



Escuela Superior de Ciencias Experimentales y Tecnología

GRADO EN INGENIERÍA QUÍMICA

Curso académico 2022/23

Trabajo de Fin de Grado

**Diseño y Simulación de un Proceso de Producción de Astaxantina
y Biogás a partir de microalgas**

José Monescillo Gijón



GRADO EN INGENIERÍA QUÍMICA

Trabajo de Fin de Grado

El presente trabajo, titulado “SIMULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA Y BIOGÁS A PARTIR DE MICROALGAS”, constituye la memoria correspondiente a la asignatura Trabajo Fin de Grado que presenta D. José Monescillo Gijón como parte de su formación para aspirar al título de Graduado en Ingeniería Química. Este trabajo ha sido realizado en la Universidad Rey Juan Carlos, en los departamentos de Tecnología Química y Ambiental y Tecnología Química , Energética y Mecánica

Índice

Resumen	1
Introducción	3
1. Microalgas	3
1.1 Biorrefinería de microalgas	4
2. Astaxantina.....	5
2.1 Descripción general	5
2.2 Propiedades	5
2.3 Microalgas ricas en astaxantina.....	6
2.4 Procesos de pretratamiento y extracción de astaxantina de microalgas	7
3. Biogás.....	9
3.1 Proceso de producción.....	10
3.2 Producción de biogás a partir de microalgas	10
Objetivos	11
Solución Técnica/ resultados	12
1. Selección de la microalga.....	12
2. Selección del pretratamiento y proceso de extracción de astaxantina.....	13
3. Diagrama de bloques	14
4. Capacidad de producción	15
5. Simulación y discusión de resultados.....	15
5.1 Etapa de cultivo	16
5.1.1 Discusión de resultados	19
5.2 Etapa de filtrado y cosechado.....	19
5.2.1 Discusión de resultados	21
5.3 Etapa de extracción de astaxantina.....	22
5.3.1 Discusión de resultados	25
5.4 Etapa de digestión anaerobia. Síntesis de biogás	26
5.4.1 Discusión de resultados	28
5.5 Tratamiento de fangos	29

5.5.1 Discusión de resultados	30
Conclusiones	31
Anexo	32
Glosario de términos	32
Bibliografía	34

Resumen

Desde hace siglos, las algas han sido un alimento utilizado por la especie humana. Aunque recientemente, su producción y su consumo se ha incrementado considerablemente, motivado, en otras razones, por las recomendaciones de organismos de reconocida importancia mundial como la OMS y la FAO, o sus múltiples propiedades beneficiosas. Esta búsqueda de alimentos que aporten beneficios para la salud y que sean capaces de reducir la aparición de enfermedades, ha desembocado en el novedoso término “superalimento”. Los llamados “superalimentos” parecen prometer soluciones innovadoras para prevenir, e incluso curar, ciertas enfermedades a partir de su alto contenido en compuestos favorables para la salud. Por ello, el consumo se ha elevado exponencialmente, a pesar de los altos precios que poseen. Alimentos fermentados, como el kimchi o el kéfir, semillas de chía, acai, aguacate, quinoa o bulgur, entre muchos ejemplos, han sido sustituidos por algas, como la espirulina o el kelp.

En el presente Trabajo Fin de Grado, se ha diseñado la producción a gran escala de la microalga *Haematococcus pluvialis*, por ser una de las especies descubiertas hasta el momento, que mayor cantidad de astaxantina natural es capaz de producir. La astaxantina es un carotenoide de color rojo, con diversas aplicaciones curativas o regenerativas en humanos y, capaz de mejorar la productividad o de ciertas cualidades en animales.

Para su cultivo, recolección y extracción, se ha planteado una biorrefinería basada en un sistema de producción en continuo, que utiliza estanques abiertos (también llamados “raceway”) como sistema de cultivo. El área necesaria calculada ha sido de 0,5942 ha. Previamente, la materia prima utilizada (*H. pluvialis*), se ha seleccionado de manera rigurosa tras un análisis comparativo de tres especies diferente de microalga. Finalmente, en base a criterios de composición y productividad, se ha seleccionado dicha microalga. *H. pluvialis* tiene un contenido de hasta el 5% de astaxantina y, tras el cultivo y recolección se obtuvo una corriente con un caudal de 11,25 kg/h y un porcentaje másico de biomasa del 4,98%. A continuación, se ha escogido el método de extracción. Después de estudiar las consecuencias de cada posible proceso y de su afcción, tanto a la materia prima, como al medio ambiente; teniendo siempre presente las posibles repercusiones de utilizar procedimientos que conlleven un mayor consumo energético y, por consiguiente, un hipotético aumento en las emisiones y/o residuos, se ha optado por utilizar sonicación como método de disrupción celular. Para la extracción de la astaxantina liberada al medio tras la lisis celular, se ha utilizado acetato de etilo como disolvente. Este solvente ha sido escogido teniendo en cuenta criterios biológicos y ambientales, dónde se ha pretendido reducir al mínimo la toxicidad y el impacto en el entorno natural y, la polaridad, evitando el arrastre de una gran cantidad de agua, que reduciría la pureza y el valor de la corriente de interés. Tras el proceso de extracción de astaxantina mediante la utilización de acetato de etilo, se consiguió una corriente con un caudal de 1,92 kg/h y una concentración del 7% en astaxantina.

Por otro lado, se ha buscado una forma de dar una segunda vida a los residuos generados. Mejor dicho, se ha implementado un sistema que ha permitido la reducción del volumen final de residuos, además de, generar una corriente gaseosa de biogás, rica en metano, que posee un gran poder calorífico, convirtiéndola en una eficiente fuente de energía. Para ello, se ha diseñado un proceso de digestión anaerobia que utiliza la biomasa residual generada en el proceso de extracción de astaxantina. Mediante la acción de microorganismos anaerobios, la materia orgánica residual sufre una serie de cambios que reducen su volumen y producen un efluente gaseoso, principalmente compuesto por metano y dióxido de carbono. A su vez, la corriente líquida que abandona el digestor, puede valorizarse siendo utilizada como fertilizante debido a su alto contenido en nutrientes. Se obtuvo un caudal de biogás de 4,91 kg/h con un porcentaje masico del 70% en metano y un caudal de fango espesado de 18,38 kg/h y un porcentaje másico del 92% en agua.

Introducción

1. Microalgas

Las algas son un tipo de plantas que se encuentran en zonas húmedas como lagos y mares. Son organismos fotosintéticos, por lo que son capaces de producir compuestos orgánicos absorbiendo energía solar. Muchas especies almacenan gran cantidad de lípidos y carbohidratos que se aprovechan tanto para la producción de bioproductos de alto valor añadido como biocombustible¹ [1].

Las algas se clasifican en tres subgrupos: macroalgas, microalgas y cianobacterias.

1. Macroalgas

Las macroalgas son una fuente de materias primas a partir de la cual se extraen componentes como el yodo, algina² y carragenina³, además de proporcionar productos y suplementos para el consumo humano. Son organismos eucariotas, por lo que disponen de un núcleo diferenciado por una membrana, y, multicelulares, dónde se pueden diferenciar hojas, tallos y raíces [2].

En la figura 1, se representan imágenes de macroalgas como ejemplo:

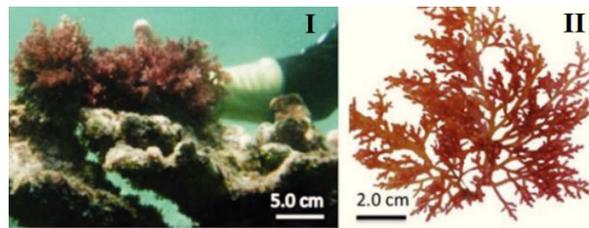


Figura 1: Ejemplo macroalga. Familia Rhodomelaceae. **I.** talos pseudoparenquimatosos; **II.** hábito de *Laurencia* sp. sobre corales [3].

2. Microalgas y cianobacterias

Las microalgas son microorganismos (2-200 μm) fotosintéticos unicelulares que poseen núcleo y todos los orgánulos propios de células eucariotas. Están presentes en todos los cuerpos de agua, dulce o salada, e incluso pueden desarrollarse en ambientes terrestres y pueden sobrevivir en las condiciones más extremas. Algunas microalgas están rodeadas solamente por la membrana plasmática, aunque la mayoría poseen pared celular [2].

La Figura 2 representa el aspecto de la célula y pared celular de *N. gaditana* (A-G) y *C. vulgaris* (H-J), dos especies de microalgas.

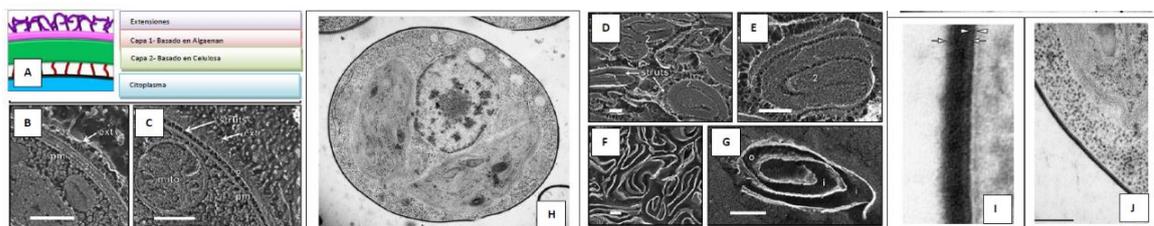


Figura 2: Ejemplo de microalga y algunas de sus estructuras fisiológicas. **A.** modelo de la pared de *N. gaditana*; **B.** Corte transversal de la pared nativa mostrando sus dos capas; **C.** Corte tangencial a través de las dos capas nativas; **D y E.** Presionado de las paredes celulares, con la prominente capa fibrilar 2, enmascarando la presencia de la capa 1; **F y G.** Pared celular después de 24 horas de incubación con celulosa. La capa fibrilar fue digerida, exponiendo la capa 1; **H.** Célula de *C. vulgaris* completa después de la división de los cloroplastos, pero antes de la división de los protoplastos; **I y J.** Imagen de la pared celular al final de la fase de crecimiento [4].

Algunas especies son células procariotas que carecen de orgánulos como plastidios, mitocondrias, núcleo, aparato de Golgi y flagelos, como es el caso de las cianobacterias. Los compuestos fotosintéticos están repartidos libremente por el protoplasma celular. Tienen dos procesos nutricionales, durante el día realizan la fotosíntesis y por la noche son capaces de fijar nitrógeno que utilizan como fuente de alimento [4].

A pesar de las diferencias que existen entre microalgas y cianobacterias, desde el punto de vista de la Ingeniería de procesos, en muchas ocasiones se engloban ambas en el término de microalgas. Por ello, para este Trabajo Fin de Grado, y a partir de este párrafo en el que se hace referencia, cuando se utilice el término microalgas, englobará tanto microalgas como cianobacterias. De igual manera, el diseño de los equipos será aplicable tanto a microalgas como a cianobacterias [5].

1.1 Biorrefinería de microalgas

Una biorrefinería es un sistema o conjunto de sistemas que integran procesos y equipos de transformación, donde utilizando la biomasa⁴ como materia prima, se pueden producir biocombustibles, energía y productos químicos. Las biorrefinerías son análogas a las refinerías de petróleo, ambas se pueden comparar en lo que respecta al fraccionamiento y transformación de una materia prima compleja. Sin embargo, en una biorrefinería se utiliza una materia prima renovable, y que no ha sufrido una biodegradación de largo plazo (como el crudo de petróleo). Por lo tanto, las posibilidades de obtener más productos son mayores utilizando la biomasa (en este caso de microalgas) [6].

Además, las biorrefinerías ofrecen una amplia gama de técnicas y tecnologías emergentes para separar la biomasa en sus principales constituyentes, permitiendo obtener biocombustibles, utilizados para su uso o como fuente de calor, y bioproductos⁵ de alto valor añadido, que se utilizan en la industria cosmética, farmacéutica, alimentaria, tanto humana como animal, así como en la producción de bioplásticos y biofertilizantes [2].

En la Figura 3, se observa una imagen de la planta de producción de microalgas de Alga Energy en Arcos de la Frontera (Cádiz). En el caso concreto del presente Trabajo Fin de Grado, se lleva a cabo el estudio y simulación de una biorrefinería de microalgas para obtener astaxantina y biogás.



