



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Máster en Técnicas Avanzadas en Química. Control y Calidad
Químicos.

**Recuperación de proteínas de biomasa algal usando Disolventes
Eutécticos Profundos (DESS)**

Autor: Begoña Valleandrés Goyenechea

Tutor/es: Marisol Vega Alegre

David Moldes Plaza

Resumen

El incremento de la demanda de alimentos y piensos, junto con la necesidad de reducir las emisiones de gases de efecto invernadero provenientes del ganado, ha impulsado la búsqueda de fuentes de proteínas más sostenibles. Las microalgas son ricas en proteínas de alto rendimiento y crecen rápidamente en aguas residuales, convirtiendo nutrientes y carbono (incluyendo CO₂) en biomasa, produciendo O₂ en el proceso. Además, las microalgas son capaces de retener contaminantes de las aguas residuales, abordando así otro problema: la escasez de agua. Sin embargo, obtener proteínas de las microalgas es un proceso complejo, ya que necesitan ser separadas del resto de biocomponentes presentes en la matriz, requiriendo el uso de técnicas de extracción eficientes, selectivas y sostenibles. Los disolventes eutécticos profundos (DESs) son una alternativa prometedora en comparación a las técnicas tradicionales, que normalmente necesitan disolventes orgánicos o condiciones fuertes, dos cosas perjudiciales para la estabilidad de las proteínas y la salud del planeta.

En este trabajo se ha realizado un ensayo de extracción líquido-sólido con la microalga verde *Scenedesmus almeriensis*. Primero, se prepararon los DESs y para su caracterización se utilizó espectroscopía IR-TF. Tras ello, se llevó a cabo un *screening* inicial para estudiar la influencia de los factores principales en el proceso de recuperación de proteínas, dando como resultado que la combinación del pretratamiento de ultrasonidos y mortero incrementaba el rendimiento de la recuperación. Con la información obtenida en el *screening* se optimizó el procedimiento de preparación de muestra y se implementó un diseño de experimentos ortogonal L18 para estudiar siete factores diferentes: biomasa, pretratamiento, DES, tiempo, temperatura, ratio biomasa-disolvente y concentración de DES. El tipo de biomasa se estudió a dos niveles, mientras que los otros seis factores se estudiaron a tres niveles. Se ensayó con tres DESs diferentes, todos preparados con cloruro de colina como dador de enlace de hidrógeno, en un ratio molar 1:2, para comprobar si el aceptor de enlace de hidrógeno tiene influencia en el rendimiento del DES. Las variables respuesta medidas fueron la recuperación de proteínas y carbohidratos, así como su ratio. Además, se construyeron varios modelos matemáticos para predecir el valor óptimo de las variables respuesta. Los resultados obtenidos demuestran una recuperación de proteínas del 20 %, aunque también se extrajeron una cantidad considerable de carbohidratos. Por lo tanto, parece que los DESs tienen un gran potencial de extracción de proteínas en microalgas, aunque el proceso necesita ser optimizado con el fin de mejorar el ratio proteínas-carbohidratos

extraído.

Abstract

The increasing demand for food and feed, and the need of reducing the emission of greenhouse effect gases from livestock are boosting the search for alternative sustainable protein sources. Microalgae are rich in high-quality protein and grow rapidly in wastewater, converting nutrients and carbon (including CO₂) into biomass, producing O₂ in the process. Moreover, microalgae are also capable of removing pollutants from the wastewater, tackling another problem: the scarcity of water. However, obtaining proteins from microalgae is a difficult process, as they must be separated from the rest of the biocompounds present in the matrix, requiring the use of efficient, selective, and sustainable extraction techniques. Deep eutectic solvents (DESs) are a promising alternative compared to traditional techniques, that typically use organic solvents or harsh conditions, which are both detrimental to protein stability and planet health.

In this work, liquid-solid extraction with DESs has been attempted on the green microalgae *Scenedesmus almeriensis*. First, we have prepared the DESs, and for their characterization FT-IR spectroscopy has been employed. Then, a preliminary screening result was set to study the main factors influencing the protein recovery process, finding that the combined pretreatment with ultrasounds and mortar increases the protein recovery yield. With the information gathered in the screening design, the experimental sample preparation procedure was optimized, and an orthogonal L18 experimental design was implemented to study seven different factors: biomass, pretreatment, DES, time, temperature, biomass to solvent ratio, and DES concentration. The type of biomass was studied at two levels, while the other six factors were studied at three levels. Three DES were assayed, all prepared with choline chloride as a hydrogen bond donor at a molar ratio of 1:2, to check if the hydrogen bond acceptor influences the DES performance. The response variables measured were the protein and carbohydrate yield, as well as the ratio of them. In addition, several mathematical models have been built to predict the optimal value of the response variables. The results achieved show a protein recovery yield up to 20 %, although a considerable amount of carbohydrates are also extracted. Therefore, it seems that DESs have a great potential for extraction proteins from microalgae, but the process needs to be optimized in order to improve the ratio of proteins-carbohydrates extracted.

Índice

1. Introducción	1
1.1. Problema actual de escasez de proteínas e importancia	1
1.2. Microalgas como fuente de proteínas	2
1.3. Recuperación de proteínas	3
1.3.1. Métodos clásicos de extracción de proteínas	5
1.3.2. Disolventes eutécticos profundos (DESs)	6
1.3.3. Disolventes eutécticos profundos (DESs) para la obtención de proteínas.	8
2. Objetivos y plan de trabajo	10
3. Materiales y métodos	11
3.1. Materiales, equipos y reactivos	11
3.2. Caracterización de la biomasa	13
3.2.1. Análisis de proteínas	13
3.2.2. Análisis de carbohidratos	14
3.2.3. Análisis de lípidos	14
3.2.4. Análisis de humedad y cenizas	15
3.3. Preparación de los DESs	16
3.4. Caracterización de los DES	16
3.5. Procedimiento analítico para la extracción de proteínas con DESs	17
3.5.1. Screening inicial	17

3.5.2.	Diseño L18	18
3.6.	Métodos de análisis de las muestras	19
3.6.1.	Método del BCA para el análisis de las proteínas	19
3.6.2.	Método del Fenol-Sulfúrico para la determinación de carbohidratos	20
4.	Resultados y discusión	22
4.1.	Metodología estadística: Diseño Experimental	22
4.1.1.	Screening inicial	23
4.1.2.	Diseño L18 de Taguchi	23
4.2.	Composición de la biomasa	26
4.3.	Resultados screening inicial	27
4.3.1.	Tipo de extractante	27
4.3.2.	Tipo de pretratamiento	28
4.4.	Diseño de experimentos L18	30
4.4.1.	Preparación de DES	30
4.4.2.	Caracterización espectroscópica de los DES	31
4.4.3.	Resultados del diseño	33
4.4.4.	Extracción de proteínas	35
4.4.5.	Extracción de carbohidratos	40
4.4.6.	Ratio proteínas/carbohidratos	43
5.	Conclusiones	48

A. Apéndices	50
A.1. Resultados test LSD para el diseño L18	50
A.1.1. Extracción proteínas	50
A.1.2. Extracción carbohidratos	51
A.1.3. Ratio	52
Bibliografía	59

1. Introducción

1.1. Problema actual de escasez de proteínas e importancia

Las proteínas son uno de los tres macronutrientes esenciales, junto con los carbohidratos y los lípidos. Estas desempeñan funciones estructurales y catalíticas vitales en los organismos, además de complementar a los lípidos y carbohidratos como fuente de energía. Las proteínas están formadas por diferentes aminoácidos, y cada animal necesita un grupo de los denominados «aminoácidos esenciales» (que sólo se pueden adquirir a través de la dieta) para su correcto funcionamiento, ya que el resto pueden ser producidos por su propio metabolismo. Al contrario de lo que ocurre con lípidos y carbohidratos (para los que no hay una cantidad “mínima” diaria), sí existe una recomendación de ingesta óptima de proteína, de entre 0.8-1.0 gramos por cada kilo de masa corporal, aunque este valor puede ser superior en personas deportistas o que quieran aumentar su masa muscular [1], [2].

Según la ONU, la población mundial en 2050 alcanzará cifras de entre 9-10 mil millones de personas [3]. El aumento de la demanda de alimentos, por tanto, de proteínas, va a necesitar de un aumento de producción a gran escala. El impacto medioambiental de duplicar la producción agrícola y ganadera va a depender de cómo se logre ese aumento de producción. Sostener el sistema alimentario y prevenir el cambio climático son dos de los mayores retos que se deben afrontar a corto y medio plazo, y ambos deben superarse al tiempo que se reduce el impacto de la gestión de la tierra y se apoya la salud y el bienestar humano. Lograr la seguridad alimentaria sin sobrepasar los límites medioambientales es un gran desafío, sobre todo porque la demanda de productos ganaderos en los países en desarrollo está creciendo rápidamente [4]. Teniendo en cuenta que la mayoría de producción de proteína animal proviene de la ganadería intensiva, la cual tiene un alto impacto medioambiental (amenaza de biodiversidad, producción de gases de efecto invernadero, vertidos de fertilizantes que dañan los ecosistemas marinos, de agua dulce y terrestres, etc [5]), se deberían buscar alternativas en otras fuentes de proteínas, como las vegetales.

En el campo de la proteína vegetal están, por ejemplo, las legumbres, cuyo impacto (por gramo de proteína) es de hasta 5 y 10 veces menor que las fuentes animales [6], tal y como se resume en la Figura 1:

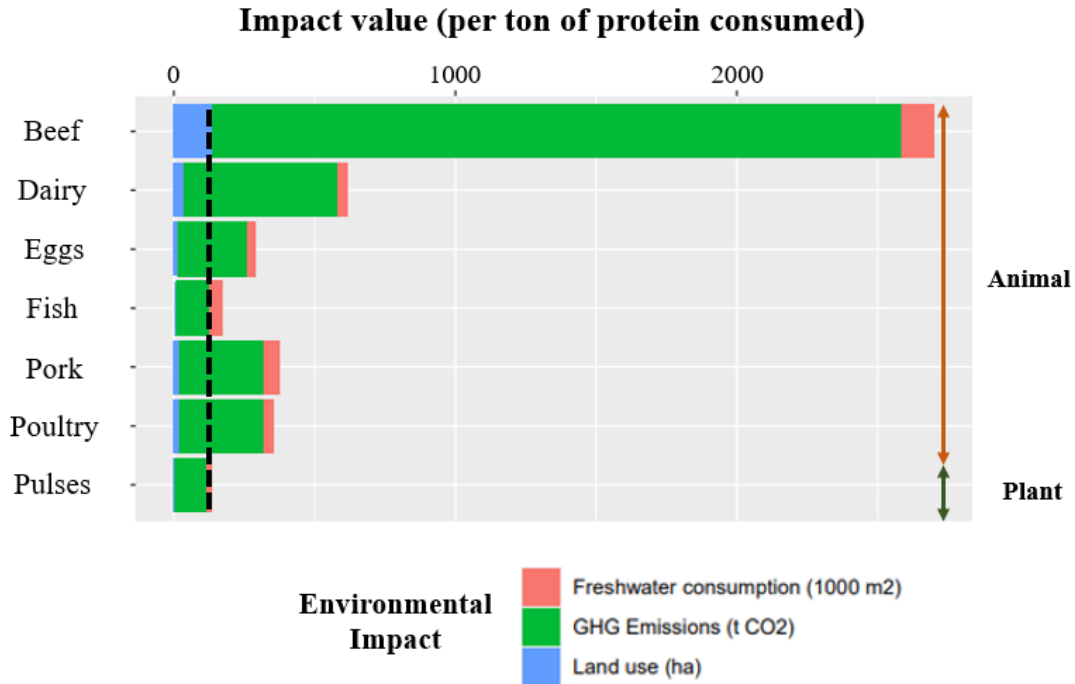


Figura 1: Cantidad de: agua potable (rojo), emisiones de gases de efecto invernadero (verde) y tierra usada (azul), por cada tonelada de proteína producida de diversas fuentes proteicas.

Debido a la creciente demanda que se espera y para complementar a las legumbres, es necesario buscar otras formas de producción y fuentes de proteínas que ayuden a cumplir los requerimientos de alimentación globales previstos, sin causar un daño al medioambiente. En este contexto, y dado que el consumo excesivo de carne roja y procesada se ha asociado al aumento de ciertas enfermedades [7], [8], se ha impulsado la recomendación de reducir su consumo. Multitud de nuevos estudios han surgido para dar respuesta a esta problemática, centrándose en buscar nuevas fuentes de proteínas de origen vegetal y de insectos [9]. Por ejemplo, Hallström et al. [10] encontraron que, en comparación con las dietas omnívoras, hay bajada de emisiones del 25-55 % en dietas veganas, de un 20-35 % en dietas vegetarianas y de un 0-35 % en dietas con menor consumo de carne en diferente grado.

1.2. Microalgas como fuente de proteínas

Las algas pueden describirse como organismos unicelulares (micro) o pluricelulares (macro) que se desarrollan en medio marino, y que son unas grandes productoras de O₂ y fijadoras de CO₂, como consecuencia de la fotosíntesis [11]. Estas propiedades ya de por sí son muy

interesantes pero, además, producen una cantidad muy importante de proteína (entre el 30-70 % en masa seca [12]) y de alta calidad, pues contiene todos los aminoácidos esenciales. Algunas también tienen mayor rendimiento proteico por unidad de superficie comparados con cultivos terrestres como la soja, legumbres o el trigo [13]. Es decir, a la par que se lucha contra una de las causas del calentamiento global reduciendo la cantidad de CO₂ atmosférico, se produce proteína de origen vegetal de gran calidad, que puede sustituir a la carne y derivados [14].

Este trabajo se va a centrar en las microalgas, las cuales son organismos unicelulares que se adaptan muy bien al entorno donde se encuentren, y que son muy resistentes a varios tipos de contaminantes, como metales pesados o contaminantes orgánicos emergentes; esto se puede usar para intentar paliar otro de los problemas a los que se enfrenta la sociedad actual: la escasez de agua potable [15]. Toneladas de agua se contaminan cada día debido a las actividades agrícolas, ganaderas y derivadas de la propia actividad del ser humano, lo que es problemático ya que las reservas de agua potable son limitadas. Ese agua residual (o *wastewater*, en inglés) suele contener gran cantidad de nitrógeno y de materia orgánica, pero también altas concentraciones de metales pesados como Cu, Zn, As, Cd, así como contener diversos contaminantes emergentes persistentes [16]. Parece lógico que la única alternativa es «limpiar» dicho agua contaminada, y es aquí donde se pueden aprovechar las microalgas: usar el agua residual como medio de cultivo para que las microalgas crezcan, produciendo proteínas y materia orgánica, a la par que retiran CO₂ y aportan O₂. Además, el agua residual se purificará, pues las algas son unos conocidos biosorbentes capaces de retener elevadas cantidades de metales pesados y contaminantes emergentes [17], [18]. De esta forma, atacamos los problemas medioambientales (agua contaminada e impacto de la producción de proteína) de una forma en la que prácticamente no se necesitan recursos extras, al emplearse como fuente de nutrientes las aguas residuales.

1.3. Recuperación de proteínas

El mayor escollo a resolver cuando queremos obtener proteínas (o cualquier otra biomolécula) de las microalgas, es que se debe romper la pared celular para liberar lo que haya dentro de cada célula, lo que es una etapa complicada dado que esta estructura es rígida y resistente [19]; la pared celular está formada principalmente por glucoproteínas, glucosaminas, pectinas y fibrillas de microcelulosa y de otros componentes como polisacáridos, sílica o carbonato de

calcio. Aún así, su estructura y composición varía en función de su etapa de crecimiento, forma celular y condiciones ambientales [20].

Además, después todavía queda separar selectivamente las proteínas de la mezcla resultante. Para afrontar esto se recurre a lo que se denomina como «aproximación de biorefinería» [21]. Generalmente, el proceso suele dividirse en las siguientes etapas, que se han esquematizado en la Figura 2:

1. Disrupción celular, se rompe la membrana y pared celular.
2. Liberación de las proteínas y resto de biomoléculas presentes en las células.
3. Separación selectiva de las proteínas.

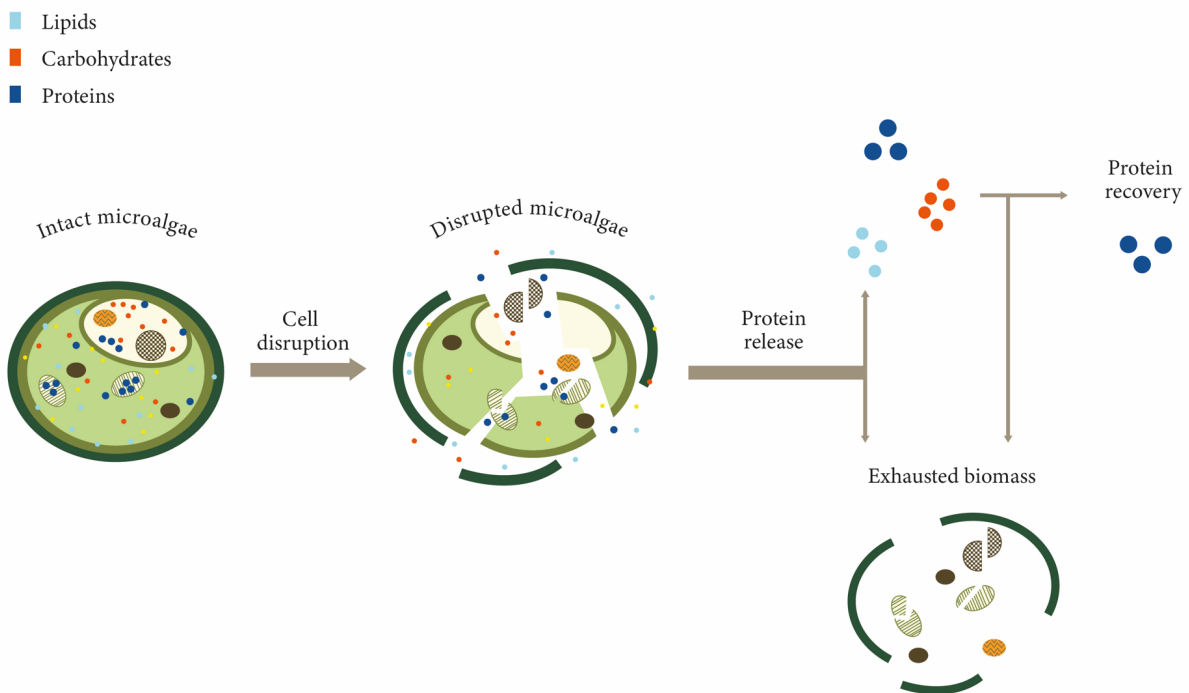


Figura 2: Esquema del proceso de obtención de proteínas a partir de biomasa algal [22].

En la primera etapa se suelen usar técnicas como la rotura asistida por microondas o ultrasónicos, la homogenización a alta presión, o hidrólisis ácidas, básicas o enzimáticas [22]. Las condiciones de operación de algunas de estas técnicas pueden resultar agresivas, afectando a la integridad de las proteínas que se quieren extraer. Además, muchas demandan bastante energía o tiempo, lo que no interesa a nivel industrial.

Para la liberación de los componentes, se suele emplear un extactante, con el fin de aislar dichas biomoléculas de las fracciones sólidas y de los orgánulos. Por último, se procede a la separación selectiva de proteínas, usando otro tipo de disolventes para su extracción u otras técnicas, como los métodos de precipitación, de separación por membrana, cromatográficos o electroforéticos.

