



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**Aplicación de sistemas bifásicos acuosos (ATPSs) a la
extracción de proteínas de biomasa algal**

Autora: Sara Catalina Darai

Tutor/es: David Moldes Plaza / Marisol Vega Alegre

Resumen

El mundo afrontará un gran crecimiento en la demanda de proteína en las próximas décadas como consecuencia del aumento de la población. Debido a que la producción de proteína de origen animal es responsable de numerosos y graves problemas medioambientales, se precisan fuentes alternativas que garanticen el suministro de este macronutriente tan vital en la dieta. En este sentido, las microalgas han surgido como una fuente rica en proteínas de alta calidad y otras biomoléculas de interés tecnológico y agroalimentario, con la ventaja de que pueden cultivarse a muy bajo coste en fotobiorreactores de tratamiento de aguas residuales ricas en nutrientes, valorizando de este modo las aguas residuales mediante un concepto de economía circular.

Sin embargo, extraer las proteínas de la matriz celular y separarlas del resto de biomoléculas no es una tarea sencilla, debido a la rigidez de la pared celular de las microalgas y a la falta de especificidad de los tratamientos de extracción disponibles. En este trabajo se ha investigado el potencial de los sistemas bifásicos acuosos (ATPSs) que combinan disolventes eutécticos profundos (DESs) naturales y biodegradables con disoluciones acuosas de sales de fosfato, para recuperar selectivamente proteínas contenidas en biomasa liofilizada de la microalga verde *Scenedesmus almeriensis*, así como su capacidad para separar las proteínas de los carbohidratos. En primer lugar, se han construido los diagramas de fases de tres ATPSs diferentes (Bet:2LA-K₂HPO₄, ChCl:2Urea – K₂HPO₄, y ChCl:2Urea – K₃PO₄), aplicando el método de valoración de punto de niebla (*Cloud Point Titration Method*) para seleccionar la composición idónea de cada sistema. Posteriormente, se ha llevado a cabo un diseño de experimentos para estudiar el efecto de dos factores: tipo de ATPS empleado (3 niveles) y tipo de pretratamiento de la muestra, morterada y sin morterar (2 niveles), en la extracción de proteínas, carbohidratos, y su separación, de la microalga *Scenedesmus almeriensis* liofilizada, crecida en aguas de purín de cerdo. Simultáneamente, para comprobar si la matriz tiene un efecto en la capacidad de los ATPS para recuperar la proteína, se aplicó el mismo diseño experimental a un patrón de BSA (proteína pura). El análisis de los resultados mediante ANOVA mostró que, para la BSA, tanto el ChCl:2Urea-K₃PO₄ como el Bet:2LA-K₂HPO₄ dan altos rendimientos de extracción de proteína, mientras que para la biomasa algal el ATPS ChCl:2Urea-K₃PO₄ es el que extrae significativamente más proteína que los otros dos (15%), minimizando simultáneamente la coextracción de carbohidratos (<4%). No se observaron diferencias significativas en la extracción con estos ATPSs de biomasa pulverizada o no triturada. Así, los ATPS se presentan como una tecnología prometedora para la extracción de proteínas de microalgas.

Abstract

The world will face a great protein demand in the coming decades, due to the rapid population growth. Since the production of animal protein is responsible for several environmental problems, alternative protein sources are needed to ensure the supply of this vital macronutrient in the diet. In this sense, microalgae have emerged as a rich source of high-quality proteins and other biomolecules of technological and agrifood interest, with the additional advantage that they can be grown at very low cost in wastewater treatment photobioreactors, valorizing in this way the wastewater through the concept of circular bioeconomy.

However, extracting proteins from the microalgae cell matrix and separating them from the other biomolecules is not an easy task, due to the rigidity of their cell wall and the lack of specificity of the available extraction treatments. In this work, the potential of aqueous biphasic systems (ATPSs) that combine natural and biodegradable deep eutectic solvents (DESs) with aqueous solutions of phosphate salts, have been used investigated to selectively recover proteins contained in lyophilized biomass of green microalgae *Scenedemus almeriensis*, as well as its ability to separate proteins from carbohydrates. First, the phase diagrams of three different ATPS (Bet:2LA-K₂HPO₄, ChCl:2Urea – K₂HPO₄, y ChCl:2Urea – K₃PO₄) were built, applying the cloud point titration method, to select the ideal composition of each system. Subsequently, a design of experiments was carried out to study the effect of two factors: type of ATPS used (three levels), and type of the pretreatment on the sample, mortared and without mortar (two levels), in the extraction of proteins, carbohydrates, and their separation from the microalgae, grown in pig slurry. Simultaneously, to check whether the matrix affects the ability of ATPS to recover proteins, the same experimental design was implemented to a BSA protein standard. The analysis of the results by ANOVA showed that, for BSA, both ChCl:2Urea-K₃PO₄ and Bet:2LA-K₂HPO₄ provide high protein extraction yields, while for the algal biomass the ATPS ChCl:2Urea-K₃PO₄ is the one that extracts significantly more protein than the other two (up to 15%), and at the same time minimizes the carbohydrate coextraction (<4%). No significant differences were observed in the extraction with these ATPSs from mortared or non-mortared biomass. Therefore, ATPSs arise as a promising technology for the extraction of proteins from microalgae.

Tabla de Abreviaturas

ATPS: Aqueous Two-Phase Systems / sistemas acuosos bifásicos

BCA: Bicinchoninic acid / ácido bicinconínico

Bet: Betaína

BSA: Bovine serum albumin / albúmina de suero bovino

ChCl: Cloruro de colina

DES: Deep eutectic solvents / disolventes eutécticos profundos

Gly: Glicerol

H₀: Hipótesis nula

H₁: Hipótesis alternativa

HBA: Hydrogen bond acceptor / aceptor de enlaces de hidrógeno

HBD: Hydrogen bond donor / dador de enlaces de hidrógeno

LA: Ácido levulínico

LSD: Least significant difference / diferencia mínima significativa

MAE: Microwave-assisted extraction / extracción asistida por microondas

PEG: Polietilenglicol

SFE: Supercritical Fluid Extraction / extracción con fluidos supercríticos

WW: Wastewaters / aguas residuales

Contenido

1.	INTRODUCCIÓN.....	6
1.1.	LA DEMANDA CRECIENTE DE PROTEÍNAS.....	6
1.2.	MICROALGAS COMO FUENTE DE PROTEÍNAS.....	7
1.3.	BIORREFINERÍAS DE MICROALGAS.....	7
1.4.	MÉTODOS TRADICIONALES DE OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS.....	10
1.5.	DISOLVENTES EUTÉCTICOS PROFUNDOS (DESS) Y SISTEMAS ATPS PARA LA OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS.....	11
1.5.1.	DESS (Deep Eutectic Solvents).....	11
1.5.2.	SISTEMAS ATPSs BASADOS EN DESS.....	12
2.	OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	16
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1.	PREPARACIÓN DE LOS DESS.....	17
3.2.	PREPARACIÓN DE ATPS.....	17
3.2.1.	CONSTRUCCIÓN DE DIAGRAMAS DE FASE.....	18
3.3.	CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA.....	19
3.3.1.	ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	19
3.3.2.	ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS.....	20
3.3.3.	ANÁLISIS DE LÍPIDOS.....	20
3.3.4.	ANÁLISIS DE HUMEDAD Y CENIZAS.....	20
3.4.	PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.....	21
3.5.	ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS.....	21
3.5.1.	MÉTODO BCA PARA ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	21
3.5.2.	MÉTODO DEL FENOL-SULFÚRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS.....	23
3.6.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	24
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
4.1.	COMPOSICIÓN DE LA BIOMASA.....	27
4.2.	DIAGRAMAS DE FASE.....	27
4.3.	RESULTADOS DISEÑO DE EXPERIMENTOS.....	30
4.3.1.	PREPARACIÓN DE DES.....	30
4.3.2.	PREPARACIÓN DE ATPS.....	30
4.3.3.	ANOVA DE DOS VÍAS.....	31
5.	CONCLUSIONES.....	35
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	36
7.	Anexos.....	41
7.1.	Valores experimentales ANOVAs.....	41
7.2.	Prueba LSD de rangos múltiples.....	43

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA DEMANDA CRECIENTE DE PROTEÍNAS

Las proteínas son uno de los macronutrientes indispensables para el crecimiento y mantenimiento del organismo. Son el principal componente estructural de las células y, además, llevan a cabo un gran número de funciones en el organismo, entre las que destacan el papel catalítico de las enzimas, funciones mecánicas para las que son necesarias la elastina y el colágeno, y funciones de transporte y almacenamiento donde son indispensables proteínas como la hemoglobina, la mioglobina y los citocromos, o tareas de protección, para las cuales son indispensables los anticuerpos [1].

En cuanto a la dieta, la importancia de las proteínas radica en su capacidad de aporte de aminoácidos, necesarios para el mantenimiento de la proteína corporal y para su incremento durante el crecimiento. Un bajo aporte de proteína puede conducir a un retraso en el crecimiento o, en el caso del adulto, a alteraciones patológicas [2].

También se ha descubierto que las proteínas pueden tener efectos anticancerígenos, antibacterianos o antivirales [1].

Una de las dificultades a las que se enfrenta la humanidad es la insostenibilidad del actual sistema de producción, distribución y consumo de alimentos. En las próximas décadas el mundo se enfrentará a una importante demanda de proteínas; según se estima, la población mundial alcanzará los 9-10 mil millones en 2050 [3] y, debido a los problemas medioambientales asociados a la obtención de proteínas animales (emisiones de gases de efecto invernadero, contaminación de suelos y aguas), será necesario encontrar nuevas fuentes de proteínas cuyo impacto ambiental sea menor, garantizando la alimentación sin sobrepasar los límites máximos de emisiones establecidos [4], [5], [6]. La creciente demanda de alimentos se ha intentado solventar mediante la expansión de las tierras de cultivo, pero esto supone la pérdida de una gran cantidad de superficies naturales, en muchos casos forestales, lo cual conlleva pérdida de biodiversidad, mayor erosión del suelo, y disminución de la producción de oxígeno y de la captura de dióxido de carbono y otros contaminantes [6].

En Europa, aunque el crecimiento de la población en años recientes es reducido y se espera que llegue a ser negativo, la demanda de productos animales sigue siendo creciente [7], debido a que las dietas europeas son, por lo general, ricas en productos de origen animal, con un consumo de aproximadamente 80 kg de carne y 250 kg de

leche por persona y año, frente a la media mundial de 42 kg y 90 kg, respectivamente (la OMS recomienda no superar los 30 kg de carne al año) [6].

Se han propuesto varias estrategias para hacer más sostenible el sistema alimentario, algunas de las cuales proponen cambios tanto en la producción como en el consumo de alimentos.

1.2. MICROALGAS COMO FUENTE DE PROTEÍNAS

En el contexto de intentar minimizar el consumo de proteína animal y, a la vez, asegurar una producción adecuada de proteína para la creciente población, surge la búsqueda de nuevas fuentes de proteína vegetal. Aunque actualmente ya existe una fuente de proteína vegetal de alta calidad, las legumbres, es necesario desarrollar fuentes adicionales para dar respuesta a la creciente y elevada demanda. Las microalgas se perfilan como una fuente eficiente debido a su facilidad de cultivo, alta productividad por área y elevado contenido proteico [8], [9]. Usar microalgas como sustrato para la producción de proteínas tiene otras ventajas adicionales ya que, al ser organismos fotosintéticos, reducen el impacto de las emisiones de CO₂ (retirándolo de la atmósfera), y utilizan luz solar para obtener energía y crear biomasa, resultando energéticamente eficientes [10], [11]. Además, pueden obtener los nutrientes necesarios para su crecimiento de las aguas residuales ricas en carbono y nitrógeno (urbanas, agroalimentarias), por lo que simultáneamente tratarían dichos residuos.

Las microalgas son una rica fuente de proteínas y, en menor medida, de carbohidratos y lípidos. Por ejemplo, la *Spirulina platensis* contiene entre 46% y 63% de proteína (en masa seca), cercano al de la carne magra (71–76%) [12]. Nutricionalmente, las proteínas de las algas tienen los nueve aminoácidos esenciales (lisina, metionina, treonina, triptófano, histidina, leucina, isoleucina, valina y fenilalanina), que son los que nuestro cuerpo no puede sintetizar y que tenemos que ingerir de la dieta [12], [13].

1.3. BIORREFINERÍAS DE MICROALGAS

A todo lo anterior se le suma el hecho de que las microalgas son microorganismos capaces de sobrevivir en ambientes adversos, siempre que dispongan de nutrientes esenciales (C, N, P) y luz, ya que debido a su compleja pared celular pueden adsorber y retener potenciales contaminantes como metales pesados o contaminantes emergentes (de naturaleza eminentemente orgánica).