Figura 3: Ejemplo de biorrefinería de microalgas. Planta real ubicada en Arcos de la Frontera (Cádiz), de Alga Energy [7]

2. Astaxantina

2.1 Descripción general

La astaxantina, es un carotenoide⁶ secundario de color rojo brillante que se utiliza ampliamente en la industria alimentaria, cosmética, acuícola⁷, nutracéutica⁸ y farmacéutica. También está presente en la carne, en los salmónidos, en los camarones y en los cangrejos de río. Dentro de los carotenoides, pertenece al grupo de xantofilas. Químicamente, es el 3,3'-dihidroxi- β,β' -caroteno-4,4'-diona [8].

En la Figura 4 y 5 se muestran diferentes imágenes ejemplo de la astaxantina:

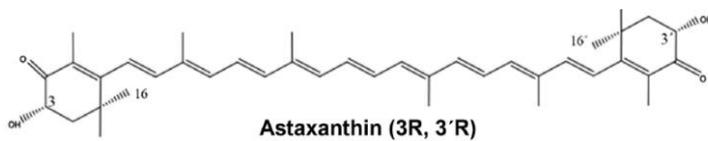


Figura 4: Estructura química de la molécula de astaxantina [9].

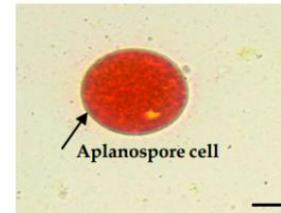


Figura 5: Aspecto del quiste de astaxantina al final del cultivo [10].

Se puede producir sintéticamente, aunque las propiedades y beneficios de la astaxantina natural, hacen que esta sea de mayor calidad y la más demandada en el mercado. La dificultad para su producción y extracción, y las destacables propiedades antioxidantes que posee han elevado su precio hasta los 100 USD por kg, precio que se mantiene hoy en día. Hasta la fecha, se calcula que el mercado mundial de la astaxantina alcanzará los 1.000 millones de USD en 2025 [10]. En la actualidad, la pigmentación del pescado es la única función práctica de la astaxantina sintética como aditivo para pienso. La astaxantina sintética no ha sido aprobada como aditivo alimentario ni suplemento para el consumo humano debido a la diferencia en la estructura molecular con respecto al producto natural [10].

2.2 Propiedades

Debido a su capacidad antioxidante, la astaxantina ha despertado interés recientemente por sus propiedades beneficiosas para la salud, que incluyen propiedades antidiabéticas, antiinflamatorias, antienvejecimiento, alimenticias y nutricionales. La astaxantina es un ingrediente nutricional muy popular y un componente importante en los piensos para animales y acuicultura. Esta actividad antioxidante es mayor en la astaxantina natural, que además contiene un mayor número de biocompuestos como la vitamina C, el β -caroteno, la cantaxantina, la zeaxantina, la luteína y el α -tocoferol [8][11].

➤ Antidiabéticas

La administración de astaxantina natural no se ha relacionado con ningún efecto secundario negativo en los ensayos. Como resultado, ha sido analizada en profundidad como agente antidiabético. Se descubrió que la astaxantina es un potente antioxidante que puede controlar y prevenir la resistencia a la insulina⁹ y la esteatosis¹⁰ hepática. Además, reduce la hiperglucemia y protege contra la retinopatía¹¹, la nefropatía¹² y la neuropatía¹³.

➤ Antiinflamatorias

Se ha demostrado que la astaxantina contiene actividad antiinflamatoria, y se ha comprobado que tiene beneficios protectores contra las lesiones pulmonares agudas. Por otro lado, su uso también es beneficioso para el corazón, ya que, inhibiendo el estrés oxidativo, la apoptosis¹⁴ y previene enfermedades como la aterosclerosis¹⁵, la hipertensión arterial y la dislipidemia¹⁶.

➤ Antienvjecimiento

La astaxantina es un carotenoide con fuertes propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Gracias a su efecto antiinflamatorio, la suplementación de la astaxantina puede prevenir la degradación de la piel relacionada con la edad y preservar problemas cutáneos relacionados con el daño medioambiental por lo que se utiliza como ingrediente cosmético.

➤ Industria alimentaria

Las recientes investigaciones sobre ingredientes alimentarios funcionales han revelado un gran interés por la producción de alimentos que contienen elementos de algas verdes, como la astaxantina. Es utilizada con frecuencia como suplemento dietético en las industrias de alimentos. La utilización de astaxantina como sustitutivo de los antioxidantes sintéticos, ha dado lugar a una mayor estabilidad frente a la oxidación, permitiendo preservar la composición nutricional y alargar la vida útil de los productos, sin emplear aditivos sintéticos que, además, pueden ser una posible fuente de carcinógenos¹⁷.

➤ Acuicultura y producción de piensos

Además de su capacidad antioxidante, la astaxantina también puede emplearse como adición a la dieta en la acuicultura para aumentar el rendimiento de crecimiento y como ingrediente de piensos para pollos. Al suplementar los alimentos de los peces con astaxantina se redujeron los niveles de colesterol y triglicéridos, entre otros beneficios. Por otro lado, este pigmento carotenoide dota de un color rojo rosado a la carne de varios peces, lo que mejora la calidad y la aceptación de los clientes.

2.3 Microalgas ricas en astaxantina

El gran potencial de mercado de la astaxantina natural, ha impulsado el cultivo masivo de organismos que producen naturalmente este biopigmento de interés para las aplicaciones indicadas previamente.

La microalga predominante en este ámbito es la microalga verde *Haematococcus pluvialis*, siendo la especie que actualmente es capaz de producir una mayor cantidad de astaxantina. Otra microalga, *Monoraphidium sp.*, es una buena productora de β -caroteno y también de astaxantina. *Chromochloris (Chlorella) zofingiensis* es otra fuente potencial de astaxantina natural, debido a su rápido crecimiento. Existen otras microalgas como *Nannochloropsis sp.*, *Chlorella vulgaris*, *Botryococcus braunii*, *Chlorococcum sp.* que también tienen la capacidad de generar astaxantina, aunque en cantidades poco significativas [12].

En las figuras 6 y 7 se muestran dos ejemplos del cultivo de *H. pluvialis*:



Figura 6: Cultivo de *H. pluvialis* en fotobiorreactores tubulares [13].



Figura 7: Cultivo de *H. pluvialis* en tanques abiertos [13].

2.4 Procesos de pretratamiento y extracción de astaxantina de microalgas

Tras su recolección en los sistemas de cultivo, las paredes celulares de las microalgas, debido a su robustez, representan probablemente la mayor barrera para la extracción de compuestos de interés. El principal inconveniente es el alto consumo de energía o métodos fisicoquímicos de extracción y disrupción celular que son necesarios [14].

Junto con la mejora de la producción de astaxantina, la disrupción celular y la extracción de astaxantina son los aspectos más importantes, ya que influyen significativamente en el coste total de la producción de astaxantina. Por ello, la importancia de seleccionar un pretratamiento y método de extracción que permita obtener la máxima cantidad de astaxantina posible, pero, evitando siempre una posible degradación química o térmica que pueda afectar a la estructura molecular de la astaxantina y, en consecuencia, a las propiedades que posee [14].

Existen muchos métodos de ruptura de la pared celular que permiten maximizar la eficacia de la extracción de los bioproductos de interés, como lípidos y astaxantina, en microalgas industriales como *H. pluvialis*. Algunos de estos procesos son: homogeneización, ultrasonidos, microondas, disolventes, ácido/base, oxidación de Fenton, enzimas hidrolíticas y CO₂ supercrítico (SC-CO₂), entre otros [15] [8]. Según la escala, la eficacia de estos métodos se ve afectada por las condiciones de operación como temperatura, presión, así como las propiedades fisiológicas y bioquímicas de la biomasa (cepa, medio, modo de nutrición, estado de las células (seco/húmedo y vivas), fase de crecimiento y método de almacenamiento, entre otros), influyendo significativamente en la rentabilidad económica [16].

A continuación, se analizarán los procesos de pretratamiento (disrupción celular) y extracción de astaxantina que se aplican en la actualidad. Se han agrupado en tres grupos: métodos biológicos, químicos y fisicoquímicos; de manera que sea más sencilla la selección de aquellos que se utilizarán para la simulación planteada en este Trabajo Fin de Grado.

2.4.1 Disrupción celular biológica y extracción con disolventes

Los pretratamientos biológicos son generalmente métodos que degradan la pared celular utilizando enzimas líticas. Las enzimas hidrolíticas son las más populares. Estas, degradan la pared celular de las algas y, posteriormente, los productos intracelulares se recuperan mediante extracción con disolventes [17]. A diferencia de los casos de *Chlorella* sp., la degradación enzimática de la pared celular de *H. pluvialis* es muy limitada, porque estas enzimas son caras, y la pared celular del quiste de *H. pluvialis*

es conocida por su gran resistencia a la degradación en comparación con otras microalgas [15].

A pesar de su fortaleza, enzimas hidrolíticas en combinación con disolventes, por ejemplo, pectinasa y celulasa seguidas de acetato de etilo como disolvente, son utilizadas para extraer astaxantina de biomasa seca de *H. pluvialis* [17].

Los pretratamientos biológicos, pueden ofrecer varias ventajas, como el menor consumo de energía, el uso de disolventes menos tóxicos y la producción nativa de astaxantina al evitar el estrés térmico. Sin embargo, hay que tener en cuenta varias cuestiones, como la mejora de la tasa de germinación o el debilitamiento sincronizado de las células del quiste, para que los pretratamientos biológicos puedan ser considerados para futuras aplicaciones en biorrefinerías de microalgas [15] [8] [16].

2.4.2 Disrupción celular química y extracción con disolventes

En general, los tratamientos químicos presentan ventajas como la baja energía necesaria y una buena escalabilidad, pero deben ser seleccionados de manera minuciosa teniendo en cuenta su bio-toxicidad y reactividad a la astaxantina, como se ha indicado anteriormente [8].

La disrupción celular y la extracción de astaxantina con disolventes, son los métodos más comunes y fáciles de aplicar, sin necesidad de utilizar ningún instrumento sofisticado. Para la extracción de la astaxantina se utilizan habitualmente disolventes orgánicos como etanol, metanol, acetona, hexano, diclorometano (DCM) y acetato de etilo. Sin embargo, de acuerdo con la salud y las preocupaciones por el medioambiente, los disolventes más recomendados son la acetona y el etanol [17].

Se propuso un experimento en el que se utilizó la acetona como solución única para la desintegración de las paredes celulares y extracción de astaxantina. Se obtuvo una cantidad muy baja, en quistes intactos de *H. pluvialis*, incluso después de una extracción prolongada de 16 h [15]. Según la bibliografía, también existen procesos de extracción basados en la utilización de líquidos iónicos¹⁸ [15].

En general, los resultados indican que el rendimiento de extracción de astaxantina depende en gran medida de las condiciones operativas, como el tipo y la mezcla de disolventes y el tiempo de procesamiento. En cuanto al estado (más seco/húmedo, etapa de crecimiento), falta información y estudios al respecto [16].

2.4.3 Disrupción fisicoquímica de las células y extracción con disolventes

Existen varios métodos integrados de extracción fisicoquímica que combinan la extracción física (la molienda con microesferas, las microondas, los ultrasonidos o la extracción con fluidos supercríticos, entre otros) con la extracción química (disolvente orgánico, ácido o tampón de ruptura¹⁹) en una sola etapa y secuencialmente para mejorar la eficacia de extracción de astaxantina de la biomasa de *H. pluvialis*[15]. La molienda de microesferas es el método más extendido y es un procedimiento eficaz y respetuoso con el medio ambiente. Un estudio reciente descubrió que, utilizando esferas de zirconia²⁰ con disolventes como acetona y etanol, es posible recuperar prácticamente toda la astaxantina (31,6 mg/g de biomasa; una eficiencia superior al 99%) en 30 minutos a 200 rpm [17]. En 2021, se analizó la utilización de nanoplacas ultrafinas de α -cuarzo con un tamaño aproximado de 1,14 μm y un grosor de

7,7 nm para la extracción de astaxantina. Los resultados mostraron que las nanoplacas penetran con éxito en los quistes de *H. pluvialis* y recuperaron eficazmente el 99 % de astaxantina en la extracción con diclorometano y metanol [18].

