



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

**Diseño de un proceso de extracción
mediante ultrasonidos y filtración tangencial
para la valorización de biomasa algal crecida
en aguas residuales de purines**

Autor:

Beltrán Cortijo, Rodrigo

Tutor(es):

**Rojo de Benito, Elena María
Bolado Rodríguez, Silvia
Departamento de Ingeniería
Química y Tecnología del Medio
Ambiente**

Valladolid, Abril 2023.

Abstract and Keywords

Este trabajo realiza el diseño de un proceso para recuperar péptidos de biomasa algal crecida en fotobiorreactores de tratamiento de purines de cerdo. Se realizó una optimización de la extracción con ultrasonidos, obteniendo los mayores rendimientos de extracción de péptidos y monosacáridos a 1h y 50% de amplitud (51% y 62.3% respectivamente), consiguiendo así una valorización integrada de la biomasa algal. Posteriormente, se estudió la separación de los péptidos de mayor tamaño del resto de hidrolizado mediante un sistema de ultrafiltración alcanzando una baja retención del 15.3% con una membrana de 50 kDa y una presión transmembrana de 2-3 bar (los péptidos obtenidos fueron de pequeño tamaño). Con estos resultados experimentales se realizó un diseño preliminar de una planta de tratamiento de 472.12 kg/d biomasa algal crecida en purines de cerdo, alcanzando un precio mínimo de venta de 3.54 €/L y una producción de hidrolizado con péptidos de 0.78 m³/d.

Palabras clave: Ultrafiltración, ultrasonidos, filtración tangencial, hidrolisis enzimática y biorrefinería

This work performs the design of a process to recover peptides from algal biomass grown in pig slurry treatment photobioreactors. An optimisation of the extraction with ultrasound was carried out, obtaining the highest extraction yields of peptides and monosaccharides at 1h and 50% amplitude (51% and 62.3% respectively), thus achieving an integrated valorisation of the algal biomass. Subsequently, the separation of the larger peptides from the rest of the hydrolysate was studied using an ultrafiltration system, achieving a low retention of 15.3% with a 50 kDa membrane and a transmembrane pressure of 2-3 bar (the peptides obtained were of small size). With these experimental results, a preliminary design of a treatment plant for 472.12 kg/d algal biomass grown on pig slurry was made, reaching a minimum selling price of 3.54 €/L and a production of hydrolysate with peptides of 0.78 m³/d.

Keywords: Ultrafiltration, ultrasound, tangential filtration, enzymatic hydrolysate and biorefinery

Índice

1. Introducción	9
2. Objetivos.....	19
3. Materiales y métodos	21
3.1 Materia prima	21
3.2. Experimentos realizados.....	22
3.3. Equipos.....	25
3.4 Métodos de análisis	28
3.5. Cálculos para el diseño del proceso	33
4. Resultados experimentales.....	39
4.1 Optimización del proceso de extracción con ultrasonidos	39
4.2. Separación de péptidos mediante filtración tangencial	42
5. Diseño proceso global	53
6. Diseño del proceso de extracción y filtración	55
6.1 Ultrasonidos	55
6.2 Sistema de filtración	57
7. Balance Económico	61
7.1 Coste total de la planta	61
7.2 Análisis de la viabilidad y sensibilidad económica de la planta.....	61
8. Estudio Ambiental.....	63
8.1 Objetivos.....	63
8.2 Aspectos ambientales e impactos asociados	63
9. Estudio de seguridad.....	67
10. Conclusiones.....	69
11. Bibliografía	71

ANEXOS

ANEXO 1: P&ID

ANEXO 2: Hojas de especificaciones

ANEXO 3: Estudio HAZOP

ANEXO 4: Hojas de seguridad de reactivos

Índice de tablas

Tabla 1. Ventajas y desventajas de pretratamientos.

Tabla 2. Ventajas y desventajas de diferentes métodos de separación de proteínas.

Tabla 3. Datos de las membranas del artículo Damar et al. (2020).

Tabla 4. Composición de la biomasa en base seca (%).

Tabla 5. Composición de la biomasa en base seca sin cenizas (%).

Tabla 6. Condiciones de operación de las distintas pruebas de filtración,

Tabla 7. Características y propiedades del sistema de filtración tangencial.

Tabla 8. Características y propiedades de las membranas de microfiltración.

Tabla 9. Características y propiedades de las membranas de ultrafiltración Microdyn Nadir.

Tabla 10. Ensayos realizados en laboratorio.

Tabla 11. Curva de calibrado del HPLC (Shimadzu LC.2050C).

Tabla 12. Curva de calibrado del HPLC (Waters).

Tabla 13. Concentración para la preparación de la curva de calibración.

Tabla 14. Valores obtenidos de solubilización de proteínas y pérdidas de nitrógeno.

Tabla 15. Valores obtenidos de solubilización y recuperación para los carbohidratos.

Tabla 16. Consumos de potencia (W) y energía en cada experimento de extracción.

Tabla 17. Concentración de péptidos en los experimentos de microfiltración.

Tabla 18. Resultados de filtración con membrana 50 kDa, a 2 bar y $1.37 \cdot 10^{-3}$ m³/h.

Tabla 19. Resultados de filtración con membrana 50 kDa, a 2-3 bar y $1.37 \cdot 10^{-3}$ m³/h.

Tabla 20. Resultados de filtración con membrana 10 kDa, a 3 bar y $2.19 \cdot 10^{-3}$ m³/h.

Tabla 21. Resultados de concentración de péptidos durante proceso de filtración con membrana 50 kDa, a 2 bar.

Tabla 22. Resultados de concentración de péptidos durante proceso de filtración con membrana 50 kDa, a 2-3 bar.

Tabla 23. Resultados de concentración de péptidos durante proceso de filtración con membrana 10 kDa, a 3 bar.

Tabla 24. Resultados de filtración con membrana 50 kDa, a 2 bar y $1.37 \cdot 10^{-3}$ m³/h.

Tabla 25. Resultados de concentración de péptidos durante proceso filtración.

Tabla 26. Resultados de filtración con membrana 50 kDa, a 2-3 bar y $1.37 \cdot 10^{-3}$ m³/h (Ensayo Control 1).

Tabla 27. Resultados de filtración con membrana 50 kDa, a 3-4 bar y $1.91 \cdot 10^{-3}$ m³/h (Ensayo Control 2).

Tabla 28. Resultados de filtración con membrana 50 kDa, a 3-4 bar y $1.91 \cdot 10^{-3}$ m³/h (Ensayo Control 3).

Tabla 29. Resultados de concentración de proteínas durante proceso filtración (Ensayo Control 1).

Tabla 30. Resultados de concentración de proteínas durante proceso filtración (Ensayos Control 2 y 3).

Tabla 31. Condiciones de operación y diseño del reactor.

Tabla 32. Características del material y espesor de la carcasa.

Tabla 33. Características del material y espesor del fondo.

Tabla 34. Valores calculados para la membrana de 50 kDa.

Tabla 35. Resumen de costes de inversión de la planta.

Tabla 36. Resumen de costes y ganancias de la planta.

Tabla 37. VAN y TIR del proyecto con precio de venta de 3.5 €/L.

Tabla 38. VAN y TIR del proyecto con precio de venta de 3.54 €/L.

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama de bloques de un proceso de biorrefinería de microalgas.

Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de estudio.

Figura 3. Ultrasonicador UIP1000hdT, marca Hielscher.

Figura 4. Sistema de filtración utilizado para la experimentación.

Figura 5. Esquema de funcionamiento del sistema de filtración en flujo tangencial.

Figura 6. Comparación de solubilización de las proteínas a distintos tiempos y amplitudes.

Figura 7. Comparación de solubilización y recuperación de los carbohidratos a distintos tiempos y amplitudes.

Figura 8. Evolución de J en el tiempo para la membrana de 50 kDa, a 2 bar y $1.37 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3/\text{h}$.

Figura 9. Evolución de J en el tiempo para la membrana de 50 kDa, a 2-3 bar y $1.37 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3/\text{h}$.

