obtenido se sitúa más cercano al límite superior (mayor rendimiento) que al inferior, esto hace que, en términos de rendimientos, esta alga presente un rendimiento comparable a las biomásas con rendimientos intermedios a la hora de producir XOS.

En general, se puede afirmar que los rendimientos obtenidos coinciden con los valores esperados en relación a la información bibliográfica previa, pero con tendencia a comportarse de manera similar a las biomásas de menor rendimiento dentro de la industria. Una

excepción a esta regla es *U. rigida*, alga que se sitúa como una biomasa competitiva a nivel de rendimiento si se compara con otras biomasa lignocelulósicas.

3.3.3. Análisis global: Producción de XOS

En la Tabla 3.11 se muestran datos relevantes para llevar a cabo un análisis global de cada una de las algas en estudio. En ella se presenta la composición de xilano en unidades de $[g_{xilano,bio}/100 g_{biomasa}]$; el rendimiento de extracción medido en $[g_{xilano,hemi}/g_{xilano,bio}]$; también, rendimiento enzimático medido en $[mg_{AR}/mg_{enzima}]$; rendimiento XOS/biomasa en $[mg_{XOS}/g_{biomasa}]$, y finalmente, el rendimiento XOS/hemi medido en $[mg_{XOS}/g_{hemicelulosa}]$. Estos datos corresponden a los resultados obtenidos al trabajar con hemicelulosa no libre de agar.

Tabla 3.11: Parámetros relevantes en análisis de algas como fuente de xilano para producción de XOS a partir de hemicelulosa no libre de agar.

	Composición xilano	Rendimiento extracción	Rendimiento enzimático	Rendimiento XOS/biomasa	Rendimiento XOS/hemi
AC	9,26 ± 1,11	83,78 ± 1,11	1,05 ± 0,43	3,8 ± 1,8	14,29 ± 6,77
GS	25,59 ± 0,07	50,34 ± 1,6	-	5,8 ± 2	18,47 ± 6,37
PC	12,6 ± 1,51	40,31 ± 2,07	0,34 ± 1,03	0,9 ± 0,1	4,13 ± 0,46
UR	0,97 ± 0,19	81,82 ± 0,23	28,99 ± 5,14	0,08 ± 0,01	1,21 ± 0,16

Los mayores rendimientos relacionados a la producción de XOS los obtiene el alga *G. skottsbergii*, y además, es aquella la que presenta la composición de xilano más alta. Como contrapunto se encuentra, por un lado, el rendimiento de extracción, siendo este el tercero entre las cuatro algas, y por otro lado, el rendimiento enzimático, siendo el más bajo entre las algas en estudio. Se presume que aumentando estos rendimientos se podría recuperar más xilano, y que este sea más digerible por la enzima.

Luego, en la Tabla 3.12 se muestran datos análogos, pero estos corresponden a los resultados obtenidos al trabajar con hemicelulosa libre de agar. Mencionar que se mide en las mismas unidades usadas para la Tabla 3.11.

Tabla 3.12: Parámetros relevantes en análisis de algas como fuente de xilano para producción de XOS a partir de hemicelulosa libre de agar.

	Composición xilano	Rendimiento extracción	Rendimiento enzimático	Rendimiento XOS/bio-masa	Rendimiento XOS/hemi
AC	9,26 ± 1,11	41,49 ± 2,24	10,19 ± 3,31	9,7 ± 0,9	98,98 ± 9,18
GS	25,59 ± 0,07	-	-	-	-
PC	12,6 ± 1,51	6,1 ± 0,01	10,36 ± 4,28	3,55 ± 0,3	59,17 ± 5
UR	0,97 ± 0,19	4,93 ± 0,08	45,59 ± 8,73	5,35 ± 0,07	267,5 ± 3,32

Al aplicar un proceso de extracción de agar, *U. rigida* presenta los valores más alto de rendimiento enzimático, rendimiento XOS/biomasa y rendimiento XOS/hemicelulosa; como contrapunto se tiene su baja composición de xilano y el bajo rendimiento de extracción de xilano, pero superando este último punto se podría proyectar que *U. rigida* logre mayores rendimientos de producción de XOS.

A la hora de comparar ambas tablas se evidencia un aumento considerable en los valores de rendimiento enzimático, rendimiento XOS/biomasa y rendimiento XOS/hemicelulosa para todas las algas en estudio. La principal desventaja que implica llevar a cabo un proceso de extracción de agar es el bajo rendimiento de recuperación de xilano tras la extracción alcalina, en relación al proceso que no implica una extracción de agar.

Por otro lado, en la Figura 3.17 se muestran los rendimientos de cada una de las etapas por la que pasaron las algas rojas en estudio, iniciando desde biomasa seca hasta llegar a la producción de XOS. Destacar que se incluyen rendimientos por etapa y rendimiento global, esto para los dos procesos estudiados: por un lugar aquel que emplea hemicelulosa no libre de agar, y por otro, aquel que usa hemicelulosa libre de agar.

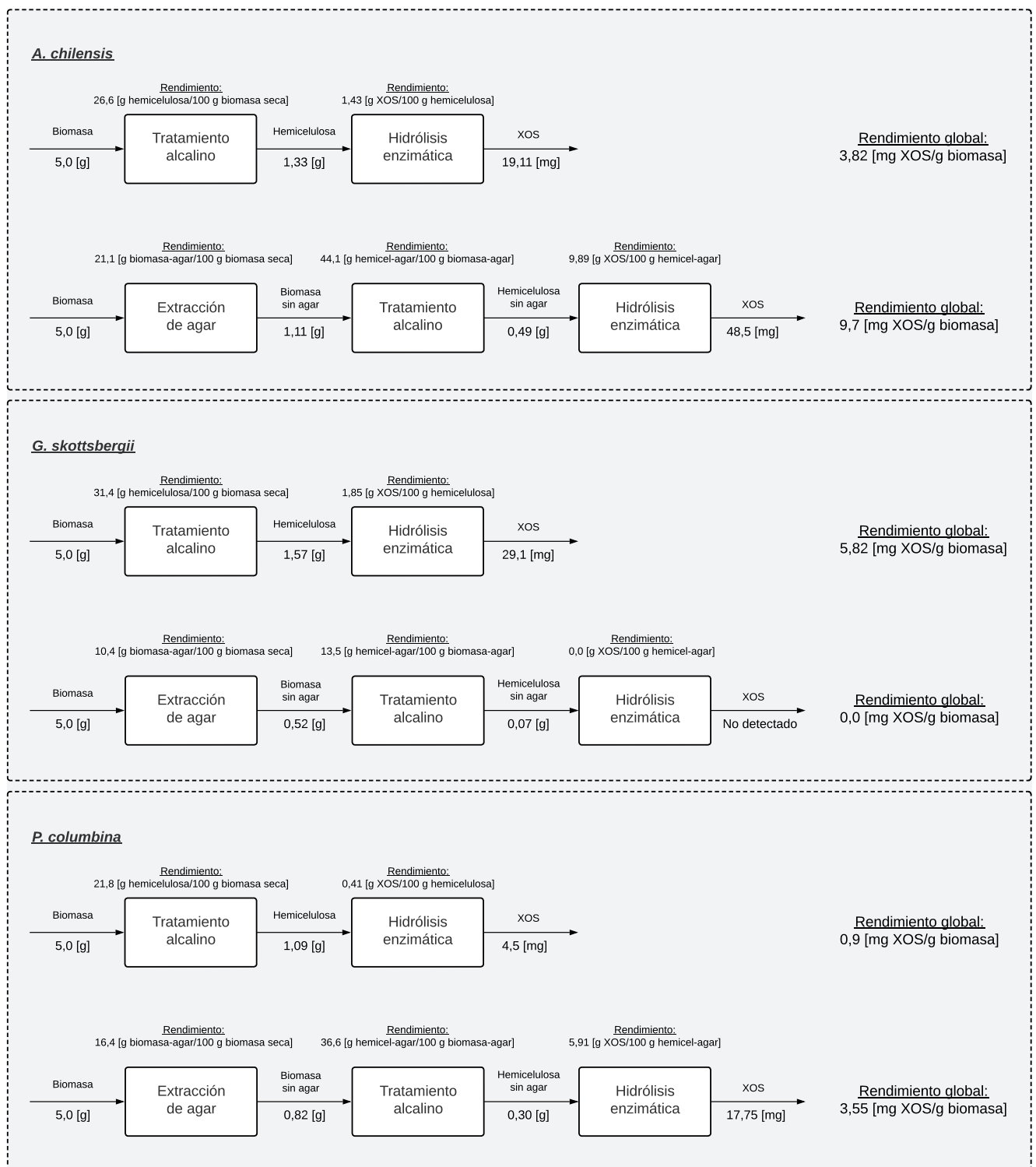


Figura 3.17: Rendimientos de los procesos extractivos y de separación aplicados durante la producción de XOS a partir de algas rojas (*A. chilensis*, *G. skottsbergii* y *P. columbina*).

El esquema no presenta información nueva, pero sí permite una visualización de resultados obtenidos en distintas partes del presente estudio. Se confirma que entre las algas rojas, *A. chilensis* presenta los mejores rendimientos, en particular cuando se trabaja con

le hemicelulosa libre de agar.

De manera análoga, en la Figura 3.18 se plantea lo mismo que en la imagen anterior, pero para el alga verde *U. rigida*.

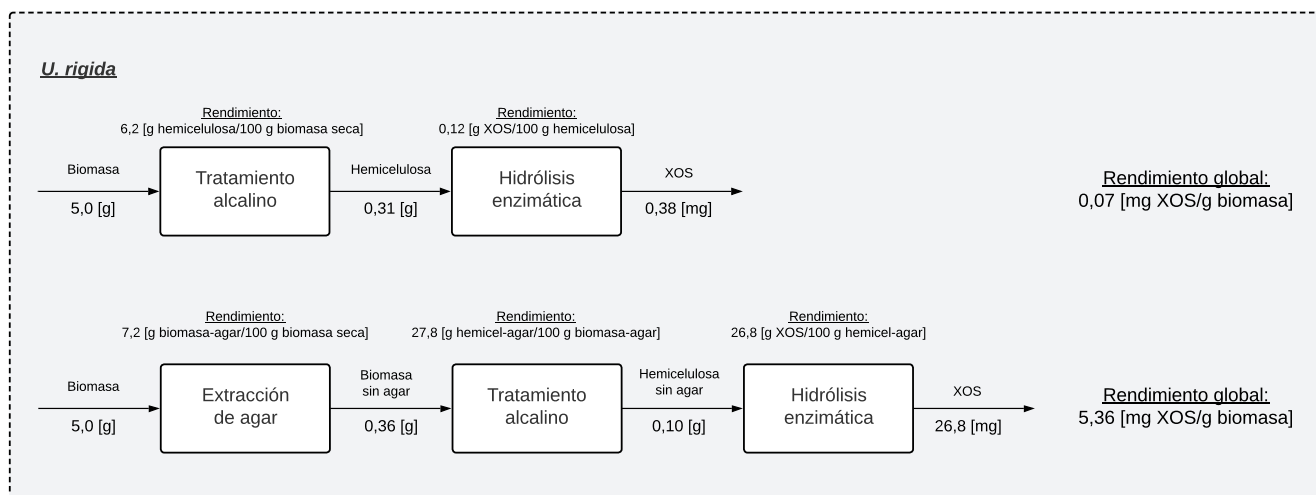


Figura 3.18: Rendimientos de los procesos extractivos y de separación aplicados durante la producción de XOS a partir del alga verde *U. rigida*.

Lo destacable es el aumento significativo, de casi 140 veces, en el rendimiento global del proceso cuando se compara aquel que usa hemicelulosa libre de agar como materia prima versus el que usa hemicelulosa no libre de agar. Por lo demás, *U. rigida* parece ser una fuente de hemicelulosa para producción de XOS comparable a *A. chilensis*, alga roja.

CAPÍTULO

4

CONCLUSIONES, RECOMENDACIONES Y PROYECCIONES

4.1. Conclusiones

Los datos de composición bioquímica de *A. chilensis*, *G. skottsbergii*, *P. columbina* y *U. rigida* son consistentes con lo reportado en estudios anteriores, en términos de composición de xilano, celulosa, proteínas y cenizas. La baja composición de lignina que presentan estas macroalga es una ventaja comparativa a la hora de extracción de hemicelulosa, presentando de esta manera menos enlaces entre estas dos estructuras, lo que podría facilitar la recuperación del xilano de la hemicelulosa. Destaca *G. skottsbergii* con solo el 6,77% de lignina.

Cada alga está asociada a una concentración óptima de NaOH para la cual la recuperación de xilano tras el pretratamiento alcalino es máxima, siendo esta de 9%p/v para *A. chilensis* y *P. columbina*, 6%p/v para *U. rigida*, y de 3%p/v para el alga *G. skottsbergii*.

El proceso de extracción de agar previo al tratamiento alcalino implica una disminución en el rendimiento de recuperación de xilano con respecto al xilano disponible en biomasa. Pero sí ayuda en un aumento significativo del xilano digerible por la enzima en todas las algas estudiadas, a excepción de *P. columbina*. Esto indica que la matriz galacto-sulfatada (agar y otros compuestos) estaría encapsulando a las hemicelulosa de

xilano y dificultando el acceso de la enzima al sustrato. Por tanto, suena interesante estudiar más en profundidad este fenómeno con el fin de entender bajo qué condiciones de extracción de agar se puede maximizar este efecto, y al mismo tiempo, minimizar el efecto de baja en el rendimiento de recuperación de xilano.

El rendimiento de hidrólisis enzimática de xilano fue relativamente bajo, siendo *Ulva rigida* la que presentó el rendimiento más destacable, aunque en términos absolutos todavía se encuentra limitado (solo llegó al 1,03%).

En términos de la recuperación de XOS al hidrolizar la hemicelulosa con extracción de agar previa, *A. chilensis* y *U. rigida* son los que presentan un mayor aumento relativo en la cantidad de XOS recuperados, y destacando el alga verde por la variedad de xilooligosacáridos producidos, presentando casi toda la gama entre XOS de grado de polimerización del 1 al 6, a excepción del 3. Considerando el rendimiento en la producción de XOS, indicador que caracteriza todo el proceso de extracción, *U. rigida* alcanza el mejor rendimiento, seguido por el alga roja *A. chilensis*.