En la actualidad, los fluidos supercríticos (SCF) se utilizan ampliamente con fines de extracción, ya que son más eficaces que los disolventes líquidos tradicionales. Los fluidos supercríticos actúan como disolventes líquidos con poderes de disolución selectivos. El CO₂ supercrítico (SC-CO₂) es, con diferencia, el fluido supercrítico más utilizado en la extracción de compuestos naturales. El CO₂ supercrítico no es inflamable, no es tóxico y es relativamente inerte. Además, la adición de pequeñas cantidades de otros disolventes (denominados arrastrantes o cosolventes) aumenta su poder disolvente. El extracto obtenido por extracción con SCF es altamente concentrado, ya que el disolvente se separa por despresurización del proceso. [18].

Otros experimentos que analizaban el uso de las diferentes técnicas mencionadas anteriormente en el presente Trabajo Fin de Grado no obtuvieron resultados destacables de recuperación de astaxantina o, al menos, no tan relevantes como los detallados en los apartados 2.4.1, 2.4.2 y 2.4.3 [15].

Métodos como las microondas y los ultrasonidos también fueron estudiados. La principal ventaja de su uso es la mayor eficacia en la lisis celular, en comparación, con la molienda mecánica o lisis enzimática, entre otras técnicas. Además, es un método rápido, fácil de usar y controlar, que no utiliza sustancias químicas y, relativamente barato, pues el precio de los sonicadores (equipos que generan os ultrasonidos), no es excesivamente elevado. En cuanto a las posibles consecuencias negativas en su utilización, pueden provocar cambios estructurales en la molécula de astaxantina, convirtiendo diferentes isómeros e, incluso, cabe la posibilidad de que se degraden pigmentos, debido a que puede generar cavitación en el disolvente [18]. No obstante, si previamente se realiza un ajuste riguroso de los parámetros, evitando la posibilidad de que pueda degradar a la materia prima o la sustancia de, es un método a tener en cuenta, debido a la alta eficacia que posee, su versatilidad y su sencillo uso.

Por otro lado, los pretratamientos mecánicos generalmente pueden ser empleados en concentraciones de biomasa con un menor tiempo de procesamiento. Sin embargo, el elevado consumo energético y el necesario aumento de escala son factores importantes que afectan a la rentabilidad en la producción de astaxantina de *H. pluvialis* [15].

3. Biogás

El biogás es un biocombustible gaseoso formado principalmente por metano y dióxido de carbono y pequeñas fracciones de otros gases como hidrógeno, nitrógeno, oxígeno y sulfuro de hidrógeno, que se obtiene por la descomposición anaeróbica de la biomasa. Es un proceso, en el que, en ausencia de oxígeno, bacterias fermentativas y metanogénicas biodegradan la materia orgánica resultando la mezcla gaseosa descrita. Se puede generar de manera natural y también se trata de un proceso útil para gestionar los residuos orgánicos del que se obtiene un efluente con valor añadido [19].

3.1 Proceso de producción

El proceso general se divide en tres etapas [19][20]:

1. Hidrolisis: los organismos hidrolíticos producen enzimas extracelulares capaces de convertir la materia orgánica compleja (proteínas, carbohidratos, lípidos, etc.) en compuestos orgánicos solubles, que serán metabolizados por las bacterias anaerobias.
2. Acidogénesis y acetogénesis: el material orgánico es fermentado por varios microorganismos, formando así compuestos que son utilizados, primeramente, por microorganismos metanógenos (ácido acético, fórmico, H_2), y, posteriormente, compuestos orgánicos más reducidos (ácido láctico, propiónico, butírico, etanol), que serán oxidados por las bacterias acetogénicas a pequeños sustratos que puedan ser metabolizados por las bacterias metanógenas.
Solo el ácido acético formado da lugar al 70% del metano generado. Además, en esta etapa, se consume cualquier traza de oxígeno presente.
3. Metanogénesis: las bacterias metanogénicas, actúan sobre los productos de las etapas anteriores y completan el ciclo de biodescomposición anaeróbica mediante la producción de metano.

La composición final de la mezcla está formada por 50-70% de metano, 25-50% de dióxido de carbono y 1-5% de otros gases como hidrogeno o nitrógeno [19].

3.2 Producción de biogás a partir de microalgas

Las microalgas son capaces de generar una amplia gama de bioproductos que son beneficiosos y/o de interés para el ser humano, como, por ejemplo, la astaxantina, descrita anteriormente en el presente trabajo fin de grado. Además, la biomasa residual, rica en proteínas, carbohidratos y lípidos puede ser utilizada para la generación de biogás, valorizando estos deshechos y reduciendo la materia orgánica no deseada o no utilizable [21].

Este gas rico en CO_2 puede ser utilizado de forma eficiente recirculándolo, una vez separado, hacia la zona de cultivo. El CO_2 se consumiría como fuente de carbono inorgánico para el crecimiento de las microalgas, aumentando así la fracción de metano y mejorando aún más el biogás. Posteriormente, el biogás mejorado podría utilizarse para la generación de calor y energía [21]. Cabe destacar, que, para una posible aplicación de la recirculación mencionada, sería necesario realizar una separación previa del metano, pues se trata del principal gas de interés. Por tanto, será necesario realizar el conveniente estudio sobre la aplicación y la rentabilidad de esta posible técnica para su incorporación en el proceso. En el presente Trabajo Fin de Grado no se abordara dicha cuestión debido a las limitaciones de espacio y tiempo que requeriría.

Las algas contienen elevadas cantidades de polisacáridos y sustancias lipídicas. Estas, influyen significativamente en la calidad de la biomasa para la producción de biogás [22]. Relacionado con esto, existen parámetros que son cruciales para evaluar la idoneidad de dicha biomas, como es la relación C:N (relación Carbono : Hidrógeno). Para un rendimiento óptimo de un proceso de digestión anaerobia, la relación C:N debe estar en el rango 20:1-30:1 [23].

Objetivos

El objetivo general del presente Trabajo Fin de Grado es el diseño y desarrollo de una biorrefinería de microalgas basada en la extracción de astaxantina como producto de alto valor añadido, y la obtención de bioenergía en forma de biogás de la biomasa residual obtenida.

Para el desarrollo del objetivo descrito anteriormente, se plantearon una serie de objetivos parciales. Son los siguientes:

- Selección del tipo de microalga con mejores características para el proceso requerido, priorizando aquellas con mayor capacidad de producción de astaxantina.
- Selección y diseño de un proceso que se ajuste a la materia prima seleccionada y que permita obtener astaxantina de la manera más eficiente y económica posible. Simultáneamente, se planteará el diseño de un proceso que permita transformar la biomasa residual, del proceso de extracción de astaxantina, en biogás.
- Simulación de los procesos descritos, introduciendo valores realistas, basados en datos de producción de biorrefinerías operativas actualmente, y análisis de los resultados obtenidos y valoración de los mismos. De esta manera, es posible determinar estimaciones de parámetros que permitan decidir la posible aplicación del proyecto.

Solución Técnica/ resultados

1. Selección de la microalga

Para realizar las operaciones necesarias para la extracción de la astaxantina y la obtención de biogás de la biomasa residual, en primer lugar, se seleccionó la materia prima con la que se iba a trabajar. Para ello, se realizó una comparación entre las tres especies de microalgas ricas en astaxantina que mejores características tenían para la biorrefinería planteada. Se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1: Comparación de las características de algunas microalgas ricas en astaxantina [4]

	<i>H. pluvialis</i>	<i>C. zoofingensis</i>	<i>N. gaditana</i>
Contenido de astaxantina (% peso seco)	En quiste (~82%) 3-5% de la biomasa seca	0,1-0,4% de la biomasa seca	1,6-2 % de la biomasa seca
Pared celular	Sí (~2,2 µm)	Sí (1-25 nm)	Sí (2-21 nm)
Composición pared celular (% peso seco)	- HC: 70% - Celulosas: 3% - Proteínas. 6% - Materiales resistentes a la acetólisis: 3%	-	Celulosa: ~75%
Estructura pared celular	Pared celular rígida de 3 capas: - TLS: compuesta por polímero alifático resistente a la acetólisis - Intermedia: estructura gruesa amorfa rica en manosa y celulosa - Terciaria: disposición heterogénea de manosa y celulosa	Pared celular de 2 capas: - Capa exterior dura de esporopolenina (biopolímero muy resistente) - Pared secundaria rica en manosa y polisacáridos similares a la quitina con disposición heterogénea	Pared celular de 2 capas: - Pared externa hidrofóbica de polímero alifático resistente a la acetólisis - Pared interna rica en celulosa (~75%)
Composición microalga (% peso seco)	- Lípidos: 32 ~ 40 % - Carbohidratos: 36 ~ 40 % - Proteínas: 17 ~ 25 % - Carotenoides: 2 ~ 5 %	- Lípidos: ~35 % - Carbohidratos: ~4 9% - Proteínas: ~17 % (Datos bajo estrés de N)	- Lípidos: ~18 % - Carbohidratos: ~38 % - Proteínas: ~29 % -
Resistencia a químicos	ALTA	BAJA	MEDIA

Teniendo en cuenta que el bioproducto de interés es la astaxantina y que el objetivo del proceso es maximizar la producción y recolección de este pigmento, la microalga que cuenta con un mayor contenido de este carotenoide, es *H. pluvialis*. A pesar de poseer la pared celular más resistente de las microalgas analizadas, y que, en consecuencia, mayor gasto energético supondrá, el porcentaje de astaxantina en la célula de *H. pluvialis*, en comparación con los otros dos tipos de microalgas, es considerablemente superior. La astaxantina es una biosustancia con un valor de mercado muy elevado, por lo que, *H. pluvialis*, predomina como candidata, a pesar de las posibles limitaciones que su fisiología provoca. Además, el contenido en el resto de macronutrientes (proteínas, lípidos y carbohidratos), también es importante analizarlo de forma rigurosa, pues será la materia prima del biogás que se producirá a partir de la biomasa residual. Un aspecto que afecta directamente a la calidad del biogás es la proporción C : N, que influye significativamente en la producción de metano, compuesto mayoritario de la mezcla gaseosa que denominamos biogás. Dicha proporción debe ser notablemente superior para el Carbono respecto al Nitrógeno (de 1:20-1:30). Por ello, es importante seleccionar una biomasa que

tenga un alto contenido en lípidos y bajo en proteínas. Teniendo en cuenta esto, de nuevo, *H. pluvialis*, resulta ser la mejor candidata, para ser la microalga seleccionada como materia prima del proceso descrito en este Trabajo Fin de Grado [22] [23].

2. Selección del pretratamiento y proceso de extracción de astaxantina

Una vez seleccionada el tipo de biomasa que se va a utilizar, es necesario escoger el pretratamiento y los métodos de extracción de astaxantina óptimos para la preservación de las características naturales de esta sustancia, minimizando los gastos tanto energéticos como de sustancias químicas y maximizando la recuperación de astaxantina, y, en definitiva, obteniendo un balance económico y ambiental lo más adecuado posible.

Algunos de las variables y factores a analizar para dicha elección son, entre otros, los costes químicos y/o energéticos, la estabilidad molecular de la biosustancia de interés, la toxicidad, y la escalabilidad o capacidad de operación a gran escala.

La rígida pared celular de *H. pluvialis*, supone uno de los primeros desafíos para este fin, pues la ruptura de la célula supone un alto consumo energético o de materiales y sustancias en los casos en los que se utilizan métodos fisicoquímicos. Por ello, una de las primeras decisiones escogidas es la aplicación de un pretratamiento que disminuya la resistencia que la pared celular ofrece a la rotura, y, por consiguiente, a la recuperación de astaxantina. Los pretratamientos convencionales implican métodos mecánicos como el prensado por expulsión, la molienda con esferas o la trituración, pero como se indicó anteriormente, consumen mucha energía y complica su escalabilidad [8][16].

En la simulación del presente Trabajo Fin de Grado, se ha escogido la sonicación como método de disrupción celular. Esta técnica ha sido seleccionada mayoritariamente por su eficacia, aunque también se tuvieron en cuenta la sencillez, rapidez y bajo coste que supone su utilización. Es cierto que existe el riesgo de degradación de la astaxantina, pero normalmente es consecuencia de la cavitación que se puede crear en los disolventes empleados. En este caso, es una técnica combinada de pretratamiento (lisis) y extracción química (mediante disolvente), pero no de manera simultánea. Por tanto, se descarta el posible deterioro de la sustancia de interés, no afectando a la utilización de sonicación como el método seleccionado.