1.3.1. Métodos clásicos de extracción de proteínas

Las proteínas de las algas convencionalmente se han extraído por medios acuosos, ácidos y alcalinos, o por hidrólisis enzimática de alga seca pulverizada. El sobrenadante se recoge mediante varios procesos de centrifugado y se recupera por técnicas como la ultrafiltración, precipitación o cromatografía [23].

No forma parte de este TFM explicar detalladamente cada una de estas técnicas utilizadas hoy en día, con sus respectivas ventajas y desventajas, por lo que se han resumido en la Tabla 1 las principales características de cada una de ellas:

Tabla 1: Características y tipos de los métodos de extracción de proteínas clásicos.

Método de extracción	Características	Tipos	Referencias
<i>Precipitación</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Método adecuado para la recuperación de la proteína cruda, preservando la actividad estructural. - Ineficiente en etapas posteriores de purificación (baja recuperación y eficiencia). 	<ul style="list-style-type: none"> Precipitación por punto isoeléctrico. Salting out. Precipitación con disolventes orgánicos. 	[24], [25]
<i>Separación por membrana</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Sin necesidad de disolvente. - Condiciones suaves que permite trabajar a bajas temperaturas (evita la degradación de proteínas). - Proceso lento (desarrollo procesos de flujo cruzado: MF y UF). - Difícil implementación industrial. - Pocas aplicaciones. 	<ul style="list-style-type: none"> Microfiltración y Ultrafiltración (MF y UF, respectivamente) 	[26], [27]
<i>Técnicas cromatográficas y electroforesis</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Electroforesis: excelente para identificar y cuantificar aminoácidos; largos tiempos de funcionamiento y bajo consumo de muestras (difícil aplicación industrial). - Cromatografía: la purificación de proteínas puede requerir de la combinación de varios tipos de técnicas cromatográficas. Es caro y requiere grandes cantidades de fase móvil orgánica. 	<ul style="list-style-type: none"> - Electroforesis capilar. - Cromatografía de intercambio iónico, permeación en gel, etc 	[28], [29]
<i>Extracción con disolventes</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Tiene bajo coste y buena capacidad de solubilidad. - Presenta altos tiempos de funcionamiento y elevado consumo de disolventes y energía. - La mayoría son compuestos orgánicos volátiles (COV) derivados de fuentes no renovables. 	<ul style="list-style-type: none"> Hidrocarburos, álcalis, acetona, alcoholes y cloroalcanos 	[30]-[32]

1.3.2. Disolventes eutécticos profundos (DESS)

A pesar de que los métodos de extracción convencionales suelen dar buenos rendimientos y son fáciles de implementar a nivel industrial, son bastante contaminantes y no conviene si queremos hacer un proceso con el mínimo impacto medioambiental posible. En 2003, Abbot et al. [33] describieron un nuevo tipo de disolventes: los disolventes eutécticos profundos (*Deep Eutectic Solvents*, DESs), los cuales han atraído la atención como alternativa a los disolventes orgánicos convencionales y a los líquidos iónicos, ya que presentan unas propiedades físicoquímicas análogas a estos últimos, pero los DESs son más biodegradables, más baratos, se pueden obtener de fuentes renovables, no son inestables, y su preparación no conlleva la formación de subproductos [34].

La definición estricta de mezcla eutéctica sería: “*mezcla no reactiva isotérmica aproximadamente reversible entre distintos componentes, durante el enfriamiento de un sistema líquido, que resulta en una depresión del punto de congelación del sistema en comparación con el punto de fusión de los compuestos puros*”.

Formalmente, los DESs no son un compuesto nuevo que se forma a partir de unos reactivos, puesto que no hay roturas ni formación de enlaces covalentes [35]. Los DESs son una mezcla de compuestos, generalmente donadores de enlaces hidrógeno (HBD) o un haluro metálico junto con un aceptor de enlaces de hidrógeno (HBA); lo que estabiliza el sistema es la formación de nuevos enlaces de hidrógeno intermoleculares [36], y la mezcla de dichos compuestos a una determinada composición provoca que se alcance un punto eutéctico en el diagrama de fases, que no es más que el punto que provoca que la mezcla de dos sólidos dé un líquido (es decir, la mezcla tiene un punto de fusión más bajo que el de los compuestos por separados). El adjetivo de «profundo» se añade porque el descenso en el punto de fusión de la mezcla es mucho más abrupto de lo esperado si la mezcla tuviera un comportamiento ideal (un caso genérico se muestra en la Figura 3). Toda mezcla en el intervalo ΔT_2 se denomina mezcla eutéctica profunda.

Este comportamiento se observó por primera vez en una composición de cloruro de colina ($T_f \approx 302\text{ °C}$) y urea ($T_f \approx 133\text{ °C}$) con fracción molar 1:2, que resultó en un líquido a temperatura ambiente (temperatura de fusión de la mezcla eutéctica $T_{\text{eutéctica}} \approx 12\text{ °}$) [33].

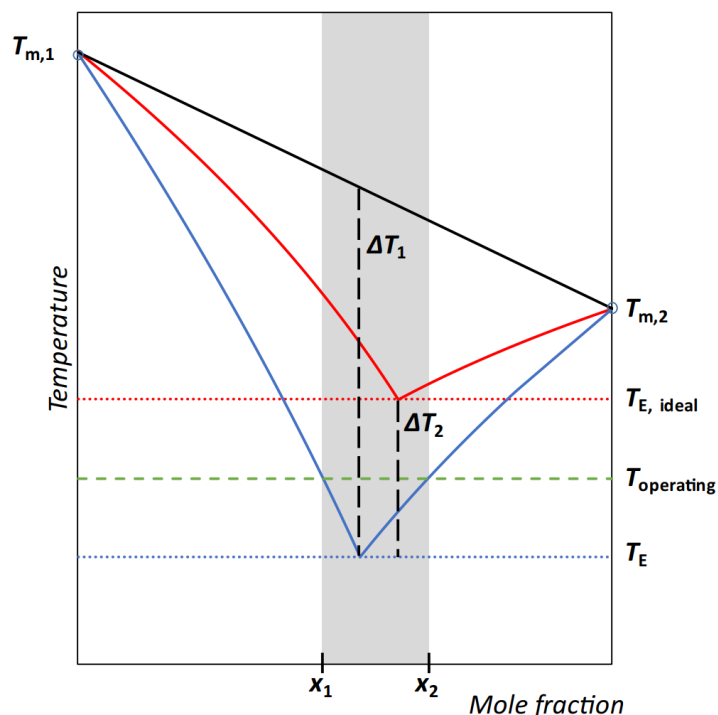


Figura 3: Diagrama de fases de una mezcla cualquiera, donde se representa la temperatura de fusión en función de la fracción molar. La línea roja muestra cómo sería si el comportamiento fuera ideal, y en azul la línea que caracteriza a las mezclas eutécticas [37].

Esta temperatura de fusión tan baja permite que se puedan utilizar como disolventes y/o electrolitos, con baja presión de vapor, siendo térmicamente estables, baratos, y también menos tóxicos y más biodegradables que los disolventes orgánicos convencionales o los líquidos iónicos [35]. En conjunto a todo lo anterior, pueden ser incluso más «verdes» si su síntesis proviene de materias primas propias del metabolismo celular, siendo los denominados Disolventes Eutécticos Profundos Naturales o Natural Deep Eutectic Solvents – NADES [38].

Los DESs se pueden clasificar en cinco tipos (Tabla 2), atendiendo a la naturaleza de los componentes de su fórmula general: $Cat^+ X^- z Y$, donde Cat^+ es generalmente un catión amonio, fosfonio o sulfonio, y X representa una base de Lewis, que normalmente es un anión haluro. Y es un ácido de Brønsted (MCl y derivados) y z el número de moléculas que interactúan con el correspondiente anión. Mezclando los reactivos en las cantidades adecuadas y con una ligera calefacción o simplemente pulverizando, se obtiene el DES según la siguiente reacción:

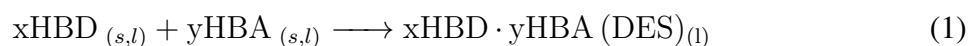


Tabla 2: Clasificación general tipos de DESs (HBA: Aceptor de enlaces de hidrógeno; HBD: Donador de enlaces de hidrógeno; QAS: Sal de amonio cuaternaria) [39], [40]

Tipo	Fórmula general	Términos
<i>I – HBA y cloruro metálico</i>	$Cat^+ X^- \cdot z MCl_n$	M = Zn, Sn, Fe, Al, Ga, In
<i>II - HBA y cloruro metálico hidratado</i>	$Cat^+ X^- \cdot z MCl_n \cdot H_2O$	M = Cr, Co, Cu, Ni, Fe
<i>III – QAS y HBD</i>	$Cat^+ X^- \cdot z RZ$	Z = CONH ₂ , COOH, OH
<i>IV – HBD y Cloruro metálico hidratado</i>	$MCl_n + RZ = MCl_{n+1}^+ \cdot RZ + MCl_{n+1}^-$	M = Al, Zn; Z = CONH ₂ , OH
<i>V – Compuestos moleculares</i>	DES no iónicos	Sustancias moleculares

Los DESs **tipo III** son los más estudiados y suelen estar basados en cloruro de colina (sal de amonio cuaternaria) y varios donadores de hidrógeno como alcoholes, ácidos carboxílicos o amidas [34]. Además, muestran una interacción de enlace de hidrógeno más fuerte, lo que afecta directamente a las propiedades fisicoquímicas del DES [41]. El cloruro de colina se ha adoptado extensamente para este propósito ya que es relativamente barato, no tóxico y biodegradable. Es más, la colina es un nutriente humano y micronutriente esencial [42]. Concretamente, los DES de tipo III serán los que se utilizarán en este trabajo.

1.3.3. Disolventes eutécticos profundos (DESs) para la obtención de proteínas.

Hay muchos estudios que demuestran el buen rendimiento de los DES para extraer proteínas de diversas matrices, tanto de tejidos animales como de fuentes vegetales como, por ejemplo, las semillas oleaginosas [43]-[47]. Los resultados de Bai et al. [48] dieron eficiencias de extracción de proteínas superiores al 90 % en matrices de colágeno en la piel de bacalao, con una pureza del 93 %, utilizando un único DES formado por cloruro de colina y ácido oxálico (ratio 1:1).

En cuanto a la recuperación de proteínas en microalgas con DES, sólo se han encontrado un par de estudios [49], [50]. En el primero, Cicci et al.[49] realizaron varios experimentos aplicando diferentes pretratamientos para estudiar la extracción de proteínas, lípidos, carbohidratos, carotenoides y clorofilas en *Scenedesmus dimorphus*, con un NADES preparado mezclando 1,2-propanediol, cloruro de colina, y agua, en relación molar 1:1:1. El mayor rendimiento en la extracción de proteínas fue de un 27 % y se logró en los experimentos con el pretratamiento asistido por ultrasonidos.

Posteriormente, Sed et al.[50] llevaron a cabo un estudio con la misma microalga pero con otro NADES formado por una mezcla de los ácido caprílico y láurico, con una extracción en dos etapas:

1. Utilizando el disolvente en su forma hidrofílica (recuperación de proteínas).
2. Con el disolvente en su forma hidrofóbica. La eficiencia en la extracción de proteínas fue del 100 %.

Se puede decir que la extracción con DESs es una técnica prometedora y sostenible para la recuperación de proteínas.

2. Objetivos y plan de trabajo

El objetivo general del proyecto en el que se enmarca la investigación de este TFM es la valorización de biomasa algal crecida en aguas residuales o en residuos de purín de cerdo, analizando los posibles metales pesados o contaminantes emergentes que puedan biosorberse.

Concretamente, este trabajo se focaliza en la valorización de la biomasa algal para la obtención de proteínas, que como se ha comentado, es el macronutriente con más valor, minimizando la coextracción de carbohidratos, ya que pueden inhibir futuras aplicaciones industriales (como la síntesis de polímeros biodegradables como los polihidroxialcanoatos, PHAs). Es por eso que los objetivos específicos planteados son los siguientes:

- Preparar y caracterizar varios disolventes eutécticos profundos (DES), a partir de compuestos naturales.
- Aplicar los DES en la extracción de proteínas directamente de la biomasa de microalga, elaborando un procedimiento analítico de preparación y tratamiento de muestra, así como de análisis cuantitativo.
- Optimizar el método de extracción de proteínas de microalgas previamente planteado.
- Estudiar, mediante el adecuado diseño de experimentos, los factores que potencialmente puedan influir en el proceso analítico, atendiendo a tres variables respuesta: la extracción de proteínas, la de carbohidratos, y el ratio de las dos anteriores.
- Ver en qué condiciones experimentales se maximiza la extracción de proteínas al tiempo que se reduce la extracción de carbohidratos.
- Obtener modelos teóricos que permitan estimar la extracción de proteínas y carbohidratos.

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales, equipos y reactivos

General:

- Material volumétrico de vidrio: matraces aforados, matraces Erlenmeyers y pipetas graduadas.
- Material general de laboratorio.
- PURELAB® Classic para agua ultrapura de tipo I con resistividad de 18.2 MΩ.cm.

Preparación DESs: De ahora en adelante se usarán abreviaturas para describir los reactivos más utilizados (Tabla 3).

Tabla 3: Abreviaturas de los HBAs y HBDs utilizados en la preparación de los DESs.

Compuesto	Abreviatura
Cloruro de colina	ChCl
Glicerol	Gly
Etilenglicol	EG
Betaína	Bet

Los equipos y reactivos para la preparación de DES son :

- Balanza analítica Precisa® 600C 600 g \pm 0.1 mg.
- Baño de Ultrasonidos, sin calefacción, ULTRASONS, SELECTA™ 3000514.
- Incubador con agitación orbital (*Optic Ivymen System*).
- ChCl, pureza \geq 98 %.
- Gly, pureza \geq 99.5 %.
- Urea (valor).

Preparación muestra:

- Balanza analítica Entris® 220 g \pm 0.1 mg, con ajuste externo.
- Centrífuga ALC PK 120.
- Tubos de centrifuga de 50 mL.
- Filtros de jeringa de 0.45 μ m de nylon.

Método fenol-sulfúrico: determinación carbohidratos

- Espectrofotómetro UV/Vis Milton Roy Spectronic Genesys-5.
- Cubetas de cuarzo y vidrio para espectrofotómetro UV-VIS.
- Micropipeta mecánica Eppendorf®, Reference 2: 10-100 μ L y 100-1000 μ L.
- Dispensador 10 mL.
- Ácido sulfúrico concentrado 96-98 %.
- Disolución fenol (aq.) 80 % (m/m).
- D(+)-Glucosa anhidra.

Método BCA: determinación proteínas

- Kit de ensayo de proteínas Thermo Scientific™ Pierce™ BCA.
- Tubos de microcentrifuga Eppendorf™ 2 mL.
- Cubetas de plástico de 1.5 mL.
- Incubador.

3.2. Caracterización de la biomasa

En este TFM se han empleado dos tipos de biomasa distintas. Por una parte, tenemos una biomasa de microalga liofilizada que ha sido crecida en un bioreactor en medio de purín de cerdo. Por otro lado, se dispone de una biomasa de microalga pura líquida, crecida en un bioreactor pero con un medio sintético para asegurar su correcto crecimiento.

Dado que el objetivo de este trabajo es determinar el porcentaje de extracción de proteínas, así como su relación con los carbohidratos co-extraídos, es indispensable conocer la cantidad inicial de estos macronutrientes en las biomásas usadas. Debido a que no contamos con ningún “patrón” de microalga para evaluar la veracidad de los métodos de análisis, lo que se hizo fue cuantificar los cinco componentes principales de la biomasa (proteínas, carbohidratos, lípidos, agua y sales minerales o cenizas) cuya suma debe dar prácticamente el total (las microalgas tienen otros compuestos como pigmentos o material genético, pero en una cantidad despreciable). A continuación, se procede a describir los métodos de análisis seguidos para determinarlos.

3.2.1. Análisis de proteínas

Se ha utilizado el método Kjeldahl [51]. Es un método volumétrico que permite determinar diferentes tipos de nitrógeno presentes en la muestra. Nosotros cuantificamos el nitrógeno total, que es la suma del nitrógeno amoniacal y el orgánico. El procedimiento consta de tres etapas:

1. Digestión de la biomasa (≈ 0.1 g) con 6 mL de H_2SO_4 (96 % en masa) y un catalizador de CuSO_4 . Se somete al programa de calentamiento durante 3 h, hasta completa digestión de las muestras. Este tratamiento convierte el nitrógeno proteico en amonio.
2. Destilación del NH_4^+ como NH_3 : se coloca cada tubo en la unidad de destilación, se añade un exceso de NaOH y se calienta, recogiendo el NH_3 destilado en un matraz Erlenmeyer que contiene H_3BO_3 en exceso y un indicador ácido base adecuado (indicador mixto rojo de metilo y azul de metileno). El NH_3 destilado reacciona con el H_3BO_3 dando una cantidad equivalente de H_2BO_2^- .
3. Valoración del H_2BO_2^- con una disolución patrón de H_2SO_4 hasta cambio de color del indicador (de verde a morado).

El nitrógeno total está relacionado con la cantidad de proteína a través de un factor de conversión, f , que depende del tipo de proteínas de la muestra (Ecuación 2):

$$\% \text{Proteínas} = f \cdot \% \text{N} = f \cdot \frac{2 \cdot C_{\text{H}_2\text{SO}_4} \cdot V_{\text{H}_2\text{SO}_4} \cdot Mm(\text{N})}{m(\text{Muestra}) \cdot 10} \quad (2)$$

Donde C (en molaridad) y V (en mL) son el volumen y concentración de la disolución patrón de H_2SO_4 , $m(\text{Muestra})$ es la masa inicial (en gramos) de muestra pesada, y $Mm(\text{N})$ es la masa molar del nitrógeno, (en $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$). Para las microalgas, generalmente se aceptan valores entre 6.25 y 5.50, aunque la tendencia de la última década es emplear un valor de $f = 5.95$ [52].

3.2.2. Análisis de carbohidratos

Para el análisis de carbohidratos, se ha adaptado un método de hidrólisis [53] [54]:

1. Se añaden 2 mL de H_2SO_4 al 72 % a cada tubo con muestra (≈ 0.03 g) y se agita con ayuda del vórtex para mezclar bien la biomasa y el ácido.
2. Se colocan los tubos en un baño de agua a 30 °C por 1 h agitando cada tubo cada 5-10 min; el nivel del agua justo por encima del nivel de disolución. También se puede hacer en un incubador.
3. La disolución resultante se filtra con filtros de Nylon o PTFE de 0.45 μm y se enrasa en un matraz aforado de 100 mL. A partir de aquí se sigue el método fenol-sulfúrico para la determinación de carbohidratos como el que se realiza para las muestras, que se explicará en detalle en el Apartado 3.6.2.

3.2.3. Análisis de lípidos

La determinación del contenido de lípidos se ha llevado empleando el método de extracción Soxhlet [55], [56], empleando hexano como disolvente, con un tiempo de extracción de 6 h.

1. Se pesan entre 3 y 5 g de biomasa (en polvo) en un capuchón de celulosa y se introduce en la cámara de extracción. Esta se coloca sobre el matraz de fondo redondo previamente pesado que contiene el disolvente, y se conecta el refrigerante (Figura 4).

