



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**Valorización de residuos de plantas de
tratamiento de aguas mediante el uso de
disolventes verdes.**

Autora: Paloma Martínez-Sagarra Crespo

Tutoras: Patricia Fernández Requejo y

David Moldes Plaza

Año 2024

Resumen

El aumento en la demanda de proteínas está motivando la búsqueda de soluciones sostenibles que cubran esta necesidad sin afectar negativamente al medio ambiente. Las microalgas han surgido como una prometedora fuente de proteínas y otras biomoléculas de interés. Este estudio se ha enfocado en la optimización de la extracción de proteínas, minimizando la coextracción de carbohidratos, de la microalga *Scenedesmus almeriensis*, tanto pura, como cultivada en purín de cerdo.

En este trabajo, se ha investigado la aplicación del disolvente eutéctico profundo (DES) formado por cloruro de colina y urea en la relación molar 1:2 como agente de extracción. Se llevaron a cabo dos diseños. Primero, se evaluó el efecto de cuatro factores (temperatura, tiempo de contacto, pretratamiento de la biomasa y ratio DES:biomasa) en el proceso de extracción de proteínas de la microalga pura empleando un diseño L9 de Taguchi. Mediante un análisis de varianza (ANOVA), se identificaron los factores significativos y se propusieron las condiciones óptimas en comparación con los resultados obtenidos previamente para la biomasa cultivada en purín, el cual fue un estudio realizado previamente en el grupo de investigación. Además, se determinó que, el factor más influyente para ambos tipos de biomasa fue el pretratamiento, siendo el morterado de discos con el que mejores resultados se obtuvieron. Posteriormente, se investigó la influencia del uso de ultrasonidos (US) en la eficiencia del proceso de extracción de proteínas a diferentes tiempos y temperaturas, empleando un diseño factorial completo tanto para la biomasa pura como la cultivada en purín.

Los resultados indicaron que el uso de US no mejoró significativamente la extracción bajo las condiciones probadas, pero que, las condiciones de extracción óptimas identificadas hacen que la eficiencia del proceso mejore de forma considerable, reforzando la idea de la viabilidad de las microalgas como fuente sostenible de proteínas.

Abstract

The increasing demand for proteins is driving the search for sustainable solutions that meet this need without negatively impacting the environment. Microalgae have emerged as a promising source of proteins and other valuable biomolecules. This study focuses on optimizing protein extraction from the microalgae *Scenedesmus almeriensis*, both in its pure form and when grown in pig manure.

In this work, a Deep Eutectic Solvent (DES) composed of choline chloride and urea in a 1:2 molar ratio was used as the extraction agent. Two experimental designs were conducted. First, a Taguchi L9 design was applied for protein extraction from pure microalgae, considering four factors: temperature, contact time, biomass pretreatment, and the DES ratio. Through an analysis of variance (ANOVA), significant factors were identified, and optimal conditions were proposed. These were compared with previously obtained results for biomass cultivated in slurry, a study conducted earlier by the research group. It was determined that the most important and influential factor for both types of biomasses was the pretreatment method, with disc mortaring yielding the best results. Subsequently, the influence of ultrasound (US) on protein extraction was studied at different times and temperatures using a complete factorial design for both pure biomass and that cultivated in manure.

The results indicated that the use of US did not significantly improve extraction under the tested conditions. However, the optimal extraction conditions identified significantly enhanced the process's efficiency, reinforcing the viability of microalgae as a sustainable protein source.

Índice

1	Introducción.....	1
1.1	Problemática del incremento de la demanda proteínas	1
1.2	Microalgas como fuente de proteínas	2
1.3	Extracción de proteínas.....	2
1.4	Disolventes eutécticos profundos (DES).....	3
1.4.1	DES para la extracción de proteínas	6
2	Objetivos y plan de trabajo.....	8
3	Materiales y Métodos.....	9
3.1	Reactivos y equipos generales	9
3.2	Biomasa utilizada y caracterización	9
3.3	Preparación del DES.....	10
3.4	Extracción de proteínas.....	10
3.4.1	Diseño L ₉ (3 ⁴) de Taguchi.....	11
3.4.2	Extracción asistida por ultrasonidos	14
3.5	Métodos de cuantificación de proteínas y carbohidratos.....	16
3.5.1	Método del BCA para la determinación de proteínas.....	16
3.5.2	Método del fenol-sulfúrico para la determinación de carbohidratos.....	17
3.6	Análisis estadístico	19
4	Resultados y Discusión	20

4.1	Diseños L9 para la extracción de proteínas	20
4.1.1	Resultados de ANOVA.....	20
4.1.2	Comparación de resultados biomasa pura vs biomasa purín	21
4.2	Extracción asistida por ultrasonidos	25
4.2.1	ANOVA de tres factores.....	25
4.2.2	ANOVA de dos factores: comparación biomasa pura vs biomasa purín ...	27
5	Conclusiones.....	31
6	Referencias	32
7	Anexo	37
7.1	Resultados L9.....	37
7.2	Resultados de ultrasonidos.....	38

1 Introducción

1.1 Problemática del incremento de la demanda proteínas

Las proteínas son uno de los macronutrientes esenciales para el crecimiento y el mantenimiento de la unidad biológica, realizando diversas funciones en este. Además, son componentes esenciales de células y tejidos [1]. Algunas proteínas celulares son proteínas estructurales, que, en asociación con varios lípidos y carbohidratos, forman las estructuras de los diversos orgánulos intracelulares. Sin embargo, la mayoría de las proteínas son enzimas que catalizan diferentes reacciones químicas en las células. Por ejemplo, las enzimas promueven todas las reacciones oxidativas que suministran energía a la célula y promueven la síntesis de todas las sustancias químicas celulares, como el ATP [2]. El creciente interés en la salud y el bienestar ha llevado a un aumento drástico del consumo de proteínas, que se han convertido en componentes esenciales de la dieta humana, necesarias para el crecimiento, la reparación de tejidos, y producción de enzimas y hormonas [3]. Es por todo esto por lo que la demanda global de proteínas cada vez es mayor y se prevé que siga aumentando de manera significativa en un futuro cercano.

Actualmente, las proteínas de la dieta provienen principalmente de fuentes animales (carne, huevo, pescado y lácteos) y en menor medida de fuentes vegetales (legumbres), lo que supone un serio problema medioambiental [4]. Un ejemplo es la producción de carne, especialmente de vacuno, que genera altas emisiones de gases contaminantes, contribuyendo al efecto invernadero. La producción ganadera intensiva, es decir, aquella que busca maximizar la producción en el menor tiempo posible y con la menor superficie de terreno, provoca que no exista suficiente superficie para el reciclaje de los desechos del ganado, lo que conduce a sobrecargas de nutrientes y contaminación. A menudo, la ganadería extensiva más tradicional, que se basa en el uso de grandes terrenos donde los animales pueden pastar libremente, se mantiene en entornos donde la deforestación y la degradación de la tierra reflejan debilidades en las instituciones y en las políticas [5]. Por todos estos motivos, es necesaria la búsqueda de nuevas fuentes de proteínas que sean medioambientalmente más sostenibles.

1.2 Microalgas como fuente de proteínas

Recientemente, debido a numerosas investigaciones, la biomasa de microalgas se está postulando como una alternativa prometedora a las actuales fuentes de proteínas de origen vegetal [6]. En promedio, la mayoría de las especies de microalgas tiene un contenido proteico similar o mayor al de otras fuentes vegetales convencionales terrestres, como por ejemplo la soja o trigo [7], [8]. Aunque las especies de microalgas contienen niveles de proteínas diferentes en función de la especie, género o condiciones en las que ha sido cultivada, de manera general las microalgas tienen una composición química que contiene entre 7 y 23 % (m/m) de lípidos, 5-23 % (m/m) de hidratos de carbono y entre 6 y 52 % (m/m) de proteínas, en base de materia seca [9].

Por otro lado, la producción de microalgas es un mecanismo natural importante para reducir el exceso de CO₂ gracias a la fotosíntesis [10], [11]. Además, las aguas residuales que contienen niveles altos de nitrógeno, fósforo e incluso contaminantes emergentes como antibióticos, pueden causar eutrofización si se liberan en aguas naturales sin el tratamiento adecuado [6]. Debido a este problema, la aplicación de microalgas como agente fitoremediador para eliminar los contaminantes de las aguas residuales ha ganado un gran interés [12]. Además, las microalgas, tienen muchas aplicaciones industriales, por ejemplo, productos farmacéuticos, biocombustibles, acuicultura... incluida la integración en el cultivo de marisco. La integración de la acuicultura de moluscos y las microalgas proporciona incentivos económicos porque las aguas residuales de la acuicultura cargadas de nutrientes que podrían haberse desechado en el medio ambiente pueden utilizarse para producir microalgas y desarrolla un papel clave en el logro del objetivo a largo plazo del desarrollo sostenible y el apoyo a la economía circular [13].

Por estos motivos, las microalgas son un valioso recurso biológico, que representa una de las fuentes más prometedoras para nuevos productos y aplicaciones [14].

1.3 Extracción de proteínas

A la hora de extraer biocompuestos de microalgas, el principal problema se encuentra en la pared celular [15]. La pared celular varía en función de la etapa de crecimiento, la

forma celular o factores ambientales [16]. En los métodos que se usan actualmente, la extracción consta de tres etapas, siendo la primera la disrupción celular. Las paredes de las microalgas son muy resistentes, compuestas de polisacáridos y proteínas conectadas, y varía según los factores ambientales a los que se vea sometida la microalga, o la forma celular. Por eso es crucial este primer paso de disrupción celular en el cual se liberan los compuestos de interés del interior de la célula a través de métodos físicos (morterado, homogeneización a alta presión, irradiación por microondas, ultrasonidos -US- o campos eléctricos pulsados), químicos (hidrólisis ácida o alcalina, y térmica) o biológicos (uso de enzimas para descomponer la pared celular o crear huecos en ella). Posteriormente se produce la recuperación selectiva de los biocompuestos. Para obtener selectivamente la máxima cantidad posible de los compuestos que se requieran, es necesario el uso de un método convencional, ya sea precipitación, separación por membranas, técnicas cromatográficas, extracción con solventes o electroforesis [17]. Para terminar, se purifica el compuesto de interés [17], [18].

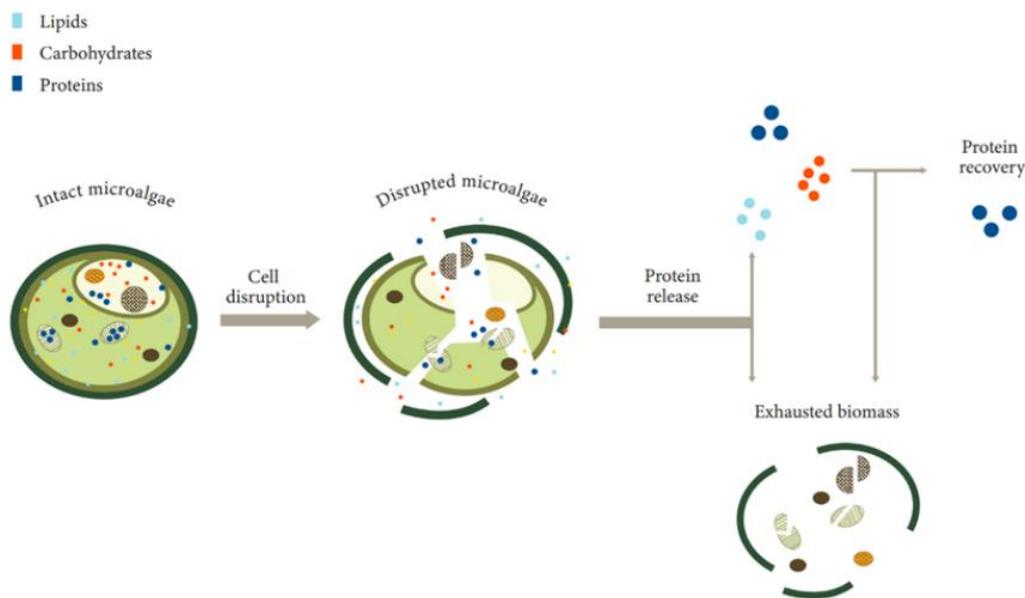


Figura 1. Esquema de extracción de proteínas a partir de biomasa algal. Extraído de [17].