Las técnicas convencionales de extracción con disolventes utilizan alcoholes alifáticos (por ejemplo, metanol, etanol) o ácidos y álcalis concentrados (por ejemplo, ácido sulfúrico o hidróxido de potasio) u otros disolventes, como el dimetilsulfóxido (DMSO), para la recuperación de la astaxantina. Sin embargo, el tipo de disolvente o agente de extracción utilizado depende en gran medida de la aplicación industrial. Teniendo en cuenta que las principales aplicaciones de la astaxantina son los nutracéuticos humanos y la acuicultura, la toxicidad y las posibilidades de contaminación de los productos químicos/disolventes utilizados y los cambios estructurales y/o la degradación por sustancias químicas

deberían evitarse o, al menos, minimizarse. Además, las técnicas convencionales de extracción con disolventes pueden no ser tan eficaces como otras tecnologías avanzadas. La extracción con SC-CO₂ precisa de un tiempo de extracción corto, una mejor calidad del bioproducto y un proceso de bajo coste. El SC-CO₂ es ampliamente utilizado en las industrias de *Haematococcus* como un método de extracción de astaxantina altamente selectivo, aunque la instalación de alta presión sigue siendo muy cara en comparación con otros métodos [8] [16].

Inicialmente, se analizó la posibilidad de utilizar metanol, acetona o acetato de etilo. Dichos disolventes son ampliamente utilizados por su baja toxicidad y sostenibilidad. Pero, finalmente, teniendo en cuenta que la corriente final estaría compuesta mayoritariamente de agua, era más razonable utilizar un disolvente menos polar, como el acetato de etilo. De esta manera, la corriente rica en astaxantina, arrastraría consigo menor cantidad de agua, aumentando su pureza. Además, facilitaría la separación entre el disolvente y la mezcla rica en astaxantina, permitiendo la recirculación de acetato y reduciendo los costes por pérdidas de disolvente.

3. Diagrama de bloques

En la Figura 8, se representa el diagrama simplificado del proceso planteado:

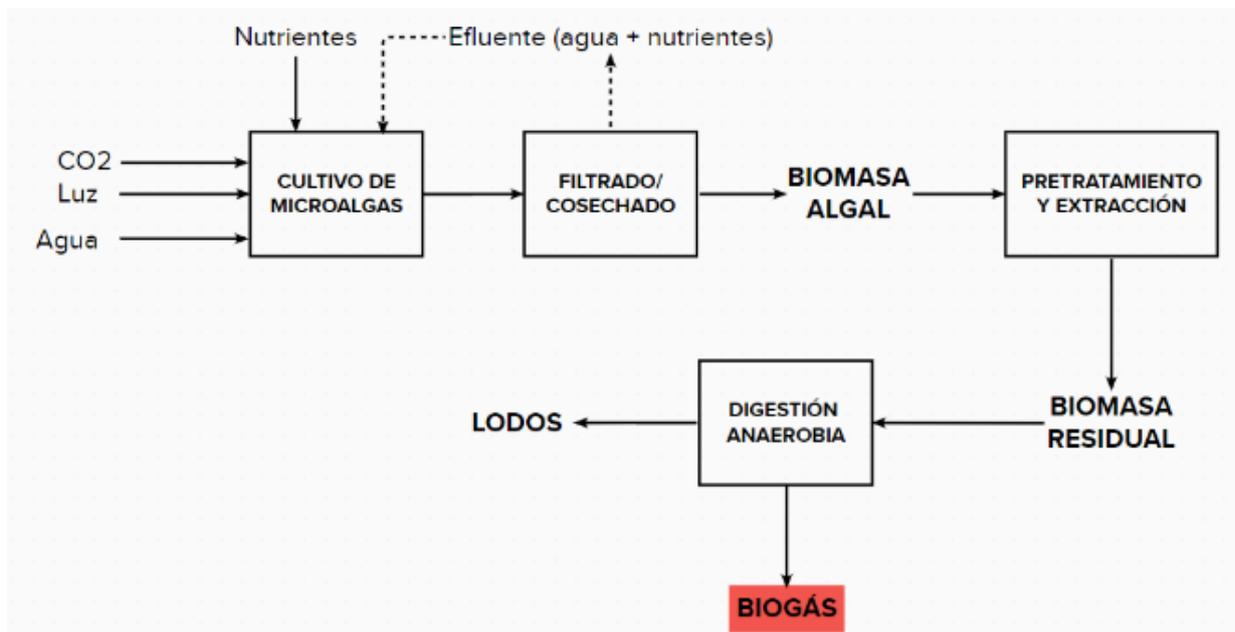


Figura 8: Diagrama de bloques simplificado del proceso de extracción de astaxantina y generación de biogás.

En la Figura 9, se puede apreciar el diagrama completo de proceso que se va a estudiar en la biorrefinería planteada en el presente Trabajo Fin de Grado:

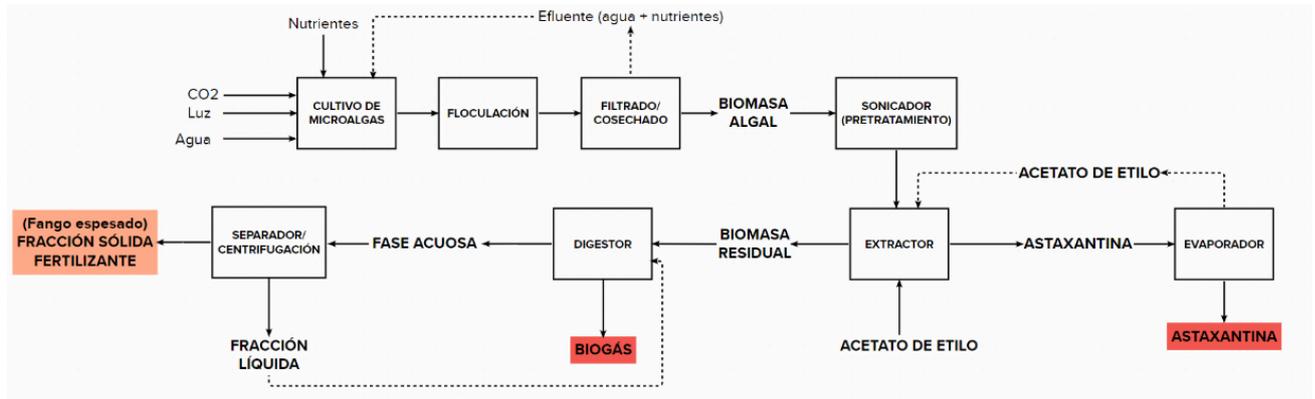


Figura 9: Diagrama de bloques completo del proceso de extracción de astaxantina y generación de biogás.

4. Capacidad de producción

Antes de realizar la simulación del proceso descrito, primero es necesario establecer las capacidad de producción de la biorrefinería de estudio. Se utilizara una base de cálculo de 100 toneladas/año de biomasa algal y un factor de operación de 8000 h/año.

$$biomasa \left(\frac{Kg}{h} \right) = 100 \frac{tn}{año} \cdot \frac{1000 kg}{1 tn} \cdot \frac{1 año}{365 día} \cdot \frac{1 día}{24 hora} = 11,415 \frac{kg}{h} \text{ de biomasa [Ec.1]}$$

Teniendo en cuenta los datos de producción escogidos, la corriente de alimentación de biomasa es de 11,415 kg/h.

Los valores seleccionados se han determinado tomando como referencia la biorrefinería real, que actualmente está operativa, propiedad de Alga Energy en Arcos de la Frontera, Cádiz.

5. Simulación y discusión de resultados

Esta sección describe el proceso con más detalle y se analizan las diferentes fases o etapas que lo componen. Es decir, se estudiará el proceso y los diferentes flujos de las corrientes involucradas. Para realizar la simulación se ha empleado el programa SuperPro Designer.

Cabe señalar que, en esta simulación, los resultados discutidos han tenido en cuenta la utilización de bombas de impulsión, válvulas o cambiadores de calor. Variables como la concentración no se ven afectadas por la adicción de cambiadores de calor o bombas. Estos equipos modifican el estado físico de las corrientes, en el caso de los cambiadores de calor, como, por ejemplo, para la condensación de corrientes de vapor resultantes tras una evaporación parcial de una mezcla para la recuperación de un disolvente (puede verse en el apartado 5.3); o añaden presión a una corriente (provocando un aumento simultaneo de la temperatura de dicha corriente en muchas ocasiones), en el caso de la bomba.

5.1 Etapa de cultivo

La primera etapa del proceso global es el cultivo de las microalgas. Como se mencionó anteriormente, la microalga cultivada es *H. pluvialis*. En primer lugar, es necesario escoger el sistema de cultivo que se va a utilizar. Para ello, se deben tener en cuenta criterios biológicos, como la biomasa utilizada, económicos, operativos y ambientales. En la simulación realizada en el presente Trabajo Fin de Grado, se seleccionó un sistema de cultivo de tipo laguna aireada, más conocido como “raceway”. Son sistemas abiertos de bajo coste y fácil diseño, que operan de forma continua. Su construcción también es sencilla y suelen tener alta durabilidad. Además, al estar abierto “al aire libre” no es necesaria una fuente de radiación externa, la energía solar será la fuente de energía utilizada por las células. Como inconvenientes, tienen el riesgo de contaminarse al estar expuestos, o pueden verse afectados por periodos de lluvias. Por ello, debe estudiarse meditamente su ubicación, ya que, dichos sistemas de cultivo operan con un nivel de cultivo bajo; de lo contrario, la radiación solar no llegaría a todas las células de forma homogénea, afectando a la productividad final [24].

Otros parámetros a tener en cuenta son los nutrientes que necesita el microalga para su crecimiento. Uno de los nutrientes más importante para las algas es el nitrógeno, ya que afecta directamente en el porcentaje de lípidos de la biomasa producida. También son necesarios nutrientes como fosfatos y sulfatos para el correcto funcionamiento celular, y, en consecuencia, el crecimiento algal. La fuente de carbono se proporciona a través de una corriente de CO₂ que se inyecta al sistema de cultivo. Por otro lado, factores como el pH y la temperatura también son importantes, ya que influyen en la productividad, por lo que se deberán controlar de forma eficiente.

En esta simulación en concreto, se emplearon como nutrientes, DAP (siglas de fosfato diamónico, en inglés), nitrato de sodio y sulfato de magnesio. El agua utilizada puede ser dulce o salada, ya que *H. pluvialis* es capaz de desarrollarse en ambas condiciones, pero en este caso, solo se empleó agua dulce.

Para llevar a cabo la simulación, se utilizó el programa SuperPro Designer V9.5.

Los equipos que participan en esta primera etapa del proceso son:

- Tres tolvas: HP-101, HP-102, HP-103. Estos equipos se utilizan para almacenar los diferentes nutrientes que se suministran al cultivo en el raceway.
- Tres mezcladores: MX-101, MX-102, MX-103. Combinan diferentes corrientes.
- Una bomba centrífuga: PM-101. Son utilizadas para la impulsión del agua suministrada.
- Un raceway: RP-101. Su función es favorecer el crecimiento de la biomasa algal.

La Figura 10, muestra el esquema de simulación de la etapa descrita:

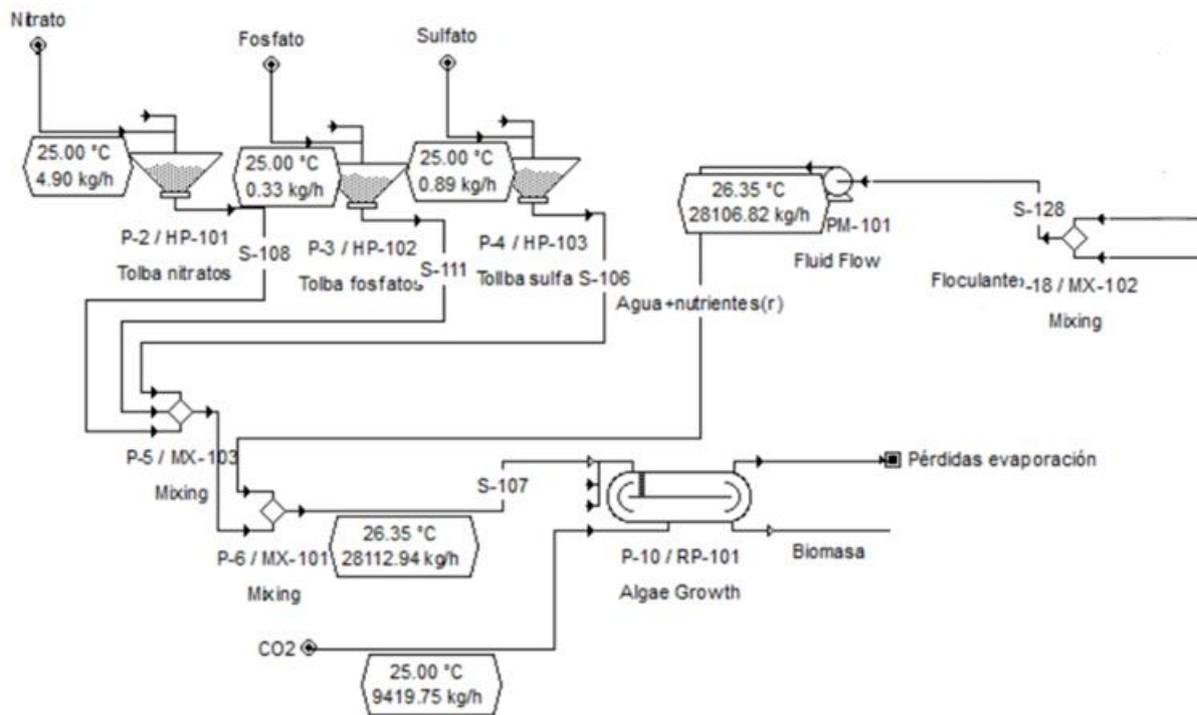
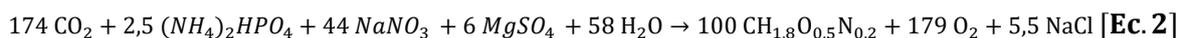


Figura 10: Esquema de la simulación de la etapa de cultivo de microalga.

