



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNOLOGÍA  
Y MATERIALES.**

# **EXTRACCIÓN DE FICOBILIPROTEÍNAS Y AGAR A PARTIR DE *AGAROPHYTON CHILENSE***

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

**SEBASTIÁN ANDRÉS CORREA RIVAS**

**PROFESOR GUÍA:**

**MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS**

**MIEMBROS DE COMISIÓN:**

**MARÍA ORIANA SALAZAR AGUIRRE**

**STEPHANIE BRAIN ISASI**

**SANTIAGO DE CHILE**

**2020**

**RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE:** Ingeniero Civil Químico e Ingeniero Civil en Biotecnología.

**POR:** Sebastián Andrés Correa Rivas

**FECHA:** 30/03/2020

**PROFESOR GUÍA:** María Elena Lienqueo Contreras

## **EXTRACCIÓN DE FICOBILIPROTEÍNAS Y AGAR A PARTIR DE *AGAROPHYTON CHILENSE***

*Agarophyton chilense* es un alga roja presente en las costas de Chile que posee gran relevancia para la economía nacional, ya que es un producto de exportación a nivel mundial para la obtención de agar, un agente gelificante utilizado en de la industria alimenticia.

Dentro de este tipo de algas es posible encontrar, además, ficobiliproteínas, como la ficoeritrina y la ficocianina, que corresponden a pigmentos proteicos cuya función es la captación de luz para el proceso de fotosíntesis. Estas proteínas son utilizadas como pigmentos naturales en la industria cosmética y alimenticia, y poseen propiedades antioxidantes y antitumorales.

El objetivo de este trabajo es dar valor agregado al proceso de extracción de agar con la obtención de ficobiliproteínas como coproducto. Para esto se diseña un método de extracción y purificación de proteínas a nivel de laboratorio y, a partir de los restos algales, se diseña un método de extracción de agar. Además, se evalúa el efecto de este proceso en el rendimiento y calidad del agar.

La extracción de ficobiliproteínas inicia con una suspensión de alga seca en buffer fosfato salino. Luego, a través de ciclos de congelamiento-descongelamiento y posterior reposo se extraen las proteínas hacia el medio extracelular. A continuación, las proteínas solubles se fraccionan mediante precipitación con sulfato de amonio, sedimentando en el rango entre 20 y 60 % de saturación. Luego, el pellet solubilizado se dializa para ser purificado en una columna de intercambio aniónico. Se determina la pureza de las ficobiliproteínas en las fracciones mediante electroforesis y espectrofotometría. Se obtiene  $0,193 \pm 0,04$  mg y  $0,181 \pm 0,02$  mg de ficoeritrina y ficocianina por gramo de alga seca, respectivamente, siendo un 65 % menor en ficoeritrina al reportado para la misma alga. Tras las etapas de purificación se obtiene un índice de pureza de 2,85 en ficoeritrina y 2,11 en ficocianina, inferior a lo reportado en literatura para la primera, que con procedimiento similar en otras algas alcanza un valor de 5,21.

Por otra parte, se realiza una extracción de agar para alga sin tratamiento y alga resultante de la extracción de ficobiliproteínas. Se aplica un tratamiento alcalino para la disminución de compuestos sulfurados. Luego de una neutralización se realiza una cocción de la muestra de alga para solubilizar el agar en agua destilada a alta temperatura. Finalmente, el agar se seca y se determina rendimiento para comparar el efecto de extracción de proteínas en el agar. El rendimiento no se ve altamente afectado por la extracción de proteínas, obteniendo un promedio de 22,03 % y 23,26 % con y sin extracción previa de ficobiliproteínas respectivamente, estando ambos dentro del rango esperado para algas del género. Adicionalmente, se obtiene una calidad de agar sobre los  $700 \text{ g/cm}^2$  en promedio de fuerza de gel en ambos casos.

Se concluye la factibilidad de un proceso a escala de laboratorio para la extracción en conjunto de agar y ficobiliproteínas a partir de *Agarophyton chilense*, sin afectar rendimiento y calidad de agar.

## AGRADECIMIENTOS

Llegando ya al final de este proceso, lo que más tengo son palabras de agradecimiento para mi familia, especialmente mis padres y mi hermano que siempre han estado ahí para alentarme. Nadie les enseña a los padres cuál es la mejor fórmula para criar a un hijo, pero creo que los míos la encontraron, y estoy muy agradecido de todo el amor que me han dado durante toda mi vida, siempre preocupados de cómo estoy, aguantando todas mis mañas, regalomeándome, y por sobre todas las cosas, enseñándome a ser una mejor persona. No puede faltar mi querido hermano, o como mi mamá le decía, mi abogado, porque siempre estuvo ahí para apoyarme y defenderme. Los amo mucho a todos y les estaré eternamente agradecidos, este no es un logro personal, es un logro de todos. También agradecer a mi hermano de la vida, Wilson, que me ha acompañado durante tantos años, y ha sido parte fundamental de este proceso de crecimiento.

Durante mi etapa universitaria conocí a personas maravillosas, hice muchos amigos que se ganaron mi corazón y ahora son parte de mi vida. Empecé en plan común con un grupo de amigos con los que adoptamos una buena forma de llevar la u: estudio, cumbia y pilsen, que se hizo parte de una rutina que pudo ser bien soportada gracias a ellos; y así me llevo recuerdos de hermosas personas como el Marley, la Dani, la Cote, el Kike, el Panchito, el Álvaro, la Sami, el Kako, destacando a mi fiel camarada José Yáñez que desde el primer día pude entender lo valioso que es tener gente como él en la vida, que por más que no nos podamos ver, siempre están ahí para ti.

Cuando entré a IQBT todo sucedió muy rápido, sentí el cariño de su gente, y lo atesoraré por con muy lindos recuerdos. Volví a sentirme como en un curso en el colegio, que a lo largo de los años nos fuimos haciendo muy unidos. Quiero agradecer a los iqbtienses, un grupito lindo de gente que me acompañó todos los días durante estos últimos 4 años, al igual que mi queridísimo equipo de baby Nitrato de Meterlo FC, con los que no pudimos levantar ninguna copa, pero sí un sentimiento por la camiseta. No puede faltar la mención al querido pana Claudito Corvalanz, un amigo incondicional, siempre atento a los problemas del corazón y el bullita. Y el agradecimiento especial al mejor team que pude tener con el Gualla y la Andi, mis queridísimos amigos, unos hermanos más que gané, que me han apoyado en todo este proceso, que me han hecho sentir parte de sus vidas, con los que estoy seguro de que fuimos capaces de crecer juntos y aprender los unos de los otros.

También muchos agradecimientos a la profe Mel, mi profesora guía, que me ayudó mucho con todas las dudas, y me ha dado un inmenso apoyo que el trabajo realizado. De igual forma, un agradecimiento muy especial para Stephanie, quien fue mi gurú a lo largo de toda esta memoria, una persona muy entusiasta que transmite alegría y emoción por el trabajo, y fue quien me dio la confianza de que las cosas se estaban haciendo bien, ayudándome a sacar adelante nuestro trabajo y a ser un mejor profesional.

Finalmente, agradecer al proyecto BASAL FB0001, al proyecto Fondequip EQM160019 por el cromatógrafo AKTA AVANT 25, y al profesor Buschmann por la donación de algas y el realizar los ensayos de caracterización necesarios para concluir este trabajo.

# Tabla de contenido

1. Introducción .....	1
1.1. Contexto.....	1
1.2. Motivación.....	1
1.3. Objetivos.....	2
2. Estado del arte .....	3
2.1. Propiedades de ficobiliproteínas .....	3
2.1.1 Estructura de ficobiliproteínas.....	4
2.1.2 Absorción de ficobiliproteínas .....	5
2.1.3 Factores determinantes en la estabilidad y rendimiento de extracción de ficobiliproteínas .....	7
2.2. Propiedades de agar .....	9
2.3. Métodos de obtención de ficobiliproteínas .....	11
2.3.1. Solubilización y extracción de proteínas .....	12
2.3.2. Clarificación .....	15
2.3.3. Purificación .....	15
2.3.4. Análisis de pureza.....	16
2.4. Métodos de obtención de agar .....	17
2.4.1 Tratamiento alcalino .....	18
2.4.2 Enjuague, reposo y neutralización.....	20
2.4.3 Blanqueo .....	20
2.4.4 Cocción .....	21
2.4.5 Filtración, gelificación y congelamiento.....	21
2.4.6 Secado .....	22
3. Materiales y métodos .....	22
3.1. Equipos y materiales .....	22
3.2. Métodos .....	22
3.2.1. Obtención de Ficobiliproteínas .....	22
3.2.2. Obtención de agar.....	25
4. Resultados y discusión .....	26
4.1. Extracción y purificación de ficobiliproteínas.....	26
4.1.1. Extracción de ficobiliproteínas en función del tiempo de resuspensión.....	26

4.1.2.	Estudio preliminar de métodos de extracción de ficobiliproteínas .....	29
4.1.3.	Extracción y precipitación con sulfato de amonio .....	32
4.1.4.	Intercambio iónico .....	35
4.1.5.	Análisis electroforético de pureza de ficobiliproteínas en fracciones de cromatografía.....	41
4.2.	Extracción de agar .....	44
4.2.1.	Acondicionamiento de parámetros de extracción.....	44
4.2.2.	Pruebas preliminares de extracción .....	45
4.2.3.	Pruebas definitivas de extracción .....	45
5.	Conclusiones .....	47
6.	Recomendaciones y focos de optimización .....	49
6.1.	Extracción y purificación de ficobiliproteínas.....	49
6.2.	Extracción de agar .....	49
7.	Bibliografía.....	51
8.	Anexos.....	56
Anexo A.	Secuencia parcial de aminoácidos de <i>Agarophyton chilense</i> en comparación con otras especies del género <i>Gracilaria</i> sp.....	56
Anexo B.	Materiales utilizados en desarrollo de experimentos .....	57
Anexo C.	Preparación buffer fosfato salino 0,1M .....	57
Anexo D.	Preparación de buffer fosfato para etapa de intercambio iónico .....	58
Anexo E.	Análisis mediante geles de poliacrilamida y preparación.....	58
Anexo E.1.	Elaboración gel .....	59
Anexo E.2.	Preparación de gel de corrida 10× SDS .....	59
Anexo E.3.	Metodología de electroforesis aplicada .....	59
Anexo E.4.	Preparación de solución de tinción .....	60
Anexo F.	Cálculo de concentraciones de liberación de ficobiliproteínas con el transcurso de los días .....	61
Anexo G.	Crecimiento de microorganismos en medio de extracción de ficobiliproteínas	62
Anexo H.	Niveles de ficobiliproteínas de extractos crudos y tras precipitación con sulfato de amonio .....	63
Anexo I.	Índice de pureza a lo largo de cromatografías por intercambio aniónico.....	67
Anexo J.	Cromatograma de intercambio iónico con elución en gradiente escalón .....	70
Anexo K.	Resultados SDS-PAGE.....	71

Anexo L. Muestras de extracción de agar ..... 73

## Tablas

Tabla 1: Contenido de ficobiliproteínas en algas rojas de Kilakarai, Golfo de Mannar. Proteína total determinada en relación masa total de proteína sobre masa de alga seca .....	4
Tabla 2: Rangos de longitudes de onda absorción máximo de distintos tipos de ficobiliproteínas ..	5
Tabla 3: Efecto de la temperatura de secado de alga en la concentración de ficobiliproteínas en Agarophyton chilense. ....	7
Tabla 4: Rendimiento de extracción de agar y contenido de compuestos sulfatados para distintas especies de Gracilaria (*R-ficoeritrina como coproducto).....	11
Tabla 5: Índices de pureza de ficoeritrina obtenidos para distintas especies con sus respectivas metodologías de purificación. El índice de pureza se determina a partir del pico de absorbancia de ficoeritrina sobre la absorbancia a 280 nm. ....	16
Tabla 6: Cambio de propiedades de agar y rendimientos obtenidos con la variación de la concentración de hidróxido de sodio en tratamiento alcalino . . . . .	19
Tabla 7: Efectos en rendimiento y calidad de agar por diferentes tratamientos previos a la cocción en la extracción de agar de Pteocladia capillacea .....	20
Tabla 8: Concentración de ficoeritrina y ficocianina presente en muestras de liberación de proteínas en función de la cantidad de días en suspensión, determinada a través de la ecuación de Beer, expresado en miligramos de proteína sobre gramos de alga seca.....	27
Tabla 9: Rendimiento de extracción de ficoeritrina (*) y ficocianina (**) en muestras de extracto crudo de extracción de ficobiliproteínas, expresado en miligramo de proteínas por gramo de alga seca. ....	35
Tabla 10: Índice de pureza de ficoeritrina (Absorbancia 560/Absorbancia 280) para distintos pHs de carga utilizando buffer fosfato 0,025 M. (*) la aparición del último pico observado se encuentra desplazado a 39 [mL]. ....	40
Tabla 11: Índice de pureza de ficocianina (Absorbancia 610/Absorbancia 280) para distintos pHs de carga utilizando buffer fosfato 0,025 M. (*) la aparición del último pico observado se encuentra más desplazado. ....	40
Tabla 12: Rendimientos de pruebas preliminares de extracción de agar obtenido de muestras con y sin extracción previa de ficobiliproteínas. ....	45
Tabla 13: Rendimientos de extracción de agar en pruebas finales con y sin extracción previa de ficobiliproteínas Promedio* para muestras con volumen de suspensión de 600 mL.....	46

Tabla 14: Valores de concentración de ficobiliproteínas determinadas a través de los de picos de absorbancia obtenidos para muestras de liberación de ficobiliproteínas para distintos días de suspensión.....	61
Tabla 15: Cantidad de ficobiliproteínas por gramo de alga seca determinadas para muestras de liberación de ficobiliproteínas para distintos días.....	61
Tabla 16: Absorbancias de picos en muestras de extracto crudo de ficobiliproteínas.....	65
Tabla 17: Concentraciones de ficobiliproteínas de extractos crudos determinada a partir de la ecuación de Beer utilizando valores de picos de absorbancia.....	65
Tabla 18: Cantidad de ficobiliproteínas obtenidas en extracto crudo por cantidad de alga seca utilizada para la extracción.....	65
Tabla 19: Absorbancias de picos en muestras de sobrenadante de saturación al 20 % con sulfato de amonio para precipitación de ficobiliproteínas.....	65
Tabla 20: Concentraciones de ficobiliproteínas de sobrenadante de saturación al 20 % con sulfato de amonio para precipitación de ficobiliproteínas determinada a partir de la ecuación de Beer utilizando valores de picos de absorbancia.....	66
Tabla 21: Cantidad de ficobiliproteínas obtenidas en sobrenadante de saturación al 20 % con sulfato de amonio para precipitación de ficobiliproteínas por cantidad de alga seca utilizada para la extracción.....	66
Tabla 22: Fracciones (volumen de elución) utilizada en cada carril de cada gel de poliacrilamida para medición de pureza de picos de absorbancia en distintas cromatografías.....	71

## Figuras

Figura 1: Representación esquemática de la membrana tilacoidal y los ficobilisomas. CF, factor de acoplamiento; PS, fotosistema. ....	3
Figura 2: Esquema de la estructura de ficobilisoma con ficoeritrina (PE) y ficocianina (PC) como subunidades de varilla y aloficocianina (APC) como subunidad central con péptidos enlazadores .....	4
Figura 3: (a) Estructura cristalina de las subunidades $\alpha$ y $\beta$ de C-aloficocianina de <i>Synechocystis</i> sp. (b) C-ficocianina de <i>Leptolyngbya</i> sp. N62DM. (c) R-ficoeritrina de <i>Palmaria palmata</i> . (d) Estructura molecular de ficobilina, ficocianobilin . ....	5
Figura 4: Espectro de absorción para ficoeritrina (B-PE y R-PE), ficocianina (C-PC), aloficocianina (APC), clorofila a (Chla) y clorofila b (Chlb) . ....	6
Figura 5: Espectro de absorción de <i>Gracilaria</i> sp., extracto crudo dilución 1:1 con buffer (___), <i>Ulva</i> sp. extracto crudo dilución 1:1 con buffer (.....), y mezcla 1:1 de los dos extractos de algas (----) . ....	7
Figura 6: Efecto de tiempo de exposición a la luz en el espectro de absorción de R-ficoeritrina en buffer fosfato de potasio 20mM . ....	8
Figura 7: Efecto del pH en el espectro de absorción de R-ficoeritrina en buffer fosfato de potasio 20mM . ....	8
Figura 8: Efecto de la temperatura en el espectro de absorción de R-ficoeritrina en buffer fosfato de potasio 20mM . ....	9
Figura 9: Diagrama de proceso de obtención de ficobiliproteínas. Elaboración propia.....	12
Figura 10: Efecto de diferentes buffer de extracción de ficobiliproteína en <i>Gracilaria lemaneiformis</i> . ....	13
Figura 11: Variación del rendimiento de extracción de ficobiliproteínas según la potencia utilizada en etapa de ultrasonido . ....	13
Figura 12: Variación del rendimiento de extracción de ficobiliproteínas según el tiempo utilizado en etapa de ultrasonido . ....	14
Figura 13: Variación del rendimiento de extracción de ficobiliproteínas según la cantidad de ciclos de congelamientos realizados . ....	14
Figura 14: Diagrama de proceso de obtención de agar. Elaboración propia.....	18

Figura 15: Fuerza de gel obtenido de agar con tratamiento alcalino para distintas temperaturas y concentraciones de NaOH en <i>Gracilaria clifronii</i> .....	19
Figura 16: Progresión de la liberación de ficobiliproteínas al medio extracelular con el transcurso de los días. El número sobre cada muestra indica el día en que fue extraída la muestra desde iniciado el experimento. ....	27
Figura 17: Espectrograma de luz visible de distintas muestras de extracción de ficobiliproteínas para distintos días en suspensión en PBS (máximo de absorción de ficoeritrina y ficocianina a longitud de onda de 565 y 620 nm). ....	28
Figura 18: Precipitación con sulfato de amonio a distintos porcentajes de saturación con sulfato de amonio en extracto de ficobiliproteína obtenido por ciclos de congelamiento. ....	29
Figura 19: Precipitación con sulfato de amonio a distintos porcentajes de saturación con sulfato de amonio en extracto de ficobiliproteína obtenido por sonicación. ....	30
Figura 20: Fracción de ficobiliproteínas resuspendida tras precipitadas con sulfato de amonio en el rango comprendido de saturación entre 30 y 40 % (izquierda) y entre 40 y 50 % (derecha). ....	30
Figura 21: Espectrograma de luz visible de proteínas insolubles en sulfato de amonio para comparación de muestras precipitadas en distintos rangos de saturación con sulfato de amonio (máximo de absorción de ficoeritrina y ficocianina a longitud de onda de 565 y 620 nm). ....	31
Figura 22: Espectrograma de luz visible para muestras antes y después de un ciclo de congelamiento (máximo de absorción de ficoeritrina y ficocianina a longitud de onda de 565 y 620 nm). ....	31
Figura 23: Alga seca preparada para la extracción de ficobiliproteínas y agar. (Izquierda) Alga seca pesada; (Centro) Alga seca homogenizada por trituración; (Derecha) Alga humedecida y limpiada en agua destilada. ....	32
Figura 24: Filtrado de extracto crudo de ficobiliproteínas (izquierda) y sobrenadante de extracto centrifugado para eliminación de impurezas (derecha) tras protocolo definitivo de extracción. ....	33
Figura 25: Diferencia entre extracto crudo de ficobiliproteínas (izquierda) y sobrenadante de precipitación con sulfato de amonio con saturación al 60 % (derecha) de tres muestras distintas. ....	33
Figura 26: Pellet de tres muestras distintos obtenidos tras centrifugación en precipitación con sulfato de amonio con saturación al 60 %. ....	33
Figura 27: Espectrograma de luz visible (promedio a partir de tres muestras) de extracto de ficobiliproteínas crudo, sobrenadante de precipitación con sulfato de amonio con saturación de 20 % de sulfato de amonio, y sobrenadante de precipitación con sulfato de amonio con saturación	

de 60 % (máximo de absorción de ficoeritrina y ficocianina a longitud de onda de 565 y 620 nm). .....	34
Figura 28: Cromatograma de proceso de intercambio aniónico de muestra de extracto de ficobiliproteínas dializado tras precipitación con sulfato de amonio al 60% de saturación, en columna de 1 mL empacada de resina Q-Sepharose®, cargada con buffer fosfato 0,025 M, pH 5,5. Elución con gradiente lineal de buffer fosfato 0,025 M, pH 5,5 NaCl 0,5 M. Se monitorea absorbancia a 280, 560 y 610 nm. ....	38
Figura 29: Cromatograma de proceso de intercambio aniónico de muestra de extracto de ficobiliproteínas dializado tras precipitación con sulfato de amonio al 60% de saturación, en columna de 1 mL empacada de resina DEAE-Sepharose® Fast Flow, cargada con buffer fosfato 0,025 M, pH 5,5. Elución con gradiente lineal de buffer fosfato 0,025 M, pH 5,5 NaCl 0,5 M. Se monitorea absorbancia a 280, 560 y 610 nm. ....	38
Figura 30: Cromatograma de proceso de intercambio aniónico de muestra de extracto de ficobiliproteínas dializado tras precipitación con sulfato de amonio al 60% de saturación, en columna de 1 mL empacada de resina Q-Sepharose®, cargada con buffer fosfato 0,025 M, pH 5,5. Elución con gradiente lineal de buffer fosfato 0,025 M, pH 6,5 NaCl 0,5 M. Se monitorea absorbancia a 280, 560 y 610 nm. ....	39
Figura 31: Cromatograma de proceso de intercambio aniónico de muestra de extracto de ficobiliproteínas dializado tras precipitación con sulfato de amonio al 60% de saturación, en columna de 1 mL empacada de resina Q-Sepharose®, cargada con buffer fosfato 0,025 M, pH 5,5. Elución con gradiente lineal de buffer fosfato 0,025 M, pH 7,5 NaCl 0,5 M. Se monitorea absorbancia a 280, 560 y 610 nm. ....	39
Figura 32: Columna empacada con 1 mL de Q-Sepharose® 1 utilizada en proceso de intercambio iónico. (1) columna limpia previo a la inyección de la muestra, (2) columna con ficobiliproteínas adheridas tras inyección de muestra, (3) columna con restos de proteínas posterior a la elución aplicado 100 % del gradiente de NaCl. ....	41
Figura 33: Gel de poliacrilamida para electroforesis de fracciones obtenidas en cromatografía con resina Q-Sepharose® utilizando buffer fosfato 0,025M, pH 5,5, y un gradiente lineal de NaCl. Eje vertical: pesos moleculares de bandas de estándar. Eje horizontal: fracciones (volúmenes de elución) de cromatografía utilizadas (S: estándar de pesos moleculares; C: muestra de proteína inyectada). ....	42
Figura 34: Gel de poliacrilamida para electroforesis de fracciones obtenidas en cromatografía con resina Q-Sepharose® utilizando buffer fosfato 0,025M, pH 6,5, y un gradiente lineal de NaCl. Eje vertical: pesos moleculares de bandas de estándar. Eje horizontal: fracciones (volúmenes de elución) de cromatografía utilizadas (S: estándar de pesos moleculares; C: muestra de proteína inyectada). ....	43

Figura 35: Gel de poliacrilamida para electroforesis de fracciones obtenidas en cromatografía con resina Q-Sepharose® utilizando buffer fosfato 0,025M, pH 7,5, y un gradiente lineal de NaCl. Eje vertical: pesos moleculares de bandas de estándar. Eje horizontal: fracciones (volúmenes de elución) de cromatografía utilizadas (S: estándar de pesos moleculares; C: muestra de proteína inyectada). .....	43
Figura 36: Secuencia aminoacídica determinada para cadenas a y b de R-PE de Agarophyton chilense. Secuencia aminoacídica parcial (seq) según mapas de densidad (den). Comparación con secuencia homólogas de P. boldii (secuencia modelo, polbo); G. monilis (grimo); P. sordium (porso) mediante alineamiento múltiple. (Cambios conservados destacados en azul y no conservados en rojo. ....	56
Figura 37: Crecimiento de microorganismos en extracción de ficobiliproteínas. Izquierda: restos de microorganismos en buffer de extracción; Centro: pellet blanco tubo derecho con microorganismos; Derecha: placa de Petri con crecimiento de microorganismos proveniente de pellet obtenido por centrifugación de muestra de extracción de ficobiliproteínas. ....	62
Figura 38: Espectro visible para muestras de extracto crudo de ficobiliproteínas. ....	63
Figura 39: Espectro visible para muestras de sobrenadante de saturación al 20 % con sulfato de amonio para precipitación de ficobiliproteínas. ....	64
Figura 40: Espectro visible para muestras de sobrenadante de saturación al 60 % con sulfato de amonio para precipitación de ficobiliproteínas. ....	64
Figura 41: Índice de pureza de ficoeritrina y ficocianina durante cromatografía de intercambio aniónico en columna de 1 mL de Q-Sepharose®, utilizando buffer fosfato 0,025 M, pH 5,5, elución con gradiente de buffer fosfato con NaCl 0,5 M. ....	67
Figura 42: Índice de pureza de ficoeritrina y ficocianina durante cromatografía de intercambio aniónico en columna de 1 mL de DEAE-Sepharose® Fast Flow, utilizando buffer fosfato 0,025 M, pH 5,5, elución con gradiente de buffer fosfato con NaCl 0,5 M. ....	68
Figura 43: Índice de pureza de ficoeritrina y ficocianina durante cromatografía de intercambio aniónico en columna de 1 mL de Q-Sepharose®, utilizando buffer fosfato 0,025 M, pH 6,5, elución con gradiente de buffer fosfato con NaCl 0,5 M. ....	68
Figura 44: Índice de pureza de ficoeritrina y ficocianina durante cromatografía de intercambio aniónico en columna de 1 mL de Q-Sepharose®, utilizando buffer fosfato 0,025 M, pH 7,5, elución con gradiente de buffer fosfato con NaCl 0,5 M. ....	69
Figura 45: Índice de pureza de ficoeritrina y ficocianina durante cromatografía de intercambio aniónico en columna de 1 mL de Q-Sepharose®, utilizando buffer fosfato 0,025 M, pH 6,5, elución con gradiente escalonado de buffer fosfato con NaCl 0,5 M. ....	69

Figura 46: Cromatografía de intercambio aniónico de muestra de ficobiliproteínas, obtenida tras precipitación con sulfato de amonio, en columna de 1 mL de Q-Sepharose®, utilizando buffer fosfato 0,025 M, pH 5,5, elución con gradiente escalonado de buffer fosfato con NaCl 0,5 M. Se monitorea absorbancia a 280, 565 y 618 nm. ....	70
Figura 47: Gel de poliacrilamida para electroforesis de fracciones obtenidas en cromatografía con Q-Sepharose® utilizando buffer fosfato 0,025M, pH 5,5, y un gradiente escalonado de NeCl. Eje vertical: pesos moleculares de bandas de estándar. Eje horizontal: fracciones (volúmenes de elución) de cromatografía utilizadas (S: estándar de pesos moleculares; C: muestra de proteína inyectada).....	72
Figura 48: Gel de poliacrilamida para electroforesis de fracciones obtenidas en cromatografía con DEAE-Sepharose® Fast Flow utilizando buffer fosfato 0,025M, pH 5,5, y un gradiente lineal de NaCl. Eje vertical: pesos moleculares de bandas de estándar. Eje horizontal: fracciones (volúmenes de elución) de cromatografía utilizadas (S: estándar de pesos moleculares; C: muestra de proteína inyectada). ....	72
Figura 49: Prensa utilizada para filtración de agar. ....	73
Figura 50: Izquierda: solución de extracción de agar con alga en suspensión en agua hirviendo; Centro: Agar filtrado; Derecha: Agar gelificado posterior a la filtración. ....	73
Figura 51: Agar seco obtenido tras protocolos de extracción. ....	74

# 1. Introducción

## 1.1. Contexto

Las algas rojas alrededor del mundo representan un recurso de gran importancia en aspectos nutricionales al tener mayor contenido de proteínas que otros tipos de algas. También se ha reportado que poseen extractos o compuestos bioactivos que presentan propiedades antitumorales, antioxidantes y antimicrobianas, pudiendo tener aplicaciones dentro del ámbito de la medicina y la industria farmacéutica para el desarrollo de productos [1].

Para el año 2012, según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, del inglés Food and Agricultural Organization), se producían alrededor de 7 millones de toneladas de algas frescas, de las cuales la mitad estaba destinada al consumo humano, mientras que el resto era utilizada en la industria alimenticia, farmacéutica, cosmética y otras aplicaciones [1]. El desembarque total de algas en Chile durante el año 2018 fue de 241.575 toneladas, según las cifras preliminares del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA) [2].

*Gracilaria* spp. tiene una gran relevancia al ser el alga más explotada a nivel mundial. Un tipo de alga roja que se puede encontrar dentro de Chile es *Agarophyton chilense* (especie conocida anteriormente como *Gracilaria chilensis*), más conocida como “Pelillo”, la que se distribuye a lo largo de la costa chilena entre la región de Antofagasta y la Isla de Chiloé. Durante el año 2018 fueron desembarcados un total de 58 mil toneladas de pelillo, provenientes de recolección de orilla y cosecha. El cultivo de algas corresponde al 1,7 % del total de cosechas en Chile, representando el pelillo cerca del 98 % de la producción de algas en cultivo [2].

Este recurso posee importancia económica para el país, generando cerca de 33 millones de dólares por la exportación de alrededor 2 mil toneladas de alga seca durante el año 2018 [2].

Uno de los subproductos obtenidos a partir de esta alga es el agar, el cual es utilizado como agente gelificante dentro de la industria alimenticia para la producción de jaleas, yogurts y helado, además de ser utilizado como sustratos en cultivos microbiológicos [3]. Según datos del Instituto de Fomento Pesquero (IFOP) se registró una exportación de 1.380 toneladas de agar producido en Chile acumulado a noviembre durante el año 2018, por un valor cercano a los 32 millones de dólares por este producto [2].

El agar es definido como complejo coloidal compuesto principalmente por polisacáridos que tiene la capacidad de gelificar, sirviendo como material de reserva y principal constituyente de la pared celular en las algas rojas [4]. Para el año 2009 se reportó una producción mundial de 9.600 toneladas, siendo extraído el 80 % de *Gracilaria* spp [5].

## 1.2. Motivación

A partir de los datos presentados anteriormente, se puede observar que el mercado de algas tiene un alto impacto sobre la economía del país, siendo Chile uno de los principales productores y exportadores a partir de las praderas de este recurso, del cual se genera un producto como el agar que tienen aplicaciones como agente gelificante.

Por otro lado, es posible encontrar otros componentes dentro de las algas, tales como proteínas, entre las que se encuentra un grupo denominado ficobiliproteínas. Estas poseen distintas características que las hacen atractivas para el mercado. Las ficobiliproteínas son las responsables de regular los fenómenos de recolección de luz en cianobacterias y algas, absorbiendo longitudes de onda de la luz solar en el rango de 480 a 660 nm, dentro del espectro visible, con el propósito de transferir energía en el proceso de fotosíntesis de las algas [6]. Las subunidades de estas proteínas son pigmentos autofluorescentes, coloreados y solubles en agua, que se encuentran tanto en cianobacterias como en algas rojas [7]. La coloración de estas proteínas las hace atractivas dentro del mercado de colorantes al ser pigmentos naturales.

Dado que el actual enfoque de la industria alimenticia se encuentra dirigido hacia la producción de alimentos que posean mayor beneficio para la salud de las personas, y de la misma forma la demanda de alimentos más naturales y saludables ha ido en aumento, las ficobiliproteínas son una opción prometedora como aditivos en la industria alimenticia y como colorante dentro de la industria cosmética [6].

Finalmente, se han estudiado los beneficios que puede traer el consumo de este tipo de productos, dentro de los cuales se tiene la capacidad de estimular el sistema inmunológico. También poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antivirales, anticancerígenas y tienen efectos en la reducción del colesterol [6]. Por otra parte, dada la capacidad que tienen como fotorreceptores, las ficobiliproteínas son utilizadas en experimentos por su capacidad fluorescente de fácil detección.

Las dos principales ficoproteínas que se extraen de algas rojas corresponden a ficoeritrina y ficocianina, las cuales tienen un valor en el mercado de 231 000 y 238 000 CLP por milígramo, cuya descripción en mercado indica una relación Absorbancia 566/Absorbancia 280 en ficoeritrina superior a 4,6 [8], y una relación Absorbancia 620/Absorbancia 280 en ficocianina superior a 3,5 respectivamente [9].

Por esto resulta de interés la obtención de estas ficobiliproteínas a partir de pelillo, de tal forma de potenciar a la industria nacional al darle valor agregado al proceso de producción de agar.

### **1.3. Objetivos**

#### **Objetivo General**

Diseñar un método que permita extraer y purificar ficobiliproteínas de *Agarophyton chilense* y extraer agar de los restos algales que quedan de la extracción de estas proteínas.

#### **Objetivos Específicos**

- Diseñar un método de extracción y purificación de ficobiliproteínas desde *Agarophyton chilense*, y probar su efectividad mediante su implementación a escala de laboratorio.
- Determinar niveles de pureza de las ficobiliproteínas obtenidas y proponer etapas para aumentar la pureza.
- Diseñar un método de extracción de agar de los restos algales provenientes de las etapas de extracción de ficobiliproteínas, e implementar el método de extracción a escala de laboratorio.
- Comparar la calidad de agar obtenido de *Agarophyton chilense* con y sin extracción previa de ficobiliproteínas.