Por este motivo, actualmente se está estudiando el tratamiento de aguas residuales (wastewaters, WW) con microalgas en fotobiorreactores, purificando el agua entrante para posteriormente valorizar la biomasa producida, y así obtener biomoléculas de alto valor añadido con múltiples aplicaciones industriales y agropecuarias, como las proteínas, pigmentos, etc. [14]. En la Figura 1 se esquematiza el proceso de tratamiento de aguas residuales en el cual se incorporan las microalgas:

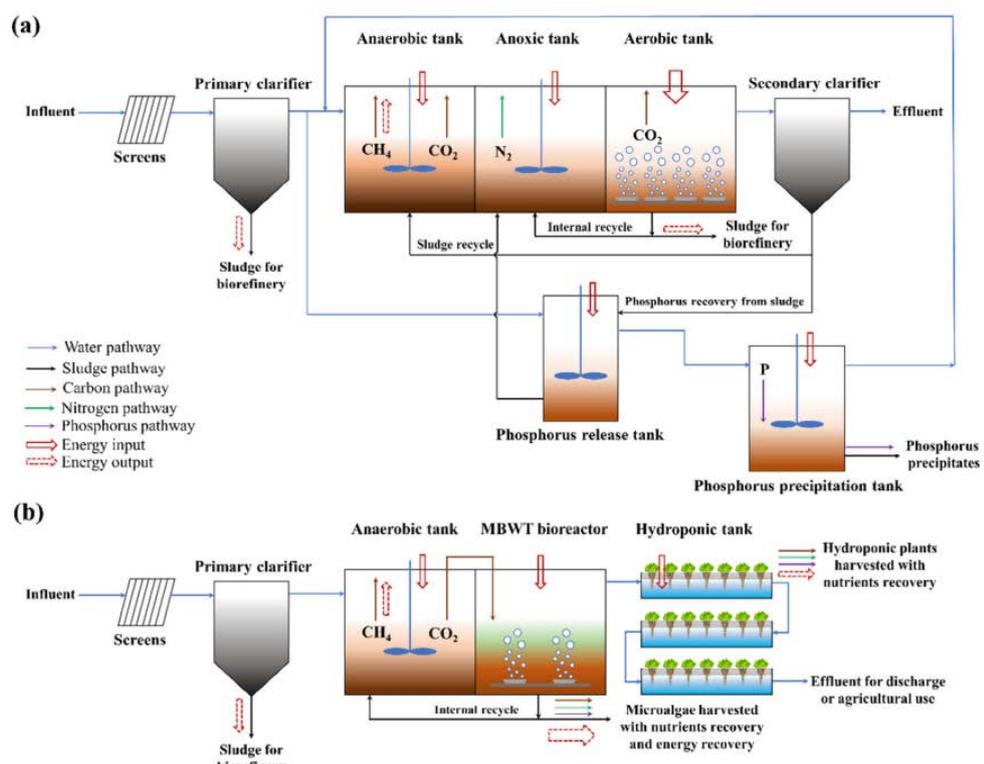


Figura 1. Comparación entre el proceso de tratamiento de aguas residuales convencional mejorado con recuperación de nutrientes (a) y el proceso híbrido de tratamiento de aguas residuales mediante microalgas típico (b) [14].

No obstante, esta aproximación presenta el inconveniente de que la biomasa crecida en presencia de aguas residuales puede estar contaminada con sustancias tóxicas. Es por ello que se requieren técnicas posteriores que selectivamente permitan separar y purificar las biomoléculas de interés. Este trabajo se centra en el fraccionamiento de la biomasa algal para extraer las proteínas, pero hay otras líneas de investigación que se centran en la recuperación de carbohidratos para producir bioplásticos[15], [16], o en la obtención de lípidos para la producción de biodiesel [17], [18]. El interés último reside en combinar estas etapas de fraccionamiento de la biomasa, en lo que se conoce como “aproximación de biorrefinería”. Las biorrefinerías son instalaciones donde, mediante

diversos procesos de transformación de la materia prima (biomasa), se obtiene bioenergía (calor, electricidad, biocombustibles) y una gran cantidad de bioproductos (biomoléculas con diversas aplicaciones). Para conseguir esta extensa gama de productos es necesaria la integración de diferentes procesos y tecnologías. El cultivo de algas en aguas residuales tiene numerosos beneficios respecto a los métodos de cultivo y tratamiento tradicionales (que requieren el uso de sustancias exógenas, lo cual se traduce en un aumento de la energía y recursos extra que hay que aportar):

- El tratamiento de las aguas residuales tendrá un bajo coste, pues muchos de los contaminantes serán asimilados por las microalgas.
- Las microalgas podrían aprovechar los nutrientes de las aguas residuales hasta un nivel muy bajo, lo que cumpliría con los estándares cada vez más estrictos de reutilización.
- Las microalgas son capaces de vivir en las aguas residuales con los nutrientes allí presentes sin necesidad o con muy pocos suplementos de nutrientes, por lo tanto, el tratamiento de aguas residuales mediante microalgas tiene el potencial para reducir el coste de producción y las emisiones de gases de efecto invernadero [19]–[21].

La producción de compuestos de alto valor añadido utilizando biomasa residual se ha convertido en uno de los enfoques más prometedores en las biorrefinerías. Los productos de mayor interés son nutracéuticos, cosméticos y productos farmacéuticos [22], carotenoides, ficobiliproteínas, compuestos altamente purificados como omega-3, ácidos grasos poliinsaturados, ácido icosapentaenoico o ácido docosahexaenoico [23].

A pesar del interés industrial, las tecnologías utilizadas en la producción de biomasa de microalgas limitan la escalabilidad del proceso [24]. Los procesos posteriores, especialmente en la purificación de las biomoléculas de alto valor añadido, pueden representar el 80-90% de los costes de producción, dependiendo de las técnicas de purificación requeridas para la obtención de los productos deseados. Todo esto encarece enormemente el proceso [25].

Los datos de la viabilidad económica de las biorrefinerías todavía son escasos, especialmente cuando hablamos de producción a gran escala. Aún son necesarios avances en las técnicas de extracción para que la recuperación de un compuesto dado no dañe la recuperación y calidad de otros [23]. Algunas técnicas de pretratamiento

como la extracción con fluidos supercríticos (SFE) y la extracción asistida por microondas (MAE), contribuyen a la producción de compuestos bioactivos con una degradación mínima en un entorno seguro para el consumo humano. Además, el uso de técnicas de rotura de la pared celular y de la membrana (que serán explicados más adelante detalladamente) están asociados con mayores rendimientos, tiempos de extracción más cortos y una mayor selectividad en la extracción de compuestos [22].

1.4. MÉTODOS TRADICIONALES DE OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS

Un problema recurrente en la extracción de proteínas y otras biomoléculas de las microalgas es que, debido a la rigidez de su pared celular, es difícil la obtención directa [22]. Para solucionar esta problemática surgen los denominados métodos tradicionales de obtención, entre los cuales destacan la precipitación, la diálisis, la cromatografía y la extracción con disolventes[26].

La extracción con disolvente convencional ha sido la metodología más empleada para la recuperación de proteínas contenidas en biomasa algal. Sin embargo, se está llevando a cabo una búsqueda de metodologías sostenibles, seguras y de bajo costo operativo para superar las desventajas de los métodos convencionales [27]. En la Tabla 1 se comentan brevemente los métodos convencionales de extracción con disolvente de proteína:

Tabla 1. Métodos convencionales de extracción de proteínas.

EXTRACCION ALCALINA	Es un método utilizado tradicionalmente para llevar a cabo la extracción de proteínas en semillas. Básicamente se trata de solubilizar proteínas en álcali diluido y seguidamente tiene lugar su precipitación isoeléctrica en ácido diluido [28].
EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA	La extracción de proteínas asistida por enzimas se basa en la alteración de la integridad de las paredes celulares causada por la acción de enzimas [29].
EXTRACCIÓN POR MICELIZACIÓN	Se basa en la capacidad de las proteínas para formar aglomerados con una estructura micelar [28].
EXTRACCIÓN POR MICROONDAS (MAE)	La extracción por microondas emplea la energía de la radiación de microondas para calentar las moléculas en el interior de la estructura del material, aumentando así la presión interna y facilitando la división de los analitos en el disolvente [30].

1.5. DISOLVENTES EUTÉCTICOS PROFUNDOS (DESs) Y SISTEMAS ATPS PARA LA OBTENCIÓN DE PROTEINAS

1.5.1. DESs (Deep Eutectic Solvents).

Los DES fueron descritos por primera vez en 2003 por Abbott et al. [31]. Se trata de líquidos a temperatura ambiente formados por la mezcla binaria, en una relación molar específica, de compuestos aceptores y dadores de enlaces de hidrógeno (*hydrogen bond acceptor*, HBA, y *hydrogen bond donor*, HBD) [32]. En la Figura 2 se muestran los HBAs y HBDs más habituales en la preparación de DES.

Los DES no se consideran una nueva molécula (no hay rotura o formación de enlaces covalentes) sino que son una mezcla de compuestos, generalmente de dos sólidos, o de un líquido y un sólido que, en una ratio molar específica, presenta un punto eutéctico anormalmente bajo (de ahí el adjetivo *deep* o profundo), siendo por tanto líquidos a temperatura ambiente. Poseen propiedades fisicoquímicas singulares como son un punto de fusión muy inferior al de los componentes puros, una baja volatilidad y presión de vapor, estabilidad térmica, y polaridad sintonizable que permite la solubilización de varias moléculas, incluidas las proteínas [33], [34].

También poseen baja toxicidad al estar formados habitualmente por productos naturales biodegradables, y son biocompatibles con un gran número de biomoléculas, lo que permite extraerlas con estos disolventes sin alterarlas. En función de la naturaleza de los compuestos de partida se pueden modular las propiedades del DES, adaptándolos a diferentes aplicaciones, por lo que son considerados disolventes de diseño.

Se considera que son las fuertes interacciones del tipo enlace de hidrogeno entre los dos componentes de los DES (HBD y HBA) las que provocan ese punto eutéctico más bajo de lo esperado [35]. La gran variedad de estos dos grupos es inmensa y se estima que puede haber en torno a $10^6 - 10^8$ posibles combinaciones [36]. Dependiendo de la naturaleza de los componentes, los DESs se clasifican en cinco tipos o grupos (Tabla 2), siendo el tipo III el más investigado. Esto se debe a que muestran un enlace de hidrógeno más fuerte, lo que afecta directamente a las propiedades fisicoquímicas de los DESs. Los DESs tipo III están formados por una sal de amonio cuaternaria (HBA), y un alcohol, ácido carboxílico o amida actuando como HBD [32], [34], [37], [38].

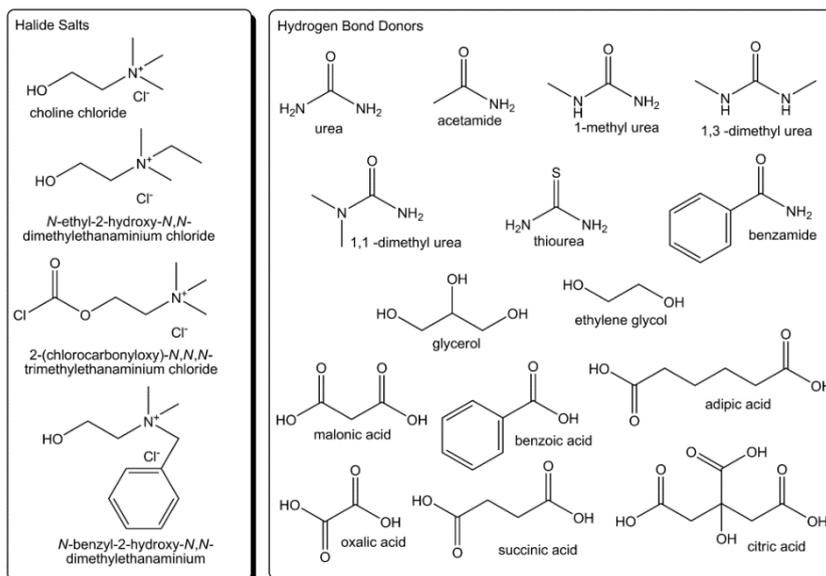


Figura 2. Estructuras de algunos HBAs (halogenuros de cationes de amonio cuaternario) y HBDs (adaptado de [32]).

Tabla 2. Composición y estructura simplificada de los diferentes tipos de DES.