1.4 Disolventes eutécticos profundos (DES)

En la industria, los métodos de extracción más utilizados son aquellos que implican una gran cantidad de disolventes que son tóxicos, volátiles e inflamables. Estos disolventes

representan un riesgo para la salud y el medio ambiente [20]. Con el fin de alcanzar métodos más sostenibles, se están buscando métodos alternativos para así minimizar el impacto ambiental del proceso y preservar la integridad de las proteínas [21].

Aquí es donde entran en juego los disolventes eutécticos profundos (DES, deep eutectic solvents), concepto propuesto por Abbott et al. [22] en 2003. Estos disolventes poseen propiedades interesantes, como: baja volatilidad (lo que reduce el riesgo de evaporación y mejora la seguridad ambiental), alta biodegradabilidad y baja toxicidad, viscosidad moderada, así como una gran estabilidad térmica, siendo capaces de disolver fácilmente una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos [23]. Un DES se prepara a partir de dos o más componentes individuales, estos suelen ser fácilmente biodegradables, baratos, no tóxicos e incluso pueden ser compuestos naturales. En la **Figura 2** se muestran los principales dadores y aceptores de enlaces de hidrógeno a utilizados en la preparación de DES:

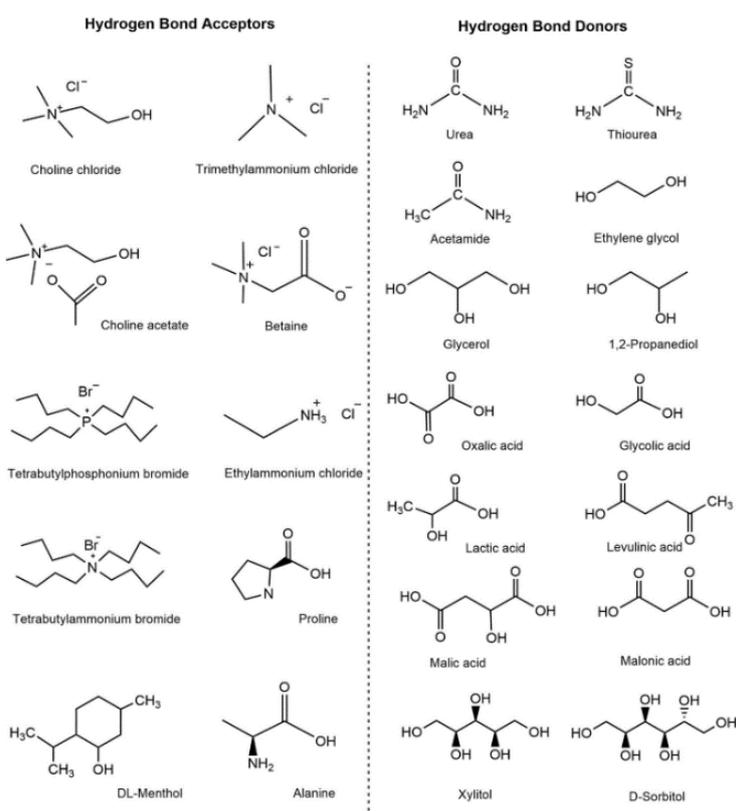


Figura 2. Típicos aceptores y dadores de enlaces de hidrógeno para la formación de disolventes eutécticos profundos (DES). Figura extraída de [25].

Dependiendo de los componentes utilizados para su formación, los DES se pueden clasificar en diferentes grupos o tipos como se puede observar en Tabla 1.

Tabla 1. Tipos de DES, junto a su fórmula general y los componentes de cada uno [25], [26], [15].

TIPO DE DES	FÓRMULA GENERAL	COMPONENTES
I	$Cat^+ X^- \cdot z MCl_n$	HBA y cloruro metálico
II	$Cat^+ X^- \cdot z MCl_n \cdot H_2O$	HBA y cloruro metálico hidratado
III	$Cat^+ X^- \cdot z RZ$	HBA y HBD
IV	$MCl_n + RZ = MCl_{n+1}^+ \cdot RZ + MCl_{n+1}^-$	Cloruro metálico y HBD
V	DES no iónicos	Componentes moleculares

Además, la preparación del DES sólo requiere la mezcla de los compuestos (no se produce reacción química) y el calentamiento de productos químicos de fácil acceso con una relación molar adecuada, tal que el punto eutéctico de la mezcla disminuye fuertemente. Esta mezcla consta de un dador de enlace de hidrógeno (HBD) y un aceptor de enlace de hidrógeno (HBA) que, al combinarse, forman una estructura estable de enlaces de hidrógeno a temperaturas significativamente más bajas que las de sus componentes individuales, es decir, el punto de fusión del sistema resultante es más bajo que el de los componentes por separado [24]. En la Figura 3, se puede observar un diagrama de fase binario en el que se ve la temperatura de fusión en función de la composición de la mezcla. Además, también se observan la temperatura eutéctica ideal y real de una mezcla de dos compuestos, A y B [25]. Por lo tanto, los DES se consideran una clase de disolventes energéticamente eficientes, rentables y respetuosos con el medio ambiente [23].

Los DES se introdujeron como una alternativa más sostenible a los líquidos iónicos (IL, ionic liquids) a principios del siglo XXI, ya que, aunque comparten muchas propiedades, los IL generalmente requieren procesos de síntesis más complejos, sus componentes son más caros, y algunos pueden ser tóxicos [25].

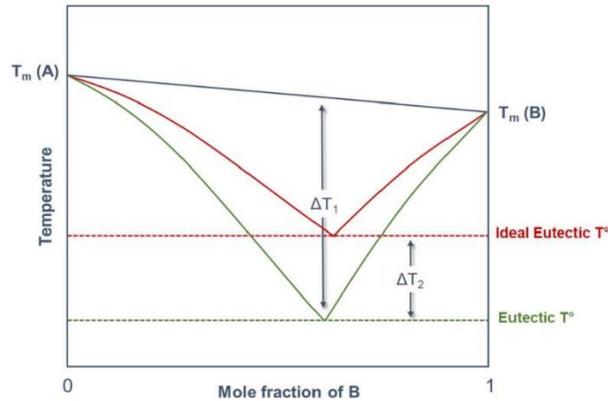


Figura 3. Diagrama de fase sólido-líquido que representa una mezcla eutéctica ideal simple (línea roja) y una mezcla eutéctica profunda (línea verde) [25].

Cabe destacar un grupo de DES que se denominan disolventes eutécticos profundos naturales (NADES). Esto quiere decir que su composición es una mezcla de metabolitos naturales, como pueden ser azúcares, aminoácidos u ácidos orgánicos [26]. Sin embargo, muchas veces se usa simplemente el término DES, que es el que se utilizará en este trabajo. En este estudio se ha utilizado una mezcla de cloruro de colina y urea, ambos metabolitos presentes en el organismo. La colina forma parte del grupo de vitaminas B4, es un compuesto económico, sostenible y junto con la urea se utilizan en una amplia gama de aplicaciones, incluyendo la extracción de biomoléculas, la catálisis y la síntesis de materiales avanzados [27]. La urea, a su vez, presenta baja toxicidad y, además, es biodegradable [28].

1.4.1 DES para la extracción de proteínas

Existen numerosos estudios que respaldan la eficacia de los DES en la extracción de proteínas, debido a su capacidad de formar fuertes interacciones de enlace de hidrógeno con las proteínas [29], [30], [31], [32]. Estas interacciones facilitan la disolución y extracción de proteínas de matrices complejas como las microalgas, conduciendo a buenos rendimientos sin degradar las proteínas [17]. Por ejemplo, Zhen Lin et al. [33] estudiaron la extracción de proteínas de brotes de bambú en tres partes diferentes del brote: el extremo tierno (TBS), el brote basal (BBS) y la vaina; y compararon los

resultados entre el uso de DES (ChCl:ácido levulínico en la relación molar 1:6) con la extracción alcalina convencional (NaOH). A continuación, se muestra la Tabla 2 con los resultados obtenidos en el estudio.

Tabla 2. Resultados del rendimiento de extracción de proteínas utilizando DES versus un disolvente convencional (NaOH) [33].

Parte del bambú	Rendimiento con DES %(m/m)	Rendimiento con NaOH %(m/m)
TBS	3.92 ± 0.12	2.39 ± 0.11
BBS	1.55 ± 0.03	1.70 ± 0.01
Vaina	0.95 ± 0.02	0.83 ± 0.09

Como se puede observar, el rendimiento de recuperación de proteínas obtenido con el DES como agente de extracción fue mayor que con el disolvente convencional. Además, los residuos sólidos restantes después de la extracción de proteínas con DES podrían utilizarse en un enfoque de biorrefinería para su valorización como fuente de fibra dietética y otros compuestos de interés [34].

No obstante, aunque existen muchos estudios que muestran el prometedor potencial de los DES en la extracción de proteínas, se puede mejorar la eficiencia de la extracción combinándola con otras técnicas como los ultrasonidos (US) o microondas (MW) [35]. Puesto que los ultrasonidos emplean ondas sonoras de alta frecuencia que inducen cavitación acústica, generando microburbujas que, al colapsar, crean fuerzas mecánicas intensas. Estas fuerzas son capaces de romper las paredes celulares de las microalgas, facilitando la liberación de proteínas y otros compuestos intracelulares sin necesidad de químicos agresivos obteniéndose mejores eficiencias en la extracción [36].

Un ejemplo de ello el trabajo publicado por Vishal Sharma et al. en él que determinaron las proteínas presentes en harina de Sacha inchi, planta que produce semillas ricas en proteínas y lípidos. Se utilizaron diferentes DES, siendo el que mejores rendimientos obtuvo el de ChCl y glicerol, en relación molar 1:2. Aplicaron ultrasonidos durante 40 minutos, a 60 °C, con un contenido de agua en el DES de 50 % (p/p). Este procedimiento se llevó a cabo mediante ciclos de 5 segundos de pulso y 15 de descanso. Los resultados mostraron que los ultrasonidos mejoraban la extracción de proteínas [12].

2 Objetivos y plan de trabajo

Este Trabajo de Fin de Grado forma parte de un proyecto de investigación, cuyo objetivo general es la extracción de compuestos de alto valor añadido, como proteínas y carbohidratos, a partir de biomasa crecida en aguas residuales urbanas y ganaderas utilizando técnicas de separación sostenibles.

El objetivo general de este trabajo es la extracción de proteínas a partir de biomasa microalgal, minimizando la coextracción de carbohidratos, utilizando el DES cloruro de colina: urea en la relación molar 1:2.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Aplicar el DES en la extracción de proteínas a partir de biomasa microalgal crecida en un medio sintético. Se analizó la influencia de 4 factores controlables en el proceso de extracción.
- Comparar los resultados con los obtenidos para la extracción de proteínas con el mismo DES y la misma microalga crecida en purín de cerdo (trabajo previamente realizado en el grupo de investigación).
- En las condiciones óptimas obtenidas para ambas biomasas, estudiar el uso de ultrasonidos para evaluar si su aplicación mejora la extracción de proteínas.
- Analizar en qué condiciones experimentales se maximiza la extracción de proteínas minimizando la coextracción de carbohidratos.