- Realizar propuestas de optimización en métodos de extracción y purificación propuestos tanto para ficobiliproteínas como agar.

## 2. Estado del arte

### 2.1. Propiedades de ficobiliproteínas

Como se mencionó anteriormente, las ficobiliproteínas son pigmentos proteicos encargados de la captación de luz en cianobacterias y algas rojas, ubicadas en la membrana fotosintética, siendo altamente fluorescentes y solubles en agua. Comúnmente las ficobiliproteínas constituyen el 24 % de la masa seca del total de proteínas celulares [6].

La absorción de luz en cianobacterias y algas rojas para el rango de longitud de onda en que la clorofila resulta poco eficiente es llevado a cabo dentro de los ficobilisomas, que corresponde a megacomplejos proteicos, encargados de transferir energía al fotosistema II [10]. Estos ficobilisomas están ubicados en el estroma [11], compartimiento donde se lleva a cabo el proceso de fotosíntesis en las células eucariontes de las algas [12], específicamente en las membranas externas de los tilacoides, como se puede observar en la Figura 1.

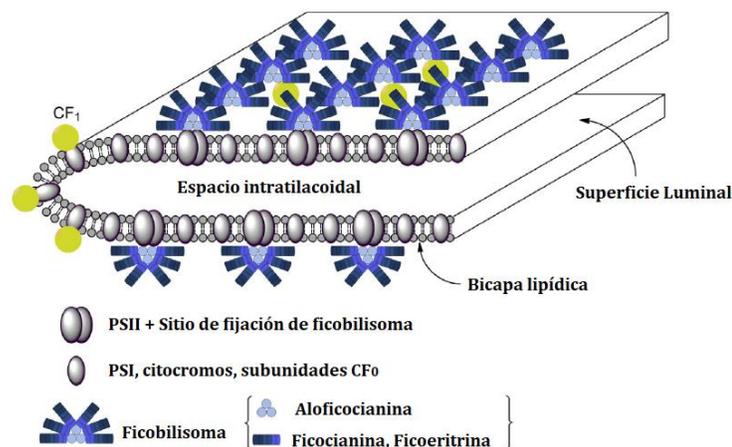


Figura 1: Representación esquemática de la membrana tilacoidal y los ficobilisomas. CF, factor de acoplamiento; PS, fotosistema. [11]

Las ficobiliproteínas pueden ser clasificadas según su estructura en cuatro grupos principales: ficoeritrina (PE), ficocianina (PC), aloficocianina (APC) y ficoeritrocianina (PEC). Cada una posee distinta coloración, lo que les permite absorber longitudes de onda en distintos rangos dentro del espectro de luz visible. Dependiendo de la especie donde se origine, la ficoeritrina puede ser clasificada en tres grupos, B-ficoeritrina (B-PE) obtenida de algas rojas unicelulares, R-ficoeritrina (R-PE) proveniente de la mayoría de las algas rojas y C-ficoeritrina (C-PE), extraída de cianobacterias [6]. La clasificación es análoga para el resto de las ficobiliproteínas.

La disposición de ficobiliproteínas dentro de los ficobilisomas en algas rojas concentran una mayor cantidad de aloficocianina en la región cercana al núcleo, donde se conectan con unidades de ficocianina y luego en el extremo a ficoeritrina, siendo esta última la más abundante [10]. Estas se estructuran en el ficobilisoma como se puede observar en la Figura 2.

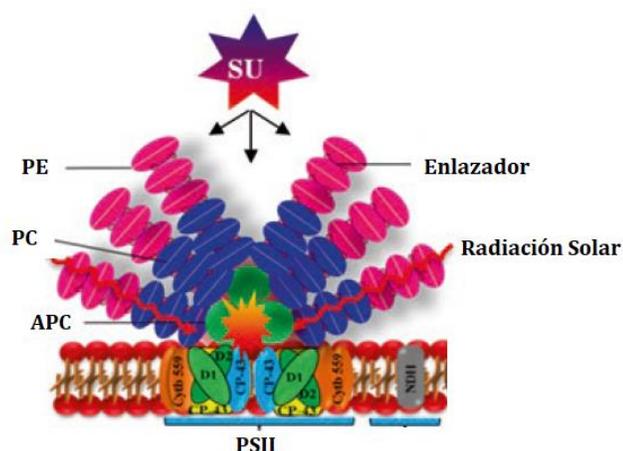


Figura 2: Esquema de la estructura de ficobilisoma con ficoeritrina (PE) y ficocianina (PC) como subunidades de varilla y aloficocianina (APC) como subunidad central con péptidos enlazadores [6].

En la Tabla 1 se puede observar la cantidad de proteína que poseen distintas especies de algas rojas ubicadas en el Golfo de Mannar, y sus respectivas composiciones en ficoeritrina, aloficocianina y ficocianina, destacando un mayor contenido de la primera en la mayoría de las especies.

Tabla 1: Contenido de ficobiliproteínas en algas rojas de Kilakarai, Golfo de Mannar. Proteína total determinada en relación masa total de proteína sobre masa de alga seca [13].

Nombre de especie	Proteína total (% m/m)	Ficobiliproteína (mg/g)		
		R-PE	R-APC	R-PC
<i>Acanthophora spicifera</i>	1.061 ± 0.05	0.421 ± 0.01	0.121 ± 0.01	0.34 ± 0.01
<i>Gracilaria corticata</i>	0.649 ± 0.04	0.781 ± 0.02	0.092 ± 0.01	0.32 ± 0.02
<i>G. edulis</i>	0.698 ± 0.06	0.762 ± 0.03	0.081 ± 0.01	0.33 ± 0.01
<i>G. salicornia</i>	0.601 ± 0.07	0.573 ± 0.02	0.074 ± 0.02	0.23 ± 0.01
<i>Gelidium acerosa</i>	0.928 ± 0.09	0.545 ± 0.03	0.062 ± 0.02	0.19 ± 0.01
<i>Gelidium pusillum</i>	0.444 ± 0.04	0.403 ± 0.02	0.085 ± 0.02	0.18 ± 0.02
<i>Hypnea espert</i>	0.461 ± 0.03	0.416 ± 0.01	0.046 ± 0.02	0.18 ± 0.02
<i>Laurencia papillosa</i>	0.981 ± 0.06	0.182 ± 0.01	0.043 ± 0.01	0.36 ± 0.02
<i>Portieria hornemannii</i>	1.013 ± 0.07	1.232 ± 0.04	0.061 ± 0.02	0.20 ± 0.02
<i>Sarcocnema filiforme</i>	0.377 ± 0.07	0.397 ± 0.02	0.056 ± 0.02	0.19 ± 0.01

Por otro lado, se ha reportado el contenido de ficobiliproteínas en *Agarophyton chilense*, con una concentración de 0,549 (mg/g) de ficoeritrina y 0,249 (mg/g) de ficocianina en el alga fresca, pudiendo variar dependiendo de los pretratamientos que pueda recibir el alga [14]. El contenido de ficobiliproteínas en algas rojas es significativamente menor al encontrado en cianobacterias, en las cuales se alcanza un contenido total de éstas en torno al 20% del peso seco de cianobacteria, es decir, valores de hasta 200 (mg/g), el cual depende principalmente de la forma de cultivo [15].

### 2.1.1 Estructura de ficobiliproteínas

Las ficobiliproteínas, tanto en cianobacterias como algas rojas, se encuentran agregadas generalmente en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , y en algunas especies a una tercera subunidad  $\gamma$ , siendo esta última un péptido enlazador que se encuentra en la ficoeritrina. Se han reportado que los pesos moleculares relativos de las subunidades de ficoeritrina de algas rojas (R-PE) van desde 18 a 20 kDa en  $\alpha$ , 19 a 21 kDa en  $\beta$  y 30 kDa en  $\gamma$ , teniendo la proteína completa un peso molecular promedio entre 240 y 260 kDa [16].

La estructura de las R-PE pueden ser descritas como dos estructuras triméricas compuestas por las subunidades  $(\alpha\beta)_3$  unidas por la subunidad  $\gamma$ , formando un complejo final  $(\alpha\beta)_6\gamma$ , mientras que las R-PC y R-APC corresponden a estructuras triméricas  $(\alpha\beta)_3$  unidas por enlaces a través de cisteínas. El color que poseen las preparaciones de ficobiliproteínas proviene de los grupos prostéticos que se encuentran unidos covalentemente. Estos grupos son cromóforos de tetrapirrol de cadena abierta que llevan ficobilinas [6]. En la Figura 3 se pueden observar ejemplos de la estructura cristalina, tanto de las subunidades como de la proteína completa.

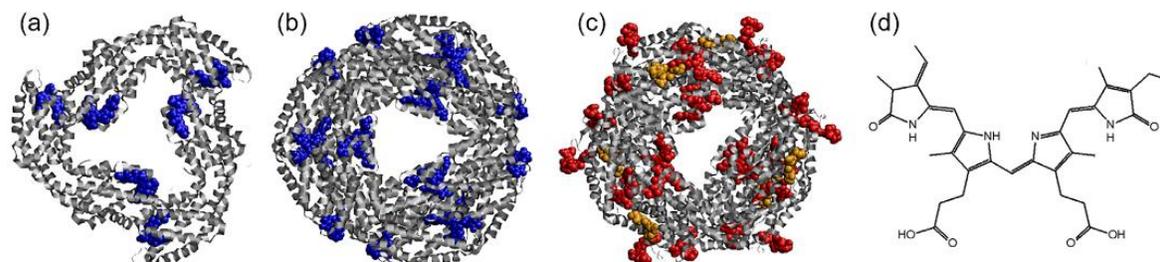


Figura 3: (a) Estructura cristalina de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de C-alofoficocianina de *Synechocystis* sp. (b) C-ficocianina de *Leptolyngbya* sp. N62DM. (c) R-ficoeritrina de *Palmaria palmata*. (d) Estructura molecular de ficobilina, ficocianobilin [17].

Estudios de la estructura terciaria de R-PE en *Agarophyton chilense*, han determinado que presenta un plegamiento de tipo globina con un elevado contenido helicoidal, acorde al análisis de similitud realizado con R-PE de distintas especies de algas rojas. Se analizaron las secuencias de aminoácidos de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , las cuales poseen un total de 164 y 177 residuos respectivamente. La subunidad  $\alpha$  presenta dos cromóforos del tipo ficoeritrobilina (PEB), y la subunidad  $\beta$  dos cromóforos PEB y una ficourobilina (PUB). [18]

Por otro lado, se cree que la interacción entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  es más estable que la presente entre los dos heterohexámeros  $(\alpha\beta)_3$  para formar  $((\alpha\beta)_3)_2$ , debido a la mayor presencia de puentes de hidrógeno entre los dímeros del hexámero.

### 2.1.2 Absorción de ficobiliproteínas

Una de las principales características de las ficobiliproteínas es su rango de absorción el se muestran en la Tabla 2 [11]. A partir de esta característica se puede realizar una estimación de su concentración mediante espectrofotometría. En la Figura 4 se puede observar el espectro de absorción con los respectivos picos para los distintos pigmentos mediante un barrido de longitudes de onda.

Tabla 2: Rangos de longitudes de onda absorción máximo de distintos tipos de ficobiliproteínas [11].

Ficobiliproteína	Rango de máxima absorción $\lambda_{max}$ [nm]
B-PE	545-565
R-PE	540-565
C-PE	560
R-PC	617
C-PC	620
APC	618-671
PEC	568-570

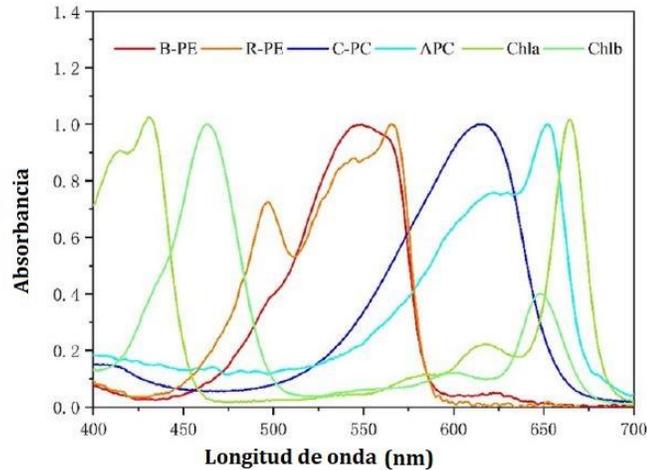


Figura 4: Espectro de absorción para ficoeritrina (B-PE y R-PE), ficocianina (C-PC), aloficocianina (APC), clorofila a (Chla) y clorofila b (Chlb) [19].

Una vez extraídas desde el alga, es posible determinar la concentración de ficobiliproteínas presente en el medio de extracción. Estos cálculos se hacen usando la absorbancia registrada en la longitud de onda en que se observa el máximo de absorción característico para cada ficobiliproteína. Con estos valores se puede determinar la concentración de ficoeritrina (PE) y ficocianina (PC) mediante las siguientes ecuaciones propuestas por Beer [20]:

$$PE \left[ \frac{mg}{ml} \right] = [(A_{565} - A_{592}) - (A_{455} - A_{592}) \cdot 0,2] \cdot 0,12$$

$$PC \left[ \frac{mg}{ml} \right] = [(A_{618} - A_{645}) - (A_{592} - A_{645}) \cdot 0,51] \cdot 0,15$$

Estas ecuaciones pueden ser utilizadas con datos de muestras que tengan presencia de restos celulares e impurezas en el extracto de ficobiliproteínas. Consideran que la base del barrido de longitudes de onda no corresponde a una línea horizontal, sino que corresponde a una curva inclinada, por lo que el cálculo es menos sensible a los niveles de interferencia de otros compuestos. Otras ecuaciones no consideran estas particularidades, sobreestimando los valores de concentración de proteínas [20].

Para determinar la factibilidad de utilización de estas ecuaciones se realizaron pruebas con extractos provenientes de otras algas distintas a las rojas, tales como *Ulva* sp. [20]. Se realizó un barrido de valores de absorbancia a longitudes de onda entre 400 y 750 nm para determinar una línea basal que registrara la absorbancia de los interferentes en la muestra en ausencia de ficobiliproteínas. Estos resultados demostraron que esta línea basal no tiene un comportamiento lineal horizontal, lo que se puede apreciar en la Figura 5.

Por otro lado, se sometió el extracto crudo de ficobiliproteínas a una etapa de centrifugación a distintas velocidades de rotación para eliminar los restos celulares e impurezas, y luego hacer el barrido de longitudes de onda con el propósito de determinar mediante las ecuaciones de Beer la concentración de ficobiliproteínas. Los resultados de concentración de ficobiliproteínas obtenidos presentaron una variación poco significativa con las distintas velocidades de rotación, en comparación a otras fórmulas utilizadas anteriormente. Se concluyó que la fórmula es poco sensible

a la presencia de impurezas, por lo que es útil para obtener una aproximación de la concentración de ficobiliproteínas, lo que podría ser engorroso mediante otros métodos más complejos.

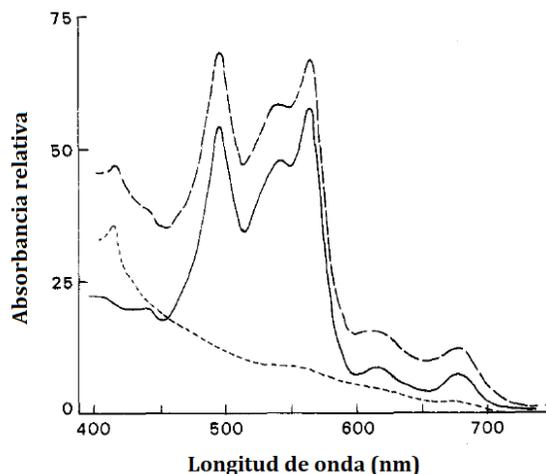


Figura 5: Espectro de absorción de *Gracilaria sp.*, extracto crudo dilución 1:1 con buffer (\_\_\_), *Ulva sp.* extracto crudo dilución 1:1 con buffer (.....), y mezcla 1:1 de los dos extractos de algas (----) [20].

### 2.1.3 Factores determinantes en la estabilidad y rendimiento de extracción de ficobiliproteínas

Dentro de las etapas de extracción y purificación de ficobiliproteínas se debe tener especial cuidado en las condiciones a las cuales son expuestas.

Se suelen realizar etapas de secado en el tratamiento de algas para ser almacenadas, ante lo cual las concentraciones de los pigmentos fotosintéticos se ven afectados dependiendo de la temperatura a la cual se realice esta operación. Se obtienen mayores concentraciones de ficoeritrina y ficocianina a temperatura bajo los 60 °C, mientras que a temperaturas mayores estas proteínas pueden sufrir denaturación térmica provocando modificaciones estructurales [14].

En este mismo trabajo [14] se determinó el efecto de la temperatura de secado para *Agarophyton chilense* en la concentración de ficoeritrina y ficocianina obtenidos, obteniendo lo mayores valores a una temperatura de 50 °C. Se puede observar la variación que presenta con esta variable en la Tabla 3.

Tabla 3: Efecto de la temperatura de secado de alga en la concentración de ficobiliproteínas en *Agarophyton chilense*.

T (°C)	Ficoeritrina (mg/g)	Ficocianina (mg/g)
Fresca	0.5490 ± 0.0640	0.2490 ± 0.0300
40	0.9322 ± 0.0657	0.4817 ± 0.0395
50	1.0378 ± 0.0477	0.7323 ± 0.0705
60	0.5731 ± 0.1261	0.2694 ± 0.0333
70	0.4158 ± 0.1044	0.2791 ± 0.1017

Por otro lado, se ha estudiado la estabilidad que presenta la R-ficoeritrina, alterando distintos factores como el tiempo de exposición a luz, pH de la solución en la que se encuentra y la temperatura a la que se encuentra expuesta [21]. Se generó el espectro de absorción para longitudes de onda de entre 400 y 650 nm, dentro del cual están los picos de absorción de ficoeritrina.

Se observó que a medida que aumenta el tiempo de exposición de la proteína a la luz, la estabilidad de esta disminuye (Figura 6). Por otro lado, se tiene que la R-PE es estable para el rango de pH entre 4 y 10 (Figura 7). Además, se observó que a temperaturas entre 4 y 40 °C la proteína se mantiene estable, y desde los 60 °C se tiene una disminución significativa de la estabilidad (Figura 8) [21].

Otro de los factores que pueden influir en la estabilidad de las ficobiliproteínas es la temperatura a la cual se almacena el extracto. Esta temperatura también influye en el tiempo que puede permanecer estable en almacenamientos oscuros. Se determinó que la estabilidad es mejor a -20 °C que, a 4 °C, teniendo pequeñas modificaciones luego de 2 semanas a -20 °C. Se ha reportado que las muestras congeladas a -80 °C sufren insignificantes modificaciones en la degradación del pigmento luego de transcurridos 6 meses [21].

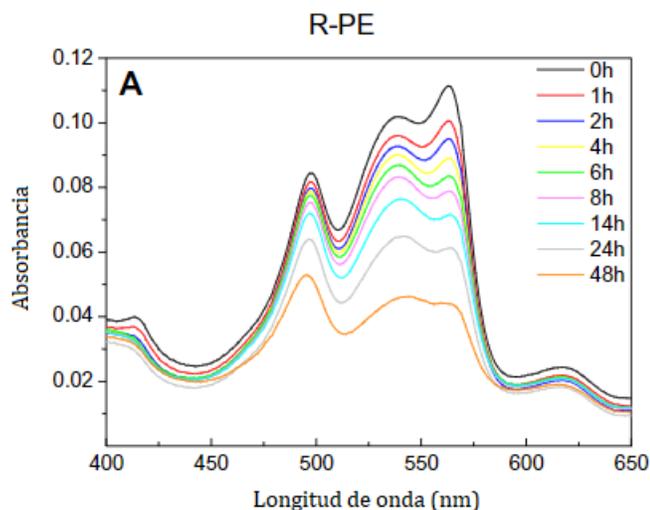


Figura 6: Efecto de tiempo de exposición a la luz en el espectro de absorción de R-ficoeritrina en buffer fosfato de potasio 20mM [21].

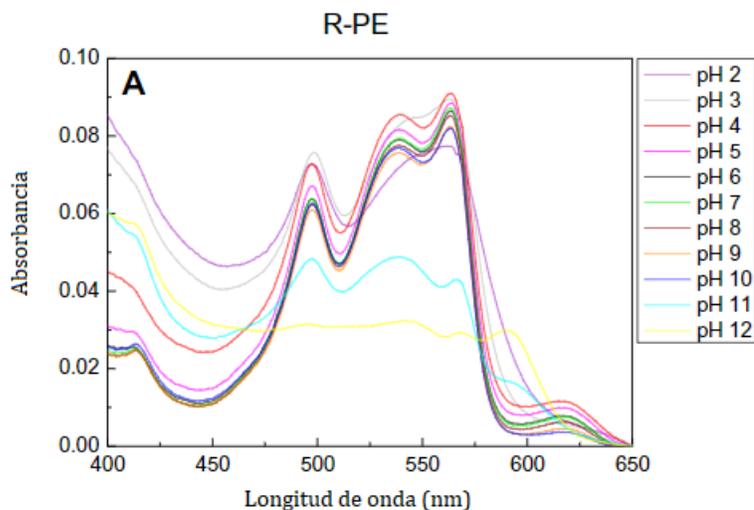


Figura 7: Efecto del pH en el espectro de absorción de R-ficoeritrina en buffer fosfato de potasio 20mM [21].

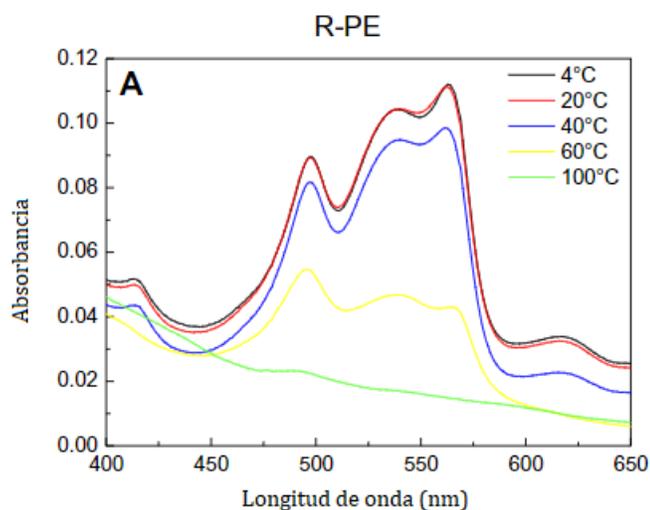


Figura 8: Efecto de la temperatura en el espectro de absorción de R-ficoeritrina en buffer fosfato de potasio 20mM [21].

Por otro lado, un factor importante que no tiene relación con la forma de extracción es a la estación del año en la cual son producidas y cosechadas las algas. Se han realizado estudios de la composición total de proteínas y la fracción de ficobiliproteínas para la macroalga *Grateloupia turuturu*, encontrada en las costas de Francia. Se determinó que tanto la concentración de ficoeritrina como ficocianina tienen su mínimo en los meses correspondientes al verano. Esto puede deberse a la destrucción de las ficobiliproteínas por la radiación, siendo el invierno el mejor periodo de cosecha [22].

## 2.2. Propiedades de agar

En la industria alimentaria, el agar se utiliza principalmente como agente gelificante, estabilizante y para controlar la viscosidad, cumpliendo una función de aditivo no nutritivo. El poder gelificante del agar es tan alto que se usa a una concentración máxima del 1 %. Por esta razón, las cantidades ingeridas son muy pequeñas y, debido a que el cuerpo humano no digiere fácilmente el agar, su aporte calórico es insignificante. En el cuerpo humano se ha demostrado que se asimila menos del 10 % del polisacárido, por lo que su importancia como nutriente es muy pequeña [23].

La calidad del agar se mide en base a las distintas propiedades que presenta, entre las cuales destacan la temperatura de gelificación, la temperatura de fusión y la resistencia del gel, siendo esta última de gran importancia, ya que mientras más fuerte sea, menor es la cantidad requerida para las distintas aplicaciones en la formación de geles. Se considerará un agar de buena calidad aquel que pueda resistir una fuerza entre 400 y 500  $[g/cm^2]$ , cuyo valor depende del grado de pureza alcanzado. Las propiedades físicas y el contenido de agar dependerán del tipo de alga, su procedencia, fecha de cultivo, madurez, parámetros ambientales y métodos de extracción [24].

Actualmente se considera que el agar está constituido principalmente por agarosa y agarpectina. La agarosa corresponde al compuesto que le otorga la propiedad gelificante al agar. Esta es una gelificación en medios acuosos con una reactividad muy baja con cationes y proteínas, lo que diferencia el agar de otros tipos de gelificantes. Por otro lado, la agarpectina posee un bajo poder gelificante en agua, y aún no se ha asignado una estructura específica a esta. Sin embargo, se sabe que se encuentra constituida principalmente por unidades alternadas de D-galactosa y L-galactosa, y que contiene todos los grupos polares existentes en el agar [23].

El agar es soluble en agua caliente e insoluble en agua fría, por lo que dentro de los procesos de extracción de agar desde el alga se debe considerar, además del pH y del estado redox, las condiciones adecuadas de temperatura para que se produzca la hidrólisis necesaria y aumente su solubilidad. Por otro lado, durante la hidrólisis de los polisacáridos que componen la pared celular del agar, se debe evitar una excesiva fragmentación, ya que el reducir en gran medida el tamaño de los fragmentos de polisacáridos podría causar una disminución de los rendimientos durante el proceso si son alcanzados pesos moleculares para los cuales son solubles en agua fría, perdiendo agar en las etapas de eliminación de agua [23].

La solución de agar contempla un contenido de agarosa y agaropeptinas, que poseen propiedades de solubilidad distintas una de otra bajo las condiciones de operación a las cuales son sometidas durante la extracción de agar. Por esta razón usualmente es difícil no perder alguna de las dos durante el proceso. Además, a lo largo de las etapas de extracción, se deben establecer condiciones de operación que eviten la mayor pérdida de uno u otro componente, para mantener una relación constante entre agarosa y agaropeptinas. Esto permite que el producto pueda formar un gel con alta resistencia. La estabilidad del agar ante una hidrólisis dependerá en gran medida de la temperatura de operación, ya que esta variable afecta la solubilidad de los componentes [23].

Una de las características fundamentales de un gel de agar corresponde a la histéresis de gelificación. Cuando se enfría el agar se forma un gel a temperaturas entre 32 y 43 °C dependiendo del grado de metilación del agar, el que a su vez varía de acuerdo al alga marina de origen. Por otro lado, cuando el gel se calienta, este se derrite a una temperatura de aproximadamente 85 °C. La diferencia significativa entre las temperaturas de gelificación y de fusión, resultante de un mayor número de enlaces de hidrógeno y la falta de grupos sulfato, es lo que resulta atractivo para sus distintas aplicaciones [23].

Existen componentes del alga que pueden reducir la calidad del agar, como el alto contenido de compuestos sulfurados, característica que presentan principalmente las especies de *Gracilaria*. Es por esto que los pretratamientos de las algas antes de la extracción del agar son importantes ya que condicionarán en gran medida las características del producto obtenido. Actualmente, el proceso para las especies de *Gracilaria* reciben un tratamiento alcalino, lo que provoca la hidrólisis de los grupos sulfato y transforma cantidades importantes de 6-sulfato de L-galactosa en 3,6-anhidro-L-galactosa, aumentando así la resistencia del gel del agar obtenido, es decir, su calidad [23].

La hidrólisis alcalina debe adaptarse al tipo de alga utilizada, y así obtener la mayor cantidad de desulfatación posible, evitando al mismo tiempo pérdidas de rendimiento que este proceso puede causar, lo que se puede producir si se disuelve el agar en la solución alcalina [23].

En la Tabla 4 se muestran distintos rendimientos de obtención de agar para distintas especies de *Gracilaria*. De acuerdo a lo expuesto por McLachlan y Bird, el rango de rendimientos para la mayoría de las algas de las cuales se extrae agar va desde un 20 a un 30 %, generalmente [25].

Tabla 4: Rendimiento de extracción de agar y contenido de compuestos sulfatados para distintas especies de Gracilaria (\*R-ficoeritrina como coproducto).

Especie	Rendimiento de agar [%] (g agar/ g alga seca)	Contenido de sulfato [%]	Referencia
<i>G. cornea</i> (1997)	31,6 – 45,1	4,8 – 5,47	[26]
<i>G. tikvahiae</i> (1992)	21 – 21	2,5 – 3,5	[26]
<i>G. blodgettii</i> (1992)	24,2 – 25,7	2,3	[26]
<i>G. lemanieformis</i> (1992)	9,9 – 23,7	1,2 – 2,2	[26]
<i>G. cornea</i> (2003)	18 – 34	2,5 – 5,2	[26]
<i>G. crassissima</i> (2003)	14 – 34	2,5 – 5	[26]
<i>G. verrucosa</i> (1987)	14,6 – 35,6	No determinado	[26]
<i>G. cervicornis</i> (2005)	40	5,7	[26]
<i>G. blodgettii</i> (2005)	37	3,0	[26]
<i>G. crassissima</i> (2005)	30	4,2	[26]
<i>G. verrucosa</i> (1972)	24	No determinado	[26]
<i>G. gracilis</i> (2009)	26,7	6,8	[26]
<i>G. verrucosa</i> (2018)*	28	6,0	[26]
<i>G. chilensis</i>	20-22	No determinado	[27]

La estación del año y el ambiente en el que se producen las algas, además de las condiciones específicas de cultivo, pueden afectar el rendimiento del agar extraído para un proceso específico, mientras que la calidad de este dependerá específicamente de los tratamientos y la especie utilizada [28].

### 2.3. Métodos de obtención de ficobiliproteínas

Para la obtención de ficobiliproteínas procedentes de algas rojas se debe considerar en primer lugar la limpieza de las algas a partir de las cuales se realizará la extracción, para eliminar la mayor cantidad de impurezas, tales como arena, sales y restos de otras algas u organismos marinos. Por lo general, las algas para ser transportadas y almacenadas son deshidratadas. El rendimiento final se determina como mg de ficobiliproteínas producidas por unidad de masa de alga seca.

Dado que las proteínas de interés se encuentran en el interior de las células de las algas, es necesaria una etapa de ruptura celular para liberar el contenido de proteínas al medio en. Posterior a la extracción se debe separar el contenido algal de la solución con todo el material extraído, lo que se realiza mediante procesos de filtración y centrifugación.

Una vez obtenido el extracto crudo de proteínas solubles, se requiere de etapas de purificación, que permitan eliminar el resto de los componentes celulares y proteínas que no son de interés. Existen distintos métodos para determinar el nivel de pureza que poseen las proteínas y determinar la presencia de contaminantes. En la Figura 9 se puede observar un esquema general de las etapas que requiere la obtención de ficobiliproteínas.

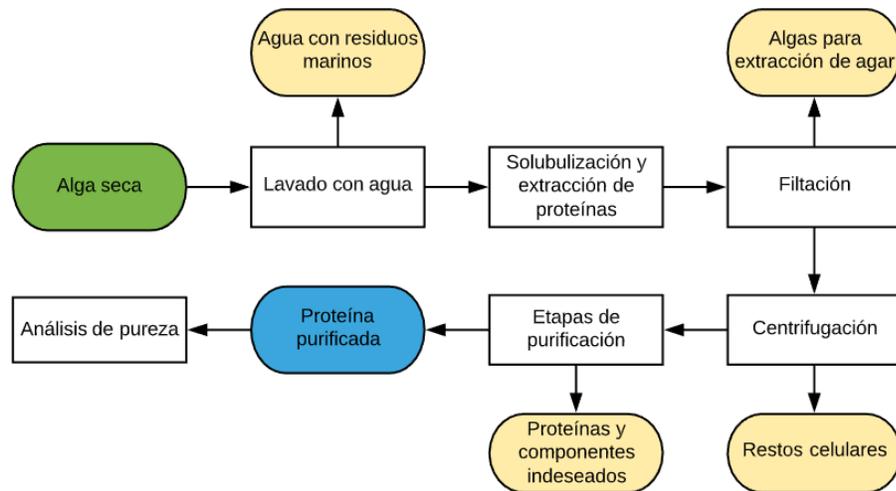


Figura 9: Diagrama de proceso de obtención de ficobiliproteínas. Elaboración propia.

A continuación, se describe en detalle las etapas requeridas para la obtención de proteínas, y las distintas alternativas para poder llevar a cabo el proceso.

### 2.3.1. Solubilización y extracción de proteínas

En primer lugar, las proteínas que se encuentran solubles en el medio intracelular de las algas deben ser extraídas eliminando los restos celulares para que no interfieran en el proceso. Para esto las algas deben ser hidratadas en el caso de haber sido almacenadas en condiciones de baja humedad. Luego, el alga es resuspendida en buffer para generar un gradiente de concentración entre el interior y exterior celular de tal forma que se promueva el desplazamiento de las biomoléculas hacia el medio extracelular, que será tratado posteriormente en la purificación.

El buffer en el cual se realiza la extracción de ficobiliproteínas es relevante en el proceso, como se puede observar en Figura 10. Aquí se expresa la variación en la cantidad relativa de ficoeritrina liberada en la extracción con distintos tipos de buffer, medido a través de la absorbancia a 565 nm (OD565), siendo el mejor el buffer fosfato salino (PBS) [29].