Tipos	Fórmula General	Términos
I – HBA y cloruro metálico	$Cat^+ X^- \cdot z MCl_n$	M = Zn, Sn, Fe, Al, Ga, In
II - HBA y cloruro metálico hidratado	$Cat^+ X^- \cdot z MCl_n \cdot y H_2O$	M = Cr, Co, Cu, Ni, Fe
III – HBA y HBD	$Cat^+ X^- \cdot z RZ$	Z = OH, COOH, CONH ₂
IV – cloruro metálico y HBD	$MCl_n + RZ = MCl_{n-1}^+ \cdot RZ + MCl_{n+1}^-$	M = Al, Zn; Z = OH, CONH ₂
V – Componentes moleculares	DESS no iónicos	Compuestos por sustancias moleculares

1.5.2. SISTEMAS ATPSs BASADOS EN DESs

Los sistemas acuosos de dos fases (*Aqueous Two-Phase Systems*, ATPS) han ganado interés debido al gran potencial para la extracción, separación, purificación y enriquecimiento de proteínas, membranas, virus, enzimas, ácidos nucleicos y otras biomoléculas. Entre sus ventajas cabe destacar que permiten obtener buenos rendimientos de recuperación, son fáciles de escalar y los tiempos de operación son cortos [39].

Los ATPSs son sistemas formados por dos fases acuosas que son inmiscibles, dando como consecuencia el comportamiento repulsivo de sus componentes. Existe una gran variedad de ATPSs según el tipo de sustancias que se mezclen, siendo los más comunes los formados por dos polímeros (generalmente polietilenglicol, PEG, y dextrano) o un polímero y una sal (habitualmente fosfato, sulfato o citrato); otros tipos pueden incluir líquidos iónicos y alcoholes de cadena corta.

Los sistemas polímero-polímero se utilizan preferentemente para la separación, recuperación y purificación de solutos sensibles al entorno iónico, ya que estos sistemas poseen una fuerza iónica baja, siendo la elevada fuerza iónica la única desventaja de los sistemas polímero-sal, estudiados durante más de cinco décadas [40]. Por su parte, los ATPSs de alcohol-sal son bastante económicos en comparación con los polímeros.

Estos sistemas se caracterizan por su baja viscosidad, fácil recuperación de constituyentes y tiempos de sedimentación reducidos, pero un gran inconveniente de usar este tipo de ATPS es que muchas proteínas no son compatibles con la fase rica en alcohol [41], [42]. Los PEG de diferentes pesos moleculares son ampliamente utilizados en ATPS debido a su baja toxicidad, bajo precio y baja volatilidad. La Tabla 3 muestra diferentes tipos de ATPS aplicados en la extracción de varios biocompuestos [39].

Tabla 3. Tipos de ATPS (extraída de [34]).

Types of ATPS	Representative examples		
	Composition of ATPS	Product	Results
Polymer – polymer	PEG – dextran	Chitinase	Successful partitioning of chitinase towards bottom phase
	PEG – dextran	Nanospheres, nanowires and DNA derivatized nanowires	Successful In situ binding Au nanospheres with Au nanowires
Polymer – salt	PEG – K ₂ HPO ₄	B-phycoerythrin	Recovery yield = 90 % Purification factor = 4
	PEG 4000 – sulfate + 8.8 % NaCl	α-Amylase	Purification = 53 fold Purity = 86 %
Alcohol – salt	2-propanol – K ₂ HPO ₄	Lipase	Recovery yield = 99 % Purification factor = 13.5
	Ethanol – K ₂ HPO ₄	2,3-butanediol	Recovery yield = >98 %
Micellar/reverse micellar ATPS	<i>n</i> -Decyl tetra (ethylene oxide)	Bacteriophages	Bacteriophages partitioning towards micelle poor phase
	Isooctane/ethylhexanol/methyltrioctyl ammoniumchloride	Plasmid DNA	Successful purification of DNA and RNA removal
Ionic liquids (ILs) – based ATPS	1-Butyl-3-methylimidazolium chloride – salt	Codeine and papaverine	Recovery yield = >90 % (codeine), >99 % (papaverine)
	Imidazolium – K ₂ HPO ₄	Curcuminoids	Extraction yield = 96 % Purity = >51 %

Para que haya dos fases, ambas deben ser inmiscibles. En el caso de los polímeros, la inmiscibilidad es consecuencia del impedimento estérico, mientras que en los ATPS polímero-sal la elevada absorción de agua por parte de la sal es lo que provoca un fenómeno de repulsión similar. La separación de fases está afectada por diversos factores: concentración y masa molecular de los polímeros o concentración y composición de la sal. Desde el punto de vista químico-físico, saber cuándo la mezcla de componentes será o no miscible o a qué temperatura se estudia con los diagramas de fase. Por lo general, y dado que tenemos tres variables (temperatura, y composición de los dos componentes) se tendría que acudir a una representación tridimensional. Para simplificar el problema lo que se hace es mantener constante la temperatura y crear un diagrama de fases únicamente con las composiciones de ambas sustancias, como se muestra en la Figura 3.

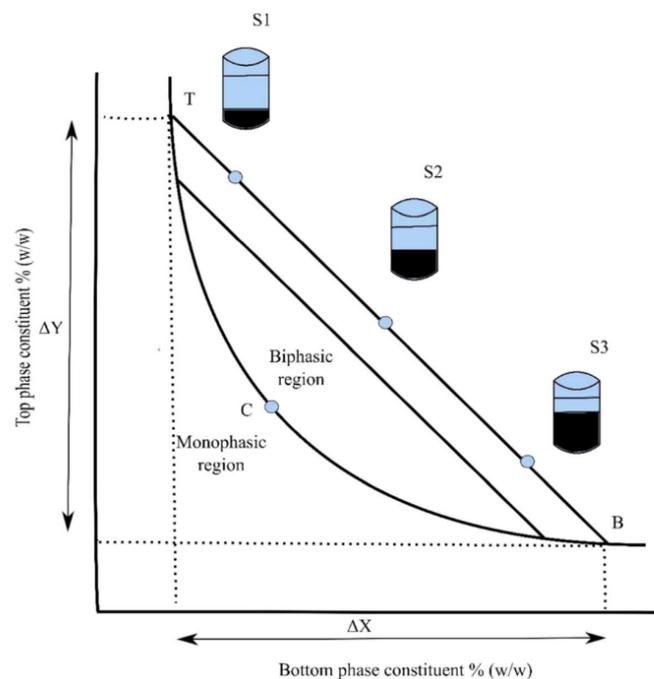


Figura 3. Representación esquemática de un diagrama de fases de un ATPS (tomado de [39]).

La curva que se asemeja a una exponencial es lo que se conoce como “curva binodal”, por debajo de la cual el sistema tendrá únicamente una fase, mientras que por encima aparecerán dos fases que, trazando las conocidas como “Tie lines” y aplicando la regla de la palanca, permiten predecir la cantidad de cada fase en una dupla cualquiera de composición. Además de lo mencionado, factores como el pH también pueden afectar a la forma del diagrama de fases [39].

Si queremos trabajar con ATPSs es imprescindible conocer su diagrama de fases, que proporcional la información de qué cantidad de DES y de sal, en nuestro caso, debemos añadir para obtener dos fases, de otro modo podríamos mezclar cantidades y obtener tan sólo una fase.

La principal ventaja de los ATPSs es que las condiciones de operación, por lo general, son suaves. Así, para la extracción de proteínas serían una muy buena alternativa porque se evitaría su desnaturalización. Los ATPSs basados en disolventes orgánicos convencionales han demostrado su potencial para la purificación de proteínas de microalgas. Phong et al. [43] obtuvieron un ATPS formado por soluciones acuosas de sulfato de amonio y 2-propanol y Baskaran et al. [44], en lugar del 2-propanol utilizaron polietilenglicol 600.

Sin embargo, el gran cambio de paradigma parece apuntar a diseñar ATPSs basados en disolventes biodegradables como los DESs, ya que estos muestran las propiedades de un ATPS típico pero los componentes no son tóxicos (o al menos estos son menos perjudiciales). El mayor problema de estos métodos es el escaso conocimiento que se tiene sobre la recuperación de la fase en la cual se encuentran las proteínas [4], [26], [45]–[47], y hay pocos estudios al respecto, más aún en la extracción directa de proteínas de microalgas con ATPS.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Este trabajo forma parte de un proyecto de investigación que tiene como objetivo general la utilización de microalgas para el tratamiento de aguas residuales urbanas y ganaderas en fotobiorreactores, y la posterior valorización de la biomasa algal obtenida para extraer selectivamente las proteínas, separándolas de los carbohidratos. El residuo rico en carbohidratos será biotransformado en una etapa posterior en polihidroxialcanoatos (PHAs), los cuales se destinarán a la fabricación de biopolímeros.

El objetivo principal de este Trabajo Fin de Grado es investigar el potencial de los sistemas bifásicos acuosos (Aqueous Two-Phase Systems, ATPSs) basados en disolventes eutécticos profundos (*Deep Eutectic Solvents*, DESs) para la recuperación selectiva de las proteínas presentes en la biomasa de microalga *Scenedesmus almeriensis*, minimizando la coextracción de carbohidratos.

Se investigará el efecto de dos factores sobre el rendimiento de la extracción de proteínas contenidas en biomasa algal liofilizada y su separación de los carbohidratos:

- Tipo de ATPSs, empleando tres sistemas diferentes, ChCl:2Urea–K₃PO₄, ChCl:2Urea–K₂HPO₄ y ChCl:2LA–K₂HPO₄; y
- Preparación previa de la biomasa, pulverizada en mortero y sin tratamiento previo, para evaluar si la rotura previa parcial de la membrana celular causada por la molienda favorece la extracción.

El efecto de estos dos factores experimentales a tres y dos niveles, respectivamente, se evaluará realizando, por duplicado, un diseño factorial completo de 6 experimentos, con objeto de determinar las condiciones óptimas de operación, para ver si estos sistemas disolventes son efectivos para la recuperación selectiva de proteínas de la biomasa algal.

Se aplicará un diseño experimental análogo a la extracción de proteína de un patrón puro de BSA (*bovine serum albumin*) para evaluar y comparar el efecto los factores investigados en la extracción de proteínas de ambas matrices.

Previamente a los experimentos de extracción, se obtendrán los diagramas de fases de los tres ATPSs empleados con objeto de establecer la cantidad óptima de cada componente del ATPS para la formación del sistema bifásico.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. PREPARACIÓN DE LOS DESs

Equipos y reactivos:

- Cloruro de colina (ChCl). Pureza $\geq 98\%$.
- Betaína (Bet). Pureza $\geq 98\%$.
- Urea. Pureza $\geq 98\%$.
- Ácido levulínico (LA). Pureza 98%.
- Glicerol (Gly). Pureza $\geq 99,5\%$.
- Incubador con agitación orbital (*Optic Ivymen System*).

Se han preparado los DES ChCl:2Urea y Bet:2LA, que son la mezcla de cloruro de colina con urea y de betaína con ácido láctico, en relación molar 1:2.

En primer lugar, se pesan las cantidades necesarias de cada compuesto en una balanza de precisión ± 0.01 g. Los compuestos se transfieren a un matraz Erlenmeyer, se tapa la boca del matraz con papel de aluminio y se introduce en un incubador con agitación orbital para conseguir la mezcla homogénea y la formación del DES líquido.

3.2. PREPARACIÓN DE ATPS

Equipos y reactivos:

- Tubos tipo Falcon 15 ml cónico.
- Balanza de cuatro dígitos.
- Pipeta Pasteur.
- Pipeta volumétrica 100 – 1000 μL .
- Los DESs preparados anteriormente.
- Fosfato de potasio (K_3PO_4). Pureza $\geq 98\%$.
- Hidrogenofosfato de potasio (K_2HPO_4). Pureza $\geq 98\%$.

Para la preparación de ATPS el primer paso es la obtención del diagrama de fases de las mezclas binarias para identificar la región en la que se encuentra el sistema bifásico.

3.2.1. CONSTRUCCIÓN DE DIAGRAMAS DE FASES

Equipos y reactivos:

- Vial de 5 mL.
- Agitador magnético.
- Núcleo de agitación.
- Pipeta Pasteur.
- ATPSs preparados.

La finalidad principal de obtención de los diagramas de fase es saber en qué regiones de estos, es decir, a que concentraciones de cada componente se encuentra la parte bifásica. Para ello se pesa en un vial entre 0,6 y 0,9 g de disolución de la sal, con precisión de ± 0.1 mg. Previamente se habrá añadido un núcleo de agitación al vial, y se habrá anotado la masa inicial (suma de vial y agitador).

El método seguido para la construcción de los diagramas de fase se conoce como “Cloud Titration method” [48]. Consiste en ir añadiendo, gota a gota y con agitación constante, el DES a la disolución de la sal, hasta que aparezca turbidez (región metaestable bifásica), en cuyo momento se anota nuevamente el peso del vial para obtener la masa de DES añadida.

