

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



**EFFECTO DE LA TEMPERATURA E IRRADIANCIA EN EL CONTENIDO Y
COMPOSICIÓN DE ULVÁN EN ULVA SP**

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER
EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

HÉCTOR ALFREDO SARABIA ARGUELLES

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA MÉXICO. 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA E IRRADIANCIA EN EL CONTENIDO Y
COMPOSICIÓN DE ULVÁN EN ULVA SP.**

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER
EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

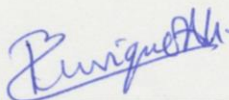
HÉCTOR ALFREDO SARABIA ARGUELLES

Aprobada por:



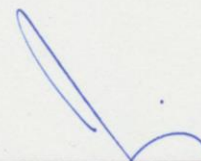
DR. JOSÉ ANTONIO ZERTUCHE GONZÁLEZ

Director de Tesis



DR. ENRIQUE HERNÁNDEZ GARIBAY

Sinodal



DR. JOSÉ SANDOVAL GIL

Sinodal

RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo conocer el efecto de la temperatura e irradiancia en la composición química de *Ulva sp.*, con énfasis en los cambios en la composición y contenido de polisacáridos solubles. Muestras de *Ulva sp* se mantuvieron en cultivo en laboratorio bajo tres condiciones de temperatura (15, 20 y 25°C) y dos irradiancias (30 y 200 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$) con un fotoperiodo de 12:12 (Luz:Oscuridad; L:O). Después de ocho días, las muestras fueron lavadas y deshidratadas a 60 °C. Los polisacáridos solubles fueron extraídos en HCl 0.2N a 60°C por 3 horas; en el extracto obtenido, se determinó el contenido de ramnosa por el método de cisteína, ácidos urónicos por el método de carbazol, sulfatos por el método turbidimétrico de cloruro de bario y el contenido de polisacáridos solubles se determinó por la sumatoria de ramnosa, sulfatos y ácidos urónicos. El contenido de proteína se determinó por el método de Bradford a partir de una extracción alcalina en NaOH 0.2N a 95°C por 30 min. Los resultados obtenidos muestran que *Ulva sp.* presentó la mejor respuesta de crecimiento a 20°C en condiciones de alta irradiancia ($9.93 \pm 0.64 \text{ \% día}^{-1}$). El contenido de polisacáridos solubles incrementó en condiciones de alta irradiancia siendo mayor en la temperatura de 20 °C ($35.72 \pm 0.53 \text{ \%}$), el contenido de ramnosa fue mayor en condiciones de baja irradiancia en las temperaturas de 20 y 25°C (13.48 ± 23 y $13.48 \pm 16 \text{ \%}$ respectivamente), mientras que los sulfatos aumentaron en condiciones de alta irradiancia a 20 °C ($11.27 \pm 0.66 \text{ \%}$), al igual que el contenido de ácidos urónicos ($11.82 \pm 0.29 \text{ \%}$). El contenido de proteínas en el tejido en condiciones de baja irradiancia varió inversamente proporcional a la temperatura con un máximo a 15°C ($13.39 \pm 0.22 \text{ \%}$). Se concluye que la temperatura e irradiancia en cultivo, afectan el crecimiento, el contenido y composición de polisacáridos solubles y proteínas de *Ulva sp.* En altas irradiancias se obtuvo el mejor crecimiento y mayor contenido de sulfatos y ácidos urónicos; mientras que bajas irradiancias favoreció el contenido de ramnosa a 20 y 25°C. Debido a la presencia del azúcar ramnosa, grupos sulfatos y ácidos urónicos el polisacárido soluble, es un polisacárido sulfatado conocido como ulván.

Palabras claves: ulva, ulván, composición, carbohidratos.

DEDICATORIA

A mis padres,

Alicia y Héctor Martín

Por enseñarme a ser fuerte ante cualquier situación y no dejarme vencer. Saben que sin su apoyo no habría llegado hasta aquí.

A mis hermanos,

Martín y Mario

Por estar ahí y apoyarnos a pesar de la distancia, valorando y aprendiendo de cada experiencia que se nos presenta.

A mis hermanos de vida,

Por confiar en mí y motivarme a seguir adelante.

A Gianmarco porque sé que siempre podré contar contigo aun cuando el cielo y los suelo nos tengan separados (qepd).

A mis compañeros de Laboratorio de Macroalgas por apoyarme y confiar en mi trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres que sin ellos no sería lo que soy.

A mis hermanos por su apoyo y su motivación para continuar en el camino.

A mi comité de tesis por su conocimiento, su tiempo y la confianza para realizar este trabajo.

Al Dr. José Zertuche por su apoyo y orientación en este trabajo.

Al Dr. José Sandoval por su ayuda y su tiempo.

Al Dr. Enrique Hernández por aconsejarme, orientarme y apoyarme en este camino de la ciencia.

A mis compañeros de laboratorio (Edith, Alejandra, Laura, Steph, Mariana, Sandra, Mar) por ayudarme en cada uno de mis experimentos y por su valioso tiempo.

A Arturo por apoyarme en esta aventura y creer en mí hasta el día de hoy y siempre estar ahí como mi hermano de vida.

A Gianmarco por siempre estar ahí aun en el silencio, te amo hermano y te agradezco cada minuto que compartimos en esta vida.

GRACIAS

ÍNDICE GENERAL

	Página
VOTOS APROBATORIOS	2
RESUMEN	3
DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTOS	5
ÍNDICE GENERAL	6
1. INTRODUCCIÓN	7
2. HIPÓTESIS	10
3. OBJETIVOS	10
4. METODOLOGÍA	11
4.1 CULTIVO EN INCUBADORES	11
4.2 ANÁLISIS DE POLISACÁRIDOS SOLUBLES	12
4.2.1 Preparación de las muestras	12
4.2.2 Extracción de polisacáridos solubles	12
4.2.2.1 Cuantificación y caracterización de polisacáridos solubles	14
a) Polisacáridos solubles (Ulván)	
b) Ramnosa	
c) Ácidos Urónicos	
d) Sulfatos	
e) Proteínas	
4.3 CONTENIDO DE PROTEÍNAS	15
4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	16
5. RESULTADOS	17
6. DISCUSIONES	31
7. CONCLUSIONES	34
8. BIBLIOGRAFÍA	35

INTRODUCCIÓN

Las macroalgas marinas son organismos más simples, en comparación con las plantas terrestres, que se caracterizan por contener grandes cantidades de polisacáridos (Wood 1974). En las macroalgas las principales funciones de los polisacáridos son estructurales y de reserva energética (McCandless 1981, Kloareg & Quatrano 1988, Usov & Zelinsky 2013). Los polisacáridos de macroalgas son diferentes con respecto a los encontrados en plantas terrestres debido a la presencia de grupos sulfatos y otros azúcares, además de presentar alto contenido de grupos iónicos, alta solubilidad en agua y propiedades reológicas únicas (Wood 1974; McCandless 1981; Jensen 1993; Lobban & Harrison 1994).

Las algas verdes (*Chlorophyta*) pertenecientes a las *Ulvaceae* (géneros *Ulva* y *Enteromorpha*) almacenan almidón como reserva energética y presentan varios tipos de polisacáridos estructurales, tales como ulván, celulosa, xiloglucano y glucuronano (Percival & McDowell 1967; Quemener *et al.* 1997; Lahaye 2001; Lahaye & Robic 2007; Robic *et al.* 2009; Alves *et al.* 2013).

El ulván es uno de los principales polisacáridos sulfatados solubles extraídos de la pared celular de algas verdes del género *Ulva* (Robic *et al.* 2009, Costa *et al.* 2012, Harrysson *et al.* 2018), donde el azúcar ramnosa (deoxi L-Galactosa) es el componente principal por lo que recibe el nombre de polisacárido sulfatado no galactano (PSNG) (Hernández-Garibay, 2011); dicho polisacárido contiene esencialmente ramnosa, xilosa, ácido glucurónico, ácido idurónico y grupos sulfato (Paradossi *et al.* 2002, Robic *et al.* 2009, Xiao *et al.* 2016).

El ulván es un polisacárido complejo que presenta dos principales disacáridos conocidos como ácidos ulvanobiurónicos designados como tipo: **A3S**: β -D-GlcA- (1 $\rightarrow$ 4) - α -L-Rha3S- (1 $\rightarrow$) y **B3S**: α -L-IdoA- (1 $\rightarrow$ 4) α -L-Rha3S- (1 $\rightarrow$) (Ray & Lahaye 1995; Lahaye 2001; Costa *et al.* 2012; Yaich *et al.* 2013). Sin embargo, los residuos de xilosa parcialmente sulfatados también pueden presentarse en lugar de los ácidos urónicos, conocidos como ulvanobiosas (Lahaye 2001; Robic *et al.* 2009) (Figura 1). Dichos disacáridos pueden variar dependiendo de la especie, localización y método de extracción (Costa *et al.* 2012, Peasura *et al.* 2015, Xiao *et al.* 2016).