En resumen, la concentración de NaOH tiene un efecto sobre la cantidad de xilano que se recupera en la hemicelulosa. Además, la extracción de agar facilita la exposición de xilano digerible, pero implica una baja en el rendimiento de recuperación de xilano. El alga *G. skottsbergii* es la que presenta un mayor contenido de xilano en su estructura, pero su rendimiento de recuperación no es el mejor, ni tampoco lo es la producción de XOS a partir del xilano extraído. Por su parte, *P. columbina* prácticamente no percibe producción de XOS ni con el pretratamiento alcalino solo, ni incluyendo la extracción de agar. Finalmente *A. chilensis* y *U. rigida* son las algas que presentan un mayor rendimiento de recuperación de xilano, fueron las que presentan un mayor aumento en la concentración de extremos reductores frente a la acción de xilanasas, evidenciando una mayor hidrólisis del xilano recuperado, resultados consistentes con el rendimiento de hidrólisis, y a su vez, son aquellas que presentan un mayor rendimiento de XOS con respecto a biomasa y hemicelulosa, y un mayor aumento relativo al aplicar una extracción de agar. Por tanto, si es posible superar los bajos rendimientos de hidrólisis podrían ser candidatos interesantes para la producción de XOS.

4.2. Proyecciones y recomendaciones

La principal proyección es determinar sin lugar a dudas, mediante una técnica con una mayor resolución, si los peaks que se alejan un poco del tiempo de retención de los estándares de D-xilosa corresponden efectivamente estos, o bien, a otra molécula. Se propone una cromatografía de gases para determinar si la medición corresponde a xilosa.

Mejorar la extracción de agar en términos de la pérdida de biomasa y rendimiento de recuperación de xilano. Se propone emplear otro tipo de filtrado, evitando el uso de gasas, o bien, cambiar la metodología de extracción de agar por otra más acorde a los objeti-

vos. Junto a lo anterior, y aprovechando que se está recuperando agar, suena interesante analizar la producción de oligómeros de agar, los cuales también presentan propiedades prebióticas, pudiendo incluirse junto a los XOS, esperando algún efecto de sinergia.

En cuanto a la metodología en sí, se sabe de la existencia de metodologías alternativas para la extracción de XOS, si bien, el tratamiento alcalino parece la opción más económica, no estaría mal probar otros protocolos quizás un poco más costosos, pero esperando obtener mejores resultados. En sintonía con lo anterior, también se propone el estudio de algas que tengan antecedentes de producción de XOS, como lo son *Palmaria palmata* y *Caulerpa racemosa*.

Finalmente, sería interesante llevar a cabo una caracterización más en profundidad de los azúcares estructurales de las algas, esto dado su alta variabilidad entre especies, incluso, dentro de una misma especie donde factores como la localización, la estacionalidad y la etapa del ciclo de vida, afecta la composición total y específica de los carbohidratos de las algas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] CASTRO, C., DIAZ-MORENO, C., & GUTIERREZ-CORTES, C. 2017. Probióticos y prebióticos en matrices de origen vegetal: Avances en el desarrollo de bebidas de frutas. *Revista Chilena de Nutrición*, 44(4):383-392p.
- [2] SANTIBAÑEZ, L., HENRÍQUEZ, C., CORRO-TEJADA, R., BERNAL, S., ARMIJO, B. & SALAZAR, O. 2021. Xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass: A comprehensive review. *Carbohydrate Polymers*, 251:117118p.
- [3] PALMA, M. 2015. Evaluación de factibilidad técnico-económica y estratégica para la creación y desarrollo de una empresa de transferencia de conocimiento y tecnología en el ámbito de encapsulación a la industria alimentaria en Chile. Memoria para optar al grado de Magister en Gestión y Dirección de Empresas. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas.
- [4] YAMAMOTO, Y., KISHIMURA, H., KINOSHITA, Y., SABURI, W., KUMAGAI, Y., YASUI, H. & OJIMA, T. 2019. Enzymatic production of xylooligosaccharides from red alga dulce (*Palmaria* sp.) wasted in Japan. *Process Biochemistry*, 82:117-122p.
- [5] QUITRAL, V., MORALES, C., SEPULVEDA, M & SCHWARTZ, M. 2012. Propiedades nutritivas y saludables de algas marinas y su potencialidad como ingrediente funcional. *Revista Chilena de Nutrición*, 39(4):196-202p.
- [6] IBÁÑEZ, E. & CIFUENTES, A. 2013. Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93:703-709p.

- [7] ŚCIESZKA S. & KLEWICKA E. 2019. Algae in food: a general review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 59(21):3538-3547.
- [8] BARSANTI, L. & GUALTIERI, P. 2014. *Algae Anatomy, Biochemistry, And Biotechnology*. 2^a ed. Pisa, Italia. CRC Press. 1-6p.
- [9] DOMOZYCH, D., CIANCIA, M., FANGEL, J.U., MIKKELSEN, M.D., ULVSKOV, P. & WILLATS, W. 2012. The cell walls of green algae: A journey through evolution and diversity, *Front. Frontiers in Plant Science*, 3:1–7p.
- [10] SE-KWOM, K. 2015. *Springer Handbook of Marine Biotechnology*. Busan, Corea. Springer Publishing. 243-245p.
- [11] STIGER-POUVREAU, V., BOURGOUGNON, N. & DESLANDES, E. 2016. Carbohydrates From Seaweeds. En: FLEURENCE, J. & LEVINE, I. *Seaweed in Health and Disease Prevention*, Academic Press, 223-274p.
- [12] DENIAUD-BOUËT, E., KERVAREC, N., MICHEL, G., TONON, T., KLOAREG, B., HERVE, C. 2014. Chemical and enzymatic fractionation of cell walls from Fucales: Insights into the structure of the extracellular matrix of brown algae. *Annals of botany*. 114(6):1-14p.
- [13] MOLINA, J. 2013. Producción de bioetanol a partir de algas utilizando la levadura *Scheffersomyces stipitis*. Memoria de Ingeniero Civil en Biotecnología. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Física y Matemáticas. 3p.
- [14] FUJII, Y., KOBAYASHI, M., MIYABE, Y. et al. 2021. Preparation of $\beta(1\rightarrow3)/\beta(1\rightarrow4)$ xylooligosaccharides from red alga dulce by two xylanases from *Streptomyces thermogriseus*. *Bioresources and Bioprocessing*. 8:38p.
- [15] ZUÑIGA-JARA, S. & CONTRERAS, C. 2020. An economic valuation of the commercial cultivation of *Agarophyton chilensis* in northern Chile. *Journal of Applied Phycology*. 32(5):3233–3242p.
- [16] CANDIA, A., GALLEGUILLOS, F., NÚÑEZ, M., AROCA, G. 2006. Avances en el mejoramiento productivo del cultivo del "pelillo". 26p.
- [17] MORALES, C., SCHWARTZ, M., SEPULVEDA, M. & QUITRAL, V. 2019. Chemical composition and technological properties of red seaweed, *Agarophyton*

- chilensis (ex *Gracilaria chilensis*). *Revista de Ciencia y Tecnología*. 31:1-10p.
- [18] ORTIZ, J. 2011. Composición nutricional y funcional de las algas rodofíceas chilenas. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química. Laboratorio de Química y Análisis de Alimentos. 1-15p.
- [19] WESTERMEIER, R., AGUILAR, A., SIGEL, J., QUINTANILLA, J. & MORALES, J. 1999. Biological basis for the management of *Gigartina skottsbergii* (Gigartinales, Rhodophyta) in southern Chile. *Hydrobiologia*. 398:137-147p.
- [20] SUBPESCA. 2022. Alga Luga Roja. [en línea] <https://www.subpesca.cl/portal/616/w3-article-847.html> [consulta: 04 de noviembre del 2022]
- [21] GREGERSEN, S., ABDUL-KHALEK, N., KRANOLD, R., LØVSTAD, S., JACOBSEN, C., BECH, E., HEGELUND, T., SEJBERG, J. & TOFT, M. 2022. Is *Gigartina* a potential source of food protein and functional peptide-based ingredients? Evaluating an industrial, pilot-scale extract by proteomics and bioinformatics. *Future Foods*. 6:100189p.
- [22] BUSCHMANN, A., VARELA, D., CIFUENTES, M., DEL, M., HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M., HENRÍQUEZ-ANTIPA, L., WESTERMEIER, R. & CORREA, J. 2004. Indoor cultivation of the carragenophytic red alga *Gigartina skottsbergii*. *Aquaculture* 241:357-370p.
- [23] ROMO, H., M. ÁVILA Y A. CANDIA. 2001. Manual de técnicas de cultivo y repoblación de Luga Roja (*Gigartina skottsbergii*). Proyecto FONDEF D97I1064. IFOP - Universidad de Concepción, Chile. 32p.
- [24] BADILLA, R., VON BRAND, E. & COLLANTES, G. 2008. Karyotypes and microfluorometric studies in *Porphyra columbina* Montagne (Bangiales, Rhodophyta), with reference to morphology and sexuality. *Revista de biología marina y oceanografía*, 43(1):17-23p.
- [25] NELSON, W., & BROOM, J. 2010. The identity of *Porphyra columbina* (Bangiales, Rhodophyta) originally described from the New Zealand subantarctic islands. *Australian Systematic Botany*, 23(1):16-26p.
- [26] ETCHEVERRY, H. & COLLANTES, G. 1977. Cultivo artificial del luche *Porphyra columbina*. *Revista de Biología Marina del Departamento Oceanográfico de la Univer-*

- alidad de Chile, 16(2):195-202p.
- [27] BORASO, A., ZAIOSO, H. & JULIO, V. 2015. La Zona Costera Patagónica Argentina. Vol. I. Recursos biológicos bentónicos. Buenos Aires, Argentina. Editorial Universitaria de la Patagonia.
- [28] CIAN, R., CABALLERO, M., SABBAG, N., GONZÁLEZ, R., & DRAGO, S. 2014. Bio-accessibility of bioactive compounds (ACE inhibitors and antioxidants) from extruded maize products added with a red seaweed *Porphyra columbina*. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1):51–58p.
- [29] CINA, R., FAJARDO, M., ALAIZ, M., VIOQUE, J., GONZALEZ, R., & DRAGO, S. 2013. Chemical composition, nutritional and antioxidant properties of the red edible seaweed *Porphyra columbina*. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65(3):299–305p.
- [30] CIAN, R., MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O. & DRAGO, S. 2012. Bioactive properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis from protein byproducts of *Porphyra columbina*. *Food Research International*, 49(1):364–372.
- [31] ADMASSU, H., ABERA, T., ABRAHA, B., YANG, R. & ZHAO, W. 2018. Proximate, Mineral and Amino acid Composition of Dried Laver (*Porphyra* spp.) Seaweed. *Journal of Academia and Industrial Research (JAIR)*, 6(9):149-145p.
- [32] BRIONES, G. 2012. Producción de etanol a partir de la macroalga *Ulva rígida*. Memoria de Ingeniero Civil en Biotecnología. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Física y Matemáticas. 21p.
- [33] DOMINGUEZ, H. & LORET E. 2019. *Ulva lactuca*, A Source of Troubles and Potential Riches. *Marine Drugs*. 17(6):357.
- [34] PEZOA-CONTE, R., LEYTON, A., ANUGWOM, I., VON SHOULTZ, S., PARANKO, J., MÄKI-ARVELA, P., WILLFÖR, S, MUSZYNSKI M., NOWICKI, J., LIENQUEO, M.E., & MIKKOLA, J.-P. 2015. Deconstruction of the green alga *Ulva rigida* in ionic liquids: Closing the mass balance. *Algal Research*. 12:262-273.
- [35] WORLD REGISTER OF MARINE SPECIES. 2012. WoRMS Photogallery - *Ulva rigida*. [en línea] <https://www.marinespecies.org/photogallery.php?album=770&pic=50233> [consulta: 03 de noviembre del 2022]

- [36] TABOADA, C., MILLÁN, R. & MÍGUEZ, I. 2009. Composition, nutritional aspects and effect on serum parameters of marine algae *Ulva rigida*. *Science and Food Agriculture*. 90(3):445-449.
- [37] HARITONIDIS, S. & MALEA, P. 1999. Bioaccumulation of metals by the green alga *Ulva rigida* from Thermaikos Gulf, Greece. *Environmental Pollution*. 104(3):365-372.
- [38] FLEURENCE, J., LE COEUR, C. & MABEAU, S. 1995. Comparison of different extractive procedures for proteins from the edible seaweeds *Ulva rigida* and *Ulva rotundata*. *Journal of Applied Phycology* 7:577–582p.
- [39] PERERIRA, L. 2011. A review of the nutrient composition of selected edible seaweeds. En: POMIN, V. *Seaweed: Ecology, Nutrient Composition and Medicinal Uses*. Estados Unidos. Nova Science Publishers. 15-47p.
- [40] SATPATI, G. & RUMA, P. 2011. Biochemical composition and lipid characterization of marine green alga *Ulva rigida* a nutritional approach. *Journal of Algal Biomass Utilization*. 2(4):10–13p.
- [41] BRAIN-ISASI, S., CARÚ, C. & LIENQUEO, M.E. 2021. Valorization of the green seaweed *Ulva rigida* for production of fungal biomass protein using a hypercellulolytic terrestrial fungus. *Algal Research*. 59:102457p.
- [42] OBED, D. & KIAER, B. 2012. The potential for oligosaccharide production from the hemicellulose fraction of biomasses through pretreatment processes: xylooligosaccharides (XOS), arabinooligosaccharides (AOS), and mannoooligosaccharides (MOS). *Carbohydrate Research*, 360:84-92p.
- [43] SAMANTA, A., JAYAPAL, N., SOHINI, R., KOLTE, A., SENAMI, S. & SRIDHAR, M. 2015. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. 5(1):62-71p.
- [44] EBRINGEROVÁ, A. 2006. Structural Diversity and Application Potential of Hemicelluloses. *Macromolecular Symposia*, 232(1):1-12p.
- [45] PINALES-MÁRQUEZ, C., RODRIGUEZ-JASSO, R., ARÁUJO, R., TREVIÑO, A., NABARLATZ, D., GULLÓN, B. & RUIZ, H. 2021. Circular bioeconomy and integrated biorefinery in the production of xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass: A review. *Industrial Crops and Products*, 162:113274.