Con estas dos masas (sal y DES) se obtiene el primer punto del diagrama de fases. Para obtener el siguiente punto se añade al vial agua desionizada gota a gota hasta desaparición de la turbidez, anotando en ese momento el peso del vial. Se coloca en la placa agitadora y se añade gota a gota DES hasta que vuelva a aparecer turbidez, anotando la masa en ese momento. Repitiendo el proceso, se irán obteniendo puntos sucesivos del diagrama de fases. Finalmente llega un momento en el que, aunque se siga añadiendo DES, la mezcla ya no se enturbia, concluyendo así la construcción del diagrama. En la Figura 4 se pueden observar las dos situaciones de este proceso iterativo para la construcción del diagrama de fases (cuando se enturbia ligeramente, estaremos en uno de los puntos de la curva binodal).

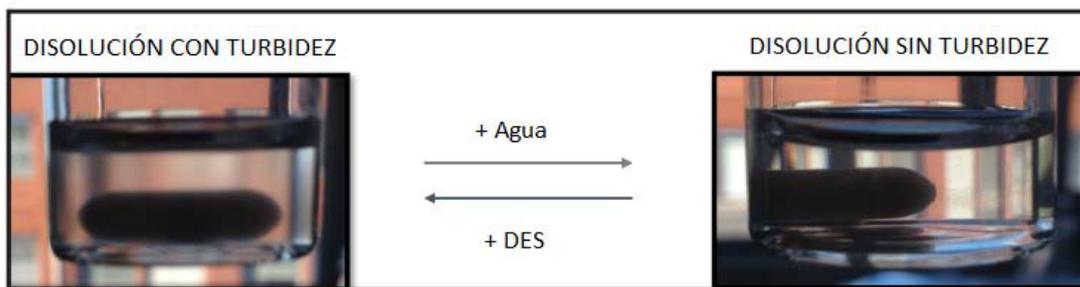


Figura 4. Ilustración del método "Cloud Titration method"[48].

Con los datos de masa recopilados se calcula, en cada punto, la masa de DES y de sal y la fracción en peso, mediante la siguiente expresión:

$$w_i = \frac{m_i}{m_{total}}$$

donde w_i es la fracción en masa de DES o sal y m_i es la masa de DES o sal en cada punto. Los pares de valores de fracción en masa de DES y sal se representan en un gráfico bidimensional, obteniéndose el diagrama de fases. Los diagramas de fases de los tres ATPSs estudiados se registraron a temperatura ambiente (aprox. 20-22 °C). Una vez obtenida del diagrama de fases la composición óptima del ATPS se procede a su preparación. En un tubo Falcon de 15 mL de capacidad se mezclan las cantidades necesarias de DES y de la disolución salina para tener los porcentajes óptimos derivados del diagrama de fases.

3.3. CARACTERIZACIÓN DE LA BIOMASA

La biomasa empleada en este estudio consiste en un lote liofilizado de microalga *Scenedesmus almeriensis* cultivado en un fotobiorreactor de tratamiento de aguas residuales de la ganadería porcina (purín líquido). La planta de tratamiento está ubicada en la Universidad de Almería, que colabora con este proyecto y nos suministra la biomasa de microalgas ya liofilizada.

3.3.1. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

El análisis de proteínas se va a llevar a cabo mediante el método Kjeldahl, el cual fue desarrollado por el danés Johan Kjeldahl en 1883. Este método permite determinar el

contenido de "nitrógeno Kjeldahl" de una muestra, que es la suma del nitrógeno orgánico (proteico) y el nitrógeno amoniacal.

En primer lugar, se digiere una pequeña cantidad de muestra (alrededor de 0,1 g en masa seca) con ácido sulfúrico concentrado aplicando el adecuado programa de calentamiento, y utilizando CuSO_4 como catalizador del proceso. El nitrógeno Kjeldahl se convierte cuantitativamente en amonio. Éste se trata en caliente con un exceso de NaOH, destilando como amoníaco que se recoge en un Erlenmeyer que contiene un exceso de H_3BO_3 con un indicador mixto ácido-base. Por último, el H_2BO_3^- formado en la reacción de neutralización del amoníaco destilado se valora con una disolución patrón de ácido sulfúrico, detectándose así el punto final de la valoración cuándo se produce el viraje del indicador de verde a morado [49].

3.3.2. ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS

Para el análisis de carbohidratos se ha adaptado un método de hidrólisis de la biomasa. Para ello, se toma alrededor de 0,03 g de microalga y se añaden 2 mL H_2SO_4 al 72%, calentando durante 1 h a 30 °C; después se añaden 34 mL de agua y se calienta otras 2 h a 100 °C. La disolución resultante se filtra a través de un filtro de 0,45 μm y se enrasa en un matraz aforado. La determinación se hace con el método Fenol-Sulfúrico, similar al utilizado para medir carbohidratos en los extractos obtenidos con ATPSSs, el cual se explica con detalle más adelante [50].

3.3.3. ANÁLISIS DE LÍPIDOS

Para el análisis de lípidos se ha utilizado el método Soxhlet, empleando hexano como agente extractante [51], [52]. Debido a que la cantidad de grasa extraída en el matraz de fondo redondo era casi indetectable, se modificó ligeramente el procedimiento, pesándose en su lugar el cartucho que contenía la muestra, antes y después de la extracción, y obteniendo la masa de lípidos extraída por diferencia.

3.3.4. ANÁLISIS DE HUMEDAD Y CENIZAS

Los dos componentes restantes de la microalga son la humedad (cantidad de agua que tiene) y las cenizas (residuo mineral constituido por aniones y cationes inorgánicos).

Para la determinación de la humedad se pesa un crisol de porcelana limpio y seco, se introduce una cantidad exactamente conocida de muestra (entre 1 y 10 g, dependiendo de la densidad de la misma), y se deseca en la estufa a 105 °C hasta peso constante. El contenido porcentual de agua se determina a partir de la pérdida de masa. La muestra seca resultante de esta determinación se traslada a un horno de mufla y se calcina durante 24 h a 550 °C, pesando el residuo de sales resultante una vez frío. El porcentaje de cenizas se determina respecto a la masa de muestra seca.

3.4. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Al ATPS preparado en un tubo Falcon, como se explicó en la sección 3.3, se le añaden 0.03 g (± 0.1 mg) de la muestra de biomasa y se agita en un rotor de brazo rotatorio (ELMI, mod. Intelli-Mixer RM-2M), en modo C1 a 99 rpm durante 15 minutos, luego 2 minutos más en el modo UU y por último se deja reposar durante 20 minutos, para que las dos fases formadas se recompongan y distingan fácilmente, llegando al equilibrio de reparto de las proteínas en cada fase. A continuación, se extrae, mediante una jeringuilla con aguja, la fase superior (del DES), en la cual se encontrarán las proteínas extraídas. Se filtra el contenido de la jeringuilla a través de un filtro de jeringa de nylon de 0.45 μm de tamaño de poro para eliminar restos de materia sólida, se transfiere el filtrado a un matraz aforado de 25 mL y se enrasa con agua. La disolución resultante se almacena refrigerada a 4 °C en un tubo Falcon de 50 mL hasta su análisis, que fue completado dentro de las dos semanas siguientes.

3.5. ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS

3.5.1. MÉTODO BCA PARA ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

Equipos y reactivos:

- Tubos Eppendorf.
- Incubador.
- Espectrofotómetro (Thermo Scientific GENESYS 20).
- Pipeta volumétrica 100 - 1000 μL .
- Pipeta volumétrica 20 - 200 μL .

- Jeringuilla con aguja.
- Filtros de jeringa de nylon, poro: 0,45 μm , \varnothing 25 mm, no estériles.
- Equipo Vortex.
- “Pierce™ BCA Protein Assay Ki” de ThermoScientific”.

El ácido bicinconínico (BCA) es ampliamente utilizado para llevar a cabo la determinación de concentración de proteína. Algunas de las cualidades que lo hacen idóneo para esta tarea son su facilidad de uso, su alta sensibilidad y su tolerancia frente a interferentes [53].

Se trata de un método colorimétrico basado en dos reacciones sucesivas. En la primera se produce la reducción de iones cúpricos (Cu^{2+}) a iones cuprosos (Cu^+) por los enlaces peptídicos mediante la conocida como reacción de Biuret en medio alcalino, seguida de una segunda reacción consistente en la quelación del Cu^+ con dos moléculas de BCA, formándose así un complejo de color púrpura que presenta un máximo de absorción a 562 nm.

En la Figura 5 se observa la reacción que tiene lugar. La concentración de proteínas de la disolución se determinará construyendo una curva de calibrado a partir de una disolución patrón de proteína (albúmina de suero bovino, BSA) [54].

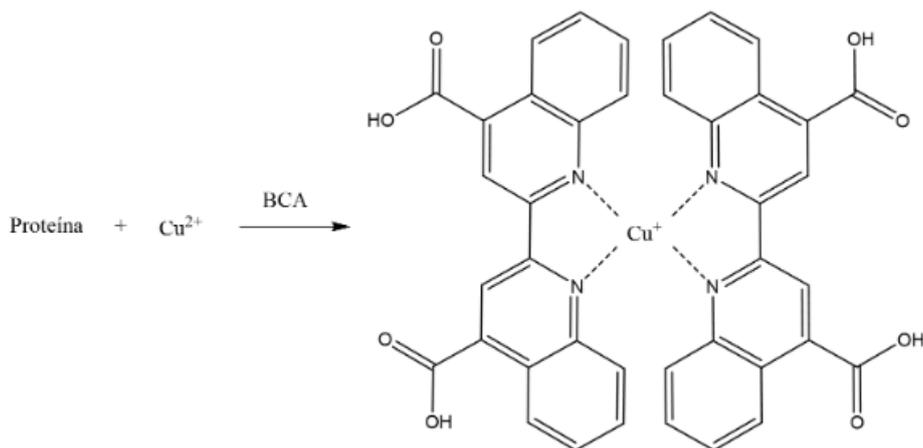


Figura 5. Reacción de formación del complejo coloreado de $\text{Cu}(I)$ con dos moléculas de BCA.

Para esta determinación se ha empleado el kit de ensayo de proteínas BCA Pierce™ (Thermo Fisher), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se transfieren 60 μL del extracto diluido de proteínas (sección 3.4) a un tubo Eppendorf, y se añaden 1,2 mL del

reactivo (preparado mezclando volúmenes de las disoluciones A y B en una relación 50:1). Tras agitar el tubo con ayuda de un vórtex, se lleva a un incubador a 37 °C durante 30 minutos.

Finalmente, se espera a que los tubos se atemperen y se mide la absorbancia a 562 nm en cubetas de vidrio o plástico de 1 cm de camino óptico. La concentración de proteínas se obtiene interpolando adecuadamente en una línea de calibrado previamente realizada con patrones de BSA que acompañan al propio kit.

3.5.2. MÉTODO DEL FENOL-SULFÚRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS

Equipos y reactivos:

- Tubos tipo Falcon 50 mL cónico.
- Pipeta volumétrica 100 - 1000 µL.
- Pipeta volumétrica 20 - 200 µL.
- Jeringuilla con aguja.
- Filtros de jeringa de nylon, poro: 0,45 µm, Ø 25 mm, no estériles.
- Espectrofotómetro SPECTRONIC® GENESYSTEM 5.
- Disolución de fenol en agua 80% (m/m).
- Ácido sulfúrico. Pureza 96-98%.
- D(+)-Glucosa anhidra. Pureza purísimo PRS.

El método del fenol-sulfúrico para la determinación de carbohidratos totales es un método colorimétrico rápido y sencillo, capaz de detectar prácticamente todas las clases de carbohidratos, incluidos mono, di, oligo y polisacáridos; aunque se debe tener en cuenta que la capacidad de absorción de los diferentes carbohidratos varía.

La función del ácido sulfúrico concentrado será descomponer los polisacáridos, oligosacáridos y disacáridos en monosacáridos. Las pentosas (compuestos de 5 carbonos) se deshidratan transformándose en furfural y las hexosas (compuestos de 6 carbonos) se convertirán en hidroximetilfurfural. Estos compuestos reaccionarán a continuación con el fenol para producir un color amarillo anaranjado.

Para productos con un alto contenido de xilosa (una pentosa), se debe usar xilosa para construir la curva de calibración para el ensayo y medir la absorción a 480 nm, mientras que para productos que tienen un alto contenido de hexosa se usa comúnmente la glucosa como patrón de calibración y la absorción se mide a 490 nm.

El color de esta reacción es estable durante varias horas y la precisión del método es de ± 2 % en las condiciones adecuadas [55]. En este trabajo se ha usado glucosa para preparar los patrones de calibración, en un intervalo de concentraciones comprendido entre 10 y 80 mg/L. Se ajusta el cero instrumental con un blanco preparado como los patrones.