Figura 10. Evolución de J en el tiempo para la membrana de 10 kDa, a 3 bar y $2.19 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3/\text{h}$.

Figura 11. Evolución de J en el tiempo para la membrana de 50 kDa, a 2 bar y $1.37 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3/\text{h}$.

Figura 12. Evolución de J en el tiempo para la membrana de 50 kDa, a 3-4 bar y $1.37 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3/\text{h}$ (Ensayo control 1).

Figura 13. Evolución de J en el tiempo para la membrana de 50 kDa, a 3-4 bar y $1.91 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3/\text{h}$ (Ensayo control 2 y 3).

1.Introducción

En estas últimas décadas, está creciendo la importancia de la biomasa algal como materia prima para la producción de una amplia gama de productos con aplicaciones alimentarias, energéticas, agrícolas, sanitarias y para piensos animales, debido a su alto contenido en diferentes macro-componentes como son las proteínas, los carbohidratos y los lípidos. Durante este tiempo se han sugerido varios enfoques y métodos para la extracción de estos valiosos compuestos mediante un proceso de biorrefinería, lo que supondría una ampliación de las oportunidades de esta materia prima en el mercado.

La biorrefinería es definida por la Agencia Internacional de Energía (IEA) como *“el procesamiento sostenible de biomasa en un rango de productos comercializables y energía”* (Pandey et al., 2021). Este procesamiento permite la obtención de diversos bio-productos (como los bio-combustibles, energía y/o productos de valor añadido) a través de la transformación de una biomasa mediante diferentes tecnologías. Este concepto se puede englobar dentro de la economía circular y permite reducir el consumo de recursos no renovables y la emisión de gases de efecto invernadero (GEI). Las microalgas poseen gran potencial como materia prima en un proceso de biorrefinería debido a que de ellas se pueden obtener diversos compuestos y además se consideran actualmente fuentes renovables gracias a su rápido crecimiento, lo cual es beneficioso para el proceso (Chew et al., 2017).

En la Figura 1 se puede ver un ejemplo de un proceso de biorrefinería utilizando como materia prima la biomasa algal, los métodos de extracción empleados y las distintas aplicaciones que podrían tener estos diferentes bio-productos obtenidos. Las fracciones de aceites, minerales, carbohidratos y proteínas suelen emplearse en la producción de químicos, combustibles, alimentos, biogás y productos de valor añadido. Además, los residuos generados (como la glicerina) también se pueden utilizar para la producción de otros productos de valor añadido (Chew et al., 2017).

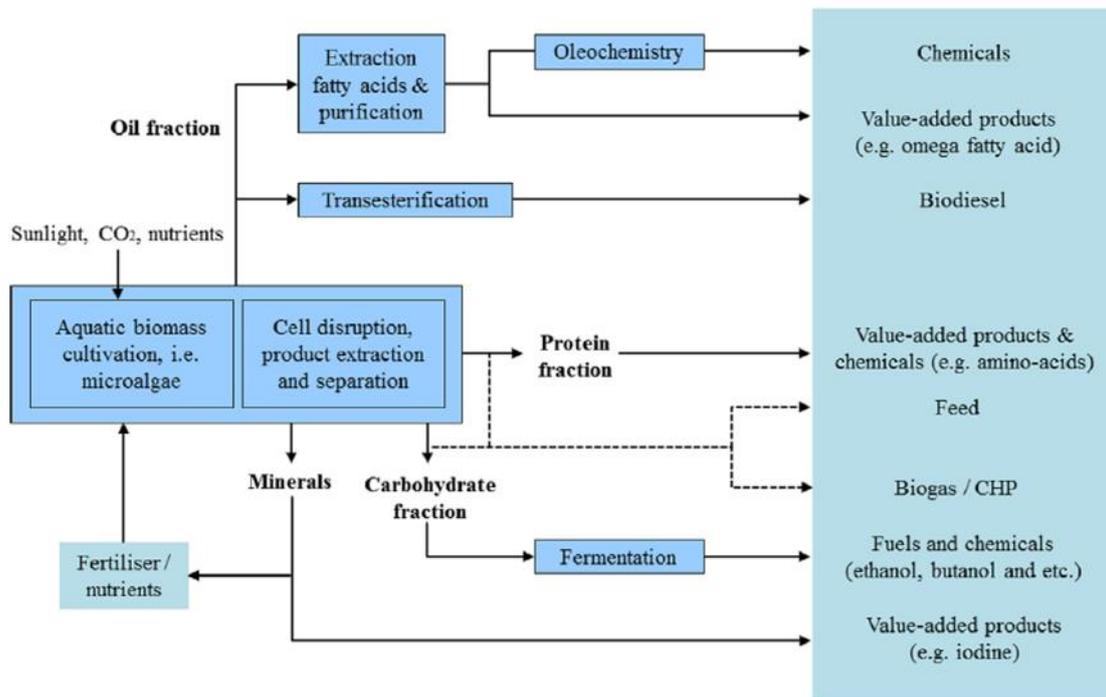


Figura 1. Diagrama de bloques de un proceso de biorrefinería de microalgas (Chew et al., 2017).

Sin embargo, la transformación de la biomasa algal en una planta de biorrefinería sigue siendo un proceso poco viable técnica y económicamente debido a las diferentes limitaciones que existen actualmente: los fotobiorreactores a escala industrial tienen elevados costes de inversión, donde además se alcanzan bajas concentraciones de biomasa ($\approx 1-2$ g/L de biomasa seca) y así mismo, el cultivo de microalgas conlleva importantes gastos en nutrientes para su crecimiento. Además, la biomasa producida posee una pared celular muy resistente dificultando la extracción de los diferentes compuestos y por otro lado, los procesos posteriores de fraccionamiento y purificación (*downstream*) no permiten la recuperación simultáneamente de los múltiples componentes microalgales, lo que conlleva también un alto coste económico del proceso de fraccionamiento y purificación de los macro-componentes de las microalgas (Gifuni et al., 2019).

Una alternativa en la que se viene trabajando en los últimos años, es el uso de fotobiorreactores para el tratamiento de aguas residuales con elevados contenidos de nitrógeno, como los purines. Se consigue así simultáneamente, obtener agua limpia útil para usos agrícolas y recuperar los nutrientes de un residuo difícil de tratar por métodos clásicos, acumulándolos en la biomasa algal crecida en estos fotobiorreactores en forma de proteínas y carbohidratos. La biomasa algal en estos sistemas de tratamiento es un consorcio de bacterias y algas, con elevados contenidos de proteínas (40-70%) y de carbohidratos (18-45%) y, habitualmente un reducido porcentaje de lípidos (<10%) (Rojo et al., 2022). Las proteínas son el principal componente de este tipo de biomasa algal, pero también son los

compuestos más sensibles de las microalgas (sobre todo frente a temperatura y pH extremos), por lo que su extracción es el paso más importante y crucial en la biorrefinería. En cuanto a los carbohidratos, se encuentran principalmente formados por glucosa, xilosa y por varios heteropolisacáridos los cuales se pueden encontrar tanto dentro como en la propia pared celular (Pandey et al., 2021).

El primer paso en un proceso de biorrefinería es el cultivo y producción de la biomasa algal en fotobiorreactores, pero para poder obtener los macro-componentes de las microalgas (los cuales se encuentran principalmente dentro de la pared celular), es necesario romper esta pared y liberar los macro-compuestos de interés, y éste es el principal obstáculo del proceso y que más se está investigando en los últimos años. Esta etapa resulta aún más importante cuando se trabaja con biomasa algal crecida en aguas residuales, ya que las algas capaces de crecer en estas condiciones tienen paredes aún más resistentes. Para realizar esta extracción, existen distintos tipos de métodos que se pueden clasificar en físicos, químicos y biológicos (Rojo et al., 2022; Zhang et al., 2019).