3 Materiales y Métodos

3.1 Reactivos y equipos generales

Reactivos:

- Urea, pureza ≥ 98 %.
- Cloruro de colina, pureza ≥ 99 %.
- Ácido sulfúrico concentrado, pureza 96-98 %.
- Fenol, pureza ≥ 99 %.
- Glucosa anhidra, pureza ≥ 98 %.
- Kit de ensayo de proteínas Pierce™ BCA Protein Assay Kit.

Equipos:

- Molino de discos Retsch.
- Incubador con agitación orbital (Optic Ivymen System).
- Balanza analítica Entris 220 g \pm 0.1 mg.
- Espectrofotómetro UV/Vis Spectronic Geneseys 5.
- Agitador Vortex Arex Digital (Velp Scientifica).
- Centrífuga PK120 (ALC)
- Baño de ultrasonidos con calefacción y temporizador, ULTR.

3.2 Biomasa utilizada y caracterización

En este estudio se ha utilizado como biomasa la microalga *Scenedesmus almeriensis*, tanto pura, como cultivada en purín de cerdo. Para evitar su posible degradación, se liofilizaron y se almacenaron a $T \leq 25$ °C hasta su posterior uso. Ya que el objetivo de este trabajo es determinar el porcentaje extraído de proteínas minimizando el de carbohidratos, lo primero que se hizo fue caracterizar la biomasa para conocer la cantidad inicial presente de ambos antes de la extracción.

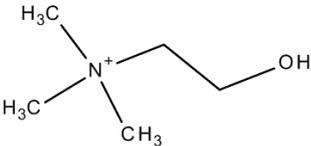
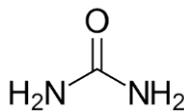
Las proteínas se determinaron por un método volumétrico, el método Kjeldahl. Este analiza la cantidad de nitrógeno total presente en la biomasa y posteriormente, puede ser convertido en proteína inicial a través de un factor de conversión, f (para este trabajo, $f = 5.95$) [37]. El contenido de carbohidratos de la biomasa inicial se ha determinado como monosacáridos totales utilizando un procedimiento descrito por Martín-Juárez et

al., que consiste en la hidrólisis ácida de los carbohidratos presentes en la biomasa y posterior cuantificación de los monosacáridos generados mediante HPLC-IR [38]. Los resultados obtenidos fueron, 41.3 % y 21.5 % de proteínas y carbohidratos iniciales respectivamente para el alga pura, y 44.5 % de proteínas y 20,4 % de carbohidratos para la cultivada en purín de cerdo.

3.3 Preparación del DES

Para la preparación del DES se ha utilizado cloruro de colina (ChCl), el cual va a actuar como aceptor de enlaces de hidrógeno (HBA), y urea, que actúa como donador de enlaces de hidrógeno (HBD). Los dos compuestos se pesaron en un matraz Erlenmeyer y se dejaron aproximadamente durante dos horas a una temperatura de 60 °C, con una agitación de 500 rpm, hasta obtención de un líquido transparente e incoloro. Se guardó en estufa a 30 °C para evitar su solidificación a temperaturas bajas en los meses de invierno. En la Tabla 3, se muestran las estructuras del cloruro de colina y de la urea.

Tabla 3. Estructuras del HBA y HBD necesarios para la formación del DES.

HBA	HBD
Cloruro de colina	Urea
Cl^- 	

3.4 Extracción de proteínas

Con el objetivo de maximizar la extracción de proteínas a partir de la biomasa microalgal minimizando en lo posible la coextracción de carbohidratos, se llevaron a cabo diferentes diseños experimentales para identificar los factores principales que influyen en el proceso

de extracción. Por una parte, se continuó con el trabajo realizado el curso 22-23 por la alumna Sara Rebaque, aplicando un diseño L9 de Taguchi para analizar la influencia de 4 factores, a 3 niveles cada uno, en la extracción de proteínas. La diferencia es que en este trabajo se realiza el diseño para la microalga *Scenedesmus almeriensis* crecida en un medio sintético, la cual a partir de ahora se la denominará pura, mientras que en el trabajo anterior se aplicó a la microalga crecida en purín, para así evaluar si el tipo de medio de cultivo tiene influencia en la eficiencia de la extracción de proteínas.

Posteriormente, se analizó la influencia de la aplicación de ultrasonidos (US) como pretratamiento de la biomasa previo al proceso de extracción. Así, se eligieron las condiciones óptimas derivadas de ambos diseños L9, buscándose una solución de compromiso para ambas biomásas. Se implementó un diseño factorial completo de tres factores ($2^1 \cdot 3^2$), uno a dos niveles (el tipo de biomasa) y otros dos a tres niveles, para la microalga pura y la cultivada en purín de cerdo. Para la realización de ambos diseños se adicionaron 20 g de agua a la biomasa, ya que fue la cantidad de agua óptima obtenida en el estudio previamente realizado en el grupo de investigación.

3.4.1 Diseño L₉ (3⁴) de Taguchi

Para estudiar el efecto de 4 factores a 3 niveles con un diseño factorial completo (efectos principales y sus respectivas interacciones), el número de experimentos necesarios sería muy elevado ($3^4 = 81$). Sin embargo, si sólo nos interesa encontrar los efectos principales con el mínimo número de experimentos, entonces una buena opción es usar un diseño L9 de Taguchi (donde sólo se requieren 9 experimentos) [39]. Para ello, se toman las combinaciones de niveles adecuadas que permitan calcular el efecto de cada factor. Los factores estudiados fueron: la temperatura de extracción, el tiempo de contacto, la ratio DES:biomasa, y el tipo pretratamiento de la biomasa. En la Tabla , se muestran los factores estudiados y sus niveles, junto con el código numérico empleado para facilitar su identificación.

Tabla 4. Factores y niveles para el diseño L9 Taguchi.

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

En la Tabla , se muestran las combinaciones llevadas a cabo en este estudio. En este apartado solo se realizó la extracción de proteínas a partir de la biomasa *Scenedesmus almeriensis* pura.

Tabla 5. Combinaciones propuestas para el diseño L9 de Taguchi

Temperatura / °C	Tiempo / h	Pretratamiento	Ratio
1	1	1	1
2	2	1	3
1	2	2	2
1	3	3	3
2	1	3	2
3	2	3	1
3	1	2	3
2	3	2	1
3	3	1	2

Se eligieron tres temperaturas de extracción, 20, 30 y 40 °C, para evaluar su influencia en la recuperación de proteínas. No se eligieron temperaturas mayores para evitar la degradación de las proteínas extraídas. Otro factor analizado fue el tiempo de contacto entre la biomasa y el DES, 0.5, 1 y 2 h, con el fin de evaluar si se podía reducir el tiempo

del proceso de extracción. Además, se modificó la ratio DES:biomasa, 3, 6, y 12, para analizar si se podía ahorrar disolvente o si incrementando un poco respecto a la de 9:1 utilizada previamente, se obtenían mejores resultados. Por último, se estudió el tipo de pretratamiento de la microalga para intentar favorecer la ruptura de la pared celular, facilitando así la liberación de compuestos, siendo estos niveles: no hacer nada, morterado manual, o usando morterado de discos.

Las etapas del procedimiento de extracción que se llevaron a cabo fueron las siguientes (en la Figura 4 aparece un esquema del procedimiento experimental):

1. En un Erlenmeyer, se pesan ≈ 0.5 g de biomasa liofilizada.
2. Se añade la cantidad de DES adecuada en función de la ratio del diseño.
3. Se añaden 20 g de agua desionizada.
4. Se tapa la boca del Erlenmeyer con papel de aluminio y se lleva al incubador el tiempo correspondiente, con agitación a 500 rpm.
5. Tras el tiempo adecuado, se transfiere el contenido del Erlenmeyer a un tubo Falcon y se lleva a la centrífuga 5 minutos a 5000 rpm. Este proceso se realizará 5 veces para minimizar pérdidas de biomasa.
6. Una vez finalizados los ciclos de centrífuga, se enrasa el matraz de 100 mL.
7. Se filtran aproximadamente 30 mL de la disolución obtenida con un filtro de Nylon de $0.45 \mu\text{m}$ a un tubo Falcon limpio y seco, y se guarda a $T < 4 \text{ }^\circ\text{C}$ por un máximo de 2 semanas, hasta la cuantificación de proteínas y carbohidratos.

A pesar de que este diseño sólo permite detectar si los factores elegidos afectan significativamente (sin considerar las posibles interacciones entre ellos), haciendo uso de gráficos de medias se podría estudiar cualitativamente si es posible que haya alguna interacción.

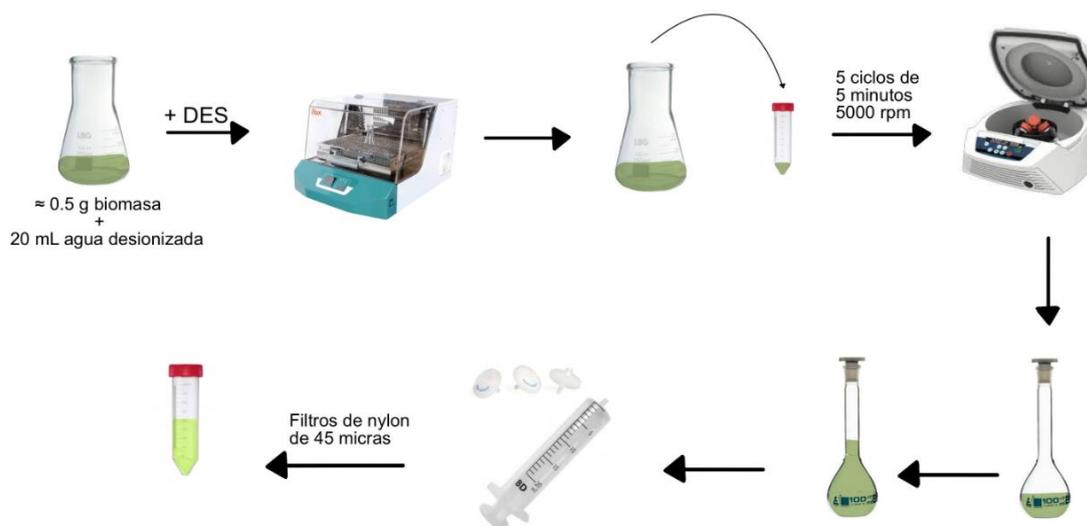


Figura 4. Procedimiento seguido para el diseño L9 de Taguchi.

3.4.2 Extracción asistida por ultrasonidos

Una vez analizados los resultados del diseño L9 de Taguchi, y habiendo optimizado cada uno de los factores. Se llevó a cabo un estudio de pretratamiento de la biomasa aplicando US, a diferentes tiempos y temperaturas, a los dos tipos de biomasa estudiados: la microalga pura y la crecida en purín. La frecuencia con la que se trabajó fue de 40 KHz. Tras la aplicación de los US a la mezcla biomasa-agua, el protocolo seguido fue el mismo que el descrito en el Apartado 3.4.1 usando las condiciones óptimas encontradas (ratio DES:biomasa 12:1, 1 h en el incubador, a 30 °C). La biomasa empleada fue la morterada con molino de discos, pues fue la que mayores rendimientos de extracción proporcionó en los dos diseños L9.