En tubos Falcon, se pipetea el adecuado volumen de la disolución patrón de glucosa, agua desionizada hasta completar un volumen total de 2 mL, 50 μ L de fenol al 80% y 5 mL de ácido sulfúrico del 98%, mezclando bien tras cada adición. Se enfrían las disoluciones a temperatura ambiente sumergiendo los tubos en un baño de agua (unos 20 min). Finalmente, se mide la absorbancia de las disoluciones a 488-490 nm en cubetas de vidrio o cuarzo.

Las muestras y blancos se preparan y miden de igual forma, pipeteando 2 mL del extracto diluido, o de agua desionizada en el caso de los blancos. La concentración de carbohidratos en los extractos se obtiene interpolando el valor de la absorbancia leída en la línea de calibrado.

3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Como ya se ha indicado en el capítulo 2, se investigó el efecto de dos factores sobre el rendimiento de la extracción de proteínas contenidas en biomasa algal liofilizada y su separación de los carbohidratos. Los factores ensayados y sus niveles se muestran esquemáticamente en la Tabla 4, junto con el código empleado (-1, 0 y 1) para simbolizar dichos niveles de cada factor.

Tabla 4. Niveles de los factores estudiados

Factores estudiados	Niveles		
	-1	0	1
ATPS	Bet:2LA - K_2HPO_4	ChCl:2Urea - K_2HPO_4	ChCl:2Urea - K_3PO_4
Pretratamiento	Sin morterar	---	Mortorada

Se empleó un diseño factorial completo que combina todos los posibles niveles de los factores, resultando 6 experimentos de extracción que se realizaron por duplicado.

Para el caso de la microalga, se han estudiado tres variables de respuesta diferentes: porcentaje de proteína extraída, porcentaje de carbohidratos extraído y la ratio de ambos valores (R).

$$R = \frac{\%Extracción\ Proteínas}{\%Extracción\ Carbohidratos}$$

Idealmente, lo que queremos es maximizar esa función R para lograr una extracción selectiva de la fracción proteica de la biomasa. Por otro lado, ya que la BSA es un 98% proteína, en esta matriz solo tendremos en cuenta el porcentaje de proteína extraído como variable de respuesta.

Para analizar los resultados del diseño experimental se empleó el análisis de la Varianza (ANOVA), test estadístico que se utiliza para comparar las varianzas entre las medias de diferentes grupos (causada por diferencias entre los niveles del factor investigado) con la varianza dentro de los grupos (asignable a la pura variación aleatoria) mediante una prueba F. Si la varianza intergrupos es significativamente mayor que la varianza intragrupos concluiremos que el factor ejerce un efecto significativo y procederemos a identificar el nivel o niveles responsables de la variación mediante una prueba de múltiples rangos.

En este trabajo se empleará un ANOVA de dos vías para dilucidar si, dependiendo del tipo de ATPS elegido o el pretratamiento de la biomasa realizado, se modifican el porcentaje de extracción de proteínas, el de carbohidratos, y su ratio [56].

Como todo test de hipótesis, se deben plantear las hipótesis nulas (H_0) y alternativa (H_1) para cada factor, así como escoger el nivel de significación o nivel de confianza ($\alpha=0,05$). Las hipótesis nulas formuladas para cada uno de los factores ensayados y para su interacción se muestran en la Tabla 5:

Tabla 5. Hipótesis nulas del ANOVA.

H_0
El factor tipo de ATPSs no tiene efecto: No hay diferencias entre las medias de los ATPS a ningún nivel estudiado.
El factor pretratamiento de la biomasa no tiene efecto: No hay diferencias entre las medias de los pretratamientos.
La interacción entre tipo de ATPSs y pretratamiento no tiene efecto: El efecto del ATPS es independiente del pretratamiento empleado

Para comprobar si las medidas están afectadas por un sesgo sistemático, además de por la inevitable variabilidad aleatoria, se calcula la varianza de cada grupo y se compara con la residual, calculando el cociente de varianzas F_{calc} que se compara con el estadístico crítico (F_{crit}) para el α seleccionado; si $F_{calc} > F_{crit}$ rechazaremos H_0 y podremos decir que existen diferencias significativas entre grupos, esto es, entre los niveles del factor. En el caso de que el factor resulte ser significativo se aplicará una prueba de múltiples rangos (en este trabajo, el test de la diferencia mínima significativa, LSD), calculando todas las diferencias absolutas posibles entre las respuestas medias a cada nivel y comparándolas con un valor crítico LSD calculado como sigue:

$$LSD = t_{crit} \cdot \sqrt{MS_R \cdot \left(\frac{2}{n_j}\right)}$$

donde el t_{crit} es el valor tabulado de la t de Student para los grados de libertad residuales y el nivel de significación prefijado, MS_R es la varianza residual y n_j es el número de réplicas realizadas a cada nivel del factor “j”.

Como se ha avanzado, realizaremos el ANOVA de dos vías tanto para los experimentos con microalga como para los del BSA, puesto que es esperable que un ATPS que extraiga muy bien proteína disponible, no muestre el mismo desempeño para recuperar proteínas que se encuentran tras una membrana celular rígida como la que tienen las microalgas.

Para el caso de la microalga, se han estudiado tres respuestas diferentes: el %Proteína, %Carbohidratos, y la ratio de ambos valores (R).

$$R = \frac{\%Extracción\ Proteínas}{\%Extracción\ Carbohidratos}$$

Idealmente, lo que queremos es maximizar esa función R para lograr una extracción selectiva de la fracción proteica de la biomasa. Por otro lado, ya que la BSA es un 98% proteína, con la matriz de BSA solo se ha tenido en cuenta el porcentaje de proteína extraído como variable de respuesta.

El tratamiento estadístico de los resultados de los diseños experimentales se llevó a cabo con el software estadístico *Statgraphics Centurion 19* (Statgraphics Technologies Inc.).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. COMPOSICIÓN DE LA BIOMASA

En la Tabla 6 se muestran los valores promedio y la desviación estándar absoluta de tres determinaciones replicadas de cada uno de los componentes mayoritarios de la microalga empleada (crecida en purín y liofilizada). Todas las medidas se hicieron por triplicado por las técnicas descritas anteriormente.

Tabla 6 Parámetros de la composición de la microalga.

Scenedesmus Almeriensis liofilizada Purín		
Proteínas / %	44,50	1,73
Carbohidratos / %	20,43	2,98
Lípidos / %	19,71	0,01
Cenizas / %	15,09	0,34
Humedad / %	5,59	0,18
Total	105,32	3,46

Los cinco componentes medidos son los mayoritarios en la microalga, por lo que su suma debe de dar próxima al 100%. Se comprueba que es así, aunque se sospecha que se ha podido sobreestimar el porcentaje de proteína obtenido por el método Kjeldahl ya que el factor de conversión usado para convertir %N a %proteína ha sido el valor encontrado en la bibliografía, pero puede variar ligeramente en función del tipo de microalga, condiciones de crecimiento, etc.

4.2. DIAGRAMAS DE FASE

Para obtener el diagrama de fases de las mezclas DES-sal ensayadas, se representó la fracción en masa del DES frente a la fracción en masa de la sal, calculadas a partir de las cantidades pesadas de cada componente en cada punto, como se ha explicado en la sección experimental.

Como ejemplo, se muestran en las Tablas 7 y 8 los valores experimentales y las fracciones en peso calculadas para el ATPS ChCl:2Urea-K₃PO₄.

Tabla 7. Datos para construir el diagrama de fases, obtenidos del “Cloud Point Titration method” para el ATPS ChCl:2Urea-K₃PO₄.

Cálculos empezando inicialmente con disolución de la Sal				
	m Inicial / g	m con DES / g	m DES / g	m Total (+ Agua) / g
m Dis Sal / g	0,8803	1,2692	0,3889	1,3639
	1,3639	1,4715	0,4965	1,5705
	1,5705	1,7770	0,7030	1,8701
	1,8701	2,0835	0,9164	2,1793
	2,1793	2,4431	1,1802	2,5443
	2,5443	2,9311	1,5670	3,0248
	3,0248	3,4242	1,9664	3,6324
	3,6324	4,3846	2,7186	4,7275
	4,7275	6,3785	4,3696	

Tabla 8. Fracción en masa de DES y sal.

W_{DES}	W_{K3PO4}
0,306	0,279
0,337	0,240
0,396	0,199
0,440	0,170
0,483	0,145
0,535	0,121
0,574	0,103
0,620	0,081
0,685	0,055

Los diagramas de fases nos permiten obtener información del estado físico del sistema dependiendo de los volúmenes añadidos de DES y solución salina. Las Figuras 6, 7 y 8 muestran los diagramas de fases obtenidos mediante el método de valoración de punto de niebla para los tres sistemas ensayados.