- [46] HSIEH, Y. & HARRIS, P. 2019. Xylans of Red and Green Algae: What Is Known about Their Structures and How They Are Synthesised? *Polymers*, 11(2):354p.
- [47] Designing xylan for improved sustainable biofuelproduction
- [48] BRIENZO, M. 2016. Sugarcane bagasse hemicellulose properties, extraction technologies and xylooligosaccharides production. En: RILEY, G. *Food Waste*. Nueva York, Nova Science Publishers, pp. 155-188.
- [49] Kabel, M. A., Kortenoeven, L., Schols, H. A. & Voragen, A. 2002. In vitro fermentability of differently substituted xylo-oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21):6205–6210pp.
- [50] AZEVEDO, A., DE OLIVA, P., FERNANDES, D. & PASTORE, G. 2013. Xylooligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, 51(1):78-85p.
- [51] CUORTOIS, J. 2009. Oligosaccharides from land plants and algae: production and applications in therapeutics and biotechnology. *Current Opinion in Microbiology*, 12(3):261-273.
- [52] PARAJÓ, J., GARROTE G., CRUZ, J. & DOMINGUEZ, H. 2004. Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials. *Trends in Food Science and Technology*, 15(3–4):115-120.
- [53] JENSEN, J., BUSSE-WICHER, M., POULSEN, C., FANGEL, J., SMITH, P., YANG, J., PEÑA, M., DINESEN, M., MARTENS, H., MELKONIAN, M., WONG, G., MOREMEN, K., WILKERSON, C., SCHELLER, H., DUPREE, P., ULVSKOV, P., URBANOWICZ, B. & HARHOLT, J. 2018. Identification of an algal xylan synthase indicates that there is functional orthology between algal and plant cell wall biosynthesis, *The New Phytologist* 218(3):1049-1060p.
- [54] TURVEY, J. & WILLIAMS, E. 1970. The Structures Of Some Xylans From Red Algae. *Phytochemistry*, 9(11):2383-2388.
- [55] CERESO, A. 1967. The Carrageenan System of *Gigartina skottsbergii*, Part I: Studies on a Fraction of K-Carrageenan. *Journal of the Chemical Society C: Organic*, 0(0):992-997p.

- [56] KIYOHARA, M., HAMA, Y., YAMAGUCHI, K. & ITO, M. 2006. Structure of beta-1,3-xylooligosaccharides generated from *Caulerpa racemosa* var. *laete-virens* beta-1,3-xylan by the action of beta-1,3-xylanase. *Journal of Biochemistry*. 140(3):369-373p.
- [57] MOURITSEN, O. & VINTHER, C. 2020. A Role for Macroalgae and Cephalopods in Sustainable Eating. *Frontiers in Psychology*. 11:1402p.
- [58] TITLYANOV, E., TITLYANOVA, T., LI, X. & HUANG, H. 2017. *Common Marine Algae of Hainan Island (Guidebook)*. Academic Press. 75-228p.
- [59] Chen, X., Fu, X., Huang, L., Xu, J., & Gao, X. 2021. Agar oligosaccharides: A review of preparation, structures, bioactivities and application. *Carbohydrate Polymers*, 265:118076.
- [60] SYNYTSYA, A., ČOPIKOVA, J., Kim, W. & Park, Y. 2015. Cell Wall Polysaccharides of Marine Algae. *En: Kim, S. Springer Handbook of Marine Biotechnology*. Springer Handbooks. Springer, Berlin, Heidelberg, 543-590p.
- [61] PANDYA, Y., BAKSHI, M. & SHARMA, A. 2022. Agar-agar extraction, structural properties and applications: A review. 11. 1151-1157p.
- [62] AKNIPAR, O., ERDOGAN, K. & BOSTANCI, S. 2009. Enzymatic production of Xylooligosaccharide from selected agricultural wastes. *Food and Bioproducts Processing*, 87(2):145-151p.
- [63] Caracterización y evaluación biológica de las algas: *Gigartina chamissoi*, *Porphyra columbina* y *Ulva lactuca*
- [64] CHEN, Y., XIE, Y., AJUWON, K., ZHONG, R., LI, T., CHEN, L., ZHANG, H., BECKERS, Y. AND EVERAERT, N. 2021. Xylo-Oligosaccharides, Preparation and Application to Human and Animal Health: A Review. *Frontiers in Nutrition*, 8:731930p.
- [65] AMORIM, C., SILVÉRIO, S., PRATHER, K. & RODRIGUES, L. 2019. From lignocellulosic residues to market: Production and commercial potential of xylooligosaccharides. *Biotechnology Advances*, 37:107397p.
- [66] CAPETTI, C., VACILOTTO, M., DABUL, A. ET AL. 2021. Recent advances in the enzymatic production and applications of xylooligosaccharides. *World J Microbiol Biotechnol* 37:169p.

- [67] GUPTA, P., HEDGE, P. & AGARWAL, P. 2012. A review of xylooligosaccharides. *International Research Journal of Pharmacy* 3(8):71-74p.
- [68] BRAIN-ISASI, S., CORREA, S., AMADO-HINOJOSA, J., BUSCHMANN, A., CAMUS, C. & LIENQUEO, M. E. 2022. Combined extraction methodology for simultaneous recovery of phycobiliproteins and agar from the red alga *Gracilaria chilensis* C. J. Bird, McLachlan & E. C. Oliveira. *Algal Research*, 67:102821p.
- [69] WANG, N., ZHANG, J., WANG, H., LI, Q., WEI, S. & WANG, D. 2014. Effects of metal ions on the hydrolysis of bamboo biomass in 1-butyl-3-methylimidazolium chloride with dilute acid as catalyst. *Bioresource Technology* 173:399-405p.
- [70] KADAM, S., ÁLVAREZ, C., TIWARI, B., & O'DONNELL, C. 2017. Extraction and characterization of protein from Irish brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Food Research International* I, 99:1021-1027p.
- [71] KIM, H., YUN, E., CHUNG, J., CHOI, I., KIM, K. 2013. High temperature and low acid pretreatment and agarase treatment of agarose for the production of sugar and ethanol from red seaweed biomass. *Bioresource Technology*, 136:582-587p.
- [72] PIGMAN, W., BROWNING, B., MCPHERSON, W., CALKINS, C. & LEAF, L. 1949. Oxidation of D-Galactose and Cellulose with Nitric Acid, Nitrous Acid and Nitrogen Oxides. *Journal of the American Chemical Society*, 71(6):2200-2204p.
- [73] KOSTAS, E., WILKINSON, S., WHITE, D. & COOK, D. 2016. Optimization of a total acid hydrolysis based protocol for the quantification of carbohydrate in macroalgae. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 7(1):21-36p.
- [74] CHEM, Y., LEE., H., JUAN, J. & PHANG., S. 2016. Production of New Cellulose Nanomaterial from Red Algae Marine Biomass *Gelidium elegans*. *Carbohydrate Polymers*, 151:1210-1219p.
- [75] GRETZ, M., SOMMERFELD., M., ATHEY, P. & ARONSON, J. 1991. Chemical Composition Of The Cell Walls Of The Freshwater Red Alga *Lemanea Annulata* (Batrachospermales). *Journal of Phycology*, 27(2):232-240p.
- [76] USOV. A. 2011. Polysaccharides of the red algae. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, 65:115-217p.

ANEXOS

Anexo A. Abreviaciones

En la Tabla A.1 se presentan las abreviaciones usadas a lo largo de este documento.

Tabla A.1: Abreviaciones para la mejor comprensión de este documento.

Abreviación	Significado
XIL	Xilano
XOS	Xilooligosacáridos
GLU	Glucosa
HEM	Hemicelulosa
HEM-AGAR	Hemicelulosa con extracción de agar
CEL	Celulosa
C_i	Concentración i
t_i	Tiempo i
A_i	Área i
AC	<i>Agarophyton chilensis</i>
GS	<i>Gigartina skottsbergii</i>
PC	<i>Porphyra columbina</i>
UR	<i>Ulva rigida</i>
XOS	Xilooligosacárido
X_i	Xilooligosacárido de grado de polimerización i
BIO	Biomasa
E_i	Estándar i

Anexo B. Reactivos y Equipos

B.1. Reactivos

En la Tabla B.1 se exhiben los reactivos usados durante la metodología experimental llevada a cabo durante esta investigación, junto a la etapa en donde este fue usado.

Tabla B.1: Reactivos e insumos usados durante la investigación.

Reactivo/Insumo	Etapa en la que se usó
NaOH	Extracción de agar Pretratamiento alcalino Extracción de proteínas
H₂SO₄	Extracción de agar Hidrólisis ácida Determinación de lignina Cromatografía
Agua destilada	Acondicionamiento Extracción de agar Azúcares reductores Cromatografía Extracción de proteínas
HCl	Pretratamiento alcalino Extracción de proteínas
Etanol	Pretratamiento alcalino
Xilanasa Enzeco	Azúcares reductores Cromatografía
Acetato de sodio	Azúcares reductores
Reactivo Bradford	Extracción de proteínas
Reactivo DNS	Azúcares reductores

B.2. Equipos

En la Tabla B.2 se muestran los equipos empleados durante la metodología experimental llevada a cabo durante esta investigación, junto a la etapa en donde estos fueron usados.

Tabla B.2: Equipos usados durante la investigación.

Equipo	Etapa en la que se usó
Tamiz 20 Mesh	Acondicionamiento
Tamiz 60 Mesh	Acondicionamiento
Trituradora	Acondicionamiento
Baño maría	Extracción de agar Hidrólisis ácida
Estufa	Extracción de agar Pretratamiento alcalino
Autoclave	Pretratamiento alcalino
Centrífuga	Pretratamiento alcalino Extracción de proteínas
pHmetro	Pretratamiento alcalino
Mortero	Pretratamiento alcalino
Espectrofotómetro	Azúcares reductores Determinación de lignina Extracción de proteínas
Cámara de filtración	Hidrólisis ácida
Columna Aminex	Caracterización azúcares
Columna REZEX	Caracterización XOS
Mufla	Determinación de cenizas
Sonicador	Extracción de proteínas

Anexo C. Datos de hemicelulosa recuperadas posteriormente la tratamiento alcalino

C.1. Para tratamiento alcalino

En la Tabla C.1 se muestran las masas de hemicelulosas recuperadas tras el tratamiento alcalino sin extracción de agar. Estos datos se emplean en el cálculo de la composición de azúcares de la hemicelulosa y para el rendimiento de extremos reductores.

Tabla C.1: Masa de hemicelulosa recuperada para distintas concentraciones de NaOH, y para cada alga en estudio. Medida en gramos.

Alga	C_{NaOH}	Hemicelulosa recuperada
<i>A. chilensis</i>	3	0,58
	6	0,72
	9	1,33
	12	2,06
<i>G. skottsbergii</i>	3	1,00
	6	1,15
	9	1,57
	12	1,61
<i>P. columbina</i>	3	0,36
	6	0,74
	9	1,09
	12	1,08
<i>U. rigida</i>	3	0,19
	6	0,21
	9	0,31
	12	0,38

C.2. Para tratamiento alcalino con previa extracción de agar

En la Tabla C.2 se muestran las masas de hemicelulosas recuperadas tras el tratamiento alcalino con extracción de agar, recordar que para este solo se evaluó una concentración de 9 %p/v de NaOH. Estos datos se emplean en el cálculo de la composición de azúcares de la hemicelulosa y para el rendimiento de extremos reductores.

Tabla C.2: Masa de hemicelulosa recuperada para cada alga en estudio (con pretratamiento alcalino y extracción de agar). Medida en gramos.

Alga	Hemicelulosa recuperada
<i>A. chilensis</i>	0,49
<i>G. skottsbergii</i>	0,07
<i>P. columbina</i>	0,30
<i>U. rigida</i>	0,10

C.3. Composición de xilano y celulosa en la hemicelulosa recuperada

En la Tabla C.3 se presentan las composiciones porcentuales (rendimientos) de xilano y celulosa.

Tabla C.3: Contenido porcentual de celulosa y xilano en la hemicelulosa extraída con distintas concentraciones de NaOH. Medido en gramos de xilano o glucosa con respecto a gramos de hemicelulosa obtenida.

Carbohidrato	Alga	g / 100g de hemicelulosa			
		NaOH 3 %	NaOH 6 %	NaOH 9 %	NaOH 12 %
Celulosa	AC	0,30 ± 0,06	0,58 ± 0,09	1,19 ± 0,00	1,23 ± 0,11
	GS	0,38 ± 0,21 0	0,76 ± 0,08	1,13 ± 0,01	1,35 ± 0,03
	PC	0,33 ± 0,03	0,83 ± 0,07	0,97 ± 0,08	1,10 ± 0,04
	UR	0,91 ± 0,21	3,05 ± 0,56	1,46 ± 0,21	1,04 ± 0,15
Xilano	AC	2,16 ± 0,36	4,74 ± 0,69	7,76 ± 0,02	6,31 ± 0,24
	GS	10,32 ± 2,07	9,67 ± 0,31	8,13 ± 0,32	7,35 ± 0,45
	PC	1,14 ± 0,14	3,57 ± 0,33	6,34 ± 0,54	3,97 ± 0,25
	UR	0,69 ± 0,15	0,79 ± 0,13	0,38 ± 0,05	0,33 ± 0,05

Anexo D. Datos de la determinación de humedad

En las Tablas D.1, D.2, D.3 se presentan los datos experimentales medidos para la determinación de humedad de alga, los promedios por triplicado y los errores asociados a estos, respectivamente.

Tabla D.1: Datos experimentales de la medición de humedad en gramos.

Datos	A	B_0	B_1	B_2	B_3	B_4	B_5	B_6
<i>A. chilensis</i>	49,38	54,38	51,87	51,25	50,66	50,45	50,44	50,43
	48,56	53,56	50,90	50,56	50,03	49,80	49,76	49,73
	46,33	51,33	48,65	48,14	47,60	47,49	47,48	47,45
<i>G. skottsbergii</i>	48,22	53,21	50,31	49,77	49,24	49,19	49,18	49,15
	45,46	50,46	47,65	47,03	46,54	46,52	46,51	46,45
	45,19	50,18	47,21	46,75	46,24	46,16	46,16	46,15
<i>P. columbina</i>	46,73	51,74	49,45	48,53	48,05	47,89	47,67	47,64
	45,14	50,16	47,69	47,01	46,40	46,27	46,26	46,19
	46,28	51,29	48,76	48,01	47,43	47,29	47,28	47,20
<i>U. rigida</i>	48,63	53,63	51,28	50,73	50,21	49,98	49,87	49,86
	47,12	52,13	49,63	49,09	48,56	48,32	48,23	48,21
	58,27	63,27	60,91	60,35	59,71	59,53	59,53	59,52

Tabla D.2: Promedios de la medición de humedad en gramos.