El diseño del US es un diseño factorial completo de dos factores a tres niveles (3^2), en el cual se pueden analizar los efectos principales de los factores además de tener en cuenta las interacciones entre ellos, de tal manera que se realizan 18 experimentos (por duplicado). En la Figura 5, se muestra el procedimiento experimental seguido independientemente de la combinación de niveles de los factores.

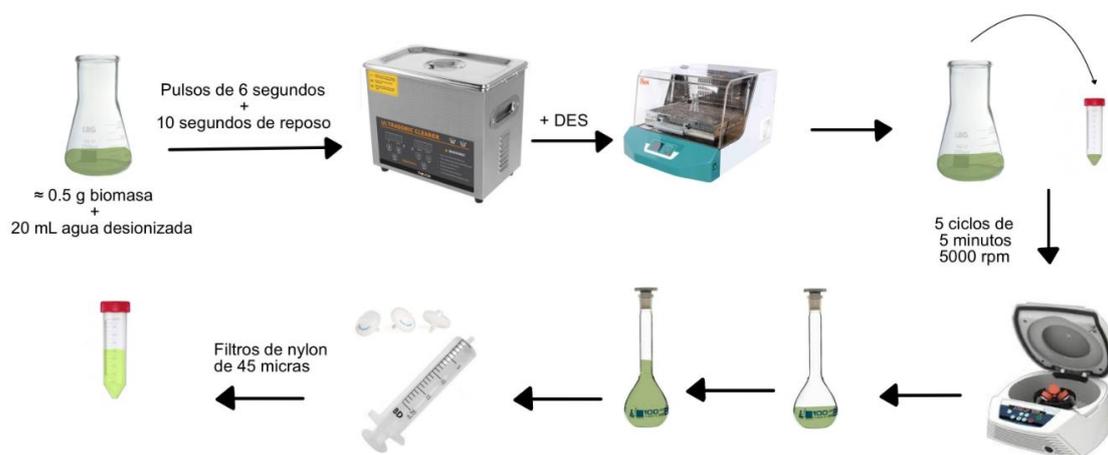


Figura 5. Procedimiento seguido para el diseño factorial completo con US.

En la Tabla 4 se encuentran los factores estudiados a cada uno de los 3 niveles:

Tabla 4: Factores y niveles para el diseño factorial completo para estudiar el efecto de los US

	Niveles		
Factores	1	2	3
Temperatura / °C	20	30	40
Tiempo de contacto / h	0.25	0.50	1

Se eligieron tres temperaturas de aplicación de los US, 20, 30 y 40 °C, para evaluar su influencia en la extracción, no se seleccionaron temperaturas más elevadas para evitar la degradación de las proteínas [40]. Por su parte, el tiempo de aplicación de los US también fue estudiado, 15, 30 y 60 minutos, con el fin de ver si se podía reducir o se encontraban efectos cuadráticos. Los US, independientemente del tiempo y la temperatura estudiados, se aplicaron en pulsos de 10 segundos con intervalos de descanso de 6 segundos.

3.5 Métodos de cuantificación de proteínas y carbohidratos

Una vez finalizado el proceso de extracción, se determinó el contenido en proteínas y carbohidratos en las muestras líquidas obtenidas empleando dos métodos espectrofotométricos. Las variables respuesta calculadas fueron el rendimiento de recuperación de proteínas (en inglés, protein recovery yield, PRY) y el rendimiento de carbohidratos extraídos (en inglés, carbohydrate recovery yield, CRY), que se calcularon mediante las ecuaciones 1 y 2:

$$PRY (\%) = \frac{m_{p_{ext}}}{m_{p_0}} \cdot 100 \quad (1)$$

$$CRY (\%) = \frac{m_{c_{ext}}}{m_{p_0}} \cdot 100 \quad (2)$$

donde $m_{i_{ext}}$ es la masa de analito extraída, y m_{i_0} la masa de analito que había inicialmente en la masa de biomasa empleada, de proteínas (p) y carbohidratos (c).

3.5.1 Método del BCA para la determinación de proteínas

El método del ácido bicinconínico (BCA) es un ensayo colorimétrico general establecido para la determinación de la concentración de proteínas. Algunas de las ventajas de este método son: un amplio rango de ensayo, baja sensibilidad, repetitividad y reproducibilidad. Es un método espectrofotométrico, en el cual la formación de color es el resultado de dos reacciones (**Figura 6**).

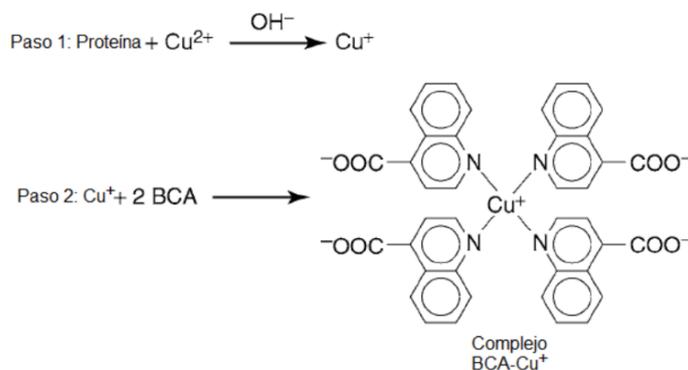


Figura 6. Reacciones del método del BCA. Reducción de Cu^{2+} a Cu^+ y su posterior complejo con dos moléculas de BCA. Extraído de [41].

En primer lugar, los iones Cu^{2+} se reducen a Cu^+ mediante los enlaces peptídicos de las proteínas en condiciones alcalinas mediante la reacción de Biuret. En el siguiente paso, se forma un complejo de color púrpura Cu^+ con dos moléculas del ácido bicinónico que puede medirse a una longitud de onda de 562 nm [41].

Para la cuantificación de proteínas se hizo uso del kit de ensayo de proteínas Pierce™ BCA Protein Assay, siguiendo el siguiente procedimiento:

1. Se prepara el reactivo de trabajo a partir de las dos disoluciones A y B, en relación 50:1 respectivamente (en volumen). 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 adicionan 60 μL de muestra, y posteriormente 1.2 mL del reactivo preparado anteriormente.
3. Se mezclan los reactivos agitando los tubos Eppendorf en un vórtex.
4. Se introducen en el incubador a 37 °C durante media hora.
5. Pasado el tiempo, se mide la absorbancia de cada muestra a $\lambda=562$ nm, en cubetas de plástico.

Es importante medir las absorbancias en un corto periodo de tiempo tras el incubador, ya que se va desarrollando el color y puede dar lugar a resultados incorrectos.

3.5.2 Método del fenol-sulfúrico para la determinación de carbohidratos

La cuantificación de carbohidratos se ha llevado a cabo a través del método fenol-sulfúrico. Este, al igual que el método del BCA, es un método colorimétrico, rápido y sencillo. Se basa en dos reacciones principales:

1. Hidrólisis ácida: La presencia del ácido sulfúrico concentrado hidroliza los polisacáridos, oligosacáridos y disacáridos a monosacáridos.

2. Reacción con Fenol: Los compuestos deshidratados reaccionan con el fenol, produciendo un color amarillo anaranjado (máximo de absorción, $\lambda=490$ nm) [42].

En la Figura 7 se muestra un ejemplo de las reacciones involucradas en el método fenol-sulfúrico.

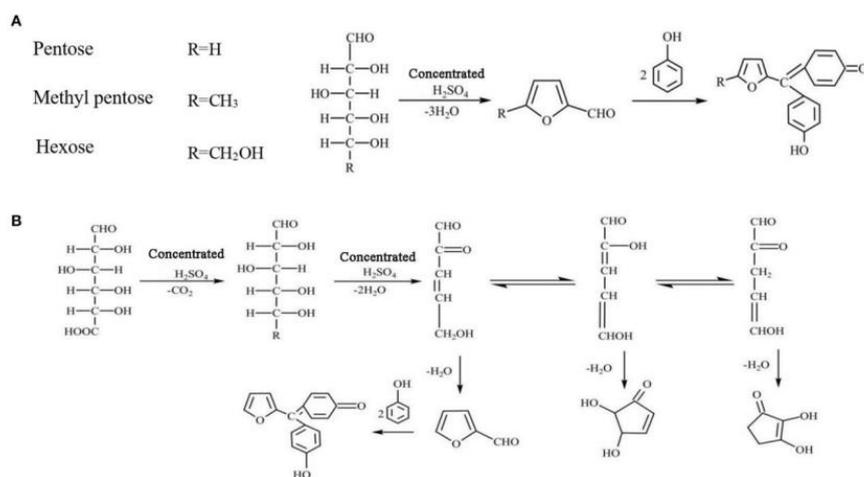


Figura 7. Ejemplo del método fenol-sulfúrico. A) Principio de reacción de la pentosa, metilpentosa y hexosa. B) Principio de reacción del ácido urónico. Extraído de [43].

El procedimiento del método es el siguiente:

1. Se añade a un tubo Falcon una cantidad de muestra entre los 0.10 y 2.00 mL, en función de la concentración de carbohidratos presente, y se completa con agua desionizada hasta un volumen total de 2 mL.
2. En campana, se añaden 50 μ L de fenol al 80 % (m/m).
3. Seguidamente, se añaden 5 mL de H₂SO₄ concentrado y se agita levemente. (Hay que tener cuidado ya que la reacción es exotérmica). Se puede ver como se produce un cambio de color a anaranjado.
4. Se colocan los Falcon en una gradilla en un baño de agua a temperatura ambiente durante 20 minutos.
5. Pasado el tiempo, se mide la absorbancia de cada muestra en el espectrofotómetro a una longitud de onda $\lambda=490$ nm en cubetas de vidrio, ya que el H₂SO₄ concentrado dañaría las de plástico.

3.6 Análisis estadístico

Para evaluar los resultados de los diseños experimentales se utilizó el análisis de varianza (ANOVA). Este método se basa en la prueba F para comparar varianzas, y evalúa si las diferencias observadas entre los factores son significativas o si pueden atribuirse a una variabilidad aleatoria dado un cierto nivel de significación, α (para este trabajo, $\alpha = 0.05$) [44]. Si el *p-valor* obtenido es inferior al nivel de significación, entonces existirán diferencias significativas entre los factores estudiados. No obstante, el ANOVA sólo informa de si un factor es o no significativo. Pero si los factores tienen varios niveles, algunos pueden ser diferentes entre sí y otros no. Para determinar estas diferencias se realiza una prueba *post-hoc*. En este trabajo, se ha utilizado la prueba LSD (Least Significant Difference), la cual forma un intervalo de confianza para cada par de medias al nivel de confianza seleccionado, usando la distribución t de Student. La magnitud de los límites indica la menor diferencia entre dos medias cualesquiera que puedan representar una diferencia estadísticamente significativa. La prueba LSD, calcula la diferencia absoluta entre las medias de respuesta para cada nivel de un factor y la compara con un valor crítico (LSD) determinado por la ecuación 3:

$$LSD = t_{crit} \cdot \sqrt{MS_R \cdot \left(\frac{2}{n_j}\right)} \quad (3)$$

donde t_{crit} es el valor tabulado de la t de Student para los grados de libertad residuales y el nivel de significación establecido, MS_R , es la varianza residual, y n_j es el número de réplicas por nivel del factor “j” [45]. Se va a utilizar la metodología CLD (Compact Letter Display). Esta es una técnica utilizada para representar gráficamente los resultados de comparaciones múltiples de medias de tratamientos en estudios estadísticos. Se encarga de asignar letras a las medias de los tratamientos para indicar cuales son significativamente diferentes entre sí tras realizar pruebas estadísticas como ANOVA y pruebas *post-hoc*. En los gráficos resultantes, los tratamientos que comparten al menos una letra no son significativamente diferentes. Esto hace que se facilite la comprensión de los resultados al proporcionar una visualización clara de que tratamientos son significativamente diferentes entre sí [46], [47]. Los cálculos se han realizado usando el software *Statgraphics Centurion 19*, mientras que la mayoría de los gráficos han sido elaborados con R (versión 4.4.1). Todos los diseños se realizaron por duplicado.