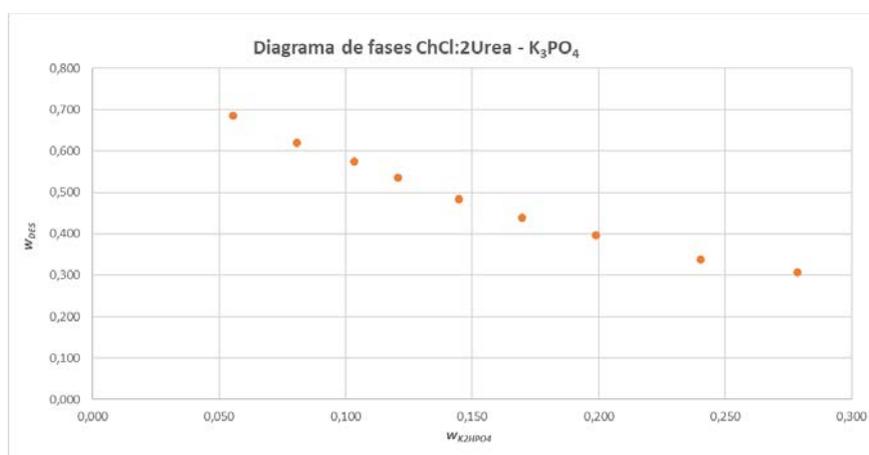


Figura 6 Diagrama de fases del ATPS ChCl:2Urea-K₃PO₄

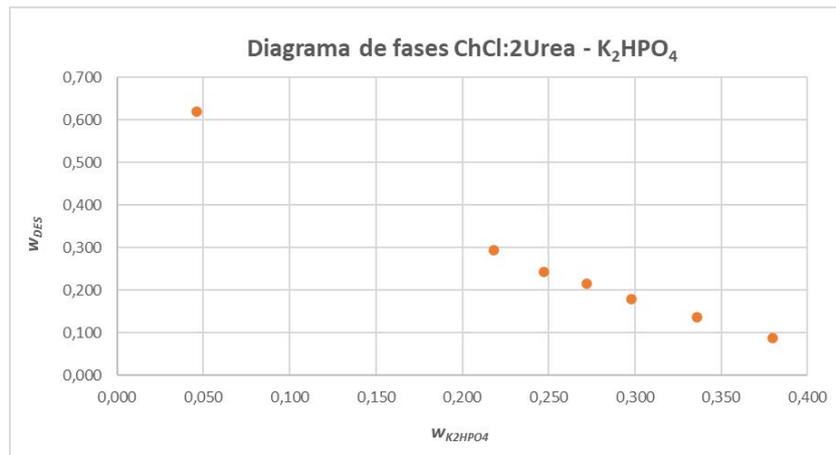


Figura 7 Diagrama de fases del ATPS ChCl:2Urea- K_2HPO_4

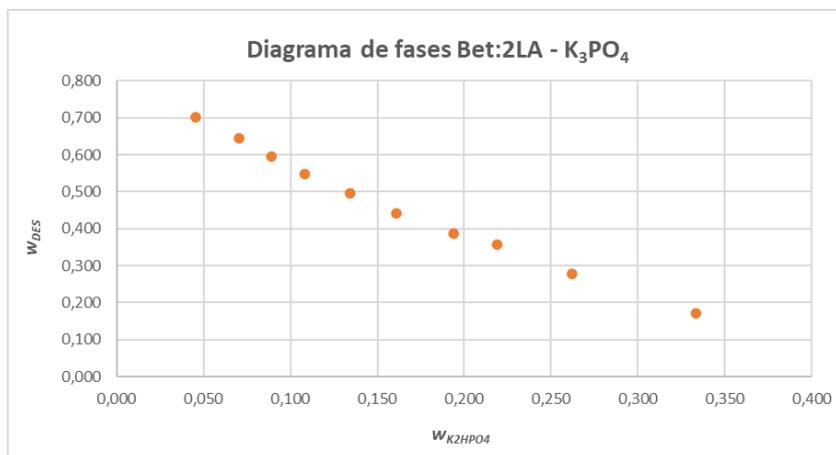


Figura 8 Diagrama de fases del ATPS Bet:2LA- K_3PO_4

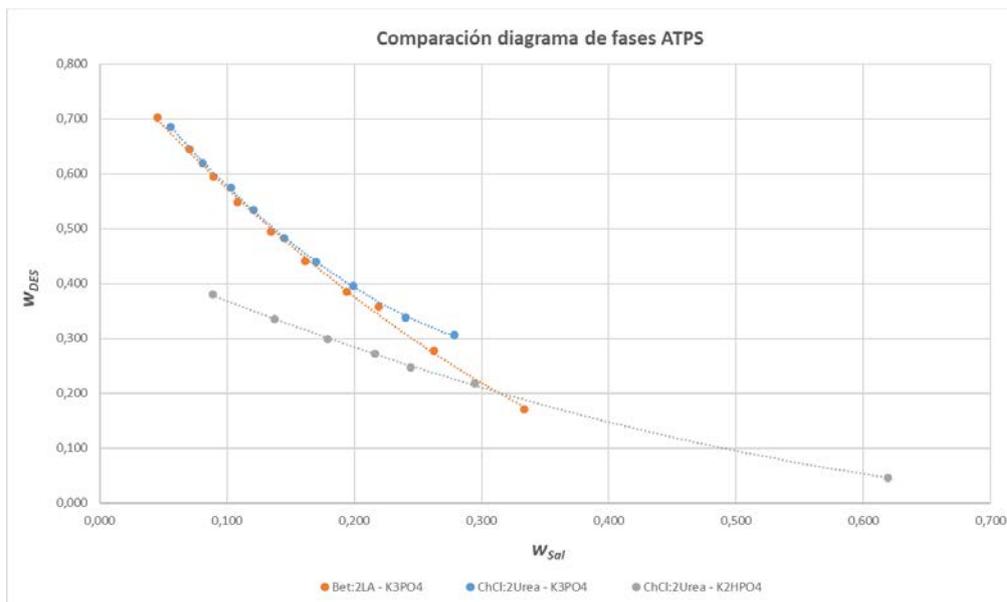


Figura 9 Comparación de los diagramas de fases de los tres ATPS preparados.

En la Figura 9 se han representado conjuntamente los diagramas de fases de los tres sistemas, observándose que el diagrama apenas cambia al modificar el tipo de DES, pero el cambio es muy acusado cuando se varía la sal del sistema.

4.3. RESULTADOS DISEÑO DE EXPERIMENTOS

4.3.1. PREPARACIÓN DE DES

Para la preparación de los DES en primer lugar se deben pesar las cantidades necesarias de cada compuesto, las cuales se han calculado previamente mediante Excel. Los valores de masa pesados se muestran en la Tabla 9:

Tabla 9. Cantidades necesarias para la preparación del DES de cloruro de colina - urea (1:2) y betaina ácido láctico (1:2).

m ChCl (g)	m urea (g)	m betaína (g)	m LA (g)
27,25	23,13	17,29	33,67

4.3.2. PREPARACIÓN DE ATPS

Las disoluciones de sal se prepararon en masa, y posteriormente se determinó su concentración mediante una volumetría ácido/base, teniendo una concentración del orden de 40-44 % (en masa). Tras varios ensayos previos, se eligieron las siguientes cantidades de sal y DES para formar el ATPS: 3,2 g y 1,6 g, respectivamente. Para la preparación del ATPs se toma un tubo, un falcón de 15 mL, donde se adiciona la sal junto con el DES, formando dos fases (Figura 10):



Figura 10. Tubos Falcon conteniendo un ATPS DES-sal. Fase inferior, disolución acuosa de la sal; fase superior, DES.

Al añadir 0,03 g de alga liofilizada, esta aparece preferentemente en la fase menos densa, el DES (Figura 11).

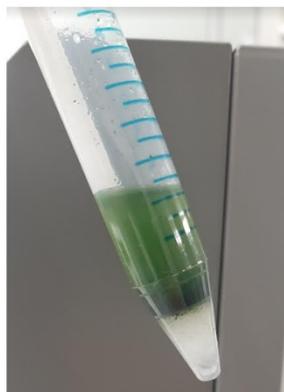


Figura 11. ATPS final, tras haber añadido el alga.

4.3.3. ANOVA DE DOS VÍAS

Los resultados experimentales de proteína y carbohidratos extraídos y la ratio Proteína/Carbohidatos del diseño experimental para microalgas se recogen en la Tabla A1 del Anexo, mientras que los resultados de proteína extraída de BSA se muestran en la Tabla A2. Dichos resultados se analizaron mediante un ANOVA de dos vías.

La Tabla 10 resume los p-valores correspondientes al test de comparación de varianzas del ANOVA, para cada tipo de matriz (microalga y BSA), así como respecto a la variable estudiada: Proteína extraída, Carbohidratos extraídos, y su ratio.

Tabla 10 Resumen de los p-valores del ANOVA de dos vías, obtenidos por cada factor dependiendo de la respuesta estudiada en cada matriz.

Factores estudiados	Microalga			BSA
	% Proteínas	% Carbohidratos	Ratio Prot/Carb	% Proteínas
ATPS	0,0002	0,0444	0,0011	0,0000
Pretratamiento	0,6613	0,8779	0,7335	0,1142
Interacción	0,2381	0,9230	0,7481	0,1718

Los resultados apuntan a que el pretratamiento de molienda aquí empleado no tiene un efecto significativo en la extracción de proteínas o carbohidratos ($p > \alpha$). En cambio, el tipo de ATPS sí tiene un efecto significativo en todas las variables respuesta analizadas ($p < \alpha$). Para saber con qué ATPS se obtienen los mejores resultados se aplicó la prueba LSD de múltiples rangos a cada variable (los resultados del test se pueden consultar en las Tablas A3 - A6 del Anexo).

Las Figuras 12, 13 y 14 muestran las gráficas de medias de las variables de respuesta investigadas. En ellas se puede visualizar si las diferencias entre los resultados a cada nivel del factor tipo de ATPS son significativas (cuando los intervalos de confianza no se solapan).

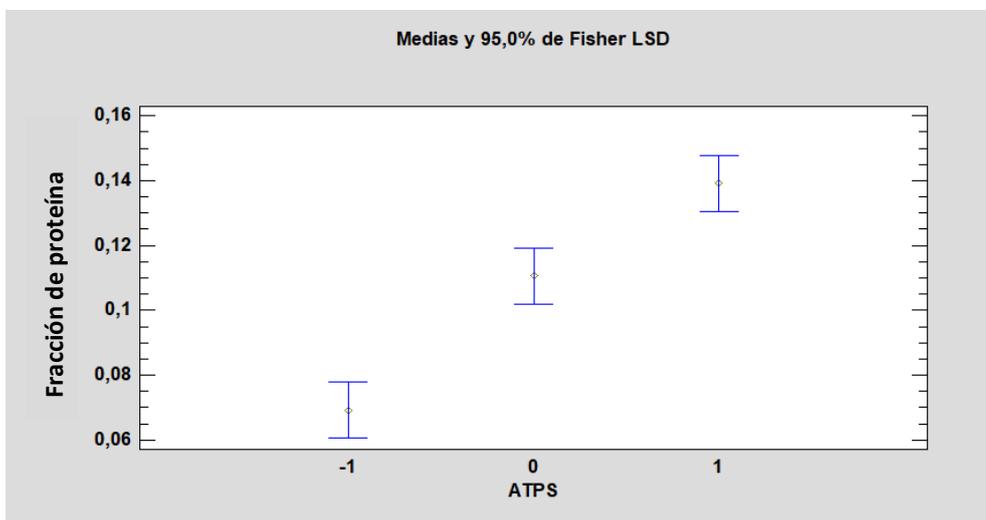


Figura 12 Valores promedio de extracción de proteínas en microalga dependiendo del tipo de ATPS empleado (el test LSD confirma que esas diferencias son significativas).

En el caso de la extracción de proteínas de la microalga (Figura 12), todos los ATPS proporcionan rendimientos de extracción diferentes, siendo $\text{ChCl}:2\text{Urea}-\text{K}_3\text{PO}_4$ el que proporciona mejores resultados (de hasta un 14%).

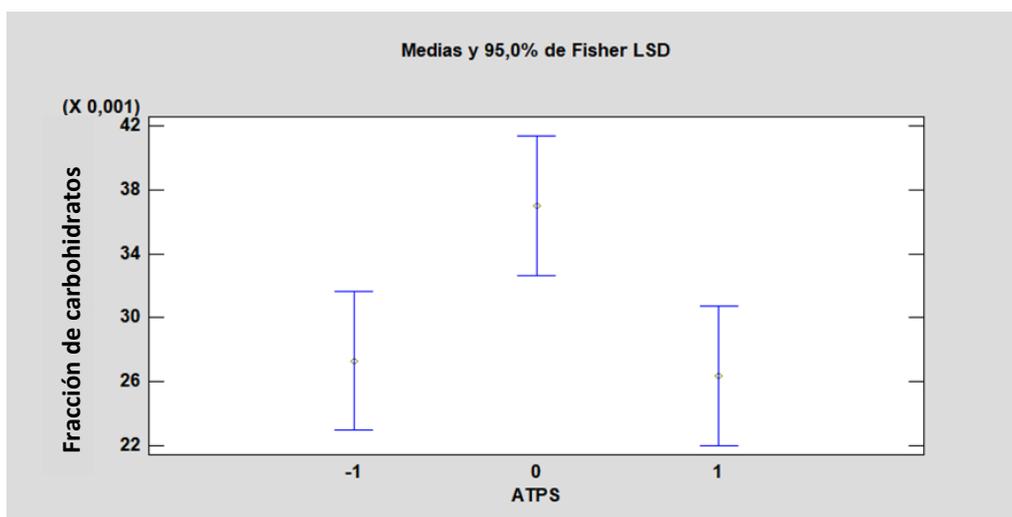


Figura 13 Valores promedio de extracción de carbohidratos en microalga dependiendo del tipo de ATPS empleado (el test LSD confirma que esas diferencias son significativas entre 0 y el resto de niveles).

Para la extracción de carbohidratos, los ATPSs formados por Bet:2LA-K₂HPO₄ (-1) y ChCl:2Urea-K₃PO₄ (1) son los que proporcionan menor eficiencia en la extracción de carbohidratos respecto a ChCl:2Urea-K₂HPO₄ (0) no habiendo diferencias significativas entre los niveles -1 y 1.

No obstante, cabe destacar que el p-valor obtenido está muy cercano a 0,05. Es decir, que a pesar de que el factor ha resultado ser significativo para la variable extracción de carbohidratos, lo es en mucha menor medida que en el caso de las proteínas, con un p-valor dos órdenes de magnitud más pequeño que permite rechazar la hipótesis nula con mayor fuerza.

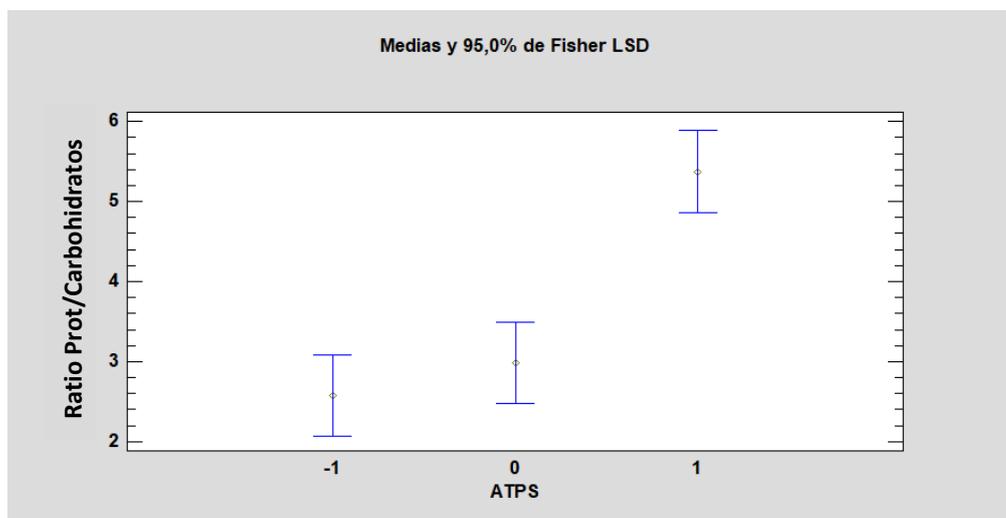


Figura 14 Valores promedio de la ratio en microalga dependiendo del tipo de ATPS empleado (el test LSD confirma que esas diferencias son significativas entre 1 y el resto de niveles).

Por último, al analizar la ratio (Figura 14), se obtiene que el ATPS ChCl:2Urea-K₃PO₄ es el que proporciona una mayor eficiencia en la extracción de proteínas, a la vez que reduce la coextracción de carbohidratos.