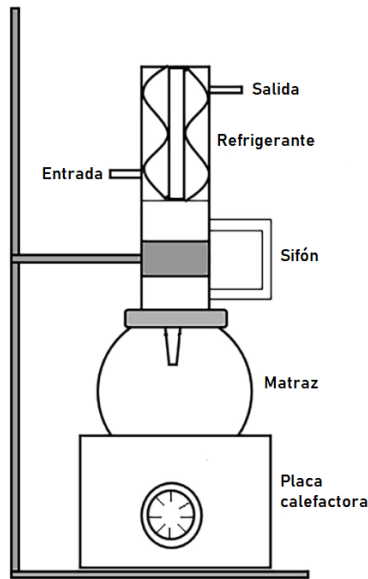


Figura 4: Equipo Soxhlet. Figura tomada de [56].

2. Se calienta el matraz hasta que el hexano comienza a destilar, llenando la cámara de extracción y extrayendo la grasa de la muestra. Por efecto sifón se produce el vaciado de la cámara de extracción cuando se ha llenado, repitiéndose el proceso de extracción varias veces hasta extraer cuantitativamente la grasa.
3. Finalizada la extracción de la muestra, el disolvente se separa de la grasa por destilación, se enfría el matraz en el desecador, pesándose en frío. La masa de grasa total se obtiene restando el peso del matraz vacío (Ecuación 3):

$$\text{Aceite}(\%) = \frac{\text{Masa de grasa extraída}}{\text{Masa muestra seca}} \cdot 100 \quad (3)$$

3.2.4. Análisis de humedad y cenizas

Los dos componentes restantes de la microalga son la humedad (cantidad de agua en la muestra) y las cenizas o fracción mineral.

1. Se pesa con precisión de ± 0.1 mg una cantidad de microalga (entre 1 y 10 gramos, dependiendo de la densidad de la muestra) en un crisol de porcelana, y se seca en estufa a 105°C hasta peso constante. Por diferencia se obtiene la cantidad de agua de la muestra.

2. A continuación, se transfiere la muestra seca a un horno de mufla donde se calcina a 550 °C durante 24 h. Una vez frías las cenizas, se pesan para obtener el contenido mineral de la muestra.

3.3. Preparación de los DESs

Tras preparar y hacer pruebas con varios DESs, finalmente los que se usaron para todos los experimentos de este trabajo se encuentran en la Tabla 4:

Tabla 4: Composición y abreviatura de los DESs utilizados. Primero se escribe el HBA y después el HBD, el número que aparece delante de cada uno indica la ratio molar.

Nombre completo DES	Abreviatura
Cloruro de colina - Glicina (ratio molar 1 a 2)	ChCl:2Gly
Cloruro de colina - Etilenglicol (ratio molar 1 a 2)	ChCl:2EG
Cloruro de colina - Urea (ratio molar 1 a 2)	ChCl:2Urea

Para prepararlos, se pesa en un matraz Erlenmeyer la cantidad requerida de cada compuesto, para alcanzar la relación molar deseada. Se cubre la apertura del matraz con papel de aluminio y se deja 2 horas a 60 °C en un incubador con agitación (500 rpm). El proceso de preparación es el mismo para todos ellos. En algunos experimentos, se probó a emplear el DES diluido con agua (para disminuir la viscosidad, pero intentando mantener sus propiedades físicoquímicas). Para ello se pesaron las adecuadas cantidades de DES y agua y se mezclaron agitando convenientemente.

3.4. Caracterización de los DES

Para confirmar que se ha formado un DES hay que caracterizarlo, y principalmente se acude a dos técnicas espectroscópicas: la resonancia magnética nuclear de protón (RMN-¹H) y la espectroscopía de infrarrojo, que generalmente se realiza con la transformada de Fourier (FTIR)¹.

¹Actualmente, la mayoría de los equipos de IR llevan incorporada la transformada de Fourier, pues reduce los tiempos de análisis, amplifican la relación señal/ruido, y requieren una cantidad de muestra muy pequeña.

A pesar de que el RMN es una técnica muy interesante, a veces es difícil identificar la formación de enlaces de hidrógeno, o se necesitan condiciones o equipos especiales. Es por ello que en este trabajo únicamente se han adquirido los espectros de IR de los compuestos puros y de los DES formados con un equipo *Bruker Tensor 27 FTIR spectrometer*.

3.5. Procedimiento analítico para la extracción de proteínas con DESs

El fenómeno físico-químico que tiene lugar es la extracción sólido-líquido. Primeramente se describirá cómo se llevó a cabo el screening inicial, y después las modificaciones introducidas en la realización del diseño L18 de Taguchi (la discusión de la elección de estos diseños y los factores estudiados se encuentra en el Apartado 4.1).

3.5.1. Screening inicial

El procedimiento fue el siguiente:

1. Se pesa, con precisión de 0.1 mg, unos 0.5 g de muestra en un Erlenmeyer de 50 mL, adicionándose DES en proporción 9:1. Si hubiese que aplicar US, ahora sería el momento.
2. Tapar la boca del Erlenmeyer con papel de aluminio, y llevar a un incubador con calentamiento ($T = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$) y agitación (500 rpm), durante 2 h.
3. Se retiran los Erlenmeyers del incubador y se procede a centrifugar. Si por algún motivo no se pudiera centrifugar inmediatamente, es posible dejarlos hasta dos días, bien tapados en frigorífico ($T \approx 4\text{ }^{\circ}\text{C}$), sin que afecte a la cantidad de proteína extraída.
4. Si es necesario, añadir entre 5-10 mL de agua desionizada para despegar del fondo del Erlenmeyer la pasta de bioamasa-DES. Pesar los tubos Falcon (sin tapón) que se vayan a usar para centrifugar, y transferir todo el contenido de los Erlenmeyers a los Falcon, enjuagando el matraz con pequeñas fracciones de agua desionizada hasta alcanzar en el Falcon la marca de los 20-25 mL (3-4 enjuagues).
5. Centrifugar durante 5 min a 5000 rpm.

6. Transferir el sobrenadante a un matraz aforado de 250.0 mL.
7. Añadir 1 mL de DES en cada Falcon de nuevo, y completar con agua hasta la marca de los 10 – 15 mL. Agitar manualmente para que se mezcle todo bien.
8. Repetir pasos 5, 6 y 7 cuatro veces más (es decir, un total de cinco ciclos de centrifuga).
9. Enrasar los matraces aforados. Es recomendable que en los pasos anteriores no se haya agitado mucho la disolución, para evitar la formación de espumas que puedan dificultar el enrase. En caso de aparición de espumas en la superficie, nos guiaremos del líquido para enrasar (la espuma tiene poca masa e influirá poco). Si se aprecia turbidez en la disolución, repetir el experimento disminuyendo la cantidad de biomasa inicial, o bien filtrar y volver a enrasar. Determinar la masa total de los matraces (sin tapones).
10. Por última, filtrar unos 40 mL a un Falcon limpio y seco, a través de filtros de jeringa de 0.45 μm de PTFE, o en su defecto de Nylon.

Tras 2 semanas, se empiezan a formar aglomerados, por lo que se recomienda llevar a cabo los análisis antes de ese tiempo, o bien conservar las muestras líquidas congeladas.

3.5.2. Diseño L18

El procedimiento mostrado en el apartado anterior sufrió ligeras modificaciones:

- Se adiciona 0.5 g de masa seca, si trabajamos con una muestra líquida, habrá que calcular la cantidad necesaria para asegurar ese aporte en masa seca.
- Los ultrasonidos no se aplican sólo al principio. En este caso, se introduce el Erlenmeyer en un baño de ultrasonidos durante el tiempo deseado, y para controlar la temperatura se hace añadiendo bloques de hielo y controlándolo con un termómetro (no disponíamos de un US termostataado).
- Se redujo el tiempo de la centrifuga a cinco minutos, pues se observó que la separación se producía pronto.

- Se eliminó el paso de añadir DES tras cada ciclo de centrifuga, puesto que se comprobó que no aumentaba el rendimiento de extracción de proteínas y lo único que se hacía era gastar más disolvente.
- Los matraces empleados fueron de 100 mL, ya que de esta forma el análisis posterior de proteínas estaba lejos del límite de cuantificación (con 250 mL a veces quedaba demasiado diluida la muestra para la curva de calibrado).

3.6. Métodos de análisis de las muestras

Una vez se tengan las muestras líquidas obtenidas del proceso de extracción, se determina su cantidad de proteínas y carbohidratos aplicando sendos métodos analíticos.

3.6.1. Método del BCA para el análisis de las proteínas

Se ha empleado el método del BCA [57]. Este método combina el test de biuret (reducción de $\text{Cu}^{2+} \longrightarrow \text{Cu}^+$ por una proteína en un medio alcalino), con la detección colorimétrica del catión cuproso, Cu^+ , con ácido bicinconínico (BCA). Dos moléculas de BCA actúan como agente quelante coordinándose al catión Cu^+ , formando así un complejo de color morado en disolución (Figura 5), resultando el máximo de absorción a $\lambda = 592 \text{ nm}$

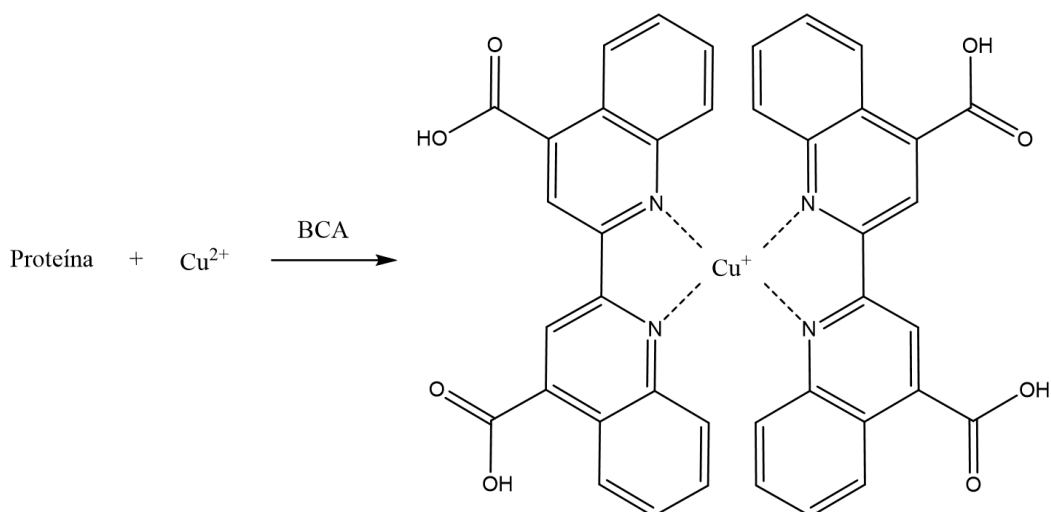


Figura 5: Reacción de formación del complejo coloreado de Cu(I).

Se ha utilizado el kit de ensayo de proteínas Thermo Scientific™ Pierce™ BCA, y el procedimiento es el que sigue:

1. Se prepara un reactivo de trabajo mezclando 50:1 (en volumen) de un reactivo **A**, que es una mezcla de compuestos que garantiza un medio con un pH y fuerza iónica controlados, con un reactivo **B**, que es una disolución de sulfato de cobre.
2. En tubos Eppendorf™, se toman 60.0 μL de la muestra a analizar, y se añaden 1.2 mL de dicho reactivo de trabajo (cuidado al estimar la cantidad preparada, porque los volúmenes de **A** y **B** no son aditivos).
3. Se asegura la mezcla completa con un agitador vórtex, y en un incubador se calientan a 37 °C durante 30 min.
4. Finalmente, se dejan enfriar los tubos hasta la temperatura ambiente y se mide la absorbancia de cada muestra a $\lambda = 592 \text{ nm}$ en un corto intervalo de tiempo.

3.6.2. Método del Fenol-Sulfúrico para la determinación de carbohidratos

Se va a utilizar el método fenol-sulfúrico para determinar los carbohidratos totales [54]. Es un método colorimétrico y rápido, capaz de determinar toda clase de carbohidratos: mono-, di-, oligo- y polisacáridos; aunque según el tipo de carbohidratos presentes en la muestra, la absorbancia varía. Debido a esto último, todos los resultados se expresarán en función de un único carbohidrato, la glucosa, aunque de facto, se asuma que dicha concentración es la de carbohidratos (pues todo se ha debido de transformar en glucosa). El ácido sulfúrico va a descomponer y deshidratar los carbohidratos hasta monosacáridos (glucosa), y después a derivados de furfural. Éstos van a reaccionar con el fenol para formar un compuesto de color anaranjado-amarillento. Un esquema de las reacciones principales se muestra en la Figura 6. Al utilizar glucosa en la curva de calibrado, se mide la absorbancia a $\lambda = 490 \text{ nm}$ por espectrofotometría UV-Visible.

Como se ha comentado previamente, se van a realizar curvas de calibrado con glucosa. Éstas deberán prepararse semanalmente y habrá que seguir comprobando su concentración con patrones aislados cada vez que se realice un análisis de muestras. Esta línea contendrá entre 7-8 puntos sin contar el blanco, siendo el intervalo de concentraciones entre 10 y 90 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

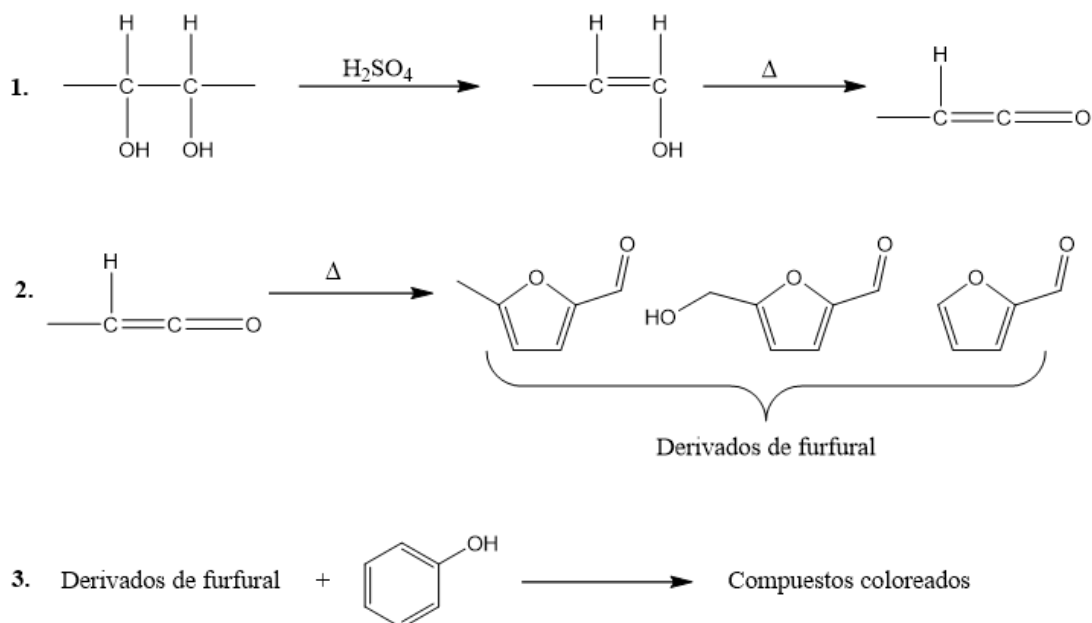


Figura 6: Reacciones (simplificadas) que tienen lugar en el método fenol-sulfúrico.

Pasos del método de análisis de carbohidratos:

1. Se añade el volumen de disolución patrón de glucosa indicado a cada tubo de centrifuga, y se completa con agua desionizada hasta los 2 mL (volumen total propuesto). Si se está analizando una muestra, habrá que conocer de antemano el orden de magnitud de concentración de los carbohidratos que puede tener, y en base a eso se se añadirán volúmenes entre 0.100 y 2.00 mL de muestra (el resto será agua desionizada hasta alcanzar los 2.00 mL).
2. A continuación, se añade a cada tubo 50 μ L de la disolución de fenol al 80 % (m/m), siempre en campana por su alta toxicidad, y se agita ligeramente.
3. Después, se añaden 5 mL —con dispensador— de H_2SO_4 concentrado, con cuidado, ya que la reacción es muy exotérmica, y se agita de nuevo el tubo para que se mezcle bien. Se va a observar como la disolución se vuelve de color naranja claro. Se lleva la gradilla con los tubos a un baño de agua que llegue a cubrir el nivel de la disolución.
4. Después de unos 20-30 minutos, cuando la disolución esté a temperatura ambiente, se transfieren las muestras a cubetas de vidrio o cuarzo y se mide la absorbancia en su máximo (está entre 488-490 nm). En algunas muestras pueden aparecer burbujas que interfieran con la medida, en ese caso hay que introducir las cubetas unos segundos en un baño de ultrasonidos.

4. Resultados y discusión

4.1. Metodología estadística: Diseño Experimental

La optimización de las condiciones experimentales para extraer proteínas de la biomasa algal empleando DESs se ha llevado a cabo mediante un Diseño de Experimentos estadístico (DoE) [58], [59].

Concretamente, se verá qué factores afectan significativamente a la respuesta de un proceso y cómo estos interactúan entre sí. Para ello, cada factor se evalúa al menos a dos niveles, realizándose réplicas con el fin de estimar los factores de ruido del proceso (variabilidad de la materia prima, ambiental o del equipamiento, etc). El fin último de un diseño de experimentos es encontrar la combinación idónea de factores que maximicen o minimicen la respuesta estudiada, obteniendo la máxima información del proceso con el mínimo número de experimentos para ahorrar tiempo y recursos.

El fundamento del diseño de experimentos es el análisis de varianza (ANOVA), que es un test de hipótesis basado en la prueba F de comparación de varianzas. Con el ANOVA, se estudia cómo influyen los factores controlables en la variabilidad de la respuesta, o si esta variabilidad es significativamente mayor que la variabilidad aleatoria propia de la experimentación causada por los factores no controlables que afectan al proceso, entonces diremos que el factor afecta a la respuesta. Hay varias etapas a desarrollar, que se pueden resumir en cuatro:

1. Determinar qué variable respuesta queremos optimizar.
2. Seleccionar los factores controlables, así como sus respectivos niveles, definiendo el dominio experimental.
3. Elegir el diseño que, con el mínimo número de experimentos, permita obtener toda la información que deseada.
4. Analizar estadísticamente de los resultados de los experimentos.

4.1.1. Screening inicial

Previo a la optimización del proceso de extracción de proteínas de microalgas *Scenedesmus almeriensis* con DES tipo III, y con objeto de establecer el potencial de este tipo de disolventes para la recuperación de biomoléculas de la biomasa, se realizó un experimento previo consistente en un diseño factorial completo de dos factores: tipo de extractante (a dos niveles, agua y DES) y el tipo de pretratamiento (a cinco niveles: biomasa sin tratamiento, morterada, morterada en combinación con ultrasonidos, y empleo de una ratio alta disolvente-biomasa).

Cada nivel de pretratamiento se hizo por sextuplicado. El resto de parámetros experimentales como el tipo de DES, la temperatura, el tiempo, o el tipo de biomasa, se mantuvieron constantes, usándose como disolvente el DES ChCl:2Gly (o agua en su defecto), una temperatura de 45 °C, un tiempo de contacto de 2 h, y microalga liofilizada de purín en todos los experimentos.

