



---

**Universidad de Valladolid**

FACULTAD DE CIENCIAS

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**Recuperación de biomoléculas de  
biomasa algal con disolventes  
biodegradables**

**Autora: Sara Rebaque Alonso**

**Tutores: David Moldes Plaza/Patricia Fernández**

**Requejo**

**Año 2023**



# Resumen

En las próximas décadas, se espera un notable aumento en la demanda de proteínas como consecuencia del aumento de la población mundial. Las microalgas han surgido como una prometedora fuente de proteínas de alta calidad y otras biomoléculas de interés. Además, pueden cultivarse en fotobiorreactores, donde convierten los nutrientes presentes en las aguas residuales en biomasa, contribuyendo así a la depuración del agua.

En este trabajo, se ha investigado el uso de disolventes con eutéctico profundo (DES), puros y combinados con agua, como alternativa a los disolventes orgánicos utilizados en la extracción de proteínas. Primero, se prepararon y caracterizaron los DESs y las mezclas DES+agua. Luego, se llevó a cabo un diseño factorial completo para estudiar cómo influye la cantidad de agua añadida (siete niveles) y el tipo de disolvente (tres niveles) en la extracción de proteínas, carbohidratos y su ratio, de la microalga *Scenedesmus almeriensis*. El análisis de los resultados mediante ANOVA mostró que la combinación de 20 g de agua añadida a la mezcla de biomasa:disolvente (1:9) con el DES ChCl:2Urea, incrementa el rendimiento de recuperación de proteínas en comparación con los otros disolventes utilizados. Con la información obtenida, se implementó un diseño experimental L9 de Taguchi para estudiar el efecto de cuatro factores en la extracción de proteínas de dos tipos de biomasa algal (*Scenedesmus almeriensis* y *Chlorella vulgaris*): la temperatura, el pretratamiento de la biomasa, el tiempo de contacto y la ratio biomasa:disolvente. Además, se construyeron varios modelos matemáticos para predecir el valor óptimo de las variables respuesta. Los resultados obtenidos muestran una mayor recuperación de proteínas y mejor selectividad para el caso de la microalga *Scenedesmus almeriensis* que para la *Chlorella vulgaris*, obteniéndose valores cercanos al 17 % de recuperación y de 0,7 para la selectividad.

Por tanto, se puede concluir que los DES presentan un gran potencial en la extracción de proteínas a partir de biomasa microalgal.

# Abstract

In the coming decades, a notable increase in protein demand is expected due to global population growth. Microalgae have emerged as a promising source of high-quality proteins and other biomolecules of interest. In addition, they can be cultivated in photobioreactors, where they can convert the nutrients present in wastewater into biomass, thus contributing to water purification.

In this study, the use of deep eutectic solvents (DESs), pure and combined with water, has been investigated as an alternative to organic solvents used in protein extraction. Firstly, the DESs and DES+water mixtures were prepared and characterized. Then, a full factorial design was conducted to study the influence of the amount of water added (seven levels) and the type of solvent (three levels) on the extraction of proteins, carbohydrates, and their ratio, from the microalga *Scenedesmus almeriensis*. Analysis of the results by ANOVA showed that the combination of 20 g of added water to the (1:9) biomass:solvent mixture with the DES ChCl:2Urea, increased the protein recovery yield compared to the other solvents used. Based on the information obtained, a Taguchi L9 experimental design was implemented to study the effect of four factors on protein extraction from two types of algal biomass (*Scenedesmus almeriensis* and *Chlorella vulgaris*): temperature, biomass pretreatment, contact time, and biomass:solvent ratio. Furthermore, several mathematical models were built to predict the optimal value of the response variables. The results showed higher protein recovery and better selectivity for microalgae *Scenedesmus almeriensis* compared to *Chlorella vulgaris*, with recovery values close to 17% and a selectivity of 0,7.

Therefore, with the result obtained, it can be concluded that DESs have great potential in the extraction of proteins from microalgal biomass.

# Índice

1.	Introducción .....	1
1.1	Problema del aumento en la demanda de proteínas.....	1
1.2	Microalgas como fuente de proteínas .....	1
1.3	Recuperación de proteínas.....	3
1.3.1	Métodos convencionales de extracción de proteínas.....	4
1.4	Disolventes con eutéctico profundo (DESS) .....	5
1.4.1	Disolventes con eutéctico profundo (DESS) para la obtención de proteínas.....	7
1.4.2	Mezclas Agua-DES .....	9
2.	Objetivos y plan de trabajo .....	10
3.	Materiales y métodos.....	11
3.1	Reactivos y equipos empleados .....	11
3.2	Microalgas empleadas.....	11
3.3	Preparación de los DESS .....	12
3.4	Caracterización de los DES .....	13
3.5	Procedimiento de extracción de proteínas .....	13
3.5.1	Diseño factorial completo .....	13
3.5.2	Diseño L9 de Taguchi.....	14
3.6	Métodos de análisis de las muestras.....	14
3.6.1	Método del BCA para el análisis de proteínas.....	14
3.6.2	Método del Fenol-Sulfúrico para la determinación de carbohidratos.....	16
3.7	Diseño experimental .....	17
3.7.1	Diseño experimental factorial completo.....	18
3.7.2	Diseño L9 de Taguchi.....	19
4.	Resultado y discusión .....	21
4.1	Caracterización de los DES .....	21
4.2	Diseño factorial completo .....	25
4.2.1	Resultados del diseño.....	25
4.3	Diseño L9 de Taguchi.....	28
4.3.1	Resultados del diseño.....	28
4.3.2	Comprobación experimental de los modelos .....	34
5.	Conclusiones.....	36
	Bibliografía .....	37
	Anexo .....	41

# 1. Introducción

## 1.1 Problema del aumento en la demanda de proteínas

Las proteínas son uno de los tres macronutrientes esenciales, junto con los carbohidratos y los lípidos. Éstos son indispensables para el crecimiento y el mantenimiento del organismo, y son el principal componente estructural de las células. Además, las proteínas llevan a cabo una gran variedad de funciones en el organismo, como el papel catalítico de las enzimas, funciones de transporte y almacenamiento, donde son necesarias las proteínas como la hemoglobina, la mioglobina y los citocromos. También, pueden tener funciones mecánicas, en las que intervienen la elastina y el colágeno, y tareas de protección, donde son indispensables los anticuerpos [1], [2].

Las proteínas están compuestas por diferentes aminoácidos, los cuales se clasifican en función de su capacidad para ser sintetizados por el organismo. Cada especie animal tiene aminoácidos que son esenciales para su metabolismo y que solo pueden obtenerse a través de la alimentación. Estos aminoácidos se denominan aminoácidos esenciales. Para los lípidos y carbohidratos no existe una cantidad mínima diaria recomendada. Sin embargo, en el caso de las proteínas, se establece una ingesta diaria recomendada que oscila entre de 0,8 a 1,25 g/kg de masa corporal [3].

Según las Naciones Unidas, la población mundial en 2050 se incrementará hasta las 9700 millones de personas [4]. En consecuencia, la demanda de alimentos, y por lo tanto de proteínas, también aumentará [5]. Las proteínas son una parte importante de nuestra dieta, proviniendo principalmente de fuentes animales (como la carne, huevo, pescado y productos lácteos), y en menor medida de fuentes vegetales (como las legumbres) [2]. La demanda de alimentos, en particular de carne, aumentará en un 73 % hasta los 455 millones de toneladas [6]. Así pues, es necesario satisfacer una demanda tan alta requiere prácticas intensivas, como la ganadería intensiva, que tiene un alto impacto medioambiental, incluyendo la contaminación del suelo y agua, y las emisiones de gases de efecto invernadero [7]. Por tanto, es necesario encontrar fuentes alternativas de proteínas y procesos de producción sostenibles para cumplir con las futuras demandas de proteínas [8].

## 1.2 Microalgas como fuente de proteínas

Una alternativa prometedora pueden ser las algas y microalgas, ya que se consideran una fuente viable de proteínas de origen vegetal. Las algas se subdividen en “macroalgas” y “microalgas”. Las algas macrófitas se denominan macroalgas mientras que las formas unicelulares se denominan microalgas [9].

El uso de algas para la producción de proteínas presenta varios beneficios en comparación con los cultivos tradicionales en términos de productividad y valor nutricional. Por ejemplo, algunas algas marinas y microalgas tienen un mayor rendimiento proteico por unidad de superficie en comparación con cultivos terrestres como la soja, las leguminosas y el trigo. Además, no requieren de agua dulce para crecer [8], [10].

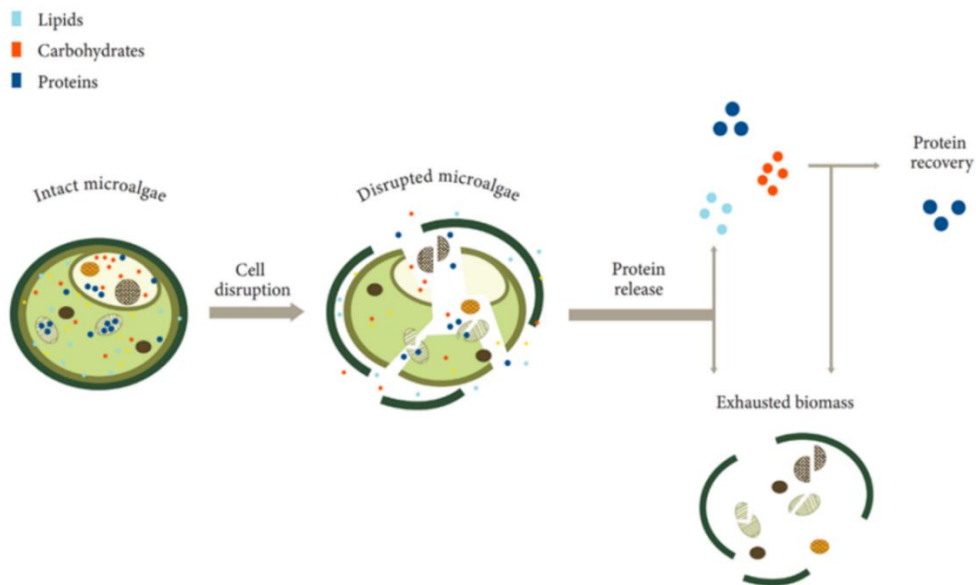
Las microalgas son microorganismos fotosintéticos unicelulares, es decir, producen biomasa a partir de sustancias inorgánicas y elementos minerales completamente oxidados debido a la energía luminosa convertida durante la fotosíntesis [11]. Las microalgas son un importante mecanismo natural para reducir el exceso de dióxido de carbono atmosférico gracias a la fotosíntesis, lo que ayudaría a disminuir el efecto invernadero, reducir el calentamiento global y mitigar los cambios climáticos [12]. Otra ventaja es que los cultivos de microalgas requieren relativamente poca agua y pueden crecer en tierras no aptas para el cultivo agrícola [13].

Por otro lado, las microalgas pueden ser utilizadas en combinación con fotobiorreactores para el tratamiento de aguas residuales, lo que se conoce como fitorremediación. Las aguas residuales están contaminadas con altas cantidades de compuestos nitrogenados, fósforo y otros elementos traza que las microalgas utilizan para crecer y desarrollarse, lo que las convierte en un agente de fitorremediación eficiente para eliminar los contaminantes de las aguas residuales [14]. Además, los bioprocesos impulsados por microalgas son prometedores debido a que no requieren de energía adicional para eliminar los contaminantes de manera efectiva. De esta manera, se puede fijar el nitrógeno y el fósforo de las aguas residuales en un solo proceso, convirtiendo estos nutrientes en biomasa, a diferencia de los enfoques convencionales de las plantas de tratamiento de aguas residuales [15].

Se ha demostrado que algunas especies de algas marinas y microalgas contienen niveles de proteínas similares a las fuentes tradicionales de proteínas, como la carne, el huevo, la soja y la leche. A pesar de que el contenido total de proteínas en la biomasa depende de la especie de microalga, éste suele estar entre el 30 y 70 % de porcentaje de masa en peso seco [16]. La cantidad de proteína acumulada en la microalga depende de varios factores: el tipo de especie, la fase de crecimiento y la calidad de la luz, y puede modificarse controlando el aporte de nutrientes y el estrés ambiental. Nutricionalmente, las microalgas sintetizan aminoácidos esenciales en buena cantidad, por tanto, pueden ser consideradas una fuente de proteína de calidad [9].

### 1.3 Recuperación de proteínas

Uno de los problemas al que nos enfrentamos cuando se trabajan con matrices vegetales para extraer sus biocompuestos, es la pared celular. Ésta es por lo general rígida y gruesa, lo que dificulta la obtención de dichos biocompuestos, que se van acumulando en su interior [17]. La estructura y composición de la pared celular varía según la etapa de crecimiento, forma celular y los factores ambientales. Generalmente, consiste en una red de microfibrillas compuestas de polisacáridos, glicoproteínas y polímeros, los cuales son difíciles de degradar [18]. Es por ello por lo que tradicionalmente, primero se lleva a cabo un paso de ruptura celular mediante el cual se liberan los compuestos de interés del interior de la célula. Seguidamente, se produce la recuperación selectiva de los biocompuestos (proteínas, carbohidratos, lípidos, etc.) y finalmente se purifica el compuesto de interés. En la Figura 1 se muestra un esquema de dicho proceso.



**Figura 1.** Esquema de obtención de proteínas a partir de biomasa algal [16].

Los métodos utilizados en la ruptura celular de microalgas incluyen técnicas físicas, químicas o enzimáticas, que se utilizan para romper o desintegrar la pared celular y liberar las biomoléculas contenidas en el interior. Para extraer proteínas, carbohidratos y lípidos, se suele emplear un disolvente de extracción cuya composición depende del método de ruptura celular y las condiciones de extracción. Por último, es necesario realizar un paso de separación selectiva de las proteínas de los demás compuestos liberados, esta separación debe permitir recuperar la máxima cantidad posible de proteínas sin que ello conlleve una pérdida de la funcionalidad de las biomoléculas extraídas [19], [20].



### 1.3.1 Métodos convencionales de extracción de proteínas

En este apartado, se describen brevemente las técnicas de separación convencionales más utilizadas para la recuperación selectiva de proteínas, entre las cuales destacan: la precipitación, la separación por membranas, la cromatografía, la extracción con disolventes y la electroforesis [21]. En la Tabla 1 se comentan brevemente las principales características de cada una de las técnicas utilizadas convencionalmente:

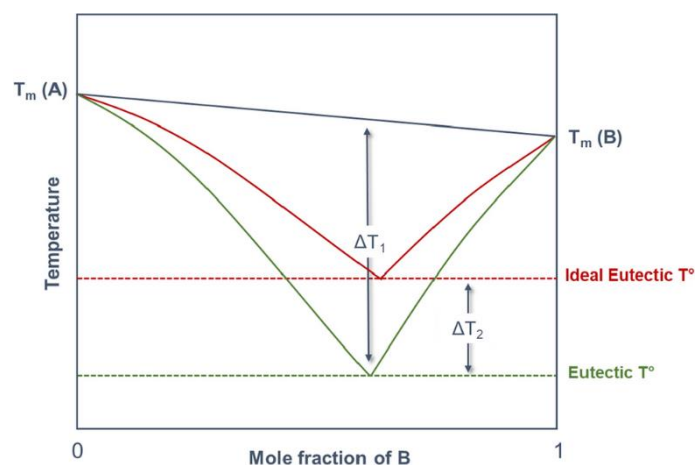
**Tabla 1.** Características de los métodos clásicos de extracción de proteínas.