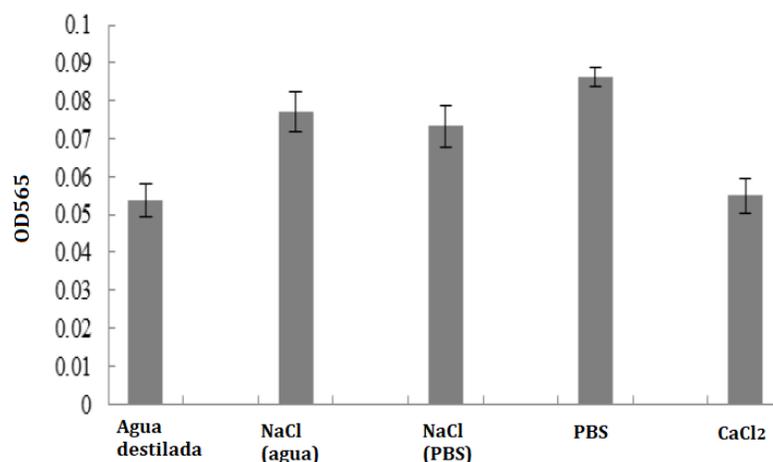


Figura 10: Efecto de diferentes buffer de extracción de ficobiliproteína en *Gracilaria lemaneiformis* [29].

Para optimizar el proceso de extracción de proteínas se tienen distintos métodos que permiten la ruptura de la membrana celular, complementando lo expuesto anteriormente para la solubilización en el medio de extracción. Las técnicas más utilizadas corresponden a tratamiento por ultrasonido, tratamientos enzimáticos y ciclos de congelamiento-descongelamiento [30].

La ruptura celular por medio de ultrasonido tiene sus principios en la generación de ciclos alternos de baja y alta presión. Los ciclos de baja presión, con ondas ultrasónicas de alta intensidad crean burbujas, las que mediante el fenómeno de cavitación colapsan violentamente durante un ciclo de alta presión, lo que provoca una fuerza de corte capaz de romper la membrana celular mejorando la exposición y la transferencia de las proteínas del medio intracelular hacia el exterior [31]. Este tipo de técnicas puede presentar desventajas como un elevado requerimiento energético o destrucción del producto por lo que se deben determinar potencia y tiempo ideal. En la Figura 11 y Figura 12 se puede observar que el aumento de ambos parámetros mencionados anteriormente mejoran los rendimientos de extracción de ficobiliproteínas en *Gracilaria lemaneiformis* [29].

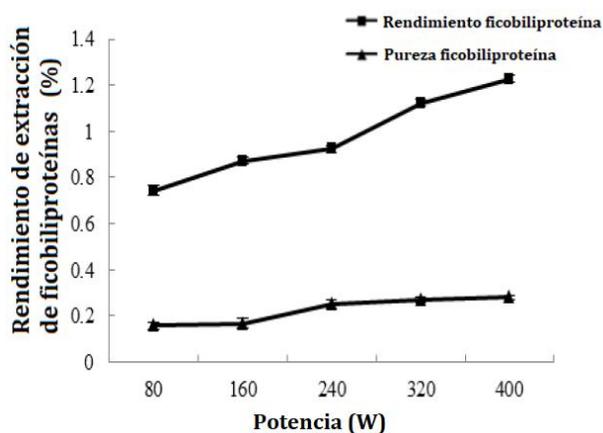


Figura 11: Variación del rendimiento de extracción de ficobiliproteínas según la potencia utilizada en etapa de ultrasonido [29].

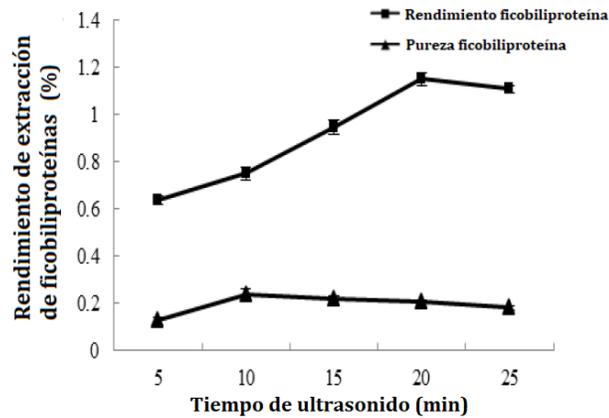


Figura 12: Variación del rendimiento de extracción de ficobiliproteínas según el tiempo utilizado en etapa de ultrasonido [29].

En cuanto al tratamiento enzimático, consiste en la utilización de enzimas capaces de digerir componentes de la pared o membrana celular provocando la ruptura de esta. Generalmente se utilizan lisozimas, que rompen enlaces de peptidoglucano presente en las paredes celulares. El uso de estos se ve desfavorecido por el elevado costo que posee esta técnica, junto con la selectividad que poseen las enzimas por determinadas moléculas que pueden no estar presentes en el alga [32].

Por otra parte, los ciclos de congelamiento-descongelamiento afectan directamente la funcionalidad e integridad de la membrana plasmática de las células, ya que a bajas temperaturas existe una pérdida de fluidez de los componentes lipídicos, generando fragilidad de esta. De la misma forma, durante la deshidratación que se genera por la congelación puede haber pérdida de componentes de la membrana [33]. En la Figura 13 se muestra un estudio realizado para determinar cómo varía la liberación de ficobiliproteínas en *Gracilaria lemaneiformis*, donde se puede observar que el aumentar la cantidad de ciclos de congelamiento conlleva a un aumento en el rendimiento de extracción de las proteínas [29].

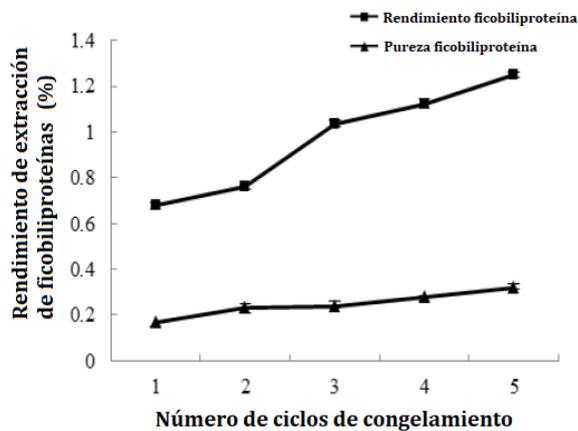


Figura 13: Variación del rendimiento de extracción de ficobiliproteínas según la cantidad de ciclos de congelamientos realizados [29].

Finalmente, otros métodos utilizados para extraer proteínas generalmente corresponden a tratamientos con detergentes que solubilizan los lípidos presentes en la membrana. Por otro lado los procesos de centrifugación son útiles, ya que las paredes celulares no soportan altos esfuerzos de corte [34].

### **2.3.2. Clarificación**

Una vez extraídas y solubilizadas las ficobiliproteínas del medio intracelular al medio tratante, se debe eliminar los restos de algas agotadas en proteínas e impurezas presentes en la solución para que evitar la mayor cantidad de interferencias posibles. Los métodos más utilizados para llevar a cabo esto son procesos de filtración y centrifugación, usados en conjunto o separadamente.

La filtración permite retener el material sólido de la solución y moléculas de gran tamaño presentes en el medio, utilizando comúnmente gasa para esta etapa. Luego, la centrifugación corresponde a una técnica a través de la cual se separan las partículas en suspensión del medio en base a la diferencia de densidad que se presente entre ambos. Así es posible eliminar aquellos componentes residuales insolubles, que por su tamaño no pudieron ser retenidos por el filtro, tales como arena fina, material celular, entre otros.

### **2.3.3. Purificación**

Este proceso comprende aquellas etapas que están relacionadas con aumentar la pureza de las proteínas, es decir, aumentar la proporción de proteínas de interés sobre el resto de las proteínas que se encuentran dispersas en el medio, siendo el objetivo llegar a una condición en la que idealmente sólo se tenga la proteína de interés en el medio.

Existen distintos métodos por los cuales se puede realizar una purificación de proteínas de acuerdo a las propiedades que presenta cada una tales como su tamaño, solubilidad, hidrofobicidad, punto isoeléctrico, afinidad, entre otras.

Comúnmente, se utiliza un proceso de precipitación por sales como primera etapa de purificación, que consiste en separar proteínas modificando la solubilidad que presentan las proteínas en presencia de una concentración determinada de sal en el medio en el que se encuentra. El principio de esta se sustenta en que las proteínas forman puentes de hidrógeno con las moléculas de agua en las que se encuentran suspendidas a través de los grupos cargados que presentan. Al adicionar sal, esta interactuará con la solución y competirá con las proteínas por la disponibilidad del solvente, provocando que las proteínas tengan interacción entre sus grupos hidrofóbicos y formen precipitados [35]. Generalmente se utilizan niveles de saturación de entre 45 a 65 % de sulfato de amonio para la purificación de ficobiliproteínas, según lo expresado en la Tabla 5.

Otra técnica utilizada para purificar ficobiliproteínas es la cromatografía por filtración por geles, la que separa de acuerdo a los tamaños de las proteínas en la muestra. En esta se hace pasar la solución con proteínas a través de una matriz sólida que posee poros de distintos tamaños. Las partículas de mayor tamaño no ingresarán en los poros de la columna, por lo que eluirán en un tiempo menor, mientras aquellas proteínas de menor tamaño irán ingresando a través de los poros, teniendo un mayor recorrido hasta el final de la columna eluyendo en un tiempo mayor [36].

Otro método utilizado en purificación utilizada corresponde a la cromatografía de intercambio iónico, cuyo principio se sustenta en separar en base a la carga neta que poseen las proteínas, o los residuos de sus aminoácidos que se encuentran en la superficie de estas, para condiciones determinadas en la solución o buffer en el que se encuentren. El punto isoeléctrico de las ficobiliproteínas varía entre pH 4,5 a 5,5 [37].

Para llevar a cabo esta etapa las proteínas deben poseer una carga contraria con la cual se encuentra cargada la matriz, con el propósito de que a medida que pase la solución a lo largo de la columna, las proteínas se adsorban, eluyendo aquellas proteínas que tenían la misma carga que la resina no

se encontraban cargadas. Finalmente, para obtener las proteínas de interés, se hace pasar un buffer con alta fuerza iónica de tal forma que pueda eluir la proteína de interés [38]. Se puede realizar más de un ciclo, generando distintas condiciones en la columna, de tal forma de obtener un producto cada vez más puro. Para la elución se puede utilizar un gradiente de sal o un gradiente de pH, ya sea de forma lineal o escalonada, de tal forma que cada conjunto de proteínas eluya a una condición determinada.

### 2.3.4. Análisis de pureza

Una de las mejores formas de medir la pureza de la proteína de interés dentro de la mezcla tratada es a través de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), en el cual luego de la adición de buffer denaturante a las muestras, estas son cargadas en pocillos desde donde se desplazan de acuerdo a su peso molecular al aplicar un campo eléctrico [39].

Otra forma de determinar el índice de pureza de las ficobiliproteínas es a través de métodos óptimos como la espectrofotometría para medir la presencia de un compuesto y la concentración relativa de este dentro de una muestra. El sistema de medición es una técnica no invasiva, en la cual se aplica a la muestra una luz monocromática a una longitud de onda determinada. La absorbancia es una medida de la radiación que es absorbida por una sustancia o molécula cuando inciden sobre estas ondas electromagnéticas, variando esta según la composición y la concentración de elementos presentes en la muestra, dependiendo también de la longitud de onda que es aplicada [40].

Todas las proteínas son capaces de absorber a una longitud de onda de 280 nm, lo que permite realizar una estimación de la concentración total de proteínas en una muestra, sin embargo, la presencia de impurezas puede sobreestimar este valor. Por otro lado, las ficobiliproteínas poseen máximos de absorción a otras longitudes de onda lo que permite determinar su concentración por separado, sin embargo, la presencia de otras proteínas que puedan presentar valores de absorbancia mayores a cero para la misma longitud de onda puede alterar el valor [41].

En el caso de las ficobiliproteínas, se puede medir su concentración relativa determinando la absorbancia que presentan, cuyo detalle se encuentra en la Tabla 2. Se determina el índice de pureza que poseen las proteínas en base a la relación entre el pico de absorbancia de la proteína de interés sobre la absorbancia a 280 nm.

Tabla 5: Índices de pureza de ficoeritrina obtenidos para distintas especies con sus respectivas metodologías de purificación. El índice de pureza se determina a partir del pico de absorbancia de ficoeritrina sobre la absorbancia a 280 nm.

<b>Especie (tipo PE)</b>	<b>Método de purificación</b>	<b>Condiciones de purificación utilizadas</b>	<b>Índice de Pureza</b>	<b>Ref</b>
<i>Rodophyta marinus</i> (B-PE)	Precipitación con sulfato de amonio. Cromatografía de intercambio aniónico (Columna: HiPrep® 16/10 Q XL). Exclusión por tamaño	Fosfato 0,01M, elución con NaCl 0,5M (pH 7)	4,8 (A545/A280)	[42]
<i>Corallina elongata</i> (R-PE)	Cromatografía (Columna de hidroxipatita) y filtración por gel (Superdex® 76)	Columna hidroxipatita: NaPi 50mM y NaCl 100 mM pH 7. Superdex: NaPi 10mM y 100 mM, pH 7	6,67 (A566/A280)	[43]
<i>Frucellaria lumbricallis</i> (R-PE)	Filtración por gel (Superdex® 200 SEC)	-	1,41 (A566/A280)	[30]

(Continuación) Tabla 5: Índices de pureza de ficoeritrina obtenidos para distintas especies con sus respectivas metodologías de purificación. El índice de pureza se determina a partir del pico de absorbancia de ficoeritrina sobre la absorbancia a 280 nm.

<b>Especie (tipo PE)</b>	<b>Método de purificación</b>	<b>Condiciones de purificación utilizadas</b>	<b>Índice de Pureza</b>	<b>Ref</b>
<i>Polysiphonia urceolata</i> (R-PE)	Columna Phenyl-Sepharose®. Cromatografía de intercambio aniónico (Columna: Q-Sepharose®). Cromatografía (Columna de hidroxipatita).	-	3,9 (A566/A280)	[30]
<i>Porphyra yezoensis</i> (R-PE)	Columna Phenyl-Sepharose®. Cromatografía de intercambio aniónico (Columna: DEAE-Sepharose).	-	4,5	[44]
<i>Porphyra haitanensis</i> (R-PE, gametofito frondoso)	Columna Phenyl-Sepharose® I. Columna Phenyl-Sepharose II. Cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Sepharose).	-	5,29 (A566/A280)	[30]
<i>Porphyria haitanensis</i> (R-PE, esporofito filamentoso)	Columna Phenyl-Sepharose®. Cromatografía de intercambio aniónico (Columna: Q-Sepharose®).	-	4,83 (A566/A280)	[30]
<i>Gracilaria lemaneiformis</i> (R-PE, fresca)	Columna Phenyl-Sepharose®. Cromatografía de intercambio aniónico (Columna: Q-Sepharose®).	-	4,2 (A566/A280)	[30]
<i>Gracilaria lemaneiformis</i> (R-PE, seca)	Columna Phenyl-Sepharose®. Cromatografía de intercambio aniónico (Columna: Q-Sepharose®).	-	3,2 (A566/A280)	[30]
<i>Grateloupia turuturu</i> (R-PE, liofilizada)	Cromatografía de intercambio aniónico (Columna: AE-200).	-	2,89 (A566/A280)	[30]
<i>Portieria hornemannii</i> (R-PE)	Precipitación con sulfato de amonio. Cromatografía de intercambio aniónico (Columna: Q-Sepharose®).	-	5,21 (A566/A280)	[30]
<i>Michrochaete</i> (C-PE)	Precipitación con sulfato de amonio (Saturación 65 %). Cromatografía de intercambio aniónico (Columna: DEAE Cellulose®).	Ácido acético – acetato de sodio 50 mM, pH 7,1.	4,06 (A555/A280)	[45]
<i>Centroceras clavulatum</i> (R-PE)	Precipitación con sulfato de amonio (Saturación 40 %). Cromatografía de intercambio aniónico.	Fosfato, pH 7,5. Elución con gradiente lineal de NaCl.	6,4 (A567/A280)	[46]
<i>Gracilaria crassa</i> (R-PE)	Precipitación con sulfato de amonio (Saturación 65 %)	Fosfato potasio 0,1M. Elución con gradiente lineal de NaCl.	3,79 (A565/A280)	[47]
<i>Heterosiphonia japónica</i> (R-PE)	Precipitación con sulfato de amonio. Columna Sepharose CL-4B. Filtración por gel (Sephadex G-200®). Cromatografía de intercambio aniónico (Columna: DEAE Sepharose FF).	Fosfato, pH 7.	4,89 (A565/A280)	[48]
<i>Portieria hornemannii</i> (R-PE)	Precipitación con sulfato de amonio (Saturación 55 %). Cromatografía de intercambio aniónico (Columna: Q-Sepharose®).	Fosfato 0,05M, pH 7,2. Elución con gradiente escalón de NaCl.	5,21 (A562/A280)	[13]

## 2.4. Métodos de obtención de agar

Durante los procesos de extracción de agar se debe tener cuidado principalmente en el control de parámetros, tales como la temperatura y tiempos a los que son expuestas las muestras en cada una

de las etapas asociadas al proceso, para obtener así el mayor rendimiento y calidad del producto posible. Las condiciones óptimas se ajustarán a la especie que será tratada, requiriendo etapas adicionales para mejorar rendimientos en algunos casos [49].

Por lo general, previo a sus procesos de extracción, las algas son sometidas una etapa de secado para ser almacenadas o transportadas, lo que puede tener efectos sobre el posterior rendimiento en el proceso de extracción de agar. Al incrementar la temperatura de secado, alcanzando rendimientos de hasta 40 % de peso seco a temperaturas de secado de 70 °C, debido a que la viscosidad y la tensión superficial disminuyen mientras que la solubilidad aumenta [14].

Las etapas consideradas para la extracción de agar en las especies del género *Gracilaria* comprenden una resuspensión de las algas almacenadas y un tratamiento alcalino, seguido de una neutralización y solubilización del agar en agua hirviendo. Finalmente, se reduce el contenido de humedad, como se puede ver esquematizado en la Figura 14. También puede ser incorporada una etapa de blanqueo, previo o posterior a la etapa de extracción del agar.

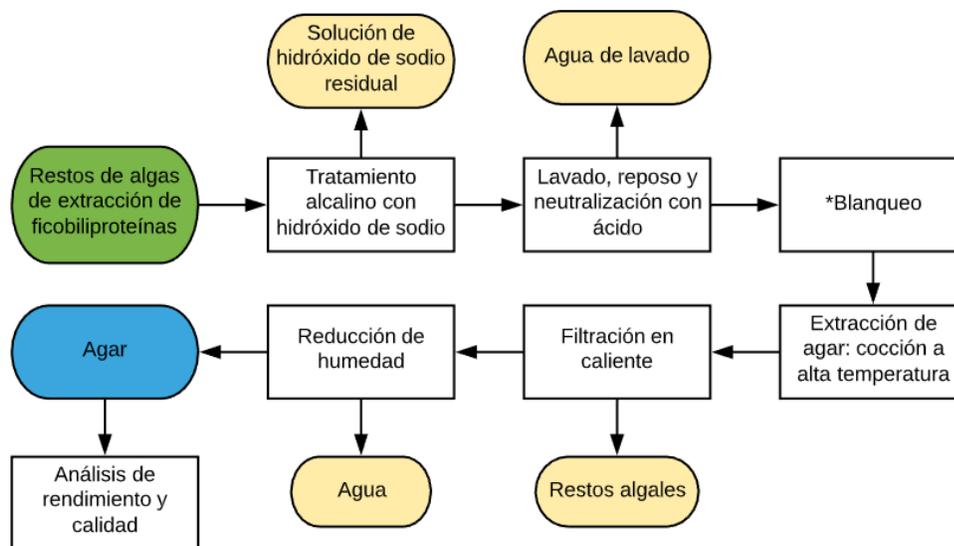


Figura 14: Diagrama de proceso de obtención de agar. Elaboración propia.

Los métodos utilizados para la extracción de agar se basan en la insolubilidad de este en agua fría, lo que permite lavar las algas a temperatura ambiente para eliminar las impurezas solubles, el agua de mar y las sales antes de ser sometidas a los procesos posteriores que contemplan procesos a altas temperaturas [4].

A continuación, se muestra un detalle de las distintas etapas que se llevan a cabo, junto con las condiciones de operación típicas.

#### 2.4.1 Tratamiento alcalino

Generalmente las algas del género *Gracilaria* presentan altas concentraciones de sulfato, lo que produce agar de baja calidad. Esto puede ser mejorado a través de un tratamiento alcalino, en el cual se convierte la L-galactosa-6-sulfato en 3,6-anhídrido-L-galactosa, eliminando así el exceso de sulfato [24].

Este método se lleva a cabo añadiendo hidróxido de sodio en la solución de algas, dejándolas reposar a alta temperatura por unas horas. Como se ha descrito anteriormente, la concentración del álcali, la temperatura y el tiempo de proceso son claves para la calidad del agar, teniendo un óptimo distinto según la especie tratada [50]. El rango de temperaturas utilizadas por lo general dentro de esta etapa va de los 60 a 90 °C, con concentraciones de hidróxido de sodio que van desde el 0,5 al 10 % p/v, con tiempos de hasta 3 horas.

Se han realizado análisis para algunos tipos de algas rojas, como *Gracilaria verrucosa*, a la cual se le realizó una evaluación del rendimiento de agar extraído y sus propiedades físicas, que determinan la calidad del producto, utilizando distinta concentración de hidróxido de sodio para el tratamiento alcalino, cuyos resultados pueden verse en la Tabla 2Tabla 6 [24]. Por otro lado, se puede observar cómo varía la fuerza de gel variando la temperatura a la cual se realiza el tratamiento alcalino, además de la variación de la concentración de NaOH, cuyo comportamiento se observa en la Figura 15.

Para determinar las condiciones a utilizar en el proceso para un alga determinada, se debe considerar el balance entre alcanzar un rendimiento y una fuerza de gelificación adecuada para el producto que se desea obtener, siendo variables las condiciones para las distintas especies [49].

Tabla 6: Cambio de propiedades de agar y rendimientos obtenidos con la variación de la concentración de hidróxido de sodio en tratamiento alcalino [24].

Propiedades físicas	Concentración NaOH % (p/v)			
	3	5	7	10
Fuerza de gelificación (g cm <sup>-2</sup> ). Media±DS	225.8±18 <sup>a</sup>	156.3±18.8 <sup>b,c</sup>	167.1±16.71 <sup>b</sup>	143.3±24 <sup>c</sup>
Temperatura de gelificación (°C). Media±DS	32.9±1.2	32.5±2.2	32.4±1.44	33.5±0.8
Temperatura de fusión (°C). Media±DS	71.9±1.5 <sup>a</sup>	63.8±2.7 <sup>c</sup>	67.3±1.4 <sup>b</sup>	67.5±2.5 <sup>b</sup>
Rendimiento % (g agar g alga seca-1) Media±DS	4.3±0.2 <sup>c</sup>	4.5±0.08 <sup>c</sup>	9.7±0.16 <sup>b</sup>	10.5±0.24 <sup>a</sup>

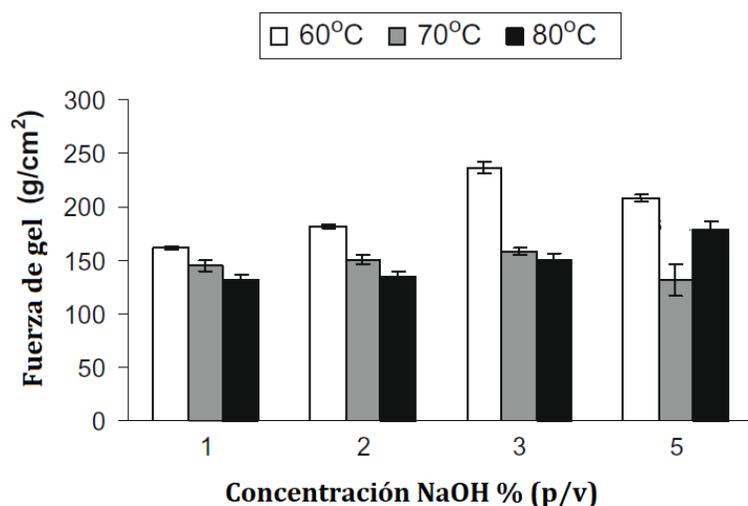


Figura 15: Fuerza de gel obtenido de agar con tratamiento alcalino para distintas temperaturas y concentraciones de NaOH en *Gracilaria clifronii* [49].

Las algas pueden quedar suspendidas en la solución de hidróxido de sodio previo a llevarlo al baño a alta temperatura, lo que también puede tener efectos en el rendimiento del agar obtenido.

Por otro lado, se han visto disminuciones en el rendimiento de extracción de agar realizándose una etapa de tratamiento alcalino, que puede estar asociada a la descomposición de polisacáridos durante el proceso y que por medio de difusión se transfieren a la fase de solución de NaOH [51].

#### 2.4.2 Enjuague, reposo y neutralización

Para pasar a la etapa de cocción, y permitir la solubilización de los azúcares presentes en la pared celular de las algas en una solución a alta temperatura, se deben establecer las condiciones de pH ideales para esta etapa.

Luego del tratamiento alcalino, y una etapa de filtración para recuperar el material de interés, se debe hacer una limpieza de las algas retenidas para eliminar los restos de solución que puedan quedar utilizando agua.

Posteriormente, la muestra de algas debe ser llevada a pH neutro con el propósito de mejorar la solubilidad de los azúcares del alga en el agua hirviendo durante la etapa de extracción [52]. En la Tabla 7 se puede observar el aumento de rendimiento que tienen las muestras de agar para una especie de alga roja cuando se realiza el ajuste de pH.

Tabla 7: Efectos en rendimiento y calidad de agar por diferentes tratamientos previos a la cocción en la extracción de agar de *Pteocladia capillacea* [52].

Método/Tratamiento	Rendimiento de agar (%)	Fuerza de gel (g/cm <sup>2</sup> )
(i) Sólo lavado a 40 °C	14	725
(ii) Lavado, reposo y molienda húmeda	16,5	800
(iii) Adición de ácido para ajuste de pH	17,5	800
(iv) ii y iii combinadas	20	750
(v) ii y iii combinadas, usando fotoblanqueo	22	550

#### 2.4.3 Blanqueo

La etapa de blanqueo es utilizada comúnmente en la extracción de agar a nivel industrial, para obtener un producto con una estética superior. El blanqueo puede ser realizado utilizando productos químicos o a través de una foto decoloración. La desventaja de la primera reside en corresponder a un tratamiento químico en el cual se adiciona hipoclorito de sodio, generando la producción de gas cloro como subproducto siendo una amenaza para el medio ambiente y la salud de quienes realizan el tratamiento [53].

El proceso de fotoblanqueo es una alternativa, la cual consiste en un proceso a través del cual las moléculas sufren una modificación fotoquímica con la cual pierden de forma irreversible la capacidad de fluorescencia, y con esto su tinción.

Cuando las moléculas son iluminadas a cierta longitud de onda, pasando de un nivel energético a otro más excitado pudiendo sufrir un cambio estructural permanente convirtiéndose en una molécula foto-blanqueada. Dentro de esto influyen los factores como el entorno molecular y la intensidad de luz con que se excita, afectando directamente las tasas de foto decoloración [54].

Este proceso se puede llevar a cabo exponiendo las muestras a tratar a luz solar, teniendo como principal parámetro a controlar la duración del foto decolorado [50]. Mediante esta alternativa no se producen cambios apreciables en la calidad del agar obtenido [52].

#### **2.4.4 Cocción**

Es en esta etapa cuando se produce la extracción del agar y corresponde a un proceso de lixiviación en el cual el agar presente en la muestra se solubiliza en el agua debido a las altas temperaturas a las que son expuestas.

Generalmente esta etapa se realiza llevando la mezcla a temperaturas por sobre los 85 °C. Se requiere de un estricto control del pH para mantenerlo en torno a 6,5. Realizar esta etapa a presión puede reducir los tiempos y aumentar los rendimientos de extracción agar ya que se requiere alcanzar temperaturas menores teniendo menores repercusiones sobre las propiedades del agar [55] [56].

Dentro de los parámetros de control importantes de esta etapa se encuentran el tiempo y temperatura de extracción, y el radio de material algal inicial sobre el volumen de solución de extracción, donde el valor óptimo podría variar dependiendo de la especie.

El aumento de la relación entre agua y alga puede aumentar los rendimientos de extracción sin afectar la fuerza de gel obtenido [52]. Por otro lado, los aumentos de temperatura durante la extracción pueden llevar a la obtención de un mayor rendimiento, pero se genera un producto de menor calidad, lo que puede deberse a la descomposición de los azúcares presentes en la solución [49]. Finalmente, un aumento del tiempo de extracción puede generar un aumento en los rendimientos, esto debido a que la solución puede solubilizar la mayor cantidad posible de azúcares, sin embargo, la mantención de la temperatura puede conllevar un mayor costo energético [49].

#### **2.4.5 Filtración, gelificación y congelamiento**

La solución obtenida de la etapa de cocción debe ser filtrada, para remover los residuos principalmente aquel material algal que no fue solubilizado, obteniendo como permeado una solución de agar en agua. Esta operación debe ser realizada con la solución a alta temperatura, de tal forma que esta no gelifique en el material filtrante. Debido a la alta viscosidad que presenta la solución, la etapa puede mejorar su eficacia aplicando un gradiente de presión que permita el paso de esta a través del filtro, el cual puede ser una gasa.

Para eliminar excesos de humedad de la solución de agar obtenido se utilizan etapas de congelamiento. El agar al estar gelificado a la temperatura utilizada dentro de la etapa de congelamiento se encuentra rígido e inflexible, por lo que los cristales de hielo no se pueden acomodar, y de esta forma el polisacárido se concentra formando una estructura similar a una esponja [57]. Producto de la formación de una fase de agua dentro de una red de agar, luego del descongelamiento de la muestra, las fases pueden ser separadas debido a la insolubilidad del agar en agua fría.

### 2.4.6 Secado

El agar que se obtiene tras una etapa de congelamiento comprende un agar con alta humedad aún, por lo que se suele utilizar una etapa de secado, en la cual mediante una corriente de aire a alta temperatura se eliminan los restos de agua. Se debe procurar que la temperatura del aire sea menor a la temperatura de fusión del agar para no solubilizar nuevamente el agar en el agua [49] [57].

## 3. Materiales y métodos

La metodología expuesta a continuación corresponde a la adoptada después de realizar pruebas preliminares para determinar algunas condiciones de operación de acuerdo a los equipos presentes en el laboratorio.

La metodología utilizada contempla la extracción de ficobiliproteínas y agar a partir de *Agarophyton chilense*.

### 3.1. Equipos y materiales

- Equipos
  - Licuadora Oster, Modelo 4172, 300W.
  - Espectrofotómetro Biochrom, Libra 550 w/Bluetooth.
  - Sonicador Q-Sonica LLC, Modelo Q-500.
  - Sonicador Ningbo scientz biotechnology co. L.T.D, Modelo SB-5200 DTD.
  - Centrífuga Sorvall RC 6+. Rotor Fiber Lite, F10-6x500y 10.000 rpm, 17.700 xG.
  - ÄKTA avant General Electric.
  - Resina Q-Sepharose® Fast Flow Anion Exchange (Sigma-Aldrich), Q-1126.
  - Resina DEAE Sepharose Fast Flow Anion Exchange (Sigma-Aldrich), DFF-100.
  - Cámara de electroforesis BioRad, Mini-Protean Tetra.
  - Fuente de poder BioRad, Power Pac 1000.
  - Baño seco MultiBloc® Heater, Equilab, Modelo 2001-1CE.
  - Agitador magnético, Heating Magnétic Stirred Equilab.
  - Horno de calentamiento Gallenkamp, Hotbox Oven with fan, Size 2.
  - Prensa metálica.
  
- Materiales y reactivos: El detalle de estos se encuentra en Anexo B.

### 3.2. Métodos

#### 3.2.1. Obtención de Ficobiliproteínas

##### Extracción

- 1) Se pesan 20 g de *Agarophyton chilense* en formato seco (sin humedad) y se homogenizan en una licuadora para obtener fragmentos de menor tamaño que no sobrepasen los 2 cm.
- 2) El alga fragmentada es lavada y humedecida en 400 mL de agua destilada con agitación durante dos minutos, con el propósito de eliminar arena y restos de material marino.

- 3) El alga humedecida es filtrada a través de dos capas de gasa, reteniendo el material celular y eliminando el permeado alto en contaminantes.
- 4) Se resuspende el alga húmeda en 400 mL de solución de PBS 0,1 M, pH 7, en una relación 1:20 peso de alga seco sobre volumen de buffer (40 mL de buffer PBS 10x y 360 mL de agua destilada).
- 5) Se realizan dos ciclos de congelamiento-descongelamiento a -20 °C en recipiente plástico. Luego de descongelar completamente la muestra en el primer ciclo, se inicia el segundo ciclo.
- 6) La suspensión de algas se deja reposar durante 5 días.
- 7) Se filtra en una doble capa de gasa, reteniendo el alga, utilizada posteriormente en la extracción de agar. Se colecta el buffer permeado con las proteínas disueltas para su purificación.
- 8) La solución permeada anteriormente se centrifuga a  $10.000 \times g$  por 30 minutos a 4 °C en la centrífuga Sorvall RC 6+. El pellet que contienen los restos celulares es eliminado mientras que el sobrenadante se utiliza en las siguientes etapas de purificación.