Por una parte, se pretendía determinar si, tal y como refleja la bibliografía, los DES son buenos agentes extractantes (o, como mínimo, mejor que el agua, que es un disolvente más barato y verde). Por otro lado, se realizaron diferentes tipos de pretratamientos a la biomasa para ver su influencia y así localizar cuáles eran las mejores alternativas para maximizar la extracción de proteínas.

En resumen, estos primeros experimentos nos permitieron familiarizarnos con el método en su conjunto, identificando los puntos débiles y así mejorarlo para el siguiente diseño. Para asegurar que los resultados obtenidos fueran robustos se hicieron seis réplicas por cada punto experimental.

4.1.2. Diseño L18 de Taguchi

Tras el análisis de los resultados del screening inicial, se procedió a modificar el procedimiento experimental (Apartado 3.5), y se seleccionaron seis factores que podían afectar al proceso: tipo de biomasa, pretratamiento aplicado, tipo de DES, ratio Microalga-DES, temperatura de extracción, tiempo de contacto, y viscosidad del DES.

Respecto al tipo de biomasa, éste fue el único factor a dos niveles, incluyendo (además de la microalga liofilizada de purín) microalga fresca pura, pues al estar en estado líquido, podría comportarse de forma diferente que la liofilizada al favorecer un mejor contacto con el disolvente, aumentando la extracción.

El resto de factores se estudiaron a tres niveles, de esta forma, en caso de querer aplicar algún modelo, se podrían incluir términos cuadráticos. Para el pretratamiento, los niveles fueron: biomasa morterada, extracción en baño de ultrasonidos, y una combinación de ambas. Por otro lado, el tiempo de contacto se consideró el ya estudiado, y un nivel superior (3 h) y uno inferior (30 min), puesto que si no hay más extracción, cuanto menor sea el tiempo se ahorrará dinero y energía. Sobre el DES, se escogieron tres tipos diferentes que aparecen en la bibliografía, pero todos tienen en común que su HBA es cloruro de colina: ChCl:2Gly, ChCl:2EG y ChCl:2Urea. Además, como se ha comentado, de cada uno se prepararon diluciones del 50 y 75 % (en masa) para ver si reduciendo la viscosidad, se mejoraba la extracción. Por último, se estudiaron también tres ratios microalga-DES 1:3, 1:6 y 1:9, con el objetivo de ver si, gastando menos disolvente se pueden llegar a unos resultados aceptables.

Si se aplicara una aproximación clásica y se quisieran estudiar todos los efectos e interacciones de los factores estudiados, harían falta $2^1 \cdot 3^5 = 486$ experimentos, que junto con sus réplicas, serían un total de 972. Como puede intuirse, este es un número exageradamente grande, que no es factible en términos de tiempo, ni de reactivos ni energía que se tendrían que consumir.

En este punto, es muy útil conocer los diferentes diseños que existen, y en este caso, se hizo uso de un diseño de Taguchi L18, con el cual con tan sólo 18 experimentos se permite estudiar los efectos de siete factores: seis a tres niveles, y uno a dos. La desventaja, es que sólo proporciona información estadística de si el efecto es significativo o no, pero no se podrán estudiar las interacciones (a excepción de la del factor a dos niveles con uno del resto).

La combinación de niveles de cada factor (nombrados con el código A, B, C, etc) se muestra en la Tabla 5, donde -1, 0 y 1 son los códigos que se utilizan para señalar el nivel bajo, intermedio, y alto, de cada uno de los factores estudiados (la combinación de niveles se puede encontrar fácilmente en cualquier libro de diseño de experimentos).

Tabla 5: Combinación de los niveles de cada factor para el diseño L18 (A, B, C, D... son los códigos para cualquier factor).

A	B	C	D	E	F	G
-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
-1	-1	0	0	0	0	0
-1	-1	1	1	1	1	1
-1	0	-1	-1	0	0	1
-1	0	0	0	1	1	-1
-1	0	1	1	-1	-1	0
-1	1	-1	0	-1	1	0
-1	1	0	1	0	-1	1
-1	1	1	-1	1	0	-1
1	-1	-1	1	1	0	0
1	-1	0	-1	-1	1	1
1	-1	1	0	0	-1	-1
1	0	-1	0	1	-1	1
1	0	0	1	-1	0	-1
1	0	1	-1	0	1	0
1	1	-1	1	0	1	-1
1	1	0	-1	1	-1	0
1	1	1	0	-1	0	1

Aunque es cierto que no se podrá decir nada sobre el resto de interacciones, se pueden construir gráficos que permitan evaluarlas de forma cualitativa, ayudando en la elaboración de próximos diseños en donde sí se estudien. En el Apartado 4.4 se mostrarán los resultados, en los que se habrán tenido en cuenta tres respuestas diferentes: la extracción de proteínas, la extracción de carbohidratos, y su ratio (R , Ecuación 4). Se hizo de esta forma porque el objetivo principal es minimizar a la vez la coextracción de carbohidratos, puesto que para la futura aplicación industrial estos pueden ser un problema.

$$R = \frac{\%Proteínas}{\%Carbohidratos} \quad (4)$$

4.2. Composición de la biomasa

En la Tabla 6 se muestran los valores promedio de los parámetros de composición para los dos tipos de microalga empleados, microalga liofilizada crecida en purín, y microalga líquida pura. Todas las medidas se hicieron por duplicado, a excepción de las proteínas y los lípidos de la líquida pura, que se calcularon mediante extrapolación de los resultados de la liofilizada de purín (asumiendo que, en masa seca, la composición sería similar). Se hizo así puesto que para el método Soxhlet se requiere masa seca (y que esté relativamente concentrada, entorno al 10-15 % como mínimo), mientras que para el NKT como hay que hacer trasvases al tubo de digestión y los cálculos son todo en masa, se iba a introducir demasiado error.

A modo de comprobación, se trabajó con una biomasa de microalga pura “compacta” (con cierto porcentaje de agua, en estado sólido pero no liofilizada) con la que se comparó el %Proteína estimado teóricamente con el obtenido experimentalmente con el NKT, siendo la diferencia entre ambos valores menor del 10 %, lo que valida la hipótesis que hemos planteado.

Tabla 6: Parámetros de composición para los tipos de microalga estudiados.

	Liofilizada Purín		Líquida Pura	
	<i>Promedio</i>	<i>s</i>	<i>Promedio</i>	<i>s</i>
<i>Proteínas /%</i>	44.50	1.73	3.97	0.15
<i>Carbohidratos /%</i>	20.43	2.98	1.82	0.27
<i>Lípidos /%</i>	19.71	0.01	1.76	0.01
<i>Cenizas /%</i>	15.09	0.34	0.57	0.02
<i>Humedad /%</i>	5.59	0.18	91.58	0.02
<i>Total /%</i>	105.32	3.46	99.70	0.31

El porcentaje total en ambos casos está entorno al 100 %. Quizás estemos sobreestimando la cantidad de proteína inicial, o los lípidos presentes, pues son los parámetros que más difícilmente podemos valorar si tenemos un sesgo. De todas formas, el valor verdadero estará cercano al calculado.

4.3. Resultados screening inicial

Como se explicó anteriormente en el Apartado 4.1.1, se realizaron dos ANOVAs de una vía, uno estudiando un factor a dos niveles, y otro a cinco.

4.3.1. Tipo de extractante

Para el diseño con dos factores a dos niveles —dos extractantes, agua y DES— el valor p obtenido ($p < 0.05$) demostró que el tipo de extractante, agua o DES, afecta significativamente a la concentración de proteína extraída. Atendiendo a los valores obtenidos, se ve que al extraer con DESs se consigue una mayor cantidad de proteínas. De forma visual, se puede construir un gráfico de cajas y bigotes para ver esta diferencia según tipo de extractante (Figura 7):

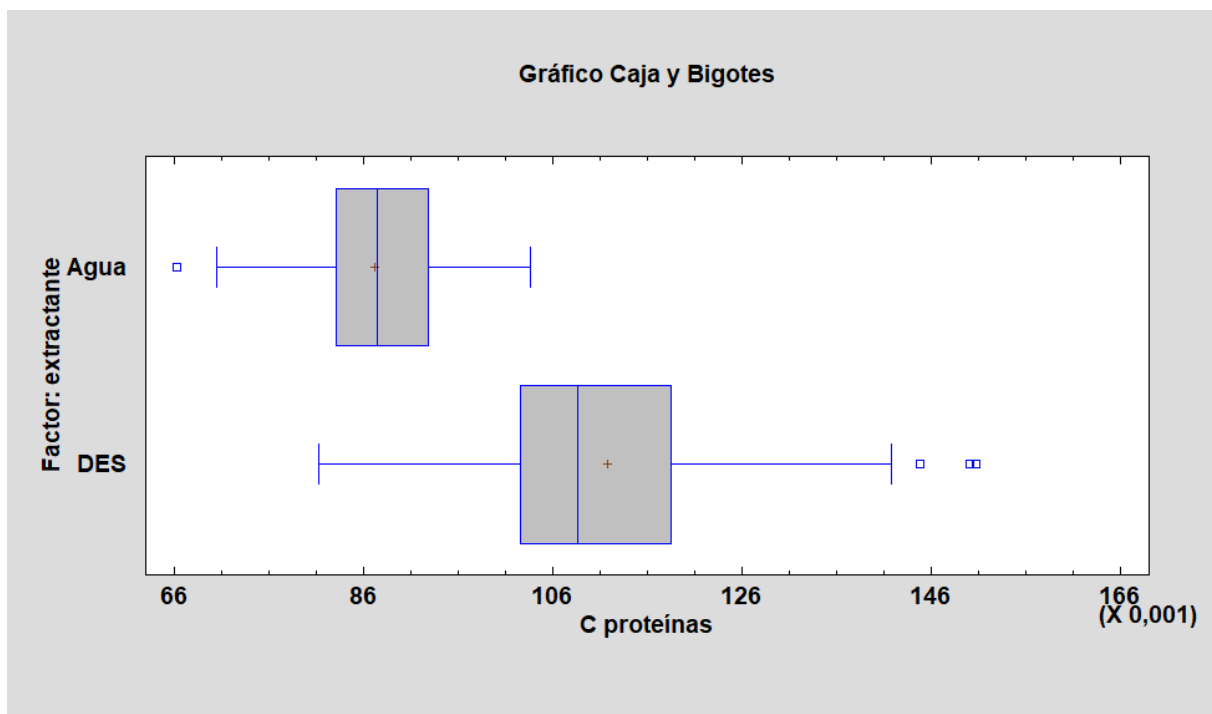


Figura 7: Gráfico de cajas y bigotes para el tipo de extractante.

Las líneas azules verticales muestran el valor mediano de la distribución, mientras que la cruz roja señala la media aritmética. La anchura de la caja y los bigotes dan información sobre la distribución de los resultados. La distribución del DES está desplazada hacia la derecha, y dado que el ANOVA había salido la diferencia significativa, podemos afirmar que usar DES es más eficaz que el agua para extraer proteínas.

4.3.2. Tipo de pretratamiento

Con los mismos datos experimentales, se evaluó cómo afectaba el tipo de pretratamiento, volviéndose a realizar un ANOVA de una vía. De nuevo, se obtuvo un $p < 0.05$, por lo que el tipo de pretratamiento afecta significativamente a la extracción de proteínas.

No obstante, en este caso para determinar qué nivel del factor es responsable del efecto (mayor extracción de proteínas) se debe realizar una prueba LSD de rango múltiple, que evalúe qué diferencias de entre los niveles son significativas. La prueba LSD compara la diferencia absoluta entre la media de las respuestas a dos niveles de un factor, con un valor crítico (LSD), que se calcula según la Ecuación 5:

$$LSD = t_{crit} \cdot \sqrt{MS_R \cdot \left(\frac{2}{n_j}\right)} \quad (5)$$

MS_R es la el cuadrado medio de los residuales y n_j es el número de réplicas. Si la diferencia experimental supera al valor crítico, la respuestas a esos niveles de factor son significativamente diferentes. Los resultados se muestran en la Tabla 7, mostrándose en rojo aquellas diferencias que son significativas, y de forma visual con el diagrama de cajas y bigotes de la Figura 8.

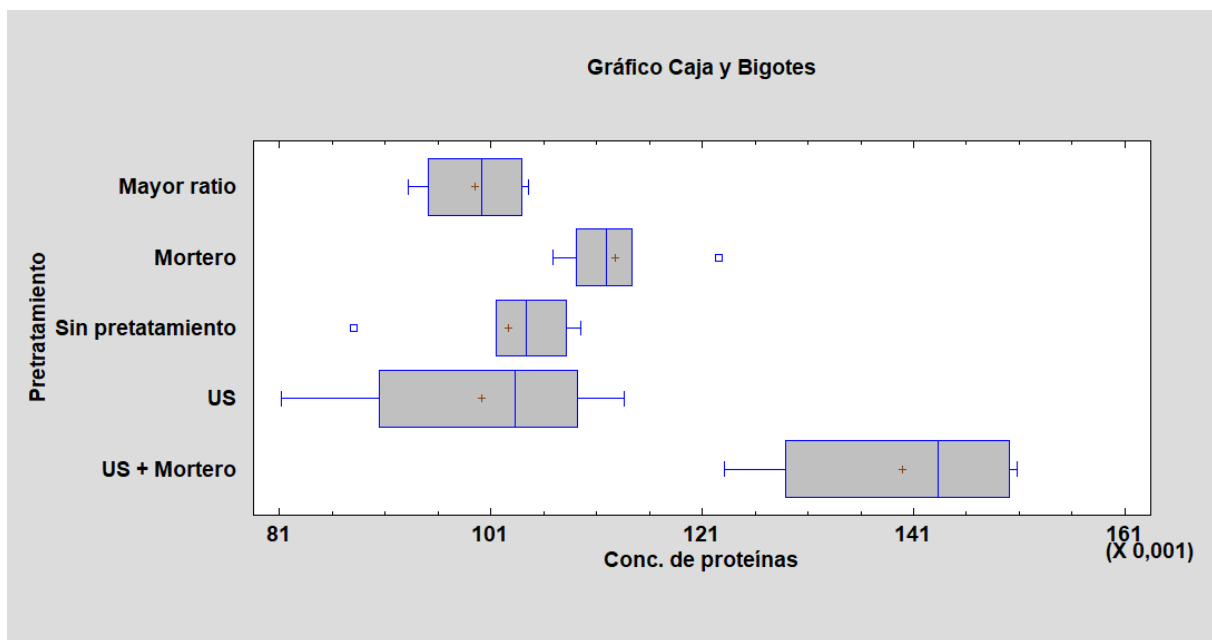


Figura 8: Gráfico de cajas y bigotes para pretratamientos.

Tabla 7: Prueba de Rango Múltiple LSD para la extracción de proteínas por tipo de pretratamiento.

Pretratamiento	Casos	Media	
Mayor ratio	6	0,0995291	
US	6	0,100173	
Sin pretatamiento	6	0,102666	
Mortero	6	0,112819	
US + Mortero	6	0,139927	
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Mayor ratio - Mortero	*	-0,0132902	0,0122248
Mayor ratio - Sin pretatamiento	-0,00313639	0,0122248	
Mayor ratio - US	-0,000643672	0,0122248	
Mayor ratio - US + Mortero	*	-0,040398	0,0122248
Mortero - Sin pretatamiento	0,0101538	0,0109342	
Mortero - US	*	0,0126466	0,0109342
Mortero - US + Mortero	*	-0,0271078	0,0109342
Sin pretatamiento - US	0,00249272	0,0109342	
Sin pretatamiento - US + Mortero	*	-0,0372616	0,0109342
US - US + Mortero	*	-0,0397544	0,0109342

* indica una diferencia significativa.

Según los resultados obtenidos se ha demostrado que:

- Ambos factores tienen efectos significativos ($p < 0.05$) en la respuesta.
- Utilizando **DESS** en vez de agua se logra extraer una **mayor cantidad de proteínas**.
- Dentro de los **pretratamientos**, el que mejor funcionó fue la combinación de **morterar la muestra + US**. Aunque sus valores sean más dispersos, su media de concentración de proteínas extraídas es significativamente más alta (Figura 8).

Por lo tanto, tras el *screening inicial* se decidió extraer únicamente con DESS (probando tres tipos distintos) y utilizando un pretratamiento que implicara US, mortero o la combinación de ambas, además de otros factores que habían permanecido constantes.

4.4. Diseño de experimentos L18

En este apartado, se mostrarán los resultados de las cantidades empleadas para preparar los DES, su caracterización espectroscópica mediante sus espectros de IR, y finalmente se analizarán los resultados del diseño de experimentos L18, así como los modelos de regresión que mejor expliquen los datos experimentales.

4.4.1. Preparación de DES

Los DESs preparados fueron los siguientes: ChCl:2Gly, ChCl:2EG y ChCl:2Urea. En las Tablas 8, 9 y 10 vienen las masas reales de cada compuesto añadido.

Tabla 8: Masas DES ChCl:2Gly.

Ratio = 1.97	ChCl	Glicerina
Masa / g	81.73	106.22
Volumen / mL	-	84.37

Tabla 9: Masas DES ChCl:2EG.

Ratio = 1.97	ChCl	EG
Masa / g	81.40	71.39
Volumen / mL	-	64.14

Tabla 10: Masas DES ChCl:2Urea.

Ratio = 1.97	ChCl	Urea
Masa / g	82.34	69.64
Volumen / mL	-	-

4.4.2. Caracterización espectroscópica de los DES

En las Figuras 9, 10 y 11 se muestran los espectros IR de cada uno de los DES preparados (ChCl:2Gly, ChCl:2EG y ChCl:2Urea, respectivamente). En todas las figuras, en rojo se muestra el espectro del ChCl puro, en azul aparece el del HBD correspondiente (Gly, EG o Urea), y en verde se señala el espectro del DES preparados. La transmitancia está dada en tanto por uno.

Para caracterizar los DESs nos interesa ver si existen enlaces de hidrógeno. Para ello, hay que prestar atención a la región entre $3000\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$, en búsqueda de una banda relativamente ancha intensa. Ésto se refleja claramente en los espectros de ChCl:2Gly y ChCl:2Urea, sin embargo, para el ChCl:2EG no tenemos esa banda tan ancha, lo que puede atribuirse a que el EG es un compuesto que ya de por sí establece enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares de una forma muy eficaz. En el caso del ChCl:2Urea, se puede apreciar que la banda no es tan intensa, debido a que la fuerza del enlace de hidrógeno $N - H \cdots N$ es menor que la que dan los grupos O-H [60].