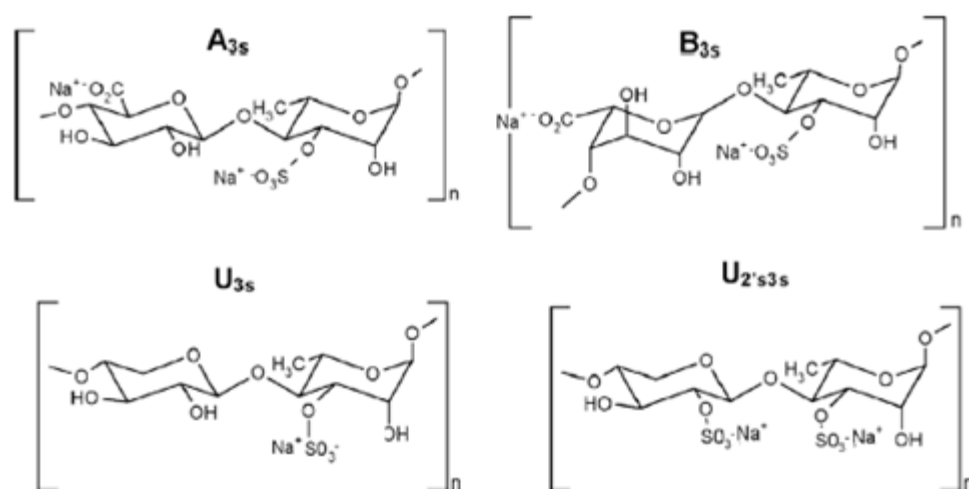


Figura 1. Estructuras de los disacáridos repetidos en ulván de *Ulva*: Ácidos Ulvanobiurónicos (A3S y B3S) y Ulvanobiosas (U3S y U2'S3S) (Lahaye 2001).

Se ha reportado que el ulván presenta una amplia gama de propiedades bioactivas tales como: anticancerígeno, anticoagulante, antioxidante, antimicótico, antitumoral y antiinflamatoria (Robic *et al.* 2009, Peña-Rodríguez *et al.* 2011, Alves *et al.* 2013). Su bioactividad está asociada principalmente al grado de sulfatación,

además del contenido de ácidos urónicos y al contenido de ramnosa (Jiao et al. 2011, Alves et al. 2013). Si bien existen diversos estudios que describen la composición del ulván y sus propiedades funcionales (Lahaye y Robic 2007; Robic et al. 2009; Usov y Zelinsky 2013), se desconoce cómo puede variar la composición del ulván en una misma especie en relación a las condiciones ambientales en que se desarrolla, tales como la temperatura y la luz.

La temperatura es un factor ambiental fundamental que controla el metabolismo del alga ya que altera la actividad enzimática, las tasas de respiración y fotosíntesis en los organismos (Xiao et al. 2016); esto, influye en la composición química celular, la absorción de nutrientes y las tasas de crecimiento (Singh & Singh 2015). En particular en el género *Ulva*, la tasa fotosintética generalmente aumenta con la temperatura (Kim et al. 2011, Xiao et al. 2016).

Por otro lado, la luz es una fuente de energía esencial para realizar actividad fotosintética y el crecimiento de organismos autótrofos, donde la irradiancia y el ciclo de luz-oscuridad desempeñan un papel importante en el metabolismo (Lüning, K. 1981, Singh & Singh 2015). La utilización de la luz durante las respuestas a corto plazo de la fotosíntesis depende fuertemente de la temperatura (Henley & Ramus 1989, Xiao et al. 2016).

Las propiedades nutricionales del alga verde han motivado su cultivo en estanques a nivel comercial en México para consumo humano. El cultivo en estanques permite regular algunas de las variables ambientales, como el aporte de nutrientes a través de fertilizaciones. Sin embargo, durante el cultivo las algas se exponen a condiciones variables de luz y temperatura que pueden influir en su composición química. En ese sentido el presente trabajo tiene como objetivo

conocer el efecto de la temperatura e irradiancia en el crecimiento de *Ulva* sp. y la composición del polisacárido soluble; además, determinar condiciones óptimas de dichas variables para mejorar el rendimiento y calidad del polisacárido.

2. HIPÓTESIS

Variación en las condiciones de temperatura e irradiancia en el cultivo en *Ulva* sp producirá cambios en el contenido y la composición de los polisacáridos solubles.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la temperatura e irradiancia en el contenido y composición de polisacáridos solubles y proteínas en el tejido de *Ulva* sp sometida a cultivo en condiciones de laboratorio.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la influencia de la temperatura e irradiancia respecto al contenido de ramnosa, ácidos urónicos y sulfatos (ulván).
2. Determinar el efecto de la temperatura e irradiancia en el contenido de proteínas en el tejido de *Ulva* sp en cultivo.

4. METODOLOGÍA

4.1 CULTIVO EN INCUBADORES

La muestra de *Ulva* sp fue colectada de las pozas de cultivo del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO-UABC), y se llevó al laboratorio donde se enjuagó con agua de mar filtrada. Posteriormente antes de iniciar el experimento las muestras fueron separadas en tres fracciones para ser sometidas a un proceso de aclimatación térmica (con duración de dos días); dicho proceso consistió en mantener una de las fracciones a 20 °C (temperatura promedio del cultivo en la fecha de colecta), mientras que las otras dos fracciones se llevaron a las temperaturas de 15 y 25 °C. La exposición a estas temperaturas se hizo de forma gradual, incrementando o disminuyendo 2 °C por día con el fin de evitar un shock térmico en el alga y con ello incrementar su estrés a dichas condiciones.

Posterior al periodo de aclimatación, la muestra de *Ulva* sp se separó en fracciones de 4 g de tejido fresco (1 g L^{-1}), en recipientes de 4 L de agua de mar filtrada e irradiada con luz UV y enriquecida con nitrato de amonio ($25 \text{ } \mu\text{mol}$) y ácido fosfórico ($2.5 \text{ } \mu\text{mol}$) para ser expuesta a tres condiciones de temperatura (15, 20 y 25 °C) y a dos irradiancias (30 y $200 \text{ } \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$) con un fotoperiodo de 12:12 (Luz:**O**scuridad; L:**O**). Los tratamientos se realizaron por triplicado ($n=3$).

Las condiciones de temperatura e irradiancia del presente trabajo fueron en base a: las temperaturas a las que se encuentra *Ulva* sp. en las pozas de cultivo del Instituto de Investigaciones Oceanológicas a lo largo del año; y en el caso de las irradiancias, se realizaron curvas P-E con el fin de determinar la irradiancia de compensación (I_c) e irradiancia de saturación (I_k) del tejido de pozas, siendo 30

$\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ un valor mayor al Ic encontrado para pozas, y $200 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ el valor promedio de la curva P-E.

Para mantener las muestras en movimiento cada cubeta experimental fue suministrada con aireación. Se hicieron mediciones de temperatura y pH tres veces al día (antes de encender la luz del incubador, durante el día y antes de apagar la luz). Cada tres días se realizaron recambios de agua con agua de mar filtrada y enriquecida. Después de siete días las algas se cosecharon para ser analizadas químicamente.

4.2 ANÁLISIS DE POLISACÁRIDOS SOLUBLES

4.2.1 Preparación de las muestras

Al final del periodo experimental las muestras fueron cosechadas y lavadas con agua desionizada con el fin de remover nitrógeno y sales, tras lo cual fueron secadas en estufa de convección a 60°C hasta peso constante. Posteriormente para homogenizar las muestras fueron pulverizadas con mortero.

4.2.2 Extracción de polisacáridos solubles

Para la cuantificación de los polisacáridos solubles, cuantificación de ramnosa y ácidos urónicos, se realizó el siguiente procedimiento de extracción: en tubos eppendorf, se colocaron 20 mg de muestra pulverizada y 2 mL de HCl 0.2 N, y la extracción se realizó en baño maría a 60°C durante 3 horas. Posteriormente fueron centrifugados a 4000 rpm por 5 minutos; de cada muestra se tomó 1 mL del sobrenadante y se diluyó a 40 mL (solución de trabajo para cuantificación de ramnosa y ácidos urónicos) (Figura 2).

La cuantificación de sulfatos, se realizó con el siguiente procedimiento: en tubos eppendorf, se colocaron 20 mg de muestra pulverizada y se agregaron 0.5 mL de HCl 2 N, las muestras se hidrolizaron en baño maría a 100°C. Posteriormente se centrifugaron a 4000 rpm por 5 minutos; de cada muestra se tomó una alícuota de 0.25 mL del sobrenadante el cual se diluyó a 5 mL (dilución 1:20) (Figura 2).