4 Resultados y Discusión

4.1 Diseños L9 para la extracción de proteínas

4.1.1 Resultados de ANOVA

Con los resultados experimentales, se llevó a cabo un ANOVA multifactorial para las dos variables respuesta estudiadas (PRY y CRY). Posteriormente, se ha realizado una prueba *post-hoc* LSD. En la Tabla 5 se recogen los p-valores de cada factor, así como su porcentaje de contribución a la varianza de la respuesta. Los resultados para cada combinación de niveles de los experimentos se pueden encontrar en Tabla Anexos 1.

Tabla 5. Resultados obtenidos para cada factor estudiado: su % de contribución a la varianza y su y p-valor para el diseño L9 de Taguchi. En rojo, los p-valores que son significativamente significativos.

Factores	PRY		CRY	
	%Contribución	p-valor	%Contribución	p-valor
Temperatura	2.47	< 0.05	2.45	< 0.05
Tiempo	7.66	< 0.05	2.19	< 0.05
Ratio	11.67	< 0.05	0.68	0.065
Morteroado	77.68	< 0.05	93.87	< 0.05

Para la extracción de proteínas a partir de la biomasa pura se observa que los cuatro factores afectan significativamente a la extracción (p-valor < 0.05). El factor que indudablemente más afecta a la extracción es el tipo morteroado (77.7 %), seguido a mucha distancia de la ratio (11.7 %), el tiempo (7.6 %), y en último lugar la temperatura (2.5 %). Respecto a la extracción de carbohidratos, de nuevo el morteroado fue el factor más relevante (93.9 %), junto con el tiempo y la temperatura, aunque con una contribución mucho más pequeña (2.2 y 2.4 %, respectivamente). La ratio DES:biomasa resultó ser un factor no significativo, es decir, que aumentar la cantidad de DES usada parece incrementar sólo las proteínas extraídas, y no la cantidad de carbohidratos recuperados.

Comparando con los resultados obtenidos anteriormente para la biomasa microalgal crecida en purín de cerdo, se observa que, para el PRY, todos los factores resultaron significativos, mientras que para el CRY sólo el morteroado y la ratio lo fueron. Respecto

al morterado, se confirma que es el factor que más contribuye en ambas respuestas (87.5 % para PRY y 91.1 % para CRY), independientemente de la biomasa con la que se trabaje. No obstante, se encuentran ligeras diferencias para el CRY, ya que para la biomasa crecida en purín ni la ratio ni el tiempo resultaron significativos (para la microalga pura el tiempo sí fue significativo, aunque con poca contribución).

4.1.2 Comparación de resultados biomasa pura vs biomasa purín

Para ver gráficamente cómo afecta cada factor y cada uno de sus niveles en las respuestas estudiadas para las dos biomazas analizadas, se muestra el gráfico de medias (Figura 8), donde aparecen los resultados obtenidos para la biomasa pura (8a) y los de la biomasa crecida en purín (8b), tanto para la extracción de proteínas como de carbohidratos.

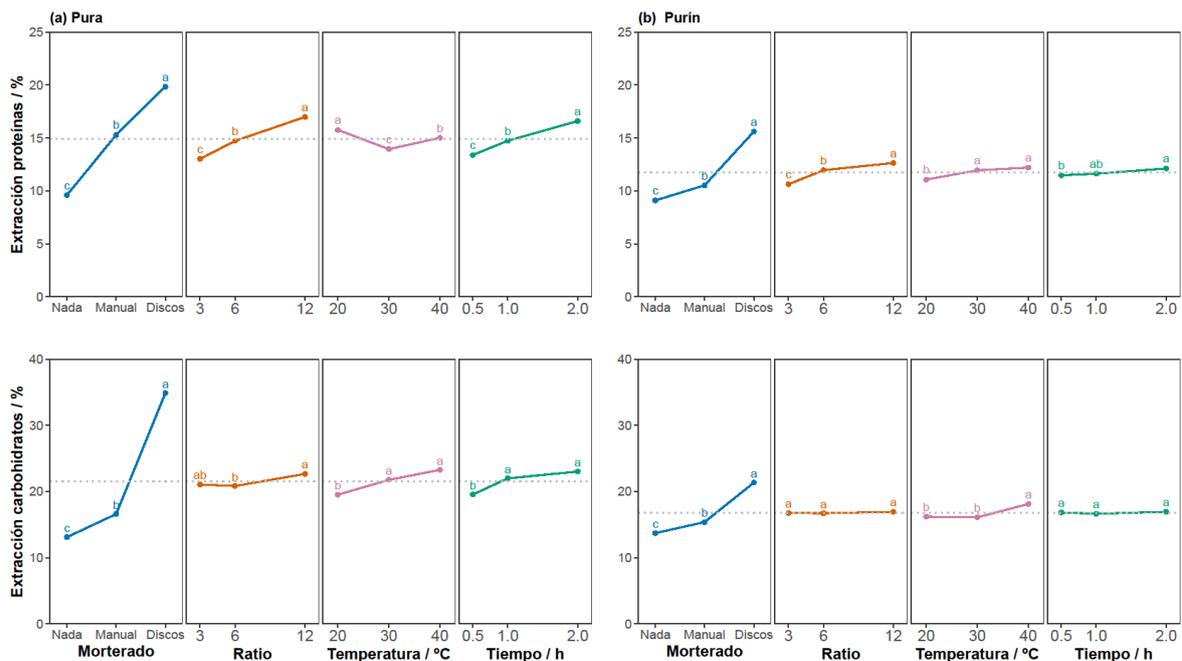


Figura 8: Comparativa de la contribución de cada nivel para la extracción de proteínas (primera fila) y carbohidratos (segunda fila) para la microalga pura (a) y la microalga crecida en purín (b). Las letras situadas encima de cada punto se disponen siguiendo la metodología CLD, de acuerdo con los resultados de la prueba LSD. Las medias que comparten (al menos) una letra en el mismo factor, para la misma respuesta y para la misma microalga, no son estadísticamente significativas. La línea punteada indica la gran media de cada variable respuesta estudiada.

Para la extracción de proteínas (Figura 8a, primera fila), se observa que hay diferencias significativas entre todos los niveles del tipo de pretratamiento de la biomasa o morterado (nada, manual o discos), siendo el de discos el nivel que más altos valores proporciona (19.8 %). Para la ratio DES:biomasa (3, 6 o 12), también hay diferencias significativas entre los tres niveles, de modo que aumentar la ratio parece aumentar el rendimiento de la extracción (aunque su efecto es menos acentuado que para el morterado). Emplear una ratio de 12, ayuda a mejorar el rendimiento de extracción de proteínas (13 % cuando la ratio es de 3 y 17 % si es de 12). Los niveles de temperatura también muestran diferencias significativas entre ellos, resultando que a 20 °C se obtienen rendimientos de extracción de proteínas más altos (15.8 %). Para el tiempo, se puede observar una tendencia creciente, dando los mejores resultados tras la incubación durante 2 h (16.6 %).

Respecto a la extracción de carbohidratos (Figura 8a, segunda fila), ahora los valores óptimos serán aquellos que minimicen el CRY. Así, el morterado tiene un efecto similar al visto anteriormente, siendo la mejor opción no utilizar ningún tipo de morterado para obtener los rendimientos de extracción más bajos (13.1 %). Para la ratio DES:biomasa, se observa que no hay una diferencia significativa entre 3-6, y 3-12, pero sí entre 6-12, por lo que habría que elegir la de 3 o 6 (21.1 o 20.9 %, respectivamente). Por su parte, aumentar la temperatura de 20 a 30 °C, mejoró los rendimientos de extracción de carbohidratos, pero sin embargo no se obtuvieron diferencias significativas entre 30 y 40 °C. De forma similar a la temperatura, un mayor tiempo de contacto entre la biomasa y el DES condujo a una mayor extracción de más carbohidratos. Por lo tanto, 0.5 h es el nivel que significativamente proporcionó una menor recuperación de carbohidratos (19.6 %). Como ya se comentó anteriormente, se busca maximizar el rendimiento de extracción de proteínas minimizando en lo posible la coextracción de carbohidratos, por lo tanto, para la biomasa pura, los niveles óptimos para cada factor fueron: usar discos como método de morterado (PRY = 19.8 %), ya que, aunque aumenta la cantidad de carbohidratos extraídos, si elegimos morterado a mano o sin morterar disminuye mucho la cantidad de proteínas extraídas. Para el tiempo de extracción, se eligió 1h (PRY = 14.7 %) como nivel óptimo, ya que, incrementar el tiempo al doble no compensa para lo poco que se mejoraría la extracción. Los mejores resultados para la ratio DES:biomasa se obtuvieron para la ratio de 12 (PRY = 17 %), ya que para carbohidratos no afecta significativamente. Por último, la temperatura óptima fue de 20 °C (PRY = 19.5 %).

Comparando los resultados de la extracción a partir de microalga pura con los obtenidos para la microalga crecida en purín (Figura 8a vs 8b), se aprecia que, en promedio, se obtienen mayores rendimientos de extracción para la microalga crecida en un medio sintético (pura) que para la microalga crecida en purín. Esto puede explicarse debido a que las condiciones de cultivo afectan significativamente a la estructura de las microalgas. Por ejemplo, en entornos exteriores expuestas a contaminantes u otros patógenos, las microalgas deben adaptarse a fluctuaciones naturales, lo que provoca que fortalezcan las membranas celulares e incluso cambiar su composición química [48]. La consecuencia de esto es que será más complicado extraer los compuestos de interés de su interior.

Prestando atención a la recuperación de proteínas, en ambas microalgas el nivel óptimo de pretratamiento es el morterado de discos, y para la ratio DES:biomasa la de 12. Sin embargo, para el tiempo de contacto y la temperatura se encontró alguna diferencia entre los niveles óptimos. Por ejemplo, como se comentó para la microalga pura, usar un tiempo de 2 h favorece la extracción de proteínas, sin embargo, para la microalga crecida en purín, no hay diferencias significativas entre 1 y 2 h. Respecto a la temperatura, para la microalga crecida en purín 30 °C parece ser el nivel óptimo (pues da valores más altos que a 20 °C), y aumentar a 40 °C no mejora el rendimiento de extracción. Sin embargo, para la microalga pura se observó que 30 °C fue el valor que proporcionó menores valores de PRY. De forma muy similar a la extracción de proteínas, en promedio, también se extrajeron más carbohidratos con la microalga pura que con la microalga crecida en purín. Por tanto, para reducir la cantidad de carbohidratos extraídos, es importante no utilizar ningún tipo de morterado, y trabajar a temperaturas entre 20-30 °C ya que parece no aumentar la extracción de carbohidratos. Finalmente, la ratio DES:biomasa y el tiempo de contacto no mostraron diferencias significativas entre los diferentes niveles, por lo que se trabajará en las condiciones que maximicen el rendimiento de extracción de proteínas.