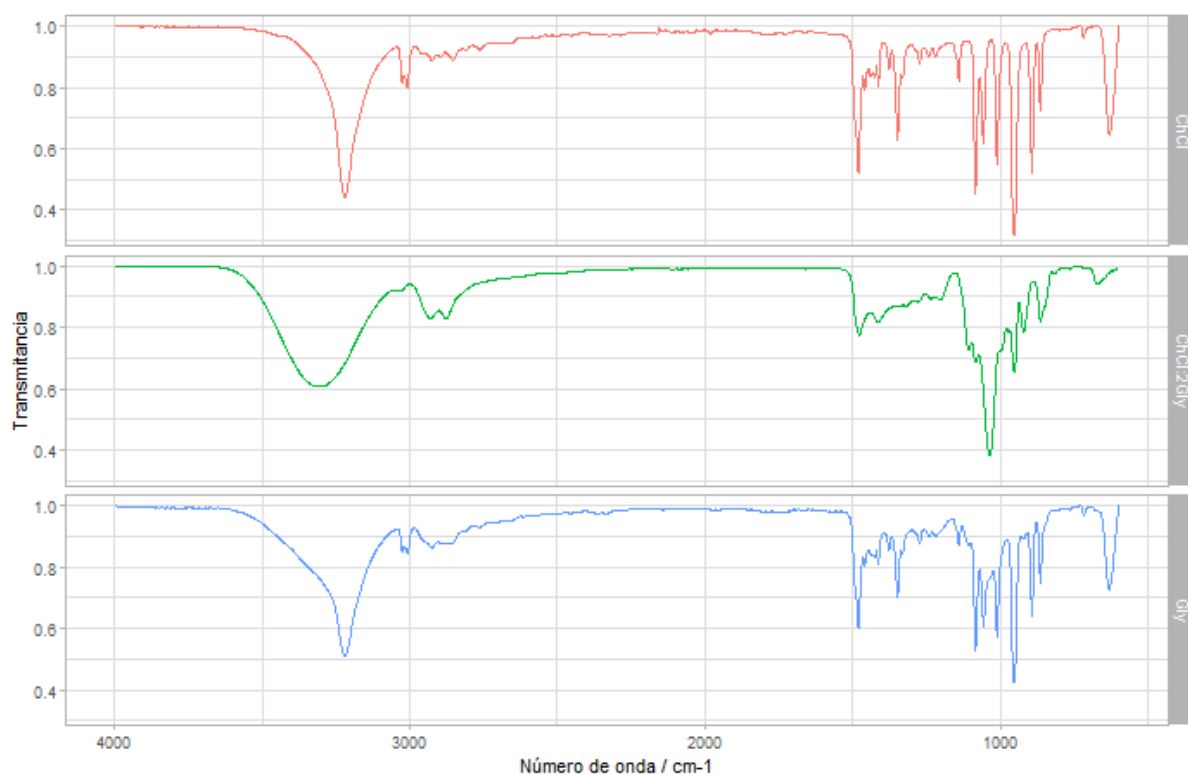


Figura 9: Espectro infrarrojo para el ChCl:2Gly y sus compuestos.

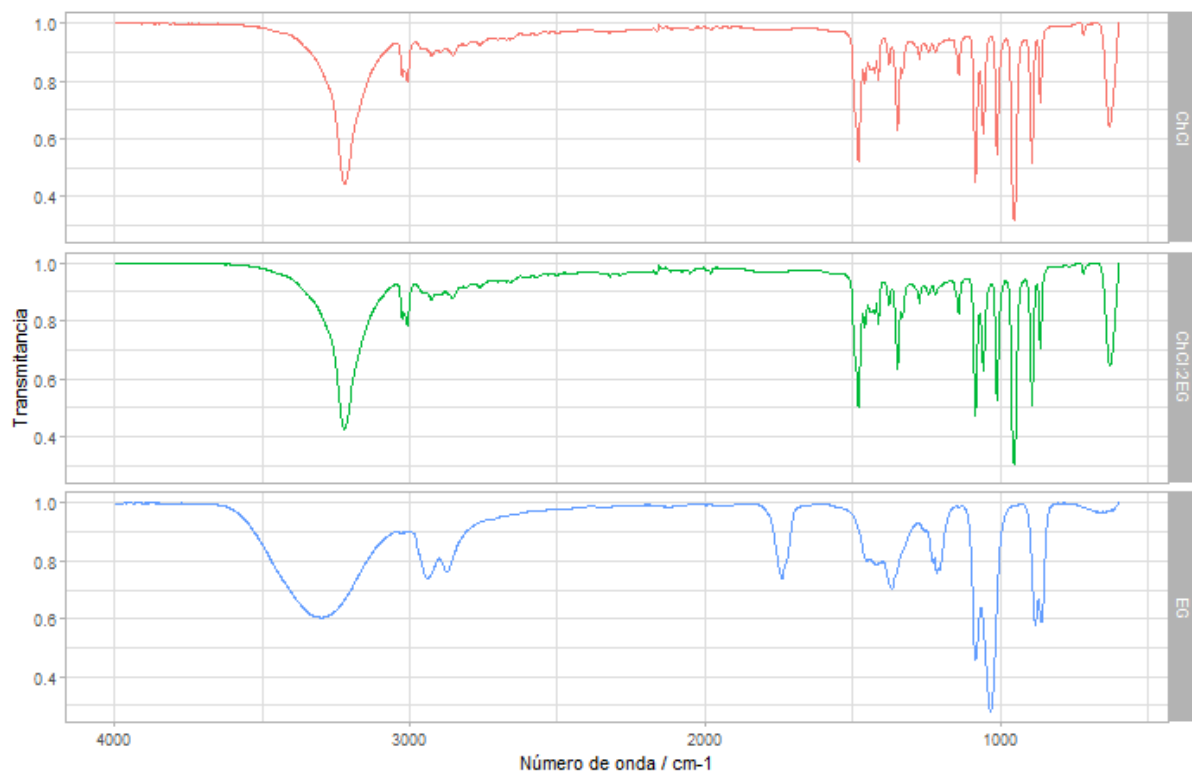


Figura 10: Espectro infrarrojo para el ChCl:2EG y sus compuestos.

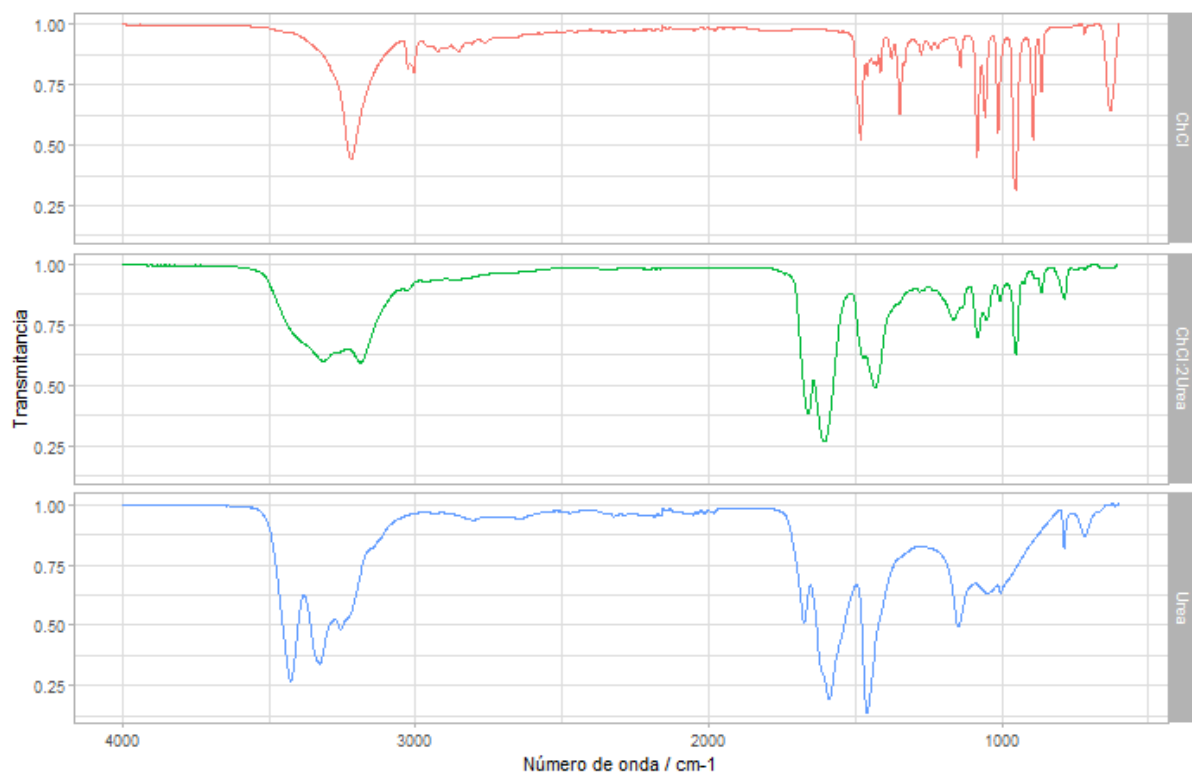


Figura 11: Espectro infrarrojo para el ChCl:2Urea y sus compuestos.

4.4.3. Resultados del diseño

Antes de mostrar los resultados, en la Tabla 11 se muestran los códigos tanto de los factores estudiados, así como de sus respectivos niveles:

Tabla 11: Desglose de factores y niveles utilizados en el diseño de experimentos, donde a - ChCl:2Gly, b - ChCl:2EG y c - ChCl:2Urea.

Factor	Nivel		
	<i>-1</i>	<i>0</i>	<i>1</i>
<i>Biomasa (A)</i>	Liofilizada	-	Fresca
<i>Pretratamiento (B)</i>	US	Mortero	US+Mortero
<i>DES (C)</i>	a	b	c
<i>Ratio (D)</i>	3	6	9
<i>Temperatura (E) / °C</i>	25	35	45
<i>Tiempo (F) / h</i>	0.5	2	3
<i>Dis. DES (G) / %</i>	50	75	100

Como se comentó anteriormente, el diseño evaluará la influencia de los siete factores en tres variables respuesta diferentes: el % Proteínas extraídas, el % Hidratos extraídos, y el ratio de ambos, ya que lo que en el fondo queremos determinar es cuáles son las condiciones en las que dicho ratio se maximiza. Más adelante (Apartados 4.4.4, 4.4.5 y 4.4.6), por simplicidad se utilizarán los códigos A1-A2, B1-B2-B3, etc, para designar los diferentes niveles de los factores en lugar de las abreviaturas (donde 1 sea el nivel más bajo, 2 el intermedio, y 3 el alto).

Es conveniente recordar que este diseño sólo permite estudiar una interacción del factor a dos niveles con el primer factor a tres niveles, que en este caso es la interacción biomasa-pretratamiento. Se eligió dado que parece evidente que la respuesta pueda verse afectada de diferente forma por el pretratamiento dependiendo del estado físico de la microalga (cuanto más agua tenga el alga, más se facilitará el contacto del DES con su superficie, y ésto puede mejorar la extracción de biocompuestos). Los resultados, con su respectiva combinación de niveles, se recogen en la Tabla 12 (R_1 y R_2 se refieren a las dos réplicas de cada experimento). Los resultados están dados en porcentajes, excepto la ratio, que se encuentra en tanto por uno.

Tabla 12: Resultados de los experimentos del diseño L18.

Código	A	B	C	D	E	F	G	Ratio Prot/Hidratos		%Proteínas extraídas		%Hidratos extraídos	
								R ₁	R ₂	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂
1	Fresca	US	a	3	25	0.5	50	0.45	0.43	19.7 %	19.3 %	43.7 %	45.1 %
2	Fresca	US	b	6	35	2	75	0.47	0.47	24.0 %	24.4 %	51.2 %	51.6 %
3	Fresca	US	c	9	45	3	100	0.50	0.42	19.9 %	18.0 %	39.6 %	42.6 %
4	Fresca	Mortero	a	3	35	2	100	0.37	0.36	22.5 %	22.9 %	61.6 %	63.9 %
5	Fresca	Mortero	b	6	45	3	50	0.40	0.41	27.2 %	27.8 %	68.5 %	67.9 %
6	Fresca	Mortero	c	9	25	0.5	75	0.31	0.33	19.7 %	21.7 %	63.0 %	65.4 %
7	Fresca	US+Mor	a	6	25	3	75	0.58	0.43	19.4 %	17.0 %	33.4 %	39.1 %
8	Fresca	US+Mor	b	9	35	0.5	100	0.49	0.42	20.5 %	19.8 %	41.8 %	46.7 %
9	Fresca	US+Mor	c	3	45	2	50	0.45	0.41	20.1 %	19.7 %	44.9 %	47.6 %
10	Liof	US	a	9	45	2	75	0.30	0.46	5.6 %	7.1 %	18.5 %	15.4 %
11	Liof	US	b	3	25	3	100	0.34	0.49	5.2 %	6.3 %	15.2 %	13.0 %
12	Liof	US	c	6	35	0.5	50	0.49	0.59	7.8 %	8.2 %	15.9 %	13.9 %
13	Liof	Mortero	a	6	45	0.5	100	0.42	0.47	8.2 %	8.7 %	19.4 %	18.5 %
14	Liof	Mortero	b	9	25	2	50	0.46	0.45	7.9 %	8.3 %	17.2 %	18.2 %
15	Liof	Mortero	c	3	35	3	75	0.46	0.47	7.6 %	7.5 %	16.5 %	15.9 %
16	Liof	US+Mor	a	9	35	3	50	0.61	0.63	10.1 %	9.9 %	16.5 %	15.8 %
17	Liof	US+Mor	b	3	45	0.5	75	0.44	0.43	7.2 %	6.4 %	16.4 %	14.7 %
18	Liof	US+Mor	c	6	25	2	100	0.66	0.56	10.2 %	10.3 %	15.4 %	18.5 %

En la Tabla 13 aparecen los p-valores resultantes, destacando en rojo aquellos que influyen significativamente.

En el caso de la recuperación de proteínas todos los factores son significativos. Ésto se debe a que el tipo de biomasa contribuye tanto, que condiciona y distorsiona el resto de factores. Para la recuperación de carbohidratos, sin embargo, únicamente son tres los factores que afectan a la respuesta: el tipo de biomasa, el pretratamiento y el tiempo de contacto, además de la interacción de la biomasa con el pretratamiento, que también es significativa. En el caso del ratio proteínas/carbohidratos, afectan la biomasa, el pretratamiento, el ratio biomasa-DES, la temperatura y la interacción biomasa-pretratamiento.

En los siguientes apartados se hará un análisis más pormenorizado de cada una de las variables de respuesta, atendiendo a las posibles interacciones extra que pueda haber. Por último, haciendo uso de modelos generales de regresiones (GLM), se construirán modelos para predecir la variable respuesta en función de los factores.

Tabla 13: p-valores de los factores experimentales y su contribución para cada respuesta.

Factor	% Proteínas ext.		% Carbohidratos ext.		Ratio P/CHs	
	<i>p</i> -valor	% Contrib.	<i>p</i> -valor	% Contrib.	<i>p</i> -valor	% Contrib.
Biomasa	0.0000	89.5	0.0000	83.2	0.0034	11.8
Pretratam.	0.0004	1.6	0.0000	8.2	0.0005	24.3
DES	0.0212	0.6	0.0837	0.3	0.3094	2.7
Ratio B/DES	0.0001	2.2	0.5269	0.1	0.0099	12.6
Temperatura	0.0046	0.9	0.1270	0.3	0.0357	8.5
Tiempo	0.0269	0.6	0.0291	0.5	0.1899	3.9
Dis DES	0.0072	0.8	0.3719	0.1	0.0822	6.1
Interacción	0.0000	2.4	0.0000	5.9	0.0318	8.8
Residual	-	1.3	-	1.2	-	21.4

4.4.4. Extracción de proteínas

En este apartado se van a estudiar más detenidamente los factores que influyen en el % de recuperación de proteínas, así como los niveles de trabajo óptimo (provee una mayor extracción de proteínas), para lo cual se recurre de nuevo al test LSD². En la Tabla 14 se muestran los resultados, pormenorizándose a continuación las conclusiones principales para cada factor:

Tabla 14: Resumen de los niveles óptimos para cada factor en % extracción de proteínas.

Factor	<i>Biomasa</i>	<i>Pretratamiento</i>	<i>DES</i>	<i>Ratio B/DES</i>	<i>Temperatura / °C</i>	<i>Tiempo / h</i>	<i>Dis DES / %</i>
Nivel óptimo	Fresca purín	Mortero	ChCl:2EG	6:1	35	Cualquiera	50

- **BIOMASA:** Hay una gran diferencia significativa entre una y otra; la que maximiza la señal es la de purín fresca, como se supuso anteriormente —mayor contacto con el disolvente—.
- **PRETRATAMIENTO:** No se encuentran diferencias al usar US + Mortero o únicamente US. Sin embargo, sí que hay diferencias significativas entre utilizar sólo mortero o los anteriores, teniendo un % de recuperación de proteínas mayor el pretratamiento de mortero, sin US.

²Las tablas de los test LSD se encuentran en el Apéndice A.1

- DES: Sólo hay diferencias significativas entre ChCl:2EG y los otros dos, ChCl:2Gly y ChCl:2Urea, siendo ChCl:2EG con el que se obtiene mayor extracción de proteína. El ChCl:2EG es el DES que menor viscosidad tiene [37 cP a 25 °C], en comparación al ChCl:2Gly y ChCl:2Urea (259 y 750, respectivamente, a 25 °C) [61]. Una mayor viscosidad se puede atribuir a una mayor presencia de enlaces de hidrógeno en el medio, haciendo que las especies libres que se encuentren en la mezcla tengan menor movilidad, dificultando así la extracción.
- RATIO: Hay diferencias significativas entre el ratio medio (6) con el mayor (9) y menor (3). Entre el mayor y el menor (3 y 9) no hay diferencias significativas. La utilización del ratio medio es lo que proporciona la respuesta más óptima. Esto puede deberse a que mientras que para los DESs ChCl:2Gly y ChCl:2Urea, donde al aumentar la cantidad de HBD, su viscosidad crece, para el ChCl:2EG pasa lo contrario, al aumentar la cantidad de EG añadida, su viscosidad disminuye [61].
- TEMPERATURA: Únicamente hay diferencia significativa entre los niveles de 25 y 35 °C, siendo a 35 °C cuando se maximiza la cantidad de proteína extraída.
- TIEMPO: Es el factor menos significativo —aunque significativo al fin y al cabo— y a la hora de comparar el efecto de los niveles se ha visto que no hay diferencias significativas entre dejar el experimento más o menos tiempo.
- DIS. DES: Hay diferencias significativas entre la disolución al 50 % (m/m) y las de 70 % y 100 %. Entre estas dos últimas no hay ninguna diferencia significativa. El nivel óptimo sería con las disoluciones al 50 % en masa, siendo mezclas con menor viscosidad se favorecería la extracción.
- INTERACCIÓN BIOMASA-PRETRATAMIENTO: Aunque la interacción sale significativa, viendo el gráfico de medias podemos afirmar que no lo es mucho (Figura 12). De nuevo, podría deberse a que el factor biomasa influye mucho en la respuesta.

Para construir los modelos matemáticos, es necesario no sólo seleccionar los factores que debe considerar, sino también sus interacciones. Es por ello que hay que fijarse en las más pronunciadas (gráficos de medias cuyas líneas se corten más abruptamente) para introducirlas en el modelo, a pesar de que estadísticamente no se han podido evaluar (Figuras 13, 14, 15):

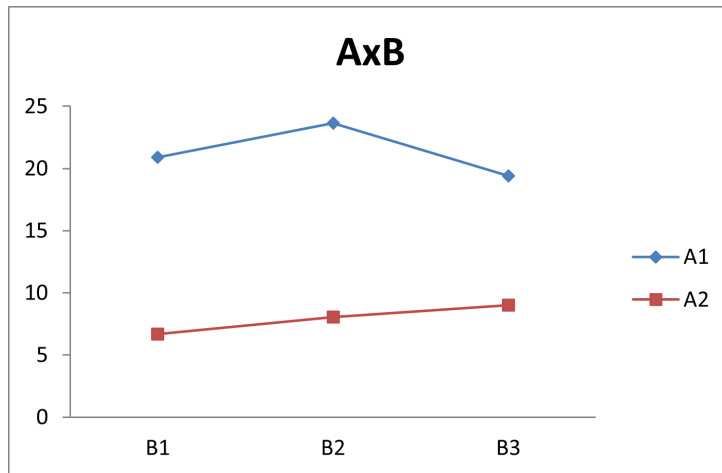


Figura 12: Gráfico de medias de la interacción Biomasa-Pretratamiento para % Extracción de proteínas.