Métodos de extracción	Características	Tipos	Referencias
<b>Precipitación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Baja eficiencia de recuperación en las etapas posteriores de purificación.</li> <li>- Puede realizarse utilizando diferentes tipos de disolventes, lo que permite una gran flexibilidad en el proceso.</li> </ul>	Precipitación por punto isoeléctrico Salting-out Precipitación con disolvente orgánico	[19], [22]
<b>Separación por membranas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La membrana es fácil de ensuciar, lo que da como resultado un mayor tiempo de análisis y poca selectividad.</li> <li>- No requiere del uso de aditivos</li> <li>- Se puede realizar a bajas temperaturas con un menor consumo energético y evitando la degradación de la proteína.</li> </ul>	Diálisis Microfiltración (MF) Ultrafiltración (UF)	[23], [24]
<b>Técnicas cromatográficas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La separación y purificación de proteínas suelen incluir uno o más pasos cromatográficos.</li> <li>- Es una técnica costosa.</li> <li>- No destruyen la estructura de la proteína.</li> </ul>	Cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en gel, cromatografía de afinidad ...	[19], [21]
<b>Extracción con solventes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Usa grandes cantidades de disolventes orgánicos que pueden ser tóxicos para la salud humana y el medio ambiente.</li> <li>- Alto consumo de energía y tiempo del proceso.</li> <li>- En condiciones severas puede resultar en la degradación de las proteínas.</li> </ul>	Extracción alcalina, acetona, alcoholes...	[25]
<b>Electroforesis</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Separa las proteínas en función de su tamaño y carga.</li> <li>- Limitación en el tamaño de muestra.</li> <li>- Proceso lento.</li> <li>- Se puede automatizar.</li> </ul>	Electroforesis capilar	[26]

## 1.4 Disolventes con eutéctico profundo (DESs)

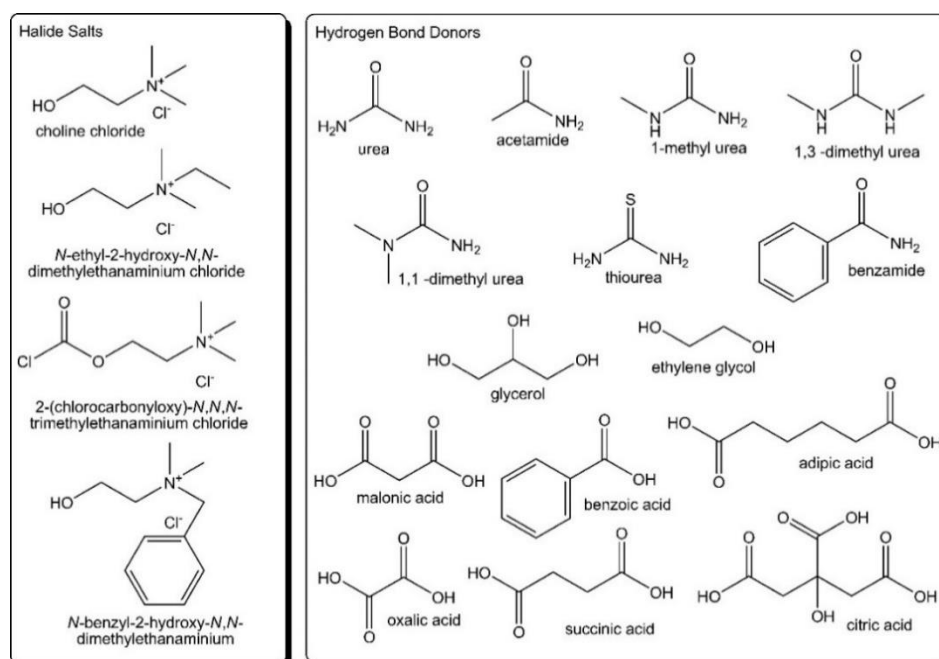
Aunque los métodos de extracción convencionales son efectivos en la industria, suelen implicar altas temperaturas y el uso de disolventes en grandes cantidades, los cuales se caracterizan por su alta volatilidad, inflamabilidad y toxicidad. Esto no es adecuado si nuestro objetivo es minimizar el impacto ambiental del proceso y preservar la integridad de las proteínas extraídas [27]. En los últimos años, se ha intensificado la búsqueda de disolventes más sostenibles.

En 2003, Abbot et al. [28] describieron un nuevo tipo de disolvente conocido como “disolventes con eutéctico profundo” (*Deep Eutectic Solvents*, DESs). Estos disolventes se han descrito como una alternativa a los disolventes orgánicos convencionales y a los líquidos iónicos (*Ionic Liquids*, IL). De hecho, DES e IL comparten muchas propiedades, como baja volatilidad, se mantienen en estado líquido en un amplio rango de temperaturas, alta estabilidad química y térmica. En comparación con los IL convencionales, los DES son fáciles de obtener, más económicos y suelen estar formados por compuestos no tóxicos y biodegradables, lo que les brinda ventajas adicionales sobre los IL tradicionales [29]. Los IL son compuestos formados por la combinación de iones asimétricos y de gran tamaño. Debido a las interacciones entre los cationes y los aniones, estos compuestos se mantienen líquidos en un amplio rango de temperatura. Por otro lado, la mayoría de los DES se obtienen combinando dos o más compuestos capaces de formar una mezcla eutéctica a través de enlaces de hidrógeno en una proporción molar adecuada. Los DES están formados por uno o más donantes de enlaces de hidrógeno (*Hydrogen Bond Donor*, HBD) y uno o más aceptores de enlaces de hidrógeno (*Hydrogen Bond Acceptor*, HBA) [31]. Las interacciones entre los HBD y los HBA disminuyen la energía reticular del sistema, lo que provoca una depresión del punto de fusión (de ahí el adjetivo “Deep” o profundo) inferior a los valores de los componentes individuales, siendo por tanto líquidos a temperatura ambiente. La depresión de temperatura del punto eutéctico debe definirse como la diferencia entre el punto eutéctico ideal y el real ( $\Delta T_2$ ) (Figura 2) [32], [33]. Las propiedades de los DES se pueden adaptar para aplicaciones particulares eligiendo diferentes combinaciones de HBA y HBD, cada una en una relación molar específica.



**Figura 2.** Diagrama de fase sólido-líquido que representa una mezcla eutéctica ideal simple (línea roja) y una mezcla eutéctica profunda (línea verde) [33].

Como se ha mencionado anteriormente, los DES generalmente están formados por la combinación de diferentes HBA y HBD, en la Figura 3 se muestran los HBAs y HBDs más habituales en la preparación de DES.



**Figura 3.** Estructura de algunos HBAs y HBDs más habituales en la preparación de DES [34].

Dependiendo de la naturaleza de sus componentes de partida, los DESs se clasifican en cinco tipos o grupos (Tabla 2). La fórmula general de un DES es  $Cat^+ X^- \cdot zY$ , donde  $Cat^+$  representa principalmente cualquier catión de amonio, fosfonio o sulfonio, y  $X^-$  es una base de Lewis, generalmente un anión haluro. Y significa ácido de Lewis o de Brønsted y  $z$  se refiere al número de moléculas que interactúan con el correspondiente anión [34], [35].

**Tabla 2.** Clasificación general de los DES (HBA: aceptor de enlaces de hidrógeno; HBD: dador de enlaces de hidrógeno) [34], [36]

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

La mayor parte de las investigaciones se han centrado en los DES de tipo III, que se componen principalmente de una sal de amonio cuaternaria como HBA (generalmente cloruro de colina) y como HBD que suele ser un componente molecular orgánico como una amida, ácido carboxílico o alcohol [36]. Estos compuestos son fáciles de preparar, y el método más común consiste en calentar y mezclar los componentes formadores del DES bajo una atmósfera inerte hasta que se forma un líquido homogéneo [29]. Los DES de tipo III muestran fuertes interacciones de enlaces de hidrógeno, lo que afecta directamente a sus propiedades fisicoquímicas.

Cuando se utilizan componentes de origen natural para preparar los DES, se les llama disolventes con eutéctico profundo naturales (*Natural Deep Eutectic Solvents*, NADES). Los NADES son mezclas de ciertas proporciones molares de compuestos naturales, como azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos y bases orgánicas, que se encuentran en los organismos [37]. Los NADES son altamente biocompatibles, ya que casi todos los organismos vivos pueden biosintetizarlos y metabolizarlos. Estos disolventes presentan varias ventajas, como una síntesis fácil, propiedades fisicoquímicas ajustables, baja toxicidad, alta biodegradabilidad y bajo punto de fusión [38]. En este trabajo en el que se estudia la aplicación de dos NADES como agentes de extracción de proteínas de biomasa algal, siempre se usará el acrónimo DES por simplicidad.

Como se ha mencionado anteriormente, los DES y los IL comparten muchas propiedades, que se pueden ajustar seleccionando la naturaleza y la proporción de los constituyentes. Ambos tipos de disolventes suelen recibir el nombre de “disolventes de diseño” debido a que sus propiedades físico-químicas pueden ser modificadas o adaptadas para cumplir con requisitos específicos en una aplicación determinada [39]. Los IL se pueden adaptar combinando diferentes aniones y cationes, mientras que los DES se pueden ajustar mediante la selección de sus compuestos formadores y modificando su relación molar en la mezcla.

Desde una perspectiva ambiental, los DES son más sostenibles que los IL convencionales debido a su mayor biodegradabilidad y menor toxicidad. El origen natural de los componentes otorga a los DES una gran ventaja sobre los IL, ya que son claramente menos tóxicos y más respetuosos con el medio ambiente. Los DES se han utilizado principalmente en síntesis orgánica, catálisis, electroquímica, preparación de materiales y ciencias analíticas y de separación [40].

#### **1.4.1 Disolventes con eutéctico profundo (DESs) para la obtención de proteínas**

Existen numerosos estudios que respaldan la eficacia de los DES en la extracción de proteínas, tanto de origen animal como vegetal. Dichas investigaciones han demostrado que los DES son capaces de obtener un buen rendimiento en la extracción de proteínas y, por tanto, pueden ser una alternativa sostenible a los métodos de extracción convencionales [35], [41].

Por ejemplo, Chen et al. mezclaron cloruro de colina con glicerol para la extracción de proteínas de soja. Observaron que la extracción de proteínas con DES mostró un rendimiento superior al 10 % al del método convencional de precipitación a base de ácido. Además, la proteína extraída mediante DES mostró una mejor resistencia al calor y una mejor hidrofobicidad, lo que sugiere que los DES pueden mejorar las propiedades físicas de la proteína que solubilizan [42]. Lien et al. extrajeron proteínas de brotes de bambú usando un DES basado en cloruro de colina y ácido levulínico, observando que el rendimiento de extracción de proteínas fue más alto utilizando el DES que el método de extracción convencional que utiliza una solución de hidróxido de sodio [43]. En otro estudio, Lin et al. extrajeron la proteína de la harina de semilla de espinillo amarillo (SSM) utilizando tres DES diferentes (cloruro de colina-ácido oxálico, cloruro de colina-glicerol y cloruro de colina-urea), y se comparó con la extracción alcalina. Este estudio demostró que los DES podrían extraer eficazmente proteínas de la harina de semilla de espinillo amarillo y mantener la calidad de las proteínas extraídas en comparación con los métodos convencionales [44].

A lo largo de diversos estudios, se ha demostrado que la extracción basada en DES se puede combinar con técnicas como la ultrasonificación para mejorar la extracción de proteínas. Hernández-Corroto et al. utilizaron un DES altamente polar e hidrofílico formado por cloruro de colina, ácido acético y agua con una relación molar 1:1:10 para la extracción de proteínas de cáscara de granada, combinado con un método de ultrasonido enfocado de alta intensidad (HIFU). Este método produjo una eficacia de extracción mejor que el método convencional y además, los extractos obtenidos e hidrolizados tuvieron una mayor bioactividad que la observada cuando se usaba un método convencional [45]. En otro estudio, Liu et al. desarrollaron un método para extraer proteínas de semillas de calabaza con DES, es un método de extracción sólido-líquido asistido por microondas con ultrasonidos. Se utilizó el cloruro de colina-PEG 200 en proporción molar 1:3, lo que resultó en una eficiencia de extracción del 93,95 % [46].

Los DES se han utilizado principalmente para extraer proteínas de origen vegetal, el número de estudios sobre la extracción de proteínas de origen animal es relativamente limitado. Wang et al. desarrollaron un método para extraer la queratina del pelo de conejo mediante un DES basado en cloruro de colina y oxalato (1:2). La queratina obtenida al disolverse el pelo de conejo en DES a 120 °C se convirtió en polvo escamoso y tenía una estructura suelta, haciendo que la queratina regenerada fuera versátil en varios campos [47]. Por lo tanto, con los ejemplos mostrados se puede decir que la extracción de proteínas utilizando DES como agentes de separación es una técnica prometedora y sostenible.

### 1.4.2 Mezclas DES+agua

Como se mencionó anteriormente, los DES se caracterizan por la formación de una estructura de enlaces de hidrógeno, lo cual resulta en un punto eutéctico inesperadamente bajo. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la integridad de los DES puede verse afectada por la presencia de agua. El agua representa una de las pocas sustancias naturales que puede actuar tanto como donante como aceptor de enlaces de hidrógeno debido a su alta polaridad, por lo tanto, es probable que interactúe fuertemente con los componentes del DES alterando su estructura y comportamiento [48].

Hammond et al. caracterizaron las interacciones DES-agua. En su estudio, analizaron el efecto del agua en la nanoestructura de cloruro de colina-urea a través de la dispersión total de neutrones y el refinamiento de la estructura potencial empírica. Para ello, se prepararon mezclas de cloruro de colina-urea-agua en diferentes relaciones molares. Los resultados revelaron que a niveles bajos de agua ( $\leq 1$  fracción molar), el agua fortalece ligeramente los enlaces de hidrógeno entre la colina y la urea. Sin embargo, cuando el contenido en agua es  $\geq 51$  % (m/m), las interacciones DES-agua y agua-agua dominan sobre las interacciones DES-DES. En este caso, la estructura del DES desaparecía y el sistema se describía como una disolución acuosa del DES [49]. Esta disolución acuosa produce cambios en las propiedades de los DES. Por ejemplo, la adición de agua disminuye la viscosidad debido al debilitamiento de los enlaces de hidrógeno, lo que favorece la difusión por transferencia de materia y mejora el manejo del disolvente. Por otro lado, la conductividad aumenta debido a la promoción de la disociación iónica de los componentes del DES [50].

En este trabajo, se ha estudiado la extracción de proteínas de biomasa algal tanto con DES puros como con mezclas DES-agua, para evaluar el uso de los DES puros como agentes de extracción o si la presencia de agua favorece la extracción de proteínas, y también para comprobar si a concentraciones altas de agua la mezcla DES-agua se comporta como si fuera agua o muestra propiedades asociadas a los componentes del DES. Por último, con los datos óptimos obtenidos de este primer estudio, se analizó el efecto de distintos parámetros experimentales en la extracción de proteínas para determinar las condiciones óptimas del proceso.

## 2. Objetivos y plan de trabajo

Este Trabajo de Fin de Grado forma parte de un proyecto de investigación cuyo objetivo general es la utilización de la biomasa crecida en agua residuales urbanas y ganaderas, tanto en biorreactores como reactores aerobios tradicionales, y la posterior valorización de la biomasa algal obtenida para extraer compuestos de alto valor añadido, como proteínas y carbohidratos, utilizando técnicas de separación económicas y respetuosas con el medio ambiente.

En particular, el objetivo general de este trabajo es la extracción de proteínas a partir de biomasa algal, minimizando la coextracción de carbohidratos, utilizando disolventes con eutéctico profundo biodegradables.

Los objetivos específicos planteados para alcanzar este objetivo general son los siguientes:

- Preparar y caracterizar dos disolventes con eutéctico profundo (DES) formados a partir de productos naturales.
- Aplicar los DES en la extracción de proteínas a partir de biomasa microalgal. Se elaboró un diseño experimental completo de dos factores para evaluar el uso de los DES puros como agentes de extracción o la necesidad de usar mezclas DES+agua en la recuperación de proteínas. Para ello, se diseñó un procedimiento analítico y un tratamiento de muestra, además, de un análisis cuantitativo para determinar la eficiencia de la extracción de proteínas y coextracción de carbohidratos.
- Una vez elegido el disolvente y la cantidad de agua añadida a partir de los resultados obtenidos en el objetivo anterior, estudiar mediante un diseño experimental adecuado, el efecto de cuatro factores que pueden influir en el proceso analítico. Los factores a estudiar son: el pretratamiento de la biomasa, la temperatura de extracción, el tiempo de contacto, y la ratio biomasa:disolvente. Para ello, se evaluará las siguientes variables de respuesta: la extracción de proteínas, la de carbohidratos y la ratio de las dos anteriores.
- Ver en qué condiciones experimentales se maximiza la extracción de proteínas al tiempo que se minimiza la coextracción de carbohidratos.
- Obtener modelos teóricos que permitan estimar la extracción de proteínas y carbohidratos.

## 3. Materiales y métodos

### 3.1 Reactivos y equipos empleados

#### Reactivos:

- Cloruro de colina (ChCl), pureza  $\geq 98$  %.
- Urea, pureza  $\geq 99$  %.
- Glicerol (Gly), pureza  $\geq 99,5$  %.
- Kit de ensayo de proteínas Pierce™ BCA Protein Assay Kit.
- Ácido sulfúrico concentrado 96-98 %.
- Fenol, pureza  $\geq 99$  %.
- D(+)-Glucosa anhidra, pureza  $\geq 98$  %.

#### Equipos:

- Incubador con agitación orbital (Optic Ivymen System).
- Molino de discos Retsch.
- Balanza analítica Entris 220 g  $\pm$  0,1 mg.
- Espectrofotómetro UV/Vis Spectronic Genesys 5.
- Valorador Culombimétrico automático Mettler Toledo C20 KF.
- Densímetro-viscosímetro Anton Paar SVM 3000 Stabinger.
- Espectrofotómetro de Infrarrojo Bruke Tensor 27 FTIR.
- Agitador Vortex.