Debido a que en vistas de diseñar un proceso industrial no se tendrá un control del tipo de biomasa que llegue a la planta, es lógico plantear una solución de compromiso en la elección de los niveles de los factores. Por este motivo, para la temperatura se escogió 30 °C, ya que aumenta el PRY para la microalga crecida en purín a pesar de perjudicar un poco en la extracción para la microalga pura (de todas formas, su efecto es pequeño). En cuanto al tiempo, se eligió 1 h como solución de compromiso, pues, aunque aumentaba ligeramente el PRY en la microalga pura, emplear el doble de tiempo no parece que

compense en términos de mejora para el PRY. El morterado con discos es el elegido como solución de compromiso, ya que aumenta considerablemente la extracción de proteínas a pesar de que también lo haga la recuperación de carbohidratos. La ratio DES:biomasa elegida es la de 12, ya que prácticamente solo aumentan las proteínas extraídas, no los carbohidratos recuperados (aunque para la microalga pura mejora un poco, pero apenas apreciable).

En la Tabla 6 se muestra un resumen de cuáles han sido las condiciones óptimas escogidas para cada biomasa. Además, también se han seleccionado las condiciones de compromiso para cada factor, en el caso en el que se quiera estudiar un tipo de biomasa del cual no se sepa su procedencia, y así, poder realizar la extracción de la forma más eficaz posible.

Tabla 6. Condiciones óptimas para cada tipo de biomasa y condiciones de compromiso seleccionadas.

Condiciones óptimas	Factores			
	Mortero	Ratio	Temperatura / °C	Tiempo / h
Biomasa pura	Discos	12	20	2
Biomasa purín	Discos	12	30	0.5
compromiso	Discos	12	30	1

Actualmente, pocos estudios han empleado DES en matrices de microalga. Cicci estudió la extracción de metabolitos de microalgas puras utilizando un disolvente eutéctico profundo formado por productos naturales (NADES) [26], en concreto, una mezcla de 1,2-propanediol, cloruro de colina y agua en la relación molar 1:1:1. El pretratamiento fue a partir de un molino de bolas, y la extracción de las biomoléculas duró un total de 24 h. La cuantificación se llevó a cabo colorimétricamente con un espectrofotómetro UV-Vis. Los resultados que se obtuvieron fueron: un 10 % de proteínas y un 7 % de carbohidratos extraídos. Un aspecto reseñable es que la extracción con el molino de bolas emplea 24 h en hacer la molienda, por lo que, empleando más tiempo, obtiene menores porcentajes de extracción que los que se han obtenido en este trabajo.

4.2 Extracción asistida por ultrasonidos

Se estudió cómo afecta la aplicación de un pretratamiento como los US a la extracción de proteínas y carbohidratos, atendiendo al tipo de biomasa usada, el tiempo y la temperatura de aplicación de los US. Los resultados brutos se encuentran en la Tabla Anexos 2.

4.2.1 ANOVA de tres factores

Primeramente, se ha realizado un ANOVA multifactorial de tres factores para determinar el efecto del tipo de biomasa, pues si resulta significativo sería conveniente hacer un diseño factorial para cada tipo de biomasa por separado. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7:

Tabla 7: Resultados ANOVA obtenidos del % de contribución y p-valor atendiendo al tipo de biomasa, el tiempo y la temperatura para el diseño US.

	PRY		CRY	
	%Contribución	p-valor	%Contribución	p-valor
Biomasa	82.0	< 0.05	42.8	< 0.05
Tiempo /h	0.57	0.157	1.91	0.09
Temperatura /°C	13.1	< 0.05	44.3	< 0.05

Para el PRY, los resultados indican que tanto el tipo de biomasa como la temperatura son factores significativos, ya que tienen un p-valor < 0.05, con una contribución de 82 y 13.11 %, respectivamente. El tiempo, sin embargo, no es un factor significativo, ya que tiene un p-valor de 0.157. Respecto al CRY, los factores con diferencias significativas vuelven a ser el tipo de biomasa y la temperatura, pero ahora las contribuciones están más igualadas, con un 42.8 y un 44.3 %, respectivamente. Como el tipo de biomasa es el factor que más contribución tiene, se estudiaron los dos tipos de microalga por separado.

La media de cada experimento junto con su desviación típica se muestra en el gráfico de barras de la Figura 9, izquierda, (a) y de carbohidratos (b) en función del tiempo, expresado en horas.

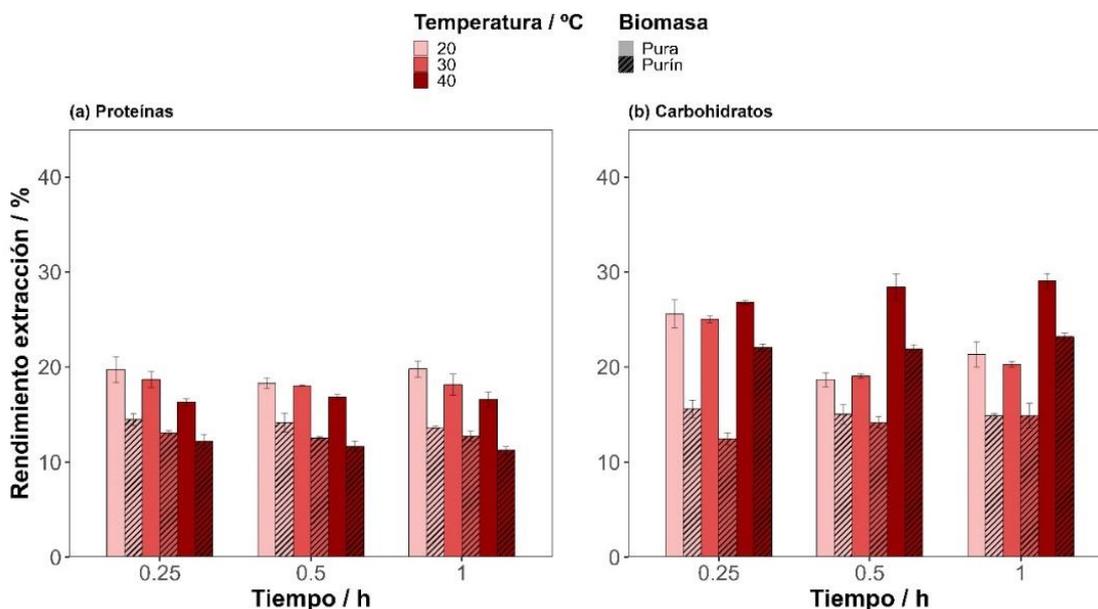


Figura 9. Diagrama de barras representando el rendimiento de extracción de proteínas (a) y carbohidratos (b). En función del color, se puede ver la temperatura empleada. Las barras ralladas pertenecen a la biomasa crecida en purín, y las no ralladas a la pura.

En términos generales, se observa que, en todos los casos para la biomasa pura, se obtienen mayores rendimientos de extracción para las proteínas y los carbohidratos que para la biomasa crecida en purín, lo que confirma los resultados obtenidos en el diseño L9. Además, en la biomasa pura, la extracción de carbohidratos es muy superior a la de proteínas. Sin embargo, para la microalga crecida en purín, la extracción de proteínas y carbohidratos está más igualada. En la extracción de proteínas, a medida que se aumenta la temperatura, va disminuyendo el rendimiento de extracción, por lo que a 20 °C se obtiene el máximo rendimiento. El tiempo no parece ser un factor significativo, ya que prácticamente se obtienen los mismos resultados para todos los tiempos estudiados. Por este motivo, si posteriormente se confirma que los niveles no son significativos entre sí, el tiempo óptimo será el de 0.5 h.

Respecto a la extracción de carbohidratos, la extracción no aumenta de forma lineal con la temperatura, pero a 40 °C se obtienen mejores resultados que con los otros dos niveles. El efecto del tiempo de contacto cambia un poco en función del tipo de biomasa utilizada. Si la biomasa es la cultivada en purín, 1h es la mejor opción, ya que se extrae un mayor porcentaje de proteínas que en los dos niveles restantes. Si la biomasa es la pura, es más complejo, porque la tendencia de la extracción con el tiempo cambia en función de la temperatura. A 20 y 30 °C, se obtiene una mayor extracción de proteínas si el tiempo es de 0.5 h mientras que, si la temperatura es de 40 °C, la mayor extracción se alcanza empleando tiempos de 1 h.

4.2.2 ANOVA de dos factores: comparación biomasa pura vs biomasa purín

A continuación, se hizo un ANOVA multifactorial, con la prueba LSD como prueba *post-hoc*, esta vez estudiando solamente los factores tiempo y temperatura para cada biomasa. En la Tabla 8, se encuentran los resultados tanto para la microalga pura como para la crecida en purín.

Tabla 8: Resultados obtenidos del % de contribución (%Cont.) y p-valor de los factores tiempo y temperatura estudiados con ANOVA para el diseño US, desgranados por tipo de biomasa.

	Pura				Purín			
	PRY		CRY		PRY		CRY	
	%Contrib.	P-valor	%Contrib.	P-valor	%Contrib.	P-valor	%Contrib.	P-valor
Tiempo / h	3.1	0.48	16.05	< 0.05	7.24	0.13	1.04	0.13
Temperatura /°C	70.61	< 0.05	62.05	< 0.05	78.7	< 0.05	94.9	< 0.05
Interacción	8.6	0.41	19.2	< 0.05	1.53	0.89	2.27	0.09

En la biomasa pura se observa que, para el PRY, ni el tiempo ni la interacción entre tiempo y temperatura son significativos (p-valor > 0.05). No obstante, la temperatura sí que lo es. Por otro lado, en el CRY, los factores son significativos, siendo la temperatura el factor con mayor contribución, 62.05 %, frente a 16.05 % del tiempo y 19.2 % de la interacción.

Por su parte, en la biomasa crecida en purín, para el PRY, ni el tiempo ni la interacción resultaron significativos, al contrario que la temperatura, con un porcentaje de contribución del 94.9 %.

En la Figura 10, se muestra el gráfico de medias correspondiente. En este gráfico, se puede ver de forma sencilla que, de nuevo, tanto para la extracción de proteínas como de carbohidratos, la recuperación es más efectiva para la microalga pura que para la cultivada en purín, ya que las condiciones en las que han sido cultivadas afectan de forma significativa a la estructura de las microalgas [48].