Como se puede apreciar en la Figura 10, las corrientes de nutrientes, con un caudal de 4,9 kg/h de nitrato, 0,33 kg/h de DAP y 0,89 kg/h de sulfato, se mezclan en MX-103. Por otro lado, la corriente fresca de agua se combina con el agua que es recirculada en MX-102, tras la separación en el clarificador y en el centrifugador (equipos que serán explicados posteriormente). Cabe destacar que, esta última corriente también contiene algún resto de biomasa, nutrientes y floculante, como consecuencia de la corriente de reciclo. El caudal resultante de la corriente “agua+nutrientes(r)” es 28106,82 kg/h . A su vez la corriente de nutrientes se mezcla en MX-101 con la corriente “agua+nutrientes(r)”. El efluente resultante entra al raceway, dónde, simultáneamente una corriente de CO₂, con un caudal de 9419,75 kg/h, proporciona una concentración de dióxido óptima para la proliferación de la biomasa algal. El tiempo de residencia establecido es de 4 días y la reacción biológica que se lleva a cabo en el biorreactor es la siguiente:



CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2} : Fórmula química utilizada para la biomasa. Se utiliza un valor de composición media de las microalgas.

Por otro lado, cabe indicar que se producen pérdidas a la atmósfera de gases como dióxido de carbono y oxígeno. Una fracción del agua también abandona el medio en forma de vapor, debido a la evaporación provocada por la radiación solar. Los caudales y concentraciones se detallan en la tabla 2:

Tabla 2: Resultados de la corriente de pérdidas por evaporación a la salida del estanque de cultivo.

Componente	Caudal (kg/h)	Composición másica (%)	Concentración (g/L)
Dióxido de Carbono	9401,035	96,923	1,665
Oxígeno	19,934	0,206	0,004
Agua	278,498	2,871	0,049

Una vez se ha ejecutado la simulación, los resultados obtenidos para la corriente rica en biomasa tras el cultivo en el raceway se detallan en la Tabla 3:

Tabla 3: Resultados de la corriente rica en biomasa a la salida del estanque de cultivo.

Componente	Caudal (kg/h)	Composición másica (%)	Concentración (g/L)
Biomasa	11,363	0,041	0,408
DAP	14,819	0,053	0,532
Floculante	0,006	0	0,0002
Cloruro de sodio	175,934	0,632	6,316
Sulfato de magnesio	62,566	0,225	2,246
Agua	27571,340	99,049	989,852

Los datos de diseño obtenidos en el raceway son:

Tabla 4: resultados de datos de diseño del estanque de cultivo.

Tiempo de residencia (días)	Volumen de trabajo efectivo (%)	Volumen de trabajo (m ³)
4	90	2700,71

A partir de estos datos, se calcula el dimensionamiento de los equipos. En este caso, se determina el número de raceways necesarios y sus respectivas áreas, teniendo en cuenta que el Caudal total involucrado en el proceso es de: 27,854 m³/h

$$V_{total} = 27,854 \frac{m^3}{h} \cdot \frac{24 h}{1 día} \cdot 4 días \cdot \frac{1 \text{ rendimiento max}}{0,9 \text{ rendimiento real}} = 2971,1 m^3 \quad [\text{Ec. 3}]$$

$$A_{necesaria} = \frac{2971,1 m^3}{0,5 m} = 5942,2 m^2 = 0,5942 ha \quad [\text{Ec. 4}]$$

Siendo:

- V total : Volumen total del cultivo.
- A necesaria : Área necesaria para que los sistemas de cultivo trabajen con el caudal calculado y con una profundidad de 0,5 m. Cabe destacar, que se ha tomado dicho valor por ser habitualmente utilizado en procesos similares.

5.1.1 Discusión de resultados

Analizando los resultados obtenidos, se puede comprobar que la producción de biomasa ha sido efectiva, habiendo obtenido una concentración de 0,41 g/L aproximadamente, siendo un valor aceptable y semejante a los consultados en bibliografía en procesos de cultivo de microalgas con estanques abiertos. Por otro lado, es llamativa la ausencia de nitratos en la corriente que abandona el cultivo. Se debe a que este nutriente ha sido consumido por completo por las microalgas, siendo, por lo tanto, el nutriente limitante en el cultivo.

En cuanto al diseño del estanque de cultivo, el volumen total calculado (2971 m³), es ligeramente superior al volumen de trabajo necesario (2700 m³). Este último valor corresponde con el volumen que debería tener un raceway, según los cálculos realizados en la simulación por el programa SuperPro Designer. Al haber obtenido valores cercanos, lo más razonable sería la construcción y utilización de un único estanque de dicho tamaño, con un área total de aproximadamente 0,6 hectáreas (0,5942 ha). Otra alternativa, sería reducir el tiempo de residencia, de forma que el área del estanque construido se ajustara al volumen de trabajo necesario obtenido. De esta manera, se necesitaría un solo estanque, a pesar de que, probablemente, la concentración de biomasa sería algo menor. No obstante, también supondría un ahorro en los costes de construcción y el área destinada al cultivo, evidentemente, también sería menor. La última posibilidad sería la construcción de dos estanques, cada uno con la mitad de volumen y de área. Es decir, cada estanque tendría un volumen de aproximadamente 1500 m³ y un área aproximada de 0,3 ha.

Para una elección óptima habría que realizar un análisis económico y sería necesaria una comparación rigurosa, evaluando tanto la producción como los costes asociados al proceso y la construcción para determinar que opción es la más favorable.

5.2 Etapa de filtrado y cosechado

En la segunda etapa, se realiza la recolección de la microalga que se ha desarrollado en el medio de cultivo. La biomasa se concentra y se estabiliza eliminando el agua, de forma que los posteriores tratamientos de extracción de astaxantina permitan obtener una corriente lo más rica posible en dicha sustancia.

En esta sección de la simulación participan los siguientes equipos (Figura 11):

- Un mezclador: MX-106. Su función es añadir un floculante al proceso que facilite la aglomeración y la recolección de la microalga.
- Un clarificador: CL-101. Concentra la biomasa, separándola del agua por diferencia de densidad.
- Un centrifugador: DC-101. De nuevo, mediante centrifugación, se elimina el exceso de agua de la corriente concentrada obtenida en el clarificador.

- Un tanque: V-101. Almacena agua proveniente de la alimentación fresca.
- Un tanque: V-102. Almacena el agua de reciclaje extraída en el clarificador y en el centrifugador. Esta corriente contiene restos de nutrientes y floculante.

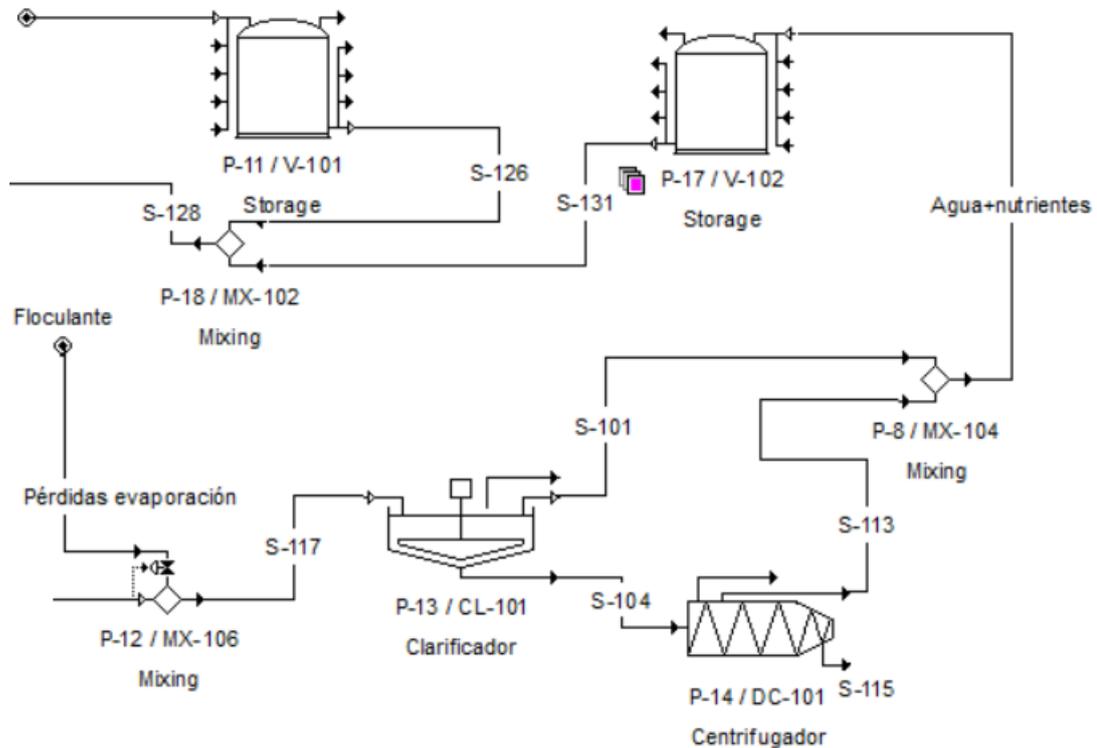


Figura 11: Esquema de la simulación de la etapa de filtrado y cosechado.

Tal y como se aprecia en la Figura 11, en primer lugar, interviene el mezclador MX-106. En este, se adiciona el floculante a la corriente rica en microalgas obtenida del estanque de cultivo. Al añadir este producto químico, se facilita la aglomeración de las microalgas que precipitan al fondo del clarificador por el aumento de su peso. De esta manera, permite una recolección de la biomasa mucho más sencilla. La corriente rica en biomasa, con mayor densidad, sale por la parte inferior del clarificador y, por la parte superior, la corriente de agua.

A continuación, para eliminar el exceso de agua de la corriente rica en biomasa, se introduce en un centrifugador. Mediante la aceleración centrífuga, las partículas, con una densidad superior, se desplazan hacia las paredes del centrifugador, permitiendo una mayor separación entre el agua y la biomasa.

Por último, el agua retirada tanto en el clarificador como en el centrifugador se recircula de nuevo al estanque de cultivo.

Los resultados de caudales y composiciones obtenidos en esta etapa se indican en las Tabla 5 y 6:

Tabla 5: Resultados de la corriente concentrada, a la salida del clarificador.

Componente	Caudal (kg/h)	Composición másica (%)	Concentración (g/L)
Biomasa	11,249	4,975	49,833
DAP	0,114	0,051	0,506
Floculante	0,037	0,017	0,167
Cloruro de sodio	1,357	0,600	6,011
Sulfato de magnesio	0,483	0,213	2,138
Agua	212,880	94,145	943,079

Tabla 6: Resultados de la corriente concentrada, a la salida del centrifugador.

Componente	Caudal (kg/h)	Composición másica (%)	Concentración (g/L)
Biomasa	0,557	14,855	149,360
DAP	0,034	0,045	0,455
Floculante	0,036	0,0476	0,479
Cloruro de sodio	0,403	0,538	5,404
Sulfato de magnesio	0,143	0,191	1,922
Agua	63,216	84,324	847,840

Los datos de diseño obtenidos para estos equipos se muestran en la Tabla 7 y Tabla 8:

Tabla 7: Velocidad de desbordamiento en el clarificador.