### 3.2 Microalgas empleadas

En este trabajo se han utilizado dos tipos de biomasa algal diferentes. La primera biomasa fue proporcionada por la Fundación Cajamar (Universidad de Almería) y está formada por un consorcio de microalgas *Scenedesmus almeriensis* y bacterias, cultivadas en aguas residuales de purín de cerdo. La segunda biomasa fue la microalga pura *Chlorella vulgaris*, obtenida de Allmicroalgae Natural Products S.A. Ambas microalgas se centrifugaron, liofilizaron y almacenaron a  $T \leq 25$  °C hasta su uso posterior para evitar su degradación.

Para alcanzar el objetivo de este trabajo, que consiste en determinar el porcentaje de extracción de proteínas y su relación con los carbohidratos coextraídos, es necesario conocer la cantidad inicial de éstos en las biomásas empleadas. Por tanto, la microalga *Scenedesmus* fue completamente caracterizada por diversos métodos analíticos. Las proteínas se determinaron por el método Kjeldahl, que es un método volumétrico que permite medir diferentes tipos de nitrógenos presentes en la muestra. Los carbohidratos se analizaron mediante una hidrólisis de la biomasa. Los lípidos se determinaron mediante el método de extracción Soxhlet, utilizando hexano



como disolvente. Los dos componentes restantes de la microalga son la humedad (cantidad de agua de la muestra) y las cenizas o fracción mineral, se determinan por gravimetría.

En el caso de la microalga *Chlorella* se tomaron los valores suministrados por el proveedor (haciendo las comprobaciones pertinentes de cada tipo de compuesto). En la Tabla 3 se muestran las composiciones químicas de los dos tipos de biomásas usadas.

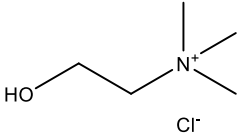
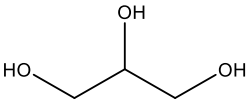
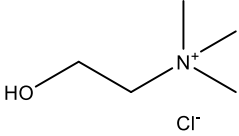
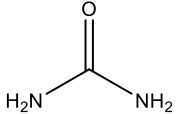
**Tabla 3.** Composición química de las biomásas de microalga utilizadas (en porcentaje en peso).

	<i>Scenedesmus almeriensis</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>
<b>Proteínas / %</b>	44,5	55,3
<b>Carbohidratos / %</b>	20,4	22,1
<b>Lípidos / %</b>	11,9	8,7
<b>Cenizas / %</b>	15,1	10,5
<b>Humedad / %</b>	5,6	3,5

### 3.3 Preparación de los DESs

En este trabajo, se prepararon dos DES utilizando cloruro de colina (ChCl) como aceptor de enlaces de hidrógenos (HBA), y glicerol (Gly) y urea como donador de enlaces de hidrógeno (HBD), ambos se prepararon en relación molar 1:2. En la Tabla 4 se muestra la estructura de los HBA y HBD, su relación molar, junto con la abreviatura que se empleará en este trabajo.

**Tabla 4.** Estructura de los HBA y HBD, y relación molar entre ellos.

Abreviatura	HBA	Relación molar	HBD
<b>ChCl:2Gly</b>	 Cloruro de colina	1:2	 glicerol
<b>ChCl:2Urea</b>	 Cloruro de colina	1:2	 urea

Para preparar los DES, se pesaron las cantidades necesarias de cada compuesto (HBA y HBD) en un Erlenmeyer. Se cubrió la boca con papel de aluminio y se llevó a un incubador con agitación orbital a 60 °C durante 2 horas, hasta conseguir una mezcla homogénea y formar el DES. Una vez formado un líquido transparente e incoloro sin la presencia de partículas sólidas, la mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente.

### **3.4 Caracterización de los DES**

Para verificar la formación de los DES es necesario caracterizarlos. Para ello, se utilizó la técnica de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier de reflexión total atenuada (ATR-FTIR) con un equipo espectrofotómetro Bruke Tensor 27 FTIR. Se realizó el espectro de IR de los compuestos puros, los DES y las mezclas DES+agua, estos últimos se realizaron para ver cómo afecta la adición de agua a la estructura del DES.

También, se midió el contenido de agua de cada DES mediante el método Karl-Fischer, que se basa en una reacción química de dos pasos entre el yodo y el dióxido de azufre. Dado que el agua y el yodo se consumen en una proporción de 1:1, se puede determinar la cantidad de agua de la muestra a través de la corriente eléctrica producida [51]. Para ello, se usó un valorador coulombimétrico automático Mettler Toledo C20 KF.

Además, se determinaron experimentalmente la densidad y la viscosidad de los dos DES puros a diferentes temperaturas para estudiar su comportamiento con la variación de la temperatura, empleando un densímetro-viscosímetro Anton Paar SVM 3000 Stabinger.

### **3.5 Procedimiento de extracción de proteínas**

La recuperación de proteínas se realizó mediante la técnica de separación extracción sólido-líquido. En primer lugar, se describirá cómo se llevó a cabo el diseño factorial completo. Posteriormente, se explicarán las diferencias con el diseño L9 de Taguchi.

#### **3.5.1 Diseño factorial completo**

El procedimiento experimental fue el siguiente:

- 1) Se pesa aproximadamente 0,5 g de biomasa algal liofilizada en un Erlenmeyer y se añade el disolvente correspondiente en la ratio en masa biomasa:disolvente de 1:9.
- 2) A continuación, se añade la cantidad de agua desionizada correspondiente a la mezcla de acuerdo con los niveles del diseño.

- 3) Se tapa la boca del Erlenmeyer con papel de aluminio y se lleva al incubador con agitación (500 rpm) durante 1 hora a 25°C.
- 4) Pasado el tiempo, se retiran los Erlenmeyers del incubador y se procede a centrifugar. Se transfiere su contenido a tubos Falcon, enjuagando los Erlenmeyers con diferentes volúmenes de agua desionizada para minimizar pérdidas de masa.
- 5) Centrifugar durante 5 min a 5000 rpm.
- 6) Transferir con cuidado el sobrenadante a un matraz aforado de 100,00 mL.
- 7) Enjuagar con diferentes volúmenes de agua desionizada y enrasar los matraces aforados con cuidado, para evitar la formación de espumas.
- 8) Por último, filtrar unos 25 mL de muestra con un filtro de Nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  a un tubo Falcon limpio y seco. Las muestras una vez filtradas se guardan en el frigorífico a 4 °C para su posterior análisis en un plazo de tiempo menor de 2 semanas, para evitar su degradación y proliferación de microorganismos.

### **3.5.2 Diseño L9 de Taguchi**

El procedimiento experimental seguido es el mismo que en el apartado anterior. Las únicas diferencias están en qué: i) se estudiaron diferentes parámetros experimentales: ratio biomasa:disolvente, tiempo de contacto, pretratamiento de la biomasa y temperatura empleada, para estudiar su influencia en los resultados de la extracción y ii) se utilizaron dos tipos de microalga.

## **3.6 Métodos de análisis de las muestras**

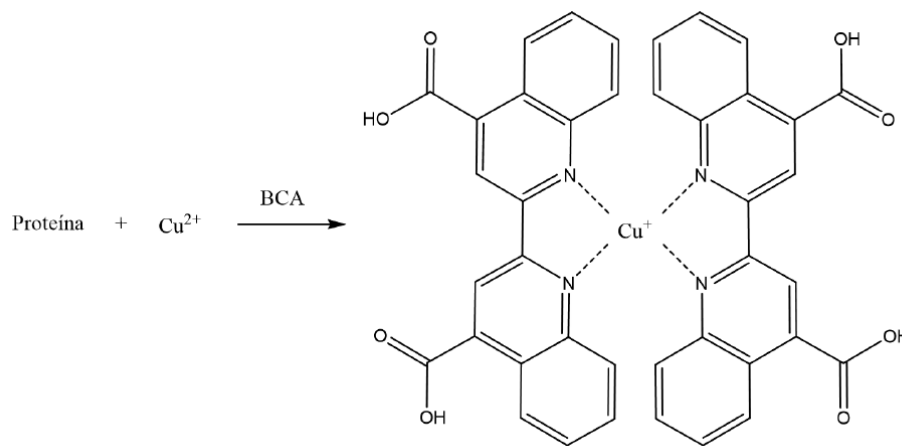
Una vez obtenidas las muestras líquidas tras el proceso de extracción, se determinó su contenido en proteínas y carbohidratos aplicando diversos métodos espectrofotométricos.

### **3.6.1 Método del BCA para el análisis de las proteínas**

El ácido bicinconínico (BCA) es ampliamente utilizado para llevar a cabo la determinación de concentración de proteínas. Esto se debe a sus cualidades que lo hacen idóneo para esta tarea debido a su facilidad de uso, su alta sensibilidad y su tolerancia frente a interferentes [52].

Se trata de un método colorimétrico basado en dos reacciones. Este método combina la reducción de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{+}$  por los enlaces peptídicos de las proteínas en medio alcalino, conocido como la reacción de Biuret. La segunda reacción consiste en la quelación del ion cuproso ( $\text{Cu}^{+}$ ) con dos

moléculas de BCA, lo que da lugar a la formación de un complejo de color morado en disolución (Figura 4), que presenta el máximo de absorbancia a  $\lambda = 562 \text{ nm}$  [53].



**Figura 4.** Reacción de formación del complejo coloreado de Cu(I).

La concentración de proteínas de la disolución se determinó construyendo una curva de calibrado a partir de una disolución patrón de proteína (albúmina de suero bovino, BSA), e interpolando.

Se ha utilizado el Kit de ensayo de proteínas Pierce™ BCA Protein Assay, y el procedimiento es el siguiente:

- 1) Se prepara un reactivo de trabajo formado por una mezcla de las disoluciones A y B (en proporción 50:1). La disolución A, es una mezcla de compuestos que garantiza un medio con un pH y fuerza iónica controlados; la disolución B, es una disolución de sulfato de cobre.
- 2) En tubos Eppendorf, se toman 60,0  $\mu\text{L}$  de la muestra a analizar, y se añaden 1,2 mL de dicho reactivo (hay que tener en cuenta que los volúmenes de A y B no son aditivos al estimar la cantidad necesaria).
- 3) Se mezcla con la ayuda de un agitador vórtex y se calienta en un incubador a 37 °C durante 30 min.
- 4) Por último, se deja enfriar los tubos a temperatura ambiente, y se mide la absorbancia de cada muestra a  $\lambda = 562 \text{ nm}$  en cubetas de plástico 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. Es un método colorimétrico rápido y sencillo, capaz de detectar prácticamente todas las clases de carbohidratos: mono-, di-, oligo- y polisacáridos. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la absorbancia varía según el tipo de carbohidrato. Por lo tanto, los resultados se expresarán en función de un único carbohidrato, en este trabajo se ha usado la glucosa.

Se utiliza ácido sulfúrico para descomponer y deshidratar los carbohidratos (polisacáridos, oligosacáridos y disacáridos) hasta convertirlos en monosacáridos y, posteriormente a derivados de furfural. Estos derivados de furfural reaccionarán con el fenol para formar un compuesto de color anaranjado-amarillento que facilita la cuantificación de los carbohidratos a través de la espectrofotometría UV-Vis. El color permanece estable durante varias horas y la precisión del método es de  $\pm 2\%$  en las condiciones adecuadas [54]. Se ha utilizado glucosa para obtener la línea de calibrado, es necesario prepararla semanalmente y verificar su concentración con patrones aislados cada vez que se realice un análisis de muestra. Se mide la absorbancia a  $\lambda = 490\text{ nm}$ . Esta línea contendrá siete puntos, sin contar el blanco, en un intervalo de concentraciones entre 10 y 80 mg/L.

El procedimiento seguido para el análisis de carbohidratos es el siguiente:

- 1) Se añade en un tubo Falcon el volumen de disolución patrón de glucosa indicada, y se completa con agua desionizada hasta los 2,00 mL. Si se está analizando una muestra, se añadirá un volumen comprendido entre 0,10 y 2,00 mL dependiendo de la concentración de carbohidratos de la muestra (el resto será agua desionizada hasta alcanzar los 2,00 mL).
- 2) Después, se añade en cada tubo 50  $\mu\text{L}$  de la disolución de fenol al 80 % (m/m), siempre en campana, y se agita ligeramente.
- 3) A continuación, se añaden 5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado con un dispensador, teniendo cuidado debido a que la reacción es muy exotérmica. Luego, se agita ligeramente para que se mezcle bien y se observa como la disolución cambia de color a naranja claro. Se coloca la gradilla con los Falcon en un baño de agua a temperatura ambiente unos 20-30 min, para que la disolución se atempere.
- 4) Pasado el tiempo, se transfiere el líquido del tubo Falcon a la cubeta de vidrio, asegurándose de que no haya ninguna burbuja. Para eliminarlas se pueden dar golpes suaves, o bien introducir las cubetas en un baño de ultrasonidos unos segundos. Por último, se mide la absorbancia de los patrones y las muestras a  $\lambda = 490\text{ nm}$ .

### 3.7 Diseño experimental

Se realizaron dos diseños experimentales con el fin de encontrar la combinación idónea de factores que maximicen la extracción selectiva de proteínas de la biomasa algal, obteniendo la máxima información del proceso con el mínimo número de experimentos para ahorrar tiempo y recursos.

Mediante la utilización de estos diseños se verá qué factores afectan significativamente a la respuesta del proceso y cómo estos interaccionan entre sí. Para ello, se evalúa cada factor con al menos dos niveles y se realizan réplicas para obtener una estimación de los factores de ruido del proceso, como la variabilidad ambiental, de la materia prima o del equipamiento, entre otros.

Para analizar los resultados del diseño experimental se utilizó el análisis de varianza (ANOVA), que es un test de hipótesis basado en la prueba F de comparación de varianzas. Este análisis se utiliza para determinar si la variación entre los grupos es significativa o simplemente se debe a la pura aleatoriedad, dividiendo la variación total de los datos en dos componentes: la variación entre los grupos y la variación dentro de los grupos [55]. Posteriormente, se lleva a cabo una prueba *post hoc* para determinar qué diferencias entre los niveles de los factores son significativas o no. La prueba LSD compara la diferencia absoluta entre la respuesta media a cada nivel de un factor, con un valor crítico (LSD), que se calcula con la ecuación (1).

$$LSD = t_{crit} \cdot \sqrt{MS_R \cdot \left(\frac{2}{n_j}\right)} \quad (1)$$

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

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

Primero, se realizó un diseño factorial completo para ver como influía la cantidad de agua añadida y el tipo de disolvente en la extracción de proteínas. Una vez, elegido el disolvente y la cantidad de agua añadida, se realizó un diseño L9 de Taguchi para estudiar el efecto de cuatro factores (pretratamiento de la biomasa, temperatura de extracción, tiempo de contacto, y la ratio biomasa:disolvente) en los resultados de la extracción.

### 3.7.1 Diseño experimental factorial completo

Primeramente, se realizó un experimento previo utilizando un diseño factorial completo de dos factores. El objetivo era evaluar, por un lado, el potencial de los DES en la recuperación de proteínas de la biomasa algal, comparándolos con el agua, por otro, si la adición de agua a la mezcla biomasa:disolvente para reducir la viscosidad de los DES utilizados podría mejorar los rendimientos de extracción de proteínas, y por último, encontrar las condiciones óptimas. Los factores utilizados y sus niveles se muestran esquemáticamente en la Tabla 5, junto con el código numérico empleado para facilitar su identificación.

**Tabla 5.** Factores y niveles para el diseño experimental factorial completo.

Factores	Niveles						
	1	2	3	4	5	6	7
Tipo de disolvente	Agua	ChCl:2Gly	ChCl:2Urea	-	-	-	-
Cantidad de agua añadida/ g	0	3	6	10	20	30	45

Respecto al tipo de disolvente, se estudiaron tres niveles: agua y dos tipos de DES diferentes. Ambos tipos de DES tienen en común que su HBA es el cloruro de colina: ChCl:2Gly y ChCl:2Urea. Por otro lado, la cantidad de agua añadida se estudió a siete niveles, utilizando 0, 3, 6, 10, 20, 30 y 45 g de agua.