Los tratamientos físicos se basan en la rotura de la pared celular mediante diferentes fuerzas mecánicas. Así mismo se caracterizan por ser métodos simples y limpios, ya que no se le añade ningún tipo de compuesto/solvente, y porque no se producen subproductos inhibidores o, si se forman, son en poca cantidad y concentración. En este grupo destaca el molino de bolas (la ruptura de la pared celular se produce por varias causas: la colisión de las células con las bolas a diferentes velocidades, la aceleración centrífuga...), los ultrasonidos (las ondas de ultrasonido crean burbujas de alta presión en el líquido que colapsan y generan ondas las cuales provocan fuerzas de cizallamiento que permiten la ruptura de la pared celular), los microondas (las ondas de microondas generan calor a través de la interacción del material calentado y un campo electromagnético aplicado dando como resultado la solubilización de los macrocomponentes), el campo eléctrico pulsado (la biomasa es sometida a un alto voltaje producido por dos electrodos que provoca una rápida rotura de la pared celular) y la homogeneización a alta presión (las presiones de más de 200 bar alteran y rompen la estructura debido a las acciones de cizallamiento, presión y calentamiento).

Por otro lado, los métodos químicos consisten en la adición de compuestos para poder romper los enlaces moleculares presentes en las células de la microalga y solubilizar los distintos macro-componentes. Los más conocidos de estos son la hidrólisis ácida (empleando HCl o H₂SO₄ a diferentes concentraciones) que permite alcanzar un alto rendimiento de extracción de carbohidratos (debido a que a través de la hidrólisis ácida se rompen los enlaces glucosídicos, quedando libres los monosacáridos como la glucosa o la xilosa), y la hidrólisis básica (empleando NaOH o KOH a diferentes concentraciones) que permite conseguir una alta solubilización de proteínas (se rompen los enlaces peptídico que unen los aminoácidos y se

produce también la saponificación de los lípidos presentes en la pared celular). Así mismo, estos métodos químicos se suelen combinar con moderadas/altas temperaturas para favorecer la extracción.

Finalmente, los métodos biológicos consisten en el uso de microorganismos como hongos que producen enzimas, o el uso directo de enzimas, para degradar y romper los enlaces específicos en la pared celular. En el caso de la biomasa algal cultivada en aguas residuales, las enzimas más empleadas son las proteasas (que degradan los enlaces peptídicos) y las celulasas (que degradan los enlaces carboxílicos) debido al alto contenido de proteínas y carbohidratos en este tipo de biomasa.

En la siguiente Tabla 1 se pueden observar las ventajas e inconvenientes de cada tipo de método para la extracción de macro-componentes de microalgas (Rojó et al., 2022; Zhang et al., 2019). Como se ve en esta tabla, cada tipo de método de extracción tiene diferentes ventajas y desventajas que deben tenerse en cuenta para la elección del mejor tratamiento en función de los compuestos a extraer, la aplicación final del producto y el tipo de biomasa algal empleado como materia prima (especie, composición y resistencia de la pared celular). Una opción viable para corregir las diferentes desventajas sería la combinación de varios métodos (como los tratamientos físicos con los tratamientos biológicos con enzimas), ya que de esta forma se podría mejorar los resultados de la extracción, aumentando los rendimientos de solubilización con un impacto mínimo en la molécula objetivo y disminuyendo los costes de operación relacionados con los tratamientos físicos (Rojó et al., 2022).

Métodos	Ventajas	Inconvenientes
<i>Molino de bolas</i>	Se emplea un equipo sencillo Es un proceso rápido Alta eficiencia de extracción	Alto consumo energético Formación de restos (debris celular) muy finos y difíciles de separar
<i>Ultrasonidos</i>	Método simple y limpio Corto tiempo de extracción Permite una alta reproducibilidad y operar de forma continua Poco impacto medioambiental	Coste energético alto Dificultad de separación y purificación del producto final Aumento de temperatura y posible degradación de productos
<i>Microondas</i>	Método rápido y eficaz	Alto consumo energético y de mantenimiento Alta temperatura Recuperación de compuestos termolábiles requiere enfriamiento Degradación de lípidos

<i>Campo eléctrico pulsado</i>	Bajo consumo energético Condiciones de operación suaves	Proceso muy novedoso y poco estudiado
<i>Homogeneización a alta presión</i>	Condiciones de operación (temperatura y pH) moderados Operación continua Gran capacidad de carga	Alto coste energético Altas presiones que pueden degradar los compuestos extraídos
<i>Químicos</i>	Métodos sencillos y rápidos fácilmente escalable Alta velocidad de reacción Altos rendimientos de extracción	Condiciones de operación extremas Degradación de algunos compuestos y producción de inhibidores Corrosión de equipos debido a los compuestos químicos Dificultad para separar los compuestos de las algas
<i>Biológicos</i>	Bajo consumo energético Baja contaminación No necesita la adición de químicos Condiciones de operación suaves Es un proceso muy selectivo	Es un proceso lento Costes elevados de enzimas Bajos rendimientos de extracción

Tabla 1. Ventajas y desventajas de pretratamientos.

Un ejemplo de métodos combinados es la extracción enzimática asistida por ultrasonidos (UAEE). El uso de enzimas por sí sólo alcanza rendimientos bajos de extracción y es necesario tiempos elevados de hidrólisis para conseguirlos, mientras que su combinación con ultrasonidos podría proporcionar mejores resultados, reduciendo el tiempo de hidrólisis y aumentando los rendimientos de solubilización. Tchabo et al. (2015) estudiaron la extracción de diferentes compuestos presentes en la frambuesa con la enzima Pectinex® UF, reduciéndose el tiempo de extracción de 45 a 12 minutos, al aplicar ultrasonidos. Esta reducción en el tiempo de hidrólisis permite también una reducción de los costes de producción.

Tomando como base los resultados previos del grupo, este proyecto plantea una ruptura celular por hidrólisis enzimática (que nos permite la extracción selectiva de los compuestos en condiciones moderadas de temperatura y pH, además de ser un proceso que apenas contamina y de bajo consumo energético tal y como se recoge en la Tabla 1) combinada de forma simultánea con ultrasonidos (que es uno de los métodos físicos más limpios y simples y es perfecto para el uso combinado con otros tratamientos) para la extracción de los diferentes macro-compuestos de la biomasa algal. Se ha comprobado que el uso de estos dos métodos combinados da resultados favorables en este tipo de materia prima, siendo más eficaz la hidrólisis

enzimática cuando se combina con ultrasonidos en las condiciones óptimas de operación. Blanco-Llamero et al. (2021) trabajaron con distintos tipos de algas (*Nannochloropsis gaditana*, *Schizochytrium* spp., *Haematococcus pluvialis*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis chuii*, *Chlorella vulgaris* y *Phaeodactylum tricornutum*) obteniendo en todos los casos mejores resultados con el método combinado de extracción que con los tratamientos individuales.

Una vez se ha producido la ruptura celular y la extracción de los diferentes macro-compuestos en un hidrolizado líquido, es necesario realizar un proceso de fraccionamiento y separación para recuperar el compuesto de interés (que en nuestro caso son las proteínas/péptidos, los cuales son los componentes mayoritarios en la biomasa algal). Para separar y recuperar estos compuestos del hidrolizado existen diversos métodos resumidos en la Tabla 2 que están basados en distintos principios:

Métodos	Ventajas	Inconvenientes
<i>Precipitación química</i>	Método simple y rápido Óptimo para grandes cantidades de hidrolizado	Posible formación de sub-compuestos Corrosión de equipos debido a la adición de químicos Útil para grandes péptidos
<i>Cromatografía</i>	Permite identificar y cuantificar las proteínas Permite separar las proteínas unas de otras	Es un proceso costoso y complejo difícil de aplicar a nivel industrial
<i>Membranas</i>	Método fiable Bajo gasto energético Es muy simple Limpio Condiciones suaves de operación Permite trabajar con grandes volúmenes Facilidad de automatización	Es un proceso lento Obstrucción de membrana Filtros de membranas pueden ser costosos Separación únicamente por tamaños

Tabla 2. Ventajas y desventajas de diferentes métodos de separación de proteínas (Nielsen, s. f.; Rojo et al., 2022; Soria et al., 2012).