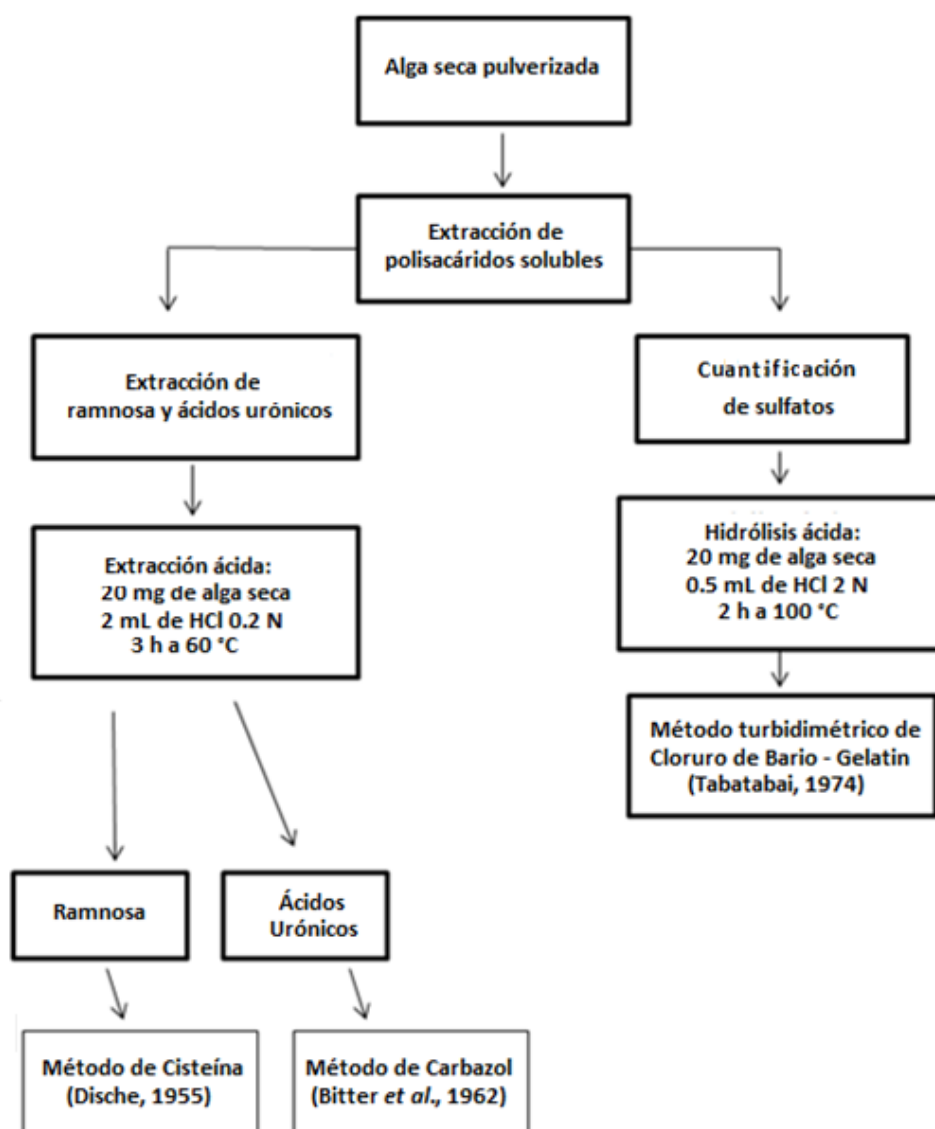


Figura 2. Procedimientos de extracción de polisacáridos solubles por medio de una extracción ácida (HCl 0.2 N) para ramnosa y ácidos urónicos y una hidrólisis ácida (HCl 2 N) para sulfatos.

4.2.2.1 Cuantificación y caracterización de polisacáridos solubles

a) Polisacáridos Solubles

El contenido de polisacáridos solubles se obtuvo en forma indirecta, considerando que el ulván está formado por una composición variable de ulvanobiosas y ulvanobiurónicos donde siempre una de las unidades es ramnosa, por lo que el contenido de ulván se obtuvo multiplicando por dos el contenido del azúcar ramnosa.

b) Ramnosa

La cuantificación de ramnosa se realizó por el método de cisteína (Dische, 1955), utilizando ramnosa como estándar ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$).

En tubos de ensayo, se añadieron 1 mL de muestra y 4.5 mL de H_2SO_4 concentrado, se agitó y se añadió 0.1 mL de la solución de cisteína al 3%, se agitó nuevamente y se dejó reposar por 30 minutos. Posteriormente se leyó su absorbancia a 396 y 427 nm.

La concentración de ramnosa se determinó a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Abs}_{\text{Rha}} = \text{Abs}_{396} - \text{Abs}_{427}$$

c) Ácidos Urónicos

La cuantificación de ácidos urónicos se determinó por el método de carbazol (Bitter y Muir, 1962), utilizando alginato como estándar ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$).

En tubos de ensayo, se añadieron 0.5 mL de muestra y 2.5 mL de H_2SO_4 -Borato de sodio 0.025 M, se agitó y se añadió 0.1 mL de carbazol al 0.125%, se agitó nuevamente y se dejó reposar por 20 minutos. Posteriormente se leyó su absorbancia a 530 nm.

d) Sulfatos

Se determinaron por el método turbidimétrico de Cloruro de Bario-Gelatin (Tabatabai, 1974, modificado por Craigie y Wen, 1984), empleando K_2SO_4 como estándar ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$).

En tubos eppendorf, se colocaron 20 mg de muestra y 0.5 mL de HCl 2 N y se hidrolizó por 2 horas a 100°C . Posteriormente, el hidrolizado fue aforado a 10 mL.

En tubos de ensayo, se añadieron 0.5 mL del hidrolizado y 5 mL de HCl 0.05 N y 0.25 mL de $BaCl_2$ -Gelatin, se agitó y se dejó reposar por 30 minutos. Posteriormente se leyó su absorbancia a 550 nm.

4.3 CONTENIDO DE PROTEÍNAS

El análisis de proteínas se realizó mediante una modificación al método de Rausch (1981) por medio de una extracción alcalina.

En tubos eppendorf se colocaron 20 mg de muestra pulverizada y 2 mL de NaOH 0.2 N, los cuales fueron colocados en baño maría a 95°C durante 30 minutos. Posteriormente fueron centrifugados a 4000 rpm por 15 minutos y del sobrenadante se tomó una alícuota de 0.25 mL el cual se aforó a 10 mL.

La determinación de proteínas se realizó mediante el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976), utilizando suero de albumina como estándar ($300 \mu\text{g mL}^{-1}$).

En tubos de ensayo, se añadieron 0.2 mL de muestra y 0.8 mL del reactivo Azul Brillante de Coomassie G-250, se agitaron y posteriormente se leyó su absorbancia a 595 nm.

4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron pruebas no paramétricas por medio del análisis de varianzas (ANOVA) de Kruskal-Wallis para muestras independientes ($\alpha=0.05$) (Zar, 1999a). En caso de obtener diferencias en al menos uno de los tratamientos, se realizaron contrastes múltiples por medio de la prueba de ranqueo de Wilcoxon-Wilcoxon para dos muestras independientes ($\alpha=0.05$) (Zar, 1999b). El análisis estadístico fue realizado en el programa Software Minitab 15.1.0.

Para realizar el análisis estadístico no paramétricos, previamente los datos fueron sometidos a pruebas de gaussianidad (prueba Q-Q_{plot}) y transformaciones Z, donde se demostró que los tratamientos no cumplen con los requerimientos para realizar estadísticos paramétricos, ya que no se ajustan a una distribución gaussiana (Zar, 1999).

5. RESULTADOS

5.1 Crecimiento en biomasa

El mayor crecimiento en biomasa fue de 9.93 ± 0.64 % en la muestra a 20°C en alta irradiancia, mientras que el menor incremento fue de -2.92 ± 0.69 % en la muestra a 25°C en baja irradiancia (Figura 3).