Se empleó un diseño factorial completo que combina todos los posibles niveles de los factores, resultando 21 experimentos ( $3^1 \cdot 7^1$ ) que se realizaron por duplicado. En el apartado 4.2.1 se mostrarán los resultados, en los que se habrán estudiado las siguientes variables de respuesta: el rendimiento de recuperación de proteína (PRY), el rendimiento de carbohidratos extraídos (CRY) y la relación de proteínas extraídas respecto a los carbohidratos recuperados (PCR). PRY (ecuación 2) y CRY (ecuación 3) se definen como la relación, en porcentaje, entre la masa de proteína o carbohidrato recuperados en el extracto y la masa inicial de proteínas o carbohidratos en la biomasa. La PCR (ecuación 4) se calculó como la relación porcentual entre el PRY y el CRY.

$$\text{PRY} = \frac{m \text{ Proteína extraída}}{m \text{ Proteína inicial}} \cdot 100 \quad (2)$$

$$\text{CRY} = \frac{m \text{ Carbohidratos extraídos}}{m \text{ Carbohidratos inicial}} \cdot 100 \quad (3)$$

$$PCR = \frac{PRY}{CRY} \quad (4)$$

### 3.7.2 Diseño L9 de Taguchi

Una vez elegido el tipo de disolvente y la cantidad de agua más adecuada a partir de los resultados obtenidos en el anterior diseño experimental, se realizó un nuevo diseño experimental para evaluar la extracción de proteínas de la biomasa algal *Scenedesmus*, y la microalga *Chlorella*. Para ello, se seleccionaron cuatro factores que podían afectar en el rendimiento de la extracción de proteínas: pretratamiento de la biomasa, tiempo de contacto, temperatura y ratio biomasa:disolvente. En la Tabla 6, se muestran los factores utilizados y sus niveles junto con el código numérico empleado para facilitar su identificación. Todos los factores se estudiaron a tres niveles.

**Tabla 6.** Factores y niveles para el diseño L9 de Taguchi.

Factores	Niveles		
	1	2	3
Temperatura / °C	20	30	40
Tiempo de contacto / h	0.5	1	2
Ratio biomasa:disolvente / g · g <sup>-1</sup>	1:3	1:6	1:12
Pretratamiento	Nada	Manual	Discos

En cuanto a la temperatura, se escogieron tres niveles diferentes, 20, 30 y 40 °C, para ver si aumentando la temperatura se favorecía el proceso de transferencia de materia, pero sin usar temperaturas demasiado altas ya que las proteínas podrían dañarse. Por otro lado, el tiempo de contacto se consideró el ya estudiado (1 h), un nivel superior (2 h) y uno inferior (30 min), pues si se consiguen los mismos rendimientos a un menor tiempo, se ahorra tanto en energía como en tiempo de operación.

Se estudiaron también tres ratios biomasa:disolvente diferentes, para determinar si es posible obtener resultados satisfactorios utilizando menos cantidad de disolvente. No se probó más allá de la ratio 12:1 porque se requeriría demasiada cantidad de disolvente, y la filosofía es intentar reducir en la medida de lo posible el consumo de reactivos. Por último, en el pretratamiento de la biomasa, los niveles considerados fueron: morterada con un mortero manual durante 4 min (manual),



morterada mediante un molino de discos durante 1 min a 700 rpm (discos) o sin morterar (nada). Con el objetivo de evaluar si la reducción del tamaño de partícula de la biomasa mejora la transferencia de materia.

Si se aplicara un diseño factorial completo para estudiar todos los efectos e interacciones de los factores estudiados, junto con sus réplicas y los dos tipos de biomasa diferentes, se requeriría un número muy elevado de experimentos (81), lo cual no es factible en términos de tiempo, de reactivos, energía que se tendría que consumir. En este caso, se utilizó un diseño ortogonal de Taguchi L9, que permite estudiar los efectos principales de los factores con solo 9 experimentos (más sus réplicas). La desventaja de este diseño es que sólo proporciona información estadística sobre si el efecto de cada factor es significativo o no, sin tener en cuenta las interacciones entre ellos, aunque éstas se pueden estudiar de forma cualitativa atendiendo a los gráficos de medias.

En el apartado 4.3.1 se mostrarán los resultados, en los que se habrán estudiado las siguientes variables de respuestas: el rendimiento de extracción de proteínas, el rendimiento de carbohidratos extraídos, y la relación de proteínas extraídas frente a los carbohidratos recuperados definidas en el diseño anterior (Ecuaciones 2, 3, 4).

## 4. Resultado y discusión

### 4.1 Caracterización de los DES

En las Figuras 5 y 6 se muestran los espectros de infrarrojo de cada uno de los DES preparados (ChCl:2Gly y ChCl:2Urea, respectivamente) y los espectros de sus correspondientes compuestos de partida. En las dos figuras, el espectro del ChCl puro se muestra en rojo, el del HBD correspondiente (Gly o Urea) en azul y el espectro del DES formado en verde. La transmitancia se expresa en tanto por uno.

En los espectros de infrarrojo, nos interesa verificar la presencia de los enlaces de hidrógeno entre los compuestos de partida lo cual es indicativo de la formación de los DES. Para ello, debemos observar la región entre  $3000 - 3500 \text{ cm}^{-1}$ , y buscar una banda relativamente ancha e intensa. En los espectros de ChCl:2Gly y ChCl:2Urea se puede apreciar la presencia de esta banda. En el caso de ChCl:2Urea, se puede observar que la banda es menos intensa en comparación con el caso del ChCl:2Gly. Esto puede deberse a la presencia de enlaces de hidrógeno  $\text{N} - \text{H} \cdots \text{N}$ , dado que estos enlaces son menos fuertes que los enlaces del grupo O-H.

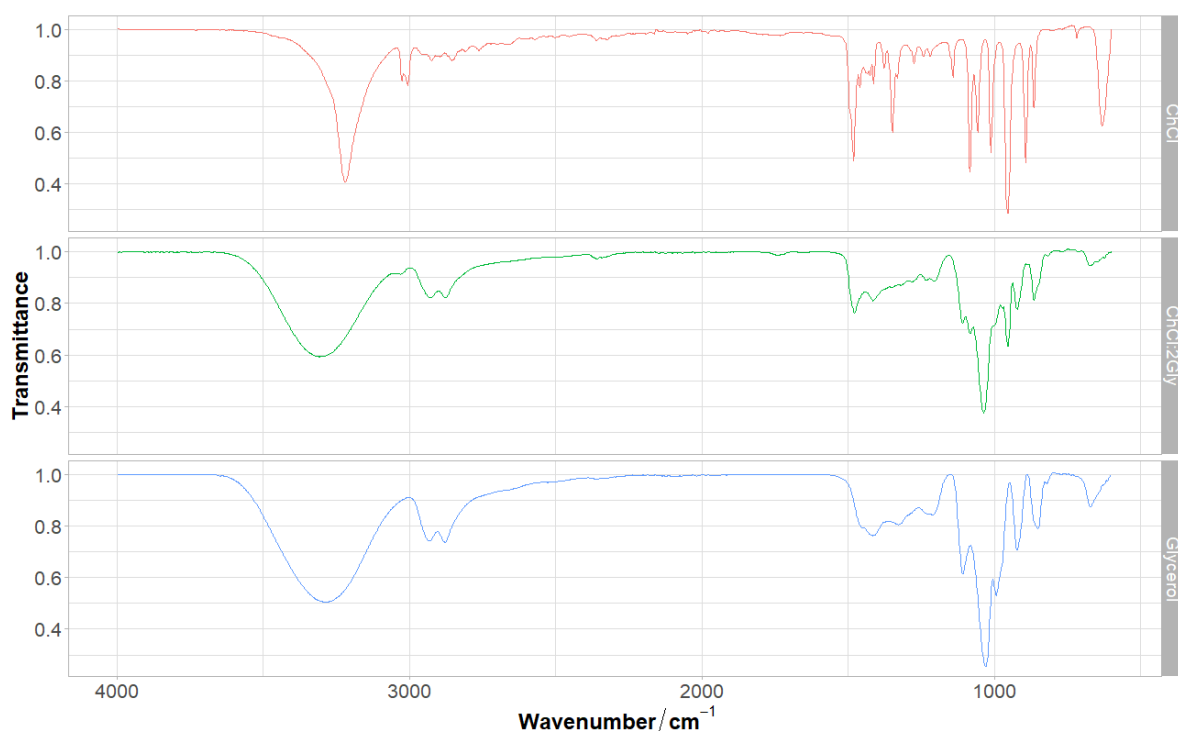
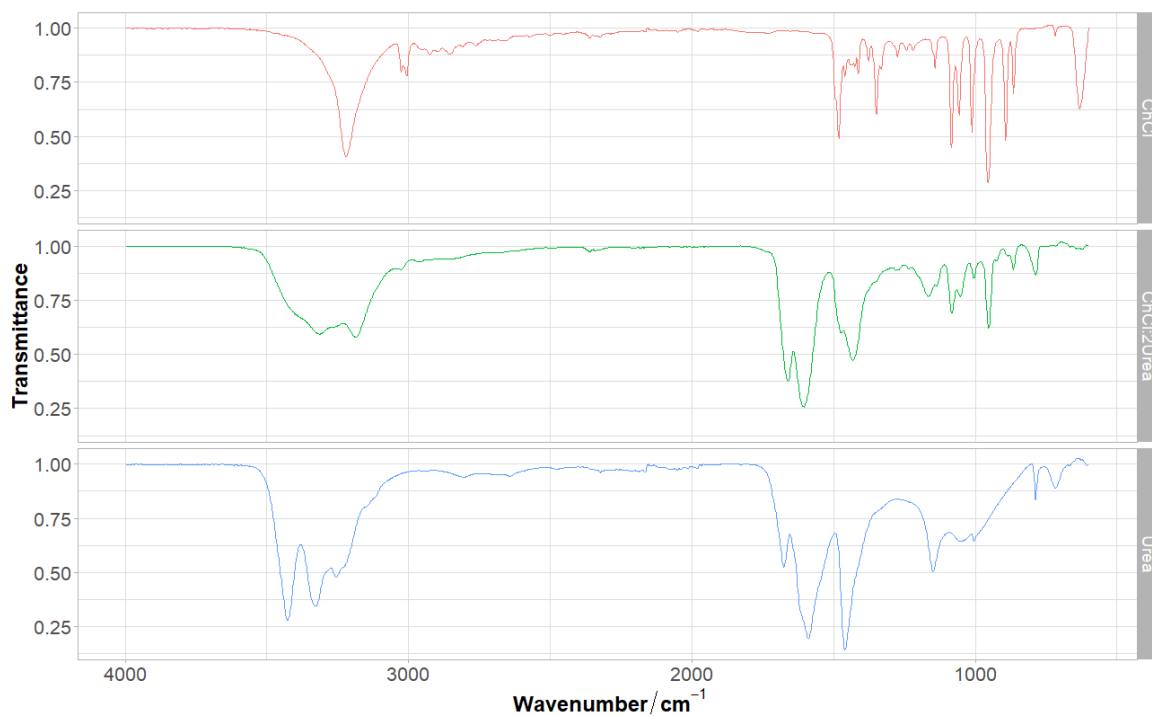


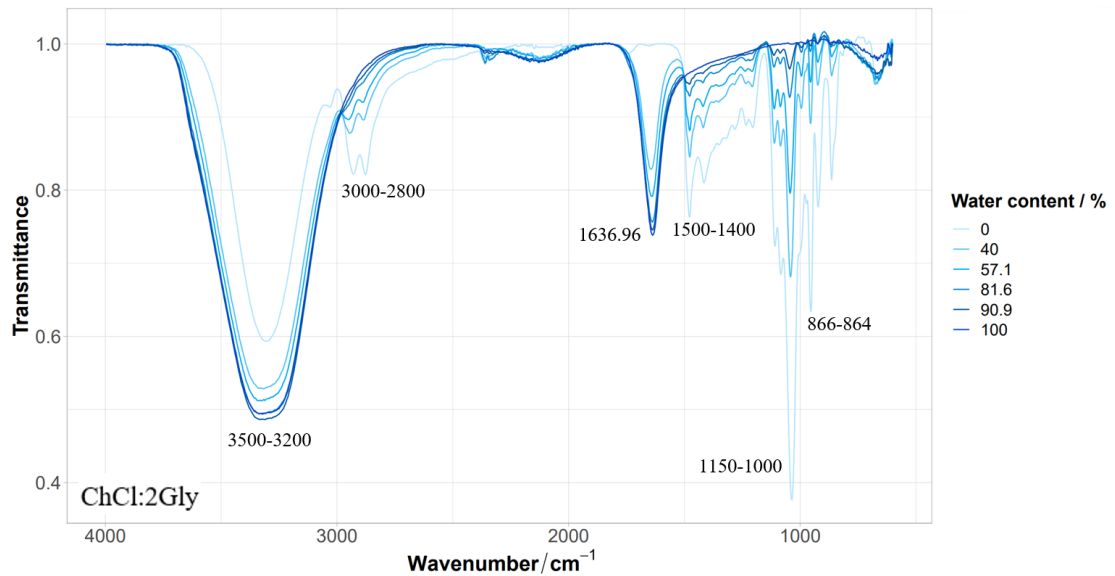
Figura 5. Espectro infrarrojo para el ChCl:2Gly y sus compuestos de partida.



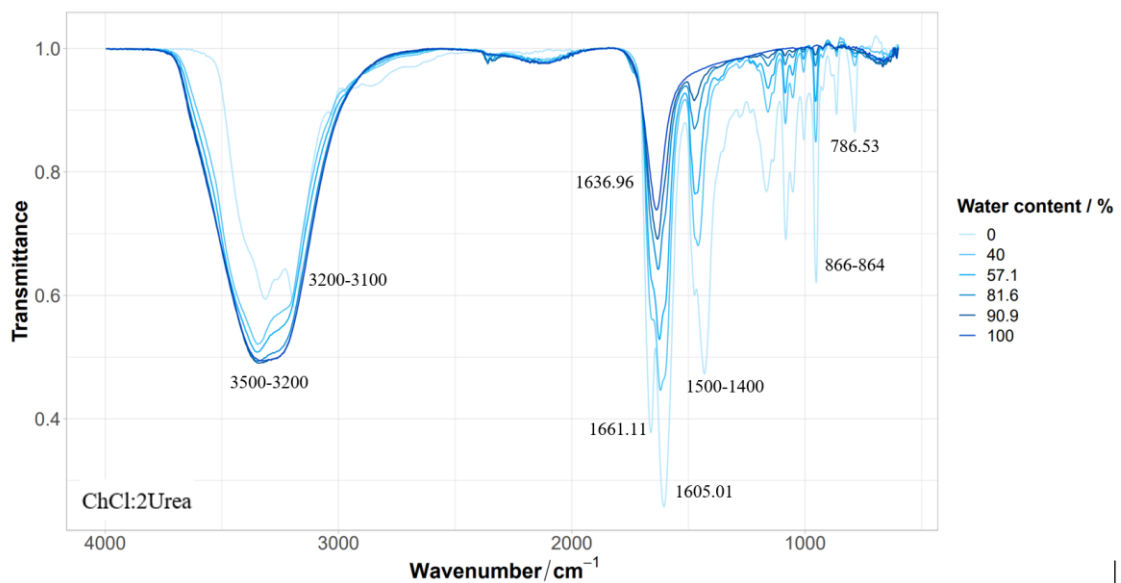
**Figura 6.** Espectro infrarrojo para el ChCl:2Urea y sus compuestos de partida.

También, se realizó un espectro de infrarrojo de las mezclas DES+agua, para ver cómo influye la presencia de agua en el DES. Para ello, se compararon los espectros de IR de los DES preparados con todas las mezclas acuosas (Figura 7 y Figura 8). Para comparar mejor con los resultados publicados por Hammond et al. [49], se calculó el porcentaje de agua añadida (en masa) en la mezcla biomasa:disolvente (de ahí que aparezcan porcentajes en vez de los valores en masa presentados anteriormente). Los espectros de IR muestran que a medida que aumenta el contenido en agua, la banda correspondiente a las vibraciones de estiramiento del enlace O-H ( $3400-3200\text{ cm}^{-1}$ ) se ensancha. El efecto es menos agudo en el caso del DES ChCl:2Gly (ya que presenta más enlaces de hidrógeno O-H debido al glicerol). Esto es más visible para el DES ChCl:2Urea, para el cual sus dos bandas elásticas N-H casi se pierden cuando los niveles de agua son superiores al 81,6 %. En el caso de ChCl:2Gly, los dos picos a  $3000-2800\text{ cm}^{-1}$  desaparecieron cuando el contenido de agua estaba por encima del 57,1 %. En la región de la huella dactilar, la banda elástica C=O ( $1661.11\text{ cm}^{-1}$ ) y la tijera de flexión H-N-H ( $1600\text{ cm}^{-1}$ ) de la urea finalmente se convierten en la banda de tijera H-O-H del agua al tener concentraciones de agua superiores al 81,6 %. Además, la flexión C-O-H y  $\text{CH}_2$  ( $1500-1400\text{ cm}^{-1}$ ) se desvanece cuando los niveles de agua están por encima del 81,6-90,9 %. Del mismo modo, el estiramiento simétrico C-N<sup>+</sup> ( $866-864\text{ cm}^{-1}$ ) y la flexión N-H ( $786,53\text{ cm}^{-1}$ ) también desaparecen al alcanzar niveles altos de agua. Por lo tanto, basándonos en los conocimientos previos y los resultados obtenidos, parece que solo las mezclas de DES con un contenido de agua del 40 % pueden seguir considerándose como DES.