### **Purificación**

- Precipitación de ficobiliproteínas con sulfato de amonio:
  - 1) Al buffer con proteínas obtenidos luego de la centrifugación final en el proceso de extracción se le adiciona 106 [g/L] de sulfato de amonio para alcanzar una saturación de 20 % con el propósito de eliminar posibles impurezas. Bajo esta condición no precipitan las proteínas de interés.
  - 2) La muestra se centrifuga en la centrífuga Sorvall RC 6+, operando a  $14.000 \times g$  por 30 minutos a 4 °C.
  - 3) Se separa el líquido sobrenadante del pellet obtenido en la etapa anterior, y se elimina este último; al sobrenadante se adiciona 229 [g/L] de sulfato de amonio para alcanzar una saturación de 60 % con el propósito de precipitar la mayor cantidad de ficobiliproteínas.
  - 4) La muestra saturada al 60 % es centrifugada a  $14.000 \times g$  por 30 minutos a 4°C en una centrífuga.
  - 5) Se elimina el sobrenadante, mientras que el pellet se resuspende en 10 mL de agua desionizada.
  - 6) Finalmente, el pellet resuspendido se introduce en una membrana de diálisis de celulosa (MWCO 14.000), la cual debe ser ambientada previamente en agua desionizada por dos horas con agitación en un cuarto oscuro. Luego, el pellet resuspendido en el interior de la membrana es dializado contra agua desionizada para eliminar el contenido de sal presente. Se monitorea la conductividad hasta alcanzar valores bajo  $1 \mu S/cm$ .

- **Intercambio Iónico**

La muestra alta en proteínas obtenida tras la diálisis es cargada en una columna de intercambio aniónico para realizar una separación en base a la fuerza iónica de las moléculas presentes utilizando el equipo Äkta Avant (GE Healthcare) para purificación de proteínas. El siguiente protocolo se aplica utilizando buffers fosfato 0,025 M con valores de pH de 5,5, 6,5 y 7,5, previamente desgasificados.

- Preparación del equipo

- 1) Se realiza una limpieza de las bombas del equipo haciendo pasar en primer lugar etanol al 20 % y luego agua desionizada.
- 2) Se realiza una limpieza de la columna de Q-Sepharose® de 1 mL haciendo pasar un flujo de 1 [mL/min] de etanol al 20 % durante 5 minutos. Luego bajo las mismas condiciones se hace pasar un flujo de agua desionizada.
- 3) Se ambientan las bombas con sus respectivos buffers de carga y elución.
- 4) Se realiza una limpieza del bucle de 7 mL en el que irá contenida la muestra de proteínas dializada que será inyectada durante el proceso de intercambio iónico, haciendo pasar por el interior de este mismo volumen de bucle en primer lugar con etanol al 20 % y luego agua desionizada.
- 5) Se limpia, seca e instala una placa de 96 pocillos de 2 mL para recolectar las fracciones.
- 6) La muestra dializada se hace pasar por un filtro para jeringa CMC 0,22  $\mu\text{m}$ , y es cargada en una jeringa para su inyección.
- 7) Se preparan los buffers de carga y elución, al pH requerido para el proceso, se pasan por un filtro de membrana de MCE de 3  $\mu\text{m}$  (MF-MILLIPORE), y posteriormente se lleva al sonicador SB-5200 DTD por 10 minutos a 20 kHz, para eliminar residuos y burbujas respectivamente, que pudiesen interferir con el paso del buffer a través de la columna.

- Proceso de intercambio iónico

En esta etapa se colectaron las distintas fracciones de 1 mL que eluyen de la columna para un posterior análisis.

- 1) Se hacen pasar 15 volúmenes de columna de buffer de carga (buffer fosfato con NaCl) a una velocidad de 1 [mL/min], hasta alcanzar un estado estacionario el valor de conductividad del buffer.
- 2) Se inyectan 7 mL de muestra desde la jeringa con la muestra a la columna a una velocidad de 0,5 [mL/min] con el propósito que se adsorba la proteína de interés producto de la fuerza iónica de estas al pH del buffer.
- 3) Se inyectan 5 volúmenes de columna de buffer de carga a la columna a una velocidad de 1 [mL/min] para eliminar aquellos compuestos que no se adhirieron a la columna.
- 4) Se inyectan 30 volúmenes de columna de buffer de elución a la columna de tal forma de generar un gradiente lineal con buffer fosfato 0,025 M, 0,5 M de NaCl, a una velocidad de 1 [mL/min], para eluir las proteínas que se encuentran adsorbidas a la matriz.
- 5) Se inyectan 5 volúmenes de columna de buffer fosfato 0,025 M, 0,5 M de NaCl a la columna, a una velocidad de 1 [mL/min], para eliminar el resto de los componentes que se encuentren adsorbidos aún a la columna.
- 6) Se registra la absorbancia a 280, 560 y 610 nm de las fracciones eluidas.

### **Análisis de pureza**

Del colector de fracciones se escogen aquellas que presentan picos de absorbancia a 280, 565 o 610 nm. Por cada cromatografía realizada se prepara un gel de poliacrilamida para realizar una electroforesis, midiendo así el nivel de pureza a través de la presencia de bandas de distintos

tamaños en cada carril y la aparente cantidad de proteínas o subunidades en cada banda. La metodología de preparación del gel de corrida y su posterior tinción se puede ver en el Anexo E.

### **3.2.2. Obtención de agar**

A continuación, se muestra el protocolo de extracción de agar. En este proceso se utiliza el mismo protocolo para realizar la extracción en muestras con y sin extracción previa de ficobiliproteínas. Sin embargo, las muestras con extracción previa de proteínas se encontrarán humedecidas, mientras que las muestras sin extracción deben ser homogenizadas, limpiadas y filtradas, previamente como se indica en los pasos del 1 al 3 de extracción de ficobiliproteínas.

Para todos los procesos se utiliza una base inicial de 20 g de alga seca, que para el caso de las muestras con previa extracción de ficobiliproteínas se encuentran humedecidas, y en aquellas muestras de alga seca sin extracción previa de proteína se realiza una limpieza quedando húmedas al iniciar las siguientes etapas.

#### **Tratamiento alcalino**

- 1) La muestra de alga húmeda (equivalente a 20 g de alga seca), es suspende en 400 mL de hidróxido de sodio al 3 % p/v.
- 2) La solución se calienta a 85 °C por 1 hora en un vaso precipitado de 600 mL en un agitador magnético de calentamiento, con el propósito de eliminar el contenido de sulfatos presentes en el alga.
- 3) La solución tratada se filtra en dos capas de gasa para retener el material algal y eliminar la solución de hidróxido de sodio.
- 4) Las algas son enjuagadas con 600 mL de agua destilada para eliminar el exceso de hidróxido de sodio y luego son filtradas nuevamente en dos capas de gasa.

#### **Reposo y neutralización**

- 1) El material algal retenido de la etapa anterior es resuspendido en 400 mL de agua destilada. Se deja en reposo durante una noche a 4 °C con el propósito de estabilizar la muestra.
- 2) Se filtra la muestra en una doble capa de gasa.
- 3) El material retenido es resuspendido en una solución de ácido sulfúrico al 0,025 % por dos horas con agitación, con el propósito de disminuir el pH de la solución.
- 4) Se filtra la muestra en una doble capa de gasa.
- 5) Se resuspende la muestra de alga retenida en 600 mL agua destilada (proporción 1:30 considerando los 20 g iniciales de alga seca) en un vaso precipitado de 1 L y se ajusta el pH a un valor entre 6,5 y 7.

#### **Extracción**

- 1) La solución neutralizada es puesta en un agitador magnético de calentamiento para ser llevado a una temperatura de 90 °C con agitación constante para alcanzar las condiciones de hervor permaneciendo un tiempo de 2 horas, con el propósito de solubilizar la mayor cantidad de agar en el medio. Se ajusta la agitación a medida que la solución se torna más viscosa para mantener homogeneidad.

- 2) Una vez finalizado el tiempo de cocción se filtra la solución de agar, a la misma temperatura de cocción, en una doble capa de gasa utilizando una prensa, aplicando presión para el paso de la solución con agar, reteniendo así los restos de algas que no fueron solubilizados o residuos que no fueron eliminados anteriormente.

### **Eliminación de humedad: deshidratación y secado**

- 1) El material permeado luego de la etapa de filtración se deja gelificar a temperatura ambiente.
- 2) El gel es congelado en el refrigerador a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y luego descongelado a temperatura ambiente para separar las fases de agua y agar, escurriendo la primera para obtener un agar reducido en humedad. Dependiendo de la muestra se puede estrujar el agar para eliminar mayor cantidad de agua que pueda quedar atrapada en el interior de la red de agar.
- 3) Posteriormente, el gel se seca en la estufa a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  para eliminar el resto de la humedad por un día aproximadamente, hasta obtener un peso constante (aproximadamente durante un día).
- 4) Finalmente, se determina el rendimiento de agar midiendo el peso de agar seco obtenido sobre el peso inicial de las algas secas.

## **4. Resultados y discusión**

### **4.1. Extracción y purificación de ficobiliproteínas**

#### **4.1.1. Extracción de ficobiliproteínas en función del tiempo de resuspensión**

Para realizar la extracción de ficobiliproteínas desde el interior de las algas, estas fueron resuspendidas en buffer fosfato salino, seleccionado por mostrar mayor eficiencia en otras especies de *Gracilaria*. En pruebas preliminares se observó que a medida que aumentaba el tiempo que permanecía el alga en el buffer, aumentaba la liberación de proteínas hacia el medio, lo que se determinó de forma visual a través de la coloración que presentaba la suspensión.

Para comprobar esto se preparó 10 g de alga homogeneizada y limpia, la cual fue resuspendida en 200 mL de PBS en un vaso precipitado, extrayendo muestras de 1 mL durante algunos días, en un periodo de 35 días. Para esto no se aplicaron métodos de ruptura celular que contribuyeran a la extracción de ficobiliproteínas. Por otra parte, no fue posible mantener la solución con una agitación constante debido a falta de disponibilidad de equipos por el periodo de tiempo deseado. Sin embargo, previo a la extracción de la alícuota, el vaso se agita para homogenizar la muestra.

En la Figura 16 se puede observar como aumentó la coloración a medida que transcurrían los días, indicando un aumento de la concentración de ficobiliproteínas a través del tiempo. Esto se comprobó realizando un barrido de longitudes de onda para cada muestra, resultado que se muestra en la Figura 17. Los picos observados en el último día presentan valores de absorbancia cinco más altos que los obtenidos durante los primeros días, lo que indica un aumento en la concentración tanto de ficoeritrina como de ficocianina, representados por los picos a una longitud de onda de 565 y 620 nm respectivamente. En el espectro de longitudes de onda de todas las muestras obtenidas, no se observa una diferencia significativa entre los máximos de absorción y sus alrededores, lo que puede tener relación con la presencia de impurezas en la solución.

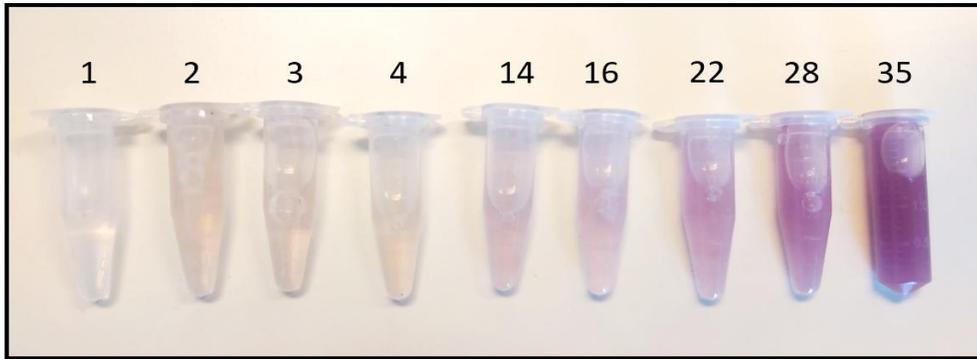


Figura 16: Progresión de la liberación de ficobiliproteínas al medio extracelular con el transcurso de los días. El número sobre cada muestra indica el día en que fue extraída la muestra desde iniciado el experimento.

Se determinó la concentración de ficoeritrina y ficocianina de las muestras para los distintos días a través de la ecuación de Beer [20], la cual se ajustó a los valores de los picos de absorbancia que presentan los barridos de longitud de onda expuestos de las ficobiliproteínas de *Agarophyton chilense*. Los valores son presentados en la Tabla 8, donde desde el día 14 los resultados obtenidos acercan a los valores mostrados de obtención de ficobiliproteínas en la Tabla 1. Estos cálculos se realizaron en base a los 200 mL de volumen en el que se encuentran suspendidas los 10 g de alga, y el detalle de estos se encuentra en el Anexo F.

Tabla 8: Concentración de ficoeritrina y ficocianina presente en muestras de liberación de proteínas en función de la cantidad de días en suspensión, determinada a través de la ecuación de Beer, expresado en miligramos de proteína sobre gramos de alga seca.

	Tiempo de incubación (días)								
	1	2	3	4	14	16	22	28	35
<b>Ficoeritrina R-PE [mg/g]</b>	0,012	0,094	0,139	0,053	0,289	0,266	0,460	0,501	0,495
<b>Ficocianina R-PC [mg/g]</b>	0,009	0,049	0,074	0,031	0,198	0,187	0,258	0,313	0,366

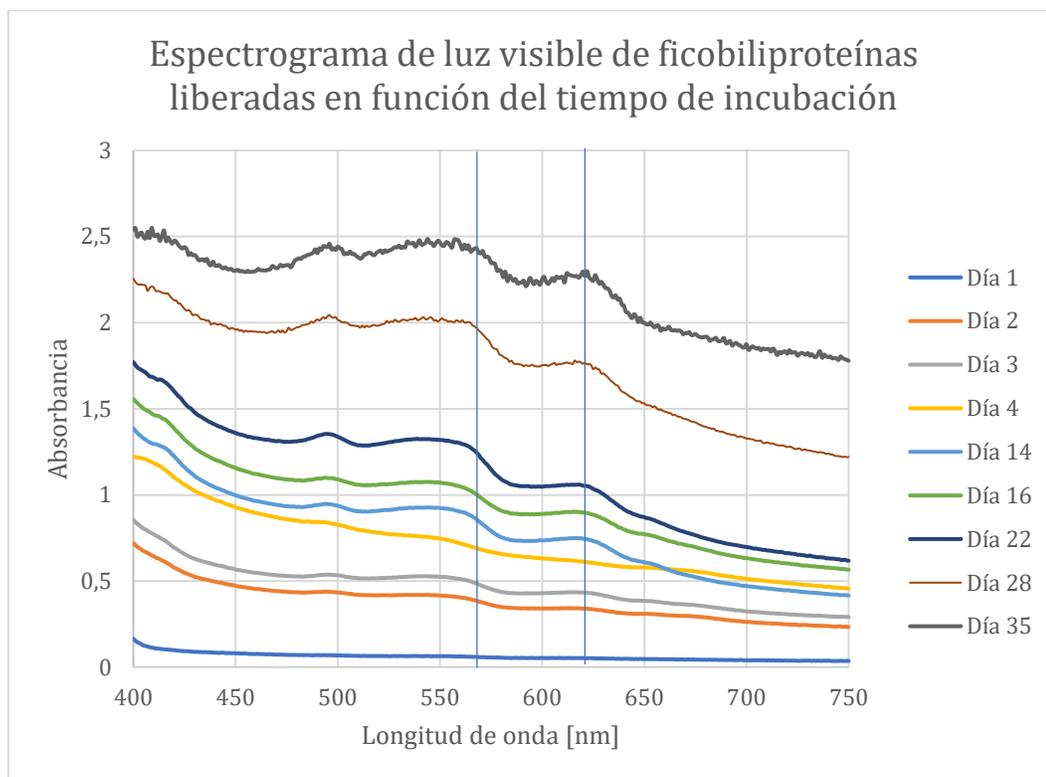


Figura 17: Espectrograma de luz visible de distintas muestras de extracción de ficobiliproteínas para distintos días en suspensión en PBS (máximo de absorción de ficoeritrina y ficocianina a longitud de onda de 565 y 620 nm).

En base a las publicaciones revisadas, y sus protocolos de extracción, se esperaba que se obtuviese una mayor concentración de ficobiliproteínas en los primeros días. Se piensa que los resultados obtenidos pueden deberse a la falta de agitación, provocando la falta de un gradiente mayor de concentración de ficobiliproteínas entre el alga y el medio, al quedar la mayoría de las ficobiliproteínas en las cercanías del alga en la sección inferior del recipiente con la muestra. Otro factor que pudo haber influido en una menor extracción es el volumen de suspensión, ya que al utilizar un mayor volumen se mantiene un gradiente de concentración mayor ayudando en la difusión.

Las muestras obtenidas de los distintos días fueron almacenadas en frío a 4 °C hasta que finalizó la última toma de muestra, lo que pudo haber tenido una repercusión en la concentración de proteínas de las primeras muestras por una posible denaturación [21].

Por otra parte, durante la extracción de ficobiliproteínas se observó el crecimiento de microorganismos en el medio, lo que pudo haber contribuido a una mayor liberación de estas proteínas. La producción de enzimas hidrolíticas por las bacterias contaminantes podría haber contribuido a la posible ruptura de la pared y membrana celular de las algas. En el Anexo G se observan imágenes de este crecimiento.

De estos experimentos se desprende la liberación de ficobiliproteínas aumenta con el transcurso de los días, y se hace necesario realizar una etapa de ruptura celular contribuya a aumentar la extracción de ficobiliproteínas, así como la necesidad de una agitación constante de la muestra.

#### 4.1.2. Estudio preliminar de métodos de extracción de ficobiliproteínas

Dado los antecedentes recopilados sobre técnicas de extracción de ficobiliproteínas, se realizaron pruebas iniciales para determinar el mejor método de extracción de ficobiliproteínas, comparando ciclos de congelamiento-descongelamiento y sonicación.

Luego de realizada la extracción mediante los dos métodos anteriormente mencionados, a los extractos obtenidos en cada caso se les aplicó una precipitación seriada con sulfato de amonio en un rango entre 20 a 70 % de saturación, con intervalos de 10 % entre cada precipitación.

En la Figura 18 y Figura 19 se observan los pellets obtenidos tras la precipitación para muestras de extracción con congelamiento y sonicación respectivamente. En estas se observa una mayor coloración, y por lo tanto mayor concentración de ficobiliproteínas, en la muestra a la cual se le aplicó un ciclo de congelamiento, por lo que se decidió usar este método en futuras extracciones.

A partir de la coloración obtenida en los precipitados de cada muestra, se definió que el rango de concentración de sulfato de amonio partiría con una saturación a 20 % para eliminar impureza y luego se proseguiría con una concentración de sulfato de amonio al 60 % para precipitar las ficobiliproteínas, de manera de evitar un incremento de impurezas en la muestra.

Siendo pruebas preliminares, no se realizaron ensayos de espectrofotometría para determinar la absorbancia de las fracciones obtenidas por ambos métodos de extracción, sin embargo, este análisis podría ser útil para realizar una comparación más certera, y así determinar el nivel de mejoría que tiene una técnica por sobre otra. También debería evaluarse la aplicación de ambos métodos de forma complementaria. Sin embargo, el aplicarlo a escala industrial podría implicar mayores costos operacionales, junto con mayores tiempos de para obtener un extracto de ficobiliproteínas.

Por otro lado, la muestra sometida a etapa de sonicación pudo ser afectada producto del aumento de temperatura ambiental, considerando que se mantenía el recipiente en hielo para controlar la temperatura. Este parámetro es importante considerando que la proteína puede sufrir una denaturación a altas temperaturas, perdiendo coloración, y disminuyendo la concentración de ficobiliproteínas detectada mediante ensayos de espectrofotometría [21].



Figura 18: Precipitación con sulfato de amonio a distintos porcentajes de saturación con sulfato de amonio en extracto de ficobiliproteína obtenido por ciclos de congelamiento.

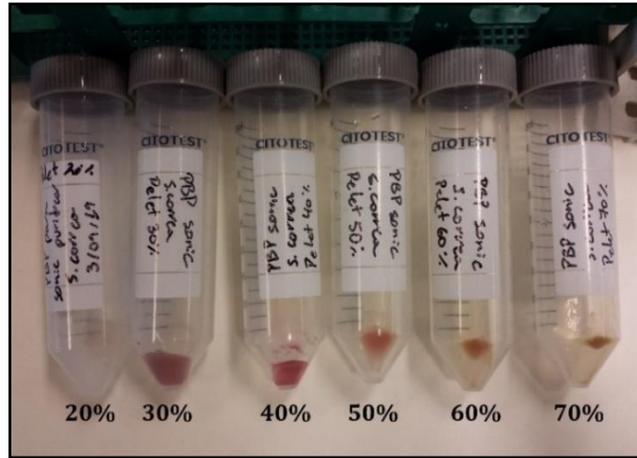


Figura 19: Precipitación con sulfato de amonio a distintos porcentajes de saturación con sulfato de amonio en extracto de ficobiliproteína obtenido por sonicación.

En la Figura 20 se presenta la coloración que poseen las fracciones de proteínas insolubles en sulfato de amonio, entre 30-40 % y 40-50 % de saturación. Se observa que cada muestra posee distinta coloración, lo que se puede explicar por la diferencia que presentan los barridos de longitud de onda de la Figura 21. El barrido de cada muestra indicaría que la concentración de cada ficobiliproteína es distinta para cada muestra, al observar la diferencia que existe entre los picos a 565 y 620 para cada saturación.

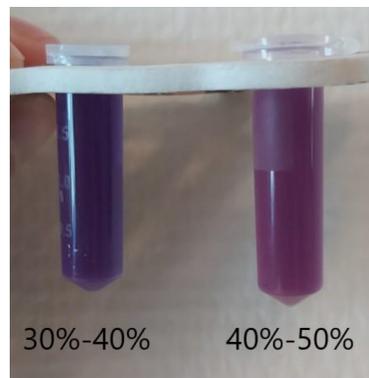


Figura 20: Fracción de ficobiliproteínas resuspendida tras precipitadas con sulfato de amonio en el rango comprendido de saturación entre 30 y 40 % (izquierda) y entre 40 y 50 % (derecha).

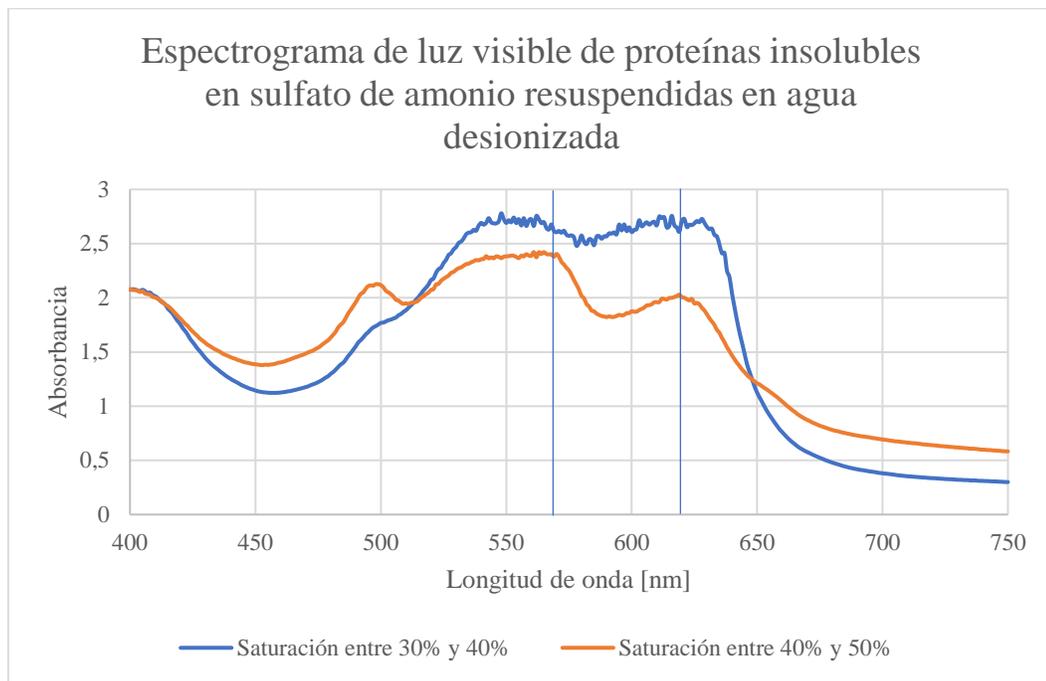


Figura 21: Espectrograma de luz visible de proteínas insolubles en sulfato de amonio para comparación de muestras precipitadas en distintos rangos de saturación con sulfato de amonio (máximo de absorción de ficoeritrina y ficocianina a longitud de onda de 565 y 620 nm).

Por otra parte, se analizó la extracción de ficobiliproteínas tras la aplicación de un ciclo de congelamiento-descongelamiento, evaluado por un análisis espectrográfico en el rango visible como se observa en la Figura 22. De este resultado se concluye que además de realizar una lisis celular, es mejor incubar el alga en la solución para que ocurra la difusión de las proteínas hacia el buffer.

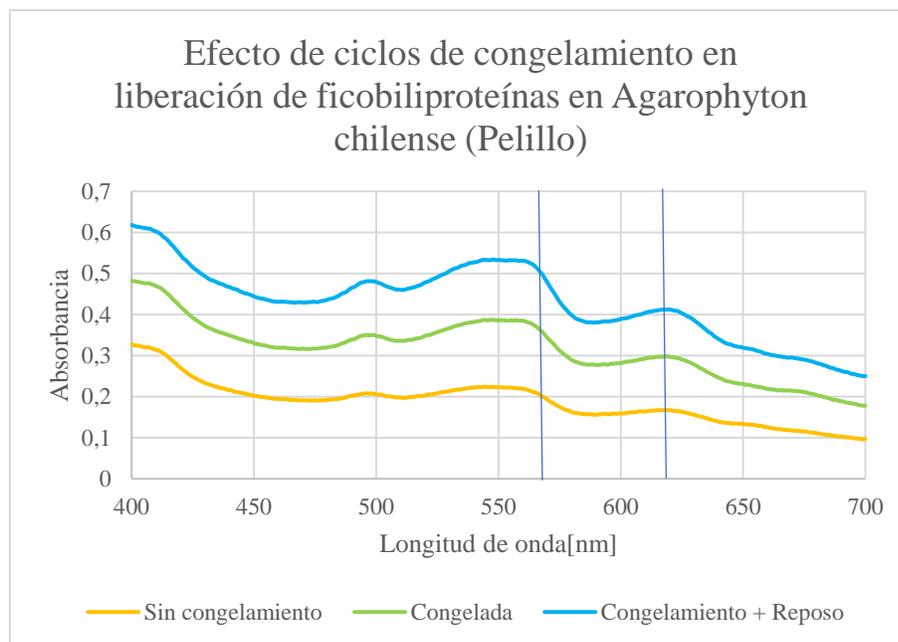


Figura 22: Espectrograma de luz visible para muestras antes y después de un ciclo de congelamiento (máximo de absorción de ficoeritrina y ficocianina a longitud de onda de 565 y 620 nm).

### 4.1.3. Extracción y precipitación con sulfato de amonio

Se realizó una extracción de ficobiliproteínas en tres muestras de alga seca. En la Figura 23 se presenta la muestra de alga seca pesada y posteriormente homogenizada, a partir de la cual se realizó tanto la extracción de ficobiliproteínas como la extracción de agar. En esta se pudo observar una alta presencia de restos de componentes marinos, piedras pequeñas y arena. Tomando esto en consideración, se plantea que la cantidad de ficobiliproteína determinada por cantidad de alga seca utilizada para la extracción se encontrará subdeterminada debido a que los componentes no correspondientes a alga presente aportan un peso extra a la muestra, sin aportar al aumento de ficobiliproteínas.

A partir de los resultados obtenidos tras las pruebas preliminares de extracción y precipitación de ficobiliproteínas con sulfato de amonio de ficobiliproteínas, se generaron y se implementaron los protocolos de extracción definitivos. Estos consistían en la resuspensión del alga en buffer tras homogenización y lavado, luego dos ciclos de congelamiento-descongelamiento y reposo durante 5 días para una mayor liberación de proteínas. Tras la etapa de extracción y filtración de la muestra para separar restos del alga del medio rico en proteínas, se obtuvo una suspensión coloreada, como se muestra en la Figura 24. Luego de una etapa de centrifugación se obtuvo una solución más transparente y reducida en impurezas.



*Figura 23: Alga seca preparada para la extracción de ficobiliproteínas y agar. (Izquierda) Alga seca pesada; (Centro) Alga seca homogenizada por trituración; (Derecha) Alga humedecida y limpiada en agua destilada.*



Figura 24: Filtrado de extracto crudo de ficobiliproteínas (izquierda) y sobrenadante de extracto centrifugado para eliminación de impurezas (derecha) tras protocolo definitivo de extracción.

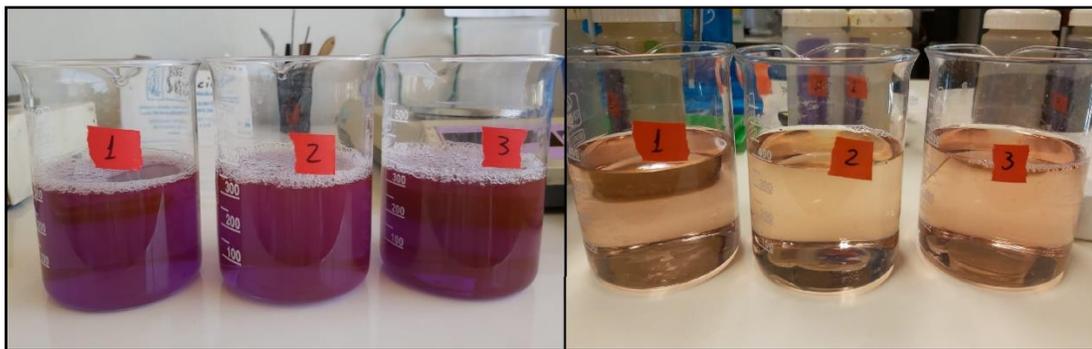


Figura 25: Diferencia entre extracto crudo de ficobiliproteínas (izquierda) y sobrenadante de precipitación con sulfato de amonio con saturación al 60 % (derecha) de tres muestras distintas.

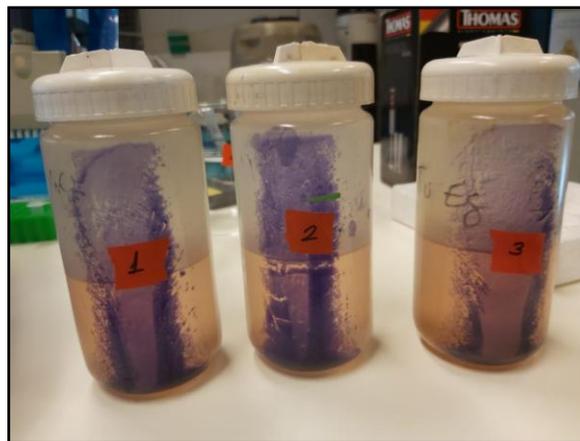


Figura 26: Pellet de tres muestras distintas obtenidos tras centrifugación en precipitación con sulfato de amonio con saturación al 60 %.

Por otra parte, se obtuvo un alto nivel de precipitación de ficobiliproteínas en solución tras la saturación al 60% con sulfato de amonio, como puede verse en la Figura 25, donde existe una disminución significativa en la coloración del sobrenadante obtenido. Además, como se muestra

en la Figura 26, el método resulta efectivo para la precipitación de estos pigmentos obteniendo los pellets tras la centrifugación. Estos resultados coinciden con lo apreciado en la Figura 27, ya que no se aprecian picos a las longitudes de onda en las que absorben las ficobiliproteínas tras la saturación al 60 %, desapareciendo casi en su totalidad el espectro. Se desconoce el efecto que pueda tener en sulfato de amonio en el barrido de longitudes de onda, sin embargo, la falta de coloración en la muestra se condice con la disminución de la absorbancia en el espectro, en el cual se alcanzan valores de cercanos a 0 del rango visible.

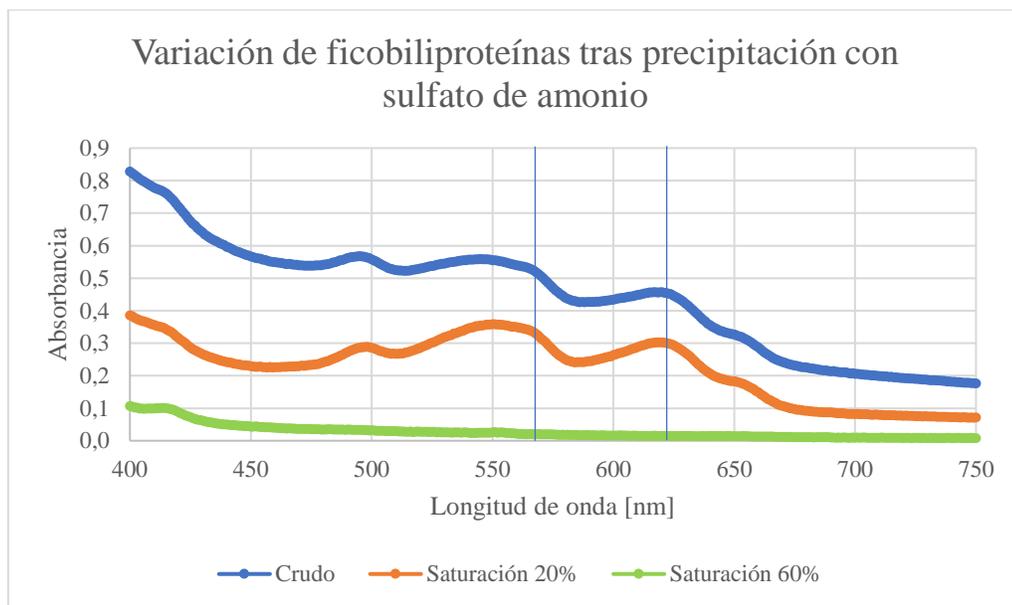


Figura 27: Espectrograma de luz visible (promedio a partir de tres muestras) de extracto de ficobiliproteínas crudo, sobrenadante de precipitación con sulfato de amonio con saturación de 20 % de sulfato de amonio, y sobrenadante de precipitación con sulfato de amonio con saturación de 60 % (máximo de absorción de ficoeritrina y ficocianina a longitud de onda de 565 y 620 nm).