Algunos ejemplos de separación de proteínas por precipitación química son la adición de sales como el sulfato de amonio (NH_4SO_4) y la precipitación isoeléctrica. En el primer caso, a través de la adición del sulfato de amonio las proteínas precipitan al aumentar su fuerza iónica en presencia de esta sal neutra. Por último, la precipitación isoeléctrica consiste en la variación el pH del hidrolizado (añadiendo HCl o NaOH) hasta alcanzar el punto isoeléctrico en el que la carga de la molécula proteica es neutra disminuyendo su solubilidad y gracias a lo cual las proteínas

pueden separarse de otros compuestos cuya solubilidad no depende del pH (Nielsen, s. f.).

Por otro lado, la cromatografía permite separar las proteínas a través de una columna de cromatografía en función de las diferencias de sus características y propiedades en una muestra. Se puede dividir en cromatografía de exclusión, intercambio iónico y afinidad. La cromatografía de exclusión separa las proteínas por su tamaño y forma ya que las moléculas que son más pequeñas que el tamaño del umbral de corte de la columna, tienen más probabilidades de atravesar el poro de la matriz, por lo que quedan atrapadas en la resina y viajan por la columna más lentamente. En el caso de la cromatografía de intercambio iónico, este proceso se basa en la diferencia entre las cargas de las moléculas para favorecer la separación y puede separar las biomoléculas con grupos ionizables, como las proteínas o los péptidos, de otras sin grupos ionizables. En este caso, las proteínas cargadas en la solución son adsorbidas reversiblemente por la matriz. Por último, la cromatografía de afinidad consiste en una matriz cromatográfica, donde la proteína es adsorbida. Esta matriz contiene un ligando unido covalentemente a un soporte sólido y tiene una afinidad de unión reversible, específica y única para una proteína específica. La principal desventaja es que todos estos métodos cromatográficos son muy costosos para su aplicación a nivel industrial (Nielsen, s. f.).

Finalmente, la filtración por membranas es una tecnología verde, que es ampliamente aplicada a diversos campos industriales (depuración, desalinización...) ya que una de las mayores ventajas de este método es que es ideal para preservar las propiedades de las proteínas. Dentro de los métodos con membranas útiles para la separación y la purificación de proteínas tenemos la diálisis y la filtración por tamaños moleculares. La diálisis es un método muy común para la purificación, concentración y fraccionamiento de diferentes moléculas. Este método se basa en los fundamentos de la difusión de solutos y de la ultrafiltración y consiste en una membrana semipermeable o una bolsa de diálisis con un tamaño de poro específico que permite el paso a moléculas de pequeño tamaño a través de ella, reteniendo aquellas cuyo tamaño sea mayor que el de poro. En el proceso de diálisis, a diferencia que la filtración por tamaños moleculares, no se aplica presión para realizar el filtrado. Por otro lado, la filtración por tamaños moleculares consiste en retener aquellos compuestos de tamaño mayor que el del poro de la membrana, mientras que los compuestos de menor tamaño pasan al otro lado de la membrana, aplicando presión sobre la solución. Este proceso depende de parámetros como las características de las propias membranas, la concentración de proteínas, presión, temperatura... (Soria et al., 2012). Dentro de este tipo de separación, ordenado de mayor a menor tamaño de poro en la membrana, estarían la microfiltración, la ultrafiltración, la nanofiltración y la ósmosis inversa. Hay gran variedad de membranas de distintos materiales, como son el nylon, la polietersulfona, la celulosa regenerada, fibra de vidrio..., y tamaños de poro. Este tipo de filtración es más rápida

que la diálisis debido a la aplicación de presión como fuerza impulsora. Ésta además se puede aplicar en pequeña y gran escala. Las moléculas que son de mayor tamaño que el tamaño de poro no pasan al otro lado de la membrana, y serán las que forman lo que se conoce como concentrado, mientras que las de menor tamaño de poro pasaran por la membrana y será lo que se conoce por permeado (Nielsen, s. f.; Rojo et al., 2022).

La microfiltración (10 μm – 0.1 μm) se suele utilizar para eliminar partículas y microorganismos como bacterias en la producción de productos como la leche o la cerveza, y en el tratamiento de aguas residuales. Por otro lado, la ultrafiltración (100 nm – 1 nm) se suele utilizar para concentrar moléculas de gran tamaño como las proteínas, por eso es el método de membranas que nos interesa y que estudiaremos en este trabajo. En nuestras experiencias trabajaremos con un rango de presiones de 1 a 4 bar. Este método se utiliza por ejemplo en el proceso de producción de queso para la concentración de proteínas presentes en el suero de leche (Damar et al., 2020), donde se utilizan tres tipos de membranas de 10 kDa con condiciones de operación distintas y que se recogen en la Tabla 3. En este trabajo se llegó a la conclusión de que para concentrar las proteínas de ese suero la membrana debe tener superficie hidrofílica, lisa, de alta porosidad y baja rugosidad. En la recuperación de proteínas de arroz en aguas residuales del proceso de producción de almidón (Doan & Lai, 2021), se trabajó con una membrana en espiral en flujo cruzado de 50 kDa, en un rango de presiones de 2 a 10 bar. Se concluyó que este proceso era eficaz a 8 bar, obteniendo para este valor un porcentaje de rechazo de péptidos del 90% (es decir, el 90% de los péptidos quedaron retenidas en el concentrado). En la recuperación de sub-productos proteicos del pescado como el atún se han obtenido buenos resultados con una membrana cerámica de 8 kDa, a 55°C, pH de 8.5 y 60 minutos de operación, llegando a 95 g/L de péptidos en el concentrado frente a 36.5 g/L en el permeado (Saidi et al., 2014).

Tamaño poro (kDa)	Material	Temperatura (°C)	Presión transmembrana (bar)	Coefficiente de rechazo de sólidos totales (%)	Coefficiente de rechazo de $\alpha\text{-La}^a$ (%)
10	Acetato de celulosa regenerada	5-60	1-10	28.2 \pm 0.3	97.6 \pm 0.2
10	Polímero fluorado compuesto	5-60	1-10	32.5 \pm 0	100 \pm 0.0
10	Polietersulfona	5-75	1-10	25.0 \pm 0.4	68.5 \pm 0.7

Tabla 3. Datos de las membranas del artículo Damar et al. (2020). ^aLa proteína $\alpha\text{-La}$ es $\alpha\text{-Lactalbúmina}$, que es la mayoría en ese tipo de biomasa.

Por último, la nanofiltración (1 nm – 0.1 nm) se utiliza también en el proceso de concentración de proteínas de forma conjunta a la ultrafiltración para eliminar los

iones monovalentes presentes y separación de péptidos de pequeño tamaño. Finalmente, la ósmosis inversa (< 1 nm) se utiliza para purificar el agua y eliminar elementos como los iones metálicos (Nielsen, s. f.).

En resumen y teniendo en cuenta todo lo anterior explicado, el proceso planteado estará formado por un fotobiorreactor donde se cultivan las microalgas; el proceso UAEE para romper la pared celular de las algas y liberar los compuestos y un sistema de membranas de ultrafiltración para la concentración de las proteínas extraídas (Figura 2):

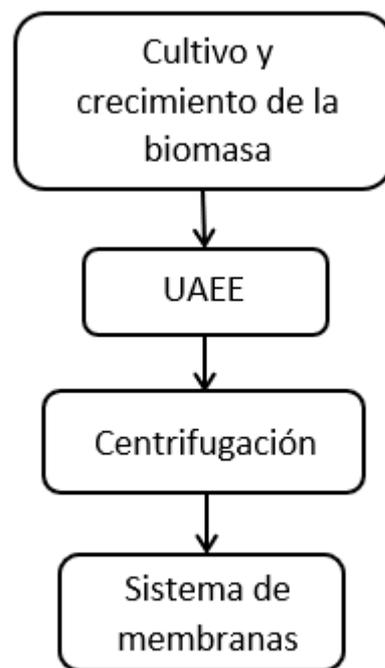


Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de estudio.