Promedios	B_0	B_1	B_2	B_3	B_4	B_5	B_6
<i>A. chilensis</i>	5,00	2,38	1,89	1,34	1,16	1,14	1,11
<i>G. skottsbergii</i>	4,99	2,10	1,56	1,05	1,00	0,99	0,96
<i>P. columbina</i>	5,01	2,58	1,80	1,24	1,10	1,02	0,96
<i>U. rigida</i>	5,00	2,60	2,05	1,49	1,27	1,20	1,19

Tabla D.3: Errores asociados de la medición de humedad en gramos.

Errores	B_0	B_1	B_2	B_3	B_4	B_5	B_6
<i>A. chilensis</i>	0,01	0,07	0,06	0,07	0,07	0,08	0,08
<i>G. skottsbergii</i>	0,00	0,08	0,08	0,09	0,07	0,06	0,05
<i>P. columbina</i>	0,03	0,22	0,02	0,04	0,06	0,05	0,03
<i>U. rigida</i>	0,01	0,12	0,08	0,10	0,09	0,11	0,10

Donde A corresponde a la masa de los vasos precipitados y B_i corresponde a la medición de masa número i (incluyendo el vaso y las biomasa algal húmeda en proceso de secado), siendo la primera B_0 y la última B_6 , en términos temporales.

Por otro lado, en las Tablas D.4 y D.5 se presentan los valores de humedad porcentual (de acuerdo a lo planteado en la ecuación 2.8) y el error asociado a cada medición. La nomenclatura es la misma de las Tablas anteriores.

Tabla D.4: Datos de humedad porcentual, medida en gramos de agua perdida dividida por gramos de biomasa húmeda.

Promedios (%)	B_1	B_2	B_3	B_4	B_5	B_6
<i>A. chilensis</i>	48,03	59,03	70,29	74,62	75,95	76,22
<i>G. skottsbergii</i>	52,33	62,13	73,20	76,87	77,27	77,73
<i>P. columbina</i>	57,94	68,76	78,97	79,97	80,11	80,77
<i>U. rigida</i>	48,47	64,10	75,20	78,06	79,65	80,85

Tabla D.5: Error asociado a cada medición de humedad porcentual.

Errores (%)	B_1	B_2	B_3	B_4	B_5	B_6
<i>A. chilensis</i>	3,01	3,42	5,44	5,95	6,77	7,33
<i>G. skottsbergii</i>	3,90	5,13	8,41	7,35	6,24	5,41
<i>P. columbina</i>	8,56	1,15	3,06	5,23	4,97	3,06
<i>U. rigida</i>	4,78	3,89	6,94	7,22	8,99	8,14

Cabe mencionar que la humedad y errores reportados en el cuerpo del documento corresponde a los últimos, es decir, a la columna B_6 .

Anexo E. Datos de la determinación del contenido de cenizas

En la Tabla E.1 se presentan los datos experimentales recopilados para la determinación del contenido de cenizas de las 4 algas en estudio.

Tabla E.1: Datos experimentales para la determinación del contenido de cenizas para cada alga. Medido en gramos.

	A	B	C	D
<i>A. chilensis</i>	32,608	33,61	32,799	19,06 %
	32,548	33,545	32,783	23,57 %
	31,991	32,99	32,161	17,02 %
<i>G. skottsbergii</i>	35,002	36,011	35,322	31,71 %
	32,693	33,701	32,997	30,16 %
	33,574	34,571	33,862	28,89 %
<i>P. columbina</i>	33,538	34,541	33,641	10,27 %
	31,171	32,162	31,289	11,91 %
	32,226	33,226	32,354	12,80 %
<i>U. rigida</i>	31,549	32,541	31,863	31,65 %
	33,144	34,151	33,457	31,08 %
	31,023	32,03	31,301	27,61 %

Donde A corresponde a la masa del crisol, B a la masa del crisol y el alga (considerar que se agregó 1 gramo de alga aproximadamente a cada crisol), C corresponde a la masa del crisol y el alga (cenizas) posterior a la incineración, y finalmente, D es el porcentaje de cenizas calculado en cada muestra. Los porcentajes de cenizas reportados corresponden al promedio de los triplicados, juntos a su correspondiente error asociado.

Anexo F. Datos, estándares y curvas de calibración de la cromatografía por intercambio iónico

F.1. Caracterización de azúcares estructurales en la biomasa algal

Tabla F.1: Datos para la caracterización de azúcares estructurales de *A. chilensis*. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T	A
1	9,005	8614719
	9,005	8617393
	9,007	8607296
1	8,974	7156601
	8,978	7031250
	8,949	5976674
2	11,994	16472
	12,004	16658
	11,995	13871
3	12,975	30589
	12,983	31589
	12,976	25742
4	13,783	46733
	13,790	49442
	13,784	39059
5	14,901	13071
	14,909	15489
	14,901	10804
6	28,280	84176
	28,294	65269
	28,276	76243

Tabla F.2: Datos para la caracterización de azúcares estructurales de *G. skottsbergii*. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T	A
1	8,989	6070784
	8,993	6102495
	8,989	6070784
2	12,468	3879
	12,476	4054
	12,468	3879
3	12,987	6635
	12,987	6792
	12,987	6635
4	13,776	124307
	13,779	124939
	13,776	124307
5	14,695	4706
	14,697	4781
	14,695	4706
6	19,41	8127
	19,402	8133
	19,41	8127
7	21,696	12454
	21,698	12602
	21,696	12454
8	28,278	98941
	28,286	89199
	28,278	98941

En las Tablas F.1, F.2, F.3 y F.3 se exhiben los datos obtenidos a partir de la cromatografía por intercambio iónico para la caracterización de biomasa, dentro de los que se incluyen el tiempo de retención, T y el área bajo la curva de cada peak, A.

Tabla F.3: Datos para la caracterización de azúcares estructurales de *P. columbina*. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T	A
1	9,005	8614719
	9,005	8617393
	9,007	8607296
2	11,336	3087
	11,341	3080
	11,339	3145
3	11,734	1934
	11,741	1947
	11,735	2183
4	12,972	30156
	12,973	29055
	12,975	28969
5	13,872	5751
	13,875	4188
	13,873	4185
6	14,738	16751
	14,740	14934
	14,744	14934
7	28,279	58014
	28,276	70112
	28,275	72184

Tabla F.4: Datos para la caracterización de azúcares estructurales de *P. columbina*. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T	A
1	9,005	8614719
	9,005	8617393
	9,007	8607296
2	11,336	3087
	11,341	3080
	11,339	3145
3	11,734	1934
	11,741	1947
	11,735	2183
4	12,972	30156
	12,973	29055
	12,975	28969
5	13,872	5751
	13,875	4188
	13,873	4185
6	14,738	16751
	14,740	14934
	14,744	14934
7	28,279	58014
	28,276	70112
	28,275	72184

Luego, en las Tablas F.5, F.6, F.7 y F.8 se muestran los promedios de T y A; mientras que en las Tablas F.9, F.10, F.11 y F.12 se exponen los errores porcentuales asociados a las mediciones experimentales.

Tabla F.5: Promedios de los datos experimentales para la caracterización de azúcares estructurales de *A. chilensis*. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T	A
1	8,97	6721508
2	12,00	15667
3	12,98	29307
4	13,79	45078
5	14,90	13121
6	28,28	75229

Tabla F.7: Promedios de los datos experimentales para la caracterización de azúcares estructurales de *P. columbina*. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T	A
1	8,98	7646563
2	12,01	9890
3	12,96	3611
4	13,77	61324
5	14,90	29986
6	17,22	1250
7	28,27	88422

Tabla F.6: Promedios de los datos experimentales para la caracterización de azúcares estructurales de *A. chilensis*. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T	A
1	8,99	6081354
2	12,47	3937
3	12,99	6687
4	13,78	124518
5	14,70	4731
6	19,41	8129
7	21,70	12503
8	28,28	95694

Tabla F.8: Promedios de los datos experimentales para la caracterización de azúcares estructurales de *U. rigida*. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T	A
1	9,01	8613136
2	11,34	3104
3	11,74	2021
4	12,97	29393
5	13,87	4708
6	14,74	15540
7	28,28	66770

Tabla F.9: Error porcentual asociado a los promedios de los datos experimentales para la caracterización de azúcares estructurales de *A. chilensis*. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T	A
1	0,18 %	9,64 %
2	0,05 %	9,95 %
3	0,03 %	10,67 %
4	0,03 %	11,95 %
5	0,03 %	17,86 %
6	0,03 %	12,62 %

Tabla F.10: Error porcentual asociado a los promedios de los datos experimentales para la caracterización de azúcares estructurales de *G. skottsbergii*. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T	A
1	0,03 %	0,30 %
2	0,04 %	2,57 %
3	0,00 %	1,36 %
4	0,01 %	0,29 %
5	0,01 %	0,92 %
6	0,02 %	0,04 %
7	0,01 %	0,68 %
8	0,02 %	5,88 %

Tabla F.11: Error porcentual asociado a los promedios de los datos experimentales para la caracterización de azúcares estructurales de *P. columbina*. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T	A
1	0,01 %	0,16 %
2	0,03 %	1,00 %
3	0,01 %	7,81 %
4	0,01 %	2,77 %
5	0,01 %	4,78 %
6	0,05 %	14,69 %
7	0,01 %	4,25 %

Tabla F.12: Error porcentual asociado a los promedios de los datos experimentales para la caracterización de azúcares estructurales de *U. rigida*. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T	A
1	0,01 %	0,06 %
2	0,02 %	1,15 %
3	0,03 %	6,93 %
4	0,01 %	2,25 %
5	0,01 %	19,19 %
6	0,02 %	6,75 %
7	0,01 %	11,46 %

Por otro lado, se generó un set de estándares de azúcares, esto con el fin de determinar el tiempo de retención de cada carbohidratos que podrían conformar la pared celular en las mismas condiciones a las que se llega al final de la hidrólisis ácida (2,16 % HCl), esto se llevó a cabo preparando muestras de 1 mg/mL, las que fueron analizadas por la columna de cromatografía. Se reporta el tiempo de retención de cada azúcar como el promedio de las muestras por triplicado, estos se exhiben en la Tabla F.13 donde se reportan los tiempos de retención obtenidos en cada medición, D, los promedios de estos, P, y el error porcentual asociado a cada uno de ellos, E.

Tabla F.13: Estándares de tiempos de retención de xilosa, glucosa y arabinosa.

Sacárido	D	P	E
Glucosa	12,963		
	12,962	12,96	0,01 %
	12,961		
Xilosa	13,906		
	13,909	13,91	0,02 %
	13,911		
Arabinosa	15,041		
	15,046	15,04	0,02 %
	15,047		

También, con el fin de lograr transformar el área bajo la curva en concentración en mg/mL, se construyeron curvas de calibración para cada uno de los sacáridos anteriormente nombrados. Estas se pueden ver en las Figuras F.1, F.2 y F.3, presentando un R^2 de 0,99, 0,99 y 1,00 respectivamente. Cabe decir que en el presente documento solo se reportan aquellos ajuste lineales que fueron efectivamente utilizados durante la investigación, descartando los de aquellos azúcares que no fueron detectados, o se descartó su presencia, en la cromatografía. Otro punto a destacar es que las curvas de calibración fueron construidas con solo 4 puntos experimentales y sin triplicados, lo que perfectible a futuro.

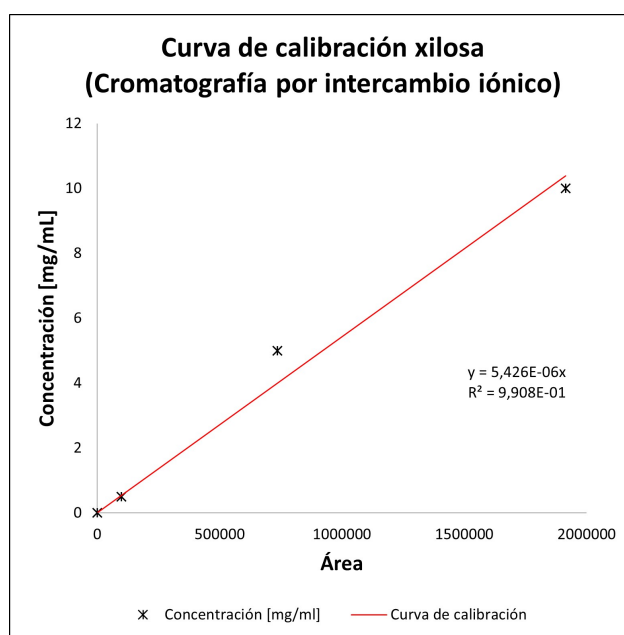


Figura F.1: Curva de calibración de concentración de xilosa para la cromatografía de intercambio iónico.

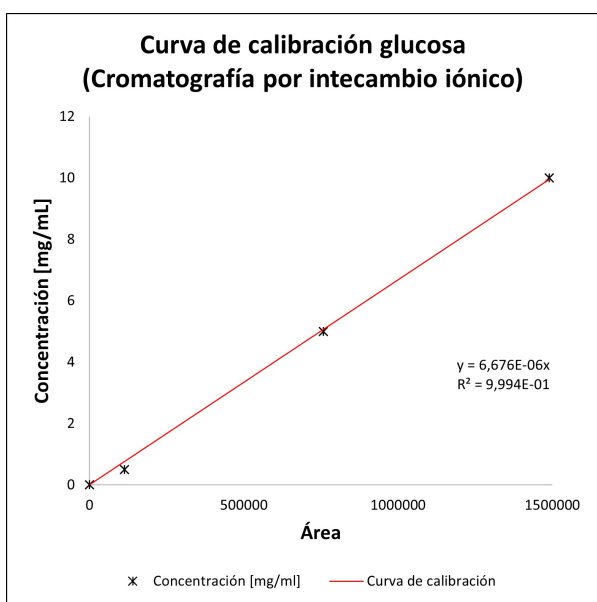


Figura F.2: Curva de calibración de concentración de glucosa para la cromatografía de intercambio iónico.