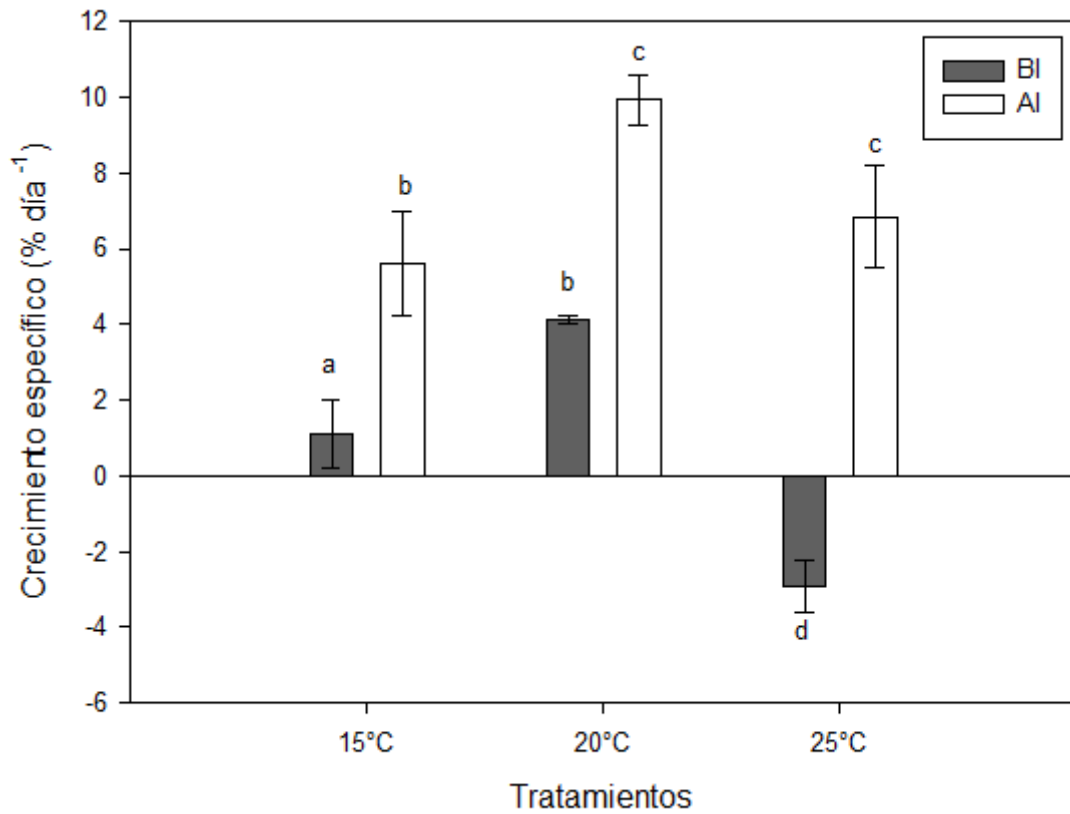


Figura 3. Crecimiento en biomasa en tratamientos a tres temperaturas y a dos irradiancias (BI: Baja Irradiancia ($30 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$), AI: Alta Irradiancia ($200 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$)). (Barras indican error estándar, $n=3$).

El análisis estadístico *a priori* de Kruskal-Wallis arrojó diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla I).

Tabla I. Análisis estadístico a priori de Kruskal-Wallis para comprobar el efecto de la temperatura e irradiancia en el incremento en biomasa de *Ulva* sp.

Variación	gl	H calculada	H crítica	α	Significancia
Tratamientos	5	14.64	5.99	0.05	*

- * = Diferencia significativa

El análisis estadístico *a posteriori* de Wilcoxon-Wilcoxon para dos muestras independientes muestra que hay diferencias significativas entre los tres tratamientos de temperatura y entre las dos condiciones de irradiancia en cada uno de ellos, con un mayor incremento en altas temperaturas y altas irradiancias (Tabla II).

Tabla II. Comparaciones de Wilcoxon-Wilcoxon entre tratamientos.

$\alpha = 0.05$ $T_L = 5$; $T_U = 16$		
Comparación	n_2/n_1	Significancia
15°C BI - 15°C AI	3	*
15°C BI - 20°C BI	3	*
15°C BI - 20°C AI	3	*
15°C BI - 25°C BI	3	*
15°C BI - 25°C AI	3	*
15°C AI - 20°C BI	3	NS
15°C AI - 20°C AI	3	*
15°C AI - 25°C BI	3	*
15°C AI - 25°C AI	3	NS
20°C BI - 20°C AI	3	*
20°C BI - 25°C BI	3	*

20°C BI - 25°C AI	3	*
20°C AI - 25°C BI	3	*
20°C AI - 25°C AI	3	NS
25°C BI - 25°C AI	3	*

- NS = Diferencia no significativa
- * = Diferencia significativa

5.2 Polisacáridos solubles

El mayor contenido de polisacáridos solubles fue de 35.72 ± 1.50 % en la muestra a 20°C en alta irradiancia, mientras que el menor contenido fue de 27.67 ± 0.74 % en la muestra a 15°C en baja irradiancia (Figura 4).

El análisis estadístico *a priori* de Kruskal-Wallis arrojó diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla III).

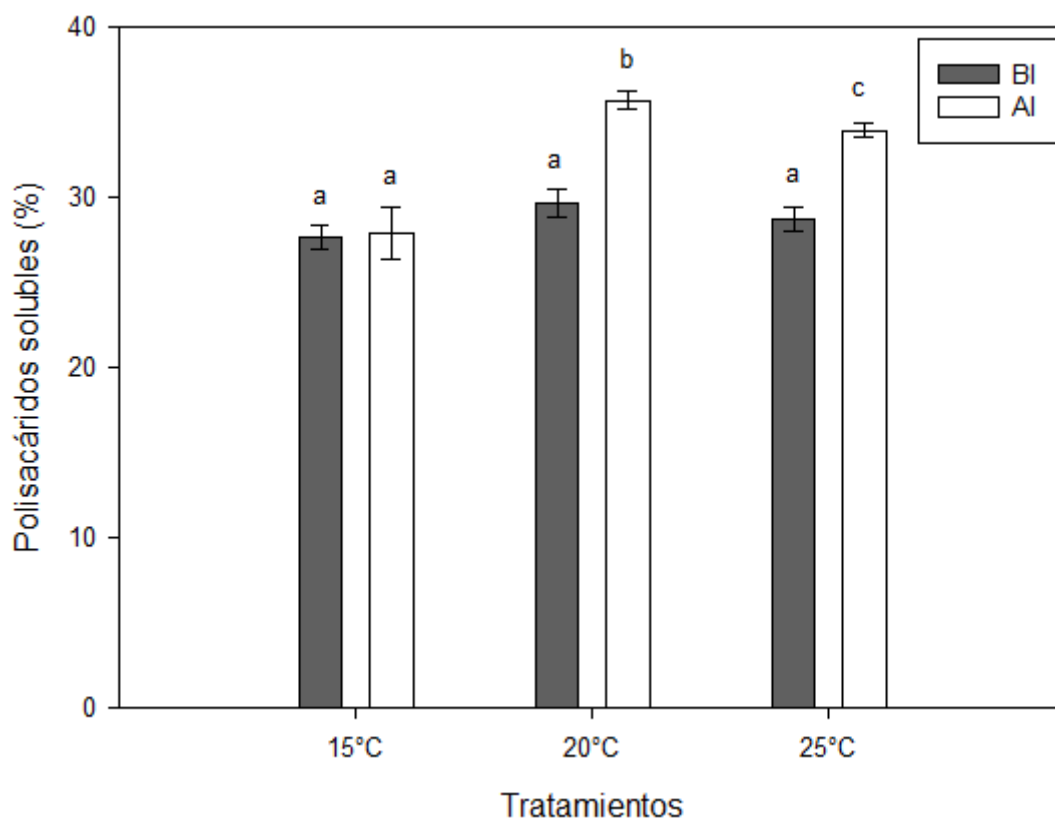


Figura 4. Contenido de polisacáridos solubles en tratamientos a tres temperaturas y a dos irradiancias (BI: Baja Irradiancia ($30 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$), AI: Alta Irradiancia ($200 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$)). (Barras indican error estándar, $n=3$).

Tabla III. Análisis estadístico *a priori* de Kruskal-Wallis para comprobar el efecto de la temperatura e irradiancia en el contenido de polisacáridos solubles de *Ulva* sp.

Grados de					
Variación	libertad	H calculada	H crítica	α	Significancia
Tratamientos	5	13.00	5.99	0.05	*

- * = Diferencia significativa

El análisis estadístico *a posteriori* de Wilcoxon-Wilcoxon para dos muestras independientes muestra que hay diferencias significativas en el contenido de polisacáridos solubles a 20°C y 25°C en condiciones de alta irradiancia (Tabla IV).

Tabla IV. Comparaciones de Wilcoxon-Wilcoxon entre tratamientos.

$\alpha = 0.05$ $T_L = 5$; $T_U = 16$		
Comparación	n_2/n_1	Significancia
15°C BI - 15°C AI	3	NS
15°C BI - 20°C BI	3	NS
15°C BI - 20°C AI	3	*
15°C BI - 25°C BI	3	NS
15°C BI - 25°C AI	3	*
15°C AI - 20°C BI	3	NS
15°C AI - 20°C AI	3	*
15°C AI - 25°C BI	3	NS
15°C AI - 25°C AI	3	*
20°C BI - 20°C AI	3	*
20°C BI - 25°C BI	3	NS
20°C BI - 25°C AI	3	*
20°C AI - 25°C BI	3	*
20°C AI - 25°C AI	3	*
25°C BI - 25°C AI	3	*

- NS = Diferencia no significativa
- * = Diferencia significativa

5.3 Ramnosa

El mayor contenido de ramnosa fue de 13.48 ± 0.23 % en la muestra a 20°C en baja irradiancia, mientras que el menor contenido fue de 12.29 ± 0.26 % en la muestra a 15°C en alta irradiancia (Figura 5).