2. Objetivos

El objetivo general de este estudio es la propuesta y diseño preliminar de un sistema capaz de recuperar las proteínas presentes en una biomasa algal crecida en un fotobiorreactor de tratamiento de purines. Se plantea la hidrólisis y separación de los componentes de un consorcio de microalgas y bacterias de una forma eficiente y sostenible, en el marco de un proceso global de valorización fraccional de los componentes de esta biomasa. Los siguientes puntos son los objetivos específicos que buscamos cumplir en este trabajo:

- Optimización del proceso de extracción de proteínas y carbohidratos mediante UAEE a través del estudio de los rendimientos de solubilización y recuperación a diferentes tiempos y amplitudes de onda.
- Estudio del comportamiento de diferentes membranas para la separación de los péptidos y monosacáridos solubilizados a diferentes caudales y presiones transmembrana.
- Diseño preliminar de un proceso de producción de péptidos de biomasa algal mediante UAEE para la extracción y separación mediante un sistema de filtración con membranas para un flujo másico algal de 472.12 kg/d.

3. Materiales y métodos

3.1 Materia prima

Como materia prima se utilizó en este estudio una biomasa formada por un consorcio de microalgas (siendo la especie principal *Scenedesmus* sp.) y bacterias obtenido en un fotobiorreactor de capa fina alimentado por purines diluidos al 10% situado en las instalaciones de la Universidad de Almería (España). La composición en base seca de esta biomasa viene reflejada en la Tabla 4 y sin cenizas en la Tabla 5. La biomasa con la que trabajamos fue liofilizada tras su cosechado.

Composición base seca (%)	
Lípidos (%)	5.81
Proteínas (%)	35.37
Carbohidratos (%)	19.34
Cenizas (%)	14.39
Glucosa (%)	9.52
Xilosa (%)	9.03

Tabla 4. Composición de la biomasa en base seca (%).

Composición base seca sin cenizas (%)	
Lípidos (%)	6.79
Proteínas (%)	41.31
Carbohidratos (%)	22.59
Glucosa (%)	11.11
Xilosa (%)	10.54

Tabla 5. Composición de la biomasa en base seca sin cenizas (%).

García-MoscOSO et al. (2015) analizaron la composición de *Scenedesmus* sp. cultivadas en un fotobiorreactor. Los valores que obtuvieron fueron un 54% de proteínas, un 23% de carbohidratos, un 17% de lípidos y un 6% de cenizas. Esta diferencia de valores se puede deber a que nuestra biomasa no está completamente formada por algas de la especie *Scenedesmus* sp., a las diferentes condiciones de operación, o del medio en el que han crecido. Nuestra biomasa ha crecido en aguas residuales, por lo que nuestro porcentaje de lípidos es pequeño debido al estrés que se genera en el fotobiorreactor donde se trata agua residual (purines) con un contenido en nutrientes no equilibrado, presencia de contaminantes y compuestos inhibidores, y la competencia con otros microorganismos. Este estrés favorece que se sinteticen más proteínas que otros compuestos, lo que explicaría el elevado porcentaje de proteínas habitualmente encontrado en esta biomasa (Trujillo-Roldán & Valdez-Cruz, 2006).

3.2. Experimentos realizados

3.2.1. Optimización de ultrasonidos

Se llevó a cabo un estudio de optimización del proceso de extracción con ultrasonidos y enzimas (UAEE), realizándose ensayos de hidrólisis durante diferentes tiempos (15 minutos, 30 minutos y 60 minutos), y para cada tiempo se probaron tres amplitudes de ultrasonidos diferentes: 50, 75 y 100%. La elección de las amplitudes para las experiencias estuvo limitada debido a que el equipo de ultrasonidos trabaja con una amplitud mínima del 50%. Los tiempos utilizados fueron elegidos para poder estudiar su influencia en la solubilización y recuperación de proteínas y carbohidratos basándose en resultados cinéticos previos del grupo de investigación en los que se concluyó que a partir de los 60 min no aumentaba la extracción de los compuestos.

En todos los experimentos se ha utilizado la enzima Protamex™ a una concentración de 1:100 v/W_{biomasa seca}, ya que en estudios anteriores se vio que ésta concentración es óptima para la obtención de péptidos. Protamex™ es una endo-proteasa de grado alimenticio que proporciona una hidrólisis extensa en un rango de pH de 6-9 y un rango de temperaturas de trabajo de 30-65°C (Protamex® | Novozymes, n.d.). Estudios previos del grupo compararon los resultados con Protamex y con otra endo-proteasa como es la Alcalasa, obteniendo con Protamex menores rendimientos de solubilización y recuperación, pero un mayor tamaño de péptidos en el hidrolizado (Rojo et al., 2021). Comparando con otro tipo de enzima como es la Celluclast 1.5L (celulasa), Protamex™ proporcionó mayores rendimientos para las proteínas, pero menores para los carbohidratos. Por consiguiente, para este trabajo hemos elegido la endo-proteasa Protamex™ debido a que permitió obtener péptidos de tamaño moderado (>50 kDa) y rendimientos de solubilización moderados. Cabe esperar que la aplicación de ultrasonidos consiga aumentar los rendimientos de solubilización de proteínas, manteniendo el tamaño de los péptidos recuperados. Las condiciones de operación empleadas fueron una temperatura de 50°C, un pH de 6.5 y una concentración de 1:100 v/W_{biomasa seca} para Protamex™ (Rojo et al., 2021).

Cada ensayo se realizó por duplicado y cada duplicado se analizó con 2 réplicas. Por lo tanto, los resultados de cada ensayo se obtuvieron como media de 4 análisis diferentes.

Cada experimento se llevó a cabo mediante el siguiente procedimiento: se pesaron 13.5 g de biomasa algal seca en un vaso de precipitados y se vertió agua MilliQ hasta llegar a los 250 g (para obtener así una suspensión al 5% de concentración (W_{biomasa seca}/w)). Se agitó con agitador magnético durante unos segundos para homogeneizar la suspensión y se midió el pH final (ajustándolo a ~6.5 cuando fue necesario). Posteriormente, se vertió la suspensión en el reactor con encamisado de vidrio (que mantuvo la temperatura constante a 50°C) del equipo de

ultrasonidos modelo UIP1000hdT (Hielscher, Alemania) se añadió la enzima Protamex™ con la concentración previa indicada (1:100 w/ $W_{\text{biomasa seca}}$), es decir, para 13.5 g de biomasa seca se añadieron 0.13 g de enzima, y se sumergió la sonda de ultrasonificación en su interior.

Tras acabar el tiempo de tratamiento por UAEE, se trasvasó la suspensión obtenida a un bote de centrífuga para separar la fase sólida residual del hidrolizado líquido con una centrífuga refrigerada (Legend RT+Thermo Scientific, USA) a 10,000 rpm durante 10 minutos o a 7,800 rpm durante 10 minutos (Fisher Bioblock Scientific 2-16P). La fase líquida (hidrolizado) se trasvasó a un recipiente de plástico de tapa roja previamente tarado y la fase sólida a otro recipiente para su posterior liofilización y análisis. El análisis de sólidos, de proteínas y de carbohidratos es común a ambas fases (sólida y líquida); mientras que el análisis de lípidos se realizó solo a la fase sólida.