Las bandas de longitud de onda son determinadas a partir del promedio de tres barridos de tres muestras distintas, cuyo detalle se puede ver en el Anexo H, donde existe diferencia en el nivel de ficobiliproteínas de cada extracto. Esta diferencia puede darse por el contenido específico de ficobiliproteínas que puede tener cada muestra de alga, que puede ser variable, al no ser homogéneas las muestras utilizadas, además del alto nivel de impurezas que presentaban. Por otro lado, no se observan cambio en las longitudes de onda a las que se observan picos de absorbancia para determinar la presencia de ficobiliproteínas.

En la Tabla 9 se muestra el rendimiento de extracción de ficobiliproteínas en las tres muestras distintas, calculadas mediante la ecuación propuesta por Beer. Estos valores exhiben cierta variabilidad, que puede deberse a la extracción a partir de distintas muestras de alga. Por otro lado, comparando con valores obtenidos en otros tipos de algas rojas, como se puede ver en la Tabla 1, se obtienen valores inferiores en el caso de ficoeritrina y similares en el caso de ficocianina, a pesar de que las muestras de algas corresponden a un periodo de cosecha de invierno, lo que podría tener un factor positivo en la concentración [28].

Tabla 9: Rendimiento de extracción de ficoeritrina (\*) y ficocianina (\*\*) en muestras de extracto crudo de extracción de ficobiliproteínas, expresado en miligramo de proteínas por gramo de alga seca.

	Muestra			
Ficobiliproteína	1	2	3	Promedio + DE
<i>R-PE*</i> [mg/g]	0,141	0,203	0,234	<b>0,193 ± 0,04</b>
<i>R-PC**</i> [mg/g]	0,154	0,188	0,202	<b>0,181 ± 0,02</b>

Uno de los principales factores que pueda limitar la liberación de un mayor contenido de proteínas hacia el medio podría ser la falta de agitación durante el periodo de reposo tras la lisis celular, lo cual mantendría un gradiente mayor con el exterior facilitando la difusión. Durante estos experimentos, las algas quedaban precipitadas en el fondo del vaso precipitado, siendo ocasionalmente agitado, al igual que en las pruebas preliminares.

Otros factores que pudieron haber afectado en el proceso, y no fueron evaluados, corresponde a la etapa de secado al cual fue sometida la muestra de alga y el pH durante la extracción, que como muestran estudios sobre extracción de ficobiliproteínas, pueden ser influyentes [14] [21]. Estos factores pueden ser considerados para futuros trabajos.

Se descartó el método de medición de proteínas a través de ensayos de Bradford, debido a que las concentraciones de proteína determinadas inicialmente por este método se encontraban en un rango de medición bajo comparado con las concentraciones conocidas, siendo difíciles de determinar presentando alta variabilidad en los resultados. Es por esto que se optó por el cálculo a través de ecuaciones propuestas por bibliografía, ampliamente utilizadas en estudios relacionados al tema. Sin embargo, estas ecuaciones pueden ser utilizadas solamente para extractos crudos, como se especifica en el desarrollo de Beer.

Se intentó determinar la concentración de ficobiliproteínas utilizando las ecuaciones de Beer en el sobrenadante tras la precipitación con sulfato de amonio con una saturación del 20 %. Se esperaba que las concentraciones determinadas fueran similares a los registrados para el extracto crudo, sin embargo, los resultados obtenidos mostraron mayor concentración de ficobiliproteínas tras la precipitación con sulfato de amonio (detalle en Anexo H). Esto resulta inconsistente, ya que tras la etapa de precipitación la concentración de ficobiliproteína debiese mantenerse constante o disminuir, considerando que el volumen se mantiene constante. Cabe mencionar que los blancos utilizados para las distintas mediciones contemplaban el contenido de sulfato de amonio en las muestras.

De acuerdo a los antecedentes de literatura, el método de Bradford es afectado por la presencia de sal en la solución de proteínas. Se ha visto que afecta las curvas de calibración con albúmina de suero bovino (BSA), produciendo interferencia en los resultados determinados por espectrofotometría a 595 nm [58]. Fenómenos de este tipo podrían ocurrir con el sobrenadante de ficobiliproteínas con restos de sulfato de amonio, sin embargo, no hay conocimiento del tema, por lo que podría evaluarse.

#### 4.1.4. Intercambio iónico

Para continuar con la purificación, se realizó una cromatografía por intercambio aniónico. Por datos bibliográficos se asume que el punto isoeléctrico de la proteína se encontraba en torno a los valores

de 4 y 5,5, por lo que se decide realizar cromatografías con un buffer de carga y pH de la muestra por sobre el valor de 5,5.

Se realizó una prueba preliminar utilizando una columna empacada con la resina DEAE-Sepharose® Fast Flow ambientada a pH 5, a la cual se le inyectó una muestra de extracto de ficobiliproteínas con pH 4, dializada tras precipitarlas con sulfato de amonio con una saturación del 60%. Como resultado, la mayor parte de la muestra fue eluida durante la inyección y el lavado de columna previo a la inducción de un gradiente. El pH de la muestra obtenida tras la diálisis pudo estar en torno al punto isoeléctrico, o menor a este, lo que es coherente con los valores indicados por literatura, situándolo entre un pH 4 y 5,5. Tras esto se decidió para futuros experimentos utilizar un buffer de carga y pH de la muestra sobre 5,5, con el propósito cargar las ficobiliproteínas con una carga contraria a la de la columna y así de tener una mayor adsorción a esta.

Para las cromatografías realizadas posteriormente se monitoreó la absorbancia a las longitudes de onda de 280, 560 y 610 nm, para observar el comportamiento a lo largo de la cromatografía de proteína total, ficoeritrina y ficocianina respectivamente. Luego, a partir de estos datos, es posible determinar el índice de pureza para cada proteína, cuyo valor se determina a partir de la relación entre la absorbancia a 560 nm y 280 nm en el caso de ficoeritrina, y 610 nm y 280 en el caso de la ficocianina.

A lo largo de las etapas previas de purificación existía variabilidad en cuanto a la cantidad de ficobiliproteína obtenida por muestra. Además, en cada cromatografía se debió utilizar distintos extractos debido a que la cantidad de muestra disponible de un solo extracto no alcanzaba para realizar todas las pruebas deseadas. Por otro lado, la concentración de ficobiliproteínas que tenían las muestras se alteró tras la dilución para el ajuste de pH. Es por esto que no fue posible comparar directamente la concentración de ficobiliproteína de las distintas fracciones entre una cromatografía y otra. Sin embargo, ya que el propósito de las cromatografías realizadas consistía en comprobar su efectividad y determinar la mejor condición de pH del buffer de carga, por lo que se realiza el análisis en base al nivel de pureza de ficobiliproteínas obtenido.

Se comparó de eficiencia entre dos tipos de resina, que corresponden a Q-Sepharose® y DEAE-Sepharose® Fast Flow, ambas aniónicas, de las cuales se tienen antecedentes de haber sido utilizadas en este tipo de procesos. Se puede observar en la Figura 28 y Figura 29 los resultados obtenidos para Q-Sepharose® y DEAE-Sepharose® Fast Flow respectivamente, utilizando en ambos casos buffer fosfato 0,025 M, pH 5,5 como buffer de carga, y fosfato 0,025 M, pH 5,5 NaCl 0,5 M para la elución mediante un gradiente lineal. Con ambas se observan comportamientos similares, con la presencia de tres picos importantes de absorbancia a una longitud de onda de 280 nm, el primero durante la inyección de la muestra, el segundo al 40 % del gradiente lineal y el último al 70 % del gradiente lineal. De esos picos coinciden con picos de absorbancia observados a una longitud de onda de 560 y 610 nm, uno durante la inyección de muestra y el otro a 40 % de gradiente de sal, siendo este último más grande y con mayor índice de pureza. A partir de este resultado se determinó que es factible purificar mediante este método, ya que es posible obtener fracciones con un mayor valor de relación ficobiliproteínas sobre proteína total en comparación a la muestra inicial.

Por otro lado, se determinó el índice de pureza de cada proteína de cada pico observado, cuyo detalle se encuentra en la Tabla 10 y Tabla 11 para ficoeritrina y ficocianina respectivamente. En el Anexo I se representa el índice de pureza que tienen las proteínas de interés a lo largo de todo el proceso cromatográfico en DEAE-Sepharose® Fast Flow y Q-Sepharose® a los distintos pHs

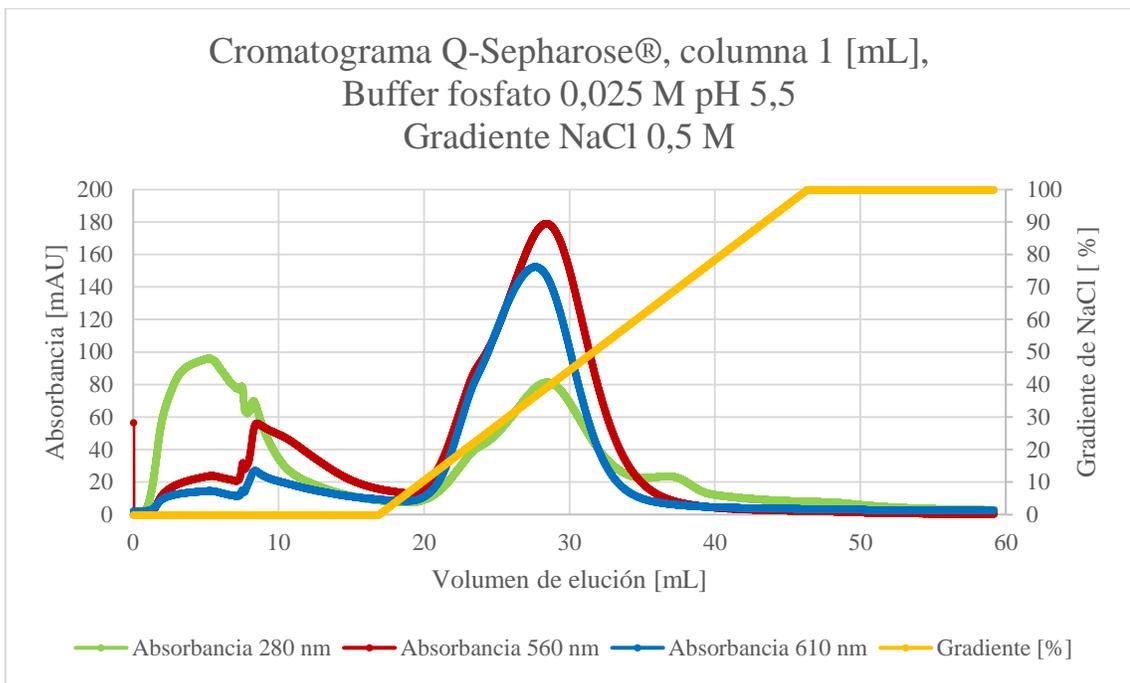
utilizados. Se puede observar que durante la carga de la muestra a la columna (entre los volúmenes de elución (Ve) 0 y 7 mL), ambas ficobiliproteínas monitoreadas presentan mayor adsorción en Q-Sepharose® que en DEAE-Sepharose® Fast Flow, eluyendo una mayor cantidad de ficoeritrina en esta última. A partir de estos resultados se determinó que resulta mejor para el proceso el uso de Q-Sepharose®. Sin embargo, en ambas resinas el índice de pureza para las ficobiliproteínas durante la elución de aquellas que fueron adsorbidas alcanza valores similares.

Dado que el pH del buffer utilizado influye en la carga que presente la resina, y con eso el nivel de adsorción que puedan tener las distintas proteínas o compuestos de acuerdo a sus propiedades, se realizan pruebas a tres distintos pHs (5,5, 6,5 y 7,5), esperando que a pH 5,5 se tuviera un mayor nivel de elución de proteínas contaminantes durante el periodo de carga de la muestra y el primer lavado, por la posible presencia de proteínas del alga funcionales a pH fisiológico. El propósito fue determinar el pH del buffer a utilizar para perder la menor cantidad de ficobiliproteínas al momento de la carga de la muestra. La meta fue que quedara la mayor cantidad de ficobiliproteína adsorbida, y así poder alcanzar un mayor nivel de pureza mediante separación con un gradiente salino para eluir las ficobiliproteínas del resto de los componentes contaminantes, registrando a qué concentración de sal se lograba dicho comportamiento.

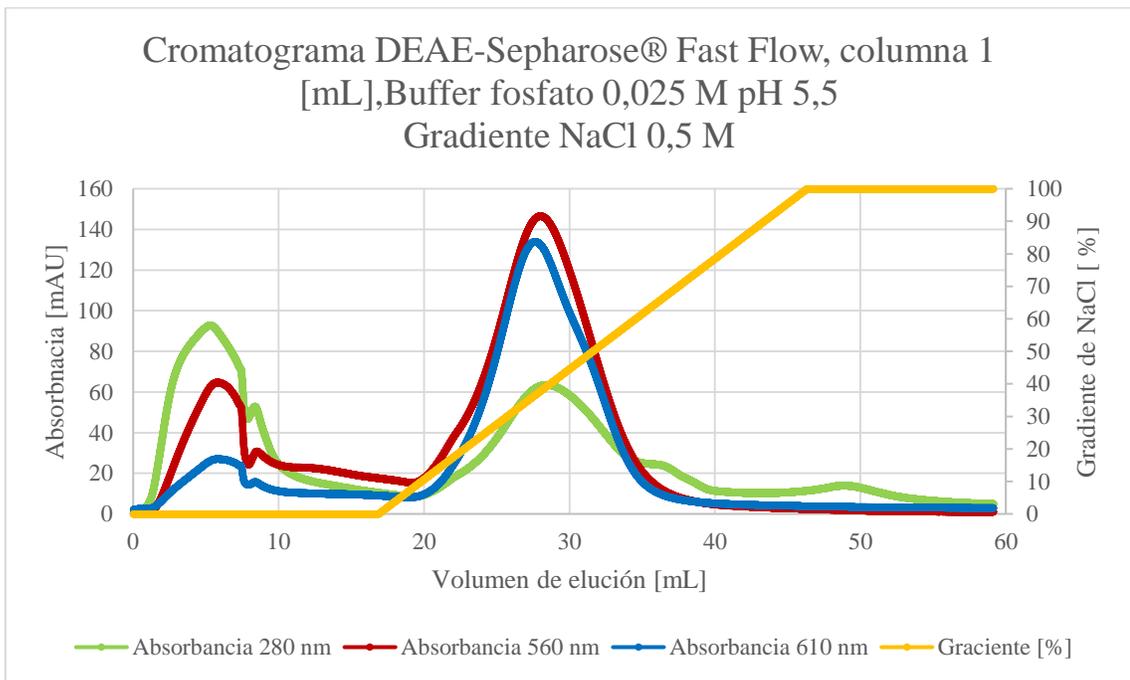
Comparando los resultados obtenidos a distintos pHs para Q-Sepharose®, los índices de pureza mostrados en la Tabla 10 y Tabla 11 indican que a pH 5,5 se tiene una menor adsorción de ficobiliproteínas, teniendo una alta cantidad de ficoeritrina y ficocianina eluida durante la carga de la muestra a la columna (Ve 0-7 mL). Esto puede deberse a la cercanía entre el pH de operación y punto isoeléctrico de estas proteínas. Además, en la cromatografía a pH 5,5, durante el lavado de la columna con buffer previo a la elución se continúa eliminando una gran cantidad de proteínas, lo que se puede observar entre los Ve 7 y 17 mL en los cromatogramas de la Figura 28 y Figura 29 de Q-Sepharose® y DEAE-Sepharose® respectivamente.

Los índices de pureza de ficoeritrina de la Tabla 10 que se obtienen al utilizar distintos pHs de operación, no presentan una tendencia clara alcanzando valores entre 2,1 y 2,8. Estos resultados que son menores a los documentados en experimentos realizados con otras especies de *Gracilaria* sp. mostrados en la Tabla 5, que se encuentran entre 4 y 6 para muestras purificadas mediante cromatografías de intercambio iónico. El mayor valor de índice de pureza de ficoeritrina es alcanzado utilizando buffer a pH 7,5, y para ficocianina utilizando buffer a pH 6,5.

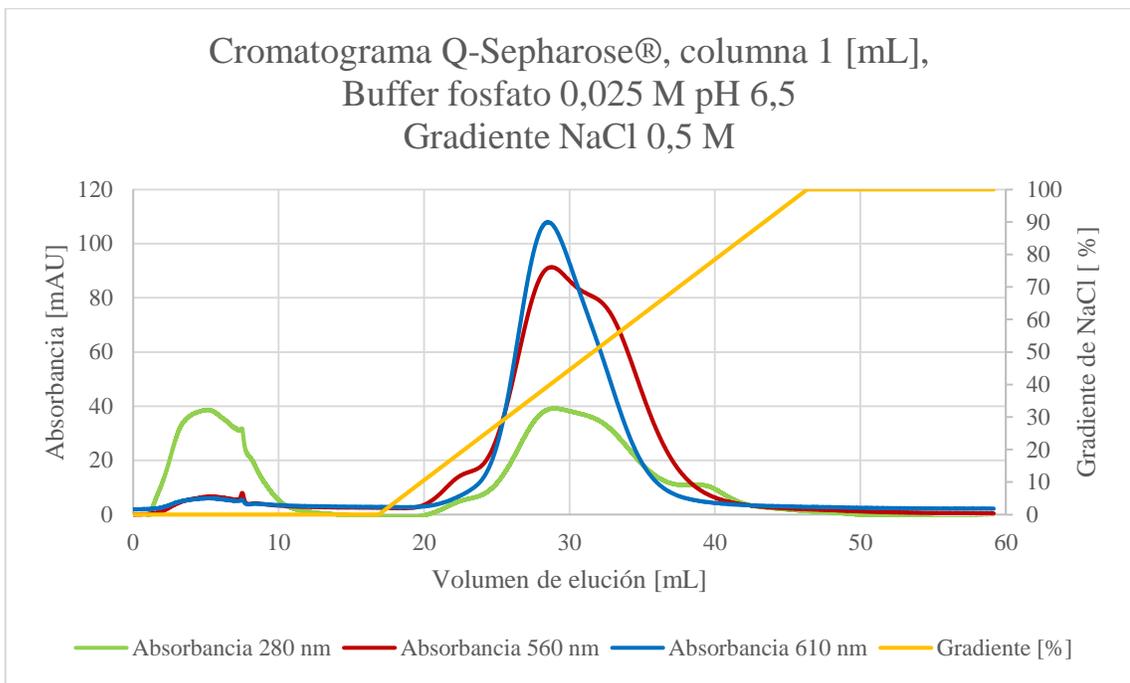
Se puede observar en los distintos cromatogramas (Figura 28, Figura 29, Figura 30, Figura 31) que las ficobiliproteínas monitoreadas eluyen dentro de un amplio rango del gradiente de sal aplicado, partiendo desde el 10 % y terminando cercano al 60 %, utilizando pH 5,5 y 6,5, mientras que en pH 7,5 termina cerca del 70 %. Este comportamiento podría deberse a una alta concentración de ficobiliproteínas adheridas a la resina, las que requerirían de un mayor volumen para eluir en su totalidad. Se podrían aumentar los volúmenes de columna (CVs) utilizados para la elución, de tal forma de determinar de mejor forma si se puede realizar una separación más definida, y en un rango más acotado, de las proteínas observando si existe una separación de los picos obtenidos.



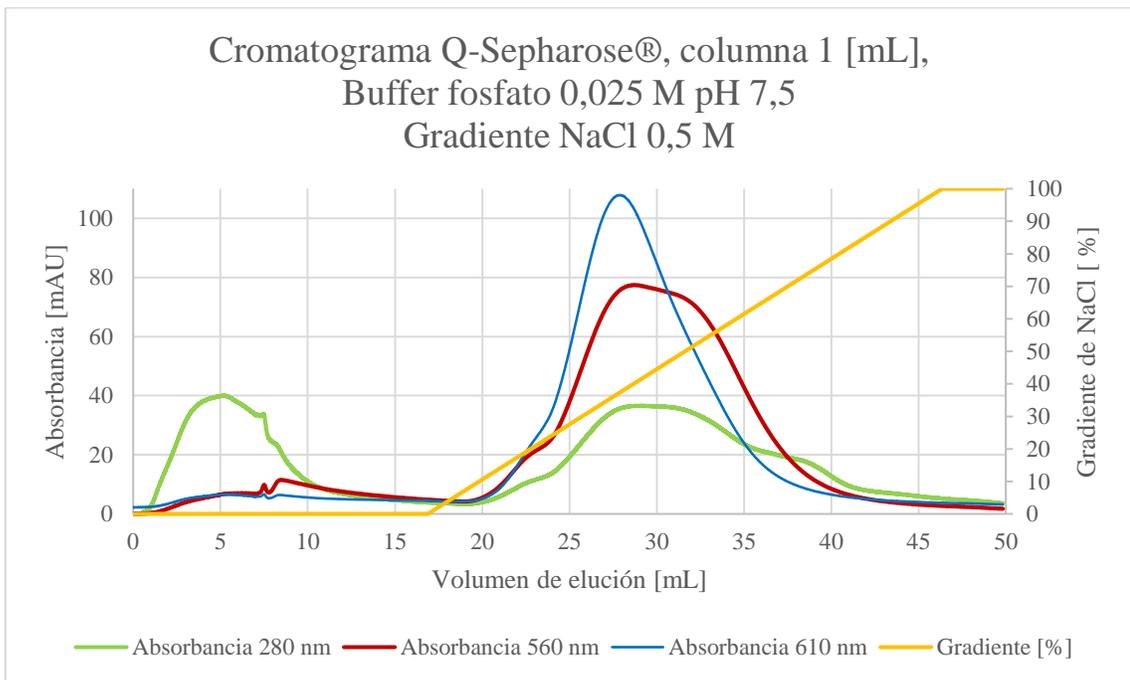
*Figura 28: Cromatograma de proceso de intercambio aniónico de muestra de extracto de ficobiliproteínas dializado tras precipitación con sulfato de amonio al 60% de saturación, en columna de 1 mL empacada de resina Q-Sepharose®, cargada con buffer fosfato 0,025 M, pH 5,5. Elución con gradiente lineal de buffer fosfato 0,025 M, pH 5,5 NaCl 0,5 M. Se monitorea absorbancia a 280, 560 y 610 nm.*



*Figura 29: Cromatograma de proceso de intercambio aniónico de muestra de extracto de ficobiliproteínas dializado tras precipitación con sulfato de amonio al 60% de saturación, en columna de 1 mL empacada de resina DEAE-Sepharose® Fast Flow, cargada con buffer fosfato 0,025 M, pH 5,5. Elución con gradiente lineal de buffer fosfato 0,025 M, pH 5,5 NaCl 0,5 M. Se monitorea absorbancia a 280, 560 y 610 nm.*



*Figura 30: Cromatograma de proceso de intercambio aniónico de muestra de extracto de ficobiliproteínas dializado tras precipitación con sulfato de amonio al 60% de saturación, en columna de 1 mL empacada de resina Q-Sepharose®, cargada con buffer fosfato 0,025 M, pH 5,5. Elución con gradiente lineal de buffer fosfato 0,025 M, pH 6,5 NaCl 0,5 M. Se monitorea absorbancia a 280, 560 y 610 nm.*



*Figura 31: Cromatograma de proceso de intercambio aniónico de muestra de extracto de ficobiliproteínas dializado tras precipitación con sulfato de amonio al 60% de saturación, en columna de 1 mL empacada de resina Q-Sepharose®, cargada con buffer fosfato 0,025 M, pH 5,5. Elución con gradiente lineal de buffer fosfato 0,025 M, pH 7,5 NaCl 0,5 M. Se monitorea absorbancia a 280, 560 y 610 nm.*

Tabla 10: Índice de pureza de ficoeritrina (Absorbancia 560/Absorbancia 280) para distintos pHs de carga utilizando buffer fosfato 0,025 M. (\*) la aparición del último pico observado se encuentra desplazado a 39 [mL].

Resina de intercambio y carga	Volumen de elución			
	5 [mL] (inyección)	23 [mL] (elución 20 %)	27 [mL] (elución 40 %)	38 [mL] (elución 70 %)
<b>Q-Sepharose® Buffer pH 5,5</b>	0,25	2,2	2,24	0,38
<b>Q-Sepharose® Buffer pH 6,5</b>	0,16	1,73	2,16	0,5*
<b>Q-Sepharose® Buffer pH 7,5</b>	0,16	1,83	2,85	0,66*
<b>DEAE- Sepharose® Fast Flow Buffer pH 5,5</b>	0,75	2,2	2,38	0,37

Tabla 11: Índice de pureza de ficocianina (Absorbancia 610/Absorbancia 280) para distintos pHs de carga utilizando buffer fosfato 0,025 M. (\*) la aparición del último pico observado se encuentra más desplazado.

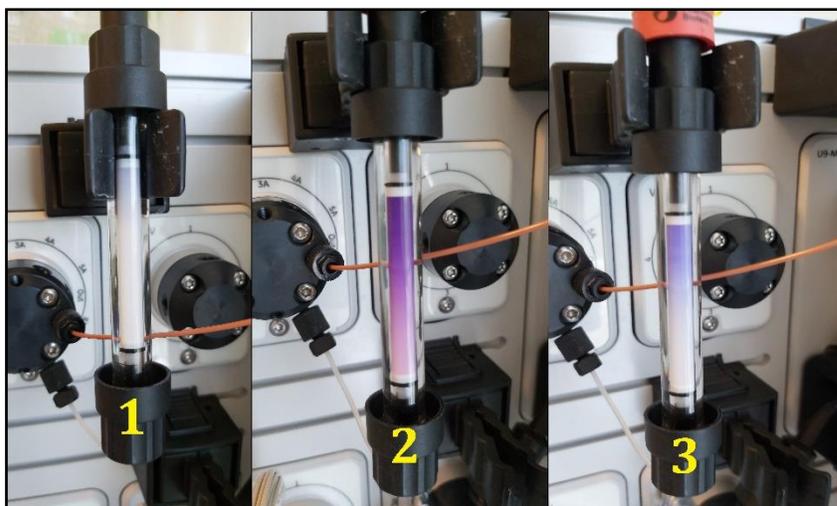
Resina de intercambio y carga	Volumen de elución			
	5 [mL] (inyección)	23 [mL] (elución 20 %)	27 [mL] (elución 40 %)	38 [mL] (elución 70 %)
<b>Q-Sepharose® Buffer pH 5,5</b>	0,15	1,98	2,06	0,28
<b>Q-Sepharose® Buffer pH 6,5</b>	0,14	0,95	2,53	0,33*
<b>Q-Sepharose® Buffer pH 7,5</b>	0,15	1,99	2,11	0,44*
<b>DEAE-Sepharose® Fast Flow Buffer pH 5,5</b>	0,27	1,67	2,23	0,37

Con el propósito de determinar si era posible eluir las ficobiliproteínas en un solo pico, se realizó una cromatografía de intercambio iónico utilizando un gradiente escalonado, con 20 %, 40 % y 100 % de gradiente, con 15 volúmenes de columna para cada valor, suficiente para poder eluir la mayor cantidad de proteínas, es decir, hasta que el pico obtenido descendiera completamente. Esto se realizó en Q-Sepharose®, con un buffer fosfato 0,025 M, pH 5,5, obteniendo el cromatograma que se encuentra en Anexo J, junto con el índice de pureza obtenido a lo largo de todo el proceso.

Mediante en gradiente escalonado, se obtuvo una elución de ficobiliproteínas al 20 % y otro al 40 % del gradiente, ambos de magnitud similar como se muestra en el Anexo J, con una concentración de ficoeritrina y ficocianina similar en ambos casos. Estos resultados indican que, a pesar de aplicar un gradiente escalonado, no es posible eluir todas las ficobiliproteínas bajo un único porcentaje de saturación de sal. El pico observado durante la elución con gradiente lineal agrupa ambos picos observados en la cromatografía con gradiente escalonado. En este caso, en ambos picos mencionados, se obtiene un índice de pureza similar a los obtenidos en las cromatografías aplicando gradiente lineal.

Esta prueba para un futuro podría realizarse mediante la aplicación de un gradiente escalonado aumentando un 10 % cada 15 volúmenes de columna, asegurando que pueda eluir toda la proteína posible con cada escalón, para determinar con mayor precisión la concentración de sal necesaria para la elución. De igual forma, en futuras pruebas, dado que la columna no presentó problemas de presión durante la operación, podría aumentarse el flujo de buffer que pasa a través de la columna, de tal forma de disminuir los tiempos de proceso de ser necesario.

Por otro lado, no fue posible tener una limpieza completa de la columna de intercambio iónico a pesar de hacer pasar el buffer de elución al 100 % del gradiente, es decir 0,5 M de NaCl, tomando en cuenta que las ficobiliproteínas comienzan una elución al 10 % según lo observado. Esto fue detectado con la presencia de color en la resina una vez finalizado del proceso, como se puede observar en la Figura 32. Se debió hacer pasar una solución de hidróxido de sodio 1 M para limpiar la columna completamente, pudiendo eluir el resto de las proteínas que se encontraban en esta, cuyas fracciones se encontraban teñidas de ficobiliproteínas. Se desconoce la razón por la que las ficobiliproteínas se mantienen adheridas con tanta fuerza a la resina.



*Figura 32: Columna empacada con 1 mL de Q-Sepharose® 1 utilizada en proceso de intercambio iónico. (1) columna limpia previo a la inyección de la muestra, (2) columna con ficobiliproteínas adheridas tras inyección de muestra, (3) columna con restos de proteínas posterior a la elución aplicado 100 % del gradiente de NaCl.*

En las fracciones obtenidas tras la elución durante el gradiente, se observa la presencia de ambas proteínas, las cuales no lograron ser separadas en fracciones diferentes, ya sea utilizando un gradiente lineal o un gradiente escalonado. Igualmente, mediante la precipitación con sulfato de amonio, no se logró obtener ficobiliproteínas en puntos de saturación diferentes. Es posible que las proteínas se encuentren unidas una a la otra, en forma similar a cómo se encuentran en los ficobilisomas de los tilacoides [10].

#### **4.1.5. Análisis electroforético de pureza de ficobiliproteínas en fracciones de cromatografía**

Ya que en todas las cromatografías realizadas el comportamiento de adsorción y elución de las ficobiliproteínas es similar, el análisis también lo será en lo observado en los geles de poliacrilamida hechos para determinar la pureza de estas proteínas.

En la Figura 33, Figura 34 y Figura 35 se muestran los geles de poliacrilamida con el desplazamiento tras la electroforesis de las fracciones obtenidas en las cromatografías en Q-Sepharose® utilizando buffer fosfato 0,025 M con pH 5,5, 6,5 y 7,5 respectivamente.

El primer carril de izquierda a derecha de cada gel corresponde al estándar de pesos moleculares, y en el segundo carril una muestra cargada, que corresponde a extracto de ficobiliproteína dializado tras precipitación con sulfato de amonio con saturación al 60 %. El resto de los carriles corresponden a las fracciones de la cromatografía correspondientes a los picos a 280, 560 y 610 nm, siendo el carril 3 y 4 fracciones obtenidas tras la inyección, es decir, proteínas no adsorbidas, los carriles 5, 6, 7 y 8 fracciones dentro del pico observado entre 10 % y 60 % del gradiente de sal, y los carriles 9 y 10 del último pico observado de menor envergadura cercano al 70 % de saturación.

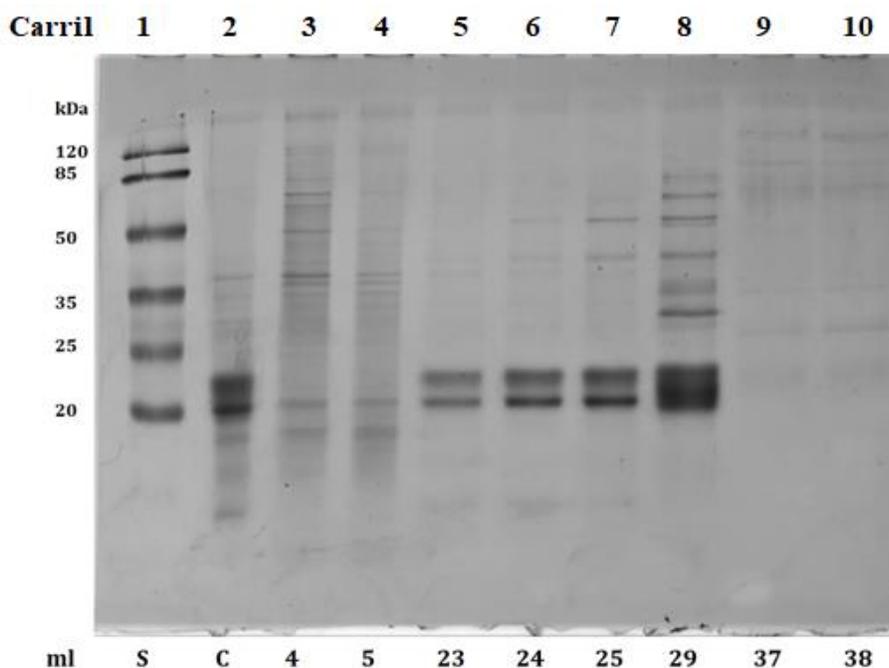


Figura 33: Gel de poliacrilamida para electroforesis de fracciones obtenidas en cromatografía con resina Q-Sepharose® utilizando buffer fosfato 0,025M, pH 5,5, y un gradiente lineal de NaCl. Eje vertical: pesos moleculares de bandas de estándar. Eje horizontal: fracciones (volúmenes de elución) de cromatografía utilizadas (S: estándar de pesos moleculares; C: muestra de proteína inyectada).