Clarificador	Velocidad de desbordamiento (L/m ² ·h)
	1333,33

Tabla 8: Tiempo de trabajo necesario en el centrifugador.

Centrifugador	Tiempo de trabajo necesario (min)
	1440

5.2.1 Discusión de resultados

En primer lugar, analizando los resultados tras el proceso de clarificación, se evidencia la eficacia de esta técnica para la reducción de agua en la corriente de entrada y, en consecuencia, para la purificación de corrientes poco concentradas. El caudal de agua de entrada era de 27571 kg/h y ha sido capaz de reducirse a un caudal de 212 kg/h, una relación de reducción mayor de 100 (1:130). Lo mismo ocurre en el centrifugador, dónde gracias a la fuerza centrífuga, se consigue una reducción de agua incluso mayor. El caudal de agua resultante a la salida del centrifugador es de 63,2 kg/h, tres veces menos que a su entrada.

En el sonicador, las ondas sónicas permiten la rotura celular y, por consiguiente, la liberación del contenido celular (explicado anteriormente). Los resultados obtenidos, están determinados directamente

por la composición de la microalga empleada (Tabla 1). Aquellos componentes que han participado en el proceso se detallan en la tabla siguiente (Tabla 9):

Tabla 9: Porcentaje en masa de cada componente que forma la biomasa utilizada como materia prima.

Componente	Composición másica (%)
Almidón	38,2
Ácido Oleico	6
PL	4
Proteínas	21
Trioleína	26
Astaxantina	4
NHP	0,8

Respecto a los resultados de diseños obtenidos para el clarificador, la velocidad de desbordamiento, es decir, la velocidad con la que el agua clarificada abandona el equipo es de 1333,33 (L/m²·h). Con este valor se podría determinar el caudal de agua que abandona el clarificador cada hora (L/h) o al día (L/día), pero es necesario conocer el área de trabajo del clarificador (este dato no lo proporciona el programa SuperPro Designer). Por otro lado, el centrifugador necesita un tiempo de trabajo de 1440 min (24 horas, es decir un día) para lograr eliminar los sólidos.

5.3 Etapa de extracción de astaxantina

Durante la tercera etapa del proceso se realiza el pretratamiento de la biomasa algal y la extracción de astaxantina mediante la utilización de un disolvente. El esquema de la simulación se representa en la Figura 13.

Los equipos involucrados en esta etapa son los siguientes:

- **Sonicador:** HG-102. Mediante ultrasonidos produce la lisis celular, que permite la liberación de las sustancias de interés al medio.
- **Extractor/decantador:** MSX-101. Con la ayuda de un agitador se homogeniza la mezcla con el disolvente. En el sedimentador la fase ligera (la fase que contiene el disolvente) arrastra consigo a las biosustancias de interés.
- **Evaporador:** EV-101. Se recupera el disolvente mediante evaporación selectiva para que pueda volver a ser utilizado.
- **Cambiador de calor:** HX-102. Su función es reducir o elevar la temperatura. En este caso, su función es condensar el acetato de etilo que abandona el evaporador como vapor.
- **Un tanque:** V-105. Almacena acetato de etilo proveniente de la alimentación fresca.
- **Un tanque:** V-103. Almacena acetato de etilo proveniente de la corriente de recicló.

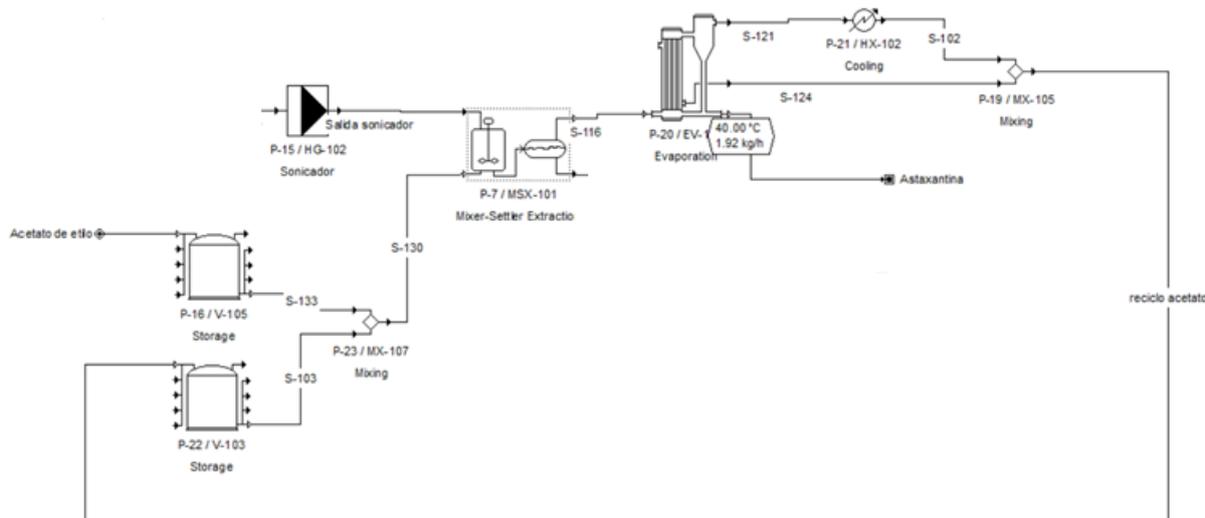


Figura 12: Esquema de la simulación de extracción de astaxantina.

Para la obtención de la astaxantina, primeramente, se realiza la rotura celular de la microalga *H. pluvialis*. Para ello, como se puede apreciar en la Figura 12, se emplea un sonificador, que, mediante ultrasonidos, rompe las paredes, liberando el contenido celular. Los resultados de la corriente a la salida del sonificador se detallan en la Tabla 10:

Tabla 10: Resultados de la corriente de salida del sonificador .

Componente	Caudal (kg/h)	Composición másica (%)	Concentración (g/L)
Biomasa	0,557	14,855	149,360
DAP	0,034	0,045	0,455
Floculante	0,036	0,0476	0,479
Cloruro de sodio	0,403	0,538	5,404
Sulfato de magnesio	0,143	0,191	1,922
Agua	63,216	84,324	847,840
Almidón	4,041	5,391	53,776
Astaxantina	0,423	0,565	5,631
NHP	0,085	0,113	1,126
Ácido Oleico	0,635	0,847	8,446
PL	0,423	0,565	5,631
Proteínas	2,222	2,964	29,563
Trioleína	2,751	3,669	36,601

Siendo:

- Astaxantina: Biosustancia de interés. El diseño de la biorrefinería está planteado para su extracción.
- NHP: Fosfolípidos no hidratables.
- PL: Fosfolípidos hidratables
- Trioleína: Triglicérido tipo.

La corriente con el contenido intracelular liberado se introduce a un extractor. Simultáneamente, otra corriente añade un disolvente al medio. En esta simulación, se utilizó acetato de etilo. Una vez la mezcla se ha homogeneizado pasa a un decantador donde se separan las diferentes fases por diferencia de densidad. La fase ligera está compuesta por el acetato y las sustancias de interés extraídas, como la astaxantina; mientras que la fase más densa, está compuesta principalmente por agua. Se ha escogido un disolvente poco polar para evitar el arrastre de agua, de forma que la fase ligera tuviera la mayor pureza posible en astaxantina. La biomasa residual, presente en la corriente pesada que abandona el decantador tras la extracción, será la materia prima para la generación de biogás. Dicha transformación se abordará en la siguiente etapa.

Por último, la corriente que contiene el disolvente, la astaxantina y otros componentes intracelulares, se introduce en un evaporador. Mediante la evaporación parcial de la mezcla alimento, se consigue la separación del acetato de etilo del resto de sustancias, permitiendo la recuperación del disolvente utilizado, para su recirculación y reutilización y, además, se incrementa la pureza de la corriente rica en astaxantina. Los resultados de composición de la corriente descrita se muestran en la tabla 11:

Tabla 11: Resultados de la corriente de salida del evaporador.

Componente	Caudal (kg/h)	Composición másica (%)	Concentración (g/L)
Almidón	0,002	0,088	0,811
Astaxantina	0,135	7,044	64,907
Acetato de etilo	0,027	1,420	13,089
Ácido Oleico	0,171	8,885	81,964
Proteínas	0,588	30,611	282,079
Trioleína	0,998	51,942	478,639

Los resultados de diseño obtenidos para el sonicador se detallan en la Tabla 12:

Tabla 12: Resultados de los datos de diseño obtenidos para el sonicador.

Sonicador	Homogeneización (min)	Número de pasos	Presión de operación (bar)	Temperatura de salida (°C)
	1440	1	500	35

Los resultados de diseño obtenidos para el extractor se detallan en la Tabla 13:

Tabla 13: Rendimiento de recuperación de astaxantina en el extractor/sedimentador:

Extractor/sedimentador	Rendimiento de recuperación (%)
	31,97

Los resultados de diseño obtenidos para el evaporador se detallan en la Tabla 14:

Tabla 14: Resultados de los datos de diseño obtenidos para el evaporador.

Evaporador	Calor específico necesario (kcal/kg)	Coefficiente de transferencia de calor (Watt/m ² ·K)	Área de transmisión de calor (m ²)	Entalpia del líquido (kcal/kg)	Entalpia del vapor (kcal/kg)	Caudal de líquido (kg/h)	Caudal de vapor (kg/h)
	273,38	2800	0,1	15,483	112,101	1,92	22,5

Los resultados de diseño obtenidos para el cambiador de calor se muestran en la Tabla 15:

Tabla 15: Resultados de los datos de diseño obtenidos para el cambiador de calor.

Cambiador de calor	Agua fría		Acetato de etilo	
	Temperatura de entrada (°C)	Temperatura de salida (°C)	Temperatura de entrada (°C)	Temperatura de salida (°C)
	5	10	40	25

5.3.1 Discusión de resultados

El diseño del proceso general y de la simulación, se ha basado en la obtención de la corriente detallada en la Tabla 11. El objetivo era conseguir extraer la mayor cantidad posible de astaxantina y, que la pureza en la corriente final fuera la máxima para este componente. Se obtuvo un caudal de 0,135 kg/h y una concentración de 64,907 g/L en la corriente final.

En general, los resultados obtenidos son aceptables, a pesar de, que este componente forma parte de una corriente mayoritariamente lipídica. No obstante, podría ser comercializada como mezcla, teniendo un alto contenido en sustancias nutritivas y beneficiosas para diversas aplicaciones como las descritas en apartados anteriores. Existe la posibilidad de diseñar un proceso que permitiera el tratamiento de esta mezcla para lograr extraer la astaxantina como sustancia pura, pero muy probablemente aún no se hayan implementados los equipos o técnicas necesarias para que fuera viable económicamente.

Por lo tanto, se concluye que la mezcla es lo suficiente rica en astaxantina como en otros componentes beneficiosos, como para poder ser comercializada y tener un beneficio económico (queda pendiente una evaluación económica para el caso planteado. Por motivos de espacio, en el presente Trabajo Fin de grado, no ha podido ser añadido dicho apartado).

Analizando los datos de diseño obtenidos en la simulación, el sonicador necesita operar durante un día (1440 min), con una presión de 500 bar. Es necesario un único paso por el equipo y la temperatura de salida de la corriente es de 35 °C (se ve incrementada en 5 °C tras el proceso). El rendimiento obtenido en el extractor es del 31,97 %. No es un valor elevado. Por ello, podría estudiarse la utilización de otros disolventes y evaluar su eficacia para seleccionar el óptimo y, mejorar así, el proceso de extracción. No obstante, dichos resultados son aproximados. La mezcla utilizada en el proceso que se detalla en el

presente Trabajo de Fin de Grado, acetato de etilo – agua, carece de información bibliográfica referente a coeficientes de repartos con las sustancias involucradas. Por ello, se tomaron datos bibliográficos de coeficientes de reparto de la mezcla octanol-agua como referencia, asumiendo una aproximación y empleando los valores de dicha mezcla, que ha sido ampliamente estudiada anteriormente y cuenta con una gran variedad de valores tabulados. Por último, en el evaporador se realiza la separación del acetato de etilo del resto de componentes de la mezcla. Se trata de un evaporador multiefectos que opera en continuo y que utiliza 1 efecto, la compresión térmica de vapor. Se obtiene un caudal de vapor de 22,5 kg/h, el cual atraviesa un cambiador de calor para obtener el acetato de etilo como corriente líquida. En el cambiador se enfría de los 40 °C hasta los 25 °C, utilizando un caudal de agua fría de 451,36 kg/h, que modifica su temperatura de los 5 °C hasta los 10 °C. La corriente de acetato condensada se combina con la corriente lateral de acetato, que fue condensada previamente por el evaporador, resultando un caudal total de 27,26 kg/h. La corriente rica en astaxantina que abandona el evaporador por la parte inferior como líquido, es de 1,92 kg/h.