Una vez se analizó la cantidad de proteínas y carbohidratos presentes en las muestras de los experimentos de optimización de ultrasonidos (apartado 2.3.1), se realizaron los cálculos del porcentaje de solubilización para proteínas y carbohidratos, y de recuperación sólo para carbohidratos. Estos valores serán los que nos muestren a qué amplitud de ultrasonidos y a qué tiempo se obtienen mejores resultados de extracción. Estos porcentajes se determinaron con las siguientes ecuaciones (Ecuación 1 y 2):

$$SY (\%) = \left(1 - \frac{MC_{\text{sólido residual}}}{MC_{\text{inicial}}} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

$$RY (\%) = \frac{MC_{\text{hidrolizado}}}{MC_{\text{inicial}}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Siendo SY el rendimiento de solubilización de un componente (%); RY el rendimiento de recuperación de un componente (%); $MC_{\text{sólido residual}}$ la masa del componente en residuo sólido tras la hidrólisis (g); MC_{inicial} es la masa inicial del componente (g); y $MC_{\text{hidrolizado}}$ es la masa del componente en la fase líquida tras la hidrólisis (g). Restando al rendimiento de solubilización el rendimiento de recuperación se obtiene el porcentaje de pérdidas del componente que se está analizando.

3.2.2. Separación de péptidos

Con los hidrolizados obtenidos mediante el proceso de UAEE se procedió a la separación y fraccionamiento de los péptidos presentes en ellos. Lo primero que se hizo fue “limpiar” el hidrolizado para eliminar los sólidos y debris celular de mayor tamaño presente en ella para mejorar la posterior separación. Para la separación se empleó un sistema de filtración tangencial (TFF) acrílico con un área de filtración de 20.6 cm², modelo CF016A (Sterlitech, EE. UU.).

Se filtró el hidrolizado por una membrana con un tamaño de poro de 0.45µm, seguido de otro filtrado con una membrana de 0.2µm y por último una de 0.1µm, todas ellas a una velocidad de 25 rpm y una presión transmembrana de aproximadamente 2 bar. Con estos pasos previos se consiguió eliminar la mayor parte de los sólidos que puedan saturar la membrana de ultrafiltración.

Cuando se tuvo un buen volumen de hidrolizado listo para seguir trabajando, se realizaron ensayos con membranas de ultrafiltración de diferentes tamaños de poro, a diferentes presiones y flujos. Las presiones que se utilizaron se mueven en un rango de 1-4 bar, ya que el sistema no funcionaba de forma estable a mayores valores de presión. El valor de la velocidad que más se uso fue 25 rpm, ya que a bajas velocidades se obtienen mejores resultados de filtración, aunque la membrana se obstruye más. Durante el experimento, se recogió muestra del retenido periódicamente al final de la prueba (donde se encuentran los péptidos y las moléculas de mayor tamaño) y del permeado (donde se encuentran los monosacáridos y moléculas de menor tamaño) al final de la prueba. También se medía la masa de permeado cada 10 minutos para poder calcular el flujo de permeado (Ecuación 3), el cual será empleado para el posterior diseño del sistema de filtración:

$$Q_n = \frac{m_n - m_{n-1}}{t} \times 3.6 \quad \text{Ecuación 3}$$

Siendo Q_n el flujo de permeado para ese tiempo (kg/h); m_n el valor de la masa de permeado en ese instante (g) y m_{n-1} el valor de la masa obtenido 10 minutos antes (g), t es el tiempo transcurrido (s). Finalmente se dividió entre la densidad del agua para obtener el flujo volumétrico (L/h). Con este valor, calculamos el flujo por área de filtración (J), el cual nos ayuda a ver cómo varía la filtración a lo largo del tiempo y el comportamiento del sistema (Ecuación 4):

$$J = \frac{Q_n}{A} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde J es el valor de flujo (L/m²h) y A el área de filtración de la membrana, que es de 0.00206 m².

Se realizaron tres pruebas, con distintas membranas y diferentes condiciones de operación, todas ellas reflejadas en la siguiente Tabla 6:

Prueba	Muestra	Tamaño (Kda)	Condiciones
1	Hidrolizado UAEE	50	25 rpm, 2 bar
		10	40 rpm, 3 bar
2	Hidrolizado UAEE	50	25 rpm, 2-3 bar
		5	25 rpm, 3-4 bar
3		50	25 rpm, 3-4 bar

	Hidrolizado enzimático (control)	50	35 rpm, 3-4 bar
		30	25 rpm, 3-4 bar

Tabla 6. Condiciones de operación de las distintas pruebas de filtración.

3.3. Equipos

3.3.1. Ultrasonidos

Para el proceso de extracción de la biomasa algal mediante un tratamiento combinado de ultrasonidos y enzimas, el equipo de ultrasonidos empleado en este trabajo es un modelo UIP1000hdT de la marca Hielscher (Alemania) (Figura 3). Este equipo tiene un potente ultrasonicador con una potencia de 1000W y una frecuencia constante de 20kHz, gran fiabilidad y puede trabajar las 24 horas del día. Este equipo puede procesar un volumen entre 1 y 5 m³ por día y puede funcionar en un rango de amplitudes que va desde el 50% (mínimo) hasta el 100% (máximo) (UIP1000hdT – Homogeneizador Potente y Versátil, s. f.).



Figura 3. Ultrasonicador UIP1000hdT, marca Hielscher.

El sistema está compuesto por un ultrasonicador y su soporte, la caja de protección acústica (para disminuir los ruidos generados por el ultrasonicador), un pequeño reactor con un encamisado que estaba conectado a un baño termostático a través de dos tuberías de goma. La temperatura del encamisado y el agua que circula a través de ella y por las tuberías se controla desde el mismo baño. Se ha

usado un reactor con encamisado, de vidrio con una capacidad de 250mL, y la concentración de biomasa algal siempre fue la misma (5% $W_{\text{biomasa seca}}/W$).

3.3.2. Sistema de filtración

El posterior proceso de separación y purificación del hidrolizado se llevó a cabo con un sistema de filtración tangencial (modelo CF016A, Sterlitech, EE. UU.), el cual está compuesto por una celda de soporte de material acrílico, donde se colocaron las membranas para llevar a cabo la separación. Esta celda está formada por dos placas separadas entre sí, las cuales se unen por cuatro tornillos situados en las esquinas, dos gomas (“o-ring”) que se colocaron en el hueco rectangular donde va situada la membrana para evitar fugas y las conexiones de entrada y salida del flujo (Figuras 4 y 5) (CROSSFLOW FILTRATION HANDBOOK, s. f.).



Figura 4. Sistema de filtración utilizado para la experimentación.

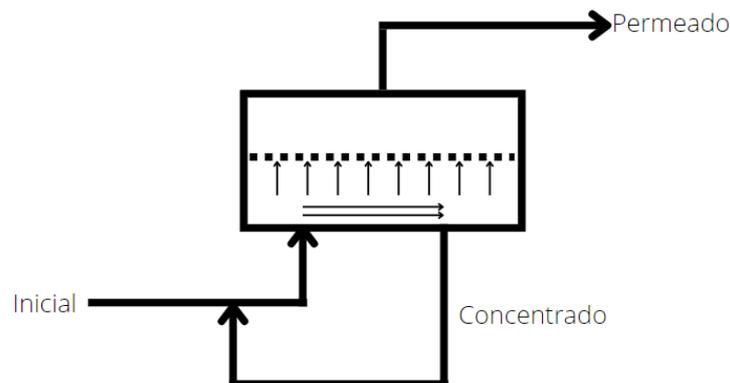


Figura 5. Esquema de funcionamiento del sistema de filtración en flujo tangencial.

Para completar el sistema y poner a punto el proceso para su uso, también se han utilizado tuberías de neopreno con un diámetro interior de 3.1 mm (Masterflex™ 06504-16), una bomba peristáltica de velocidad variable (Masterflex™ 07528-10) que se encarga de impulsar nuestra muestra en la alimentación, dos manómetros (Ashcroft 63-1008-S-DRY-02-L-0/10BAR) para medir y controlar las presiones a la entrada y salida de la celda de soporte y una válvula de aguja (Oliver Valves F25S)

para poder controlar y variar dichas presiones. El sistema de filtración tiene las siguientes características, obtenidas de la página del proveedor (Tabla 7):

Área total (cm ²)	Presión máxima (bar)	Flujo permeado (mL/min)	Profundidad "slot depth" (mm)	Ancho "slot width" (mm)
20.6	27.6	1 - 10	2.3	39

Tabla 7. Características y propiedades del sistema de filtración tangencial (CROSSFLOW FILTRATION HANDBOOK, s. f.).