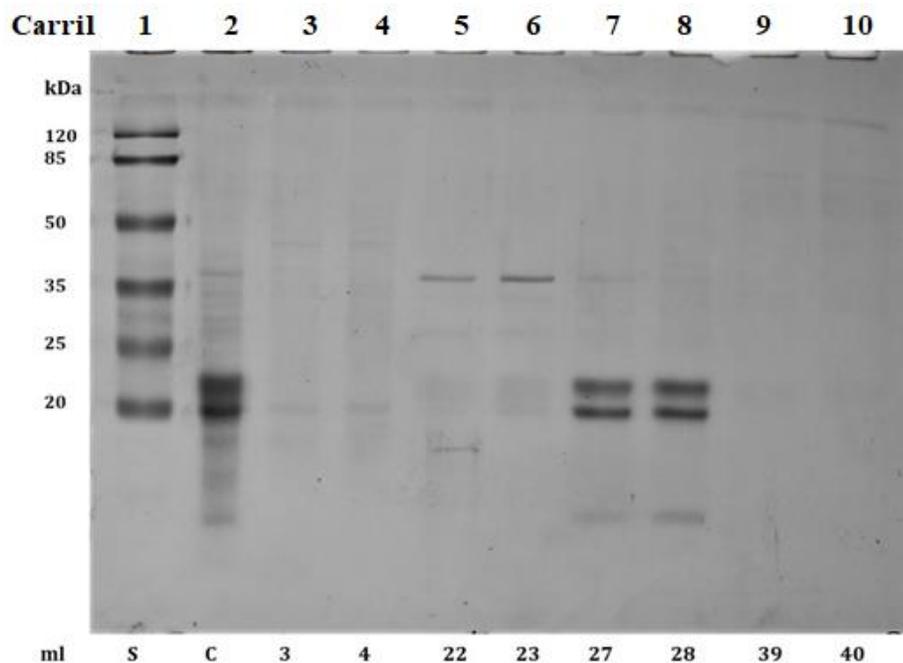


Figura 34: Gel de poliacrilamida para electroforesis de fracciones obtenidas en cromatografía con resina Q-Sepharose® utilizando buffer fosfato 0,025M, pH 6,5, y un gradiente lineal de NeCl. Eje vertical: pesos moleculares de bandas de estándar. Eje horizontal: fracciones (volúmenes de elución) de cromatografía utilizadas (S: estándar de pesos moleculares; C: muestra de proteína inyectada).

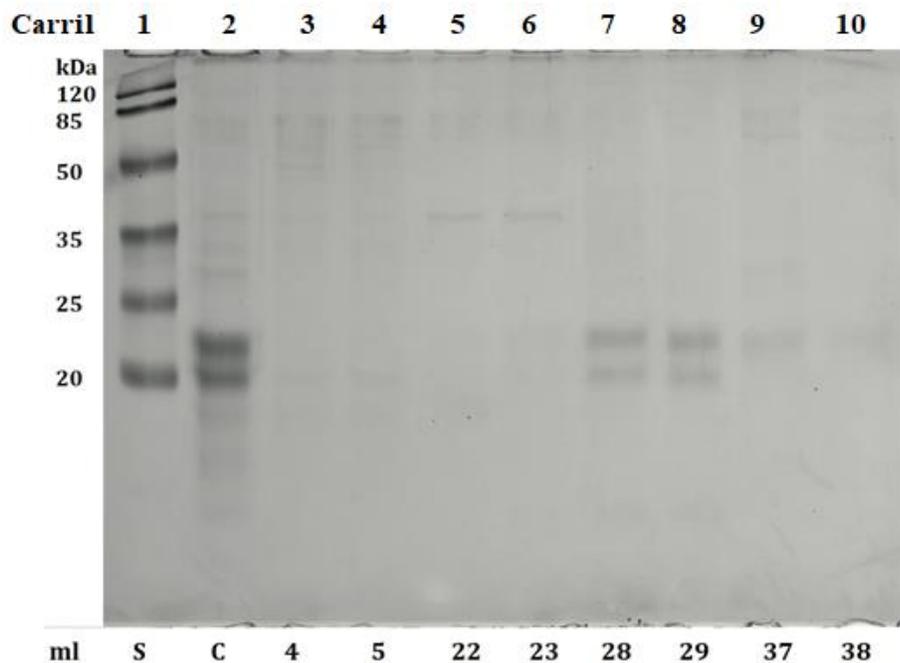


Figura 35: Gel de poliacrilamida para electroforesis de fracciones obtenidas en cromatografía con resina Q-Sepharose® utilizando buffer fosfato 0,025M, pH 7,5, y un gradiente lineal de NeCl. Eje vertical: pesos moleculares de bandas de estándar. Eje horizontal: fracciones (volúmenes de elución) de cromatografía utilizadas (S: estándar de pesos moleculares; C: muestra de proteína inyectada).

Es posible observar bandas gruesas con pesos moleculares relativos a 20 y 22 kDa que, en base a los antecedentes recopilados para otras especies del mismo género, podrían corresponder a las

subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente de las ficobiliproteínas de *Agarophyton chilense*. Estas bandas son de mayor intensidad que las observadas en el resto del gel, y se logran apreciar tanto en el segundo carril como en los carriles que poseen las fracciones del pico con mayor índice de purificación a lo largo de la cromatografía (similar en todas las cromatografías realizadas con buffers a distinto pH), es decir, aquellos entre los carriles del 5 al 8, como se puede observar en la Figura 33, Figura 34 y Figura 35. También es posible observar una banda que presenta un peso molecular relativo a los a los 30 kDa, que puede apreciarse con mayor claridad en la Figura 33, octavo carril, que podría corresponder a la subunidad  $\gamma$  que mantiene unidos los hexámeros en ficoeritrina.

Se observa la presencia de distintas bandas a distintos pesos moleculares en la mayoría de los carriles en todas las cromatografías realizadas, teniendo bandas poco intensas en los carriles 3, 4, 9 y 10 entre los pesos moleculares de 20 y 25 kDa, lo que indicaría que en estas fracciones no se eluye una cantidad significativa de ficobiliproteínas, comparando con el resto de los carriles, cuya intensidad se condice con los altos índices de pureza obtenidos en esas fracciones durante las cromatografías.

Por otro lado, es posible observar que la proteína obtenida en aquellas fracciones que se encuentran enriquecidas en ficobiliproteínas y presentan un mayor índice de pureza (5, 6, 7 y 8), no se encuentran ficobiliproteínas completamente puras, existiendo más bandas tenues de distintos pesos moleculares que no corresponderían a las subunidades presentes en ficoeritrina o ficocianina.

Con los resultados observados en los geles, se puede determinar que existe un grado de purificación de ficobiliproteínas, al tener fracciones de proteína con baja presencia de estas proteínas, y presencia de bandas de otros pesos moleculares.

En Anexo K se presentan los resultados de la electroforesis en geles de poliacrilamida de muestras obtenidas en la cromatografía utilizando DEAE-Sepharose® Fast Flow como resina catiónica, y en la cromatografía en la que se utilizó un gradiente de sal escalonado con distintas concentraciones de sal. En estos se observan resultados con la misma tendencia, con alta adhesión a la columna y con presencia de bandas intensas a pesos moleculares relativos a 20 y 22 kDa para las fracciones entre 10 y 60 % de saturación de sal.

## **4.2. Extracción de agar**

### **4.2.1. Acondicionamiento de parámetros de extracción**

Para el establecimiento de las etapas y condiciones de operación a utilizar para la extracción de agar, se realizaron pruebas de extracción de agar utilizando 10 g de alga seca como base. Se determinó la importancia de mantener la solución en ebullición para solubilizar el agar de mejor manera. De igual forma resulta importante mantener un pH neutro durante la cocción, ya que en muestras cuyo pH no era ajustado en ese rango, no se logró la extracción y solubilización del agar.

Otra complejidad que presenta el proceso es a la filtración que se debe realizar luego de la extracción del agar en agua hirviendo, ya que resultó difícil encontrar el método que permitiera ejercer la presión necesaria para que la solución permeara a través de la gasa dada la alta viscosidad de la mezcla de agar disuelto en agua. Se probó la utilización de una bomba de vacío en un sistema de filtración, sin embargo, no se generaba el vacío suficiente para poder permear toda la solución, gelificando la solución antes de que pudiera seguir el proceso. Se debe disponer de un sistema que aplique la presión suficiente para que el agar pueda permear a través del filtro.

Por otra parte, se determinó que la agitación durante la etapa de cocción es de gran importancia, debido a que, si la solución no se homogenizaba, la sección superior gelificaba, produciéndose un sistema a presión hacia la sección inferior de la solución, adhiriéndose y quemándose parte del material algal en el fondo del recipiente por la gran cantidad de calor que recibe.

#### 4.2.2. Pruebas preliminares de extracción

En pruebas preliminares se realizaron extracciones de agar a partir de 10 g de alga seca suspendidos en 200 mL de agua destilada durante la cocción, la cual se realizó durante 1 hora a una temperatura de 85 °C. La principal limitación que se presentó para realizar el proceso por más tiempo fue que a que a se aumentaba la evaporación de agua a medida que transcurría el tiempo, aumentando la viscosidad de la solución y dificultando su agitación.

Se realizan extracciones de agar para tres muestras con extracción previa de ficobiliproteínas y tres sin extracción previa, cuyos rendimientos obtenidos se muestran en la Tabla 12. Estos resultados no muestran una diferencia significativa entre los rendimientos obtenidos, tendiendo para ambos casos al 15 %. Dados los bajos rendimientos obtenidos durante estas pruebas preliminares, considerando un rango típico de entre 20 y 30 % este tipo de especie, y la necesidad de obtener una mayor cantidad por muestra para realizar análisis de calidad (mínimo 2 g), se decidió aumentar la cantidad de alga a procesar para experimentos posteriores.

Tabla 12: Rendimientos de pruebas preliminares de extracción de agar obtenido de muestras con y sin extracción previa de ficobiliproteínas.

Muestra	Rendimiento [%]	Observación
<b>Sin extracción previa de PBP</b>		
1	12,4	Solubilización incompleta, con pocos residuos tras filtración.
2	14,9	
3	15,3	
<b>Promedio</b>	<b>14.2</b>	-
<b>Con extracción previa de PBP</b>		
1	15,6	Solubilización incompleta, con pocos residuos tras filtración.
2	13,1	
3	17,5	
<b>Promedio</b>	<b>15.4</b>	-

#### 4.2.3. Pruebas definitivas de extracción

Para la extracción de agar se tomaron cuatro muestras sin extracción previa de ficobiliproteínas y cuatro con extracción previa, cuyos parámetros de operación fueron ajustados durante el proceso debido a dificultades en la filtración y solubilización.

De las cuatro muestras iniciales de 20 g que no tuvieron previa extracción de ficobiliproteínas, dos fueron suspendidas en 400 mL para la extracción. Se obtuvo que en un tiempo de una hora y media de extracción no se alcanzaba una solubilización completa del agar presente en las algas, quedando una gran cantidad de residuos retenidos en la gasa de filtración. De estas dos muestras se pudo obtener el dato del rendimiento de una sola, debido a la ruptura de la prensa metálica para filtrar la segunda muestra producto de la fuerza que se debió aplicar en esta para filtrarla. Se pudo observar que el agar obtenido de la muestra era cualitativamente de buena calidad, es decir, tenía alta

resistencia al estiramiento. Sin embargo, se optó por aumentar el tiempo de extracción a dos horas para poder solubilizar una mayor cantidad de agar, para lo cual también se debía aumentar el volumen de suspensión debido a la evaporación del agua durante el proceso.

A las dos muestras restantes a las cuales no se les había extraído ficobiliproteínas se les aumentó el volumen de suspensión a 600 mL y el tiempo de extracción a 2 horas, pudiéndose obtener una mayor solubilización de agar reduciendo la cantidad de residuos tras la filtración, esto comparado con las muestras que tuvieron menor tiempo y volumen de extracción.

Se calculó el rendimiento de extracción en base a los gramos de agar obtenido por gramo de alga seca utilizada. Los rendimientos de las últimas muestras resultaron ser mayores al obtenido comparados con la primera muestra, como se puede observar en la Tabla 13.

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{g de agar}}{\text{g de alga seca}} \times 100$$

Posteriormente, se realizó la extracción de agar en las muestras a las que se les extrajo previamente ficobiliproteínas, bajo las condiciones de dos horas de extracción en un volumen de suspensión de 600 mL. En general estas muestras tuvieron menores problemas de solubilización comparado con las que no tuvieron extracción previa de ficobiliproteínas, obteniéndose además en este caso valores ligeramente mayores en rendimiento, como se observa en la Tabla 13.

Tabla 13: Rendimientos de extracción de agar en pruebas finales con y sin extracción previa de ficobiliproteínas. Promedio\* para muestras con volumen de suspensión de 600 mL.

Muestra	Rendimiento [%]	Volumen de suspensión [mL]	Tiempo de extracción [h]	Fuerza de gel [g/cm <sup>2</sup> ]	Observación
<b>Sin extracción previa de ficobiliproteínas</b>					
1	12,25	400	1,5	-	Solubilización incompleta
2	-	400	1,5	-	Solubilización incompleta. Desperfectos en equipo de filtración
3	21,35	600	2	799	Solubilización incompleta
4	22,70	600	2	662	Solubilización completa
<b>Promedio*</b>	<b>22,03</b>	-	-	<b>731</b>	-
<b>Con extracción previa de ficobiliproteínas</b>					
1	25,65	600	2	797	Solubilización completa
2	18,35	600	2	-	Solubilización incompleta
3	23,75	600	2	864	Solubilización completa
4	25,30	600	2	519	Solubilización completa
<b>Promedio*</b>	<b>23,26</b>	-	-	<b>727</b>	-

De los resultados de la Tabla 12 y la Tabla 13, se desprende que, al usarse una mayor relación entre volumen de suspensión y de alga, se obtienen mayores rendimientos de extracción de agar. Esto puede deberse a que la difusión de agar hacia el medio era facilitada al mantener un mayor gradiente de concentración de azúcares entre el alga y la solución durante más tiempo. Por otro

lado, al estar el agar diluido en un mayor volumen su viscosidad era menor, resultado más fácil la filtración al requerirse una menor presión, además de que la gelificación demoraba más tiempo.

Se observó que rendimiento de extracción de agar se encuentra dentro de los valores reportados por literatura, como se muestra en la Tabla 4, obteniendo un promedio de 23,26 % al realizar extracción de ficobiliproteínas previamente, y 22,03 % sin extracción previa de estas. No se observó una diferencia significativa en el rendimiento al agregar una etapa previa de proteínas.

Se cree que la etapa de ruptura celular para la extracción de ficobiliproteínas pudo haber facilitado la solubilización del agar en etapas extracción de este producto. Sin embargo, algunos de los azúcares que conforman el agar, presentes en la pared celular del alga, pudieron haberse liberado hacia el medio extracelular durante la extracción de proteínas, lo cual podría cuantificarse en etapas posteriores de investigación mediante ensayos de determinación de azúcares reductores totales. También pudo haber consumo de azúcares de la pared celular del alga por parte de microorganismos contaminantes que crecían durante la extracción de ficobiliproteínas. Esto pudo haber generado disminución en el rendimiento de agar extraído en aquellas muestras con extracción previa de ficobiliproteínas.

Debe considerarse que producto de la gran cantidad de etapas de filtración requeridas, se generan pérdidas de material algal debido a la retención de este en la gasa, reduciendo así los rendimientos de obtención de agar. Al utilizar mayores volúmenes de alga se generan menores pérdidas al utilizar la misma cantidad de gasa, siendo la porción de alga retenida la misma que al utilizar un menor volumen de alga. Se puede observar en las imágenes presentes en el Anexo L el agar que es extraído y filtrado, y muestras secas.

Por otro lado, se determinó la calidad del agar mediante la fuerza de gel de las muestras utilizando un viscosímetro al disolver 3 g de agar seco en 200 mL de agua a 20°C. Como se observa en la Tabla 13, se obtiene un agar que se ajusta a los estándares de calidad en ambos casos de estudio, con valores de fuerza de gel superiores a 500 [g/cm<sup>2</sup>] para todas las muestras [24]. Se obtuvo una fuerza de gel promedio de 727 y 731 [g/cm<sup>2</sup>] para muestras con y sin extracción previa de ficobiliproteínas respectivamente, similares a los reportados en de procesos similares, como se muestra en la Tabla 7 con valores de 750 [g/cm<sup>2</sup>]. No se observa una tendencia clara para determinar si la extracción de proteínas afecta la calidad del agar, ya que se alcanzó cifras similares en ambos casos.

## 5. Conclusiones

Fue posible diseñar un protocolo de extracción y purificación de ficobiliproteínas a partir de *Agarophyton chilense* a escala de laboratorio, probando su eficiencia y determinando su pureza mediante ensayos de espectrofotometría y electroforesis. Este protocolo incluía diseñar e implementar la extracción de agar para muestras con extracción previa de ficobiliproteínas a nivel de laboratorio.

Se logró diseñar un método de extracción de ficobiliproteínas considerando los resultados de pruebas preliminares realizadas, las cuales indicaban aumentos en la cantidad de proteína liberada con el transcurso del tiempo en suspensión observados. Por otro lado, se determinó que las etapas de ruptura celular son métodos efectivos para aumentar la liberación de ficobiliproteínas, obteniendo mejores resultados preliminares realizando ciclos de congelamiento.

Se determina la efectividad del protocolo utilizado, logrando una extracción en promedio de 0,193 miligramos de ficoeritrina y 0,181 mg de ficocianina por gramo de alga seca, según la ecuación de Beer, que se encuentran por debajo de los encontrados en literatura, pero en el mismo orden de magnitud.

Se corrobora que la precipitación de proteínas con sulfato de amonio es método efectivo de purificación de ficobiliproteínas, determinándose para el caso de las *Agarophyton chilense* que estas precipitan dentro de un rango de saturación entre 20 % y 60 %.

También se prueba que la etapa de intercambio iónico es un método efectivo de purificación. Durante esta etapa, se observa una mayor eficiencia de adsorción de las proteínas en una resina Q-Sepharose® que en una DEAE-Sepharose® Fast Flow, y se determina que utilizando buffer de carga de pH 6,5 y 7,5 se logra mayor adsorción que para pH 5,5.

Se determinan los valores de pureza de ficobiliproteínas obtenidos tras el proceso cromatográfico mediante el cálculo de índices de pureza, los cuales resultaron ser 2,15 y 2,12 para ficoeritrina, y 2,60 y 2,83 para ficocianina utilizando pH 6,5 y 7,5 respectivamente para ambas proteínas. Estos valores que se encuentran por debajo de los encontrados por literatura.

Mediante los análisis realizados en geles de poliacrilamida, se determina la presencia de más proteínas distintas a las ficobiliproteínas en las fracciones donde se obtienen mayores índices de pureza en las cromatografías, lo que indica que no se logra una purificación total de las ficobiliproteínas.

Se plantea la posibilidad de estudiar un proceso cromatográfico de intercambio iónico utilizando un gradiente escalonado para determinar el rango ideal de aplicación de gradiente de sal que permita obtener una mayor pureza, utilizando como antecedentes los resultados obtenidos en este trabajo. Además, se sugiere la adición de una etapa de exclusión por tamaño al proceso para aumentar el índice de pureza obtenido, lo que además permitiría la separación de ficoeritrina y ficocianina.

Por otra parte, se logró diseñar un proceso de extracción de agar a partir de restos de algas provenientes de extracción de ficobiliproteínas. En base a los resultados obtenidos, se consideró que, al aumentar el volumen de suspensión en la etapa de cocción y el tiempo de extracción de agar, se logran mayores rendimientos.

Para al agar obtenido mediante el protocolo diseñado, se determina que no se existen diferencias significativas en cuanto al rendimiento de extracción en muestras con y sin extracción previa de ficobiliproteínas, alcanzando valores cercanos al 25 % de gramos de agar obtenido por gramos de alga seca iniciales en ambos casos. Los valores obtenidos pueden estar subdeterminados respecto al máximo que podría alcanzarse debido a la gran cantidad de impurezas que se encontraban en las muestras de alga seca pesada inicialmente.

Se logra determinar que independiente de la adición de una etapa de extracción de proteínas, se obtiene un agar de buena calidad, con valores de fuerza de gel por sobre los 500 [g/cm<sup>2</sup>] para muestras con y sin extracción de ficobiliproteínas.

Finalmente, se logra proponer etapas de mejora y focos de optimización para el proceso de extracción de ficobiliproteínas y agar.

## **6. Recomendaciones y focos de optimización**

### **6.1. Extracción y purificación de ficobiliproteínas**

Un parámetro importante que considerar previo al inicio del proceso consiste en la limpieza de las algas, la cual debiese ser más profunda para eliminar restos de arena y piedras previo a su secado para su almacenamiento. Con esto se pueden tener resultados exactos de cantidad de la proteína liberada por gramo de alga seca.

Otro aspecto por considerar es el almacenamiento de las muestras obtenidas para análisis y los extractos de ficobiliproteínas obtenidos en cada etapa de purificación, evitando condiciones que puedan generar una denaturación de las proteínas, con el propósito de realizar un seguimiento más certero de la cantidad de ficobiliproteínas a lo largo del proceso. Las muestras que sean recolectadas de los distintos análisis pueden ser congeladas para así evitar la denaturación de las proteínas.

Para realizar un estudio de la cinética de liberación de ficobiliproteínas desde el alga es necesario mantener una agitación constante de la muestra, lo que permita facilitar la difusión de las proteínas al medio.

Se puede realizar un análisis de la cantidad de ciclos de congelamientos óptimos para la liberación de proteínas, que considere los costos de la etapa junto con la cantidad de proteína que se logra extraer con cada ciclo. Además, puede ser evaluada la implementación de una etapa de sonicación posterior a la etapa de congelamiento.

En cuanto a la etapa de precipitación con sulfato de amonio, podrían realizarse pruebas reduciendo el rango de saturación a utilizar, ya sea desde la cota inferior o superior utilizada o ambas, y probar si se obtiene una mayor pureza en la etapa de intercambio iónico.

Como se intentó anteriormente en la etapa de intercambio iónico, sería útil realizar una cromatografía con un gradiente escalonado, aumentando gradualmente el porcentaje de gradiente utilizado, y determinar si se logra separar aún más las ficobiliproteínas del resto de compuestos presentes.

Una forma de separar una ficobiliproteína de otra, y aumentar a la vez el índice de pureza, puede ser a través de una exclusión por tamaño, procedimiento que ha demostrado ser efectivo en purificaciones realizadas utilizando otras especies como se muestra en la Tabla 5. Este método sería eficiente debido a la diferencia de peso que tienen ficoeritrina y ficocianina, siendo cercano a los 260 y 120 kDa respectivamente.

Finalmente, respecto al análisis de pureza, puede ser útil la realización de un gel sin denaturación de proteínas, tanto de las fracciones obtenidas tras la precipitación con sulfato de amonio como la de intercambio iónico, y así evaluar de acuerdo a los pesos de las proteínas observadas verificar si resulta mejor realizar en primer lugar la exclusión por tamaño o la cromatografía por intercambio iónico.

### **6.2. Extracción de agar**

Durante el proceso de extracción se perdía material algal que podía ser aporte de agar, quedando retenido en la gasa utilizada en las etapas de filtración. Puede buscarse un método o material con

el cual reducir estas pérdidas y así aumentar la eficiencia de extracción de agar, para obtener valores más seguros de la cantidad de agar que puede ser extraído.

Ya que uno de los principales objetivos de este trabajo corresponde a determinar si la extracción de ficobiliproteínas previo a la extracción de agar afecta en el rendimiento o calidad de este último, se pueden realizar ensayos para determinar la presencia de azúcares que compongan el agar en la suspensión de ficobiliproteínas obtenido tras su extracción. Del mismo modo, dado que existe una debilitación de la estructura celular del alga producto de las condiciones a las que es expuesta, se puede realizar un análisis de presencia de estos mismos azúcares en el tratamiento alcalino, y de ser así, realizar también un análisis y comparación con las muestras sin extracción previa de ficobiliproteínas.

Otro foco de optimización dentro del proceso corresponde a las condiciones en las que se realiza el tratamiento alcalino, es decir, la concentración de hidróxido de sodio y el tiempo del proceso, los cuales impactan directamente en la calidad y el rendimiento del agar según lo describe la literatura.

Finalmente, por la posible debilitación de la estructura celular como fue mencionado anteriormente durante la extracción de proteínas, podría realizarse un análisis para comprobar si la etapa de cocción para la extracción de agar requiere del mismo tiempo si no se extraen ficobiliproteínas previamente, ya que si requiriese una menor cantidad de tiempo para solubilizar el contenido completamente podría evitarse una disminución en la calidad del agar obtenido.

## 7. Bibliografía

- [1] ALVES, Celso, SILVA, Joana, FREITAS, Rafaela, PINTEUS, Susete, REBOLEIRA, João, PEDROSA, Rui y BERNARDINO, Susana. 2019. Red Algae. Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements : 375–382. 10.1016/B978-0-12-812491-8.00051-5
- [2] DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS SECTORIAL, Subsecretaría de Pesca y Acuicultura Gobierno de Chile. INFORME SECTORIAL DE PESCA Y ACUICULTURA, NOVIEMBRE 2019, ESTADÍSTICAS EXPORTACIÓN AGAR Y ALGAS [en línea] <<http://www.subpesca.cl/portal/618/w3-article-106365.html>> [consulta: 10 enero 2010].
- [3] POBLETE, Rodrigo, CORTES, Ernesto, MACCHIAVELLO, Juan y BAKIT, José. 2018. Factors influencing solar drying performance of the red algae *Gracilaria chilensis*. *Renewable Energy*. 126: 978–986. ISSN 0960-1481. 10.1016/J.RENENE.2018.04.042
- [4] CUBILLOS, Regina. 1951. El agar-agar chileno. *Revista de Biología Marina*. III: 70–88.
- [5] LEE, Wei-Kang, LIM, Yi-Yi, LEOW, Adam Thean-Chor, NAMASIVAYAM, Parameswari, ONG ABDULLAH, Janna y HO, Chai-Ling. 2017. Biosynthesis of agar in red seaweeds: A review. *Carbohydrate Polymers*. 164: 23–30. ISSN 0144-8617. 10.1016/J.CARBPOL.2017.01.078
- [6] KANNAUJIYA, Vinod K., SUNDARAM, Shanthi y SINHA, Rajeshwar P. 2017. Phycobiliproteins: Recent developments and future applications. 1–151 p. ISBN 9789811064609. 10.1007/978-981-10-6460-9
- [7] 2019. Phycobiliproteins and Their Commercial Significance. : 207–216 . 10.1016/B978-0-12-814667-5.00010-6
- [8] phycoerythrin | Sigma-Aldrich [en línea]. <[https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=phycoerythrin&interface=All&N=0&mode=match partialmax&lang=es&region=CL&focus=product](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=phycoerythrin&interface=All&N=0&mode=match%20partialmax&lang=es&region=CL&focus=product)> [consulta: 7 enero 2020].
- [9] C-Phycocyanin | Sigma-Aldrich [en línea]. <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/52468?lang=es&region=CL>> [consulta: 10 enero 2020].
- [10] VÁSQUEZ-SUÁREZ, Aleikar, LOBOS-GONZÁLEZ, Francisco, CRONSHAW, Andrew, SEPÚLVEDA-UGARTE, José, FIGUEROA, Maximiliano, DAGNINO-LEONE, Jorge, BUNSTER, Marta y MARTÍNEZ-OYANEDEL, José. 2018. The  $\gamma$ 33 subunit of R-phycoerythrin from *Gracilaria chilensis* has a typical double linked phycourobilin similar to  $\gamma$  subunit. *PLOS ONE*. 13(4): e0195656. ISSN 1932-6203. 10.1371/journal.pone.0195656
- [11] DUMAY, Justine, MORANÇAIS, Michèle, MUNIER, Mathilde, LE GUILLARD, Cécile y FLEURENCE, Joël. *Phycoerythrins*. 2014, p. 321–343. 10.1016/B978-0-12-408062-1.00011-1
- [12] GUAUS, E., TORRENT-BURGUÉS, J. y HOYO, J. *Thylakoid Membrane Bioenergetics*. *En: Encyclopedia of Interfacial Chemistry*. Elsevier, 2018, p. 529–536. 10.1016/B978-0-12-409547-2.13513-9
- [13] SENTHILKUMAR, Namasivayam, SURESH, Veeraperumal, THANGAM, Ramar, KURINJIMALAR, Chidambaram, KAVITHA, Ganapathy, MURUGAN, Pitchai y RENGASAMY, Ramasamy. 2013. Isolation and characterization of macromolecular protein R-Phycoerythrin from *Portieria*

- hornemannii. International Journal of Biological Macromolecules [en línea]. 55: 150–160. ISSN 01418130. 10.1016/j.ijbiomac.2012.12.039
- [14] TELLO-IRELAND, Cristian, LEMUS-MONDACA, Roberto, VEGA-GÁLVEZ, Antonio, LÓPEZ, Jessica y DI SCALA, Karina. 2011. Influence of hot-air temperature on drying kinetics, functional properties, colour, phycobiliproteins, antioxidant capacity, texture and agar yield of alga *Gracilaria chilensis*. LWT - Food Science and Technology [en línea]. 44(10): 2112–2118. ISSN 00236438. 10.1016/j.lwt.2011.06.008
- [15] KHAZI, Mahammed Ilyas, DEMIREL, Zeliha y DALAY, Meltem Conk. sin fecha. Evaluation of growth and phycobiliprotein composition of cyanobacteria isolates cultivated in different nitrogen sources. 10.1007/s10811-018-1398-1
- [16] GALLAND-IRMOULI, A. V., PONS, L., LUÇON, M., VILLAUME, C., MRABET, N. T., GUÉANT, J. L. y FLEURENCE, J. 2000. One-step purification of R-phycoerythrin from the red macroalga *Palmaria palmata* using preparative polyacrylamide gel electrophoresis. En: Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications [en línea]. p. 117–123. ISSN 13872273. 10.1016/S0378-4347(99)00433-8
- [17] PURVIS, Katherine, BRITTAIN, Kennedy, JOSEPH, Ariana, CISEK, Richard y TOKARZ, Danielle. 2019. Third-order nonlinear optical properties of phycobiliproteins from cyanobacteria and red algae. Chemical Physics Letters. 731. ISSN 00092614. 10.1016/j.cplett.2019.136599
- [18] CONTRERAS-MARTEL, Carlos. 2016. Resolución de la estructura terciaria de R- ficoeritrina de *Gracilaria chilensis*. 10.13140/RG.2.1.5187.8882
- [19] LI, Wenjun, SU, Hai Nan, PU, Yang, CHEN, Jun, LIU, Lu Ning, LIU, Qi y QIN, Song. Phycobiliproteins: Molecular structure, production, applications, and prospects. Elsevier Inc. 1. marzo 2019. ISSN 07349750. 10.1016/j.biotechadv.2019.01.008
- [20] BEER, Sven y ESHEL, Amram. 1985. Determining phycoerythrin and phycocyanin concentrations in aqueous crude extracts of red algae. Marine and Freshwater Research. 36(6): 785–792. ISSN 13231650. 10.1071/MF9850785
- [21] MUNIER, Mathilde, JUBEAU, Sébastien, WIJAYA, Alva, MORANÇAIS, Michèle, DUMAY, Justine, MARCHAL, Luc, JAOUEN, Pascal y FLEURENCE, Joël. 2014. Physicochemical factors affecting the stability of two pigments: R-phycoerythrin of *Grateloupia turuturu* and B-phycoerythrin of *Porphyridium cruentum*. Food Chemistry. 150: 400–407. ISSN 18737072. 10.1016/j.foodchem.2013.10.113
- [22] DENIS, Claire, MORANÇAIS, Michèle, LI, Min, DENIAUD, Estelle, GAUDIN, Pierre, WIELGOSZ-COLLIN, Gaëtane, BARNATHAN, Gilles, JAOUEN, Pascal y FLEURENCE, Joël. 2010. Study of the chemical composition of edible red macroalgae *Grateloupia turuturu* from Brittany (France). Food Chemistry. 119(3): 913–917. ISSN 03088146. 10.1016/j.foodchem.2009.07.047
- [23] CHAPTER 1 - PRODUCTION, PROPERTIES AND USES OF AGAR [en línea]. <<http://www.fao.org/3/x5822e/x5822e03.htm>> [consulta: 6 julio 2019].
- [24] EFRAÍN ANDRÉS MONTILLA-ESCUADERO1, MIRYAM FÁTIMA DULCE-RIVADENEIRA, Balkys Quevedo-Hidalgo, MARCELA MERCADO-REYES, RICARDO ÁLVAREZ-LEÓN, Jairo Napoleón Molina-Vargas5 y Alba Alicia y TRESPALACIOS-RANGEL. 2011. Efecto Del Tratamiento Alcalino Sobre La Productividad Y Las Propiedades Físicas Del Agar-Agar Proveniente De *Gracilaria verrucosa*. Bol. Invest.Mar.Cost. 40(1): 75–88.