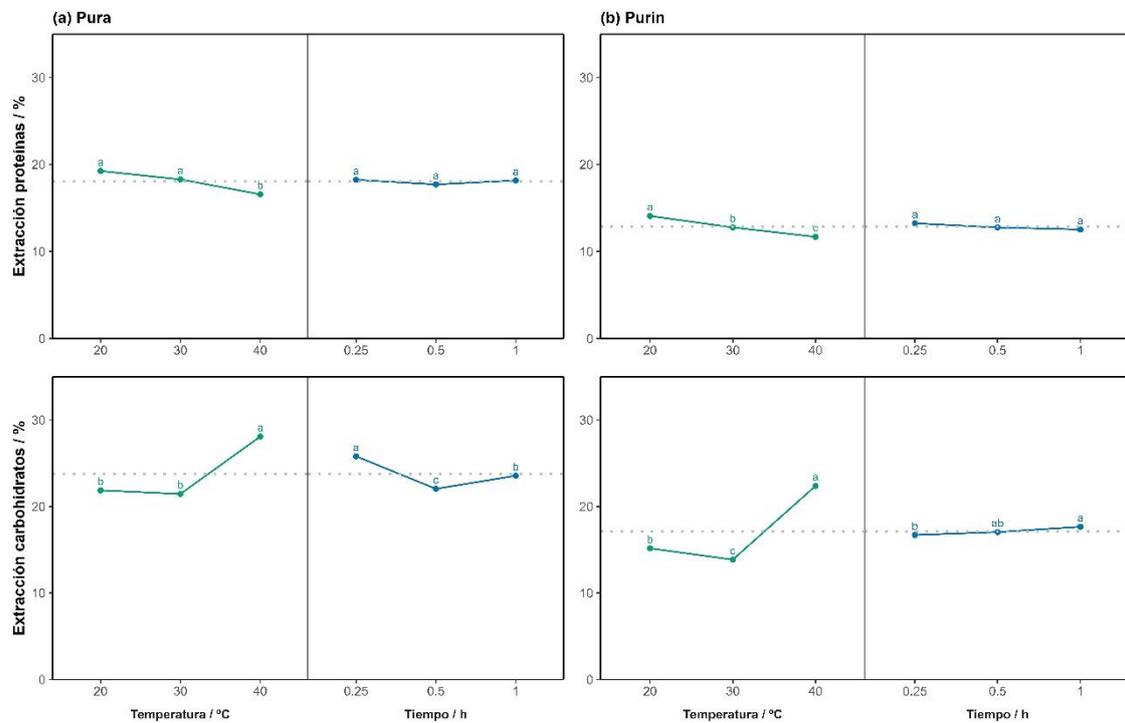


Figura 10. Extracción de proteínas (primera fila) y de carbohidratos (segunda fila), para la microalga pura (a) y la de purín (b). Las letras situadas encima de cada punto se disponen siguiendo la metodología CLD, de acuerdo con los resultados de la prueba LSD. Las medias que comparten (al menos) una letra en el mismo factor, para la misma respuesta y para la misma microalga, no son estadísticamente significativas. La línea punteada indica la gran media de cada variable respuesta estudiada.

En general, se observa que la temperatura contribuye más a la extracción tanto de proteínas como de carbohidratos, sin importar el tipo de biomasa utilizada. La temperatura es el factor clave para mejorar la eficiencia de extracción, ya que, aunque

aumenten también el rendimiento de extracción de carbohidratos, también lo hace el de proteínas. De lo contrario no se podrían extraer prácticamente proteínas.

Estudiando el PRY, se ve que, para la microalga pura, las temperaturas 20 y 30 °C no presenta diferencias significativas, mientras que a 40 °C (siendo esta la que peores resultados proporciona) sí hay una disminución en comparación a las dos anteriores. La temperatura óptima en el pretratamiento con US, por lo tanto, es 20 °C, con un porcentaje de extracción de 19.3 %. Respecto al tiempo en el pretratamiento con US, se ha comprobado que no influye, ya que se obtienen prácticamente los mismos resultados que sin utilizarlos, y mayores tiempos, no aumenta la recuperación de proteínas. Para la biomasa crecida purín, los resultados son un poco diferentes. Para la temperatura, se observa que hay diferencias significativas entre los tres niveles, siendo la temperatura más favorable la de 20 °C, alcanzando un rendimiento de extracción del 14.1 % de proteínas. El tiempo en el US, al igual que para la microalga pura, no ha influido en el proceso.

Respecto a el CRY, en la microalga pura, la temperatura entre 20 y 30 °C no muestra diferencias significativas, mientras que a 40 °C, las presenta, sin embargo, como ya se había comentado con anterioridad, se busca maximizar la extracción de proteínas, minimizando la de carbohidratos, por lo tanto, la temperatura óptima sería a 20 °C. El tiempo en el US, esta vez, se ha comprobado que influye a la hora de realizar el experimento, ya que todos los niveles presentan diferencias significativas. Aplicando 0.25 h el US es el que peores resultados da (25.8 % de extracción), y a 0.5 h, el que produce mejores resultados (22.0 %). Para las microalgas cultivadas en purín los resultados son un poco diferentes. Para la temperatura, se observa que hay diferencias significativas entre los tres niveles, siendo la temperatura menos favorable la de 40 °C (22.4 %) y la que más, a 30 °C (13.9 %). Cuando el tiempo en el pretratamiento con US es de 0.5 h no presenta diferencias significativas ninguno de los otros dos niveles, pero, cuando el tiempo es de 0.25 h sí que hay diferencias que cuando es de 1 h y viceversa. Por lo tanto, como interesa que se extraiga la mínima cantidad de carbohidratos, pero sin que esto influya mucho en la extracción de proteínas, el tiempo óptimo será a 0.5 h.

En el apartado 4.1.2 se hizo referencia a un estudio realizado por Cicci [26], en el cual estudiaron un proceso de extracción de proteínas y carbohidratos con molino de bolas.

Además, en otra parte del estudio estudiaron el efecto de los US en la extracción. Se utilizaron aplicando ciclos a pulsos, en un recipiente refrigerado, y tuvo una duración de 40 minutos con una frecuencia de 20 kHz. Así, vieron que utilizar US favorecía el proceso de extracción, consiguiendo rendimientos de 27 y 12 % de proteínas y carbohidratos, respectivamente. Si se compara con el presente estudio, el uso de US no implica mejoras significativas en la eficiencia de la extracción. Es verdad que se ha logrado aumentar la cantidad de carbohidratos extraídos pero la cantidad de proteínas recuperadas se ha mantenido prácticamente igual que sin aplicarlo, por lo que no se obtienen mejoras en la eficiencia de la extracción de proteína en el presente trabajo. Esto ha podido ser, en primer lugar, por la frecuencia y la duración de los US utilizados. Las variaciones en la potencia, frecuencia y tiempo de aplicación pueden influir significativamente en los resultados de extracción [49]. Además, también las diferencias en la naturaleza y preparación de las muestras pueden afectar a la eficacia de los US [50], por ejemplo, el tamaño de las partículas y la homogeneidad. Otros factores que también han podido afectar pueden ser, el disolvente utilizado o la precisión y exactitud en los métodos analíticos [51].

5 Conclusiones

En este trabajo, se han investigado los parámetros que maximizan la extracción de proteínas de la microalga *Scenedesmus almeriensis*, cultivada en medio sintético y en purín. Para ello, inicialmente se aplicó un diseño L9 de Taguchi. Posteriormente, con las condiciones óptimas de compromiso entre ambas biomásas, se utilizó un diseño factorial completo para evaluar el impacto de la aplicación de US a la biomasa en la extracción de proteínas tanto de la microalga pura como de la crecida en purín.

Se evaluaron cuatro factores (a tres niveles) en el proceso de extracción: tipo de pretratamiento de la biomasa, temperatura, tiempo de contacto y ratio DES:biomasa mediante un diseño L9 de Taguchi. Se determinó que el pretratamiento es el factor más influyente, siendo el morterado con discos el nivel óptimo. Al comparar estos resultados con los de la biomasa cultivada en purín, se observó que la microalga pura presentó mayor porcentaje de extracción de proteínas (24.5 %) en comparación con la biomasa crecida en purín, que mostró menores rendimientos. Para el pretratamiento de la biomasa con US, se evaluó la influencia del tipo de biomasa en los rendimientos de extracción de proteínas y carbohidratos, así como la influencia del tiempo y la temperatura de aplicación de los US empleando un diseño factorial completo. Se encontró que la microalga pura continuó mostrando mejores resultados que la cultivada en purín. Además, se observó que el tiempo de aplicación de los US no fue un factor significativo, mientras que la temperatura sí que lo fue, obteniéndose el máximo rendimiento a 20 °C.

Los resultados obtenidos presentan un potencial considerable y sugieren que futuras investigaciones podrían explorar condiciones alternativas al US (como diferentes frecuencias o aplicación en modo continuo en lugar de pulsos) para mejorar los porcentajes de extracción. Además, se propone evaluar el uso de microondas como una posible alternativa a los US. Este estudio proporciona una base sólida para futuras investigaciones y optimizaciones en la extracción de proteínas a partir de microalgas, destacando la importancia del análisis de las condiciones experimentales en la eficiencia del proceso.

6 Referencias

- [1] Martínez Augustin, O., & Martínez de Victoria, E.. (2006). Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutrición Hospitalaria*, 21(Supl. 2), 01-14.
- [2] Arthur C. Guyton and hall Textbook of Medical Physiology. SAUNDERS. ELSEVIER.2006.
- [3] G. Wu, “Dietary protein intake and human health,” *Food and Function*, vol. 7, no. 3. Royal Society of Chemistry, pp. 1251–1265, Mar. 01, 2016. doi: 10.1039/c5fo01530h.
- [4] Chou, Chieh & Affolter, Michael & Kussmann, Martin. (2012). A Nutrigenomics View of Protein Intake. *Progress in molecular biology and translational science*. 108. 51-74. doi:10.1016/B978-0-12-398397-8.00003-4.
- [5] Gerber, P.J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Faluccci, A. & Tempio, G. 2013. Tackling climate change through livestock – A global assessment of emissions and mitigation opportunities. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome.
- [6] Wan Adibah Wan Mahari, Wan Aizuddin Wan Razali, Hidayah Manan, Mursal Abdulkadir Hersi, Sairatul Dahlianis Ishak, Wee Cheah, Derek Juinn Chieh Chan, Christian Sonne, Pau Loke Show, Su Shiung Lam. Recent advances on microalgae cultivation for simultaneous biomass production and removal of wastewater pollutants to achieve circular economy, *Bioresource Technology*, Volume 364, 2022, 0960-8524. doi: 10.1016/j.biortech.2022.128085
- [7] A. Naseri, G. S. Marinho, S. L. Holdt, J. M. Bartela, and C. Jacobsen, “Enzyme-assisted extraction and characterization of protein from red seaweed *Palmaria palmata*,” *Algal Res*, vol. 47, May 2020, doi: 10.1016/j.algal.2020.101849.
- [8] E. W. Becker, “Micro-algae as a source of protein,” *Biotechnology Advances*, vol. 25, no. 2. pp. 207–210, Mar. 2007. doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.11.002.
- [9] M. R. Brown, S. W. Jeffrey, J. K. Volkman, and G. A. Dunstan, “Nutritional properties of microalgae for mariculture,” 1997. doi:10.1016/S0044-8486(96)01501-3
- [10] Dolganyuk, V.; Belova, D.; Babich, O.; Prosekov, A.; Ivanova, S.; Katserov, D.; Patyukov, N.; Sukhikh, S. Microalgae: A Promising Source of Valuable Bioproducts. *Biomolecules* 2020, 10, 1153. doi: 10.3390/biom10081153
- [11] Batista, Ana & Sousa, Isabel & Raymundo, Anabela & Bandarra, Narcisa. (2008). In: *Food Chemistry Research Developments. Microalgae in novel food products*.
- [12] V. Sharma, M. L. Tsai, P. P. Sun, C. W. Chen, P. Nargotra, and C. Di Dong, “Sequential ultrasound assisted deep eutectic solvent-based protein extraction from Sacha inchi meal biomass: towards circular bioeconomy,” *J Food Sci*