Se observa que los ATPSs ensayados han resultado más eficientes para extraer carbohidratos que proteína de las microalgas liofilizadas.

En el caso de la extracción de proteína de BSA el rendimiento de la extracción es mucho más elevado, lo que resulta lógico dado que la biomolécula es directamente accesible al extractante y no se requiere romper una membrana celular. De nuevo, el tipo de ATPS es el único factor significativo. El test LSD y el gráfico de medias indican que los ATPS Bet:2LA-K₂HPO₄ y ChCl:2Urea-K₃PO₄ proporcionan un mayor porcentaje de extracción,

sin existir diferencias significativas entre ellos, pero sí con el ATPS $\text{ChCl}:2\text{Urea}-\text{K}_2\text{HPO}_4$, (Figura 15).

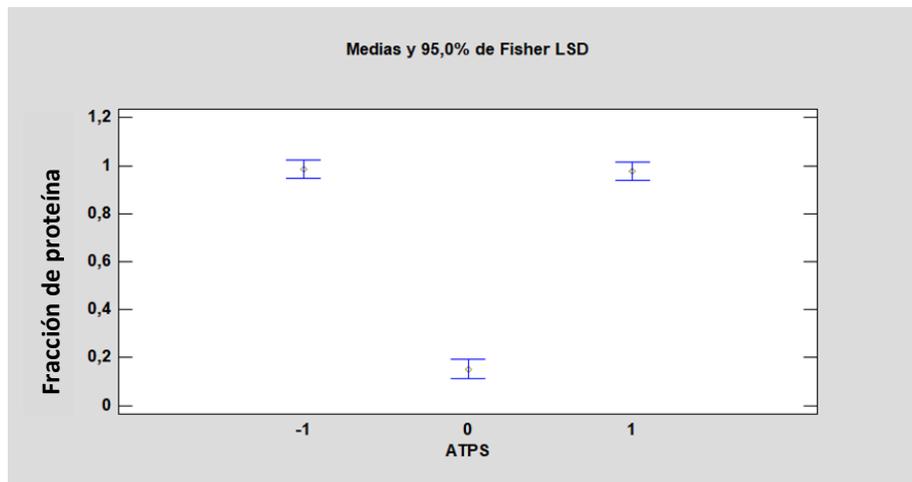


Figura 15 Valores promedio de la extracción de proteínas en BSA dependiendo del tipo de ATPS empleado (el test LSD confirma que esas diferencias son significativas entre 0 y el resto de niveles).

Estos resultados apuntan a que la capacidad de diferentes ATPS para extraer proteínas puede ser independiente del tipo de muestra en el que se utilice, y estar más relacionado con la naturaleza de las fases involucradas en el sistema acuoso bifásico.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo, se ha investigado el potencial de sistemas bifásicos acuosos basados en la combinación de disolventes eutécticos profundos naturales, de fácil biodegradabilidad, y soluciones salinas de fosfato, para la extracción de la fracción proteica contenida en biomasa algal crecida en fotobiorreactores de tratamiento de purines porcinos y liofilizada.

Se ha desarrollado un método para la recuperación de las proteínas presentes en las microalgas, comparándolo con el rendimiento de extracción de proteínas a partir de un patrón de BSA, mediante la utilización de ATPSs, y se ha estudiado mediante un diseño de experimentos si los factores ensayados (tipo de ATPS y molienda/no molienda previa de la biomasa liofilizada) influyen en la extracción:

- En el caso de las microalgas, se ha determinado que el ATPS $\text{ChCl}:2\text{Urea}-\text{K}_3\text{PO}_4$ es el que proporciona mejores ratios %Proteína extraída respecto a los carbohidratos, obteniendo valores de extracción de proteína cercanos al 15%.
- La misma conclusión se extrae tras analizar los datos del patrón de BSA, en donde los ATPSs $\text{Bet}:2\text{LA}-\text{K}_2\text{HPO}_4$ y $\text{ChCl}:2\text{Urea}-\text{K}_3\text{PO}_4$ muestran una afinidad por las proteínas significativamente mayor que $\text{ChCl}:2\text{Urea}-\text{K}_2\text{HPO}_4$.
- En ambos casos, el tipo de pretratamiento no fue un factor significativo en la extracción de proteínas y carbohidratos.
- La interacción entre ambos factores tampoco fue significativa en ninguno de los cuatro ANOVAs realizados.

Como conclusión, podemos decir que se han obtenido resultados prometedores, pues aunque los rendimientos de extracción de proteínas no hayan sido muy altos (<15%) la técnica es muy selectiva a las proteínas, y se coextrae una cantidad de carbohidratos pequeña (<3-4%), como se puede observar en la Tabla A1 en los Anexos.

Por tanto, estamos ante un procedimiento que, en comparación con las extracciones directas líquido-sólido con disolventes convencionales (incluso con DESs), es más rápido, económico, verde, y selectivo. No obstante, un trabajo futuro debe investigar otros tipos de ATPS con mayor selectividad y poder solubilizante hacia las proteínas, así como qué otros factores pueden afectar al proceso para mejorar el rendimiento del proceso. También sería recomendable escalar el proceso para utilizar cantidades de microalga más elevadas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] O. Martínez Augustin and E. Martínez De Victoria Muñoz, "Proteínas y péptidos en nutrición enteral," *Nutricion Hospitalaria*, vol. 21, no. SUPPL. 2. 2006.
- [2] C. J. Chou, M. Affolter, and M. Kussmann, "A nutrigenomics view of protein intake: Macronutrient, bioactive peptides, and protein turnover," in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, vol. 108, 2012. doi: 10.1016/B978-0-12-398397-8.00003-4.
- [3] D. Tilman and M. Clark, "Global diets link environmental sustainability and human health," *Nature*, vol. 515, no. 7528, 2014, doi: 10.1038/nature13959.
- [4] D. Moldes, E. M. Rojo, S. Bolado, P. A. García-Encina, and B. Comesaña-Gándara, "Biodegradable Solvents: A Promising Tool to Recover Proteins from Microalgae," *Applied Sciences (Switzerland)*, vol. 12, no. 5. 2022. doi: 10.3390/app12052391.
- [5] H. C. J. Godfray *et al.*, "Food security: The challenge of feeding 9 billion people," *Science*, vol. 327, no. 5967. 2010. doi: 10.1126/science.1185383.
- [6] E. Rööß, B. Bajželj, P. Smith, M. Patel, D. Little, and T. Garnett, "Protein futures for Western Europe: potential land use and climate impacts in 2050," *Reg Environ Change*, vol. 17, no. 2, 2017, doi: 10.1007/s10113-016-1013-4.
- [7] N. Alexandratos and J. Bruinsma, "World agriculture towards 2030/2050," *Land use policy*, vol. 20, no. 4, 2012.
- [8] M. R. Tredici, L. Rodolfi, N. Biondi, N. Bassi, and G. Sampietro, "Techno-economic analysis of microalgal biomass production in a 1-ha Green Wall Panel (GWP®) plant," *Algal Res*, vol. 19, 2016, doi: 10.1016/j.algal.2016.09.005.
- [9] S. Bleakley and M. Hayes, "Algal proteins: Extraction, application, and challenges concerning production," *Foods*, vol. 6, no. 5, 2017, doi: 10.3390/foods6050033.
- [10] J. Ruiz *et al.*, "Towards industrial products from microalgae," *Energy and Environmental Science*, vol. 9, no. 10. 2016. doi: 10.1039/c6ee01493c.
- [11] R. B. Draaisma, R. H. Wijffels, P. M. Slegers, L. B. Brentner, A. Roy, and M. J. Barbosa, "Food commodities from microalgae," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 24, no. 2. 2013. doi: 10.1016/j.copbio.2012.09.012.
- [12] A. L. Lupatini, L. de Oliveira Bispo, L. M. Colla, J. A. V. Costa, C. Canan, and E. Colla, "Protein and carbohydrate extraction from *S. platensis* biomass by ultrasound and mechanical agitation," *Food Research International*, vol. 99, 2017, doi: 10.1016/j.foodres.2016.11.036.
- [13] A. G. Waghmare, M. K. Salve, J. G. LeBlanc, and S. S. Arya, "Concentration and characterization of microalgae proteins from *Chlorella pyrenoidosa*," *Bioresour Bioprocess*, vol. 3, no. 1, 2016, doi: 10.1186/s40643-016-0094-8.
- [14] M. N. Johansen, *Microalgae: Biotechnology, microbiology and energy*. 2013.
- [15] J. W. R. Chong *et al.*, "Advances in production of bioplastics by microalgae using food waste hydrolysate and wastewater: A review," *Bioresource Technology*, vol. 342. 2021. doi: 10.1016/j.biortech.2021.125947.

- [16] S. O. Cinar, Z. K. Chong, M. A. Kucuker, N. Wieczorek, U. Cengiz, and K. Kuchta, "Bioplastic production from microalgae: A review," *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 17, no. 11. 2020. doi: 10.3390/ijerph17113842.
- [17] M. V. L. Chhandama, K. B. Satyan, B. Changmai, C. Vanlalveni, and S. L. Rokhum, "Microalgae as a feedstock for the production of biodiesel: A review," *Bioresource Technology Reports*, vol. 15. 2021. doi: 10.1016/j.biteb.2021.100771.
- [18] M. Aggarwal and N. Remya, "The State-of-the-Art Production of Biofuel from Microalgae with Simultaneous Wastewater Treatment: Influence of Process Variables on Biofuel Yield and Production Cost," *Bioenergy Research*, vol. 15, no. 1. 2022. doi: 10.1007/s12155-021-10277-1.
- [19] L. B. Christenson and R. C. Sims, "Rotating algal biofilm reactor and spool harvester for wastewater treatment with biofuels by-products," *Biotechnol Bioeng*, vol. 109, no. 7, 2012, doi: 10.1002/bit.24451.
- [20] Y. Wang *et al.*, "Perspectives on the feasibility of using microalgae for industrial wastewater treatment," *Bioresource Technology*, vol. 222. 2016. doi: 10.1016/j.biortech.2016.09.106.
- [21] K. Li *et al.*, "Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: A review," *Bioresource Technology*, vol. 291. 2019. doi: 10.1016/j.biortech.2019.121934.
- [22] J. A. V. Costa, B. C. B. Freitas, L. Moraes, M. Zaparoli, and M. G. Morais, "Progress in the physicochemical treatment of microalgae biomass for value-added product recovery," *Bioresource Technology*, vol. 301. 2020. doi: 10.1016/j.biortech.2019.122727.
- [23] H. R. Azencott, G. F. Peter, and M. R. Prausnitz, "Influence of the Cell Wall on Intracellular Delivery to Algal Cells by Electroporation and Sonication," *Ultrasound Med Biol*, vol. 33, no. 11, 2007, doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2007.05.008.
- [24] I. Rodríguez-Meizoso, L. Jaime, S. Santoyo, F. J. Señoráns, A. Cifuentes, and E. Ibáñez, "Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from *Haematococcus pluvialis* microalga," *J Pharm Biomed Anal*, vol. 51, no. 2, 2010, doi: 10.1016/j.jpba.2009.03.014.
- [25] M. Koller, A. Muhr, and G. Braunegg, "Microalgae as versatile cellular factories for valued products," *Algal Research*, vol. 6, no. PA. 2014. doi: 10.1016/j.algal.2014.09.002.
- [26] S. Liu, Z. Li, B. Yu, S. Wang, Y. Shen, and H. Cong, "Recent advances on protein separation and purification methods," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 284. 2020. doi: 10.1016/j.cis.2020.102254.
- [27] M. Houde, N. Khodaei, N. Benkerroum, and S. Karboune, "Barley protein concentrates: Extraction, structural and functional properties," *Food Chem*, vol. 254, 2018, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.01.156.