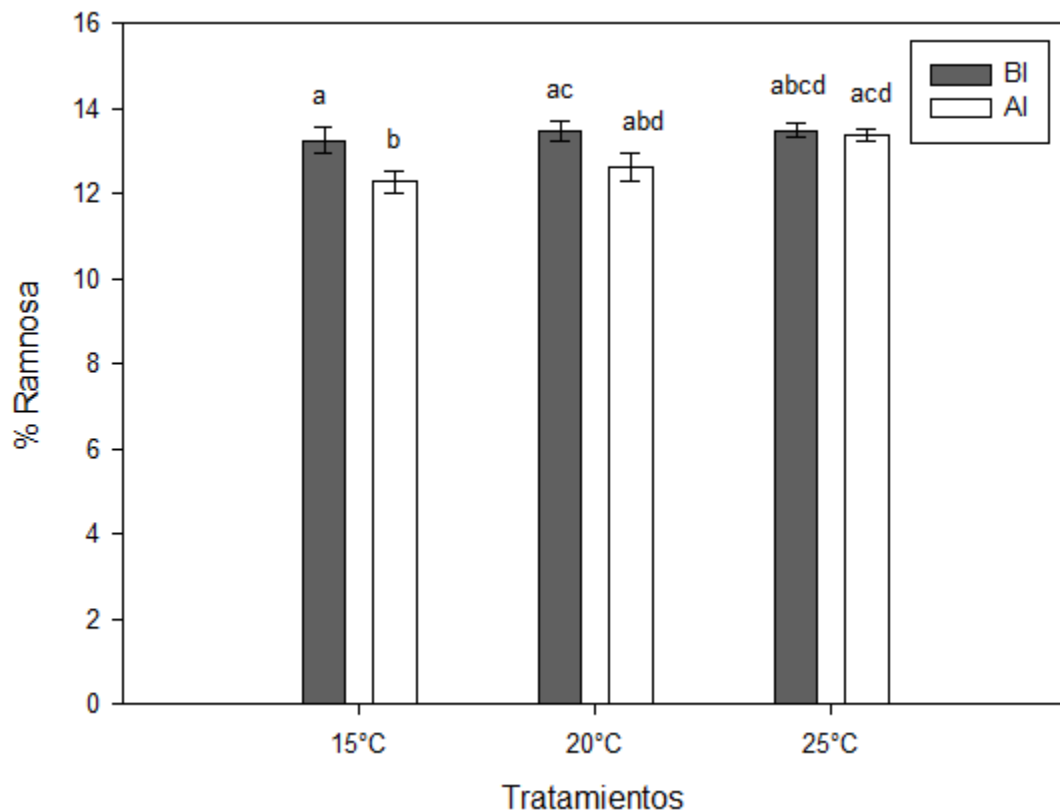


Figura 5. Contenido de ramnosa en tratamientos a tres temperaturas y a dos irradiancias (BI: Baja Irradiancia ($30 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$), AI: Alta Irradiancia ($200 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$)). (Barras indican error estándar, $n=3$).

El análisis estadístico *a priori* de Kruskal-Wallis arrojó diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla V).

Tabla V. Análisis estadístico *a priori* de Kruskal-Wallis para comprobar el efecto de la temperatura e irradiancia en el contenido de ramnosa de *Ulva* sp.

Grados de					
Variación	libertad	H calculada	H crítica	α	Significancia
Tratamientos	5	8.81	5.99	0.05	*

- * = Diferencia significativa

El análisis estadístico *a posteriori* de Wilcoxon-Wilcoxon para dos muestras independientes muestra que hay diferencias significativas en el contenido de ramnosa a 15°C y 20°C en las dos condiciones de irradiancia, así como en el contenido entre 15°C y 25°C en alta irradiancia (Tabla VI).

Tabla VI. Comparaciones de Wilcoxon-Wilcoxon entre tratamientos.

$\alpha = 0.05 \quad T_L = 5 ; T_U = 16$		
Comparación	n_2/n_1	Significancia
15°C BI - 15°C AI	3	*
15°C BI - 20°C BI	3	NS
15°C BI - 20°C AI	3	NS
15°C BI - 25°C BI	3	NS
15°C BI - 25°C AI	3	NS
15°C AI - 20°C BI	3	*
15°C AI - 20°C AI	3	NS
15°C AI - 25°C BI	3	NS
15°C AI - 25°C AI	3	*
20°C BI - 20°C AI	3	*
20°C BI - 25°C BI	3	NS
20°C BI - 25°C AI	3	NS
20°C AI - 25°C BI	3	NS
20°C AI - 25°C AI	3	NS
25°C BI - 25°C AI	3	NS

- NS = Diferencia no significativa
- * = Diferencia significativa

5.4 Sulfatos

El mayor contenido de sulfatos fue de 11.27 ± 0.66 % en la muestra a 20°C en alta irradiancia, mientras que el menor contenido fue de 8.55 ± 0.19 % en la muestra a 15°C en baja irradiancia (Figura 6).

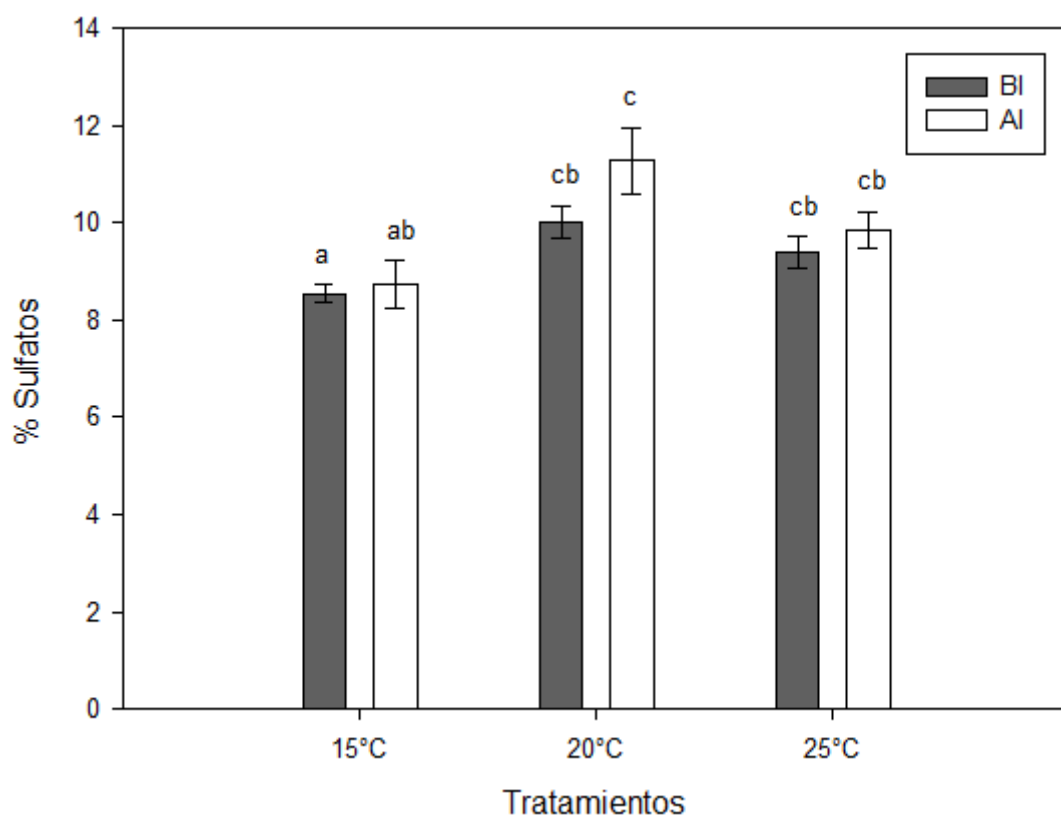


Figura 6. Contenido de sulfatos en tratamientos a tres temperaturas y a dos irradiancias (BI: Baja Irradiancia ($30 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$), AI: Alta Irradiancia ($200 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$)). (Barras indican error estándar, $n=3$).

El análisis estadístico *a priori* de Kruskal-Wallis arrojó diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla VII).

Tabla VII. Análisis estadístico *a priori* de Kruskal-Wallis para comprobar el efecto de la temperatura e irradiancia en el contenido de sulfatos de *Ulva* sp.