5.4 Etapa de digestión anaerobia. Síntesis de biogás

En la etapa de digestión anaerobia, la biomasa residual sufre una serie de cambios que permiten valorizarla. Mediante la acción de microorganismos, en ausencia de oxígeno, la materia prima es degradada y transformada en metano y dióxido de carbono. En la Figura 13, se observa el digester anaerobio en la simulación.

El equipo utilizado en esta simulación es:

- Digester: AD-101. En su interior, la biomasa utilizada como materia prima experimenta una digestión anaerobia. En consecuencia, surge una corriente gaseosa y otra comúnmente denominada “de lodos”.



Figura 13: Esquema de la simulación de la etapa de digestión anaerobia.

Las biorrefinerías que operan de forma continua generan una gran cantidad de materia orgánica. Una parte es utilizada para obtener biosustancias de interés y, al resto, se la denomina biomasa residual. Para valorizar dichos residuos, normalmente se realizan tratamientos que transforman la materia orgánica residual en compuestos de alto valor añadido. La digestión anaerobia es una buena opción. Como

resultado de este proceso, se obtiene una corriente de biogás y, por otro lado, una corriente de lodo estabilizado, con una concentración reducida de materia orgánica. Es una forma de reducir el volumen de los residuos, permitiendo, además, la reutilización de los nutrientes presentes en esta corriente, por ejemplo, como fertilizante. A su vez, el biogás obtenido, compuesto principalmente por metano (50-70%), puede ser utilizado para generar energía, entre muchos otros fines.

El digestor (AD-101) que se muestra en la Figura 13, opera a una temperatura de 30 °C, en ausencia de oxígeno y durante un tiempo de residencia de 30 horas. La corriente alimento “biomasa residual”, con un caudal de 73,07 kg/h, es la que abandona el extractor (MSX-101) del proceso anterior. La corriente de “biogás” tiene un caudal masico de 4,91 kg/h y la corriente de “lodos” 68,16 kg/h, compuesta principalmente por agua y nutrientes.

Los compuestos orgánicos transformados mediante las reacciones biológicas que se desarrollan en digestor anaerobio son: la trioleína, proteínas, el ácido oleico, los fosfolípidos y el almidón.

La composición exacta y sus respectivos caudales de las corrientes obtenidas se muestran en la Tabla 15 y Tabla 16:

Tabla 16: Resultados de la corriente de biogás a la salida del digestor.

Componente	Caudal (kg/h)	Composición másica (%)	Concentración (g/L)
Dióxido de carbono	1,474	30	0,239
Metano	3,439	70	0,558

Tabla 17: Resultados de la corriente de fangos a la salida del digestor.

Componente	Caudal (kg/h)	Composición másica (%)	Concentración (g/L)
Almidón	1,616	2,371	23,691
Astaxantina	0,288	0,422	4,221
Biomasa	0,557	0,817	8,164
Ácido Oleico	0,186	0,272	2,721
Proteínas	0,327	0,479	4,791
Trioleína	1,052	1,543	15,421
DAP	0,034	0,050	0,498
Floculante	0,036	0,052	0,523
NHP	0,051	0,075	0,744
PL	0,254	0,373	3,723
Cloruro de sodio	0,403	0,591	5,908
Sulfato de magnesio	0,143	0,210	2,101
Agua	63,216	92,745	926,838

Los datos de diseño obtenidos en el raceway son:

Tabla 18: resultados de datos de diseño del digestor.

Tiempo de residencia (h)	Volumen de trabajo efectivo (%)	Volumen de trabajo (m ³)
30	90	2,19

5.4.1 Discusión de resultados

Para el análisis de los resultados obtenidos y de la valoración de la eficacia del digestor, en la Tabla 19, se presenta una comparativa de la composición de la corriente alimento a la entrada y a la salida del digestor:

Tabla 19: Comparativa de valores de composición a la entrada y a la salida del digestor.

Componente	ENTRADA		SALIDA	
	Caudal (kg/h)	Composición másica (%)	Caudal (kg/h)	Composición másica (%)
Almidón	4,040	5,528	1,616	2,371
Astaxantina	0,288	0,394	0,288	0,422
Biomasa	0,557	0,762	0,557	0,817
Ácido Oleico	0,464	0,635	0,186	0,272
Proteínas	1,634	2,236	0,327	0,479
Trioleína	1,753	2,399	1,052	1,543
DAP	0,034	0,046	0,034	0,050
Floculante	0,036	0,050	0,036	0,052
NHP	0,085	0,116	0,051	0,075
PL	0,423	0,579	0,254	0,373
Cloruro de sodio	0,403	0,551	0,403	0,591
Sulfato de magnesio	0,143	0,196	0,143	0,210
Agua	63,216	86,509	63,216	92,745

Tras el estudio de la tabla 19, los valores resaltados en negrita corresponden con los componentes que han sido digeridos por los microorganismos, como se indicó comienzo de este apartado. Se puede apreciar una notable reducción en la materia orgánica con valores de concentración, que, en algunos casos, han sido reducidos hasta valores tres veces menor, como en el caso del almidón. Esto, permite una estabilización del fango, reduciendo el volumen de esta corriente, además de la eliminación de los malos olores asociados a la descomposición de la materia orgánica.

En cuanto al dimensionamiento, el volumen necesario del digestor se calcula:

$$V_{total} = 2,19 \text{ m}^3 \cdot \frac{1 \text{ rendimiento max}}{0,9 \text{ rendimiento real}} = 2,43 \text{ m}^3 \text{ [Ec. 5]}$$

Siendo:

- V total : Volumen total necesario para el digestor.

5.5 Tratamiento de fangos

Como se puede apreciar en la Tabla 19, el contenido de agua en el fango resultante del tratamiento de digestión anaerobia sigue siendo elevado. Por ello, es interesante plantear un proceso de tratamiento de fangos. Durante este proceso, principalmente se pretende reducir el contenido de agua.

Para esta simulación se emplearon los siguientes equipos:

- Bomba: PM-102. Su función es la impulsión del fango al espesador.
- Espesador: TH-101. Su función es reducir el contenido de agua, resultando un fango más concentrado.

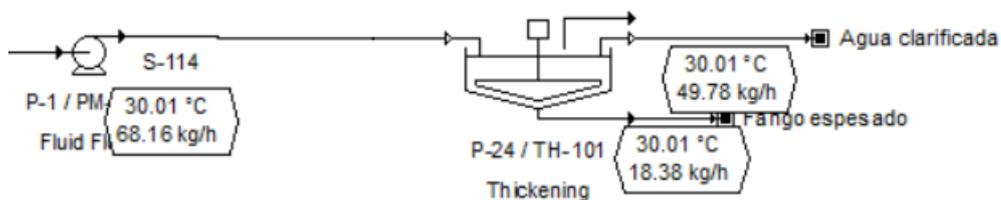


Figura 14: Esquema de la simulación de la etapa de tratamiento de fangos.

Durante el tratamiento de fangos, la corriente alimento, sufre una serie de transformaciones, como son el espesamiento o la deshidratación. Durante estos procesos, aumenta el contenido de materia seca, se reduce el volumen final de “residuos”, reduciendo el gasto por transporte al tener menor peso y se evitan los malos olores (aunque esta ventaja se ha llevado a cabo fundamentalmente en la etapa anterior, donde se somete a una digestión biológica).

Por otro lado, el sustrato final obtenido, denominado “fangos espesados”, posee unas características que son favorables para su utilización como fertilizantes. Los procesos de reducción de agua y materia orgánica provocan que la composición final sea mayor en nutrientes, que, además, se encuentran más mineralizados, es decir, pueden ser más fácilmente metabolizados por las plantas y la absorción por los cultivos es mejor. De esta manera, se disminuye el uso de fertilizantes químicos, contaminando menos tanto los suelos como el agua [30].

Los datos de diseño obtenidos para estos equipos se muestran en la Tabla 20:

Tabla 20: Velocidad de desbordamiento en el espesador.

Espesador	Velocidad de desbordamiento (L/m ² ·h)
	300

5.5.1 Discusión de resultados

Para analizar los resultados obtenidos a la salida del espesador, repitiendo el procedimiento del apartado anterior, se ha realizado una comparativa de los caudales y sus respectivas composiciones de entrada y salida:

Tabla 21: Comparativa de valores de composición a la entrada y a la salida del espesador.

Componente	ENTRADA		SALIDA	
	Caudal (kg/h)	Composición másica (%)	Caudal (kg/h)	Composición másica (%)
Almidón	1,616	2,371	0,426	2,319
Astaxantina	0,288	0,422	0,076	0,413
Biomasa	0,557	0,817	0,551	2,999
Ácido Oleico	0,186	0,272	0,049	0,266
Proteínas	0,327	0,479	0,086	0,469
Trioleína	1,052	1,543	0,277	1,509
DAP	0,034	0,050	0,009	0,049
Floculante	0,036	0,052	0,009	0,049
NHP	0,051	0,075	0,013	0,073
PL	0,254	0,373	0,067	0,364
Cloruro de sodio	0,403	0,591	0,107	0,581
Sulfato de magnesio	0,143	0,210	0,038	0,207
Agua	63,216	92,745	16,673	90,701

Los resultados mostrados en la Tabla 21, no son del todo concluyentes. En general la composición de la mayoría de los componentes se mantiene. No obstante, se produce una reducción significativa en el contenido en agua, el cual era el principal objetivo de dicho tratamiento.

Por otro lado, si se observa la velocidad de desbordamiento del espesador (Tabla 20), se puede comprobar como dicha velocidad es considerablemente mas baja que la del clarificador (Tabla 7). Esto, es consecuencia de, que la densidad de los lodos que entran al espesador es muy superior a la corriente de entrada al clarificar, siendo mayor la dificultad para eliminar el agua en la corriente de fangos.

Conclusiones

Las principales conclusiones extraídas tras la elaboración del presente Trabajo Fin de Grado son:

- Tras la búsqueda, análisis y la comparación de información bibliográfica, ha sido posible el planteamiento de un esquema de biorrefinería que permite la obtención de astaxantina, utilizando como materia prima un tipo concreto de microalga y, que, a su vez, utiliza la biomasa residual para la generación de biogás y la valorización de los fangos como fertilizante.
- Se seleccionó *H. pluvialis* como materia prima utilizada tras un estudio comparativo de tres tipos diferentes de microalga. Fue escogida por su alto contenido en astaxantina (de hasta el 5%) y su buena relación C : N, que favorece el contenido de metano en el biogás.
- Se determinó la utilización de estanques abiertos (raceways) como el diseño óptimo de cultivo para *H. pluvialis*. Al final de esta primera etapa (cultivo y cosechado) se aumentó la concentración de biomasa en la corriente hasta un 14% (porcentaje másico).
- En la segunda parte de la simulación, denominada fase de extracción de astaxantina, se logró un rendimiento de recuperación del 31,97 %. A la salida del evaporador, tras la separación del disolvente de la mezcla de interés, se obtuvo un caudal de 1,92 kg/h, con un porcentaje másico del 7% de astaxantina.
- En la etapa de digestión anaerobia, se logró generar un caudal de 4,91 kg/h de biogás con una composición másica del 70% en metano.
- En la última etapa, tras el espesamiento del fango, se obtiene una corriente de lodo espesado de 18,38 kg/h con un contenido en agua algo menor que la corriente mas ligera que abandona dicho equipo. La corriente más ligera, con un caudal de 49,78 kg/h, tiene un porcentaje másico del 97 % de agua, mientras que la corriente pesada del 92%.