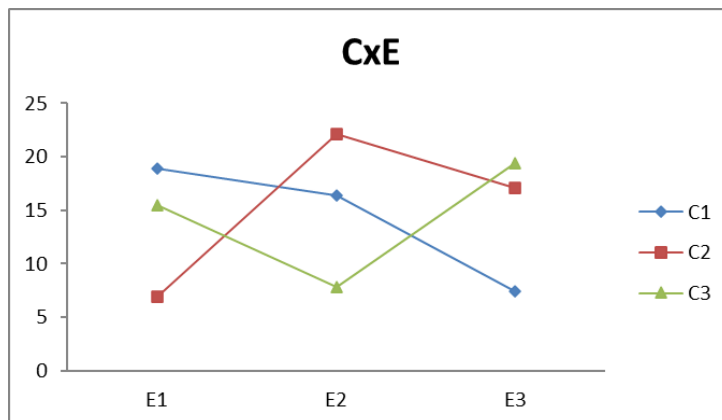


Figura 13: Gráfico de medias de la interacción DES-Temperatura para % Extracción de proteínas.

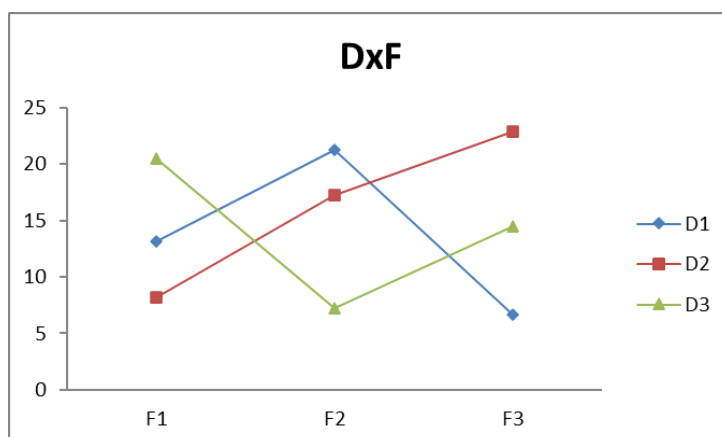


Figura 14: Gráfico de medias de la interacción Ratio-Tiempo para % Extracción de proteínas.

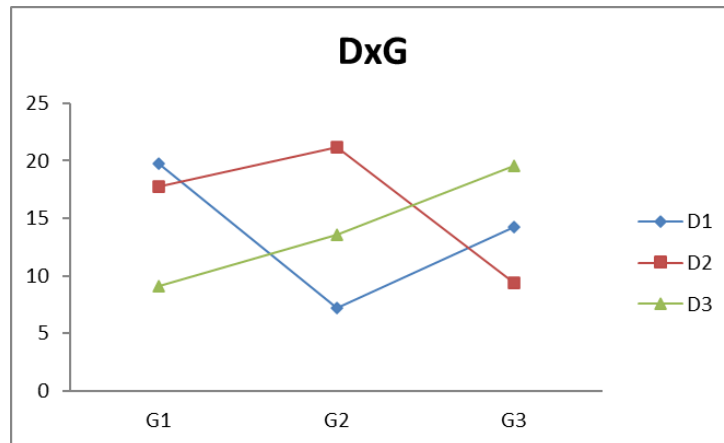


Figura 15: Gráfico de medias de la interacción Ratio-Dis DES para % Extracción de proteínas.

Se puede observar que la biomasa liofilizada (A1) da valores superiores —se corresponde con la línea azul la cual está siempre por encima—, estando su máximo en el punto referido al pretratamiento con mortero (B2), aunque como adelantamos, la interacción no es muy pronunciada. Por el contrario, vemos como las otras tres interacciones mostradas sí cortan muy abruptamente, y todas tienen cierta explicación química. Parece lógico que unas ratios mayores y menores tiempos de extracción, se consigan mejores resultados, y de igual manera ocurre con la disolución de DES, pues cuanto menor sea su porcentaje, menos viscoso y más contacto habrá. A pesar de esto, la interacción DES-Temperatura es difícil de racionalizar, pues los mecanismos implicados en la extracción de proteínas están aún siendo estudiados por la comunidad científica.

Con los efectos medios de los factores se puede construir un modelo de regresión a partir de los datos experimentales, para predecir el valor de la respuesta en función de los factores e interacciones estudiados. Con Statgraphics se aplica el método GLM (Generalized Linear Models); primero se introducen los factores e interacciones que queremos evaluar (los que han salido significativos, más las interacciones que hayan salido abruptas). De las decenas de modelos que proporcionará, se selecciona aquel que maximice la información con el menor número de variables. En este punto, puede que se hayan eliminado alguna de las variables introducidas al principio (a pesar de que resultaran significativas). No obstante, eso no es muy relevante ya que con esas variables, se llevará a cabo una regresión lineal múltiple, obteniendo un polinomio con su respectivo R^2 . Esta operación se repetirá tanto para estudiar las variables de extracción de carbohidratos como para la ratio proteínas/carbohidratos extraídos.

En el caso del %Proteína extraída, denotaremos la variable respuesta como f_P (Ecuación 6):

$$f_P = 25.474 - 15.912 \cdot A + 6.463 \cdot C + 6.663 \cdot E - 0.465 \cdot DF - 0.696 \cdot DG - 3.081 \cdot CE \quad (6)$$

Donde, A, C y E representan los diferentes factores estudiados (para recordar los códigos empleados, revisar la Tabla 11). La magnitud de cada coeficiente está relacionado con la contribución de cada factor a la respuesta, cuanto más grande, más afectará a la misma (y viceversa).

Por su parte, el R^2 se relacionan con la calidad del modelo de regresión: mide el porcentaje de varianza de la tabla de datos explicada por el modelo. Es decir, en este caso $R^2 = 95.14$, por lo que 95 % de la varianza se explica por las variables que se han seleccionado para el modelo. En la Figura 16 puede verse el modelo lineal ajustado.

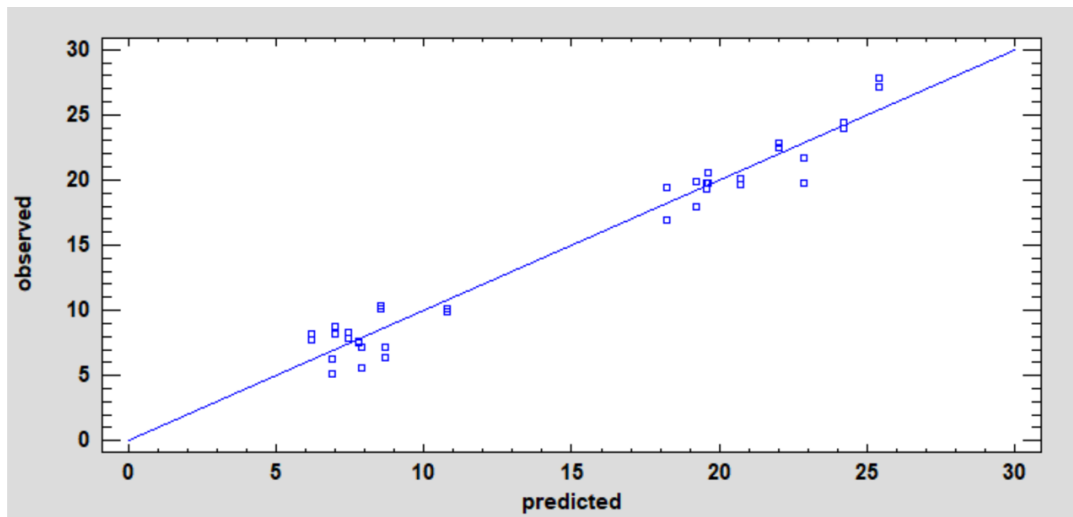


Figura 16: Gráfico de regresión del modelo para el % de extracción de proteínas.

Una vez con el modelo, es posible predecir un valor de la función respuesta a partir de una combinación de niveles de los factores no ensayada, lo que puede ahorrar mucha experimentación, así como predecir el valor máximo que se podría obtener a partir de la combinación óptima de los niveles (Tabla 14). En este caso, el óptimo proporciona un valor teórico de proteína de **23.03 %**. A modo de comprobación, experimentalmente se hicieron por duplicado dichos puntos no ensayados con las condiciones óptimas, obteniendo un porcentaje de extracción de proteínas del **20.23 %**, por lo que podemos decir que el modelo construido funciona relativamente bien.

4.4.5. Extracción de carbohidratos

Para carbohidratos, la biomasa sigue siendo el factor que más contribuye al % de extracción (con un 83 %), seguida del pretratamiento, el tiempo y la interacción de la biomasa con el pretratamiento. Para estudiar los efectos de los niveles de cada factor se realiza una prueba LSD. Según los factores estudiados el nivel que optimiza la respuesta —en este caso se busca minimizar la cantidad extraída— sería el siguiente (resumen en Tabla 15):

Tabla 15: Resumen de los niveles óptimos para cada factor en % extracción de carbohidratos.

Factor	Biomasa	Pretratamiento	DES	Ratio B/DES	Temperatura / °C	Tiempo / h	Dis DES / %
Nivel óptimo	Liofilizada purín	US o US + Mortero	ChCl:2Gly o ChCl:2Urea	Cualquiera	35	Cualquiera	Cualquiera

- BIOMASA: Existe una diferencia significativa entre ambas biomásas, la que maximiza la señal sería la biomasa fresca y la que la minimiza, la liofilizada.
- PRETRATAMIENTO: Para el pretratamiento no se han encontrado diferencias significativas entre el uso de US y US + mortero. En todo caso, con esos pretratamientos se minimizaría la respuesta y con mortero (únicamente) se maximizaría ya que sí que hay diferencias significativas entre este último y los anteriores.
- DES: El que maximiza la respuesta sería de nuevo el ChCl:2EG y para minimizarla ChCl:2Gly o ChCl:2Urea, entre los que no hay diferencias significativas.
- RATIO: No habría ninguna diferencia significativa entre un ratio mayor o menor.
- TEMPERATURA: A 25 °C se minimiza la concentración de carbohidratos extraída.
- TIEMPO: Aunque sigue siendo un factor significativo, no hay diferencias significativas entre los niveles del factor (30 min, 2h o 3h).
- DIS. DES: No existe ninguna diferencia significativa entre el uso de DES puro o con dilución.
- INTERACCIÓN BIOMASA-PRETRATAMIENTO: Al igual que ocurría con el % extracción de proteína, la interacción sale significativa, pero en este caso sí es más pronunciada (Figura 17). Por su parte, las Figuras 18, 19 y 20 muestran el resto de interacciones consideradas para el modelo.

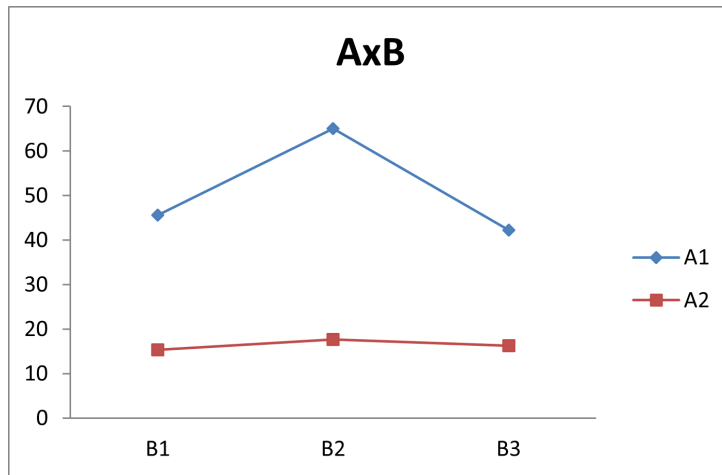


Figura 17: Gráfico de medias de la interacción Biomasa-Pretratamiento para % Extracción de carbohidratos.

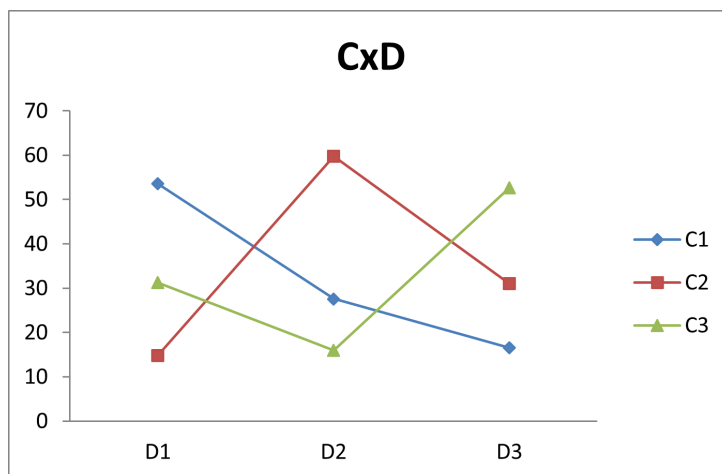


Figura 18: Gráfico de medias interacción Ratio-Tiempo para % Extracción de carbohidratos.

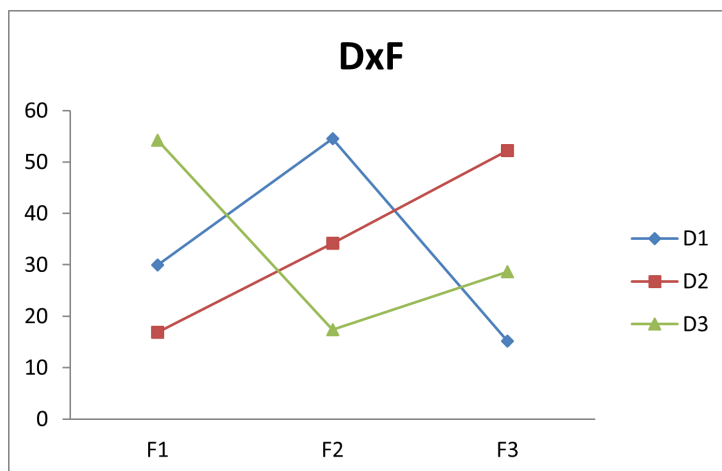


Figura 19: Gráfico de medias de la interacción DES-Ratio para % Extracción de carbohidratos.

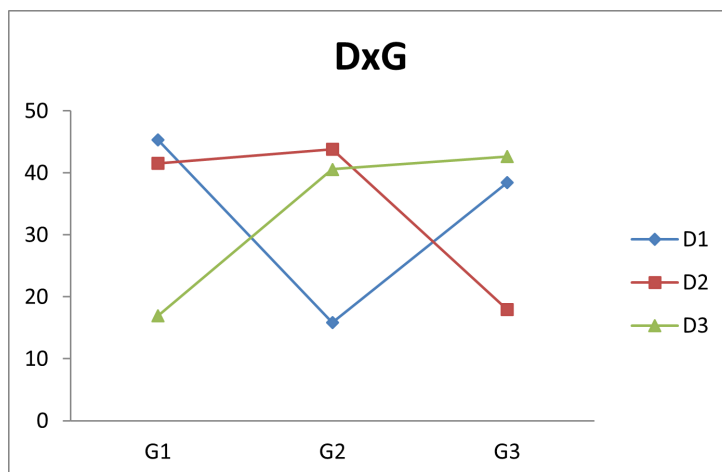


Figura 20: Gráfico de medias de la interacción Ratio-Dis DES para % Extracción de carbohidratos.

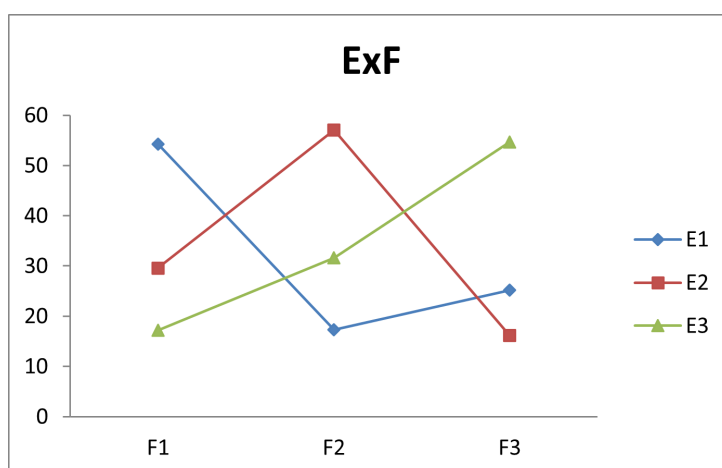


Figura 21: Gráfico de medias de la interacción Ratio-Dis DES para % Extracción de carbohidratos.

Se volvió a construir un modelo de regresión con el programa Statgraphics, obteniendo los siguientes resultados para la extracción de carbohidratos: (f_{CHs} , Ecuación 7):

$$f_{CHs} = 70.04 - 43.25 \cdot A - 5.37 \cdot B - 9.23 \cdot C + 26.27 \cdot D - 8.63 \cdot E + 16.46 \cdot G + 5.08 \cdot AB + 3.91 \cdot CD - 8.70 \cdot DF - 9.25 \cdot DG + 7.61 \cdot EF \quad (7)$$

En este caso $R^2 = 98.02$, por lo que el 98 % de la varianza viene explicado por las variables introducidas en este el modelo; un resultado muy bueno. En la Figura 22 se encuentra la línea del modelo que mejor se ajusta a los datos experimentales. El valor máximo predicho por el modelo es de un **64.48 %** de extracción de carbohidratos. Siempre se van a extraer más carbohidratos que proteínas. Éste no es el resultado que se busca, por lo que hay que encontrar una forma de que el ratio proteínas/carbohidratos sea lo más grande posible. En el siguiente apartado se va a estudiar como maximizarlo.

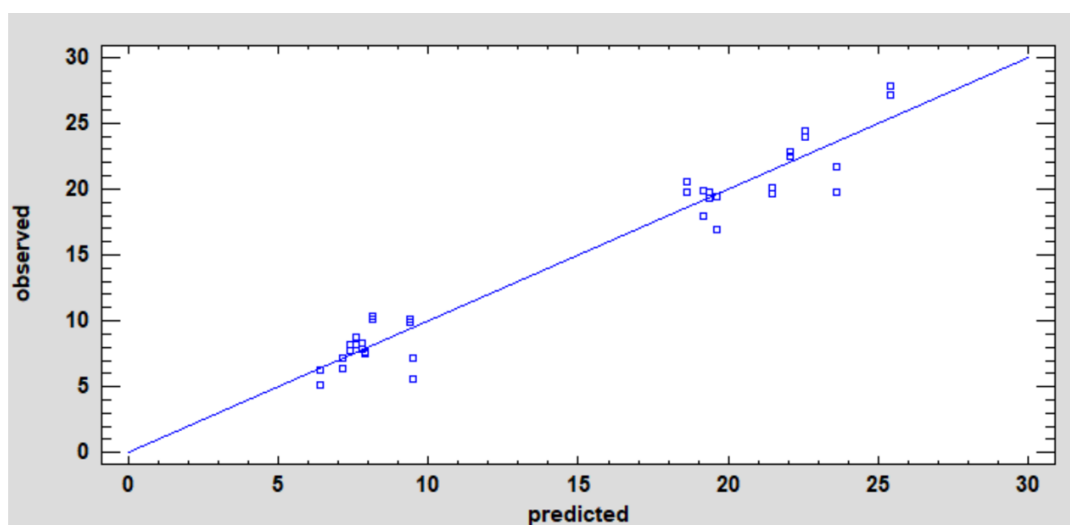


Figura 22: Gráfico de regresión del modelo para el % de extracción de carbohidratos.