Variación	Grados de libertad	H calculada	H crítica	α	Significancia
Tratamientos	5	11.15	5.99	0.05	*

* = Diferencia significativa

El análisis estadístico *a posteriori* de Wilcoxon-Wilcoxon para dos muestras independientes no muestra diferencias en el contenido de sulfatos entre las condiciones de irradiancia para los tratamientos de temperatura, sin embargo se detectaron diferencias significativas a 15 °C con respecto a 20°C y 25 °C en condiciones de baja irradiancia, así como en el contenido entre 15 °C y 20 °C en alta irradiancia (Tabla VIII).

Tabla VIII. Comparaciones de Wilcoxon-Wilcoxon entre tratamientos.

$\alpha = 0.05$ $T_L = 5$; $T_U = 16$		
Comparación	n_2/n_1	Significancia
15°C BI - 15°C AI	3	NS
15°C BI - 20°C BI	3	*
15°C BI - 20°C AI	3	*
15°C BI - 25°C BI	3	*
15°C BI - 25°C AI	3	*
15°C AI - 20°C BI	3	NS
15°C AI - 20°C AI	3	*
15°C AI - 25°C BI	3	NS
15°C AI - 25°C AI	3	NS
20°C BI - 20°C AI	3	NS
20°C BI - 25°C BI	3	NS
20°C BI - 25°C AI	3	NS
20°C AI - 25°C BI	3	NS
20°C AI - 25°C AI	3	NS

25°C BI - 25°C AI

3

NS

- NS = Diferencia no significativa
- * = Diferencia significativa

5.5 Ácidos Urónicos

El mayor contenido de ácidos urónicos fue de 11.82 ± 0.29 % en la muestra a 20°C en alta irradiancia, mientras que en condiciones de baja irradiancia se presentaron contenidos similares siendo el menor de 5.86 ± 0.49 % en la muestra a 25°C (Figura 7).

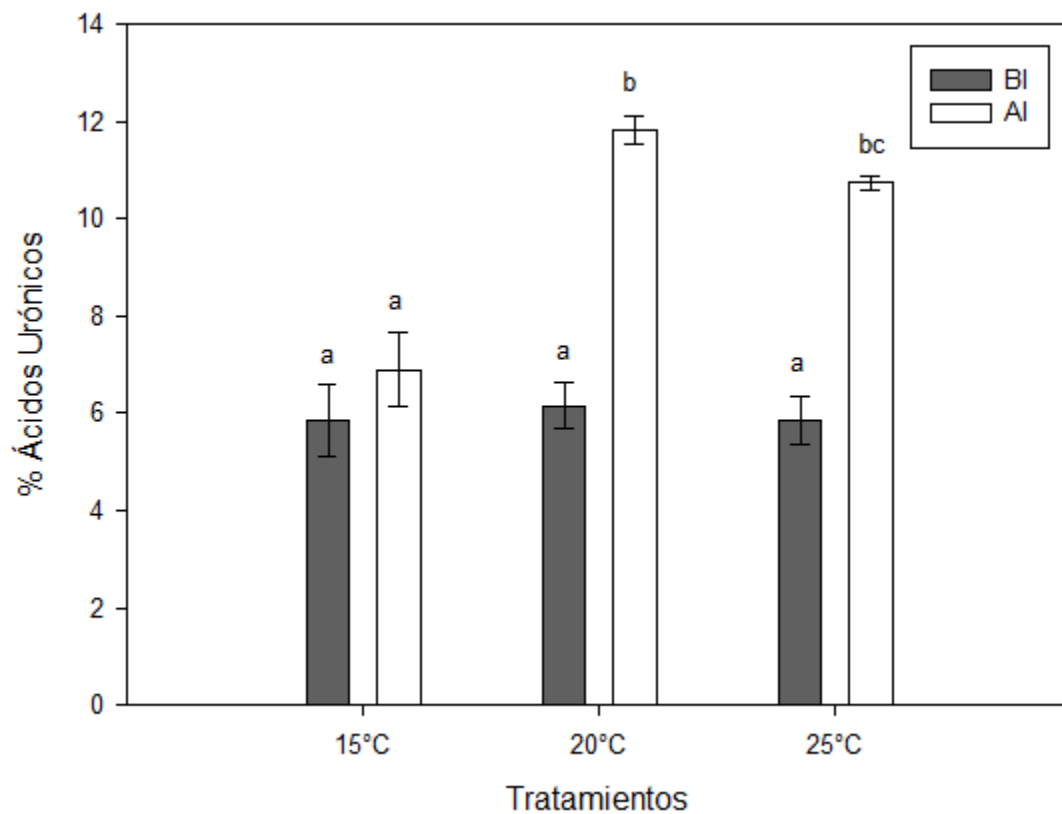


Figura 7. Contenido de ácidos irónicos en tratamientos a tres temperaturas y a dos irradiancias (BI: Baja Irradiancia ($30 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$), AI: Alta Irradiancia ($200 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$)). (Barras indican error estándar, $n=3$).

El análisis estadístico *a priori* de Kruskal-Wallis arrojó diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla IX).

Tabla IX. Análisis estadístico *a priori* de Kruskal-Wallis para comprobar el efecto de la temperatura e irradiancia en el contenido de ácidos urónicos de *Ulva* sp.

Variación	Grados de libertad	H calculada	H crítica	α	Significancia
Tratamientos	5	12.51	5.99	0.05	*

- * = Diferencia significativa

El análisis estadístico *a posteriori* de Wilcoxon-Wilcoxon para dos muestras independientes muestra que hay diferencias significativas en el contenido de ácidos urónicos a 20°C y 25°C con respecto a 15°C en condiciones de alta irradiancia. Las condiciones de baja irradiancia no mostraron diferencias significativas entre temperaturas (Tabla X).

Tabla X. Comparaciones de Wilcoxon-Wilcoxon entre tratamientos.

$\alpha = 0.05 \quad T_L = 5 ; T_U = 16$		
Comparación	n_2/n_1	Significancia
$15^{\circ}\text{C BI} - 15^{\circ}\text{C AI}$	3	NS
$15^{\circ}\text{C BI} - 20^{\circ}\text{C BI}$	3	NS
$15^{\circ}\text{C BI} - 20^{\circ}\text{C AI}$	3	*
$15^{\circ}\text{C BI} - 25^{\circ}\text{C BI}$	3	NS

15°C BI - 25°C AI	3	*
15°C AI - 20°C BI	3	NS
15°C AI - 20°C AI	3	*
15°C AI - 25°C BI	3	NS
15°C AI - 25°C AI	3	*
20°C BI - 20°C AI	3	*
20°C BI - 25°C BI	3	NS
20°C BI - 25°C AI	3	*
20°C AI - 25°C BI	3	*
20°C AI - 25°C AI	3	NS
25°C BI - 25°C AI	3	*

- NS = Diferencia no significativa
- * = Diferencia significativa

5.6 Proteínas

El mayor contenido de proteínas fue de 13.39 ± 0.22 % correspondió a la muestra de 15°C en baja irradiancia, mientras que el menor contenido fue de 11.57 ± 0.09 % en la muestra a 15°C en alta irradiancia (Figura 8).

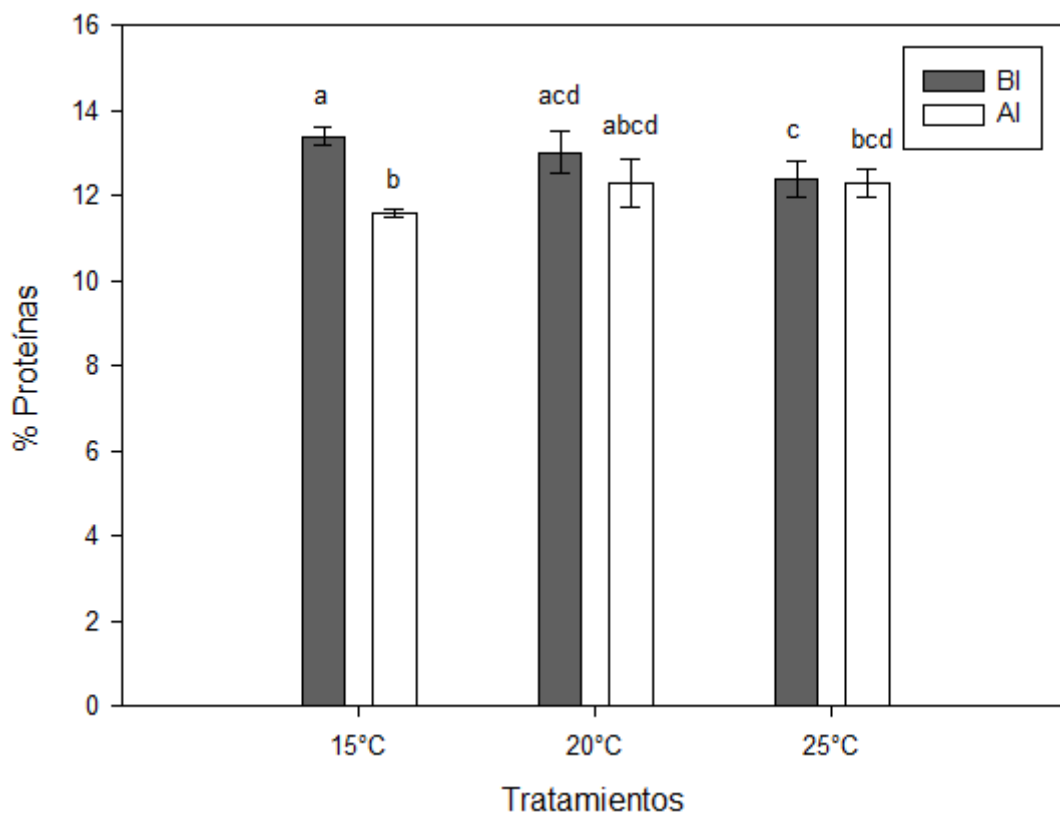


Figura 8. Contenido de proteínas en tratamientos a tres temperaturas y a dos irradiancias (BI: Baja Irradiancia ($30 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$), AI: Alta Irradiancia ($200 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$)). (Barras indican error estándar, $n=3$).