- [28] D. N. López, M. Galante, M. Robson, V. Boeris, and D. Spelzini, "Amaranth, quinoa and chia protein isolates: Physicochemical and structural properties," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 109. 2018. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.080.
- [29] M. Pojić, A. Mišan, and B. Tiwari, "Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 75. 2018. doi: 10.1016/j.tifs.2018.03.010.
- [30] A. Etxabide, T. Garrido, J. Uranga, P. Guerrero, and K. de la Caba, "Extraction and incorporation of bioactives into protein formulations for food and biomedical applications," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 120. 2018. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.030.
- [31] A. P. Abbott, G. Capper, D. L. Davies, R. K. Rasheed, and V. Tambyrajah, "Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures," *Chemical Communications*, no. 1, 2003, doi: 10.1039/b210714g.
- [32] E. L. Smith, A. P. Abbott, and K. S. Ryder, "Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications," *Chemical Reviews*, vol. 114, no. 21. 2014. doi: 10.1021/cr300162p.
- [33] S. Tang, G. A. Baker, and H. Zhao, "Ether- and alcohol-functionalized task-specific ionic liquids: Attractive properties and applications," *Chem Soc Rev*, vol. 41, no. 10, 2012, doi: 10.1039/c2cs15362a.
- [34] B. B. Hansen *et al.*, "Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications," *Chemical Reviews*, vol. 121, no. 3. 2021. doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00385.
- [35] Q. Zhang, K. de Oliveira Vigier, S. Royer, and F. Jérôme, "Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications," *Chem Soc Rev*, vol. 41, no. 21, 2012, doi: 10.1039/c2cs35178a.
- [36] T. Beyersdorff *et al.*, "Synthesis of Ionic Liquids," in *Electrodeposition from Ionic Liquids*, 2008. doi: 10.1002/9783527622917.ch2.
- [37] N. Özel and M. Elibol, "A review on the potential uses of deep eutectic solvents in chitin and chitosan related processes," *Carbohydrate Polymers*, vol. 262. 2021. doi: 10.1016/j.carbpol.2021.117942.
- [38] D. O. Abranches, M. A. R. Martins, L. P. Silva, N. Schaeffer, S. P. Pinho, and J. A. P. Coutinho, "Phenolic hydrogen bond donors in the formation of non-ionic deep eutectic solvents: The quest for type v des," *Chemical Communications*, vol. 55, no. 69, 2019, doi: 10.1039/c9cc04846d.
- [39] M. Iqbal *et al.*, "Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications," *Biological Procedures Online*, vol. 18, no. 1. 2016. doi: 10.1186/s12575-016-0048-8.
- [40] P. Å. Albertsson, "Fractionation of particles and macromolecules in aqueous two-phase systems," *Biochem Pharmacol*, vol. 5, no. 4, 1961, doi: 10.1016/0006-2952(61)90028-4.

- [41] G. Liu, B. Jiang, Y. Wang, J. Dai, and Z. Xiu, "Aqueous two-phase extraction of 2, 3-butanediol by ethanol/potassium carbonate system from *Dioscorea zingiberensis* fermentative broths," *Huagong Xuebao/CIESC Journal*, vol. 60, no. 11, 2009.
- [42] A. Louwrier, "Model phase separations of proteins using aqueous/ethanol components," *Biotechnology Techniques*, vol. 12, no. 5, 1998, doi: 10.1023/A:1008818229903.
- [43] W. N. Phong *et al.*, "Proteins recovery from wet microalgae using liquid biphasic flotation (LBF)," *Bioresour Technol*, vol. 244, 2017, doi: 10.1016/j.biortech.2017.05.165.
- [44] D. Baskaran, K. Chinnappan, R. Manivasagan, and D. K. Mahadevan, "Partitioning of crude protein from aqua waste using PEG 600-inorganic salt Aqueous Two-Phase Systems," *Chemical Data Collections*, vol. 15–16, 2018, doi: 10.1016/j.cdc.2018.05.004.
- [45] B. Schuur, T. Brouwer, D. Smink, and L. M. J. Sprakel, "Green solvents for sustainable separation processes," *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, vol. 18. 2019. doi: 10.1016/j.cogsc.2018.12.009.
- [46] Y. Xie, H. Xing, Q. Yang, Z. Bao, B. Su, and Q. Ren, "Aqueous Biphasic System Containing Long Chain Anion-Functionalized Ionic Liquids for High-Performance Extraction," *ACS Sustain Chem Eng*, vol. 3, no. 12, 2015, doi: 10.1021/acssuschemeng.5b01068.
- [47] J. F. B. Pereira, M. G. Freire, and J. A. P. Coutinho, "Aqueous two-phase systems: Towards novel and more disruptive applications," *Fluid Phase Equilib*, vol. 505, 2020, doi: 10.1016/j.fluid.2019.112341.
- [48] E. v. Capela, "ÊA simple approach for THE DETERMINATION AND CHARACTERIZATION OF TERNARY PHASE DIAGRAMS of aqueous two-phase systems composed of water, poly(ethylene) glycol and sodium carbonate," *Chem Eng Educ*, vol. 53, no. 2, 2020, doi: 10.18260/2-1-370.660-108013.
- [49] F. I. Segovia and M. E. García, "Determinacion de proteínas de un alimento por el método Kjeldahl. Valoración con un ácido fuerte," *Departamento de Tecnología de Alimentos*, vol. I, 2013.
- [50] S. van Wychen and L. M. L. Laurens, "Determination of Total Carbohydrates in Algal Biomass," *Technical Report NREL/TP-5100-60957 nationala Renewable Energy laboratory (NREL)*, no. December, 2013.
- [51] A. M. Hernandez, R. del P. Bojaca, and M. E. Duque, "Determinación de grasas y aceites en aguas por el método soxhlet," *Ideam*, 2007.
- [52] S. Aravind, D. Barik, P. Ragupathi, and G. Vignesh, "Investigation on algae oil extraction from algae *Spirogyra* by Soxhlet extraction method," in *Materials Today: Proceedings*, 2020, vol. 43. doi: 10.1016/j.matpr.2020.11.668.
- [53] T. Huang, "Competitive Binding to Cuprous Ions of Protein and BCA in the Bicinchoninic Acid Protein Assay," *Open Biomed Eng J*, vol. 4, no. 1, 2010, doi: 10.2174/1874120701004010271.

- [54] P. K. Smith *et al.*, "Measurement of protein using bicinchoninic acid," *Anal Biochem*, vol. 150, no. 1, 1985, doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- [55] S. S. Nielsen, "Phenol-Sulfuric Acid Method for Total Carbohydrates," 2010. doi: 10.1007/978-1-4419-1463-7_6.
- [56] G. Tortosa Muñoz, "Manual práctico de Quimiometría," *DIGITAL.CSIC*, 2011.

7. Anexos

7.1. Valores experimentales ANOVAs

Tabla A.1 Valores experimentales obtenidos en el ANOVA de la microalga.

	Diseño de exp. añadiendo microalga											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
m DES / g	1,72	1,64	1,62	1,63	1,62	1,63	1,63	1,62	1,61	1,62	1,62	1,64
m Dis Sal / g	2,88	2,88	2,96	3,05	3,02	3,04	2,91	2,90	2,98	2,97	2,97	2,95
K ₂ HPO ₄ o K ₃ PO ₄	K ₂ HPO ₄	K ₂ HPO ₄	K ₃ PO ₄	K ₂ HPO ₄	K ₂ HPO ₄	K ₃ PO ₄						
m K ₂ HPO ₄ o K ₃ PO ₄ / g	1,17	1,17	1,23	1,26	1,25	1,26	1,19	1,18	1,23	1,23	1,23	1,22
w DES	0,37	0,36	0,35	0,35	0,35	0,35	0,36	0,36	0,35	0,35	0,35	0,36
w K ₂ HPO ₄ o K ₃ PO ₄ / g	0,26	0,26	0,27	0,27	0,27	0,27	0,26	0,26	0,27	0,27	0,27	0,27
m Microalga / g	0,0313	0,0360	0,0305	0,0315	0,0297	0,0306	0,0310	0,0311	0,0311	0,0362	0,0312	0,0306
m Proteína inicial / g	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01
m Carbohidratos inicial / g	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Volumen de enrase / mL	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00
Proteínas / mg L ⁻¹	35,70	39,21	50,84	69,24	74,21	69,95	43,79	39,92	63,92	70,66	84,90	73,50
m Proteínas extraídas / mg	0,001	0,001	0,001	0,002	0,002	0,002	0,001	0,001	0,002	0,002	0,002	0,002
Extracción proteínas / %	7,2%	6,1%	9,4%	12,3%	14,0%	12,8%	7,9%	7,2%	11,5%	11,0%	15,3%	13,5%
Carbohidratos / mg L ⁻¹	32,68	31,67	43,45	50,12	26,76	27,12	33,30	42,60	46,66	51,04	39,13	36,02
m Carbohidratos extraídos / g	0,0008	0,0008	0,0011	0,0013	0,0007	0,0007	0,0008	0,0011	0,0012	0,0013	0,0010	0,0009
Extracción carbohidratos / %	2,6%	2,2%	3,6%	4,0%	2,3%	2,2%	2,7%	3,4%	3,8%	3,5%	3,1%	2,9%

Tabla A.2 Valores experimentales obtenidos para el ANOVA de la BSA. Notar que las celdas correspondientes a los carbohidratos se han omitido (pues es un patrón puro de proteína).

	Diseño de experimentos: cambiando la microalga por proteína pura (BSA)											
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
m DES / g	1,61	1,66	1,62	1,65	1,63	1,67	1,70	1,61	1,61	1,64	1,68	1,65
m Dis Sal / g	2,89	2,83	2,94	2,96	2,96	2,95	2,88	2,89	2,93	2,94	2,93	2,95
K_2HPO_4 o K_3PO_4	K2HPO4	K2HPO4	K3PO4	K3PO4	K3PO4	K3PO4	K2HPO4	K2HPO4	K3PO4	K3PO4	K3PO4	K3PO4
m K_2HPO_4 o K_3PO_4 / g	1,18	1,15	1,22	1,23	1,23	1,22	1,17	1,18	1,21	1,22	1,21	1,22
w DES	0,36	0,37	0,36	0,36	0,36	0,36	0,37	0,36	0,35	0,36	0,36	0,36
w K_2HPO_4 o K_3PO_4 / g	0,26	0,26	0,27	0,27	0,27	0,26	0,26	0,26	0,27	0,27	0,26	0,27
m BSA / g	0,0116	0,0168	0,0141	0,0125	0,0129	0,0148	0,0148	0,0133	0,0149	0,0129	0,0120	0,0119
m Proteína inicial / g	0,0114	0,0165	0,0138	0,0123	0,0126	0,0145	0,0145	0,0130	0,0146	0,0126	0,0118	0,0117
m Carbohidratos inicial / g	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Volumen de enrase / mL	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00
Proteínas / mg L ⁻¹	462,05	592,15	75,64	71,02	527,38	534,00	626,62	496,16	90,61	88,46	444,75	466,09
m Proteínas extraídas / mg	0,012	0,015	0,002	0,002	0,013	0,013	0,016	0,012	0,002	0,002	0,011	0,012
Extracción proteínas / %	101,6%	89,9%	13,7%	14,5%	104,3%	92,0%	108,0%	95,2%	15,5%	17,5%	94,5%	99,9%
Carbohidratos / mg L ⁻¹	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
m Carbohidratos extraídos / g	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Extracción carbohidratos / %	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

7.2. Prueba LSD de rangos múltiples

Tabla A 3 Resultados prueba de rangos múltiples para el %Extracción de proteína en microalga.

Pruebas de Múltiple Rangos para %Proteínas por ATPS

Método: 95,0 porcentaje LSD

ATPS	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
-1	4	0,0692	0,00504449	X
0	4	0,110575	0,00504449	X
1	4	0,13915	0,00504449	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
-1 - 0	*	-0,041375	0,0174563
-1 - 1	*	-0,06995	0,0174563
0 - 1	*	-0,028575	0,0174563

* indica una diferencia significativa.

Tabla A 4 Resultados prueba de rangos múltiples para el %Extracción de carbohidratos en microalga.

Pruebas de Múltiple Rangos para %Carbohidratos por ATPS

Método: 95,0 porcentaje LSD

ATPS	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	4	0,026375	0,00252199	X
-1	4	0,0273	0,00252199	X
0	4	0,037025	0,00252199	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
-1 - 0	*	-0,009725	0,00872725
-1 - 1		0,000925	0,00872725
0 - 1	*	0,01065	0,00872725

* indica una diferencia significativa.

Tabla A 5 Resultados prueba de rangos múltiples para la ratio Proteínas/Carbohidratos en microalga.

Pruebas de Múltiple Rangos para %Proteínas/%Carbohidratos por ATPS

Método: 95,0 porcentaje LSD

ATPS	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
-1	4	2,5725	0,295385	X
0	4	2,98	0,295385	X
1	4	5,375	0,295385	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
-1 - 0		-0,4075	1,02217
-1 - 1	*	-2,8025	1,02217
0 - 1	*	-2,395	1,02217

* indica una diferencia significativa.

Tabla A 6 Resultados prueba de rangos múltiples para el %Extracción de proteínas en BSA.

Pruebas de Múltiple Rangos para %Proteínas por ATPS

Método: 95,0 porcentaje LSD

ATPS	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0	4	0,153	0,0223486	X
1	4	0,97675	0,0223486	X
-1	4	0,98675	0,0223486	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
-1 - 0	*	0,83375	0,0773364
-1 - 1		0,01	0,0773364
0 - 1	*	-0,82375	0,0773364

* indica una diferencia significativa.