4.4.6. Ratio proteínas/carbohidratos

Para la ratio de la extracción de proteínas/carbohidratos, también se determinaron los factores más significativos y los efectos de cada nivel (Tabla 13). En este caso la biomasa contribuye en un 12 %, mientras que el pretratamiento lo hará en un 24 %. Los niveles de cada factor que nos van a interesar son los que maximicen todo lo posible el ratio. Los resultados obtenidos se han resumido en la Tabla 16, discutiéndose a continuación:

Tabla 16: Resumen de los niveles óptimos para cada factor para ratio proteínas/carbohidratos.

Factor	Biomasa	Pretratamiento	DES	Ratio B/DES	Temperatura / °C	Tiempo / h	Dis DES / %
Nivel óptimo	Liofilizada Purín	US + Mortero	Cualquiera	6:1	35	Cualquiera	50

- BIOMASA: Existe una diferencia significativa entre ambas biomاسas, de nuevo, la que maximiza la señal sería la biomasa fresca y la que la minimiza, la liofilizada.
- PRETRATAMIENTO: Para el pretratamiento se han encontrado diferencias significativas entre la utilización del método con US + Mortero —el que maximiza la señal— y los otros dos.
- DES: En este caso, se ha concluido que no existen diferencias significativas entre el uso de un DES y otro.
- RATIO: El ratio más óptimo es el 6:1, entre los otros dos no existe ninguna diferencia significativa.
- TEMPERATURA: A 35 °C se maximiza el ratio proteínas/carbohidratos.
- TIEMPO: Es posible dejar el experimento cualquier tiempo de los tres
- DIS. DES: El nivel más óptimo es el de la dilución al 50 % (m/m).
- INTERACCIÓN BIOMASA-PRETRATAMIENTO: Al contrario que en los dos casos anteriores, no sólo es mayor la respuesta con la biomasa liofilizada (Figura 23, línea roja), sino que se observa también como el pretratamiento con mortero únicamente, no es el que optimiza la respuesta (17).

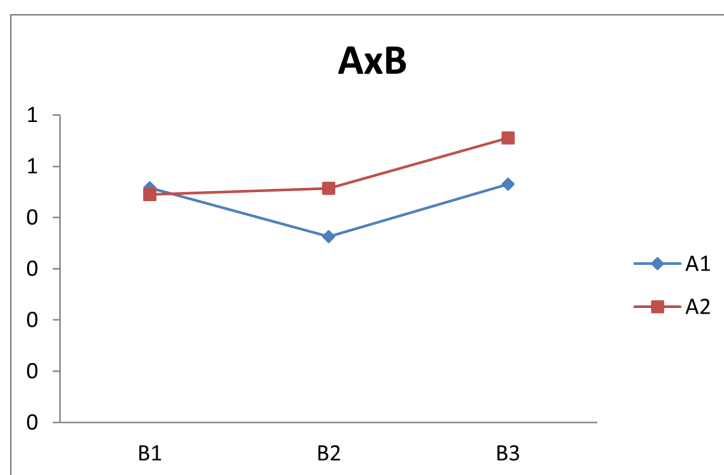


Figura 23: Gráfico de medias de la interacción Biomasa-Pretratamiento para Ratio Proteína/Carbohidratos.

Siguiendo el mismo procedimiento, se han seleccionado las interacciones más pronunciadas para la construcción del modelo de regresión lineal más adecuado (Figuras 24, 25, 26, y 27)

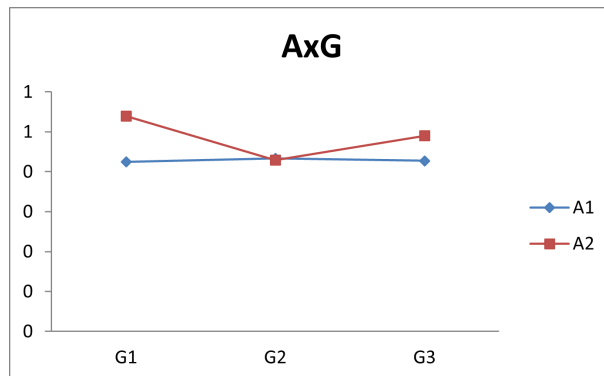


Figura 24: Gráfico de medias de la interacción DES-Ratio para Ratio Proteína/Carbohidratos.

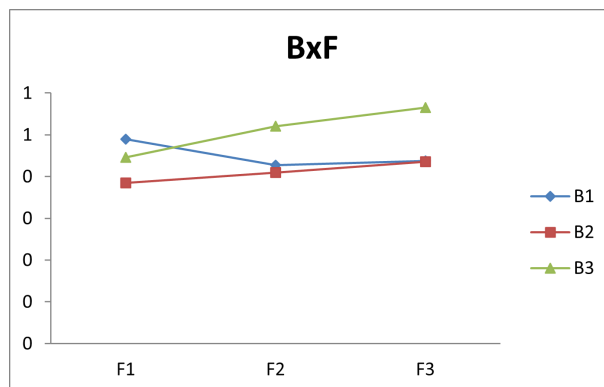


Figura 25: Gráfico de medias de la interacción Ratio-Tiempo para Ratio Proteína/Carbohidratos.

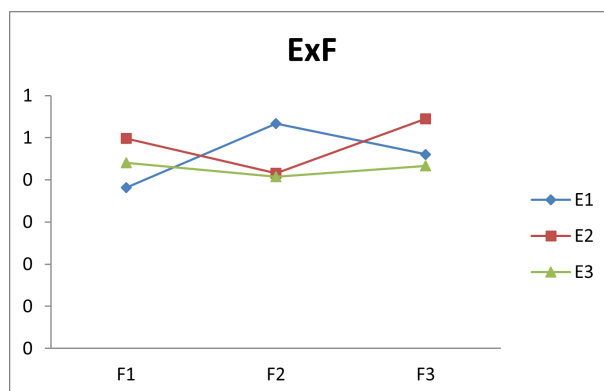


Figura 26: Gráfico de medias de la interacción Ratio-Dis DES para Ratio Proteína/Carbohidratos.

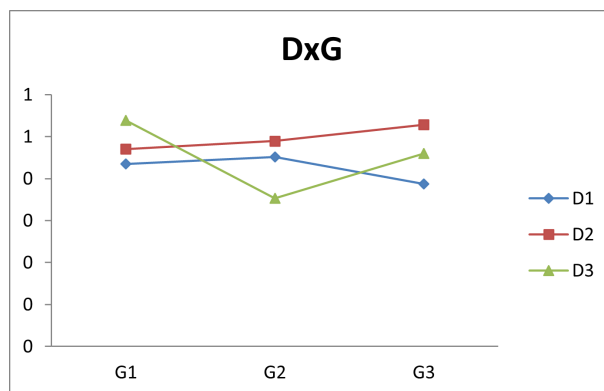


Figura 27: Gráfico de medias de la interacción Ratio-Dis DES para Ratio Proteína/Carbohidratos.

Desafortunadamente, se obtuvo un $R^2 = 60.11$ muy malo. Con estos resultados se puede afirmar que el modelo en este caso falla, y puede deberse a varios motivos, pero el principal es que estamos introduciendo dos variables (f_P y f_{Chs}) que son contrapuestas, en el sentido de que cuando queremos maximizar la extracción de proteínas necesitamos un conjunto de niveles, pero para minimizar la de carbohidratos es justo la combinación opuesta (el caso más visual es el del tipo de biomasa, para maximizar carbohidratos necesitamos trabajar con el microalga líquida pura, mientras que si queremos minimizar la obtención de carbohidratos debemos virar a la microalga liofilizada de purín). Es por esto que el modelo no es bueno.

A modo de resumen, se muestran en la Tabla 17 los valores teóricos predichos por el modelo, así como su error estimado (según la regresión lineal) de las tres variables respuestas consideradas:

Tabla 17: Valores predichos por los modelos para la extracción de proteínas, carbohidratos y su ratio.

	Valor teórico predicho	Error
% Proteína Extraída	23.03	0.51
% Carbohidratos Extraídos	64.48	0.92
Ratio Proteína/Carbohidratos	0.43	1.71

Por último, en las Figuras 28, 29 y 30 se muestran los gráficos de medias de todos los factores respecto a la respuesta media (línea amarilla) según la variable respuesta estudiada.

De este modo, se puede ver gráficamente la contribución de los niveles de cada factor a la respuesta, siendo la biomasa el factor más determinante para la extracción de proteínas y carbohidratos, mientras que en el caso del ratio, es el tipo de pretratamiento empleado.

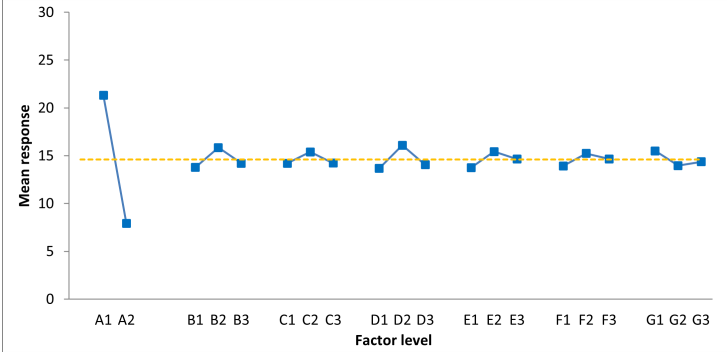


Figura 28: Gráfico de medias para el % de extracción de proteínas.

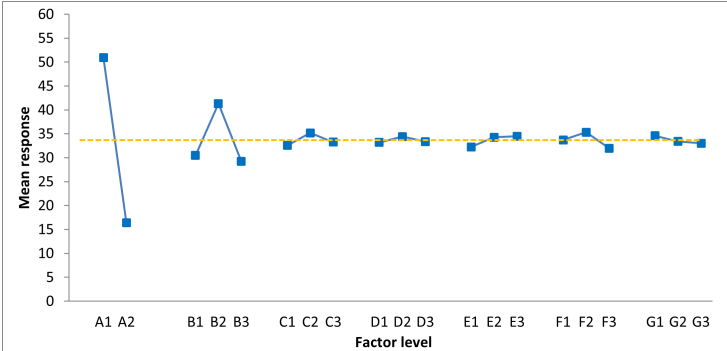


Figura 29: Gráfico de medias para el % de extracción de carbohidratos.

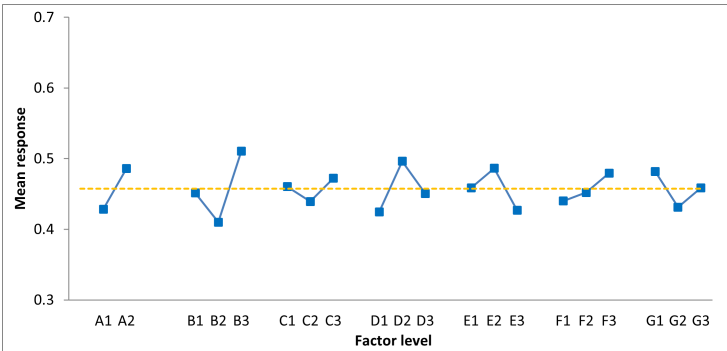


Figura 30: Gráfico de medias para el ratio proteínas/carbohidratos.

5. Conclusiones

Para finalizar, se resumen las principales conclusiones que se pueden extraer de este trabajo

- ✓ Se ha descrito una problemática medioambiental acuciante, y se ha propuesto el uso de microalgas como una posible solución: como fuente de proteínas, pero también por su capacidad para limpiar el agua y proveer de otros biocompuestos de interés.
- ✓ En este sentido, los DESs aparecen como un nuevo tipo de disolvente biodegradable, que permite extraer proteínas directamente del microalga sin necesidad de usar reactivos tóxicos y sin subproducto.
- ✓ Se ha caracterizado los tipos de biomasa empleadas por medio de diferentes métodos analíticos descritos en la literatura y/u optimizados en nuestro grupo de investigación.
- ✓ Se realizó un screening inicial, resultando que los DESs eran mejores extractantes que simplemente agua (de otro modo, carecería de sentido utilizarlos). Además, se vio que la combinación del pretratamiento US+Mortero ofrecía mejoras considerables en el rendimiento de extracción.
- ✓ Se implementó un diseño de Taguchi L18 para el estudio de siete factores, uno de ellos a dos niveles (la biomasa) y el resto a tres niveles. Así mismo, se estudiaron dos respuestas distintas: el %Extracción de proteínas y el de carbohidratos, además de su ratio.
- ✓ Los datos arrojan que, para la extracción de proteínas y carbohidratos, el tipo de biomasa es el factor que más contribuye al aumento/disminución de la respuesta, siendo la microalga líquida pura con la que se maximizan ambas respuestas, probablemente porque le es más fácil al DES penetrar y extraer las proteínas en un medio más acuoso.
- ✓ Por último, se construyeron sendos modelos matemáticos que se ajustan a los datos experimentales para que permita predecir puntos no ensayados. Los modelos para la extracción de proteínas y carbohidratos funcionan relativamente bien, y de hecho se comprobó experimentalmente que se obtenían resultados similares para el caso de la proteína. Sin embargo, para la ratio no conseguimos construir un modelo adecuado, debido a que los efectos de la extracción de proteínas y de carbohidratos son contrapuestos de acuerdo a nuestros intereses (maximizar una a la par que se reduce la otra).

Para acabar, son evidentes las limitaciones de este trabajo. Por una parte, el diseño L18 no permite estudiar cuantitativamente todas las posibles interacciones. Además, sólo se han probado biomazas en diferente estado de agregación, pero hubiera sido más interesante aún utilizar tanto microalga líquida de purín, como microalga liofilizada pura para ver si había diferencias debido a su diferente crecimiento y composición (no se hizo porque no disponíamos de dichas biomazas en el momento de la experimentación). Por último, como se ha visto a lo largo del trabajo, todavía queda mucho margen para seguir investigando estas metodologías de extracción de proteínas de microalgas, así como de la purificación de las proteínas una vez extraídas (no tratado en este trabajo). Con lo expuesto anteriormente, a continuación se proponen diversas líneas para un trabajo futuro:

- ∞ Búsqueda de otros compuestos (aparte de las proteínas) que puedan ser de interés industrial.
- ∞ Planificación de un diseño experimental más amplio en el que se estudien menos factores, pero que dé información sobre las interacciones, basándose en los resultados obtenidos en el L18.
- ∞ Investigar nuevos DES que puedan tener mayor selectividad por las proteínas.
- ∞ Probar nuevas técnicas como los Aqueous Two-Phase Systems (ATPS) basados en DES.
- ∞ Caracterizar las proteínas extraídas: tamaño, propiedades reológicas, funcionalidades biológicas, etcétera.
- ∞ Probar métodos de purificación de la proteína de los carbohidratos, una de las técnicas más empleadas en este aspecto es la cromatografía preparativa, bien usando columnas C18, de exclusión molecular, o de intercambio iónico, dependiendo de las características de las proteínas extraídas, para así obtener fracciones relativamente puras de proteínas.

A. Apéndices

A.1. Resultados test LSD para el diseño L18

A.1.1. Extracción proteínas

MS_R	7,947401
gdl_R	20
α	0,05
$t_{crítico}$	2,0860

	2 niveles	3 niveles
n_j	18	12
$LSD_{crítico}$	1,386	1,698

A		1	2
		50,9709	16,3789
1	50,9709	0,0000	34,5920
2	16,3789	34,5920	0,0000

Diferencia significativa entre 1-2

B		1	2	3
		30,4720	41,3324	29,2204
1	30,4720	0,0000	10,8604	1,2516
2	41,3324	10,8604	0,0000	12,1120
3	29,2204	1,2516	12,1120	0,0000

Diferencias significativas entre 1-2 y 2-3

Diferencia no significativa entre 1-3

C		1	2	3
		32,5605	35,1980	33,2662
1	32,5605	0,0000	2,6375	0,7057
2	35,1980	2,6375	0,0000	1,9317
3	33,2662	0,7057	1,9317	0,0000

Diferencias significativas entre 1-2 y 2-3

Diferencia no significativa entre 1-3

D		1	2	3
		33,2061	34,4322	33,3864
1	33,2061	0,0000	1,2261	0,1803
2	34,4322	1,2261	0,0000	1,0458
3	33,3864	0,1803	1,0458	0,0000

Ninguna diferencia es significativa

E		1	2	3
		32,2578	34,2749	34,4920
1	32,2578	0,0000	2,0171	2,2342
2	34,2749	2,0171	0,0000	0,2171
3	34,4920	2,2342	0,2171	0,0000

Diferencias significativas entre 1-2 y 1-3

Diferencia no significativa entre 2-3

F		1	2	3
		33,7052	33,4168	33,0048
1	33,7052	0,0000	0,2884	0,7004
2	33,4168	0,2884	0,0000	0,4120
3	33,0048	0,7004	0,4120	0,0000

Ninguna diferencia es significativa

G		1	2	3
		34,6031	33,4168	33,0048
1	34,6031	0,0000	1,1863	1,5983
2	33,4168	1,1863	0,0000	0,4120
3	33,0048	1,5983	0,4120	0,0000

Ninguna diferencia es significativa

Figura 31: Resultados LSD del %Extracción de carbohidratos.

A.1.2. Extracción carbohidratos

MS_R	0,002691
gd_R	20
α	0,05
$t_{\text{crítico}}$	2,0860

	2 niveles	3 niveles
n_j	18	12
$LSD_{\text{crítico}}$	0,036	0,044

A		1	2
		0,4285	0,4859
1	0,4285	0,0000	0,0573
2	0,4859	0,0573	0,0000

Diferencia significativa entre 1-2

D		1	2	3
		0,4246	0,4963	0,4508
1	0,4246	0,0000	0,0717	0,0262
2	0,4963	0,0717	0,0000	0,0455
3	0,4508	0,0262	0,0455	0,0000

Diferencias significativas entre 1-2 y 2-3
Diferencia no significativa entre 1-3

B		1	2	3
		0,4513	0,4100	0,5104
1	0,4513	0,0000	0,0413	0,0591
2	0,4100	0,0413	0,0000	0,1004
3	0,5104	0,0591	0,1004	0,0000

Diferencias significativas entre todos los niveles

E		1	2	3
		0,4586	0,4863	0,4268
1	0,4586	0,0000	0,0277	0,0318
2	0,4863	0,0277	0,0000	0,0595
3	0,4268	0,0318	0,0595	0,0000

Diferencias significativas entre 2-3
Diferencia no significativa entre 1-2 y 1-3

C		1	2	3
		0,4603	0,4392	0,4722
1	0,4603	0,0000	0,0211	0,0119
2	0,4392	0,0211	0,0000	0,0330
3	0,4722	0,0119	0,0330	0,0000

F		1	2	3
		0,4401	0,4313	0,4586
1	0,4401	0,0000	0,0087	0,0185
2	0,4313	0,0087	0,0000	0,0272
3	0,4586	0,0185	0,0272	0,0000

Ninguna diferencia es significativa

G		1	2	3
		0,4817	0,4313	0,4586
1	0,4817	0,0000	0,0504	0,0232
2	0,4313	0,0504	0,0000	0,0272
3	0,4586	0,0232	0,0272	0,0000

Diferencias significativas entre 1-2
Diferencia no significativa entre 1-3 y 2-3

Figura 32: Resultados LSD atendiendo a la ratio de extracción de proteínas respecto a la de carbohidratos.