3.3.3. Membranas

En este estudio se emplearon diferentes membranas, las cuales tienen distinto tamaño de poro para las diferentes etapas de filtración. Las membranas de filtración con el tamaño de poro más grandes (0.45, 0.2 y 0.1 μm) y usadas para eliminar los sólidos de mayor tamaño presentes en el hidrolizado mediante microfiltración son de la marca Pall Corporation (EE. UU.), cuyas características principales vienen definidas en la Tabla 8. Estas membranas son de polietersulfona (PES).

Modelo	Tamaño poro (μm)	Material	Flujo de agua (mL/min/cm ² a 0.7 bar)
Supor 450 (S80710)	0.45	PES	38 - 100
Supor 200 (S80700)	0.2	PES	19.3 - 34.6
Supor 100 (S80610)	0.1	PES	2.7 - 7.4

Tabla 8. Características y propiedades de las membranas de microfiltración (Polyethersulfone Membrane (Hydrophilic) – Medical OEM Manufacturing, s. f.).

Por otro lado, para los ensayos de ultrafiltración de separación y concentración de los péptidos del hidrolizado se utilizaron membranas con un tamaño de poro de 50 kDa, 30 kDa, 10 kDa y 5 kDa para separar los péptidos de los monosacáridos presentes en el hidrolizado. Las membranas que hemos utilizado son de la marca Microdyn Nadir (EE. UU.). Las características y propiedades de estas membranas son las siguientes (Tabla 9). Los materiales utilizados son PES (polietersulfona) y PESH. El PESH es una polietersulfona, pero a diferencia del PES esta está hidratada. La otra opción son membranas de la marca Biomax (Millipore, EE. UU.), que son del mismo tamaño de poro y mismo material que las de Microdyn Nadir, modelos PBGC10205 y PBQK50205.

	pH	Temperatura (°C)	Tamaño poro (kDa)	Material	Flujo máximo (L/m ² h)
UP010	0 - 14	< 95	10	PES	200.68
UH050	0 - 14	< 95	50	PESH	340.14

UH030	0 - 14	<95	30	PESH	137.76
UP005	0 - 14	<95	5	PES	40.82

Tabla 9. Características y propiedades de las membranas de ultrafiltración Microdyn Nadir (Microdyn Nadir Membrane Filters, UP005, PES, UF, 150mm, 5/Pk - 11, s. f.).

En la tabla 10 se recogen los tres ensayos que se realizaron junto a las membranas que fueron utilizadas en cada ensayo:

Ensayos	Hidrolizado	Membranas microfiltración	Membranas ultrafiltración	Condiciones
UAEE 50 kDa y 10 kDa	UAEE	0.45 y 0.2	50 kDa	2 bar y $1.37 \cdot 10^{-3} \text{m}^3/\text{h}$
			50 kDa	2-3 bar y $1.37 \cdot 10^{-3} \text{m}^3/\text{h}$
			10 kDa	3 bar y $2.19 \cdot 10^{-3} \text{m}^3/\text{h}$
UAEE 50 kDa y 5 kDa	UAEE	0.45, 0.2 y 0.1	50 kDa	2 bar y $1.37 \cdot 10^{-3} \text{m}^3/\text{h}$
			5 kDa	-
Control	Solo enzimático	0.45, 0.2 y 0.1	50 kDa	3-4 bar y $1.37 \cdot 10^{-3} \text{m}^3/\text{h}$
			50 kDa	3-4 bar y $1.91 \cdot 10^{-3} \text{m}^3/\text{h}$
			30 kDa	-

Tabla 10. Ensayos realizados en laboratorio. *Los que contienen un guión en las condiciones es porque no dio tiempo a tomar datos debido a la alta velocidad de filtración.

3.4 Métodos de análisis

Las muestras obtenidas después de cada ensayo de hidrólisis con ultrasonidos (apartado 2.3.1), tanto sólidas como líquidas, se sometieron a varios análisis para obtener su composición en proteínas, carbohidratos y lípidos y determinar el rendimiento de solubilización y recuperación de cada ensayo.

3.4.1 Análisis de sólidos

El análisis de sólidos se realizó mediante un método gravimétrico (Wycken & Laurens, 2013b) y se aplicó de la misma forma tanto a las muestras sólidas como a las muestras líquidas. Se cogieron tantos crisoles como muestras se fueron a analizar y se pesaron en una balanza analítica. Seguidamente, se les añadió una cantidad significativa de muestra, anotando el código de crisol y la masa del crisol junto con la muestra. Posteriormente, se llevaron a una estufa, donde se introducirán las muestras a una temperatura de 105°C durante 24 horas. Cuando ya haya pasado ese tiempo, se metieron los crisoles al desecador para disminuir la temperatura y se volvieron a pesar en la balanza analítica. Con estos datos se obtuvo el porcentaje de sólidos totales presentes en la muestra (Ecuación 5):

$$\text{Sólidos totales (\%)} = \frac{m_{105^\circ\text{C}} - m_{\text{crisol}}}{m_{\text{crisol+muestra}} - m_{\text{crisol}}} \times 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

Con los crisoles ya pesados, se llevaron seguidamente a una mufla, donde se introducirán las muestras a una temperatura de 550°C durante 24 horas. Cuando haya pasado el día, se sacaron y se volvieron a pesar en la balanza analítica. Con estos datos, se determinaron los porcentajes de cenizas (Ecuación 6), es decir, la

materia inorgánica presente en la muestra, y los porcentajes de sólidos volátiles, es decir la materia orgánica contenida en la muestra (Ecuación 7):

$$\text{Cenizas (\%)} = \frac{m_{550^{\circ}\text{C}} - m_{\text{crisol}}}{m_{105^{\circ}\text{C}} - m_{\text{crisol}}} \times 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

$$\text{Sólidos volátiles (\%)} = \frac{m_{105^{\circ}\text{C}} - m_{550^{\circ}\text{C}}}{m_{\text{crisol+muestra}} - m_{\text{crisol}}} \times 100 \quad \text{Ecuación 7}$$

3.4.2 Análisis de proteínas

Para analizar la cantidad de proteínas que contienen las muestras se ha realizado el análisis de Nitrógeno Total Kjeldahl, NKT (Laurens, 2013). Este análisis se divide en tres pasos: el primero es una digestión con ácido sulfúrico, la segunda una destilación y por último la valorización. Lo primero que se hace es preparar la muestra que se va a analizar, cogiendo 2 mL de muestra si ésta es líquida o pesando 0.1 g de muestra seca envuelta en papel de fumar si es sólida (utilizando papel de fumar se consigue que no se pierda muestra ni se formen espumas durante la digestión y además no interfiere en los resultados, desapareciendo en la fase de digestión).

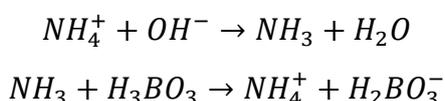
Las muestras se añaden a unos tubos de digestión junto a una pieza dieléctrica de agitación. A estas se les añade una pastilla de catalizador Kjeldahl (0.5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.2% Se) y 6 mL de H_2SO_4 concentrado. Una vez se tengan los tubos de digestión preparados, se colocan éstos en el digestor y sobre los tubos del digestor el colector de humos para eliminar los vapores, y éste se conecta a un tubo de agua de vacío y se inicia la digestión. El proceso de digestión a su vez está dividido a su vez en tres etapas:

- La primera etapa es una rampa de 20 minutos para subir la temperatura hasta 150°C . En esta etapa se comprobará que todo esté en orden y no haya ningún problema de funcionamiento (como formación de espumas o fugas).
- La segunda etapa es una rampa de otros 20 minutos para alcanzar la temperatura de 270°C .
- La tercera etapa es de 1 hora a 370°C .