Anexo

Glosario de términos

1. Biocombustible: Combustible obtenido mediante el tratamiento físico o químico de materia vegetal o de residuos orgánicos [25].
2. Algina: Sustancia viscosa extraída de las algas, cuyas soluciones se emplean en la industria como apresto de los tejidos [26].
3. Carragenina: es un polisacárido que se extrae de algas rojas, este aditivo alimentario se utiliza para espesar y estabilizar una gran variedad de alimentos [27].
4. Biomasa: Materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía [25].
5. Bioproductos: son el resultado de la aplicación de la biotecnología dentro del ámbito industrial (biotecnología blanca o industrial), dónde, mediante procesos Biológicos, Bioquímicos, Físicos, Térmicos de: Fermentación, Esterificación, Transesterificación, Digestión, Hidrólisis; con la incorporación de enzimas, microorganismos, bacterias, etc., se transforma la biomasa (cultivos de no alimentación, masa forestal, residuos vegetales, etc.) en bioproductos como: los bioplásticos, las biopinturas, los biolubricantes, los biomateriales de la construcción, la bioenergía, los biocombustibles, etc. [28].
6. Carotenoide: Pigmento de origen vegetal o animal, de color rojo, anaranjado o amarillo, que se encuentra en el tomate, la zanahoria, la yema de huevo, etc., y que, en los animales, se transforma en vitamina A
7. Acuicultura: Conjunto de técnicas y conocimientos relativos al cultivo de especies acuáticas [25].
8. Nutracéutica: Dicho de un producto alimenticio: Que combina propiedades nutritivas y otras beneficiosas para la salud [25].
9. Insulina: Hormona segregada por los islotes de Langerhans en el páncreas, que regula la cantidad de glucosa existente en la sangre [25]
10. Esteatosis: Acumulación patológica de grasa intracelular en un órgano [25].
11. Retinopatía: Enfermedad en la retina [25].
12. Nefropatía: Enfermedad en los riñones [25].
13. Neuropatía: Enfermedad en el sistema nervioso [25].
14. Apoptosis: Modalidad específica de muerte celular programada, que participa en el control del desarrollo y del crecimiento celulares [25].
15. Aterosclerosis: Endurecimiento de los vasos sanguíneos, en especial de ciertas arterias, por la formación de ateromas [25].
16. Dislipidemia: Alteración en los niveles normales de lípidos en la sangre [25]2.
17. Carcinógenos: dicho de una sustancia o de un agente que produce cáncer [25].

18. Líquido iónico: Un líquido iónico (LI) es un fluido constituido exclusivamente por iones, considerándose como tales a las sales con una temperatura de fusión por debajo del punto de ebullición del agua (100 °C al nivel del mar, ya que varía de acuerdo con la presión atmosférica) y que a menudo son hidrolíticamente estables, es decir, que son capaces de resistir la descomposición química en presencia del agua [29].
19. Tampón de ruptura: también conocido como electroforesis de proteínas, ya que provoca la desnaturalización de estas. La desnaturalización de las proteínas es la pérdida de la forma nativa de una proteína. La desnaturalización implica la ruptura de los enlaces no covalentes en la estructura de la proteína, lo que suele provocar la pérdida de la forma, la estructura y la función de la proteína; como consecuencia se llega a una degradación [30].
20. Zirconia: La zirconia cúbica, también llamada circonita o zirconita, es la forma cristalina cúbica del óxido de zirconio ZrO_2 . Es un mineral artificial utilizada como imitación del diamante [31].

Bibliografía

- [1] REN, Y., et al. Using Green Alga *Haematococcus Pluvialis* for Astaxanthin and Lipid Co-Production: Advances and Outlook. *Bioresource Technology*, 2021, vol. 340. pp. 125736. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852421010774> ISSN 0960-8524. DOI 10.1016/j.biortech.2021.125736.
- [2] MARÍA, del Valle Macía Mateos. *Biorrefinería con algas* [online]. 2019 [vid. 2023-06-04]. Trabajo de Fin de Grado. Universidad de Sevilla.
Dostupnéz: <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/101417/TFG2606%20MAC%c3%8dA%20MAT%20EOS%20.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- [3] Sentfés, A., & Dreckmann, K. M. (2014). Biodiversity of marine macroalgae of the family Rhodomelaceae (Rhodophyta) in México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 62-68. doi:10.7550/rmb.40713.
- [4] LÓPEZ, Catalina Bernal, Jorge Enrique LÓPEZ, Galán DR a SCI. *EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE Chlorella vulgaris y Nannochloropsis gaditana ASISTIDO POR ULTRASONIDO*
- [5] FERNÁNDEZ SEVILLA, J. M. (2014) “Microalgas. Definición y características” en Fernández Sevilla J.M. *Ingeniería de Procesos aplicada a la biotecnología de Microalgas*.
- [6] GONZÁLEZ-DELGADO, Ángel-Darío, Viatcheslav KAFAROV a Mahmoud EL-HALWAGI. Development of a topology of microalgae-based biorefinery: process synthesis and optimization using a combined forward–backward screening and superstructure approach [online]. 2015, **17**(8), *Clean technologies and environmental policy*, 17, 2213–2228. ISSN 1618-954X. Dostupnéz: doi:10.1007/s10098-015-0946-5
- [7] SANDOVAL, C. (2014). “Microalgas, la materia prima del futuro que se 'cultiva' en Cádiz” en “Andalucía información.” Available from: <https://andaluciainformacion.es/cadiz/925502/microalgas-la-materia-prima-del-futuro-que-se-cultiva-en-cadiz/>
- [8] KHOO, K.S., et al. Recent Advances in Biorefinery of Astaxanthin from *Haematococcus Pluvialis*. *Bioresource Technology*, 2019, vol. 288. pp. 121606. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852419308363> ISSN 0960-8524. DOI 10.1016/j.biortech.2019.121606.
- [9] TORRES-HARO, A., VERDÍN, J., KIRCHMAYR, M.R. and ARELLANO-PLAZA, M. Metabolic Engineering for High Yield Synthesis of Astaxanthin in *Xanthophyllomyces Dendrorhous*. *Microbial Cell Factories*, Sep 06, 2021, vol. 20, no. 1. pp. 175. Available

- from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34488760> MEDLINE. ISSN 1475-2859. DOI 10.1186/s12934-021-01664-6.
- [10] OSLAN, S.N.H., et al. *A Review on Haematococcus Pluvialis Bioprocess Optimization of Green and Red Stage Culture Conditions for the Production of Natural Astaxanthin*. MDPI AG, -02-10, 2021 DOI 10.3390/biom11020256.
- [11] OSLAN, S.N.H., et al. *Haematococcus Pluvialis as a Potential Source of Astaxanthin with Diverse Applications in Industrial Sectors: Current Research and Future Directions*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, Oct 27, 2021, vol. 26, no. 21. pp. 6470. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34770879> MEDLINE. ISSN 1420-3049. DOI 10.3390/molecules26216470.
- [12] RITU, J.R., et al. *Utilization of Astaxanthin from Microalgae and Carotenoid Rich Algal Biomass as a Feed Supplement in Aquaculture and Poultry Industry: An Overview*. *Journal of Applied Phycology*, Feb 01, 2023, vol. 35, no. 1. pp. 145-171. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10811-022-02817-9> CrossRef. ISSN 0921-8971. DOI 10.1007/s10811-022-02817-9.
- [13] LI, X., et al. *Biotechnological Production of Astaxanthin from the Microalga Haematococcus Pluvialis*. *Biotechnology Advances*, 2020, vol. 43. pp. 107602. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073497502030104X> ISSN 0734-9750. DOI 10.1016/j.biotechadv.2020.107602.
- [14] AMBATI, R.R., PHANG, S.M., RAVI, S. and ASWATHANARAYANA, R.G. *Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and its Commercial Applications—A Review*. *Marine Drugs*, Jan 01, 2014, vol. 12, no. 1. pp. 128-152. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24402174> MEDLINE. ISSN 1660-3397. DOI 10.3390/md12010128.
- [15] KIM, B., et al. *Cell Disruption and Astaxanthin Extraction from Haematococcus Pluvialis: Recent Advances*. *Bioresource Technology*, 2022, vol. 343. pp. 126124. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852421014668> ISSN 0960-8524. DOI [10.1016/j.biortech.2021.126124](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126124).
- [16] KIM, D., et al. *Cell-Wall Disruption and Lipid/Astaxanthin Extraction from Microalgae: Chlorella and Haematococcus*. *Bioresource Technology*, 2016, vol. 199. pp. 300-310. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852415012134> ISSN 0960-8524. DOI 10.1016/j.biortech.2015.08.107.

- [17] PATEL, A.K., et al. Recent Advancements in Astaxanthin Production from Microalgae: A Review. *Bioresource Technology*, 2022, vol. 364. pp. 128030. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852422013633> ISSN 0960-8524. DOI 10.1016/j.biortech.2022.128030.
- [18] CUELLAR-BERMUDEZ, S.P., et al. Extraction and Purification of High-value Metabolites from Microalgae: Essential Lipids, Astaxanthin and Phycobiliproteins. *Microbial Biotechnology*, Mar 2015, vol. 8, no. 2. pp. 190-209. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1751-7915.12167> MEDLINE. ISSN 1751-7915. DOI 10.1111/1751-7915.12167.
- [19] SÁNCHEZ-BAYO, A., et al. *Tesis Doctoral Biorrefinería De Microalgas Para La Producción De Biocombustibles.* , 2019.
- [20] Reyes Aguilera, E. A. (2018). Generación de biogás mediante el proceso de digestión anaerobia, a partir del aprovechamiento de sustratos orgánicos. *Revista Científica De FAREM-Estelí*, (24), 60–81. <https://doi.org/10.5377/farem.v0i24.5552>
- [21] NISHSHANKA, G.K.S.H., et al. Wastewater-Based Microalgal Biorefineries for the Production of Astaxanthin and Co-Products: Current Status, Challenges and Future Perspectives. *Bioresource Technology*, 2021, vol. 342. pp. 126018. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852421013602> ISSN 0960-8524. DOI 10.1016/j.biortech.2021.126018.
- [22] DĘBOWSKI, M., ZIELIŃSKI, M., GRALA, A. and DUDEK, M. Algae Biomass as an Alternative Substrate in Biogas Production technologies—Review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, Nov 01, 2013, vol. 27. pp. 596-604. Available from: <https://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2013.07.029> CrossRef. ISSN 1364-0321. DOI 10.1016/j.rser.2013.07.029.
- [23] D'ESTE, M., ALVARADO-MORALES, M., CIOFALO, A. and ANGELIDAKI, I. Macroalgae *Laminaria Digitata* and *Saccharina Latissima* as Potential Biomasses for Biogas and Total Phenolics Production: Focusing on Seasonal and Spatial Variations of the Algae. *Energy & Fuels*, Jul 20, 2017, vol. 31, no. 7. pp. 7166-7175. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.energyfuels.7b00853> CrossRef. ISSN 0887-0624. DOI 10.1021/acs.energyfuels.7b00853.
- [24] RODRIGUEZ-VILLA, A. (2016) “Final Report” en *AlgaEnergy S.A.* Available from: https://www.co2algaefix.es/sites/default/files/FINAL%20REPORT_CO2ALGAEFIX_PV.PDF
- [25] REAL ACADEMIA ESPAÑOLA: Diccionario de la lengua española, 23.^a ed., [versión 23.6 en línea] Available from: www.rae.es [Consulta el día 8 de junio de 2023]

[26] REAL ACADEMIA ESPAÑOLA: Diccionario de la lengua española, 23.^a ed., [versión 23.6 en línea] Available from www.rae.es/tdhle/algina [Consulta el día 8 de junio de 2023]

[27] REDACCIÓN THE FOOD TECH (2013). “¿Qué es la carragenina? Conoce su origen y propiedades” en *The Food Tech*. Available from: <https://thefoodtech.com/ingredientes-y-aditivos-alimentarios/que-es-la-carragenina-conoce-su-origen-y-propiedades/#:~:text=La%20carragenina%20es%20un%20polisac%C3%A1rido,hace%20m%C3%A1s%20de%2070%20a%C3%B1os> [Consulta el día 8 de junio de 2023]

[28] LLEIDA BIOTECH. “¿Que son los bioproductos?” en *Industrias de bioproductos*. Available from: <https://www.lleidabiotech.com/castella/indlleida.html> [Consulta el día 8 de junio de 2023]

[29] “Líquido iónico”. (2022, April 24). Available from: https://es.wikipedia.org/wiki/L%C3%ADquido_i%C3%B3nico

[30] BESEL, S.A. (2007). “Biomasa: Digestores anaerobios” en Besel, S.A. en *Energías Renovables*.

[31] Zirconia cúbica. (2023, March 30). Available from: https://es.wikipedia.org/wiki/Zirconia_c%C3%ABica