- Technol, vol. 60, no. 4, pp. 1425–1434, Apr. 2023, doi: 10.1007/s13197-023-05689-0.
- [13] A. M. D. Al Ketife, F. Almomani, M. EL-Naas, and S. Judd, “A technoeconomic assessment of microalgal culture technology implementation for combined wastewater treatment and CO₂ mitigation in the Arabian Gulf,” *Process Safety and Environmental Protection*, vol. 127, pp. 90–102, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.psep.2019.05.003.
- [14] O. Pulz and W. Gross, “Valuable products from biotechnology of microalgae,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 65, no. 6, pp. 635–648, Nov. 2004. doi: 10.1007/s00253-004-1647-x.
- [15] “Timira, V., Meki, K., Li, Z., Lin, H., Xu, M., & Pramod, S. N. (2021). A comprehensive review on the application of novel disruption techniques for proteins release from microalgae. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(16), 4309–4325. doi: 10.1080/10408398.2021.1873734”.
- [16] “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”.
- [17] D. Moldes, E. M. Rojo, S. Bolado, P. A. García-Encina, and B. Comesaña-Gándara, “Biodegradable Solvents: A Promising Tool to Recover Proteins from Microalgae,” *Applied Sciences (Switzerland)*, vol. 12, no. 5. MDPI, Mar. 01, 2022. doi: 10.3390/app12052391.
- [18] O. Córdova and R. Chamy, “Microalgae to biogas: Microbiological communities involved,” in *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*, Elsevier, 2019, pp. 227–249. doi: 10.1016/B978-0-12-817536-1.00015-1.
- [19] M. H. M. Eppink, S. P. M. Ventura, J. A. P. Coutinho, and R. H. Wijffels, “Multiproduct Microalgae Biorefineries Mediated by Ionic Liquids,” *Trends in Biotechnology*, vol. 39, no. 11. Elsevier Ltd, pp. 1131–1143, Nov. 01, 2021. doi: 10.1016/j.tibtech.2021.02.009.
- [20] C. J. Clarke, W. C. Tu, O. Levers, A. Bröhl, and J. P. Hallett, “Green and Sustainable Solvents in Chemical Processes,” *Chem Rev*, vol. 118, no. 2, pp. 747–800, Jan. 2018, doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00571.
- [21] “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”.
- [22] M. A. Dzhavakhyan and Y. E. Prozhogina, “Deep Eutectic Solvents: History, Properties, and Prospects,” *Pharmaceutical Chemistry Journal*, vol. 57, no. 2. Springer, pp. 296–299, May 01, 2023. doi: 10.1007/s11094-023-02879-0.

- [23] V. Hessel et al., “Sustainability of green solvents-review and perspective,” *Green Chemistry*, vol. 24, no. 2. Royal Society of Chemistry, pp. 410–437, Jan. 21, 2022. doi: 10.1039/d1gc03662a.
- [24] T. El Achkar, S. Fourmentin, and H. Greige-Gerges, “Deep eutectic solvents: An overview on their interactions with water and biochemical compounds,” *Journal of Molecular Liquids*, vol. 288. Elsevier B.V., Aug. 15, 2019. doi: 10.1016/j.molliq.2019.111028.
- [25] T. El Achkar, H. Greige-Gerges, and S. Fourmentin, “Basics and properties of deep eutectic solvents: a review,” *Environmental Chemistry Letters*, vol. 19, no. 4. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, pp. 3397–3408, Aug. 01, 2021. doi: 10.1007/s10311-021-01225-8.
- [26] G. S. M. B. Agnese Cicci, “Potential of Choline Chloride-Based Natural Deep Eutectic Solvents (NaDES) in the Extraction of Microalgal Metabolites,” in *CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS*, 2017. [Online]. Available: www.aidic.it/cet
- [27] Y. Nahar and S. C. Thickett, “Greener, faster, stronger: The benefits of deep eutectic solvents in polymer and materials science,” *Polymers*, vol. 13, no. 3. MDPI AG, pp. 1–24, Feb. 01, 2021. doi: 10.3390/polym13030447.
- [28] M. Ammar, S. Ashraf, D. A. Gonzalez-casamachin, D. T. Awotoye, and J. Baltrusaitis, “Recent Progress of Urea-Based Deep Eutectic Solvents as Electrolytes in Battery Technology: A Critical Review,” *Batteries*, vol. 10, no. 2. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), Feb. 01, 2024. doi: 10.3390/batteries10020045.
- [29] R. Svigelj, R. Bortolomeazzi, N. Dossi, A. Giacomino, G. Bontempelli, and R. Toniolo, “An Effective Gluten Extraction Method Exploiting Pure Choline Chloride-Based Deep Eutectic Solvents (ChCl-DESs),” *Food Anal Methods*, vol. 10, no. 12, 2017, doi: 10.1007/s12161-017-0979-y.
- [30] R. Wahlström et al., “High Yield Protein Extraction from Brewer’s Spent Grain with Novel Carboxylate Salt - Urea Aqueous Deep Eutectic Solvents,” *ChemistrySelect*, vol. 2, no. 29, 2017, doi: 10.1002/slct.201701492.
- [31] IAO Xiao-bo, WANG Gao-yang, LI Jin-hong, WANG Xiao-yi, MENG Guo-qing, CUI Jian-dong. A Comparative Study of Methods for Extracting Protein from Sesame Residue[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2021, 37(4): 273-281.
- [32] R. L. Liu, P. Yu, X. L. Ge, X. F. Bai, X. Q. Li, and 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, no. 6, 2017, doi: 10.1007/s12161-016-0732-y.
- [33] Z. Lin, G. Jiao, J. Zhang, & Giovana, B. Celli, and M. S.-L. Brooks, “Optimization of protein extraction from bamboo shoots and processing wastes using deep

- eutectic solvents in a biorefinery approach”, doi: 10.1007/s13399-020-00614-3/Published.
- [34] Z. Lin, J. Chen, J. Zhang, and M. S. L. Brooks, “Potential for Value-Added Utilization of Bamboo Shoot Processing Waste—Recommendations for a Biorefinery Approach,” *Food and Bioprocess Technology*, vol. 11, no. 5. Springer New York LLC, pp. 901–912, May 01, 2018. doi: 10.1007/s11947-018-2088-3.
- [35] S. C. Cunha and J. O. Fernandes, “Extraction techniques with deep eutectic solvents,” *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 105. Elsevier B.V., pp. 225–239, Aug. 01, 2018. doi: 10.1016/j.trac.2018.05.001.
- [36] G. Hildebrand, M. M. Poojary, C. O’Donnell, M. N. Lund, M. Garcia-Vaquero, and B. K. Tiwari, “Ultrasound-assisted processing of *Chlorella vulgaris* for enhanced protein extraction,” *J Appl Phycol*, vol. 32, no. 3, pp. 1709–1718, Jun. 2020, doi: 10.1007/s10811-020-02105-4.
- [37] P. L. Kirk, “Kjeldahl Method for Total Nitrogen.” [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- [38] Martín-Juárez, J., Vega-Alegre, M., Riol-Pastor, E., Muñoz-Torre, R., & Bolado-Rodríguez, S. (2019). Optimisation of the production of fermentable monosaccharides from algal biomass grown in photobioreactors treating wastewater. *Bioresource Technology*, 281, 239–249. doi: 10.1016/j.biortech.2019.02.082.
- [39] Unal, R., & Dean, E.B. (1990). TAGUCHI APPROACH TO DESIGN OPTIMIZATION FOR QUALITY AND COST: AN OVERVIEW.
- [40] S. Bleakley and M. Hayes, “Algal proteins: Extraction, application, and challenges concerning production,” *Foods*, vol. 6, no. 5, pp. 1–34, May 2017, doi: 10.3390/foods6050033.
- [41] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goetze NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985 Oct;150(1):76-85. doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7. Erratum in: *Anal Biochem* 1987 May 15;163(1):279. PMID: 3843705.
- [42] S.S. Nielsen, *Food Analysis Laboratory Manual*, Food Science Texts Series. doi: 10.1007/978-1-4419-1463-7_1, © Springer Science+Business Media, LLC 2010
- [43] Yue, Fangfang & Zhang, Jinrui & Xu, Jiabin & Niu, Tengfei & Lü, Xin & Liu, Manshun. (2022). Effects of monosaccharide composition on quantitative analysis of total sugar content by phenol-sulfuric acid method. *Frontiers in Nutrition*. 9. 963318. doi:10.3389/fnut.2022.963318.
- [44] C.Patrick Doncaster and Andrew Davey. “Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences.” CambridgeUniversityPress.

- [45] Miller,N.J y Miller,J.C. “Estadística y Quimiometría para Química Analítica”. Cuarta edición.Prentice Hall.2002.
- [46] H. P. Piepho, “Letters in mean comparisons: What they do and don’t mean,” *Agronomy Journal*, vol. 110, no. 2. American Society of Agronomy, pp. 431–434, Mar. 01, 2018. doi: 10.2134/agronj2017.10.0580.
- [47] H. P. Piepho, “An algorithm for a letter-based representation of all-pairwise comparisons,” *Journal of Computational and Graphical Statistics*, vol. 13, no. 2, pp. 456–466, Jun. 2004, doi: 10.1198/1061860043515.
- [48] N. K. Sarker and P. Kaparaju, “A Critical Review on the Status and Progress of Microalgae Cultivation in Outdoor Photobioreactors Conducted over 35 Years (1986–2021),” *Energies*, vol. 16, no. 7. MDPI, Apr. 01, 2023. doi: 10.3390/en16073105.
- [49] Carreira-Casais, Anxo & Rodríguez, María & González Pereira, Antía & Rivo, Franklin Noel & Soria López, Antón & García-Pérez, Pascual & Otero, Paz & Cao, Hui & Xiao, Jianbo & Simal-Gandara, Jesus & Prieto, Miguel. (2021). Critical Variables Influencing the Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Compounds-A Review. *Chemistry Proceedings*. 5. doi:10.3390/CSAC2021-10562.
- [50] F. Chemat, Zill-E-Huma, and M. K. Khan, “Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction,” in *Ultrasonics Sonochemistry*, Elsevier B.V., 2011, pp. 813–835. doi: 10.1016/j.ultsonch.2010.11.023.
- [51] Vinatoru, Mircea. (2014). Ultrasonically assisted extraction (UAE) of natural products some guidelines for good practice and reporting. *Ultrasonics sonochemistry*. 25. doi: 10.1016/j.ultsonch.2014.10.003.

7 Anexo

7.1 Resultados L9

Tabla Anexos 1. Diseño L9 de Taguchi. Se adjuntan los valores de PRY y CRY obtenidos para cada una de las combinaciones.

Temperatura/°C	Tiempo/h	Ratio	Morteroado	PRY	CRY
20	0.5	3	Nada	6.53	8.32
20	0.5	3	Nada	7.56	9.03
20	1	6	Manual	16.18	15.76
20	1	6	Manual	15.39	12.99
20	2	12	Discos	24.49	35.63
20	2	12	Discos	24.43	35.40
30	0.5	6	Discos	17.00	31.08
30	0.5	6	Discos	17.33	33.83
30	1	12	Nada	10.46	15.41
30	1	12	Nada	10.62	14.51
30	2	3	Manual	14.39	18.22
30	2	3	Manual	13.86	17.57
40	0.5	12	Manual	16.06	17.96
40	0.5	12	Manual	15.85	17.06
40	1	3	Discos	18.56	35.02
40	1	3	Discos	17.22	38.25
40	2	6	Nada	11.48	15.57
40	2	6	Nada	10.93	15.77

7.2 Resultados de ultrasonidos

Tabla Anexos 2. Combinaciones para el diseño factorial completo para la aplicación de US a la biomasa. Se adjuntan los valores obtenidos de PRY y CRY para cada una de las combinaciones.

Biomasa	Tiempo US / h	Temperatura / °C
Pura	0.5	20
Pura	0.5	30
Pura	0.5	40
Pura	1	20
Pura	1	30
Pura	1	40
Pura	2	20
Pura	2	30
Pura	2	40
Pura	0.5	20
Purín	0.5	30
Purín	0.5	40
Purín	1	20
Purín	1	30
Purín	1	40
Purín	2	20
Purín	2	30
Purín	2	40