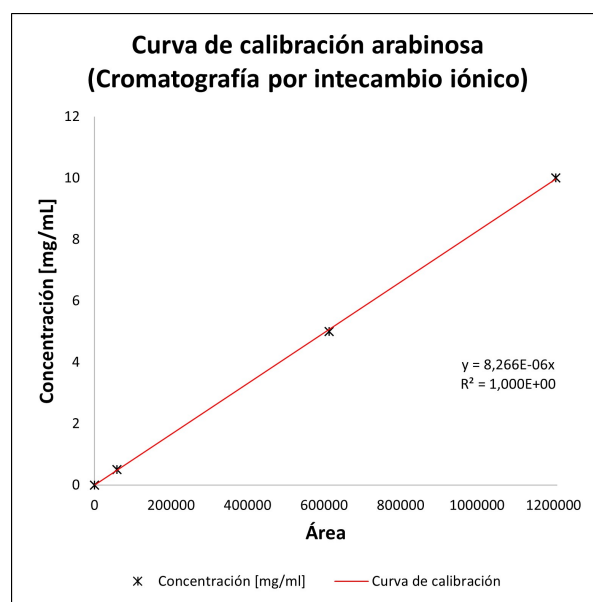


Figura F.3: Curva de calibración de concentración de arabinosa para la cromatografía de intercambio iónico.

En las Ecuaciones F.1, F.2 y F.3 se presentan las expresiones matemática que definen la relación entre área bajo la curva del cromatograma, A_m , y concentración del azúcar correspondiente, C_m , con m indicando el sacárido al que corresponde: xilosa, glucosa y arabinosa, respectivamente. Los factores de conversión se reportan en la Tabla F.14.

$$C_{xil} = (5,426 \cdot 10^{-6}) \cdot A_{xil} \quad (F.1)$$

$$C_{glu} = (6,676 \cdot 10^{-6}) \cdot A_{glu} \quad (F.2)$$

$$C_{ara} = (8,266 \cdot 10^{-6}) \cdot A_{ara} \quad (F.3)$$

Tabla F.14: Factores de conversión entre área del cromatograma y concentración de azúcares en mg/mL.

Sacárido	Factor de conversión ($\times 10^{-6}$)
Glucosa	6,676
Xilosa	5,426
Arabinosa	8,266

Luego, en la Tabla F.15 se ven las concentraciones obtenidas aplicando los factores de conversión correspondientes para las distintas algas estudiadas. A partir de estos valores, y tal como lo plantea la Ecuación 2.4, se obtuvo la composición de cada azúcar detectado. Junto a ello, se reporta el otro término necesario para obtener los porcentajes de sacáridos,

el factor de conversión entre monómeros detectados y polímero del mismo monómero que se encontraban originalmente (ver Tabla F.16).

Tabla F.15: Concentración detectada para cada alga.

	Glucosa	Xilosa	Arabinosa
A. chilensis	0,20	0,24	0,11
G. skottsbergii	0,04	0,68	0,04
P. columbina	0,02	0,33	0,25
U. rigida	0,20	0,03	0,13

Tabla F.16: Factores de conversión entre azúcares monoméricos y su polímero correspondiente, unidades arbitrarias.

Monómero	Polímero	Factor monómero-polímero $D_{m.M}$
Glucosa	Celulosa	0,99
Xilosa	Xilano	0,88
Arabinosa	-	-

F.2. Caracterización de hemicelulosa extraída

En las Tablas F.17, F.18, F.19 y F.20 se muestran los datos obtenidos a partir de la cromatografía por intercambio iónico para la caracterización de hemicelulosa obtenida tras el pretratamiento alcalino, dentro de los que se incluyen el tiempo de retención, T y el área bajo la curva de cada peak, A. Destacar que los datos recopilados corresponden a muestras que fueron sometidas a distintas concentraciones de NaOH, C_3 , C_6 , C_9 y C_{12} .

Tabla F.17: Datos de la caracterización de hemicelulosa extraída de *A. chilensis*. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T				A			
	C_3	C_6	C_9	C_{12}	C_3	C_6	C_9	C_{12}
1	8,97	8,97	8,98	8,98	7477016	7029470	7504158	7466820
	8,93	8,99	8,98	8,98	5652576	8034102	7507648	7463673
	8,96	8,95	8,98	8,98	6748272	6108820	7509159	7471457
2	-	11,75	11,75	-	-	1369	1156	-
	-	11,74	11,75	-	-	1556	1134	-
	-	11,75	11,75	-	-	1141	1165	-
3	12,50	12,53	12,55	12,56	6642	10343	9351	5703
	12,50	12,53	12,54	12,56	4626	11657	9174	5400
	12,51	12,53	12,54	12,56	6106	8843	9332	6898
4	12,93	12,93	12,93	12,92	6226	8811	9947	6593
	12,93	12,92	12,93	12,92	4041	10281	9910	6076
	12,93	12,93	12,93	12,93	5608	7587	9945	7223
5	13,74	13,74	13,74	13,74	51791	64779	57758	37565
	13,74	13,74	13,74	13,74	36994	74621	57570	35753
	13,74	13,74	13,74	13,74	46956	55674	57772	38493
6	14,86	14,87	14,88	14,88	12305	22394	20828	13509
	14,87	14,87	14,87	14,88	5252	25777	20964	11522
	14,87	14,87	14,87	14,88	11048	19176	20954	14075
7	15,92	15,92	15,91	15,91	16171	15740	14664	11279
	15,91	15,92	15,91	15,91	7791	18188	14457	10286
	15,91	15,92	15,91	15,90	14766	13481	14556	11304
8	19,52	19,55	19,54	19,55	3475	4208	4594	2809
	19,50	19,54	19,54	19,56	2786	5122	4346	2691
	19,51	19,54	19,54	19,55	2875	3792	4120	2623
9	21,62	21,62	21,63	21,63	13293	18532	17568	12113
	21,63	21,63	21,63	21,63	9823	21867	17466	12213
	21,63	21,63	21,63	21,62	11946	16108	17288	12297
10	28,23	28,24	28,25	28,24	118422	113438	96699	103053
	28,24	28,23	28,24	28,24	119950	125880	112893	105845
	28,24	28,23	28,24	28,24	122407	119941	108521	82674

Tabla F.18: Datos de la caracterización de hemicelulosa extraída de *G. skottsbergii*. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T				A			
	C_3	C_6	C_9	C_{12}	C_3	C_6	C_9	C_{12}
1	9,01	8,97	8,96	8,96	9156712	7466858	6983001	6662676
	8,99	8,97	8,97	8,96	7890166	7472263	6972380	6943882
	8,95	8,97	8,97	8,98	6408226	7438014	7051097	7386907
2	-	-	-	11,184	-	-	-	1368
	-	-	-	11,193	-	-	-	1400
	-	-	-	11,188	-	-	-	1469
3	12,58	12,59	12,58	12,60	6540	7100	8276	9135
	12,59	12,59	12,58	12,60	4228	8206	8126	9481
	12,58	12,58	12,58	12,60	1813	6759	7670	9327
4	13,74	13,74	13,74	13,75	149942	100384	62748	52403
	13,75	13,74	13,74	13,74	126807	105962	62582	55112
	13,74	13,74	13,74	13,75	99707	100355	63613	59130
5	16,01	-	-	-	2955	-	-	-
	16,01	-	-	-	2811	-	-	-
	16,00	-	-	-	2329	-	-	-
6	19,54	19,54	19,55	19,57	8865	6062	3517	3003
	19,55	19,55	19,55	19,56	7292	6062	3439	3447
	19,55	19,56	19,55	19,57	5902	6220	3636	3790
7	21,62	21,63	21,62	21,64	35828	26802	17320	15741
	21,63	21,62	21,62	21,63	30293	26958	17000	16303
	21,63	21,63	21,62	21,64	23697	27134	17328	17731
8	28,22	28,23	28,22	28,248	125728	105494	89416	82648
	28,23	28,23	28,24	28,229	124415	96933	82862	111798
	28,23	28,23	28,23	28,235	120923	59771	102022	115571

Tabla F.19: Datos de la caracterización de hemicelulosa extraída de *P. columbina*. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T				A			
	C_3	C_6	C_9	C_{12}	C_3	C_6	C_9	C_{12}
1	8,96	8,98	8,97	8,97	6528325	7516995	6951913	7363220
	8,92	9,00	8,95	8,97	4994033	7940301	6410714	6912091
	8,93	8,96	8,98	8,96	5672666	6679679	7522052	6461107
2	11,27	11,28	11,72	-	1754	2543	3987	-
	11,23	11,29	11,70	-	1491	2688	3554	-
	11,23	11,28	11,72	-	1670	2184	4381	-
3	11,71	11,71	12,61	12,62	6188	4941	8953	10097
	11,71	11,72	12,61	12,62	4681	5204	8059	10395
	11,71	11,70	12,61	12,62	5177	4310	9475	9712
4	12,61	12,61	13,74	13,73	9794	11587	57472	47443
	12,60	12,62	13,74	13,73	8022	11630	52670	44822
	12,61	12,61	13,74	13,74	9010	10066	62496	41913
5	13,75	13,74	14,88	14,88	43474	59871	46409	36239
	13,75	13,75	14,88	14,88	34005	63545	42440	34200
	13,75	13,74	14,88	14,88	38281	52759	50402	32087
6	14,88	14,88	15,95	19,55	36409	58151	6898	3658
	14,88	14,89	15,94	19,54	28450	61623	6464	3509
	14,88	14,88	15,94	19,55	32078	51065	7291	2958
7	19,53	19,55	19,55	-	3718	6100	5024	-
	19,52	19,56	19,54	-	2410	6795	4623	-
	19,54	19,54	19,54	-	3115	5225	5646	-
8	21,63	21,63	21,62	21,62	15424	25935	22408	16766
	21,62	21,64	21,63	21,62	11569	27263	20267	15516
	21,62	21,63	21,63	21,63	13590	22827	24317	14134
9	28,24	28,23	28,23	28,23	89686	123335	101037	128842
	28,23	28,24	28,23	28,23	112711	121276	118072	121885
	28,24	28,23	28,23	28,23	112324	120153	93850	110418

Tabla F.20: Datos de la caracterización de hemicelulosa extraída de *U. rigida*. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T				A			
	C_3	C_6	C_9	C_{12}	C_3	C_6	C_9	C_{12}
1	8,95	9,00	8,97	9,00	5529597	7628065	6119821	7665484
	8,96	8,96	8,96	8,97	5845930	5658070	5566221	6144538
	9,01	8,99	8,99	8,97	7817382	6931598	7042209	6144538
2	11,32	11,32	11,32	-	2899	3125	2162	-
	11,32	11,32	11,32	-	3062	2140	1934	-
	11,33	11,32	11,31	-	4383	2730	2521	-
3	11,87	11,88	11,88	11,88	10099	14021	15388	18035
	11,88	11,87	11,88	11,88	10647	10146	13734	14387
	11,88	11,87	11,88	11,88	14916	12599	17958	14387
4	12,96	12,96	12,96	12,96	23558	53435	49841	47499
	12,96	12,96	12,96	12,96	25154	36837	44619	37551
	12,97	12,96	12,96	12,96	35360	47307	58877	37551
5	13,86	13,87	13,88	13,87	8834	13866	14491	12330
	13,87	13,88	13,88	13,88	9316	9957	13155	9829
	13,87	13,87	13,87	13,88	12993	12401	17146	9829
6	14,72	14,72	14,71	14,70	21809	23333	18349	12177
	14,72	14,72	14,71	14,70	23121	16831	16669	9601
	14,73	14,72	14,71	14,70	32139	20755	21866	9601
7	-	-	-	15,99	-	-	-	3221
	-	-	-	15,98	-	-	-	2574
	-	-	-	15,98	-	-	-	2574
8	28,28	28,28	28,27	28,29	62992	66942	100331	55632
	28,28	28,29	28,29	28,29	68679	61199	65636	49393
	28,29	28,28	28,28	28,29	72562	58905	87510	49393

Por otro lado, los datos para la caracterización de hemicelulosa con previa extracción de agar (que fue sometida solo a una concentración de NaOH, 9%p/v) se muestran en la Tabla F.21, donde AC corresponde a los datos de *A. chilensis*, GS a los de *G. skottsbergii*, PC a los de *P. columbina* y UR a los de *U. rigida*.

Tabla F.21: Datos de la caracterización de hemicelulosa extraída (con previa extracción de agar) de *A. chilensis*, *G. skottsbergii*, *P. columbina* y *U. rigida*. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T				A			
	AC	GS	PC	UR	AC	GS	PC	UR
1	8,99		9,00	8,99	6033897		7275847	6294395
	8,99		9,00	8,99	6019889		7270046	6311829
	8,98		9,00	9,00	6041109		7273446	6318252
2	10,71		-	-	2517		-	-
	10,70		-	-	3524		-	-
	10,64		-	-	2113		-	-
3	11,36		11,37	-	2426		4324	-
	11,35		11,37	-	5112		4291	-
	11,33		11,37	-	1621		4290	-
4	12,99		12,96	12,98	39021		5199	38767
	12,98		12,96	12,98	27602		5200	39136
	12,98		12,95	12,99	32628		5165	39185
5	13,78		13,76	13,89	116904		79067	3798
	13,77		13,76	13,89	104971		78846	3921
	13,77		13,76	13,89	110111		79090	3875
6	14,92		14,92	14,74	23503		41432	1596
	14,86		14,91	14,74	16542		41277	1685
	14,90		14,91	14,74	18815		41467	1578
7	19,75		19,72	-	6537		3453	-
	19,66		19,68	-	2784		4179	-
	19,64		19,70	-	4300		4137	-
8	21,53		21,50	-	70756		47144	-
	21,52		21,51	-	66178		47663	-
	21,49		21,52	-	66827		47866	-
9	28,28		28,28	28,28	104614		102099	120366
	28,27		28,27	28,28	103587		116172	107616
	28,27		28,27	28,28	131695		97246	132556

Luego, en las Tablas F.22, F.23, F.24 y F.25 se muestran los promedios de T y A; mientras que en las Tablas F.26, F.27, F.28 y F.29 se exhiben los errores porcentuales asociados a las mediciones experimentales. Los promedios y errores porcentuales para la

caracterización de hemicelulosa con previa extracción de agar se pueden revisar en las Tablas F.30 y F.31, respectivamente.