Las otras combinaciones deben ser descritas como disoluciones acuosas de DES que aún retienen parte de la información de los compuestos puros.



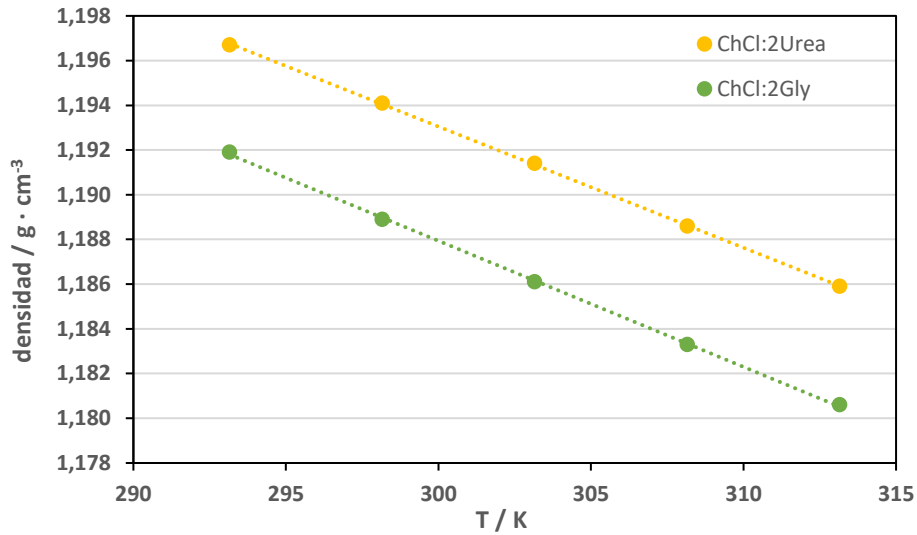
**Figura 7.** Espectro infrarrojo para el ChCl:2Gly y sus mezclas con agua.



**Figura 8.** Espectro infrarrojo para el ChCl:2Urea y sus mezclas con agua.

Además, se determinó el contenido en agua de cada DES puro mediante el método Karl-Fischer, obteniéndose valores inferiores al 1 % (% en masa).

También, se midió la densidad ( $\rho$ ) y la viscosidad ( $\eta$ ) de los DES puros a diferentes temperaturas ( $T = 20 - 40\text{ }^\circ\text{C}$ ) para estudiar su comportamiento con la variación de la temperatura. En la Figura 9 se representa la variación de la densidad en función de la temperatura para cada DES.



**Figura 9.** Variación de la densidad en función de la temperatura para cada DES.

La densidad se ajustó a un modelo lineal tanto para el ChCl:2Gly (ecuación 5) como para el ChCl:2Urea (ecuación 6).

$$\rho_{\text{ChCl:2Gly}} = - 5,64 \cdot 10^{-4} \cdot T + 1,357 \quad (5)$$

$$\rho_{\text{ChCl:2Urea}} = - 5,45 \cdot 10^{-4} \cdot T + 1,356 \quad (6)$$

En el caso del ChCl:2Gly, se obtuvo un  $R^2$  del 0,9996, mientras que para el ChCl:2Urea, el  $R^2$  es del 0,9999 %.

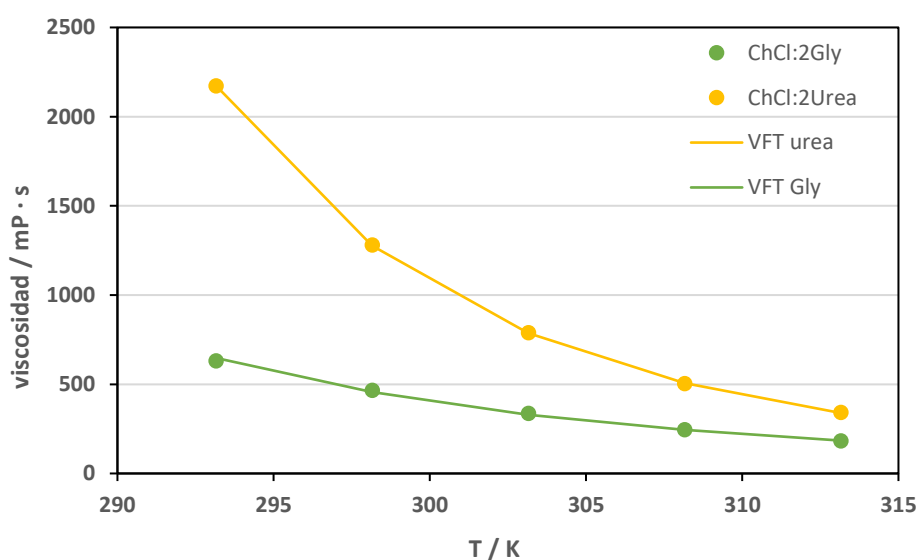
En cuanto a la viscosidad, se ajustó utilizando el modelo de Vogel-Fulcher-Tamman (VFT) (ecuación 7). En la Tabla 7 se muestran los valores de las constantes específicas A,  $T_0$  y B para cada DES.

$$\eta = A \cdot \exp\left(\frac{B}{T - T_0}\right) \quad (7)$$

**Tabla 7.** Valores de las constantes del modelo VFT para cada DES.

	ChCl:2Gly	ChCl:2Urea
A	0,1018	0,0428
B	1045,57	1046,70
T <sub>0</sub>	173,7616	196,5467

En la Figura 10 se representa los valores experimentales de la viscosidad de cada DES en función de la temperatura, junto con su ajuste al modelo VFT.



**Figura 10.** Variación de la viscosidad en función de la temperatura para cada DES.

Como se puede observar, tanto la densidad como la viscosidad disminuyen al aumentar la temperatura para los dos DES estudiados. Los valores de densidad de ChCl:2Urea son ligeramente superiores a los obtenidos para el ChCl:2Gly, mientras que la viscosidad es considerablemente mayor para el DES que contiene urea como donante de enlaces de hidrógeno en comparación con el otro DES utilizado.

## 4.2 Diseño factorial completo

### 4.2.1 Resultados del diseño

Como se comentó anteriormente, el diseño evaluará la influencia de dos factores en las variables respuesta: rendimiento de la extracción de proteínas (PRY) y la ratio proteínas/carbohidratos extraídos (PCR). Los resultados se recogen en la Tabla 8 ( $R_1$  y  $R_2$  se refieren

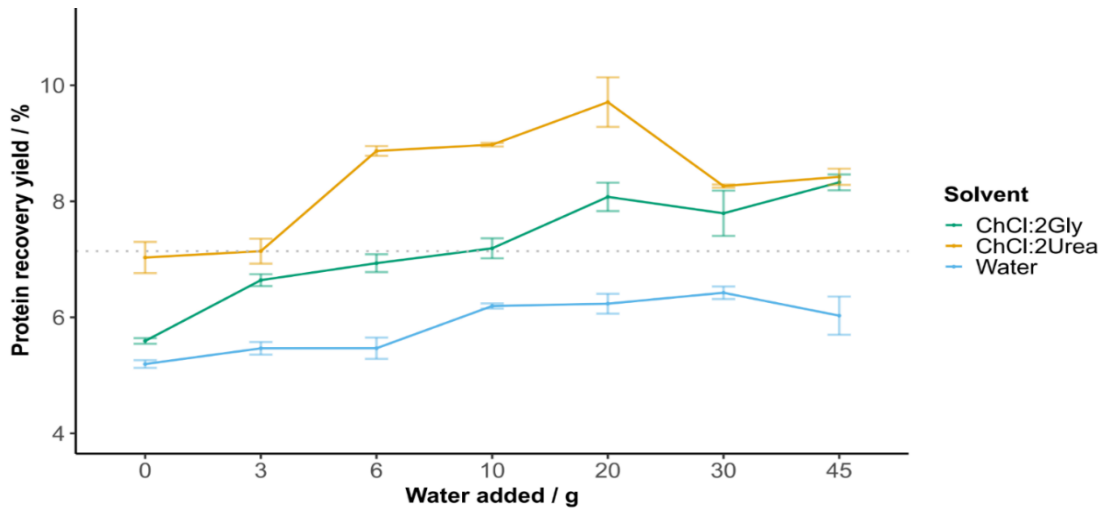
a las réplicas de cada experimento). Los resultados están en porcentaje, excepto la ratio que se encuentra en tanto por uno.

**Tabla 8.** Resultados de los experimentos del diseño factorial completo.

Tipo disolvente	Cantidad agua/g	PRY		PCR	
		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Agua	0	5,15 %	5,24 %	0,45	0,44
Agua	3	5,39 %	5,54 %	0,46	0,46
Agua	6	5,60 %	5,34 %	0,46	0,46
Agua	10	6,16 %	6,23 %	0,50	0,49
Agua	20	6,36 %	6,11 %	0,51	0,48
Agua	30	6,50 %	6,35 %	0,55	0,53
Agua	45	5,80 %	6,70 %	0,47	0,55
ChCl:2Gly	0	5,63 %	5,56 %	0,54	0,55
ChCl:2Gly	3	6,57 %	6,71 %	0,58	0,56
ChCl:2Gly	6	6,83 %	7,04 %	0,56	0,61
ChCl:2Gly	10	6,94 %	7,87 %	0,59	0,60
ChCl:2Gly	20	7,90 %	8,25 %	0,66	0,68
ChCl:2Gly	30	7,52 %	8,07 %	0,60	0,62
ChCl:2Gly	45	8,42 %	8,23 %	0,64	0,63
ChCl:2Urea	0	7,22 %	6,84 %	0,62	0,64
ChCl:2Urea	3	6,99 %	7,29 %	0,59	0,61
ChCl:2Urea	6	8,81 %	8,93 %	0,71	0,74
ChCl:2Urea	10	8,95 %	8,35 %	0,72	0,63
ChCl:2Urea	20	10,01 %	9,41 %	0,72	0,74
ChCl:2Urea	30	8,24 %	8,28 %	0,64	0,63
ChCl:2Urea	45	8,32 %	8,52 %	0,65	0,65

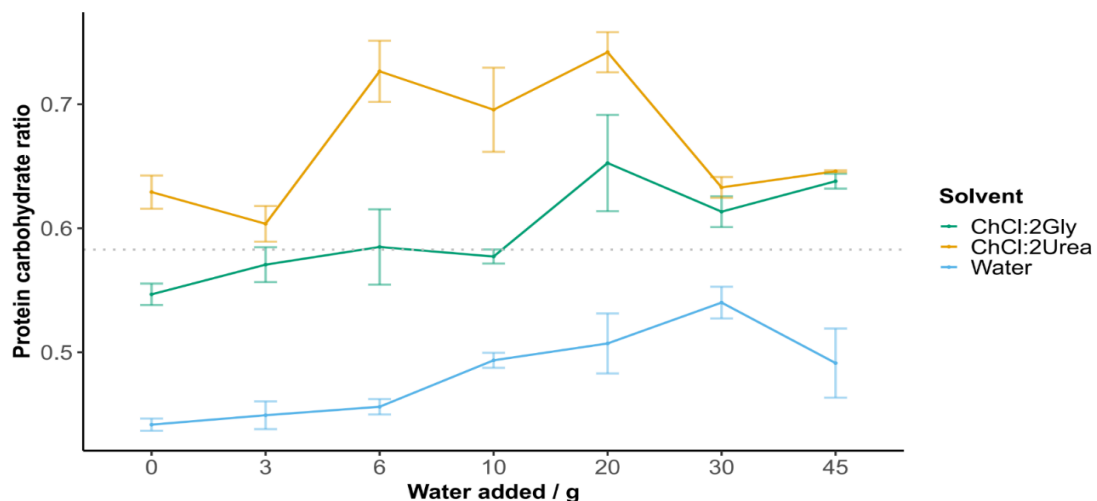
Los p-valores correspondientes al test de comparación de varianzas del ANOVA dieron todos más pequeños que el nivel de significación ( $\alpha=0,05$ ), de lo que se concluye que los dos factores, tipo de disolvente y cantidad de agua añadida, tienen efectos significativos en todas las variables respuesta analizadas. Lo mismo sucede con la interacción entre ambos factores, es decir, la cantidad de agua añadida no afecta de igual manera a cada tipo de disolvente.

Las Figuras 11 y 12 muestran las gráficas de interacción de los factores sobre las variables respuesta, porcentaje extracción de proteína y ratio proteínas/carbohidratos. En ellas se puede visualizar que las diferencias entre los resultados a cada nivel son significativas (los intervalos no se solapan). Para saber con qué disolvente y que cantidad de agua añadida se obtienen los mejores resultados se aplicó una prueba LSD de múltiples rangos a cada variable (los resultados del test se pueden consultar en las Tablas A 1 – A 4 del Anexo).



**Figura 11.** Interacción de los factores de control sobre la respuesta media del PRY. Las barras de error verticales representan la desviación estándar de las medias. La línea punteada indica la gran media.

En relación con la PRY (Figura 11), todos los disolventes proporcionan diferentes rendimientos de extracción, observándose que el uso de los DES en lugar de agua permite extraer una mayor cantidad de proteínas, siendo el ChCl:2Urea el que proporciona mayores valores de PRY. Al analizar la cantidad de agua añadida en la mezcla biomasa:disolvente, se observa que el porcentaje de extracción de proteínas aumenta al aumentar la cantidad de agua añadida, alcanzando su máximo en 20 g de agua. A partir de ese punto, el rendimiento de extracción comienza a disminuir para todos los disolventes utilizados (o se mantiene constante). Este resultado está acorde con lo obtenido en el test LSD ya que no se encontraron diferencias significativas entre los distintos niveles de agua a partir de 20 g de agua añadida.



**Figura 12.** Interacción de los factores de control sobre la respuesta media de la PCR. Las barras de error verticales representan la desviación estándar de las medias. La línea punteada indica la gran media.



En el caso de la PCR (Figura 12), se obtiene que el ChCl:2Urea es el disolvente que proporciona una mayor eficiencia en la extracción de proteínas, a la vez que reduce la coextracción de carbohidratos. Respecto a la cantidad de agua añadida a la mezcla biomasa:disolvente, se observa que la adición de 20 g de agua a la mezcla es la que proporciona los mejores resultados para los DES utilizados.

Por lo tanto, tras el diseño factorial completo se decidió realizar los experimentos de extracción en las condiciones óptimas encontradas, es decir, utilizando el DES ChCl:2Urea y añadiendo 20 g de agua a la mezcla biomasa:disolvente.

### 4.3 Diseño L9 de Taguchi

#### 4.3.1 Resultados del diseño

Al igual que se hizo en el diseño anterior, se evaluará la influencia de cuatro factores en las variables respuesta: rendimiento de extracción de proteínas (PRY) y la ratio proteína/carbohidratos extraídos (PCR), para determinar cuáles son las condiciones en las que dicha ratio se maximiza. Los resultados se recogen en la Tabla 9 (R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se refieren a las réplicas de cada experimento). De nuevo, los resultados están en porcentaje, excepto la ratio que se encuentra en tanto por uno.

**Tabla 9.** Resultados de los experimentos del diseño L9.

Temp / °C	Tiempo / h	Ratio	Pretratamiento	Biomasa	PRY		PCR	
					R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
20	0,5	3	Nada	Chlorella	9,10 %	9,11 %	0,45	0,46
20	1	6	Manual	Chlorella	10,05 %	10,26 %	0,48	0,51
20	2	12	Discos	Chlorella	12,80 %	12,18 %	0,48	0,45
30	0,5	6	Discos	Chlorella	11,21 %	12,20 %	0,41	0,44
30	1	12	Nada	Chlorella	10,29 %	9,94 %	0,50	0,48
30	2	3	Manual	Chlorella	9,71 %	10,05 %	0,44	0,46
40	0,5	12	Manual	Chlorella	10,39 %	10,80 %	0,47	0,50
40	1	3	Discos	Chlorella	11,14 %	10,46 %	0,38	0,36
40	2	6	Nada	Chlorella	9,85 %	9,73 %	0,42	0,40
20	0,5	3	Nada	Scenedesmus	7,11 %	6,99 %	0,55	0,53
20	1	6	Manual	Scenedesmus	9,82 %	10,09 %	0,67	0,70
20	2	12	Discos	Scenedesmus	15,89 %	16,51 %	0,76	0,78
30	0,5	6	Discos	Scenedesmus	15,61 %	15,89 %	0,75	0,78
30	1	12	Nada	Scenedesmus	9,85 %	10,33 %	0,75	0,81
30	2	3	Manual	Scenedesmus	9,82 %	10,18 %	0,68	0,67
40	0,5	12	Manual	Scenedesmus	12,10 %	11,14 %	0,70	0,67
40	1	3	Discos	Scenedesmus	14,76 %	14,88 %	0,66	0,66
40	2	6	Nada	Scenedesmus	9,48 %	10,83 %	0,67	0,67

Este diseño sólo proporciona información estadística sobre si el efecto de cada factor es significativo o no, sin tener en cuenta las interacciones entre ellos, como se mencionó anteriormente. En la Tabla 10 aparecen los p-valores correspondientes al test de comparación de varianzas del ANOVA, destacando en rojo aquellos que influyen significativamente.