- [25] MCLACHLAN, J. y BIRD, C. J. 1986. Gracilaria (Gigartinales, Rhodophyta) and productivity. *Aquatic Botany*. 26(C): 27–49. ISSN 03043770. 10.1016/0304-3770(86)90004-5
- [26] MENSI, Fethi. 2019. Agar yield from R-phycoerythrin extraction by-product of the red alga *Gracilaria verrucosa*. *Journal of Applied Phycology*. 31(1): 741–751. ISSN 15735176. 10.1007/s10811-018-1533-z
- [27] MARTINEZ, L. A. y BUSCHMANN, A. H. 1996. Agar yield and quality of *Gracilaria chilensis* (Gigartinales, Rhodophyta) in tank culture using fish effluents. *En: Hydrobiologia*. Kluwer Academic Publishers, p. 341–345. ISSN 00188158. 10.1007/BF00047828
- [28] MARINHO-SORIANO, E. y BOURRET, E. 2003. Effects of season on the yield and quality of agar from *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Bioresource Technology* [en línea]. 90(3): 329–333. ISSN 09608524. 10.1016/S0960-8524(03)00112-3
- [29] LIU, Ming Qiu, YANG, Xian Qing, QI, Bo, LI, Lai Hao, DENG, Jian Chao y HU, Xiao. 2013. Study of Ultrasonic-freeze-thaw-cycle assisted extraction of polysaccharide and phycobiliprotein from *Gracilaria lemaneiformis*. *En: Advanced Materials Research*. p. 1818–1824. ISBN 9783037858134. 10.4028/www.scientific.net/AMR.781-784.1818
- [30] SALURI, Mihkel, KALDMÄE, Margit y TUVIKENE, Rando. 2019. Extraction and quantification of phycobiliproteins from the red alga *Furcellaria lumbricalis*. *Algal Research*. 37: 115–123. ISSN 22119264. 10.1016/j.algal.2018.11.013
- [31] BAR, Raphael. 1988. Ultrasound enhanced bioprocesses: Cholesterol oxidation by *Rhodococcus erythropolis*. *Biotechnology and Bioengineering*. 32(5): 655–663. ISSN 0006-3592. 10.1002/bit.260320510
- [32] JARDINEZ, Stephany Montserrat Gonzalez. RUPTURA CELULAR. tratamiento enzimático [en línea]. <[https://www.academia.edu/34150903/RUPTURA\\_CELULAR](https://www.academia.edu/34150903/RUPTURA_CELULAR)> [consulta: 5 julio 2019].
- [33] SOCIEDAD COLOMBIANA DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA., Luz Mabel, MADERO, José I, LÓPEZ, Claudia, LEÓN, María Fernanda, ACOSTA, Lucía, GÓMEZ, Claudia, DELGADO, Lucy Gabriela y GÓMEZ, Claudio. 2006. Fundamentos de criopreservación. Federación Colombiana de Obstetricia y Ginecología. 291–300 p.. ISSN 0034-7434.
- [34] Lisis por ultrasonidos: Ruptura celular & extracción – Hielscher - Tecnología de Ultrasonidos [en línea]. <<https://www.hielscher.com/es/ultrasonic-lysis-cell-disruption-extraction.htm>> [consulta: 5 julio 2019].
- [35] GRODZKI, Ana Cristina y BERENSTEIN, Elsa. Antibody Purification: Ammonium Sulfate Fractionation or Gel Filtration. *En: Humana Press*, 2010, p. 15–26. 10.1007/978-1-59745-324-0\_3
- [36] HALL, Martin. 2018. Size Exclusion Chromatography (SEC). Elsevier Ltd. 421–432 p. ISBN 9780128125526. 10.1016/B978-0-08-100623-8.00021-9
- [37] GLAZER, Alexander N. y STRYER, Lubert. 1990. Phycobiliprotein—avidin and phycobiliprotein—biotin conjugates. *Methods in Enzymology*. 184(C): 188–194. ISSN 15577988. 10.1016/0076-6879(90)84273-J
- [38] GRÖNBERG, Anna. 2018. Ion Exchange Chromatography. *Biopharmaceutical Processing* : 379–

- [39] ARMAREGO, Wilfred L.F., CHAI, Christina Li Lin, ARMAREGO, Wilfred L.F. y CHAI, Christina Li Lin. 2009. Purification of Biochemicals and Related Products. Purification of Laboratory Chemicals : 577–708 . 10.1016/B978-1-85617-567-8.50014-7
- [40] SALGADO, Luis Vidal y VARGAS HERNÁNDEZ, Carlos. sin fecha. Medición de la absorbancia óptica de soluciones acuosas mediante la instrumentación virtual y el control Optical absorbance measurement of aqueous solutions using virtual instrumentation and control. Scientia et Technica Año XIX. 19(1). ISSN 0122-1701.
- [41] ROXANA VERDINI DRA ROXANA VERDINI, Dra. Análisis del contenido de proteínas en los alimentos 2017 [en línea]. <[https://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/124179/mod\\_resource/content/4/QA-2017-PROTEINAS-METODOS.pdf](https://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/124179/mod_resource/content/4/QA-2017-PROTEINAS-METODOS.pdf)> [consulta: 6 julio 2019].
- [42] GA BÁSACA-LOYA, MA Valdez, E Enríquez-Guevara, LE Gutiérrez-Millán, MG Burboa. a. Extraction and purification of B-phycoerythrin from the red microalga Rhodospirillum rubrum. [en línea]. <<http://www.marketbio.com>> [consulta: 15 enero 2020].
- [43] ROSSANO, R., UNGARO, N., D'AMBROSIO, A., LIUZZI, G. M. y RICCIO, P. 2003. Extracting and purifying R-phycoerythrin from Mediterranean red algae *Corallina elongata* Ellis & Solander. Journal of Biotechnology. 101(3): 289–293. ISSN 01681656. 10.1016/S0168-1656(03)00002-6
- [44] NIU, Jian Feng, CHEN, Zhang Fan, WANG, Guang Ce y ZHOU, Bai Cheng. 2010. Purification of phycoerythrin from *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta) using expanded bed absorption. Journal of Applied Phycology. 22(1): 25–31. ISSN 09218971. 10.1007/s10811-009-9420-2
- [45] HEMLATA, AFREEN, Sumbul y FATMA, Tasneem. 2018. Extraction, purification and characterization of phycoerythrin from *Microchaete* and its biological activities. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 13: 84–89. ISSN 18788181. 10.1016/j.bcab.2017.11.012
- [46] NAIR, Divya, KRISHNA, Jissa Gopala, PANIKKAR, Mamkoottathil Velayudhan Nataraja, NAIR, Bipin Gopalakrishnan, PAI, Jayashree Gopalakrishna y NAIR, Sudarslal Sadasivan. 2018. Identification, purification, biochemical and mass spectrometric characterization of novel phycobiliproteins from a marine red alga, *Centroceras clavulatum*. International Journal of Biological Macromolecules. 114: 679–691. ISSN 18790003. 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.153
- [47] SUDHAKAR, M. P., JAGATHEESAN, A., PERUMAL, K. y ARUNKUMAR, K. 2015. Methods of phycobiliprotein extraction from *Gracilaria crassa* and its applications in food colourants. Algal Research. 8: 115–120. ISSN 22119264. 10.1016/j.algal.2015.01.011
- [48] SUN, Li, WANG, Shumei, GONG, Xueqin, ZHAO, Mingri, FU, Xuejun y WANG, Lu. 2009. Isolation, purification and characteristics of R-phycoerythrin from a marine macroalga *Heterosiphonia japonica*. Protein Expression and Purification. 64(2): 146–154. ISSN 10465928. 10.1016/j.pep.2008.09.013
- [49] KUMAR, Vivek y FOTEDAR, Ravi. Agar extraction process for *Gracilaria cliftonii* (Withell, Millar, & Kraft, 1994). 2009. ISSN 01448617. 10.1016/j.carbpol.2009.07.001. extracción agar general
- [50] LI, Haiyan, HUANG, Jianyu, XIN, Yanjuan, ZHANG, Biaoming, JIN, Yan y ZHANG, Wei. 2009.

- Optimization and scale-up of a new photobleaching agar extraction process from *Gracilaria lemaneiformis*. *Journal of Applied Phycology*. 21(2): 247–254. ISSN 09218971. 10.1007/s10811-008-9358-9
- [51] YOUSEFI, Mahdiah Karkhane, ISLAMI, Houman Rajabi y FILIZADEH, Yousef. 2013. Effect of extraction process on agar properties of *gracilaria corticata* (rhodophyta) collected from the persian gulf. *Phycologia*. 52(6): 481–487. ISSN 00318884. 10.2216/13-165.1
- [52] RAO, A V y BEKHEET, I A. 1976. Preparation of Agar-Agar from the Red Seaweed *Pterocladia capillacea* off the Coast of Alexandria, Egypt. *Applied and environmental microbiology*. 32(4): 479–82. ISSN 0099-2240.
- [53] LEE, Wei Kang, LIM, Yi Yi, LEOW, Adam Thean Chor, NAMASIVAYAM, Parameswari, ABDULLAH, Janna Ong y HO, Chai Ling. 2017. Factors affecting yield and gelling properties of agar. *Journal of Applied Phycology*. 29(3): 1527–1540. ISSN 15735176. 10.1007/s10811-016-1009-y
- [54] PAWLEY, James B. 2006. *Handbook of biological confocal microscopy*. Springer. 985 p. ISBN 9780387455242. [en línea]. <[https://books.google.cl/books?hl=es&lr=&id=IKcPnaNPrhoC&oi=fnd&pg=PR5&dq=2006+book+handbook+of+biological+confocal+microscopy&ots=rbPIJA5cql&sig=7G6nsctINL7rFYQ\\_dTrLqMrpiTk#v=onepage&q=2006+book+handbook+of+biological+confocal+microscopy&f=false](https://books.google.cl/books?hl=es&lr=&id=IKcPnaNPrhoC&oi=fnd&pg=PR5&dq=2006+book+handbook+of+biological+confocal+microscopy&ots=rbPIJA5cql&sig=7G6nsctINL7rFYQ_dTrLqMrpiTk#v=onepage&q=2006+book+handbook+of+biological+confocal+microscopy&f=false)> [consulta: 7 julio 2019].
- [55] ARMISÉN, R. y GALATAS, F. 2009. Agar. *Handbook of Hydrocolloids: Second Edition* [en línea]. : 82–107. 10.1533/9781845695873.82
- [56] HERNÁNDEZ-CARMONA, G., FREILE-PELEGRÍN, Y. y HERNÁNDEZ-GARIBAY, E. 2013. Conventional and alternative technologies for the extraction of algal polysaccharides. 475–516 p. ISBN 9780857095121. 10.1533/9780857098689.3.475
- [57] WIELINGA, Willem. *Seed Gums*. En: *Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents*. Oxford, UK. Wiley-Blackwell. p. 275–292. 10.1002/9781444314724.ch15
- [58] SILVÉRIO, Sara C., MOREIRA, Sérgio, MILAGRES, Adriane M.F., MACEDO, Eugénia A., TEIXEIRA, José A. y MUSSATTO, Solange I. 2012. Interference of some aqueous two-phase system phase-forming components in protein determination by the Bradford method. *Analytical Biochemistry*. 421(2): 719–724. ISSN 00032697. 10.1016/j.ab.2011.12.020
- [59] Phosphate Buffer (pH 5.8 to 7.4) Preparation and Recipe | AAT Bioquest [en línea]. <<https://www.aatbio.com/resources/buffer-preparations-and-recipes/phosphate-buffer-ph-5-8-to-7-4>> [consulta: 20 enero 2020].

## 8. Anexos

### Anexo A. Secuencia parcial de aminoácidos de *Agarophyton chilense* en comparación con otras especies del género *Gracilaria* sp.

En la Figura 36 se puede observar la secuencia de aminoácidos que poseen las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de ficoeritrina de distintas especies de algas rojas, y la secuencia de *Agarophyton chilense* determinada a partir de mapas de densidad.

```

Cadena  $\alpha$ 
      1      15 16      30 31      45 46      60 61      75
polbo MKSVITTTTISAADAA GRYPSTSDLQSVQGN IQRAAARLEAAEKLG SNHEAVVKEAGDACF SKYGYLKNPGEAGEN
seq   MKSVITTTTISAADSA GRFPSSDLESVQGN IQRASARL?AA??LA ?N
den   MKSVITTTTISAADSA GRFPSSDLESVQGN IQRASARLEAAEKLKLA SNHEAVVKEAGDACF GKYG YLKNPGEAGEN
grimo MKSVITTTTISAADAA GRFPSSDLESIQGN IQRAAARLEAAQKLS GNHEAVVKEAGDACF AKYSYLKNAGEAGDS
porso MKSVITTTTISAADAA GRFPSSDLESIQGN IQRSAARLEAAEKLKLA GNHEAVVKEAGDACF AKYAYLKNPGEAGEN

      76      90 91      105 106      120 121      135 136      150
polbo QEKINKCYRDIDHYM RLIN YTLVVG G DGPL DEWGIAGAREVYRTL NLPSAAYIAAFV FTR DR LCI PRDMSAQAGV
seq   QEKINKCYRDIDHYM      LVNYSLVIGGTGPL DEWGIAGAREVYRTL NLPTSA      MSAQAGV
den   QEKINKCYRDIDHYM RLVNYSLVIGGTGPL DEWGIAGAREVYRTL NLPTSAYIAAF AFTR DR LCG PRDMSAQAGV
grimo PEKINKCYRDIDHYM RLIN YSLVVG GTGPV DEWGIAGSRE VYRAL NLPGSAYIAAF TFTR DR LCV PRDMSAQAGV
porso QEKINKCYRDVDHYM RLVNYDLVVG GTGPL DEWGIAGAREVYRTL NLPTSAYVASI AYTR DR LCV PRDMSAQAGV

      151      164
polbo EFCTALDYLINSLS
seq   EY?T?LDYIINSLS
den   EYSTALDYIINSLS
grimo EFTSALDYVINS LC
porso EFSAYLDY LINALS

Cadena  $\beta$ 
      1      15 16      30 31      45 46      60 61      75
polbo MLDAFSRVVNSDSK AAYVSGSDLQALKTF INDGNKRLDAVN YIV SNSSCIVSDAISGMI CENPGLITPGGNCYT
seq   MLDAFSRV??NAD?? ??YVGG?DL???R?? IS????RL?A
den   MLDAFSRVISNADAK AAYVGGSDLQALRTF ISDGNKRLDAVN YIV SNSSCIVSDAISGMI CENPGLITPGGNCYT
grimo MLDAFSRVVVTSDAK AAYVGGSDLQSLKSF INDGNKRLDAVN YIV SNASCIVSDAVSGMI CENPGLIAPGGXCYT
porso MLDAFSRVVNSDAK AAYVGGSDLQALKSF IADGNKRLDSVNAIV SNASCIVSDAVSGMI CENPGLISPGGNCYT

      76      90 91      105 106      120 121      135 136      150
polbo NRRMAACLRDGEIIL RYVSYALLAGDASVL EDRCLNGLKETYIAL GVPTNSTVRAVSIMK AA AVCFISNTASQRK
seq   NRRMAACLRDGEIIL RYISYALLAGDSSVL EDRCLNGLKETYIAL GVPTNSTVRAVSIMK AVGAFISNTASQRK
den   NRRMAACLRDGEIIL RYVSYALLAGDSSVL DDRCLNGLKETYIAL GVPTASSRAVSIMK ATATAFITNTASGRK
grimo NRRMAACLRDGEIIL RYVSYALLAGDSSVL DDRCLNGLKETYIAL GVPTASSRAVSIMK ATATAFITNTASGRK
porso NRRMAACLRDGEIIL -YVSYALLAGDASVL EDRCLNGLKETYIAL GVPTNSSIRAVSIMK AQAVAFITNTATERK

      151      165 166      177
polbo VEVIEGDCSALASEV ASYCDRVVA AVS
seq   VEVIEGDCSALAEI ASYCDRISAAVS
den   GEVIEGDCSALAEI ASYCDRISAAVS
grimo VEVAAGDCQALQAEA ASYFDKVGSSID
porso MSFAAGDC TSLASEV ASYFDRVGA AIS

```

Figura 36: Secuencia aminoacídica determinada para cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de *R-PE* de *Agarophyton chilense*. Secuencia aminoacídica parcial (seq) según mapas de densidad (den). Comparación con secuencia homóloga de *P. boldii* (secuencia modelo, polbo); *G. monilis* (grimo); *P. sordium* (porso) mediante alineamiento múltiple. (Cambios conservados destacados en azul y no conservados en rojo [18]).

## Anexo B. Materiales utilizados en desarrollo de experimentos

- *Agarophyton chilense* proveniente de Puerto Montt en formato seco, extraídas en el mes de junio, año 2019.
- Sulfato de amonio  $(NH_4)_2SO_4$ , N° CAS 7783-20-2 Merck.
- Buffer fosfato salino (PBS) 10× 0,1 M, pH 7. (Detalle de preparación en Anexo C)
- Buffer fosfato 0,025 M, pH 5,5 (Detalle de preparación en Anexo D)
- Buffer fosfato 0,025 M, 0,5 M NaCl, pH 5,5 (Detalle de preparación en Anexo D)
- Buffer fosfato 0,025 M, pH 6,5 (Detalle de preparación en Anexo D)
- Buffer fosfato 0,025 M, 0,5 M NaCl, pH 6,5 (Detalle de preparación en Anexo D)
- Buffer fosfato 0,025 M pH 7,5 (Detalle de preparación en Anexo D)
- Buffer fosfato 0,025 M, 0,5 M NaCl, pH 7,5 (Detalle de preparación en Anexo D)
- Monohidrógeno fosfato de disodio dihidratado  $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ , N° CAS 10028-24-7 Merck.
- Dihidrógeno fosfato de sodio monohidratado  $NaH_2PO_4 \times H_2O$ , N° CAS 10049-21-5 Merck.
- Cloruro de sodio  $NaCl$ , N° CAS 7647-14-5 Merck.
- Membrana de diálisis, de celulosa MWCO 14.000 Sigma-Aldrich (#D-9777).
- Filtro para jeringa de CMC 0,22  $\mu$ m.
- Filtro membrana MCE (3  $\mu$ m, 47mm), MF-MILLIPORE.
- Acrilamida Bis-acrilamida 29:1 30 % Winkler Ltda. Chile (BM-0100).
- Tetrametilendiamina (TEMED), N° CAS 110-18-1 Applichem.
- Persulfato de amonio (PSA) Gibco.
- Buffer Tris 1,5 M, pH 8,8 + 0,4 % SDS.
- Buffer Tris 0,5 M, pH 6,8 + 0,4 % SDS.
- Trisamonimetano (Tris) para análisis, N° CAS 77-86-1 Applichem Germany.
- Buffer de corrida SDS-PAGE 10x (detalle de preparación en Anexo E).
- Glicina, N° CAS 56-40-6 Winkler Ltda. Chile.
- Azul de Coomasie G-250 para tinción de geles.
- Hidróxido de sodio NaOH, N° CAS 1310-73-2, Merck.
- Ácido sulfúrico  $H_2SO_4$  para análisis, N° CAS 7664-93-9, Merck.
- Gasa.

## Anexo C. Preparación buffer fosfato salino 0,1M

Se prepara buffer fosfato salino 10× 0,1M, pH7, para la extracción de ficobiliproteínas presentes en *Agarophyton chilense*.

Para preparar un litro se requiere los siguientes reactivos con sus respectivas cantidades:

- 10,9 g de  $Na_2HPO_4$ .
- 3,2 g de  $NaH_2PO_4$ .
- 90 g de NaCl.

Primero estos son disueltos en 800 mL de agua desionizada. Luego, se ajusta la solución a pH 7. Posteriormente, se la solución de afora en un matraz de aforo de 1 L con agua desionizada. Finalmente, el buffer es autoclavado.

#### **Anexo D. Preparación de buffer fosfato para etapa de intercambio iónico**

Para la etapa de intercambio iónico se realizan pruebas con distintas condiciones de pH de la muestra y de ambientación columna, para observar el comportamiento de adhesión que presentan y determinar así en qué caso se alcanza el mejor nivel de pureza y menor cantidad de pérdidas de proteína de interés [59].

Para preparar 1 litro de buffer fosfato 0,025 M a pH 5,5 se utilizó:

- 0,327 g de  $Na_2HPO_4$ .
- 3,282 g de  $NaH_2PO_4$ .

En el caso del buffer con sal, se le adicionan 29,22 g de NaCl para alcanzar un 0,5 M. Luego se ajusta el pH mediante la adición de ácido o base según corresponda.

Para preparar 1 litro de buffer fosfato 0,025 M a pH 6,5 se utilizó:

- 2,395 g de  $Na_2HPO_4$ .
- 2,217 g de  $NaH_2PO_4$ .

En el caso del buffer con sal, se le adicionan 29,22 g de NaCl para alcanzar un 0,5 M. Luego se ajusta el pH mediante la adición de ácido o base según corresponda.

Para preparar 1 litro de buffer fosfato 0,025 M a pH 7,5 se utilizó:

- 5,054 g de  $Na_2HPO_4$ .
- 0,848 g de  $NaH_2PO_4$ .

En el caso del buffer con sal, se le adicionan 29,22 g de NaCl para alcanzar un 0,5 M. Luego se ajusta el pH mediante la adición de ácido o base según corresponda.

#### **Anexo E. Análisis mediante geles de poliacrilamida y preparación**

La mezcla de proteínas es aplicada en el gel dentro de un pocillo generado por medio de un peine. Las proteínas se desplazan de acuerdo con su tamaño y su carga mediante un campo eléctrico que es aplicado en el gel. Se suele añadir agentes denaturantes, lo que resulta en que se resuelvan las subunidades de las proteínas de acuerdo con su peso molecular.

Para poder observar el desplazamiento de las proteínas a lo largo del gel se añade generalmente azul de Coomassie G-250 para teñirlas, y se compara el nivel de movimiento midiendo simultáneamente proteínas marcadoras de peso molecular conocido. La mayoría de los procedimientos se suelen llevar a cabo a una temperatura de 4 °C con el fin de evitar la desnaturalización o inactivación de la proteína de interés, en el caso que se realice sin agente denaturante [39].

## **Anexo E.1. Elaboración gel**

A continuación, se detalla la elaboración de los geles. Se preparan en primer lugar la solución que será el gel de resolución con las cantidades que se muestran a continuación:

### **Gel de resolución**

- 4,75 mL de acrilamida/bis acrilamida (29:1)
- 2,375 mL de buffer tris 1,5 M, pH 8,8 + 0,4 % SDS
- 2,375 mL de H<sub>2</sub>O destilada
- 4,75 µl de TEMED
- 47,5 µl de persulfato de amonio (PSA)

Es importante considerar el orden de adición de los reactivos, siendo el PSA el penúltimo en agregarse y finalmente el TEMED. Luego la mezcla se homogeniza y se inyecta en la placa para gel. Se espera durante 30 minutos aproximadamente hasta que gelifique la solución. Luego se procede a preparar el gel concentrador, que irá sobre el de resolución, con las siguientes concentraciones:

### **Gel concentrador**

- 0,419 mL de acrilamida/bis acrilamida (29:1)
- 0,625 mL de buffer tris 0,5 M, pH 6,8 + 0,4 % SDS
- 1,4375 mL de H<sub>2</sub>O destilada
- 3,125 µl de TEMED
- 18,75 µl de persulfato de amonio (PSA)

Al igual que en el de resolución, el PSA debe ser agregado antes que el temed, y luego homogeneizar la solución. Se inyecta esta sobre el gel de resolución hasta alcanzar el tope del **VIDRIO**, y luego se inserta el peine de 10 pocillos y se espera a que gelifique.

## **Anexo E.2. Preparación de gel de corrida 10× SDS**

Para preparar un litro de buffer de corrida 10× para correr geles de poliacrilamida en análisis de pureza de proteínas se requiere de los siguientes reactivos con sus respectivas cantidades:

- Tris: 300 g
- Glicina: 144 g
- SDS: 10 g

Se añaden en un vaso precipitado hasta alcanzar 800 mL con agua destilada, agitar hasta disolver, y finalmente en un matraz de aforo completar el volumen de un litro con agua destilada.

## **Anexo E.3. Metodología de electroforesis aplicada**

### **Preparación de muestras a cargar**

Las proteínas de las muestras obtenidas de la cromatografía son denaturadas antes de ser cargadas en el gel de electroforesis.

- 1) Se preparan 50  $\mu$ l de muestra de corrida para cada fracción a analizar. Para esto se mezclan buffer denaturante y fracción de proteínas en una proporción 1:4. La muestra debe alcanzar un pH neutro.
- 2) Las muestras son llevadas a una incubadora a 90 °C durante 10 minutos.

### **Corrida del gel**

- 1) Se prepararon geles de 1,5 mL con 10 pocillos y una resolución del 15 %. (Ver Anexo E.1; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** para detalle de preparación).
- 2) El gel es insertado en la cámara de electroforesis, y esta se llena con buffer de carga.
- 3) Se quitan los peines del gel y se cargan las 50  $\mu$ l de muestras de proteínas denaturadas.
- 4) Se enciende el equipo y se aplica un voltaje de 150 V por un periodo de 1:30 h.

### **Tinción del gel**

- 1) Los geles obtenidos anteriormente son lavados con agua destilada y puestos en recipientes plásticos.
- 2) Se añade solución de tinción hasta quedar completamente cubierto el gel.
- 3) Se deja en agitación, y se monitorea la tinción a lo largo de los días.
- 4) Una vez teñido se lava con agua destilada.

### **Anexo E.4. Preparación de solución de tinción**

Para la preparación de un litro de solución de tinción se requieren las siguientes concentraciones peso/volumen en agua destilada de los reactivos que se muestran a continuación:

- Ácido fosfórico  $H_3PO_4$ : 2 %
- Sulfato de amonio  $(NH_4)_2SO_4$ : 10 %
- Metanol: 20 %
- Coomassie G250: 0,1 %

## Anexo F. Cálculo de concentraciones de liberación de ficobiliproteínas con el transcurso de los días

Se determina la concentración de ficoeritrina y ficocianina, utilizando el barrido de longitudes de onda para cada muestra, a partir de la ecuación de Beer ajustada a los picos que presentan las muestras en el barrido, cuyos resultados se observan en la Tabla 14

*Tabla 14: Valores de concentración de ficobiliproteínas determinadas a través de los de picos de absorbancia obtenidos para muestras de liberación de ficobiliproteínas para distintos días de suspensión.*

<b>Día</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>14</b>	<b>16</b>	<b>22</b>	<b>28</b>	<b>35</b>
A456	0,078	0,461	0,555	0,908	0,977	1,134	1,338	1,948	2,301
A495	0,069	0,438	0,537	0,839	0,947	1,098	1,354	2,037	2,439
A560	0,063	0,405	0,512	0,719	0,903	1,048	1,3	2,004	2,453
A590	0,053	0,342	0,429	0,644	0,734	0,888	1,051	1,757	2,233
A610	0,053	0,342	0,433	0,623	0,745	0,898	1,057	1,763	2,265
A645	0,047	0,309	0,387	0,58	0,622	0,781	0,888	1,556	2,049

Se utilizan las ecuaciones propuestas por Beer para ficobiliproteínas en presencia de contaminantes, cuyas fórmulas ajustadas a los picos obtenidos son las siguientes:

$$PE \left[ \frac{mg}{ml} \right] = [(A_{560} - A_{590}) - (A_{456} - A_{590}) \cdot 0,2] \cdot 0,12$$

$$PC \left[ \frac{mg}{ml} \right] = [(A_{610} - A_{645}) - (A_{590} - A_{645}) \cdot 0,51] \cdot 0,15$$

Cuyos resultados de concentración se muestran en la Tabla 15:

*Tabla 15: Cantidad de ficobiliproteínas por gramo de alga seca determinadas para muestras de liberación de ficobiliproteínas para distintos días.*

<b>Día</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>14</b>	<b>16</b>	<b>22</b>	<b>28</b>	<b>35</b>
<b>R-PE [mg/mL]</b>	0,0006	0,0047	0,0069	0,0027	0,0144	0,0133	0,0230	0,0251	0,0248
<b>R-PC [mg/mL]</b>	0,0004	0,0024	0,0037	0,0016	0,0099	0,0094	0,0129	0,0157	0,0183

Estos valores son modificados para obtener la cantidad de miligramos de proteínas que se obtienen por gramo de alga seca. El material correspondiente a 10 g de alga seca se encuentra suspendido en 200 mL de PBS, obteniendo los valores de la Tabla 8.

## Anexo G. Crecimiento de microorganismos en medio de extracción de ficobiliproteínas

Durante el reposo de la muestra de algas en PBS en la extracción de ficobiliproteínas se verificó el crecimiento de microorganismos en las muestras.



Figura 37: Crecimiento de microorganismos en extracción de ficobiliproteínas. Izquierda: restos de microorganismos en buffer de extracción; Centro: pellet blanco tubo derecho con microorganismos; Derecha: placa de Petri con crecimiento de microorganismos proveniente de pellet obtenido por centrifugación de muestra de extracción de ficobiliproteínas.

La muestra en la cual se extrajeron ficobiliproteínas provenientes desde *Agarophyton chilense* fue centrifugada, obteniendo un pellet con presencia de microorganismos, lo cual fue determinado la inoculación en una placa Petri, verificando el crecimiento de colonias, secuencia que puede ser observada en la Figura 37. No pudo ser verificado el tipo de microorganismos, o si este provenía de las algas o de contaminación del medio en el cual se encontrada. Sin embargo, se veía que el crecimiento de estos se daba aun cuando permanecía sellado con parafilm la muestra de extracción.

## Anexo H. Niveles de ficobiliproteínas de extractos crudos y tras precipitación con sulfato de amonio

Se realizó la extracción de ficobiliproteínas para tres muestras a partir de 20 g de alga seca, resuspendida en 400 mL de buffer. A continuación, en la Figura 38 se muestran los resultados de un barrido de longitudes de onda que se obtiene para las tres muestras distintas luego de realizar una centrifugación para eliminar impurezas.

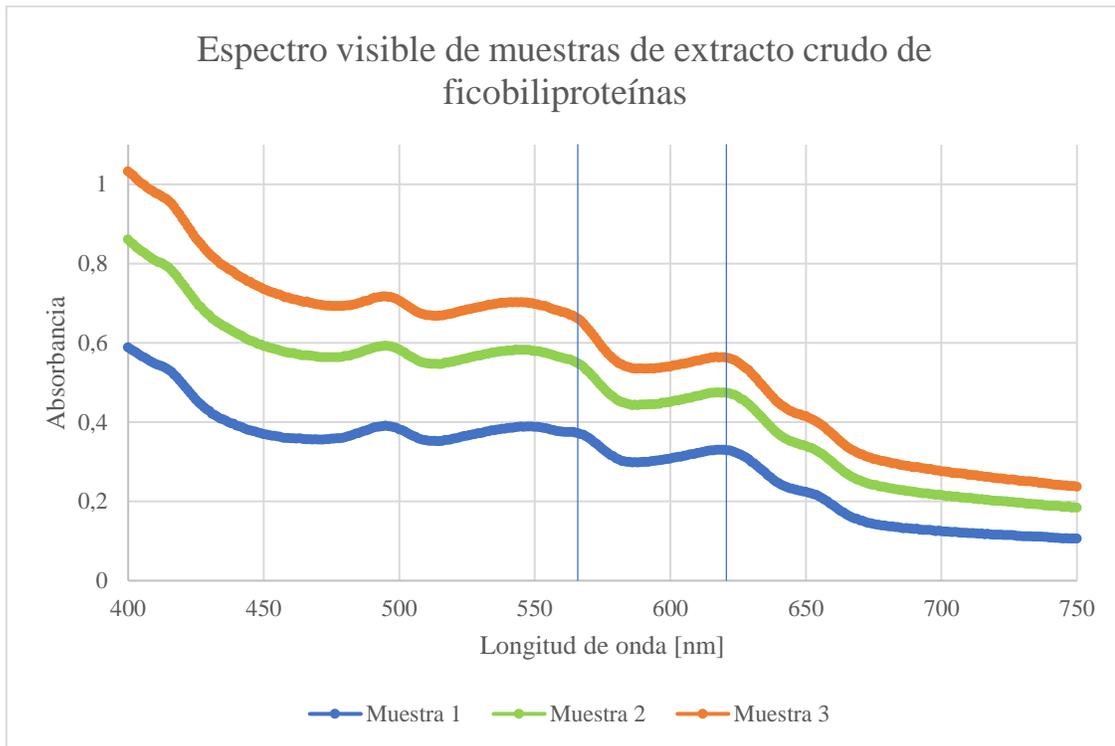


Figura 38: Espectro visible para muestras de extracto crudo de ficobiliproteínas.

Luego, se tienen los barridos de longitud de onda tras aplicar un 20 % y 60 % de saturación de sulfato de amonio en la Figura 39 y Figura 40 respectivamente.