Tabla F.22: Promedios de los datos experimentales de la caracterización de hemicelulosa extraída de *A. chilensis*. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T				A			
	C_3	C_6	C_9	C_{12}	C_3	C_6	C_9	C_{12}
1	8,96	8,97	8,98	8,98	6625955	7057464	7506988	7467317
2	-	11,75	11,75	-	-	1355	1152	-
3	12,51	12,53	12,54	12,56	5791	10281	9286	6000
4	12,93	12,92	12,93	12,92	5292	8893	9934	6631
5	13,74	13,74	13,74	13,74	45247	65025	57700	37270
6	14,87	14,87	14,87	14,88	9535	22449	20915	13035
7	-	-	-	15,91	-	-	-	10956
8	19,51	19,54	19,54	19,55	3045	4374	4353	2708
9	21,62	21,63	21,63	21,63	11687	18836	17441	12208
10	28,23	28,23	28,24	28,24	120260	119753	106038	97191

Tabla F.23: Promedios de los datos experimentales de la caracterización de hemicelulosa extraída de *G. skottsbergii*. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T				A			
	C_3	C_6	C_9	C_{12}	C_3	C_6	C_9	C_{12}
1	8,98	8,97	8,96	8,97	7818368	7459045	7002159	6997822
2	-	-	-	11,19	-	-	-	1412
3	12,58	12,59	12,58	12,60	4194	7355	8024	9314
4	13,74	13,74	13,74	13,75	125485	102234	62981	55548
5	16,01	-	-	-	2698	-	-	-
6	19,55	19,55	19,55	19,56	7353	6115	3531	3413
7	21,63	21,63	21,62	21,63	29939	26965	17216	16592
8	28,23	28,23	28,23	28,24	123689	87399	91433	103339

Tabla F.24: Promedios de los datos experimentales de la caracterización de hemicelulosa extraída de *P. columbina*. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T				A			
	C_3	C_6	C_9	C_{12}	C_3	C_6	C_9	C_{12}
1	8,94	8,98	8,97	8,97	5731675	7378992	6961560	6912139
2	11,25	11,28	11,71	-	1638	2472	3974	-
3	11,71	11,71	12,61	12,62	5349	4818	8829	10068
4	12,61	12,61	13,74	13,73	8942	11094	57546	44726
5	13,75	13,74	14,88	14,88	38587	58725	46417	34175
6	14,88	14,88	15,94	19,54	32312	56946	6884	3375
7	19,53	19,55	19,54	-	3081	6040	5098	-
8	21,62	21,63	21,63	21,62	13528	25342	22331	15472
9	28,24	28,23	28,23	28,23	104907	121588	104320	120382

Tabla F.25: Promedios de los datos experimentales de la caracterización de hemicelulosa extraída de *U. rigida*. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T				A			
	C_3	C_6	C_9	C_{12}	C_3	C_6	C_9	C_{12}
1	8,97	8,98	8,97	8,98	6397636	6739244	6242750	6651520
2	11,32	11,32	11,31	-	3448	2665	2206	-
3	11,88	11,87	11,88	11,88	11887	12255	15693	15603
4	12,96	12,96	12,96	12,96	28024	45860	51112	40867
5	13,86	13,88	13,88	13,87	10381	12075	14931	10663
6	14,72	14,72	14,71	14,70	25690	20306	18961	10460
7	-	-	-	15,98	-	-	-	2790
8	28,29	28,29	28,28	28,29	68078	62349	84492	51473

Tabla F.26: Errores asociados a los promedios de los datos experimentales de la caracterización de hemicelulosa extraída de *A. chilensis*. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T				A			
	C_3	C_6	C_9	C_{12}	C_3	C_6	C_9	C_{12}
1	0,23	0,22	0,01	0,01	13,86	13,64	0,03	0,05
2	-	0,03	0,02	-	-	15,33	1,38	-
3	0,04	0,02	0,03	0,02	18,03	13,70	1,05	13,20
4	0,01	0,00	0,01	0,03	21,28	15,17	0,21	8,66
5	0,02	0,00	0,00	0,00	16,68	14,57	0,20	3,74
6	0,03	0,00	0,01	0,01	39,46	14,70	0,36	10,29
7	-	-	-	0,02	-	-	-	5,30
8	0,05	0,03	0,02	0,01	12,31	15,55	5,45	3,48
9	0,02	0,01	0,01	0,02	14,97	15,35	0,81	0,75
10	0,01	0,00	0,01	0,01	1,67	5,20	7,90	13,01

Tabla F.27: Errores asociados a los promedios de los datos experimentales de la caracterización de hemicelulosa extraída de *G. skottsbergii*. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T				A			
	C_3	C_6	C_9	C_{12}	C_3	C_6	C_9	C_{12}
1	0,33	0,00	0,02	0,09	17,60	0,25	0,61	5,22
2	-	-	-	0,04	-	-	-	3,65
3	0,06	0,03	0,02	0,03	56,36	10,28	3,93	1,86
4	0,02	0,00	0,02	0,03	20,04	3,16	0,88	6,09
5	0,04	-	-	-	12,15	-	-	-
6	0,01	0,03	0,01	0,02	20,16	1,49	2,81	11,56
7	0,01	0,01	0,02	0,03	20,29	0,62	1,09	6,18
8	0,01	0,01	0,02	0,03	2,01	27,81	10,65	17,44

Tabla F.28: Errores asociados a los promedios de los datos experimentales de la caracterización de hemicelulosa extraída de *P. columbina*. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T				A			
	C_3	C_6	C_9	C_{12}	C_3	C_6	C_9	C_{12}
1	0,24	0,21	0,13	0,10	13,41	8,69	7,98	6,53
2	0,20	0,04	0,07	-	8,20	10,50	10,41	-
3	0,04	0,06	0,03	0,01	14,36	9,54	8,11	3,40
4	0,04	0,04	0,00	0,01	9,93	8,03	8,54	6,18
5	0,02	0,03	0,00	0,01	12,29	9,34	8,58	6,07
6	0,02	0,03	0,02	0,03	12,33	9,45	6,01	10,93
7	0,05	0,07	0,02	-	21,25	13,03	10,11	-
8	0,03	0,02	0,00	0,00	14,25	8,98	9,07	8,51
9	0,02	0,02	0,01	0,01	12,57	1,33	11,93	7,73

Tabla F.29: Errores asociados a los promedios de los datos experimentales de la caracterización de hemicelulosa extraída de *U. rigida*. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T				A			
	C_3	C_6	C_9	C_{12}	C_3	C_6	C_9	C_{12}
1	0,31	0,24	0,17	0,21	19,38	14,82	11,94	13,20
2	0,01	0,03	0,03	-	23,60	18,60	13,42	-
3	0,04	0,02	0,02	0,01	22,18	15,99	13,56	13,50
4	0,01	0,02	0,02	0,01	22,85	18,30	14,11	14,05
5	0,02	0,02	0,02	0,01	21,91	16,36	13,61	13,54
6	0,01	0,01	0,02	0,01	21,89	16,12	13,99	14,22
7	-	-	-	0,01	-	-	-	13,39
8	0,01	0,01	0,04	0,01	7,07	6,64	20,76	7,00

Tabla F.30: Promedios de los datos de la caracterización de hemicelulosa extraída (con previa extracción de agar) de *A. chilensis*, *G. skottsbergii*, *P. columbina* y *U. rigida*. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T				A			
	AC	GS	PC	UR	AC	GS	PC	UR
1	8,98		9,00	8,99	6031632		7273113	6308159
2	10,68		-	-	2718		-	-
3	11,35		11,37	-	3053		4302	-
4	12,98		12,96	12,98	33084		5188	39029
5	13,77		13,76	13,89	110662		79001	3865
6	14,89		14,91	14,74	19620		41392	1620
7	19,68		19,70	-	4540		3923	-
8	21,51		21,51	-	67920		47558	-
9	28,27		28,27	28,28	113299		105172	120179

Tabla F.31: Errores porcentuales asociados a los promedios de los datos de la caracterización de hemicelulosa extraída (con previa extracción de agar) de *A. chilensis*, *G. skottsbergii*, *P. columbina* y *U. rigida*. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T				A			
	AC	GS	PC	UR	AC	GS	PC	UR
1	0,08		0,01	0,01	0,18		0,04	0,20
2	0,35		-	-	26,74		-	-
3	0,16		0,01	-	59,88		0,45	-
4	0,05		0,05	0,01	17,30		0,38	0,59
5	0,04		0,01	0,01	5,41		0,17	1,61
6	0,18		0,01	0,01	18,09		0,24	3,54
7	0,30		0,09	-	41,58		10,39	-
8	0,09		0,03	-	3,65		0,78	-
9	0,04		0,02	0,00	14,07		9,35	10,38

Finalmente, haciendo uso de los factores de conversión previamente obtenidos, e identificando a qué azúcar corresponde cada peak con ayuda de los estándares realizados, se calculan las concentraciones respectivas para cada muestra y cada concentración de hidróxido de sodio evaluada (ver Tabla F.32). Por otro lado, las mismas concentraciones, pero para las muestras con extracción de agar, se muestran en la Tabla F.33.

Tabla F.32: Concentraciones de azúcares estructurales en la hemicelulosa extraída identificados por cromatografía de intercambio iónico, medida en mg/mL.

Alga	Azúcar	Concentraciones			
		C_3	C_6	C_9	C_{12}
<i>A. chilensis</i>	Glu	0,04	0,06	0,07	0,04
	Xil	0,25	0,43	0,39	0,20
	Ara	0,08	0,15	0,14	0,11
<i>G. skottsbergii</i>	Glu	0,03	0,05	0,05	0,06
	Xil	0,68	0,55	0,34	0,30
	Ara	-	-	-	-
<i>P. columbina</i>	Glu	0,06	0,07	0,06	0,07
	Xil	0,21	0,32	0,38	0,24
	Ara	0,27	0,47	0,31	0,28
<i>U. rigida</i>	Glu	0,19	0,31	0,10	0,07
	Xil	0,15	0,25	0,08	0,06
	Ara	0,21	0,17	0,01	0,02

Tabla F.33: Concentraciones de azúcares estructurales en la hemicelulosa extraída (con previa extracción de agar) identificados por cromatografía de intercambio iónico, medida en mg/mL.

Alga	Azúcar	Concentraciones
<i>A. chilensis</i>	Glu	0,22
	Xil	0,60
	Ara	0,16
<i>G. skottsbergii</i>	Glu	
	Xil	
	Ara	
<i>P. columbina</i>	Glu	0,03
	Xil	0,43
	Ara	0,34
<i>U. rigida</i>	Glu	0,26
	Xil	0,02
	Ara	0,01

F.3. Caracterización de XOS

Para la identificación de XOS de acuerdo a los tiempos de retención obtenidos tras la cromatografía, y también, para el cálculo de la concentración a partir del área del cromatograma, se usaron estándares y curvas de calibración, respectivamente, previamente construidas en el laboratorio. En la Tabla F.34 se presentan los tiempos de retención y factores de conversión para cada XOS de grado de polimerización entre 2 y 6; y xilosa (X_1).

Tabla F.34: Factores de conversión entre área y concentración en mg/mL, y tiempos de retención para cada XOS de grado de polimerización entre 1 y 6. Tiempo de retención medido en minutos.

XOS	Factor conversión ($\times 10^{-6}$)	Tiempo retención
X_1	0,90	34,32
X_2	2,00	28,81
X_3	0,80	24,77
X_4	1,00	21,64
X_5	0,70	19,22
X_6	1,00	17,37

Tabla F.35: Datos de la caracterización de XOS obtenidos a partir de la hidrólisis de hemicelulosa sin extracción previa de agar. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T				A			
	AC	GS	PC	UR	AC	GS	PC	UR
x1	32,72	33,27	34,20	32,46	4000	4177	51343	10833
	32,91	33,32	34,17	32,56	4866	11538	51248	9040
x2	28,26	28,62	28,42	-	3705	2410	1192	-
	28,17	28,46	28,34	-	3887	9224	601	-
x3	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
x4	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
x5	-	-	-	19,63	-	-	-	186
	-	-	-	19,556	-	-	-	189
x6	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-

En las Tablas F.35 y F.36 se muestran los datos obtenidos a partir de la cromatografía por intercambio iónico para la caracterización de XOS tras la hidrólisis enzimática, tras un pretratamiento alcalino sin y con extracción de agar previa. Dentro de estos datos se incluyen el tiempo de retención, T y el área bajo la curva de cada peak, A.

Tabla F.36: Datos de la caracterización de XOS obtenidos a partir de la hidrólisis de hemicelulosa con extracción previa de agar. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T				A			
	AC	GS	PC	UR	AC	GS	PC	UR
x1	32,50	33,17	32,56	32,40	8115	905	3013	14779
	32,474	33,033	32,781	32,46	8471	873	2832	13881
x2	28,08	-	28,63	28,53	9765	-	3268	3757
	28,192	-	28,755	28,612	9598	-	3847	3212
x3	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
x4	-	-	-	22,13	-	-	-	2685
	-	-	-	22,17	-	-	-	2660
x5	-	-	-	19,87	-	-	-	1078
	-	-	-	19,925	-	-	-	1162
x6	-	-	-	17,55	-	-	-	92
	-	-	-	17,191	-	-	-	273

Luego, en las Tablas F.37 y F.38 se presentan los promedios de cada duplicado, mientras que en las Tablas F.39 y F.40 se exhiben los errores porcentuales asociados a cada uno de ellos.