**Tabla 10.** p-valores de los factores experimentales.

Factor	PRY		PCR	
	<i>Chlorella</i>	<i>Scenedesmus</i>	<i>Chlorella</i>	<i>Scenedesmus</i>
Temperatura / °C	0,6156	0,0046	0,0021	0,0002
Tiempo / h	0,2484	0,0813	0,4117	0,0062
Ratio	0,0013	0,0001	0,0011	0,0000
Pretratamiento	0,0000	0,0000	0,0010	0,0006

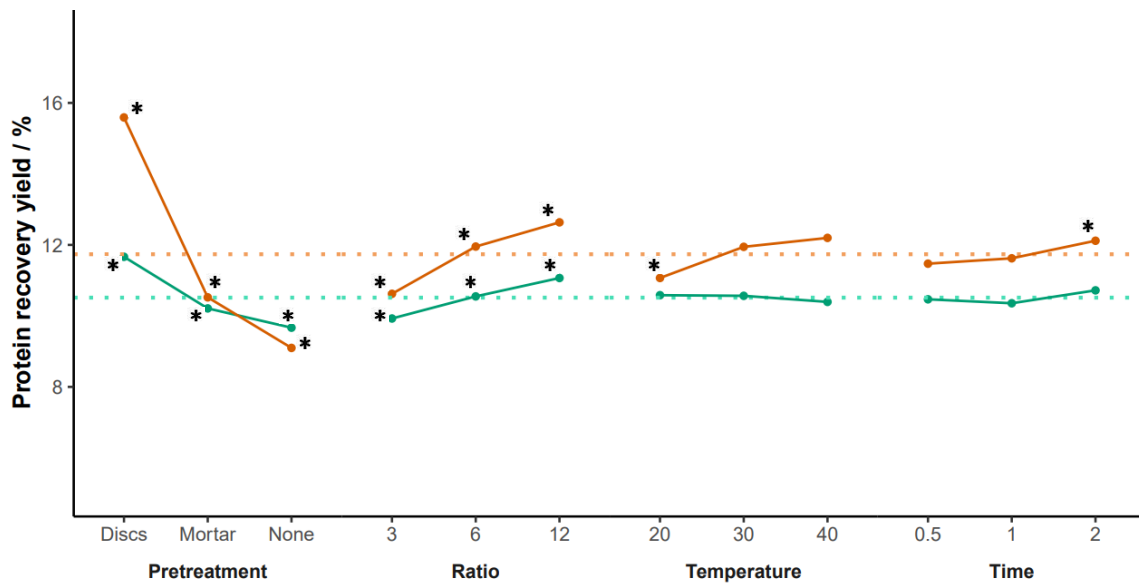
En el caso de la PRY, se observa que para la *Chlorella* solamente la ratio y el pretratamiento de la biomasa tienen un efecto significativo, mientras que para la *Scenedesmus* además de estos dos factores, la temperatura también influye en la respuesta. En lo que respecta a la PCR, se observó que para la *Chlorella* solamente tres factores afectan a la respuesta: la temperatura, la ratio y el pretratamiento de la biomasa. En cambio, para la *Scenedesmus* todos los factores son significativos.

En los siguientes apartados se realizará un análisis más detallado de las variables respuesta, rendimiento de la extracción de proteínas y de la ratio proteínas/carbohidratos extraídos. Por último, utilizando modelos de regresión generales (GLM), se construirán diferentes modelos para predecir la variable respuesta en función de los factores estudiados.

#### 4.3.1.1 Extracción de proteínas (PRY)

En cuanto a los factores que influyen en la extracción de proteínas, estos varían dependiendo del tipo de biomasa utilizado, siendo diferentes en el caso de la *Chlorella* y la *Scenedesmus*. Para determinar los efectos de los niveles de cada factor, se realizó una prueba LSD (los resultados del test se encuentran en las Tablas A 5 – A 12 del Anexo), lo que permitió obtener el nivel óptimo de trabajo para cada tipo de biomasa.

En la Figura 13 se muestra el gráfico de medias de todos los factores respuesta para las dos biomasa. De este modo, se puede ver gráficamente la contribución de los niveles de cada factor a la respuesta, siendo el pretratamiento de la biomasa el factor más determinante para la extracción de proteínas en ambos tipos de biomasa algal.



**Figura 13.** Gráfico de medias para el porcentaje de extracción de proteínas para la *Chlorella Vulgaris*, ●, y *Scenedesmus almeriensis*, ●. Las líneas punteadas indican la gran media de las dos microalgas. \* indica una diferencia significativa.

- *Chlorella vulgaris*

En cuanto a la temperatura y el tiempo, no se encontró ninguna diferencia significativa en el uso de temperaturas altas o bajas, así como en los distintos tiempos (30 min, 1h y 2h). En el caso de la ratio, hay diferencias significativas entre los distintos niveles empleados, siendo el 1:12 el que proporciona el mejor rendimiento de extracción. Por último, para el pretratamiento de la biomasa se encontró diferencias significativas entre el uso de mortero de discos (él cual maximiza la señal) y los otros dos.

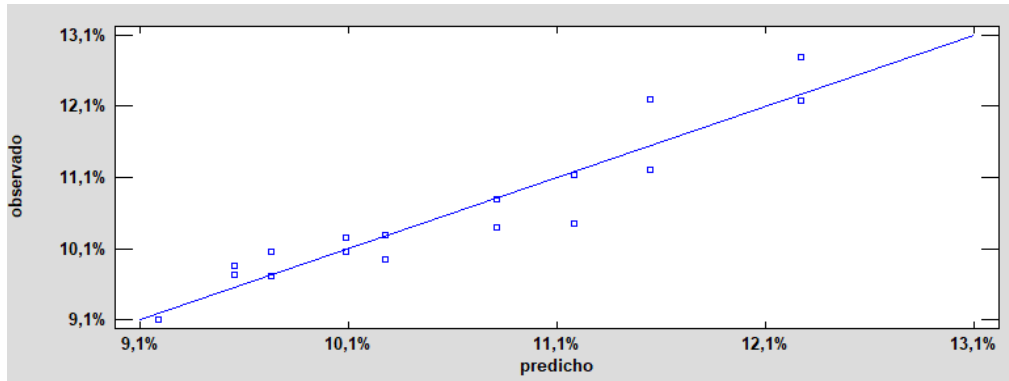
Una vez obtenidos los efectos medios de los factores, es posible construir un modelo de regresión para predecir el valor de la respuesta en función de los factores estudiados. Para ello, en el software Statgraphics se aplica el método GLM (Generalized Linear Models) y se introducen los factores que han salido significativos. Se llevará a cabo una regresión lineal múltiple, obteniéndose un polinomio con su respectivo  $R^2$ . Este mismo proceso se repitió para estudiar la variable de extracción de proteínas en la biomasa microalgal *Scenedesmus* como para la ratio proteínas/carbohidratos extraídos de los dos tipos de biomasa.

En el caso del porcentaje de proteínas extraída en la *Chlorella*, se obtuvo la ecuación (8).

$$PRY/\% = 0,0967 + 0,0115 \cdot I_1(1) - 0,00305 \cdot I_1(2) + 0,00120714 \cdot Ratio \quad (8)$$

Donde:  $I_1(1) = 1$  si Pretratamiento = Discos, -1 si Pretratamiento = Nada, 0 de lo contrario.  $I_1(2) = 1$  si Pretratamiento = Manual, -1 si Pretratamiento = Nada, 0 de lo contrario.

El  $R^2$  se relaciona con la calidad del modelo de regresión: mide el porcentaje de varianza de la tabla de datos explicada por el modelo. En este caso, el valor de  $R^2$  es del 0,8956, lo que significa que el 90 % de la varianza se explica por las variables que se ha seleccionado para el modelo. En la Figura 14 pueden observarse el modelo lineal ajustado.



**Figura 14.** Gráfico de regresión del modelo para el PRY en la *Chlorella vulgaris*.

- *Scenedesmus almeriensis*

Si observamos la Figura 13, se puede ver que no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la temperatura entre 30 y 40 °C. No obstante, se observó que la respuesta se maximiza con estas temperaturas y se minimiza con 20 °C, debido a que se encontró diferencias significativas entre esta última y las temperaturas mencionadas anteriormente. Con respecto al ratio, se hallaron diferencias significativas entre la ratio 1:12 (que maximiza la señal) y los otros dos. Por último, existen diferencias significativas entre todos los pretratamientos, de nuevo, el que maximiza la señal es el mortero de discos.

Se volvió a construir un modelo de regresión con el software Statgraphics, obteniéndose los siguientes resultados para la extracción de proteínas de la biomasa microalgal *Scenedesmus*: (ecuación 9)

$$PRY/\% = 0,0858667 + 0,0385222 \cdot I_1(1) - 0,0121278 \cdot I_1(2) + 0,000565 \cdot Temperatura/(^{\circ}C) + 0,00208016 \cdot Ratio \quad (9)$$

Donde:  $I_1(1) = 1$  si Pretratamiento = Discos,  $-1$  si Pretratamiento = Nada,  $0$  de lo contrario.  $I_1(2) = 1$  si Pretratamiento = Manual,  $-1$  si Pretratamiento = Nada,  $0$  de lo contrario.

En este caso  $R^2$  es 0,967, por lo que el 97 % de la varianza viene explicado por las variables introducidas en este modelo. En la Figura 15 se encuentra la línea del modelo que mejor se ajusta a los datos experimentales.

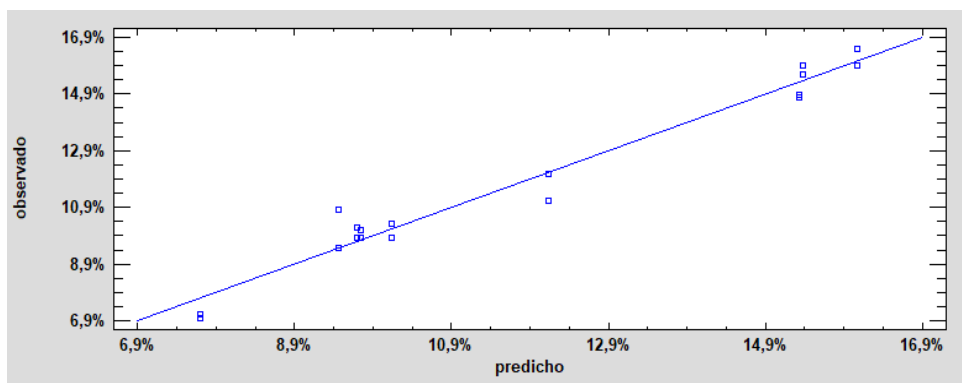


Figura 15. Gráfico de regresión del modelo para el PRY en la *Scenedesmus almeriensis*.

#### 4.3.1.2 Ratio proteínas/carbohidratos

Para la variable respuesta ratio proteínas/carbohidratos, también se determinaron los factores más significativos y los efectos de cada nivel para cada tipo de biomasa algal. Para lo cual se recurrió de nuevo al test LSD (los resultados del test se pueden consultar en las Tablas A 13 – A 20 del Anexo). En la Figura 16 se muestra el gráfico de medias de todos los factores respuesta para las dos biomosas. A través de este gráfico, se puede observar gráficamente que se obtienen mejores ratios para la biomasa microalgal *Scenedesmus almeriensis* que para la *Chlorella vulgaris*. Además, también se puede apreciar la contribución de los niveles de cada factor a la respuesta.

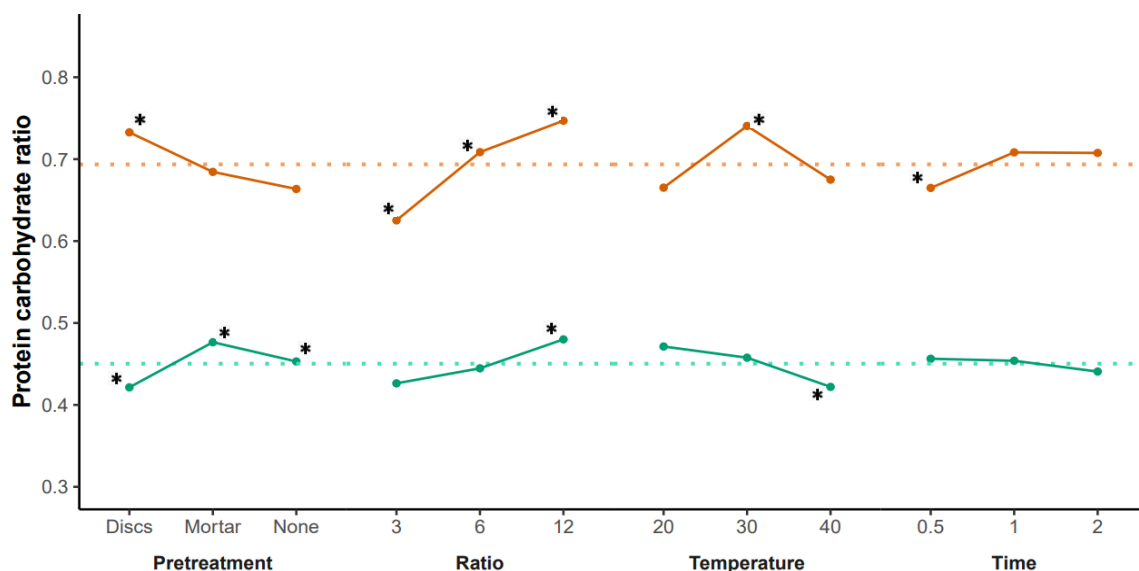


Figura 16. Gráfico de medias para la ratio proteína/carbohidratos para la *Chlorella Vulgaris*, ◆, y *Scenedesmus almeriensis*, ◆. Las líneas punteadas indican la gran media de las dos microalgas. \* indica una diferencia significativa.

- Chlorella vulgaris

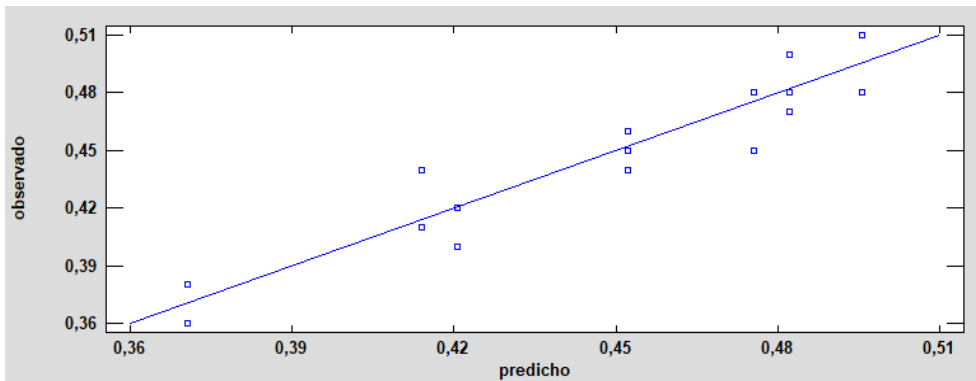
Para la temperatura, no se encontró una diferencia significativa entre 20 y 30 °C. Sin embargo, sí hubo diferencias significativas al utilizar 40 °C en comparación con las dos temperaturas anteriores, siendo 20 °C la que maximiza la respuesta. En el caso del tiempo, no existen diferencias significativas entre el uso de un tiempo u otro. La ratio óptima resultó ser 1:12, no habiendo ninguna diferencia significativa entre las otras dos ratios. Por último, en cuanto al pretratamiento de la biomasa, se encontró diferencias significativas entre la utilización de un mortero manual (el cual maximiza la señal) y los otros dos pretratamientos.

Se construyó un modelo de regresión para la ratio proteínas/carbohidratos en la Chlorella (ecuación 10)(10):

$$PCR = 0,481667 - 0,0294444 \cdot I_1(1) + 0,0272222 \cdot I_1(2) - 0,0025 \cdot Temperatura /(^{\circ}C) + 0,00611111 \cdot Ratio \quad (10)$$

Donde:  $I_1(1) = 1$  si Pretratamiento = Discos,  $-1$  si Pretratamiento = Nada,  $0$  de lo contrario.  $I_1(2) = 1$  si Pretratamiento = Manual,  $-1$  si Pretratamiento = Nada,  $0$  de lo contrario.

En este caso  $R^2$  es  $0,8835$ , por lo que el  $88\%$  de la varianza viene explicado por las variables introducidas en este modelo. En la Figura 17 pueden observarse el modelo lineal ajustado.