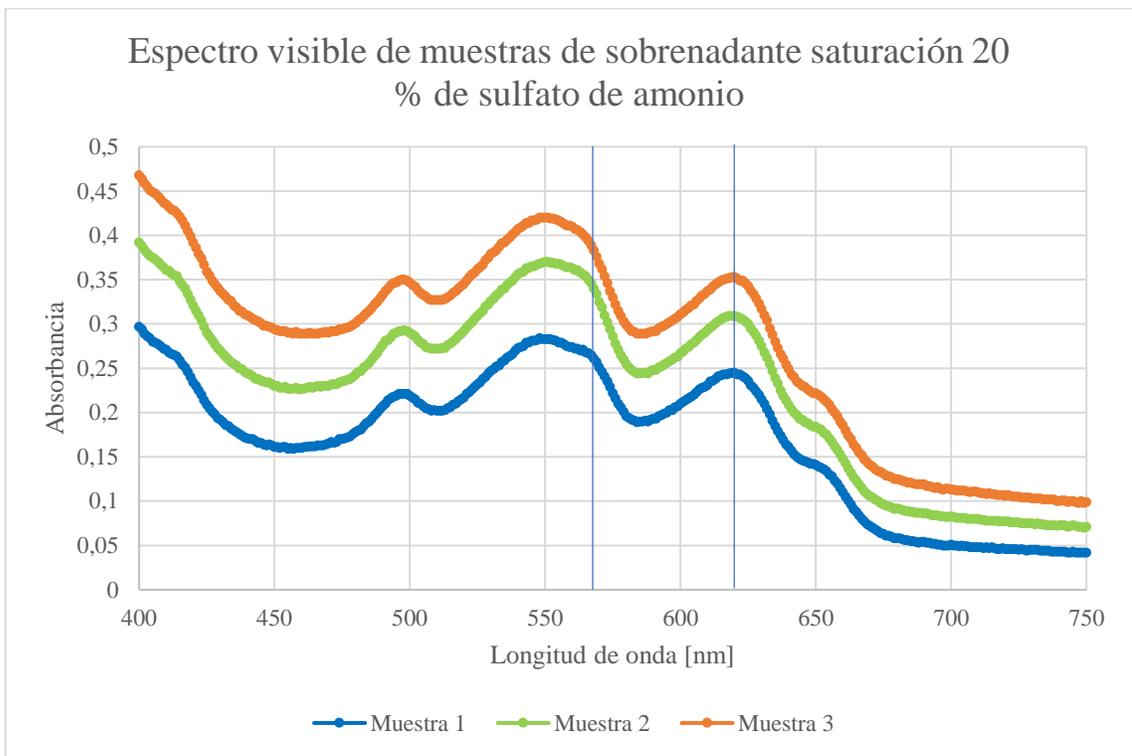


Figura 39: Espectro visible para muestras de sobrenadante de saturación al 20 % con sulfato de amonio para precipitación de ficobiliproteínas.

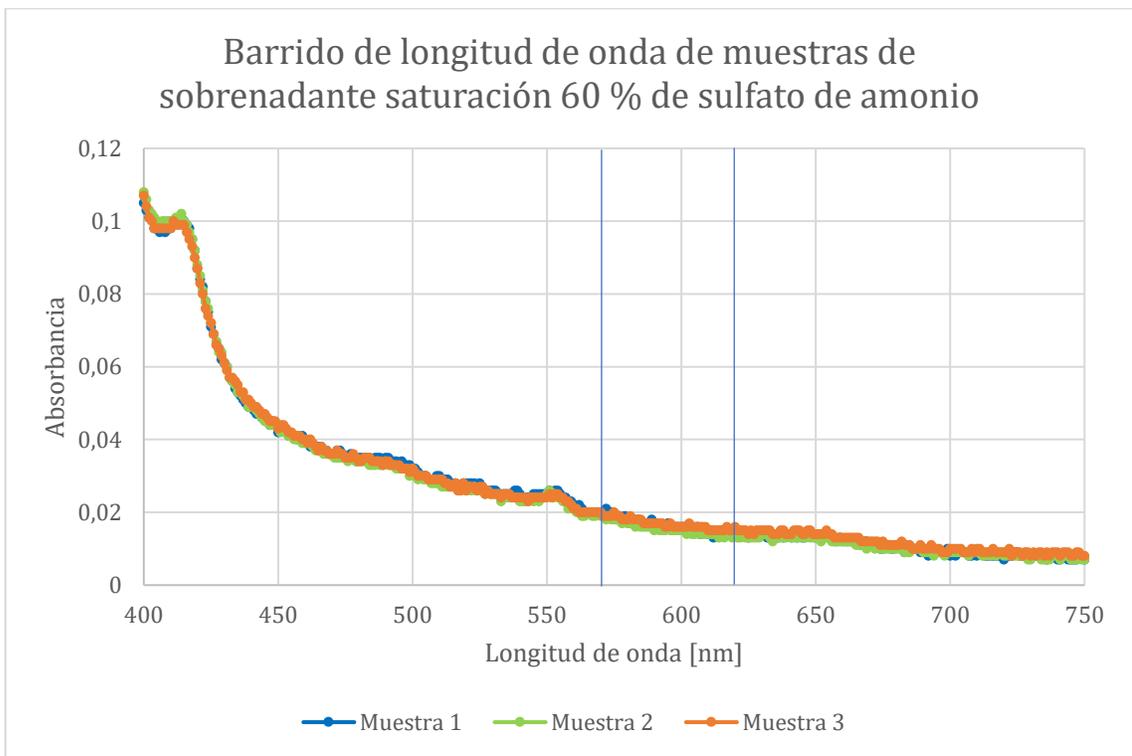


Figura 40: Espectro visible para muestras de sobrenadante de saturación al 60 % con sulfato de amonio para precipitación de ficobiliproteínas.

Se determina la concentración de ficoeritrina y ficocianina en muestras de extracto crudo utilizando la ecuación de Beer, haciendo los posteriores cálculos para determinar la cantidad de miligramos de ficobiliproteínas obtenidos por gramo de alga seca utilizada, considerando obtención de 370 mL de sobrenadante en cada etapa y un total de alga seca utilizada de 20 g, cuyos resultados se muestran en la Tabla 18.

Tabla 16: Absorbancias de picos en muestras de extracto crudo de ficobiliproteínas.

<b>Muestra</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>A456</b>	0,363	0,581	0,722
<b>A495</b>	0,391	0,593	0,717
<b>A560</b>	0,376	0,563	0,678
<b>A590</b>	0,300	0,444	0,535
<b>A610</b>	0,322	0,466	0,555
<b>A645</b>	0,232	0,351	0,427

Tabla 17: Concentraciones de ficobiliproteínas de extractos crudos determinada a partir de la ecuación de Beer utilizando valores de picos de absorbancia.

<b>Muestra</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>R-PE [mg/mL]</b>	0,008	0,011	0,013
<b>R-PC [mg/mL]</b>	0,008	0,010	0,011

Tabla 18: Cantidad de ficobiliproteínas obtenidas en extracto crudo por cantidad de alga seca utilizada para la extracción.

<b>Muestra</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>R-PE [mg/g]</b>	0,141	0,203	0,234
<b>R-PC [mg/g]</b>	0,154	0,188	0,202

Por otro lado, se tienen los datos de absorbancia para muestras de sobrenadante tras saturación al 20 % de sulfato de amonio, a partir de los cuales se realizaron cálculos utilizando la ecuación de Beer, teniendo en consideración que en esta se especifica que está hecha para extractos crudos.

Tabla 19: Absorbancias de picos en muestras de sobrenadante de saturación al 20 % con sulfato de amonio para precipitación de ficobiliproteínas.

<b>Muestra</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>A456</b>	0,160	0,227	0,290
<b>A495</b>	0,219	0,290	0,347
<b>A560</b>	0,274	0,363	0,410
<b>A590</b>	0,193	0,248	0,292
<b>A610</b>	0,231	0,293	0,337
<b>A645</b>	0,146	0,192	0,230

Tabla 20: Concentraciones de ficobiliproteínas de sobrenadante de saturación al 20 % con sulfato de amonio para precipitación de ficobiliproteínas determinada a partir de la ecuación de Beer utilizando valores de picos de absorbancia.

<b>Muestra</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>R-PE [mg/mL]</b>	0,0105	0,0143	0,0142
<b>R-PC [mg/mL]</b>	0,0092	0,0109	0,0113

Tabla 21: Cantidad de ficobiliproteínas obtenidas en sobrenadante de saturación al 20 % con sulfato de amonio para precipitación de ficobiliproteínas por cantidad de alga seca utilizada para la extracción.

<b>Muestra</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>R-PE [mg/mL]</b>	0,195	0,265	0,263
<b>R-PC [mg/mL]</b>	0,169	0,201	0,209

Se puede observar que los resultados de contenido de ficobiliproteínas mostrados en la Tabla 18, correspondientes al extracto crudo, son menores a los de la Tabla 21, correspondientes al sobrenadante de saturación al 20 % con sulfato de amonio, lo cual es incongruente debido a que no puede haber un aumento de la presencia de esta, por lo que se descarta el uso de la ecuación de Beer para muestras que no correspondan al extracto crudo.

## Anexo I. Índice de pureza a lo largo de cromatografías por intercambio aniónico

En las Figura 41, Figura 42, Figura 43, Figura 44 y Figura 45 se muestra el índice de pureza a lo largo de todo el proceso para cada una de las cromatografías realizadas.

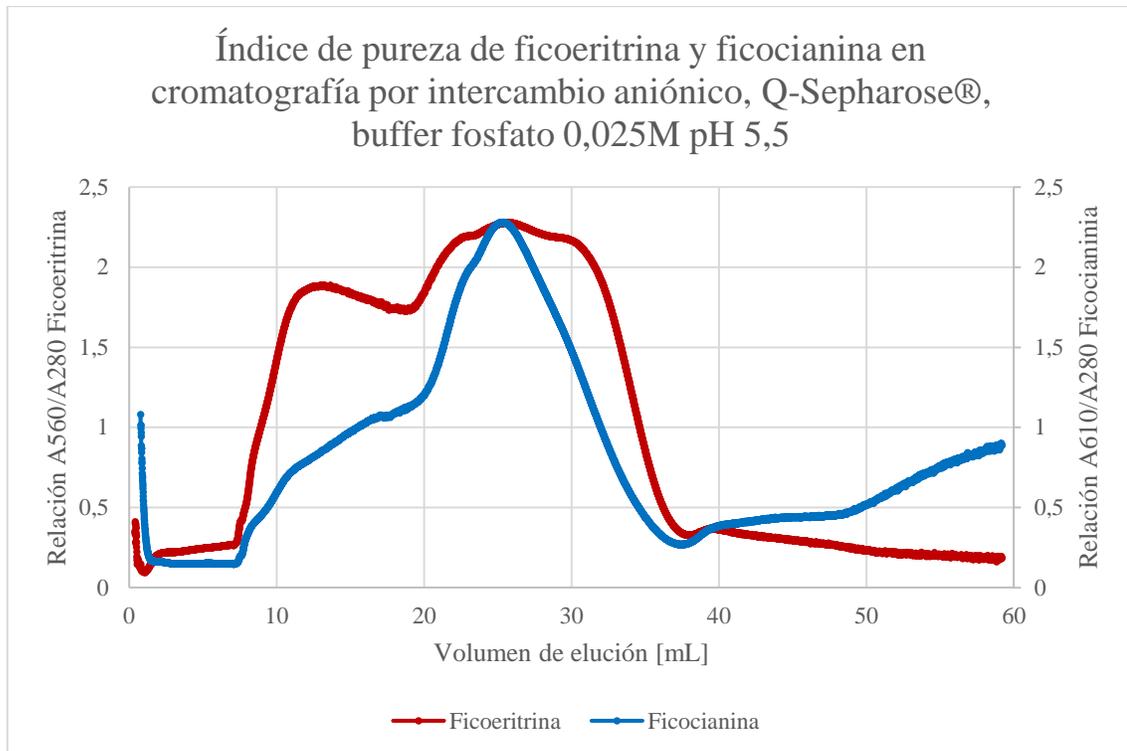


Figura 41: Índice de pureza de ficoeritrina y ficocianina durante cromatografía de intercambio aniónico en columna de 1 mL de Q-Sepharose®, utilizando buffer fosfato 0,025 M, pH 5,5, elución con gradiente de buffer fosfato con NaCl 0,5 M.

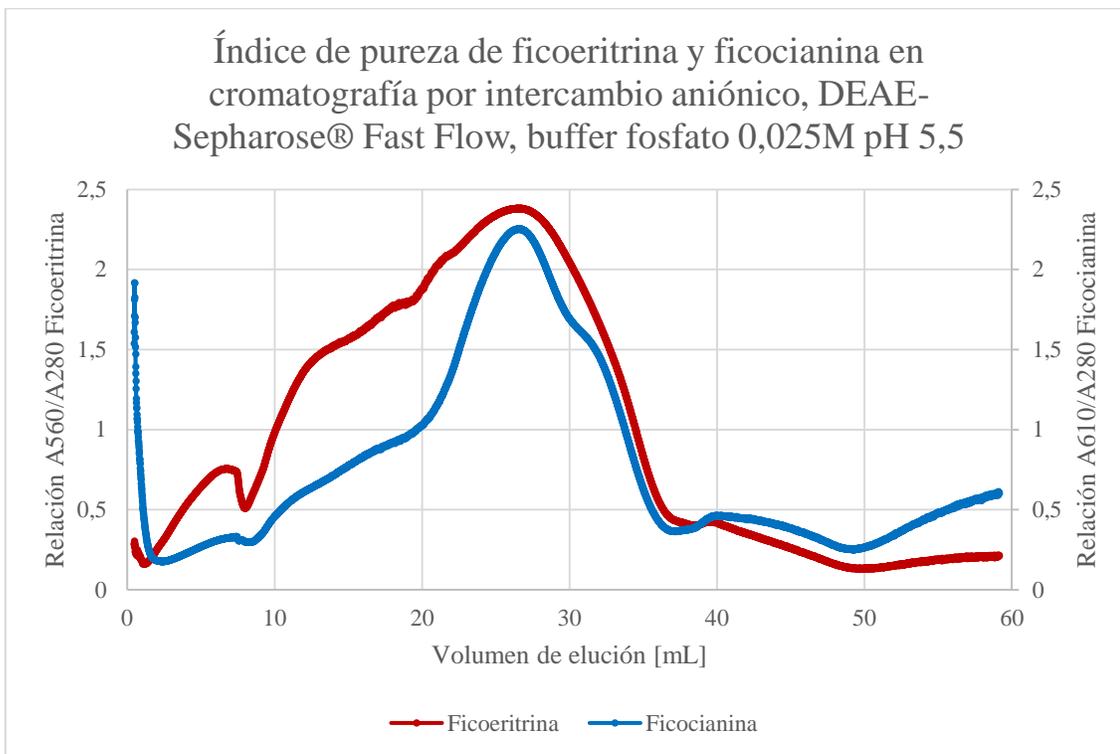


Figura 42: Índice de pureza de ficoeritrina y ficocianina durante cromatografía de intercambio aniónico en columna de 1 mL de DEAE-Sepharose® Fast Flow, utilizando buffer fosfato 0,025 M, pH 5,5, elución con gradiente de buffer fosfato con NaCl 0,5 M.

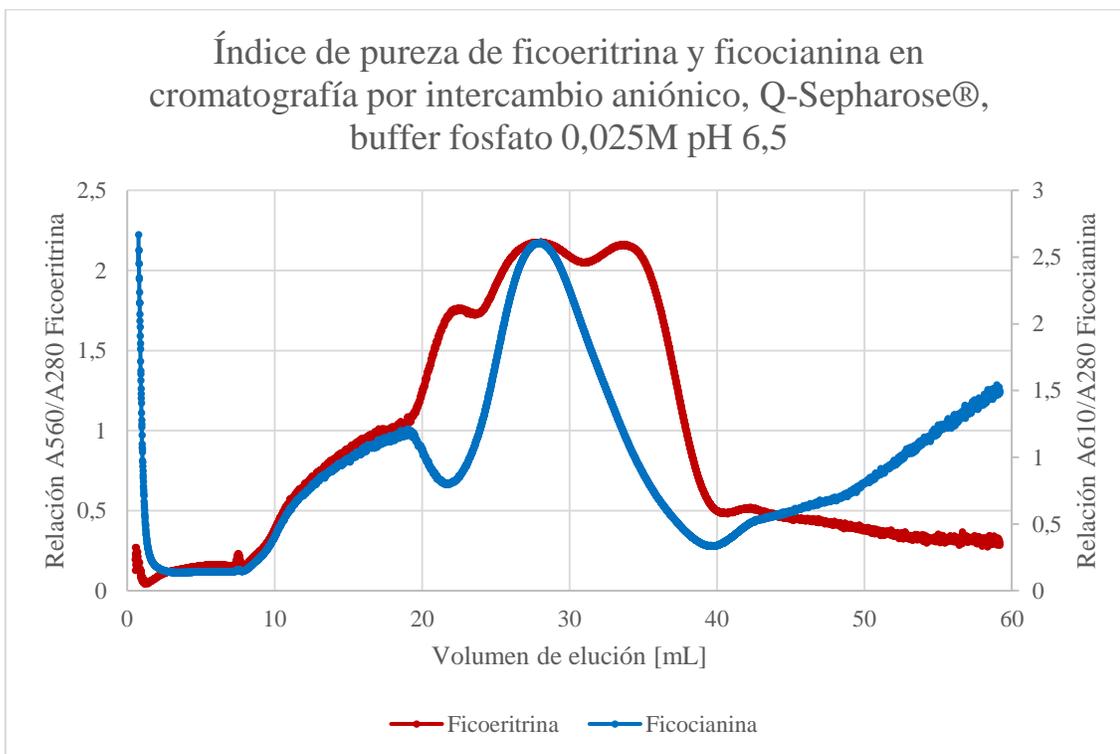


Figura 43: Índice de pureza de ficoeritrina y ficocianina durante cromatografía de intercambio aniónico en columna de 1 mL de Q-Sepharose®, utilizando buffer fosfato 0,025 M, pH 6,5, elución con gradiente de buffer fosfato con NaCl 0,5 M.

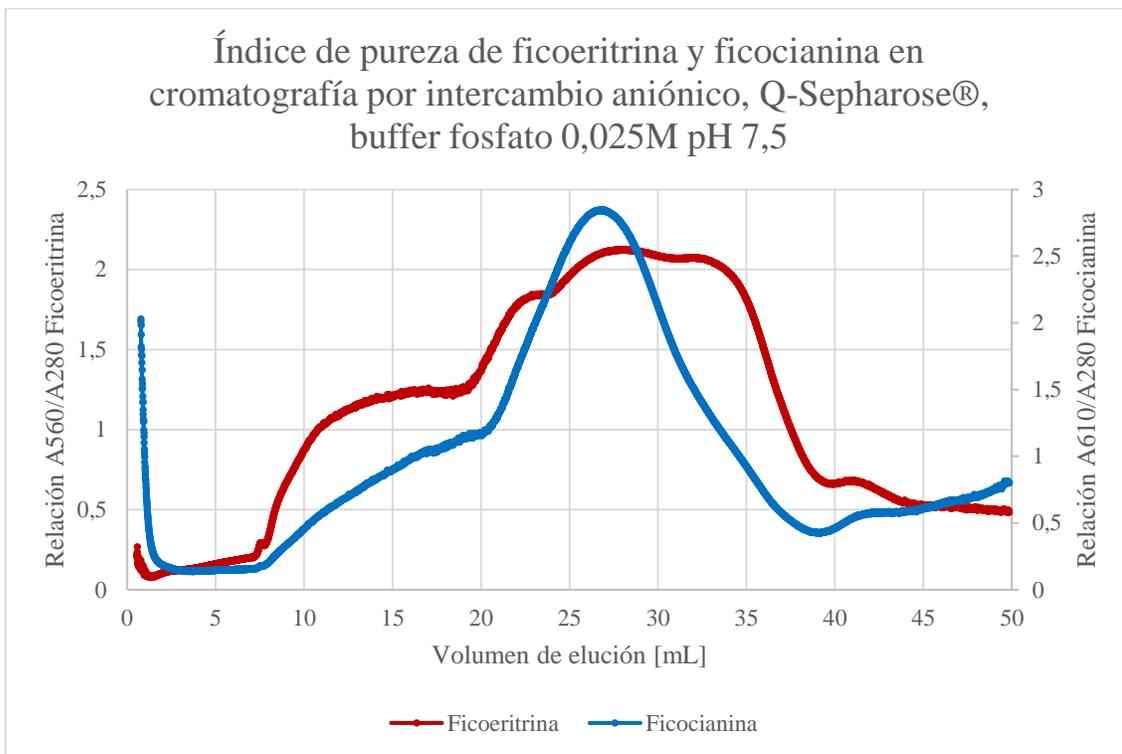


Figura 44: Índice de pureza de ficoeritrina y ficocianina durante cromatografía de intercambio aniónico en columna de 1 mL de Q-Sepharose®, utilizando buffer fosfato 0,025 M, pH 7,5, elución con gradiente de buffer fosfato con NaCl 0,5 M

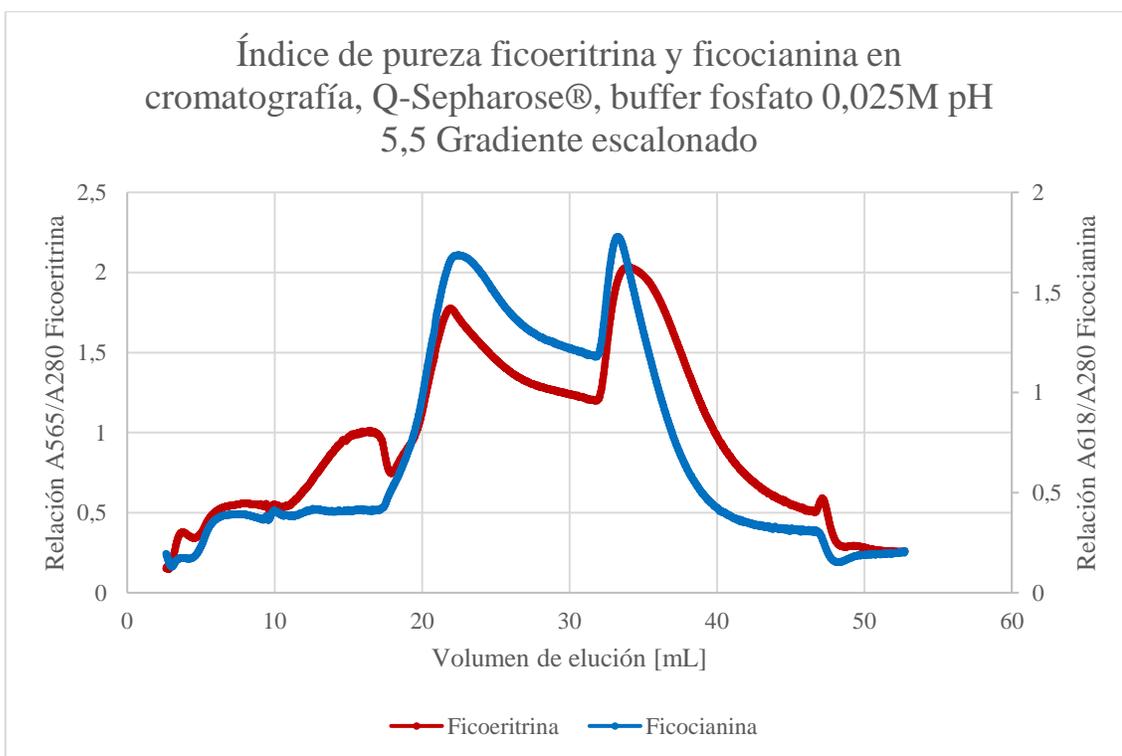


Figura 45: Índice de pureza de ficoeritrina y ficocianina durante cromatografía de intercambio aniónico en columna de 1 mL de Q-Sepharose®, utilizando buffer fosfato 0,025 M, pH 6,5, elución con gradiente escalonado de buffer fosfato con NaCl 0,5 M.

## Anexo J. Cromatograma de intercambio iónico con elución en gradiente escalón

Debido a que la elución de ficobiliproteínas observaba se encontraba dentro de un amplio rango de gradiente para las cromatografías aplicando un gradiente de sal lineal, se realizó una cromatografía utilizando un gradiente escalonado, en base a los picos observados en los cromatogramas de elución lineal. Se realizó primero una inyección de la muestra, seguido de una limpieza. Posteriormente, se realizaron aplicaciones de gradiente con 20 %, 40 % y 100 % del buffer con NaCl, con 15 volúmenes de columna para cada uno, de tal forma de que el pico pudiera descender, eluyendo la mayor cantidad de proteína posible con cada saturación. El resultado de esta prueba se muestra en la Figura 46.

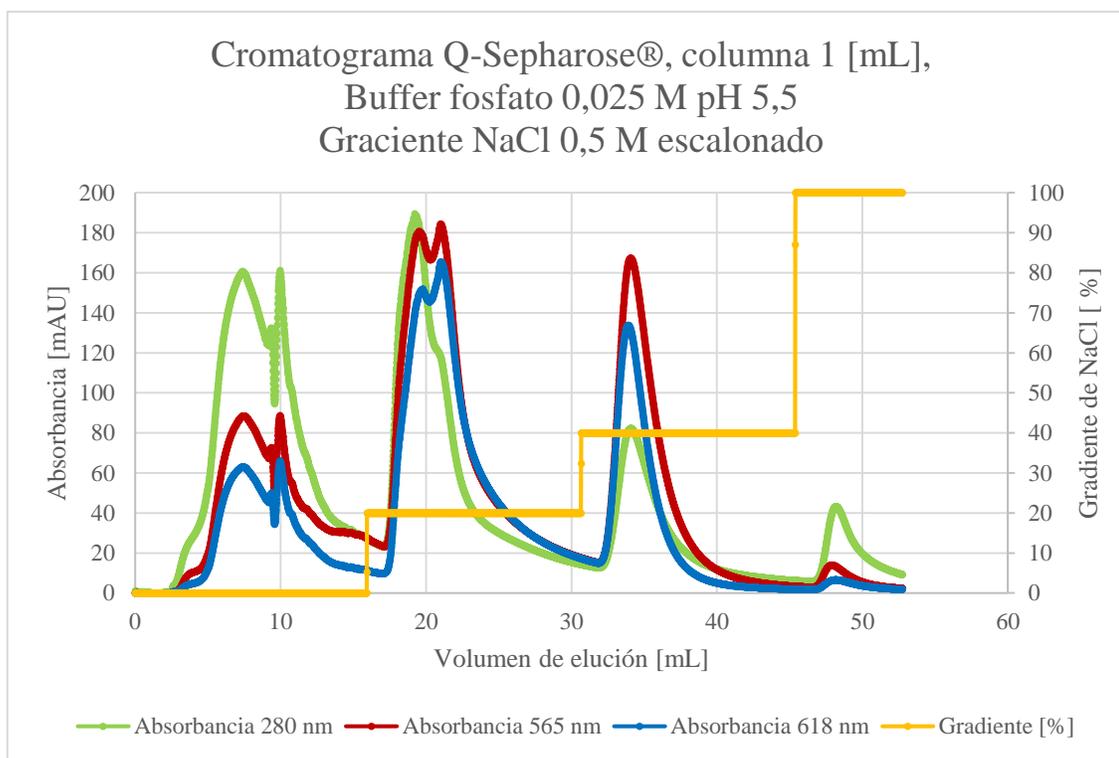


Figura 46: Cromatografía de intercambio aniónico de muestra de ficobiliproteínas, obtenida tras precipitación con sulfato de amonio, en columna de 1 mL de Q-Sepharose®, utilizando buffer fosfato 0,025 M, pH 5,5, elución con gradiente escalonado de buffer fosfato con NaCl 0,5 M. Se monitorea absorbancia a 280, 565 y 618 nm.

## Anexo K. Resultados SDS-PAGE

En la Tabla 22 se muestran los volúmenes de elución de cada fracción utilizada en los distintos carriles de geles de poliacrilamida para cada cromatografía por intercambio aniónico realizada.

Tabla 22: Fracciones (volumen de elución) utilizada en cada carril de cada gel de poliacrilamida para medición de pureza de picos de absorbancia en distintas cromatografías.

Carril	Q-Sepharose® pH 5,5 [mL]	Q-Sepharose® pH 6,5 [mL]	Q-Sepharose® pH 7,5 [mL]	Q-Sepharose® pH 5,5 (gradiente escalón) [mL]	DEAE-Sepharose® FF pH 5,5 [mL]
<b>1</b>	Estándar de pesos moleculares				
<b>2</b>	Muestra inyectada				
<b>3</b>	4	3	4	4	6
<b>4</b>	5	4	5	5	8
<b>5</b>	23	22	22	22	17
<b>6</b>	24	23	23	23	19
<b>7</b>	25	27	28	28	31
<b>8</b>	29	28	29	29	32
<b>9</b>	37	39	37	36	45
<b>10</b>	38	40	38	37	46

En la Figura 47 y Figura 48 se muestran los resultados tras la electroforesis en los geles de poliacrilamida para la medición de pureza de fracciones de cromatografía por intercambio aniónico en Q-Sepharose® utilizando gradiente de elución escalonado y DEAE-Sepharose® Fast Flow utilizando gradiente lineal respectiva, utilizando en ambos casos como buffer fosfato 0,025 M, pH 5,5 como buffer de carga.

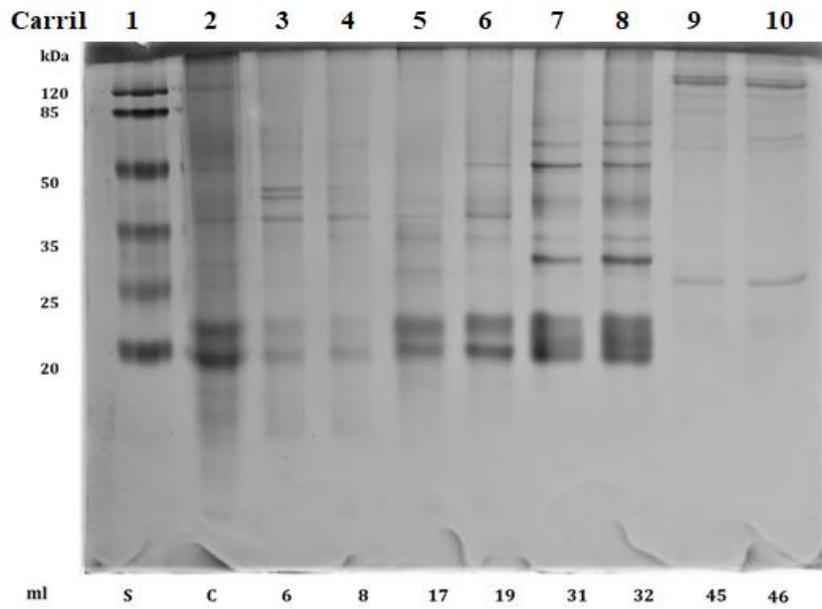


Figura 47: Gel de poliacrilamida para electroforesis de fracciones obtenidas en cromatografía con Q-Sepharose® utilizando buffer fosfato 0,025M, pH 5,5, y un gradiente escalonado de NaCl. Eje vertical: pesos moleculares de bandas de estándar. Eje horizontal: fracciones (volúmenes de elución) de cromatografía utilizadas (S: estándar de pesos moleculares; C: muestra de proteína inyectada).

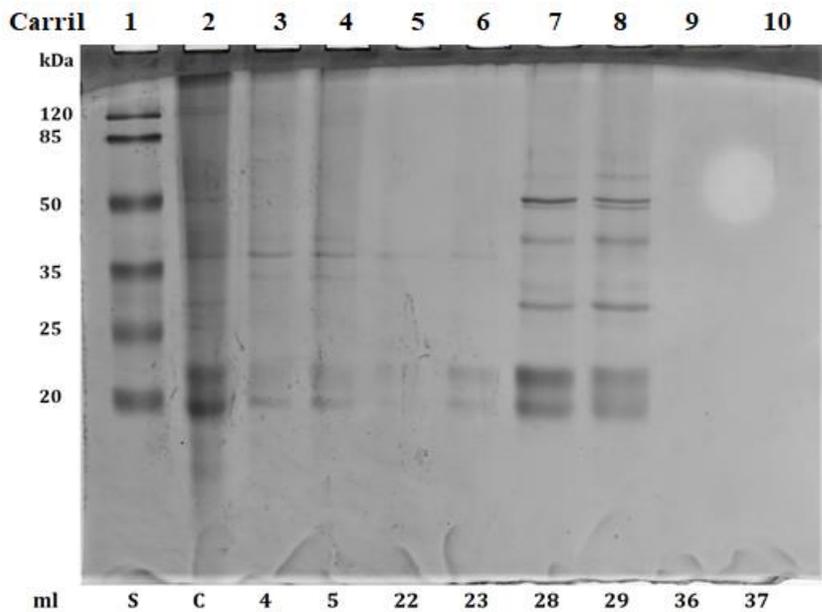


Figura 48: Gel de poliacrilamida para electroforesis de fracciones obtenidas en cromatografía con DEAE-Sepharose® Fast Flow utilizando buffer fosfato 0,025M, pH 5,5, y un gradiente lineal de NaCl. Eje vertical: pesos moleculares de bandas de estándar. Eje horizontal: fracciones (volúmenes de elución) de cromatografía utilizadas (S: estándar de pesos moleculares; C: muestra de proteína inyectada).

## Anexo L. Muestras de extracción de agar

La extracción de agar se lleva a cabo en agua a ebullición, y luego de transcurrido el tiempo necesario para solubilizar los azúcares que lo componen, la solución se filtra en la prensa que se observa en la Figura 49, obteniendo el agar que se observa en la Figura 50. Posteriormente, se lleva a cabo la etapa secado para conseguir un agar seco como se muestra en la Figura 51.



Figura 49: Prensa utilizada para filtración de agar.



Figura 50: Izquierda: solución de extracción de agar con alga en suspensión en agua hirviendo; Centro: Agar filtrado; Derecha: Agar gelificado posterior a la filtración.



*Figura 51: Agar seco obtenido tras protocolos de extracción.*