El análisis estadístico *a priori* de Kruskal-Wallis arrojó diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla XI).

Tabla XI. Análisis estadístico *a priori* de Kruskal-Wallis para comprobar el efecto de la temperatura e irradiancia en el contenido de proteínas de *Ulva* sp.

Grados de					
Variación	libertad	H calculada	H crítica	α	Significancia
Tratamientos	5	16.53	5.99	0.05	*

- * = Diferencia significativa

El análisis estadístico *a posteriori* de Wilcoxon-Wilcoxon para dos muestras independientes muestra que hay diferencias significativas en el contenido de proteínas a 15°C entre las dos condiciones de irradiancia y la temperatura de 25°C mostró diferencias con respecto a 15°C y 20°C sólo en condiciones de baja irradiancia (Tabla XII).

Tabla XII. Comparaciones de Wilcoxon-Wilcoxon entre tratamientos.

$\alpha = 0.05 \quad T_L = 5 ; T_U = 16$		
Comparación	n_2/n_1	Significancia
15°C BI - 15°C AI	3	*
15°C BI - 20°C BI	3	NS
15°C BI - 20°C AI	3	NS
15°C BI - 25°C BI	3	*
15°C BI - 25°C AI	3	*
15°C AI - 20°C BI	3	*
15°C AI - 20°C AI	3	NS
15°C AI - 25°C BI	3	*
15°C AI - 25°C AI	3	NS
20°C BI - 20°C AI	3	NS
20°C BI - 25°C BI	3	NS
20°C BI - 25°C AI	3	NS
20°C AI - 25°C BI	3	NS
20°C AI - 25°C AI	3	NS
25°C BI - 25°C AI	3	NS

- NS = Diferencia no significativa
- * = Diferencia significativa

6. DISCUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la temperatura e irradiancia influyen en el metabolismo de *Ulva* sp. ya que se observó que variaciones de dichas condiciones produjeron cambios en el contenido y composición de polisacáridos solubles, proteínas y pigmentos. Siendo la temperatura una variable considerada capaz de afectar el metabolismo del alga (Lobban y Harrison, 1994), y controlar la actividad enzimática afectando las tasas de respiración y fotosíntesis (Davison, 1991).

Los crecimientos fueron estimulados por la intensidad de luz, ya que los máximos se presentaron en condiciones de alta irradiancia, siendo las temperaturas de 20 y 25 °C las que presentaron las tasas de crecimiento específico más altas con valores de 9.93 ± 0.64 y 6.85 ± 1.36 (% día⁻¹) respectivamente. Xiao et al. (2016) reportan valores de crecimiento específico de 16 % día⁻¹ para *U. prolifera* a 20 °C, mientras que Liu & Dong (2001) reportan valores de 12 % día⁻¹ para *U. pertusa* a esta temperatura.

La extracción de polisacáridos solubles de *Ulva* sp. se realizó en medio ácido debido a la mayor solubilidad de los polisacáridos ácidos y neutros y además presenta un mayor contenido de sulfatos (Percival 1964).

El contenido de polisacáridos solubles en medio ácido (27-35%) mostró una relación positiva con respecto a la temperatura en condiciones de alta irradiancia, donde el menor contenido corresponde a la temperatura de 15°C e incrementó en las temperaturas de 20 y 25 °C con valor máximo de 35.72 ± 0.53 a 20 °C. Estos valores coinciden con lo reportado por Alves et al. (2010), donde indican que el

contenido de polisacáridos solubles puede ser alrededor del 30 % de la biomasa del alga. Lahaye & Robic (2007) reportan que los polisacáridos de la pared celular representan entre el 38 y 54% del peso fresco del alga, siendo los polisacáridos solubles sólo una fracción de dichos polisacáridos, los cuales pueden variar entre 18 y 30%.

En la composición del polisacárido soluble en medio ácido el azúcar ramnosa fue el componente principal en todos los tratamientos siendo mayor en condiciones de baja irradiancia a 20 y 25 °C con valores máximos de 13.48 ± 0.23 y 13.48 ± 0.16 respectivamente.

Los grupos sulfatos encontrados en el presente trabajo (8 - 11 %) son similares a los reportados para *U. armoricana* (10 a 14 %) (Robic et al., 2009). En este estudio el contenido de sulfatos aumentó en razón directa con la temperatura en condiciones de alta irradiancia, lo cual es similar al patrón reportado para agarofitas y carragenofitas (Craigie & Wen, 1984; López-Acuña et al., 2002) y contrasta con lo reportado por Mesa-Soria (2008), que encontró una relación inversa de sulfatos con la temperatura para *U. clathrata* a una irradiancia de $150 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

El contenido de ácidos urónicos (5 - 11 %) fue similar a lo reportado por Hernandez-Garibay (2011) para *U. clathrata* (11.55 %). En este estudio el contenido de ácidos urónicos aumentó de manera directa con la temperatura en altas irradiancias. De acuerdo a la estructura química idealizada para ulván y considerando que los ácidos urónicos estuvieron presente en todos los extractos en medio ácido, nuestros resultados concuerdan con la estructura de ácidos ulvanobiuronicos A3S y B3S. Además, dichos compuestos son de gran importancia

debido a que están relacionados con actividades antitrombóticas (El-Baky, 2009; Usman et al., 2017).

Respecto a la composición de los polisacáridos solubles, las principales variaciones se dieron en el contenido de ácidos urónicos ($\pm 5.9\%$) y sulfatos ($\pm 2.7\%$), mientras que el contenido de ramnosa fue relativamente constante ($\pm 1.19\%$); con una tendencia significativa a incrementar con la temperatura.

El contenido de polisacáridos solubles fue realizado en base a la sumatoria de las componentes del mismo, sin embargo la xilosa siendo parte de la estructura química de dicho polisacárido no fue cuantificada en el presente trabajo por lo que el contenido podría estar siendo subestimado.

El contenido de proteínas en el tejido en el presente trabajo concuerda con los intervalos de proteína reportados para el género *Ulva* (10 a 26%) por Fleurence (1999) y con lo reportado por Darcy-Vrillon (1993) de 10 al 30%. De acuerdo a Fleurence (1999) las variaciones en el contenido de proteína pueden atribuirse a diferentes factores tales como la temporada estacional o las condiciones de almacenamiento del organismo. En el presente trabajo dicho contenido fue mayor en condiciones de baja temperatura y baja irradiancia, contrario a lo encontrado por Meza-Soria (2008) donde reportó un incremento en el contenido de proteínas al aumentar la temperatura con un máximo de 21 % a 30 °C para *U. clathrata*.

7. CONCLUSIONES

Los factores ambientales de temperatura e irradiancia afectaron el contenido y composición de polisacáridos solubles así como el contenido de proteínas.

Las plantas sometidas a 20 °C de temperatura presentaron el mayor contenido de ramnosa (en condiciones de baja irradiancia) y el mayor contenido de polisacáridos solubles, sulfatos y ácidos urónicos (en condiciones de alta irradiancia).

En el polisacárido soluble obtenido en medio ácido se encontró ramnosa, grupos sulfatos y ácidos urónicos, siendo el azúcar ramnosa el componente principal lo cual concuerda con la estructura química del polisacárido sulfatado no galactano conocido como ramnano o ulván.

8. BIBLIOGRAFÍA

Alves, A., Caridade, S.G., Mano, J.F., Sousa, R.A. & Reis, R.L. (2010). Extraction and physico-chemical characterization of a versatile biodegradable polysaccharide obtained from green algae. *Carbohydrate Research* 345: 2194–2200.

Alves, A., Sousa, R.A. & Reis, R.L. (2013). A practical perspective on ulvan extracted from green algae. *Journal of Applied Phycology* 25: 407-424.