**Figura 17.** Gráfico de regresión del modelo para la PCR en la *Chlorella vulgaris*.

- Scenedesmus almeriensis

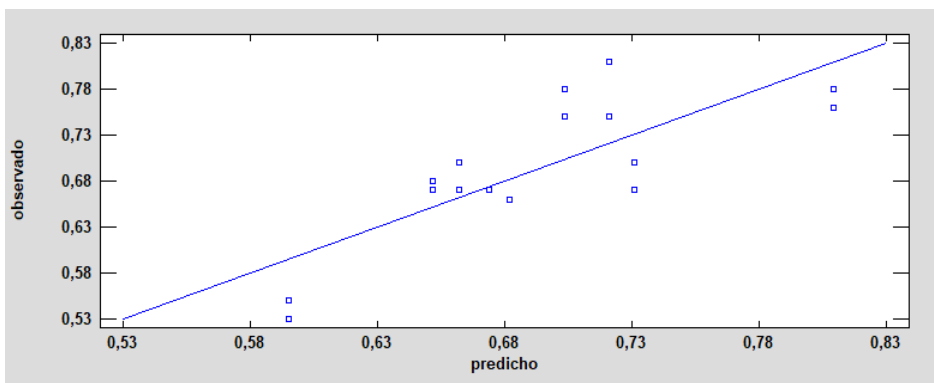
Si observamos la Figura 16, se puede ver que la temperatura óptima resultó ser 30 °C, entre las otras dos temperaturas no existe ninguna diferencia significativa. Respecto al tiempo, no se encontraron diferencias significativas entre 1 y 2 horas, pero se observó que la respuesta se maximiza con estos tiempos y se minimiza con 30 min. En el caso de la ratio, hay diferencias significativas entre las distintas ratios empleadas, siendo el 1:12 el que proporciona el mejor

resultado. Por último, para el pretratamiento de la biomasa se encontró diferencias significativas entre el uso de mortero de discos (el cual maximiza la señal) y los otros dos. En el caso de la ratio proteínas/carbohidratos en la *Scenedesmus*, se obtuvo la ecuación (11) en el modelo de regresión.

$$PCR = 0,568611 + 0,0394444 \cdot I_1(1) - 0,0105556 \cdot I_1(2) + 0,000333333 \cdot Temperatura /(^{\circ}C) + 0,0233333 \cdot Tiempo / h + 0,0123413 \cdot Ratio \quad (11)$$

Donde:  $I_1(1) = 1$  si Pretratamiento = Discos,  $-1$  si Pretratamiento = Nada,  $0$  de lo contrario.  $I_1(2) = 1$  si Pretratamiento = Manual,  $-1$  si Pretratamiento = Nada,  $0$  de lo contrario.

En este caso,  $R^2$  es  $0,6238$ . Este valor es bajo lo que significa que el modelo predictivo explica un porcentaje de la varianza pequeño. No obstante, esto no es problema, ya que el objetivo es maximizar el PRY, es decir, el rendimiento de extracción de las proteínas. En la Figura 18, se muestra la línea del modelo que mejor se ajusta a los datos experimentales.



**Figura 18.** Gráfico de regresión del modelo para la PCR en la *Scenedesmus almeriensis*.

### 4.3.2 Comprobación experimental de los modelos

Para verificar la bondad de los modelos, se realizaron experimentos para los niveles óptimos de los factores, que no habían sido ensayados previamente porque no se habían contemplado en la matriz del diseño L9, midiéndose tanto el PRY como la PCR. De esta forma, se compararon los resultados teóricos que proporciona el modelo con los experimentales, calculándose el error relativo (ecuación 12):

$$Error\ Relativo\ (\epsilon_r) = \frac{x_{Exp} - x_{Modelo}}{x_{Modelo}} \cdot 100 \quad (12)$$

En la Tabla 11 se muestran los valores de los factores seleccionados de acuerdo con los resultados obtenidos en el diseño L9, así como los valores de las variables respuesta (PRY y PCR) obtenidos experimentalmente y aplicando los modelos lineales y el error relativo calculado.

**Tabla 11.** Comprobación experimental de los modelos.

	<b>Microalga</b>	<b>T</b>	<b>t</b>	<b>R</b>	<b>P</b>	<b>y<sub>Model</sub> / %</b>	<b>y<sub>Exp</sub> / %</b>	<b>ε<sub>r</sub> / %</b>
<b>PRY</b>	<i>Scenedesmus almeriensis</i>	40	0,5	12	Discs	17,2	16,8	-2,3
	<i>Chlorella vulgaris</i>	20	0,5	12	Discs	12,3	12,9	5,2
<b>PCR</b>	<i>Scenedesmus almeriensis</i>	30	1	12	Discs	0,791	0,770	-2,6
	<i>Chlorella vulgaris</i>	20	0,5	12	Mortar	0,531	0,489	-7,9

Como se puede observar, los modelos predicen razonablemente bien, obteniendo discrepancias razonables, por debajo del 8 % de error relativo.



## 5. Conclusiones

En este trabajo, se ha investigado el uso de microalgas como una posible alternativa frente al aumento de la demanda de proteínas, aprovechando además su capacidad para purificar el agua y proporcionar otros compuestos biológicos de interés. Se ha estudiado el uso de disolventes con eutéctico profundo, como un nuevo tipo de disolvente biodegradable, para la extracción de la fracción proteica presente en diferentes biomasas algales.

A continuación, se resumen las principales conclusiones de este trabajo:

- Se han preparado y caracterizado dos DES. Los resultados del análisis físico han revelado que el DES ChCl:2Urea presenta valores superiores de densidad y viscosidad en comparación con el ChCl:2Gly. Además, se ha llevado a cabo una caracterización química utilizando espectroscopía infrarroja, lo cual ha permitido confirmar la formación de los DES mediante la detección de las correspondientes bandas de absorción en los espectros.
- Mediante un diseño factorial completo de dos factores a tres y siete niveles, se ha determinado que los dos DES empleados (ChCl:2Gly y ChCl:2Urea) son mejores agentes de extracción de proteínas a partir de biomasa algal que el agua. Por otro lado, también se ha estudiado cómo la adición de agua a la mezcla biomasa:disolvente mejora la PCR obtenida hasta un punto óptimo de 20 g, a partir del cual no se observan mejoras, incluso el rendimiento empeora.
- Se llevó a cabo un diseño de Taguchi L9 para el estudio de cuatro factores a tres niveles cada uno en dos tipos de biomasa algal (*Scenedesmus almeriensis* y *Chlorella vulgaris*). Los datos muestran que el pretratamiento de la biomasa es el factor que más contribuye en la variación de la respuesta del PRY, siendo el mortero de discos el que maximiza la respuesta. Además, se observó que se obtienen valores de la PCR más elevados cuando el tipo de biomasa usada es la microalga *Scenedesmus almeriensis*, alcanzándose rendimientos de recuperación de proteínas del 17 %, y selectividades de proteínas/carbohidratos cercanos al 0,8.
- Por último, se construyeron modelos matemáticos que se ajustan a los datos experimentales para predecir puntos no ensayados, comprobándose su validez con nueva experimentación, obteniéndose errores relativos menores del 8 %.

Como conclusión, se puede decir que se han obtenido resultados prometedores. Sin embargo, para investigaciones futuras, se podría buscar un DES más selectivo y eficiente para la extracción de proteínas. También, sería interesante enfocarse en el estudio de algas frescas, las cuales tienen un alto contenido en agua. Esto permitiría acercarse a las condiciones reales del proceso.

## Bibliografía

- [1] O. M. Augustin, «Proteínas y péptidos en nutrición enteral», *Nutr. Hosp.*, 2006.
- [2] C. J. Chou, M. Affolter, y M. Kussmann, «A Nutrigenomics View of Protein Intake», en *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Elsevier, 2012, pp. 51-74. doi: 10.1016/B978-0-12-398397-8.00003-4.
- [3] «Scientific Opinion on Dietary Reference Values for protein», *EFSA Journal*, n.º 2012;10(2):2557, doi: 10.2903/j.efsa.2012.2557.
- [4] «World Urbanization Prospects - División de Población - Naciones Unidas». <https://population.un.org/wup/DataQuery/> (accedido 8 de marzo de 2023).
- [5] H. C. J. Godfray *et al.*, «Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People», *Science*, vol. 327, n.º 5967, pp. 812-818, feb. 2010, doi: 10.1126/science.1185383.
- [6] S. Kell, «Editorial foreword for “environment, development and sustainability” journal», *Environ Dev Sustain*, vol. 24, n.º 3, pp. 2983-2985, mar. 2022, doi: 10.1007/s10668-021-02070-z.
- [7] H. Aiking y J. de Boer, «The next protein transition», *Trends in Food Science & Technology*, vol. 105, pp. 515-522, nov. 2020, doi: 10.1016/j.tifs.2018.07.008.
- [8] A. Naseri, G. S. Marinho, S. L. Holdt, J. M. Bartela, y C. Jacobsen, «Enzyme-assisted extraction and characterization of protein from red seaweed *Palmaria palmata*», *Algal Research*, vol. 47, p. 101849, may 2020, doi: 10.1016/j.algal.2020.101849.
- [9] C. E. C. C. Ejike, S. A. Collins, N. Balasuriya, A. K. Swanson, B. Mason, y C. C. Udenigwe, «Prospects of microalgae proteins in producing peptide-based functional foods for promoting cardiovascular health», *Trends in Food Science & Technology*, vol. 59, pp. 30-36, ene. 2017, doi: 10.1016/j.tifs.2016.10.026.
- [10] S. Bleakley y M. Hayes, «Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production», *Foods*, vol. 6, n.º 5, Art. n.º 5, may 2017, doi: 10.3390/foods6050033.
- [11] V. Dolganyuk *et al.*, «Microalgae: A Promising Source of Valuable Bioproducts», *Biomolecules*, vol. 10, n.º 8, Art. n.º 8, ago. 2020, doi: 10.3390/biom10081153.
- [12] K. N. Papadopoulos, Ed., *Food chemistry research developments*. New York: Nova Science Publishers, 2008.
- [13] J. Ruiz *et al.*, «Towards industrial products from microalgae», *Energy Environ. Sci.*, vol. 9, n.º 10, pp. 3036-3043, oct. 2016, doi: 10.1039/C6EE01493C.
- [14] W. A. Wan Mahari *et al.*, «Recent advances on microalgae cultivation for simultaneous biomass production and removal of wastewater pollutants to achieve circular economy», *Bioresour. Technol.*, vol. 364, p. 128085, nov. 2022, doi: 10.1016/j.biortech.2022.128085.
- [15] S. Li, W. Qu, H. Chang, J. Li, y S.-H. Ho, «Microalgae-driven swine wastewater biotreatment: Nutrient recovery, key microbial community and current challenges», *Journal of Hazardous Materials*, vol. 440, p. 129785, oct. 2022, doi: 10.1016/j.jhazmat.2022.129785.
- [16] R. Kumar, A. S. Hegde, K. Sharma, P. Parmar, y V. Srivatsan, «Microalgae as a sustainable source of edible proteins and bioactive peptides – Current trends and future prospects», *Food Research International*, vol. 157, p. 111338, jul. 2022, doi: 10.1016/j.foodres.2022.111338.
- [17] V. Timira, K. Meki, Z. Li, H. Lin, M. Xu, y S. N. Pramod, «A comprehensive review on the application of novel disruption techniques for proteins release from microalgae», *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 62, n.º 16, pp. 4309-4325, jun. 2022, doi: 10.1080/10408398.2021.1873734.
- [18] O. Córdova y R. Chamy, «Microalgae to Biogas: Microbiological Communities Involved», en *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*, Elsevier, 2020, pp. 227-249. doi: 10.1016/B978-0-12-817536-1.00015-1.
- [19] 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, Art. n.º 5, ene. 2022, doi: 10.3390/app12052391.

- [20] P. S. Corrêa, W. G. Morais Júnior, A. A. Martins, N. S. Caetano, y T. M. Mata, «Microalgae Biomolecules: Extraction, Separation and Purification Methods», *Processes*, vol. 9, n.º 1, Art. n.º 1, ene. 2021, doi: 10.3390/pr9010010.
- [21] S. Liu, Z. Li, B. Yu, S. Wang, Y. Shen, y H. Cong, «Recent advances on protein separation and purification methods», *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 284, p. 102254, oct. 2020, doi: 10.1016/j.cis.2020.102254.
- [22] L. Grossmann, S. Ebert, J. Hinrichs, y J. Weiss, «Effect of precipitation, lyophilization, and organic solvent extraction on preparation of protein-rich powders from the microalgae *Chlorella protothecoides*», *Algal Research*, vol. 29, pp. 266-276, ene. 2018, doi: 10.1016/j.algal.2017.11.019.
- [23] 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, p. 2100008, 2021, doi: 10.1002/aesr.202100008.
- [24] 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, pp. 1-22, ene. 2009, doi: 10.1016/j.cis.2008.07.004.
- [25] A. Etxabide, T. Garrido, J. Uranga, P. Guerrero, y K. de la Caba, «Extraction and incorporation of bioactives into protein formulations for food and biomedical applications», *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 120, pp. 2094-2105, dic. 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.030.
- [26] L. Hajba, S. Jeong, D. S. Chung, y A. Guttman, «Capillary Gel Electrophoresis of Proteins: Historical overview and recent advances», *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 162, p. 117024, may 2023, doi: 10.1016/j.trac.2023.117024.
- [27] L. B. Santos, R. S. Assis, J. A. Barreto, M. A. Bezerra, C. G. Novaes, y V. A. Lemos, «Deep eutectic solvents in liquid-phase microextraction: Contribution to green chemistry», *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 146, p. 116478, ene. 2022, doi: 10.1016/j.trac.2021.116478.
- [28] A. P. Abbott, G. Capper, D. L. Davies, R. K. Rasheed, y V. Tambyrajah, «Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures», *Chem. Commun.*, n.º 1, pp. 70-71, ene. 2003, doi: 10.1039/B210714G.
- [29] A. Sharma, R. Sharma, R. C. Thakur, y L. Singh, «An overview of deep eutectic solvents: Alternative for organic electrolytes, aqueous systems & ionic liquids for electrochemical energy storage», *Journal of Energy Chemistry*, abr. 2023, doi: 10.1016/j.jechem.2023.03.039.
- [30] Y. P. Mbous, M. Hayyan, A. Hayyan, W. F. Wong, M. A. Hashim, y C. Y. Looi, «Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering—Promises and challenges», *Biotechnology Advances*, vol. 35, n.º 2, pp. 105-134, mar. 2017, doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.11.006.
- [31] A. Prabhune y R. Dey, «Green and sustainable solvents of the future: Deep eutectic solvents», *Journal of Molecular Liquids*, vol. 379, p. 121676, jun. 2023, doi: 10.1016/j.molliq.2023.121676.
- [32] M. del Mar Contreras-Gómez, Á. Galán-Martín, N. Seixas, A. M. da Costa Lopes, A. Silvestre, y E. Castro, «Deep eutectic solvents for improved biomass pretreatment: Current status and future prospective towards sustainable processes», *Bioresource Technology*, vol. 369, p. 128396, feb. 2023, doi: 10.1016/j.biortech.2022.128396.
- [33] T. El Achkar, H. Greige-Gerges, y S. Fourmentin, «Basics and properties of deep eutectic solvents: a review», *Environ Chem Lett*, vol. 19, n.º 4, pp. 3397-3408, ago. 2021, doi: 10.1007/s10311-021-01225-8.
- [34] E. L. Smith, A. P. Abbott, y K. S. Ryder, «Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications», *Chem. Rev.*, vol. 114, n.º 21, pp. 11060-11082, nov. 2014, doi: 10.1021/cr300162p.
- [35] Y. Zhou, W. Wu, N. Zhang, O. P. Soladoye, Y. Zhang, y Y. Fu, «Deep eutectic solvents as new media for green extraction of food proteins: Opportunity and challenges», *Food Research International*, vol. 161, p. 111842, nov. 2022, doi: 10.1016/j.foodres.2022.111842.