Tabla F.37: Promedio de los datos experimentales de la caracterización de XOS obtenidos a partir de la hidrólisis de hemicelulosa sin extracción previa de agar. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T				A			
	AC	GS	PC	UR	AC	GS	PC	UR
x1	32,82	33,30	34,18	32,51	4433	7858	51296	9937
x2	28,21	28,54	28,38	-	3796	5817	897	-
x3	-	-	-	-	-	-	-	-
x4	-	-	-	-	-	-	-	-
x5	-	-	-	19,59	-	-	-	188
x6	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla F.38: Promedio de los datos experimentales de la caracterización de XOS obtenidos a partir de la hidrólisis de hemicelulosa con extracción previa de agar. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T				A			
	AC	GS	PC	UR	AC	GS	PC	UR
x1	32,49	33,10	32,67	32,43	8293,00	889,00	2922,50	14330,00
x2	28,14	-	28,69	28,57	9681,50	-	3557,50	3484,50
x3	-	-	-	-	-	-	-	-
x4	-	-	-	22,15	-	-	-	2672,50
x5	-	-	-	19,90	-	-	-	1120,00
x6	-	-	-	17,37	-	-	-	182,50

Tabla F.39: Error porcentual asociado a los promedio de los datos experimentales de la caracterización de XOS obtenidos a partir de la hidrólisis de hemicelulosa sin extracción previa de agar. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T				A			
	AC	GS	PC	UR	AC	GS	PC	UR
x1	0,41 %	0,12 %	0,08 %	0,23 %	13,81 %	66,24 %	0,13 %	12,76 %
x2	0,23 %	0,39 %	0,19 %	-	3,39 %	82,83 %	46,61 %	-
x3	-	-	-	-	-	-	-	-
x4	-	-	-	-	-	-	-	-
x5	-	-	-	0,28 %	-	-	-	1,13 %
x6	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla F.40: Error porcentual asociado a los promedio de los datos experimentales de la caracterización de XOS obtenidos a partir de la hidrólisis de hemicelulosa con extracción previa de agar. Tiempo de retención medido en minutos, área medida en unidades arbitrarias.

Peak	T				A			
	AC	GS	PC	UR	AC	GS	PC	UR
x1	0,06 %	0,29 %	0,47 %	0,13 %	3,04 %	2,55 %	4,38 %	4,43 %
x2	0,28 %	-	0,31 %	0,20 %	1,22 %	-	11,51 %	11,06 %
x3	-	-	-	-	-	-	-	-
x4	-	-	-	0,14 %	-	-	-	0,66 %
x5	-	-	-	0,21 %	-	-	-	5,30 %
x6	-	-	-	1,44 %	-	-	-	70,13 %

Finalmente, haciendo uso de los factores de conversión, en la Tabla F.41 se muestran las concentraciones determinadas para cada XOS (se considera un factor de dilución de 10, ya que la reacción enzimática fue diluida de acuerdo a ese factor previo análisis por la columna), estas concentraciones fueron calculadas para los productos de la reacción enzimática de hemicelulosa sin extracción de agar (HEM) y hemicelulosa con extracción de agar (HEM-AGAR).

Tabla F.41: Concentraciones de distintos XOS para las distintas algas.
Concentración medida en mg/mL.

XOS	HEM				HEM-AGAR			
	AC	GS	PC	UR	AC	GS	PC	UR
X1	0,040	0,071	0,462	0,089	0,075	0,008	0,026	0,129
X2	0,076	0,116	0,018	-	0,194	-	0,071	0,070
X3	-	-	-	-	-	-	-	-
X4	-	-	-	-	-	-	-	0,027
X5	-	-	-	0,001	-	-	-	0,008
X6	-	-	-	-	-	-	-	0,002

Anexo G. Datos y curva de calibración del ensayo DNS para la determinación de extremos reductores

En las Tablas G.1, G.2 y G.3 se presentan los datos experimentales medidos en el ensayo DNS para la cuantificación de extremos reductores de la reacción enzimática de hemicelulosa, hemicelulosa previa extracción de agar y biomasa, con xilanasa a 2 horas de haber iniciado la hidrólisis enzimática, y también, los promedios por triplicado y los errores asociados a estos, respectivamente.

Tabla G.1: Datos experimentales del ensayo DNS sobre la reacción enzimática hemicelulosa - xilanasa (2 horas de reacción), medición de absorbancia a 550 nm.

Datos	HEM		HEM-AGAR		BIO	
	E	B	E	B	E	B
<i>A. chilensis</i>	0,056	0,054	0,147	0,096	0,096	0,047
	0,047	0,042	0,167	0,102	0,085	0,040
	0,047	0,037	0,184	0,058	0,057	0,040
<i>G. skottsbergii</i>	0,045	0,051	0,676	0,612	0,081	0,042
	0,062	0,048	0,705	0,625	0,083	0,041
	0,040	0,061	0,675	0,646	0,087	0,040
<i>P. columbina</i>	0,061	0,066	0,041	0,058	0,095	0,038
	0,045	0,051	0,050	0,037	0,074	0,041
	0,050	0,040	0,045	0,089	0,073	0,044
<i>U. rigida</i>	0,321	0,099	0,798	0,460	0,101	0,056
	0,332	0,088	0,891	0,381	0,087	0,046
	0,395	0,093	1,049	0,520	0,098	0,037

Tabla G.2: Promedio de los datos experimentales del ensayo DNS sobre la reacción enzimática hemicelulosa - xilanasa (2 horas de reacción), medición de absorbancia a 550 nm.

Promedios	HEM		HEM-AGAR		BIO	
	E	B	E	B	E	B
<i>A. chilensis</i>	0,050	0,044	0,166	0,085	0,079	0,042
<i>G. skottsbergii</i>	0,049	0,053	0,685	0,628	0,084	0,041
<i>P. columbina</i>	0,052	0,052	0,045	0,061	0,081	0,041
<i>U. rigida</i>	0,349	0,093	0,913	0,454	0,095	0,046

Tabla G.3: Error porcentual asociado del ensayo DNS sobre la reacción enzimática hemicelulosa - xilanasas (2 horas de reacción), medición de absorbancia a 550 nm.

Errores (%)	HEM		HEM-AGAR		BIO	
	E	B	E	B	E	B
<i>A. chilensis</i>	10,39	19,71	11,16	27,96	25,35	9,55
<i>G. skottsbergii</i>	23,54	12,76	2,49	2,73	3,65	2,44
<i>P. columbina</i>	15,74	24,94	9,95	42,65	15,40	7,32
<i>U. rigida</i>	11,43	5,90	13,90	15,37	7,73	20,51

Por otro lado, en las Tablas G.4, G.5 y G.6 se presentan los datos experimentales medidos en el ensayo DNS para la cuantificación de extremos reductores de la reacción enzimática de hemicelulosa, hemicelulosa previa extracción de agar y biomasa, con xilanasas, pero a 16 horas de haber iniciado la hidrólisis enzimática, y también, los promedios por triplicado y los errores asociados a estos, respectivamente.

Tabla G.4: Datos experimentales del ensayo DNS sobre la reacción enzimática hemicelulosa - xilanasas (16 horas de reacción), medición de absorbancia a 550 nm.

Datos	HEM		HEM-AGAR		BIO	
	E	B	E	B	E	B
<i>A. chilensis</i>	0,067	0,054	0,186	0,090	0,150	0,043
	0,064	0,045	0,266	0,098	0,152	0,044
	0,060	0,043	0,268	0,057	0,111	0,061
<i>G. skottsbergii</i>	0,047	0,048	0,667	0,466	0,070	0,046
	0,056	0,054	0,663	0,586	0,116	0,041
	0,076	0,061	0,711	0,506	0,106	0,061
<i>P. columbina</i>	0,055	0,070	0,044	0,074	0,089	0,041
	0,054	0,120	0,053	0,045	0,133	0,042
	0,058	0,072	0,051	0,092	0,082	0,044
<i>U. rigida</i>	0,505	0,154	1,384	0,750	0,130	0,067
	0,531	0,087	1,498	0,713	0,120	0,050
	0,634	0,077	1,589	0,882	0,116	0,045

Tabla G.5: Promedio de los datos experimentales del ensayo DNS sobre la reacción enzimática hemicelulosa - xilanasas (16 horas de reacción), medición de absorbancia a 550 nm.

Promedios	HEM		HEM-AGAR		BIO	
	E	B	E	B	E	B
<i>A. chilensis</i>	0,064	0,047	0,240	0,082	0,138	0,049
<i>G. skottsbergii</i>	0,060	0,054	0,680	0,519	0,097	0,049
<i>P. columbina</i>	0,056	0,087	0,049	0,070	0,101	0,042
<i>U. rigida</i>	0,557	0,106	1,490	0,782	0,122	0,054

Tabla G.6: Error porcentual asociado del ensayo DNS sobre la reacción enzimática hemicelulosa - xilanasas (16 horas de reacción), medición de absorbancia a 550 nm.

Errores (%)	HEM		HEM-AGAR		BIO	
	E	B	E	B	E	B
<i>A. chilensis</i>	5,52	12,38	19,49	26,61	20,51	8,82
<i>G. skottsbergii</i>	24,88	11,97	3,91	11,77	21,10	6,22
<i>P. columbina</i>	3,74	32,41	9,58	33,72	3,61	6,48
<i>U. rigida</i>	12,26	39,50	6,89	11,37	21,36	7,81

Para las Tablas G.1, G.2, G.3, G.4, G.5 y G.6 HEM corresponde a la hemicelulosa obtenida luego del pretratamiento alcalino; HEM-AGAR es la hemicelulosa obtenida luego del pretratamiento alcalino, pero con una extracción previa de agar; mientras que BIO corresponde a la biomasa que fue sometida directamente a la acción de la enzima xilanasas. Además, E corresponde a la muestra con enzima, mientras que B corresponde a la muestra sin enzima.

Para la transformación entre absorbancia medida y concentración de extremos reductores se elaboró una curva de calibración con xilosa, entendiendo y asumiendo que cada xilosa corresponde a un extremo reductor, cuyos datos se exponen en la Tabla G.7, mientras que la gráfica se presenta en la Figura G.1. Con respecto a la nomenclatura, se tiene que E_i corresponde al estándar i , cada uno de ellos asociados a una concentración en orden creciente entre 0,0 y 0,5 mg/mL, lo que se puede observar con mayor detalle en la Tabla G.8. Cabe destacar que el arreglo lineal tuvo un R^2 de 0,99.

Tabla G.7: Datos para la construcción de la curva de extremos reductores, medición de absorbancia a 550 nm.

	E_1	E_2	E_3	E_4	E_5	E_6
Datos	0,039	0,091	0,314	0,491	0,583	0,768
	0,040	0,108	0,290	0,469	0,657	0,801
	0,051	0,092	0,308	0,512	0,620	0,772
Promedio	0,043	0,097	0,304	0,491	0,620	0,780
Error (%)	15,30 %	9,83 %	4,11 %	4,38 %	5,97 %	2,31 %

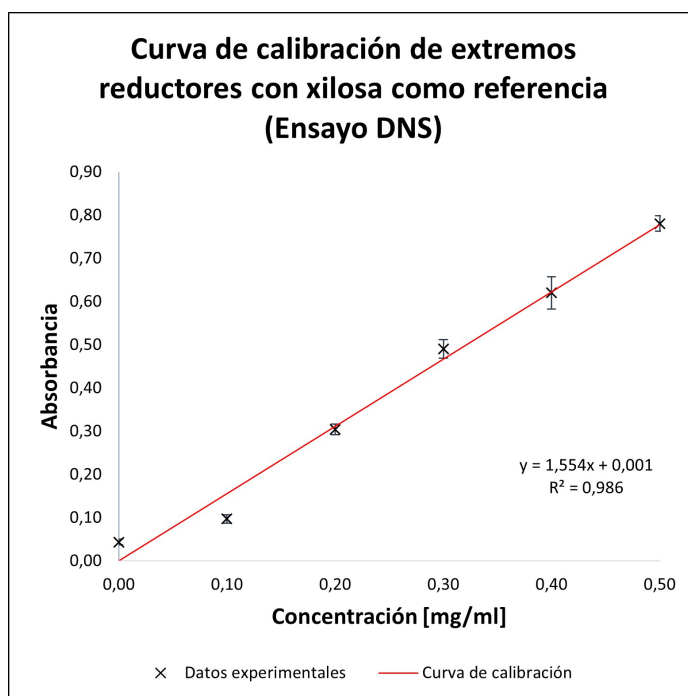


Figura G.1: Curva de calibración de extremos reductores con xilosa como referencia.

Tabla G.8: Datos para la construcción de la curva de calibración de extremos reductores con la respectiva concentración asociada en mg/mL, medición de absorbancia a 550 nm.

Concentración	Absorbancia
0,0	0,043
0,1	0,097
0,2	0,304
0,3	0,491
0,4	0,620
0,5	0,780

En la Ecuación G.1 se presenta la expresión matemática que define la relación entre absorbancia, A_{ER} , y concentración de extremos reductores, C_{ER} .

$$C_{ER} = \frac{A_{ER} - 0,001}{1,554} \quad (\text{G.1})$$

Finalmente, en la Tabla G.9 y G.10 (2 y 16 horas de hidrólisis, respectivamente) se exponen las concentraciones obtenidas, las que posteriormente fueron empleadas para calcular la concentración de extremos reductores atribuibles a la hidrólisis enzimática xilanasa - xilano como la resta entre las concentraciones asociadas a la muestra con enzima menos la muestra sin enzima (blanco).

Tabla G.9: Concentraciones de extremos reductores en las muestras con enzima (C_E) y muestras sin enzima (C_B) para cada alga en mg/mL con 2 horas de hidrólisis enzimática.

Concentraciones	HEM		HEM-AGAR		BIO	
	C_E	C_B	C_E	C_B	C_E	C_B
<i>A. chilensis</i>	0,032	0,028	0,107	0,055	0,051	0,027
<i>G. skottsbergii</i>	0,031	0,034	0,443	0,405	0,053	0,026
<i>P. columbina</i>	0,033	0,033	0,029	0,039	0,052	0,026
<i>U. rigida</i>	0,225	0,060	0,590	0,293	0,061	0,029

Tabla G.10: Concentraciones de extremos reductores en las muestras con enzima (C_E) y muestras sin enzima (C_B) para cada alga en mg/mL con 16 horas de hidrólisis enzimática.

Concentraciones	HEM		HEM-AGAR		BIO	
	C_E	C_B	C_E	C_B	C_E	C_B
<i>A. chilensis</i>	0,041	0,030	0,154	0,052	0,088	0,031
<i>G. skottsbergii</i>	0,038	0,035	0,437	0,334	0,062	0,031
<i>P. columbina</i>	0,035	0,056	0,031	0,045	0,065	0,027
<i>U. rigida</i>	0,358	0,068	0,958	0,502	0,078	0,034

Luego, en las Tablas G.11 y G.12 se exhiben los errores absolutos asociados a cada una de las mediciones respectivas.

Tabla G.11: Error absoluto asociados a las concentraciones de extremos reductores en las muestras con enzima (C_E) y muestras sin enzima (C_B) para cada alga en mg/mL con 2 horas de hidrólisis enzimática.