A.1.3. Ratio

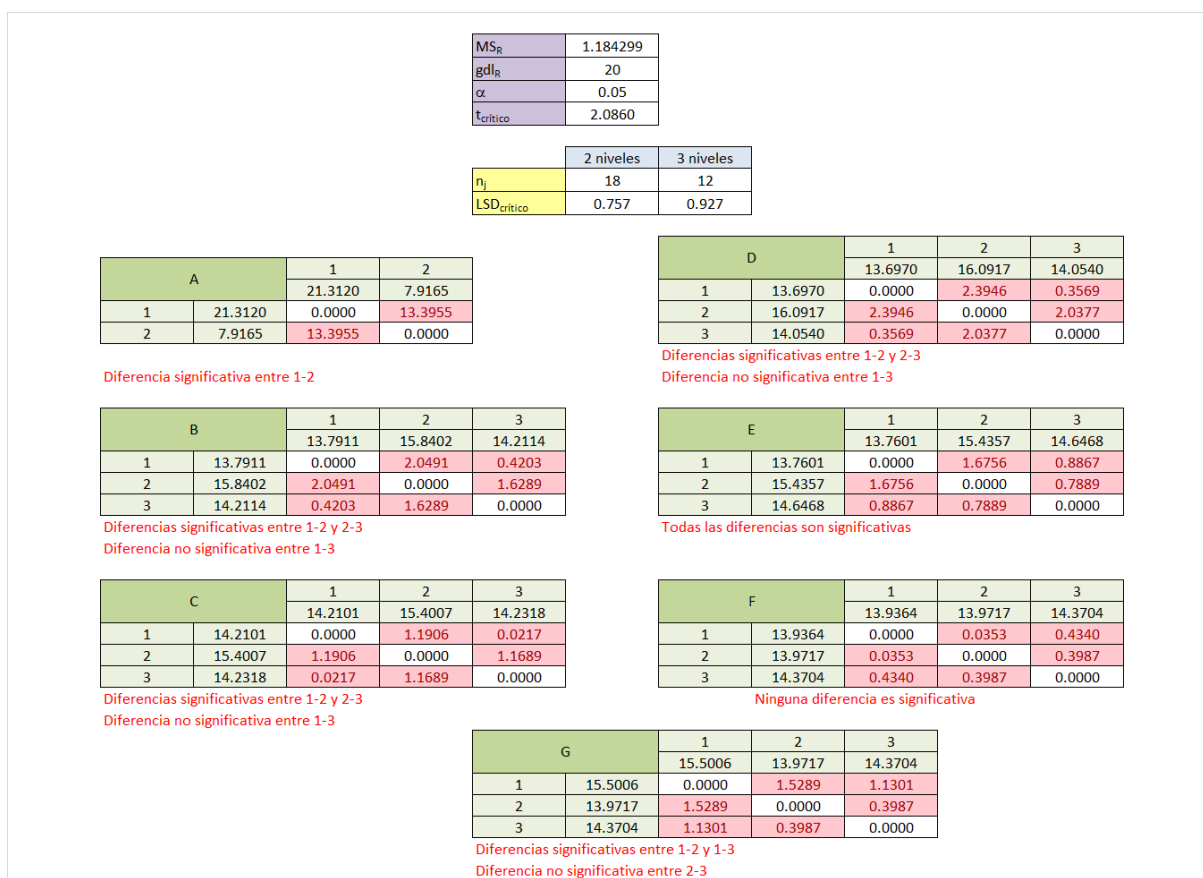


Figura 33: Resultados LSD del %Extracción de proteínas.

Referencias

- [1] W. H. Organization y U. N. University, *Protein and amino acid requirements in human nutrition*. World Health Organization, 2007, vol. 935.
- [2] N. EFSA Panel on Dietetic Products y A. (NDA), «Scientific opinion on dietary reference values for protein,» *EFSA Journal*, vol. 10, n.º 2, pág. 2557, 2012.
- [3] D. o. E. United Nations y P. D. Social Affairs, «World Population Prospects: The 2012 Revision, Highlights and Advance Table,» 2013.
- [4] H. C. J. Godfray, J. R. Beddington, I. R. Crute y col., «Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People,» *Science*, vol. 327, n.º 5967, págs. 812-818, feb. de 2010. DOI: 10.1126/science.1185383.
- [5] D. Tilman, C. Balzer, J. Hill y B. L. Befort, «Global food demand and the sustainable intensification of agriculture,» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, n.º 50, págs. 20 260-20 264, nov. de 2011. DOI: 10.1073/pnas.1116437108.
- [6] J. Ranganathan, D. Vennard, R. Waite y col., *Shifting diets for a sustainable food future*. World Resources Institute Washington, DC, 2016. DOI: 10.13140/RG.2.1.3808.2961.
- [7] R. Sinha, A. J. Cross, B. I. Graubard, M. F. Leitzmann y A. Schatzkin, «Meat Intake and Mortality,» *Archives of Internal Medicine*, vol. 169, n.º 6, pág. 562, mar. de 2009. DOI: 10.1001/archinternmed.2009.6.
- [8] Q. Sun, «Red Meat Consumption and Mortality,» *Archives of Internal Medicine*, vol. 172, n.º 7, pág. 555, abr. de 2012. DOI: 10.1001/archinternmed.2011.2287.
- [9] E. Zielińska, M. Karaś y B. Baraniak, «Comparison of functional properties of edible insects and protein preparations thereof,» *LWT*, vol. 91, págs. 168-174, mayo de 2018. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.01.058.
- [10] E. Hallström, A. Carlsson-Kanyama y P. Börjesson, «Environmental impact of dietary change: a systematic review,» *Journal of Cleaner Production*, vol. 91, págs. 1-11, mar. de 2015. DOI: 10.1016/j.jclepro.2014.12.008.
- [11] S. Bleakley y M. Hayes, «Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production,» *Foods*, vol. 6, n.º 5, pág. 33, abr. de 2017. DOI: 10.3390/foods6050033.

- [12] V. Dolganyuk, D. Belova, O. Babich y col., «Microalgae: A promising source of valuable bioproducts,» *Biomolecules*, vol. 10, n.º 8, pág. 1153, 2020. DOI: 10.3390/biom10081153.
- [13] M. van Krimpen, P. Bikker, I. van der Meer, C. van der Peet-Schwering y J. Vereijken, «Cultivation, processing and nutritional aspects for pigs and poultry of European protein sources as alternatives for imported soybean products,» English, Wageningen UR Livestock Research, 662, 2013, pág. 48. dirección: <https://edepot.wur.nl/250643>.
- [14] J. Fleurence, «Seaweed proteins,» *Trends in Food Science & Technology*, vol. 10, n.º 1, págs. 25-28, ene. de 1999. DOI: 10.1016/S0924-2244(99)00015-1.
- [15] Y. Sun, Z. Chen, G. Wu y col., «Characteristics of water quality of municipal wastewater treatment plants in China: implications for resources utilization and management,» *Journal of Cleaner Production*, vol. 131, págs. 1-9, 2016. DOI: 10.1016/j.jclepro.2016.05.068.
- [16] M. Henze e Y. Comeau, «Wastewater characterization,» *Biological wastewater treatment: Principles modelling and design*, págs. 33-52, 2008. DOI: 10.2166/9781780408613.
- [17] Y. Wang, S.-H. Ho, C.-L. Cheng y col., «Perspectives on the feasibility of using microalgae for industrial wastewater treatment,» *Bioresour Technol*, vol. 222, págs. 485-497, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.09.106.
- [18] M. P. de Souza, M. Hoeltz, L. Brittes Benitez, Ê. L. Machado y R. d. C. de Souza Schneider, «Microalgae and clean technologies: a review,» *CLEAN–Soil, Air, Water*, vol. 47, n.º 11, pág. 1800380, 2019. DOI: 10.1002/clen.201800380.
- [19] Z. A. Popper, M. Gurvan, C. Hervé y col., «Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants,» *Annu Rev Plant Biol*, 2011. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042110-103809.
- [20] O. Córdova y R. Chamy, «Microalgae to Biogas: Microbiological Communities Involved,» en *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*, Elsevier, 2020, págs. 227-249. DOI: 10.1016/B978-0-12-817536-1.00015-1.
- [21] M. Bhattacharya y S. Goswami, «Microalgae–A green multi-product biorefinery for future industrial prospects,» *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 25, pág. 101580, 2020. DOI: doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101580.

- [22] D. Moldes, E. M. Rojo, S. Bolado, P. A. García-Encina y B. Comesaña-Gándara, «Biodegradable Solvents: A Promising Tool to Recover Proteins from Microalgae,» *Applied Sciences*, vol. 12, n.º 5, pág. 2391, 2022. DOI: 10.3390/app12052391.
- [23] S. U. Kadam, C. Álvarez, B. K. Tiwari y C. P. O'Donnell, «Extraction and characterization of protein from Irish brown seaweed *Ascophyllum nodosum*,» *Food Research International*, vol. 99, págs. 1021-1027, sep. de 2017. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.07.018.
- [24] P. Bertsch, L. Böcker, A. Mathys y P. Fischer, «Proteins from microalgae for the stabilization of fluid interfaces, emulsions, and foams,» *Trends in Food Science & Technology*, vol. 108, págs. 326-342, 2021. DOI: 10.1016/j.tifs.2020.12.014.
- [25] L. Böcker, P. Bertsch, D. Wenner y col., «Effect of *Arthrospira platensis* microalgae protein purification on emulsification mechanism and efficiency,» *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 584, págs. 344-353, 2021. DOI: 10.1016/j.jcis.2020.09.067.
- [26] F. Yang y P. Yang, «Protein-Based Separation Membranes: State of the Art and Future Trends,» *Advanced Energy and Sustainability Research*, vol. 2, n.º 6, pág. 2100008, 2021. DOI: 10.1002/aesr.202100008.
- [27] A. Saxena, B. P. Tripathi, M. Kumar y V. K. Shahi, «Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview,» *Advances in colloid and interface science*, vol. 145, n.º 1-2, págs. 1-22, 2009. DOI: 10.1016/j.cis.2008.07.004.
- [28] H. Y. Ta, F. Collin, L. Perquis, V. Poinsoy, V. Ong-Meang y F. Couderc, «Twenty years of amino acid determination using capillary electrophoresis: A review,» *Analytica chimica acta*, vol. 1174, pág. 338-353, 2021. DOI: 10.1016/j.aca.2021.338233.
- [29] Z. Tang, B. Ju, W. Li, S. Wen, Y. Pu, S. Qin y col., «One-step chromatographic procedure for purification of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*,» *Protein Expression and Purification*, vol. 123, págs. 70-74, 2016. DOI: 10.1016/j.pep.2016.01.018.
- [30] M. Kumar, M. Tomar, J. Potkule y col., «Advances in the plant protein extraction: Mechanism and recommendations,» *Food Hydrocolloids*, vol. 115, pág. 106-115, 2021. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2021.106595.

- [31] F. Chemat, M. Abert Vian, H. K. Ravi y col., «Review of alternative solvents for green extraction of food and natural products: Panorama, principles, applications and prospects,» *Molecules*, vol. 24, n.º 16, pág. 3007, 2019. DOI: 10.3390/molecules24163007.
- [32] G. Cravotto, L. Boffa, S. Mantegna, P. Perego, M. Avogadro y P. Cintas, «Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves,» *Ultrasonics sonochemistry*, vol. 15, n.º 5, págs. 898-902, 2008. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2007.10.009.
- [33] A. P. Abbott, G. Capper, D. L. Davies, R. K. Rasheed y V. Tambyrajah, «Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures Electronic supplementary information (ESI) available: spectroscopic data. See <http://www.rsc.org/suppdata/cc/b2/b210714g/>,» *Chemical Communications*, n.º 1, págs. 70-71, nov. de 2002. DOI: 10.1039/b210714g.
- [34] B. B. Hansen, S. Spittle, B. Chen y col., «Deep eutectic solvents: A review of fundamentals and applications,» *Chemical reviews*, vol. 121, n.º 3, págs. 1232-1285, 2020. DOI: 10.1021/acs.chemrev.0c00385.
- [35] Á. Santana-Mayor, R. Rodríguez-Ramos, A. V. Herrera-Herrera, B. Socas-Rodríguez y M. Á. Rodríguez-Delgado, «Deep eutectic solvents. The new generation of green solvents in analytical chemistry,» *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 134, pág. 116 108, 2021. DOI: 10.1016/j.trac.2020.116108.
- [36] Q. Zhang, K. D. O. Vigier, S. Royer y F. Jérôme, «Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications,» *Chemical Society Reviews*, vol. 41, n.º 21, págs. 7108-7146, 2012. DOI: 10.1016/j.trac.2020.116108.
- [37] M. A. Martins, S. P. Pinho y J. A. Coutinho, «Insights into the nature of eutectic and deep eutectic mixtures,» *Journal of Solution Chemistry*, vol. 48, n.º 7, págs. 962-982, 2019. DOI: 10.1007/s10953-018-0793-1.
- [38] S. Mehariya, F. Fratini, R. Lavecchia y A. Zuorro, «Green extraction of value-added compounds from microalgae: A short review on natural deep eutectic solvents (NaDES) and related pre-treatments,» *Journal of Environmental Chemical Engineering*, vol. 9, n.º 5, pág. 105 989, 2021. DOI: 10.1016/j.jece.2021.105989.
- [39] E. L. Smith, A. P. Abbott y K. S. Ryder, «Deep eutectic solvents (DESs) and their applications,» *Chemical reviews*, vol. 114, n.º 21, págs. 11 060-11 082, 2014. DOI: 10.1021/cr300162p.

- [40] D. O. Abranches, M. A. Martins, L. P. Silva, N. Schaeffer, S. P. Pinho y J. A. Coutinho, «Phenolic hydrogen bond donors in the formation of non-ionic deep eutectic solvents: The quest for type V DES,» *Chemical Communications*, vol. 55, n.º 69, págs. 10 253-10 256, 2019. DOI: 10.1039/C9CC04846D.
- [41] N. Özel y M. Elibol, «A review on the potential uses of deep eutectic solvents in chitin and chitosan related processes,» *Carbohydrate Polymers*, vol. 262, pág. 117942, 2021. DOI: 10.1016/j.carbpol.2021.117942.
- [42] J. K. Blusztajn, «Choline, a Vital Amine,» *Science*, vol. 281, n.º 5378, págs. 794-795, ago. de 1998. DOI: 10.1126/science.281.5378.794.
- [43] Q. Zeng, Y. Wang, Y. Huang, X. Ding, J. Chen y K. Xu, «Deep eutectic solvents as novel extraction media for protein partitioning,» *The Analyst*, vol. 139, n.º 10, pág. 2565, 2014. DOI: 10.1039/c3an02235h.
- [44] H. Zhang, Y. Wang, K. Xu y col., «Ternary and binary deep eutectic solvents as a novel extraction medium for protein partitioning,» *Analytical Methods*, vol. 8, n.º 46, págs. 8196-8207, 2016. DOI: 10.1039/c6ay01860b.
- [45] A. Grudniewska, E. M. de Melo, A. Chan, R. Gniłka, F. Boratynski y A. S. Matharu, «Enhanced protein extraction from oilseed cakes using glycerol–choline chloride deep eutectic solvents: a biorefinery approach,» *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, vol. 6, n.º 11, págs. 15 791-15 800, 2018. DOI: 10.1021/acssuschemeng.8b04359.
- [46] K. Xu, Y. Wang, Y. Huang, N. Li y Q. Wen, «A green deep eutectic solvent-based aqueous two-phase system for protein extracting,» *Analytica Chimica Acta*, vol. 864, págs. 9-20, mar. de 2015. DOI: 10.1016/j.aca.2015.01.026.
- [47] N. Li, Y. Wang, K. Xu, Y. Huang, Q. Wen y X. Ding, «Development of green betaine-based deep eutectic solvent aqueous two-phase system for the extraction of protein,» *Talanta*, vol. 152, págs. 23-32, 2016. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.01.042.
- [48] C. Bai, Q. Wei y X. Ren, «Selective Extraction of Collagen Peptides with High Purity from Cod Skins by Deep Eutectic Solvents,» *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, vol. 5, n.º 8, págs. 7220-7227, jun. de 2017. DOI: 10.1021/acssuschemeng.7b01439.

- [49] M. B. Agnese Cicci Giorgia Sed, «Potential of Choline Chloride – Based Natural Deep Eutectic Solvents (NaDES) in the Extraction of Microalgal Metabolites,» *Chem. Eng. Trans.*, vol. 57, págs. 61-66, 2017. DOI: 10.3303/CET1757011.
- [50] G. Sed, A. Cicci, P. G. Jessop y M. Bravi, «A novel switchable-hydrophilicity, natural deep eutectic solvent (NaDES)-based system for bio-safe biorefinery,» *RSC Advances*, vol. 8, n.º 65, págs. 37 092-37 097, 2018. DOI: 10.1039/c8ra08536f.
- [51] P. L. Kirk, «Kjeldahl method for total nitrogen,» *Analytical chemistry*, vol. 22, n.º 2, págs. 354-358, 1950. DOI: 10.1021/ac60038a038.
- [52] C. V. G. López, M. d. C. C. García, F. G. A. Fernández, C. S. Bustos, Y. Chisti y J. M. F. Sevilla, «Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass,» *Bioresour. Technol.*, vol. 101, n.º 19, págs. 7587-7591, 2010. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.04.077.
- [53] S. Wychen y L. Laurens, «Determination of total carbohydrates in algal biomass,» *Contract*, vol. 303, págs. 275-3000, ene. de 2013.
- [54] S. S. Nielsen, «Phenol-Sulfuric Acid Method for Total Carbohydrates,» en *Food Analysis Laboratory Manual*, Springer US, nov. de 2009, págs. 47-53. DOI: 10.1007/978-1-4419-1463-7_6.
- [55] F. Soxhlet, «Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes,» *Dinglers Polytechnisches Journal*, vol. 232, págs. 461-465, 1879.
- [56] S. Aravind, D. Barik, P. Ragupathi y G. Vignesh, «Investigation on algae oil extraction from algae *Spirogyra* by Soxhlet extraction method,» *Materials Today: Proceedings*, vol. 43, págs. 308-313, 2021. DOI: 10.1016/j.matpr.2020.11.668.
- [57] J. M. Walker, «The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation,» en *Springer Protocols Handbooks*, Humana Press, 2009, págs. 11-15. DOI: 10.1007/978-1-59745-198-7_3.
- [58] S. N. Deming y S. L. Morgan, *Experimental design: a chemometric approach*. Elsevier, 1993.
- [59] W. Ray, *Statistics for Experiments. An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building*, 1979.

- [60] J. Emsley, «Very strong hydrogen bonding,» *Chemical Society Reviews*, vol. 9, n.º 1, págs. 91-124, 1980. DOI: <https://doi.org/10.1039/CS9800900091>.
- [61] Q. Zhang, K. D. O. Vigier, S. Royer y F. Jérôme, «Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications,» *Chemical Society Reviews*, vol. 41, n.º 21, pág. 7108, 2012. DOI: [10.1039/c2cs35178a](https://doi.org/10.1039/c2cs35178a).