- [36] S. P. Ijardar, V. Singh, y R. L. Gardas, «Revisiting the Physicochemical Properties and Applications of Deep Eutectic Solvents», *Molecules*, vol. 27, n.º 4, Art. n.º 4, ene. 2022, doi: 10.3390/molecules27041368.
- [37] Y. Dai y K. H. Row, «Application of Natural Deep Eutectic Solvents in the Extraction of Quercetin from Vegetables», *Molecules*, vol. 24, n.º 12, Art. n.º 12, ene. 2019, doi: 10.3390/molecules24122300.
- [38] Z. Usmani *et al.*, «Biobased natural deep eutectic system as versatile solvents: Structure, interaction and advanced applications», *Science of The Total Environment*, vol. 881, p. 163002, jul. 2023, doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.163002.
- [39] X. Chen, J. Liu, y J. Wang, «Ionic liquids in the assay of proteins», *Analytical Methods*, vol. 2, n.º 9, pp. 1222-1226, 2010, doi: 10.1039/C0AY00342E.
- [40] T. Cai y H. Qiu, «Application of deep eutectic solvents in chromatography: A review», *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 120, p. 115623, nov. 2019, doi: 10.1016/j.trac.2019.115623.
- [41] A. Saini, A. Kumar, P. S. Panesar, y A. Thakur, «Potential of deep eutectic solvents in the extraction of value-added compounds from agro-industrial by-products», *Applied Food Research*, vol. 2, n.º 2, p. 100211, dic. 2022, doi: 10.1016/j.afres.2022.100211.
- [42] Q. Chen *et al.*, «Molecular Property-Tailored Soy Protein Extraction Process Using a Deep Eutectic Solvent», *ACS Sustainable Chem. Eng.*, vol. 9, n.º 30, pp. 10083-10092, ago. 2021, doi: 10.1021/acssuschemeng.1c01848.
- [43] Z. Lin, G. Jiao, J. Zhang, G. B. Celli, y M. S.-L. Brooks, «Optimization of protein extraction from bamboo shoots and processing wastes using deep eutectic solvents in a biorefinery approach», *Biomass Conv. Bioref.*, vol. 11, n.º 6, pp. 2763-2774, dic. 2021, doi: 10.1007/s13399-020-00614-3.
- [44] J. Lin, H. Xiang, D. Sun-Waterhouse, C. Cui, y W. Wang, «Deep eutectic solvents and alkaline extraction of protein from seabuckthorn seed meal: a comparison study», *Food Science and Human Wellness*, vol. 11, n.º 4, pp. 1028-1035, jul. 2022, doi: 10.1016/j.fshw.2022.03.019.
- [45] E. Hernández-Corroto, M. Plaza, M. L. Marina, y M. C. García, «Sustainable extraction of proteins and bioactive substances from pomegranate peel (*Punica granatum* L.) using pressurized liquids and deep eutectic solvents», *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 60, p. 102314, mar. 2020, doi: 10.1016/j.ifset.2020.102314.
- [46] R.-L. Liu, P. Yu, X.-L. Ge, X.-F. Bai, X.-Q. Li, y Q. Fu, «Establishment of an Aqueous PEG 200-Based Deep Eutectic Solvent Extraction and Enrichment Method for Pumpkin (*Cucurbita moschata*) Seed Protein», *Food Anal. Methods*, vol. 10, n.º 6, pp. 1669-1680, jun. 2017, doi: 10.1007/s12161-016-0732-y.
- [47] D. Wang, X.-H. Yang, R.-C. Tang, y F. Yao, «Extraction of Keratin from Rabbit Hair by a Deep Eutectic Solvent and Its Characterization», *Polymers*, vol. 10, n.º 9, Art. n.º 9, sep. 2018, doi: 10.3390/polym10090993.
- [48] T. El Achkar, S. Fourmentin, y H. Greige-Gerges, «Deep eutectic solvents: An overview on their interactions with water and biochemical compounds», *Journal of Molecular Liquids*, vol. 288, p. 111028, ago. 2019, doi: 10.1016/j.molliq.2019.111028.
- [49] O. S. Hammond, D. T. Bowron, y K. J. Edler, «The Effect of Water upon Deep Eutectic Solvent Nanostructure: An Unusual Transition from Ionic Mixture to Aqueous Solution», *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 56, n.º 33, pp. 9782-9785, 2017, doi: 10.1002/anie.201702486.
- [50] F. Gabriele, M. Chiarini, R. Germani, M. Tiecco, y N. Spredi, «Effect of water addition on choline chloride/glycol deep eutectic solvents: Characterization of their structural and physicochemical properties», *Journal of Molecular Liquids*, vol. 291, p. 111301, oct. 2019, doi: 10.1016/j.molliq.2019.111301.
- [51] E. Scholz, *Karl Fischer Titration*. en Chemical Laboratory Practice. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1984. doi: 10.1007/978-3-642-69989-4.

- [52] T. Huang, «Competitive Binding to Cuprous Ions of Protein and BCA in the Bicinchoninic Acid Protein Assay», *TOBEJ*, vol. 4, n.º 1, pp. 271-278, nov. 2010, doi: 10.2174/1874120701004010271.
- [53] «Pierce BCA Protein Assay Kit.pdf».
- [54] S. S. Nielsen, «Phenol-Sulfuric Acid Method for Total Carbohydrates», en *Food Analysis Laboratory Manual*, S. S. Nielsen, Ed., en Food Science Texts Series. Boston, MA: Springer US, 2010, pp. 47-53. doi: 10.1007/978-1-4419-1463-7\_6.
- [55] C. Patrick Doncaster y Andrew J. H. Davey, «Introduction to analysis of variance», en *Analysis of Variance and Covariance How to Choose and Construct Models for the Life Sciences*, Cambridge University Press, 2007, pp. 1-41. [En línea]. Disponible en: doi.org/10.1017/CBO9780511611377

# Anexo

## A. Resultados test LSD para el diseño factorial completo

### A.1 Extracción de proteínas de la biomasa *Scenedesmus almeriensis*

**Tabla A 1.** Resultados LSD del PRY para el tipo de disolvente.

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tipo disolvente	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Agua	14	5,8897%	0,0762887%	X
CHCl-2Gly	14	7,25254%	0,0762887%	X
CHCl-2Urea	14	8,29831%	0,0762887%	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Agua - CHCl-2Gly	*	-1,36284%	0,224367%
Agua - CHCl-2Urea	*	-2,40861%	0,224367%
CHCl-2Gly - CHCl-2Urea	*	-1,04577%	0,224367%

\* indica una diferencia significativa.

**Tabla A 2.** Resultados LSD del PRY para la cantidad de agua.

Método: 95,0 porcentaje LSD

Cantidad agua/g	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0	6	5,93965%	0,116533%	X
3	6	6,41562%	0,116533%	X
6	6	7,08985%	0,116533%	X
10	6	7,41762%	0,116533%	XX
30	6	7,49312%	0,116533%	X
45	6	7,66502%	0,116533%	XX
20	6	8,00707%	0,116533%	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 3	*	-0,475967%	0,342726%
0 - 6	*	-1,150200%	0,342726%
0 - 10	*	-1,477970%	0,342726%
0 - 20	*	-2,067420%	0,342726%
0 - 30	*	-1,553470%	0,342726%
0 - 45	*	-1,725370%	0,342726%
3 - 6	*	-0,674233%	0,342726%
3 - 10	*	-1,002000%	0,342726%
3 - 20	*	-1,591450%	0,342726%
3 - 30	*	-1,077500%	0,342726%
3 - 45	*	-1,249400%	0,342726%
6 - 10		-0,327767%	0,342726%
6 - 20	*	-0,917217%	0,342726%
6 - 30	*	-0,403267%	0,342726%
6 - 45	*	-0,575167%	0,342726%
10 - 20	*	-0,589450%	0,342726%
10 - 30		-0,075500%	0,342726%
10 - 45		-0,247400%	0,342726%
20 - 30	*	0,513950%	0,342726%
20 - 45		0,342050%	0,342726%
30 - 45		-0,171900%	0,342726%

\* indica una diferencia significativa.

## A.2 Ratio proteínas/carbohidratos extraídos de la biomasa *Scenedesmus almeriensis*

**Tabla A 3.** Resultados LSD del PCR para el tipo de disolvente.

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tipo disolvente	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Agua	14	0,484286	0,0062133	X
CHCl <sub>2</sub> Gly	14	0,601429	0,0062133	X
CHCl <sub>2</sub> Urea	14	0,663571	0,0062133	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Agua - CHCl <sub>2</sub> Gly	*	-0,117143	0,0182735
Agua - CHCl <sub>2</sub> Urea	*	-0,179286	0,0182735
CHCl <sub>2</sub> Gly - CHCl <sub>2</sub> Urea	*	-0,0621429	0,0182735

\* indica una diferencia significativa.

**Tabla A 4.** Resultados LSD del PCR para la cantidad de agua.

Método: 95,0 porcentaje LSD

Cantidad agua/g	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0	6	0,540000	0,00949101	X
3	6	0,540000	0,00949101	X
6	6	0,588333	0,00949101	X
10	6	0,588333	0,00949101	X
30	6	0,595000	0,00949101	X
45	6	0,598333	0,00949101	X
20	6	0,631667	0,00949101	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 3		0,0000000	0,0279133
0 - 6	*	-0,0483333	0,0279133
0 - 10	*	-0,0483333	0,0279133
0 - 20	*	-0,0916667	0,0279133
0 - 30	*	-0,0550000	0,0279133
0 - 45	*	-0,0583333	0,0279133
3 - 6	*	-0,0483333	0,0279133
3 - 10	*	-0,0483333	0,0279133
3 - 20	*	-0,0916667	0,0279133
3 - 30	*	-0,0550000	0,0279133
3 - 45	*	-0,0583333	0,0279133
6 - 10		0,0000000	0,0279133
6 - 20	*	-0,0433333	0,0279133
6 - 30		-0,0066667	0,0279133
6 - 45		-0,0100000	0,0279133
10 - 20	*	-0,0433333	0,0279133
10 - 30		-0,0066667	0,0279133
10 - 45		-0,0100000	0,0279133
20 - 30	*	0,0366667	0,0279133
20 - 45	*	0,0333333	0,0279133
30 - 45		-0,0033333	0,0279133

\* indica una diferencia significativa.

## B. Resultados test LSD para el diseño L9

### B.1 Extracción de proteínas de la microalga *Chlorella vulgaris*

**Tabla A 5.** Resultados LSD del PRY para la temperatura.

Método: 95,0 porcentaje LSD

Temperatura / °C	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
40	6	10,3950%	0,145669%	X
30	6	10,5667%	0,145669%	X
20	6	10,5833%	0,145669%	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
20 - 30		0,016667%	0,466021%
20 - 40		0,188333%	0,466021%
30 - 40		0,171667%	0,466021%

\* indica una diferencia significativa.

**Tabla A 6.** Resultados LSD del PRY para el tiempo.

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tiempo / h	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	6	10,3567%	0,145669%	X
0,5	6	10,4683%	0,145669%	X
2	6	10,7200%	0,145669%	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0,5 - 1		0,111667%	0,466021%
0,5 - 2		-0,251667%	0,466021%
1 - 2		-0,363333%	0,466021%

\* indica una diferencia significativa.

**Tabla A 7.** Resultados LSD del PRY para el pretratamiento.

Método: 95,0 porcentaje LSD

Pretratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Nada	6	9,6700%	0,145669%	X
Manual	6	10,2100%	0,145669%	X
Discos	6	11,6650%	0,145669%	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Discos - Manual	*	1,4550%	0,466021%
Discos - Nada	*	1,9950%	0,466021%
Manual - Nada	*	0,5400%	0,466021%

\* indica una diferencia significativa.



**Tabla A 8.** Resultados LSD del PRY para la ratio.

Método: 95,0 porcentaje LSD

Ratio	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
3	6	9,92833%	0,145669%	X
6	6	10,5500%	0,145669%	X
12	6	11,0667%	0,145669%	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
3 - 6	*	-0,621667%	0,466021%
3 - 12	*	-1,13833%	0,466021%
6 - 12	*	-0,516667%	0,466021%

\* indica una diferencia significativa.

## B.2 Extracción de proteínas de la biomasa *Scenedesmus almeriensis*

**Tabla A 9.** Resultados LSD del PRY para la temperatura.

Método: 95,0 porcentaje LSD

Temperatura / °C	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
20	6	11,0683%	0,184306%	X
30	6	11,9467%	0,184306%	X
40	6	12,1983%	0,184306%	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
20 - 30	*	-0,878333%	0,589627%
20 - 40	*	-1,130000%	0,589627%
30 - 40		-0,251667%	0,589627%

\* indica una diferencia significativa.

**Tabla A 10.** Resultados LSD del PRY para el tiempo.

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tiempo / h	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0,5	6	11,4733%	0,184306%	X
1	6	11,6217%	0,184306%	XX
2	6	12,1183%	0,184306%	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0,5 - 1		-0,148333%	0,589627%
0,5 - 2	*	-0,645000%	0,589627%
1 - 2		-0,496667%	0,589627%

\* indica una diferencia significativa.

**Tabla A 11.** Resultados LSD del PRY para el pretratamiento.

Método: 95,0 porcentaje LSD

Pretratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Nada	6	9,09833%	0,18431%	X
Manual	6	10,5250%	0,18431%	X
Discos	6	15,5900%	0,18431%	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Discos - Manual	*	5,06500%	0,58963%
Discos - Nada	*	6,49167%	0,58963%
Manual - Nada	*	1,42667%	0,58963%

\* indica una diferencia significativa.

**Tabla A 12.** Resultados LSD del PRY para la ratio.

Método: 95,0 porcentaje LSD

Ratio	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
3	6	10,6233%	0,184306%	X
6	6	11,9533%	0,184306%	X
12	6	12,6367%	0,184306%	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
3 - 6	*	-1,330000%	0,589627%
3 - 12	*	-2,013330%	0,589627%
6 - 12	*	-0,683333%	0,589627%

\* indica una diferencia significativa.

### B.3 Ratio proteínas/carbohidratos extraídos de la microalga *Chlorella vulgaris*

**Tabla A 13.** Resultados LSD del PCR para la temperatura.

Método: 95,0 porcentaje LSD

Temperatura / °C	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
40	6	0,421667	0,00700529	X
30	6	0,455000	0,00700529	X
20	6	0,471667	0,00700529	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
20 - 30		0,0166667	0,0224112
20 - 40	*	0,0500000	0,0224112
30 - 40	*	0,0333333	0,0224112

\* indica una diferencia significativa.

**Tabla A 14.** Resultados LSD del PCR para el tiempo.

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tiempo / h	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
2	6	0,441667	0,00700529	X
1	6	0,451667	0,00700529	X
0,5	6	0,455000	0,00700529	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0,5 - 1		0,00333333	0,0224112
0,5 - 2		0,0133333	0,0224112
1 - 2		0,0100000	0,0224112

\* indica una diferencia significativa.

**Tabla A 15.** Resultados LSD del PCR para el pretratamiento.

Método: 95,0 porcentaje LSD

Pretratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Discos	6	0,420000	0,00700529	X
Nada	6	0,451667	0,00700529	X
Manual	6	0,476667	0,00700529	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Discos - Manual	*	-0,0566667	0,0224112
Discos - Nada	*	-0,0316667	0,0224112
Manual - Nada	*	0,0250000	0,0224112

\* indica una diferencia significativa.

**Tabla A 16.** Resultados LSD del PCR para la ratio.

Método: 95,0 porcentaje LSD

Ratio	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
3	6	0,425000	0,00700529	X
6	6	0,443333	0,00700529	X
12	6	0,480000	0,00700529	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
3 - 6		-0,0183333	0,0224112
3 - 12	*	-0,0550000	0,0224112
6 - 12	*	-0,0366667	0,0224112

\* indica una diferencia significativa.

#### B.4 Ratio proteínas/carbohidratos extraídos de la biomasa *Scenedesmus almeriensis*

**Tabla A 17.** Resultados LSD del PCR para la temperatura.

Método: 95,0 porcentaje LSD

Temperatura / °C	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
20	6	0,665000	0,00816497	X
40	6	0,671667	0,00816497	X
30	6	0,740000	0,00816497	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
20 - 30	*	-0,0750000	0,0261212
20 - 40		-0,00666667	0,0261212
30 - 40	*	0,0683333	0,0261212

\* indica una diferencia significativa.

**Tabla A 18.** Resultados LSD del PCR para el tiempo.

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tiempo / h	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0,5	6	0,663333	0,00816497	X
2	6	0,705000	0,00816497	X
1	6	0,708333	0,00816497	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0,5 - 1	*	-0,0450000	0,0261212
0,5 - 2	*	-0,0416667	0,0261212
1 - 2		0,00333333	0,0261212

\* indica una diferencia significativa.

**Tabla A 19.** Resultados LSD del PCR para el pretratamiento.

Método: 95,0 porcentaje LSD

Pretratamiento	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Nada	6	0,663333	0,00816497	X
Manual	6	0,681667	0,00816497	X
Discos	6	0,731667	0,00816497	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Discos - Manual	*	0,050000	0,0261212
Discos - Nada	*	0,0683333	0,0261212
Manual - Nada		0,0183333	0,0261212

\* indica una diferencia significativa.

**Tabla A 20.** Resultados LSD del PCR para la ratio.

Método: 95,0 porcentaje LSD

Ratio	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
3	6	0,625000	0,00816497	X
6	6	0,706667	0,00816497	X
12	6	0,745000	0,00816497	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
3 - 6	*	-0,0816667	0,0261212
3 - 12	*	-0,1200000	0,0261212
6 - 12	*	-0,0383333	0,0261212

\* indica una diferencia significativa.