Bitter, T., & Muir, H. M. (1962). A modified uronic acid carbazole reaction. *Analytical Biochemistry* 4: 330-334.

Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Costa, C., Alves, A., Pinto, P. R., Sousa, R. A., Borges da Silva, E. A., Reis, R. L. & Rodrigues, A. E. (2012). Characterization of ulvan extracts to assess the effect of different steps in the extraction procedure. *Carbohydrate Polymers* 88: 537-546.

Craigie, J.S. & Wen, Z.C. (1984). Effects of temperature and tissue age on gel strength and composition of agar from *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae) *Canadian Journal of Botany* 62: 1665-1670.

Darcy Vrillon, B. (1993). Nutritional aspects of the developing use of marine macroalgae for the human food industry. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 44: 23-35.

Davison, I.R. (1991). Environmental effects on algal photosynthesis: Temperature. *Journal Phycology* 27: 2-8.

Dische, Z. (1955). New color reactions for determination of sugars in polysaccharides. *Methods of biochemical analysis* 2: 313-358.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.

El-Baky, H.A., Baz, F.K., Baroty, G.S. (2009) Potential biological properties of sulphated polysaccharides extracted from the macroalgae *Ulva lactuca* L. *Acad. J. Cancer Research* 2: 01-11.

Fleurence, Joël. (1999). Seaweeds proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends in Food Science & Technology*, 10: 25-28.

Gao, G., Zhong, Z., Zhou, X., & Xu, J. (2016). Changes in morphological plasticity of *Ulva prolifera* under different environmental conditions: A laboratory experiment. *Harmful Algae* 59: 51-58.

Harrysson, H., Hayes, M., Eimer, F., Carlsson, N.G., Toth, G.B. & Undeland, I. (2018). Production of protein extracts from Swedish red, green, and brown seaweeds, *Porphyra umbilicalis* Kützinger, *Ulva lactuca* Linnaeus, and *Saccharina latissima* Linnaeus J. V. Lamouroux using three different methods. *Journal of Applied Phycology* 30: 3565-3580.

Henley, W. J., & Ramus, J. (1989). Photoacclimation and growth rate responses of *ulva rotundata* (chlorophyta) to intraday variations in growth irradiance. *Journal of Phycology* 25: 398-401.

Hernández-Garibay, Enrique (2011). Caracterización de polisacáridos sulfatados no galactanos de algas marinas y factores que influyen su composición. Tesis de doctorado Facultad de Ciencias Marinas, Instituto de Investigaciones Oceanológicas, UABC Ensenada BC., México.

Jensen, A. (1993). Present and future needs for algae and algal products. *Hydrobiologia* 260/261: 15-23.

Jiao, G., Yu, G., Zhang, J., & Ewart, H. S. (2011). Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Marine Drugs* 9: 196-223.

Kim, J. H., Kang, E. J., Park, M. G., Lee, B. G., & Kim, K. Y. (2011). Effects of temperature and irradiance on photosynthesis and growth of a green-tide-forming species (*Ulva linza*) in the Yellow Sea. *Journal of Applied Phycology* 23: 421-432.

Kloareg, B. & Quatrano, R.S. (1988). Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanography Marine Biology Annual Review*, 26: 259-315.

Lahaye, M. (2001). Chemistry and physico-chemistry of phycocolloids. *Cah Biol Mar* 42: 137-157.

Lahaye, M. & Robic, A. (2007). Structure and function properties of Ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules* 8: 1765-1774.

Liu, J. & Dong, S. (2001). Nutrient metabolism and the major nutrient uptake kinetics of seaweeds. *Plant physiol commun* 37: 325-330.

Lobban C.S. & Harrison P.J. 1994. *Seaweed Ecology and Physiology*. Cambridge University Press, Cambridge 366pp.

López Acuña, L.M., Pacheco Ruíz, I. Hernández Garibay, E. y Zertuche González, J.A. (2002). Caracterización del carragenano de *Chondracanthus pectinatus* (Rhodophyta: Gigartinales), *Ciencias Marinas* 28: 311-318.

Lüning K. (1981). Light in The Biology of Seaweeds. *Botanical Monographs* 17: 326-355.

Mao, W.J., Zang, X.X., Li, Y. & Zhang, H.J. (2006). Sulfated polysaccharides from green algae *Ulva conglobata* and their anticoagulant activity. *Journal of Applied Phycology* 18: 9-14.

McCandless, E.L. (1981). Polysaccharides of the seaweeds in *The Biology of Seaweeds* 559-588.

Meza-Soria, Ramón. (2008). Efecto de la temperatura en la composición del alga verde *Ulva clathrata* en condiciones de cultivo. Tesis de licenciatura Universidad Autónoma de Baja California Ensenada BC, México.

Painter, T.J. (1983). Algal polysaccharides. Aspinall GO. The Polysaccharides. New York Academic Press 2: 195-285.

Paradossi, G., Cavalieri, F., & Chiessi, E. (2002). A conformational study on the algal polysaccharide ulvan. *Macromolecules* 35: 6404-6411.

Peasura, N., Laohakunjit, N., Kerdchoechuen, O., & Wanlapa, S. (2015). Characteristics and antioxidant of *Ulva intestinalis* sulphated polysaccharides extracted with different solvents. *International Journal of Biological Macromolecules* 81: 912-919.

Peña-Rodríguez, A., Mawhinney, T. P., Ricque-Marie, D., & Cruz-Suárez, L. E. (2011). Chemical composition of cultivated seaweed *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh. *Food Chemistry* 129: 491-498.

Percival, E. (1964). Polysaccharides of the green seaweeds *Ulva lactuca* and *Enteromorpha compressa*. *Proc Int Seaweed Symp* 4: 360–365.

Percival, E., & McDowell, R.H. (1967). Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides London: Academic Press.

Quemener, B., Lahaye. M., Bobin-Dubigeon, C. (1997). Sugar determination in ulvans by a chemical-enzymatic method coupled to high performance anion exchange chromatography. *J Appl Phycol* 9: 179–188

Rausch, T. (1981). The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass. I. comparison of methods for extracting protein. *Hydrobiologia* 78: 237-251.

Ray, B., & Lahaye, M. (1995). Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva rigida* (Ulvales, Chlorophyta). Extraction and chemical composition. *Carbohydrate Research* 274: 251-261.

Robic, A., Rondeau-Mouro, C., Sassi, J. F., Lerat, Y. & Lahaye, M. (2009). Structure and interactions of ulvan in the cell wall of the marine green algae *Ulva rotundata* (Ulvales Chlorophyceae). *Carbohydrate Polymers* 77: 206-216.

Singh, S. P., & Singh, P. (2015). Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 50: 431-444.

Tabarsa, M., You, S.G., Dabaghian, E.H., & Surayot, U. (2017). Water-soluble polysaccharides from *Ulva intestinalis*: Molecular properties, structural elucidation and immunomodulatory activities. *Journal of Food and Drug Analysis* 3: 1-10.

Tabatabai, M.A. (1974). Determination of sulfate in water samples. *Environmental letters* 10: 11-13.

Usman, A., Khalid, S., Usman, A., Hussain, Z., & Wang, Y. (2017). Algal Polysaccharides, Novel Application, and Outlook in Algae Based Polymers, Blends, and Composites: *Chemistry, Biotechnology and Materials Science* 5: 115-153.

Usov, A. I. & Zelinsky, N. D. (2013). Chemical structures of algal polysaccharides in *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals* 23-86.

Wood C.G. (1974). Seaweed extracts: a unique ocean resource. *J Chem Educ* 51: 449-452.

Xiao, J., Zhang, X., Gao, C., Jiang, M., Li, R., Wang, Z., Li Y., Fan S. & Zhang X. (2016). Effect of temperature, salinity and irradiance on growth and photosynthesis of *Ulva prolifera*. *Acta Oceanologica Sinica* 35: 114-121.

Yaich, H., Garna, H., Besbes, S., Paquot, M., Blecker, C., & Attia, H. (2013). Effect of extraction conditions on the yield and purity of ulvan extracted from *Ulva lactuca*. *Food Hydrocolloids* 31: 375-382.

Zar, Jerrold H. (1999a). Nonparametric analysis of variance en Multisample hypotheses: the analysis of variance. *Biostatistical Analysis*. 4th Edition. PrenticeHall, 10: 195-200.

Zar, Jerrold H. (1999b). Paired-sample testing by ranks en Paired-sample hypotheses. *Biostatistical Analysis*. 4th Edition. PrenticeHall, 9: 165-169.

Zhao, X., Tang, X., Zhang, H., Qu, T., & Wang, Y. (2016). Photosynthetic adaptation strategy of *Ulva prolifera* floating on the sea surface to environmental changes. *Plant Physiology and Biochemistry* 107: 116-125.