Errores	HEM		HEM-AGAR		BIO	
	C_E	C_B	C_E	C_B	C_E	C_B
<i>A. chilensis</i>	0,003	0,006	0,012	0,015	0,013	0,003
<i>G. skottsbergii</i>	0,007	0,004	0,011	0,011	0,002	0,001
<i>P. columbina</i>	0,005	0,008	0,003	0,017	0,008	0,002
<i>U. rigida</i>	0,026	0,004	0,082	0,045	0,005	0,006

Tabla G.12: Error absoluto asociados a las concentraciones de extremos reductores en las muestras con enzima (C_E) y muestras sin enzima (C_B) para cada alga en mg/mL con 16 horas de hidrólisis enzimática.

Errores	HEM		HEM-AGAR		BIO	
	C_E	C_B	C_E	C_B	C_E	C_B
<i>A. chilensis</i>	0,002	0,004	0,030	0,014	0,015	0,006
<i>G. skottsbergii</i>	0,009	0,004	0,017	0,039	0,015	0,007
<i>P. columbina</i>	0,001	0,018	0,003	0,015	0,018	0,001
<i>U. rigida</i>	0,044	0,027	0,066	0,057	0,005	0,007

Anexo H. Datos y curva de calibración del análisis de lignina

En las Tablas H.1, H.2 y H.3 se presentan los datos experimentales medidos para la determinación de lignina insoluble, los promedios por triplicado y los errores asociados a estos, respectivamente.

Tabla H.1: Datos experimentales de la medición de lignina insoluble en gramos.

Datos	A	B
<i>A. chilensis</i>	0,1038	0,1059
	0,1056	0,1088
	0,1058	0,1071
<i>G.skottsbergii</i>	0,103	0,1036
	0,1014	0,1024
	0,1019	0,1031
<i>P. columbina</i>	0,1093	0,1097
	0,1037	0,1055
	0,1002	0,1009
<i>U. rigida</i>	0,0999	0,1005
	0,1052	0,1058
	0,1031	0,1034

Tabla H.2: Promedios de la medición de lignina insoluble en gramos.

Promedios	A	B
<i>A. chilensis</i>	0,105	0,107
<i>G.skottsbergii</i>	0,102	0,103
<i>P. columbina</i>	0,104	0,105
<i>U. rigida</i>	0,103	0,103

Tabla H.3: Errores asociados a los promedios de la medición de lignina insoluble en gramos.

Errores (%)	A	B
<i>A. chilensis</i>	1,05	1,36
<i>G.skottsbergii</i>	0,80	0,59
<i>P. columbina</i>	4,40	4,18
<i>U. rigida</i>	2,60	2,57

Donde A corresponde a la masa del filtro antes de la filtración, mientras que B corresponde a la masa del filtro posterior a la filtración.

Por otro lado, en las Tablas H.4, H.5 y H.6 se presentan los datos experimentales medidos para la determinación de lignina soluble, los promedios por triplicado y los errores asociados a estos, respectivamente.

Tabla H.4: Datos experimentales de la medición de lignina soluble, medición de absorbancia en celdas de cuarzo a 205 nm.

Datos	C
<i>A. chilensis</i>	0,854
	0,867
	0,866
<i>G. skottsbergii</i>	0,779
	0,781
	0,776
<i>P. columbina</i>	0,893
	0,886
	0,888
<i>U. rigida</i>	0,866
	0,863
	0,891

Tabla H.5: Promedios de la medición de lignina soluble, medición de absorbancia en celdas de cuarzo a 205 nm.

Promedios	C
<i>A. chilensis</i>	0,862
<i>G. skottsbergii</i>	0,779
<i>P. columbina</i>	0,889
<i>U. rigida</i>	0,873

Tabla H.6: Errores asociados a los promedios de la medición de lignina soluble, medición de absorbancia en celdas de cuarzo a 205 nm.

Errores (%)	C
<i>A. chilensis</i>	0,839
<i>G. skottsbergii</i>	0,323
<i>P. columbina</i>	0,406
<i>U. rigida</i>	1,760

Donde C corresponde a la absorbancia medida a 205 nm en celdas de cuarzo, esto para cada muestra y cada alga.

Para la transformación entre absorbancia medida y concentración de lignina se elaboró una curva de calibración, cuyos datos se exponen en la Tabla H.7, mientras que la gráfica se presenta en la Figura H.1. Con respecto a la nomenclatura, se tiene que E_i corresponde al estándar i , cada uno de ellos asociados a una concentración en orden creciente entre 0,0 y 0,14 mg/mL, lo que se puede observar con mayor detalle en la Tabla H.8. Cabe destacar que el arreglo lineal tuvo un R^2 de 0,98.

Tabla H.7: Datos para la construcción de la curva de calibración de lignina soluble, medición de absorbancia en celdas de cuarzo a 205 nm.

	E_1	E_2	E_3	E_4	E_5
Datos	0,685	0,796	0,924	1,026	1,115
	0,683	0,801	0,925	1,038	1,119
	0,690	0,791	0,937	1,052	1,121
Promedio	0,686	0,796	0,929	1,039	1,118
Error (%)	0,36	0,50	0,72	1,30	0,31

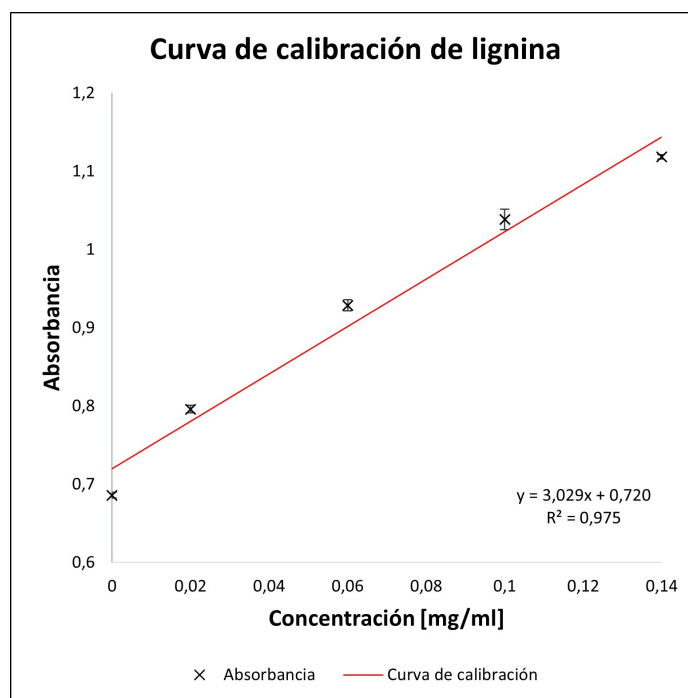


Figura H.1: Curva de calibración de lignina soluble.

Tabla H.8: Datos para la construcción de la curva de calibración de lignina soluble con la respectiva concentración asociada en mg/mL, medición de absorbancia en celdas de cuarzo a 205 nm.

Concentración	Absorbancia
0,00	0,686
0,02	0,796
0,06	0,929
0,10	1,039
0,14	1,118

En la Ecuación H.1 se presenta la expresión matemática que define la relación entre absorbancia, A_{lig} , y concentración de lignina soluble, $C_{lig,sol}$.

$$C_{lig,sol} = \frac{A_{lig} - 0,720}{3,029} \quad (\text{H.1})$$

Finalmente, en la Tabla H.9 se exponen las concentraciones obtenidas que posteriormente fueron empleadas para calcular la composición porcentual de lignina de cada alga. Recordar que la composición, reportada en el cuerpo del documento, corresponde a la concentración de lignina dividida por la concentración de biomasa algal que en este caso tiene un valor de 3 mg/mL.

Tabla H.9: Concentraciones de lignina soluble para cada alga en mg/mL.

	Concentración
<i>A. chilensis</i>	0,470
<i>G.skottsbergii</i>	0,194
<i>P. columbina</i>	0,558
<i>U. rigida</i>	0,506

Anexo I. Datos y curva de calibración de la extracción y cuantificación de proteínas

En las Tablas I.1, I.2 y I.3 se presentan los datos experimentales medidos para la determinación de la composición de proteínas para cada alga, los promedios por triplicado y los errores asociados a estos, respectivamente.

Tabla I.1: Datos experimentales de la cuantificación de proteínas, medición de absorbancia a 595 nm.

Datos	A	B	C
<i>A. chilensis</i>	0,220	0,180	0,249
	0,213	0,180	0,237
	0,195	0,199	0,285
<i>G. skottsbergii</i>	0,247	0,163	0,297
	0,256	0,190	0,303
	0,252	0,173	0,301
<i>P. columbina</i>	0,351	0,157	0,298
	0,371	0,172	0,308
	0,387	0,172	0,324
<i>U. rigida</i>	0,269	0,143	0,301
	0,255	0,146	0,350
	0,253	0,148	0,302

Tabla I.2: Promedios de los datos de la cuantificación de proteínas, medición de absorbancia a 595 nm.

Promedios	A	B	C
<i>A. chilensis</i>	0,209	0,186	0,257
<i>G. skottsbergii</i>	0,252	0,175	0,300
<i>P. columbina</i>	0,370	0,167	0,310
<i>U. rigida</i>	0,259	0,146	0,318

Tabla I.3: Errores asociados a los datos de la cuantificación de proteínas, medición de absorbancia a 595 nm.

Errores (%)	A	B	C
<i>A. chilensis</i>	6,16	5,89	9,72
<i>G.skottsbergii</i>	1,79	7,79	1,02
<i>P. columbina</i>	4,88	5,19	4,23
<i>U. rigida</i>	3,37	1,73	8,82

Donde A corresponde a la absorbancia medida a 595 nm por medio del método de Bradford y para solubilización de proteínas en agua destilada (hidratación de la Figura 2.2), B es la misma medición, pero para la solución ácida de proteínas (tratamiento ácido de la Figura 2.2), y finalmente, C corresponde a la solución alcalina (tratamiento alcalino de la Figura 2.2), esto para cada muestra y cada alga.

Para la transformación entre absorbancia medida y concentración de proteínas se elaboró una curva de calibración con BSA como estándar, cuyos datos se exponen en la Tabla I.4, mientras que la gráfica se presenta en la Figura I.1. Con respecto a la nomenclatura, se tiene que E_i corresponde al estándar i , cada uno de ellos asociados a una concentración en orden creciente entre 0,0 y 1,0 mg/mL, lo que se puede observar con mayor detalle en la Tabla I.5. Cabe destacar que el arreglo lineal tuvo un R^2 de 0,99.

Tabla I.4: Datos para la construcción de la curva de calibración de concentración de proteínas, medición de absorbancia a 595 nm.

	E_1	E_2	E_3	E_4	E_5	E_6
Datos	0,147	0,222	0,29	0,288	0,451	0,478
	0,142	0,199	0,301	0,359	0,418	0,481
	0,150	0,212	0,291	0,343	0,410	0,440
Promedio	0,146	0,211	0,294	0,33	0,426	0,466
Error (%)	2,76	5,47	2,07	11,29	5,10	4,90

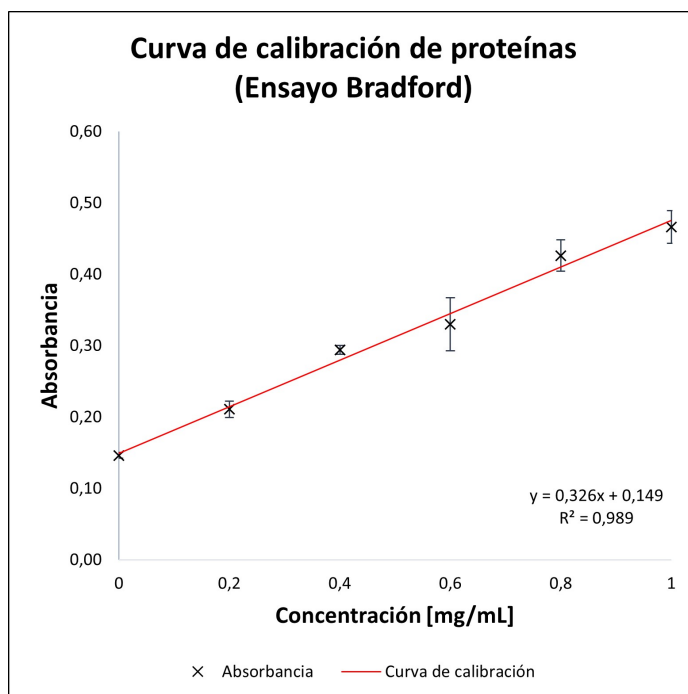


Figura I.1: Curva de calibración de proteínas mediante método de Bradford.

Tabla I.5: Datos para la construcción de la curva de calibración de proteínas mediante método de Bradford con la respectiva concentración asociada en mg/mL, medición de absorbancia a 595 nm.

Concentración	Absorbancia
0,0	0,146
0,2	0,211
0,4	0,294
0,6	0,330
0,8	0,426
1,0	0,466

En la Ecuación I.1 se presenta la expresión matemática que define la relación entre absorbancia, A_{prot} , y concentración de proteínas, C_{prot} .

$$C_{prot} = \frac{A_{lig} - 0,149}{0,326} \quad (I.1)$$

Luego, en la Tabla I.6 se exponen las concentraciones obtenidas que posteriormente fueron empleadas para calcular la composición porcentual de proteínas de cada alga. Recordar que la composición, reportada en el cuerpo del documento, corresponde a la concentración de proteínas dividida por la concentración de biomasa algal que en este caso tiene un valor de 50 mg/mL.

Tabla I.6: Concentraciones de proteínas para cada alga en mg/mL.

	Concentración
<i>A. chilensis</i>	3,60
<i>G.skottsbergii</i>	5,03
<i>P. columbina</i>	5,66
<i>U. rigida</i>	5,50

Finalmente, se debe considerar el rendimiento del método de extracción con respecto a la proteína real que tiene la muestra, en este caso, un 59,76 % [70]. En consideración de ello, en la Tabla I.7 se exhiben las concentraciones reales de proteína para cada alga.

Tabla I.7: Concentraciones de proteínas para cada alga en mg/mL, en consideración del rendimiento del método de extracción.

	Concentración
<i>A. chilensis</i>	6,03
<i>G.skottsbergii</i>	8,41
<i>P. columbina</i>	9,47
<i>U. rigida</i>	9,21