Cuando la digestión haya acabado, se procedió a apagar el equipo digestor y limpiar el colector de humos. Antes de pasar al siguiente paso, se tendrán que dejar enfriar los tubos del digestor hasta que alcancen una temperatura aproximada al ambiente para poder llevar a cabo la siguiente etapa de destilación. El nitrógeno de las proteínas presentes en la muestra habrá pasado a formar iones amonio (NH_4^+) después de esta digestión.

Una vez se han enfriado los tubos, ese procedió a realizar la destilación. Este paso se realizó en un destilador Buchi (Kjelflex K-360). Para ello también se prepararon y marcaron distintos Erlenmeyers, usando tantos como muestras hubiese.

En el destilador Buchi, lo primero que ese realizó fue una preparación previa del equipo, que consiste en una limpieza y purga. Una vez realizado este paso, colocamos el tubo del digestor con un Erlenmeyer y se realizó una predestilación y una destilación. En este paso se añadió sosa cáustica 6M, que reacciona con los iones amonio, dando lugar a amoníaco y vapor de agua, que arrastra al amoníaco. El amoníaco cuando llega al Erlenmeyer reacciona con ácido bórico, haciendo que se forme el ión amonio. En el Erlenmeyer se obtendrá una muestra de color verde, esto se debe al cambio del indicador (rojo de metilo y azul de metileno) al pasar de ácido a base por las siguientes reacciones químicas:



Cuando esté la muestra en el Erlenmeyer, se procederá a realizar su valorización con H₂SO₄ al 0.1N. Se añadirá poco a poco el H₂SO₄ hasta que la muestra cambie de verde a un morado brillante. El cambio de color se debe al cambio del indicador, pasando de una muestra básica a una ácida en la siguiente reacción química:



Con el volumen final que se haya utilizado de H₂SO₄ y su normalidad (0.1N) se calculó el porcentaje de nitrógeno de cada muestra analizada. Este valor se determinó con las siguientes ecuaciones 8 y 9:

- Si la muestra es sólida:

$$\text{Nitrógeno (\%)} = \frac{1.4 \times N \times V}{m} \quad \text{Ecuación 8}$$

Siendo N la normalidad del H₂SO₄, V el volumen de H₂SO₄ (mL) y m la masa de la muestra pesada en base seca (g).

- Si la muestra es líquida:

$$\text{Nitrógeno } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{N \times V \times 14000}{V_m} \quad \text{Ecuación 9}$$

Siendo [N] la concentración de nitrógeno en mg/L y V_m el volumen de muestra (mL).

Estos valores que se obtienen de porcentaje y concentración de nitrógeno se multiplicaron por un factor de conversión nitrógeno/proteínas (N/P) para obtener los

porcentajes y concentraciones de proteínas. Este factor se obtuvo del análisis del perfil de aminoácidos de la biomasa inicial algal utilizada, analizado en el LTI de la universidad y por HPLC; y en nuestro caso fue de 4.34 (Rojo et al., 2021).

3.4.3 Análisis de carbohidratos

El análisis de carbohidratos se realizó por cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) (Wychen & Laurens, 2013a). Para las muestras líquidas, se cogió una muestra por duplicado de cada ensayo directamente con una jeringa, y esta se filtró a través de un filtro de nylon de 0.22 μm para eliminar sólidos que pudieran estropear el equipo, recogiendo esta muestra en un vial de vidrio de 1.5 mL.

Para las muestras sólidas se pesaron aproximadamente 0.3 g de muestra sólida seca en tubos de vidrio altos. A estos tubos se les añadió 3 mL de H_2SO_4 al 72% v/v y se taparon con papel de aluminio. Cuando todas las muestras se encuentran tapadas, se introdujeron en un baño termostático a 30°C durante 1h, agitando cada 10-15 minutos las muestras para favorecer la solubilización de los carbohidratos. Una vez haya pasado ese tiempo, se sacaron las muestras del baño y se traspasaron a botellas de borosilicato de 100mL, añadiendo 84 mL de agua (por lo que la concentración de ácido sulfúrico pasó de un 72% v/v a un 4% v/v).

Cuando todas las muestras estuvieron preparadas en las botellas, se llevaron al autoclave, donde estuvieron 1h a 121°C y 1 bar. Antes de empezar, hay que asegurarse de que el autoclave tiene agua suficiente, que las válvulas de salida estén cerradas y que las tapas de las botellas no estén del todo cerradas para evitar sobrepresión. Pasado ese tiempo, se abrió lentamente la válvula para sacar el vapor y reducir la presión hasta 0 bar. Se dejaron enfriar las muestras para poder manipularlas, y se cogió muestra con una jeringa y se filtraron 2 mL en un vial con un filtro de nylon de 0.22 μm .

Los viales con las muestras se introdujeron en el equipo HPLC (Shimadzu LC-2050C), donde se analizaron las muestras con una columna Aminex HPX-87H y fase móvil de 25 mM de H_2SO_4 (flujo de fase móvil de 0.6 mL/min, temperatura de columna de 60°C). Se obtendrán las concentraciones de carbohidratos como suma de monosacáridos (glucosa, xilosa, arabinosa y celobiosa).

Para poder trabajar con los datos obtenidos en el HPLC, será necesario conocer las curvas de calibrado de cada compuesto que están presentes en las muestras. Estos valores de las curvas de calibrado son los siguientes (Tabla 11):

	Glucosa	Xilosa	Arabinosa	Celobiosa
Pendiente	280023	268509	273072	286547
Ordenada	957.89	991.69	572.12	1803.51
R ²	0.999	0.999	0.999	0.999

Tabla 11. Curva de calibrado del HPLC (Shimadzu LC-2050C).

Estos valores de las curvas de calibrado son con el HPLC Shimadzu LC-2050C (Tabla 11), pero para la fase sólida de las muestras de UAEE a 15 minutos se empleó un HPLC distinto (Waters e2695). Los datos de este HPLC se reflejan en la Tabla 12:

	Glucosa	Xilosa	Arabinosa	Celobiosa
Pendiente	216388	211088	215083	220549
Ordenada	-1034.3	-396.38	-1124.1	-987.65
R ²	0.9999	0.9999	0.9998	1

Tabla 12. Curva de calibrado del HPLC (Waters).

3.4.4 Análisis de lípidos

El análisis de lípidos se realizó a las muestras sólidas y, como el análisis de sólidos, se basó en un método gravimétrico (Lee et al., 2020). Se pesaron 0.1 g de muestra en un Erlenmeyer de 50 mL, y después se le añadió 20 mL de cloroformo: metanol (2:1 v/v) y se taparon con papel de aluminio, para evitar la evaporación de estos solventes orgánicos. Estos Erlenmeyers se introdujeron en una incubadora, donde estuvieron durante 1h a 60°C y con agitación continua a 200 r.p.m. Pasado este tiempo, a los Erlenmeyers se les añadió 5 mL de HCl 0.1M, y se trasvasaron a tubos falcón. Esta suspensión se mezcló bien en el vortex y se centrifugaron durante 10 minutos a 7,800 r.p.m., para posteriormente añadir 1 mL de MgCl₂:6H₂O 0,5% w/v. y volver a centrifugar durante 10 minutos y 7,800 r.p.m.

Tras estos pasos, se pudo apreciar claramente la formación de dos fases diferentes: una completamente transparente y una oscura. La que nos interesa es la oscura, que es donde se encontrarán los lípidos presentes en la muestra. En la fase transparente se encuentran todos aquellos compuestos que no nos interesan. Esta fase se separó de la otra utilizando pipetas Pasteur de vidrio y se introdujo en viales de vidrio, los cuales se llevaron a una estufa a 60°C durante un día para la evaporación del solvente. Estos viales se habrán pesado antes de introducir la muestra, y se pesaron después de que pase el día en la estufa. La cantidad de lípidos presentes en la muestra se determinó con la Ecuación 10:

$$\text{Lípidos (\%)} = \frac{m_{\text{tubo+lipido}} - m_{\text{tubo}}}{m_{\text{real}}} \times 100 \quad \text{Ecuación 10}$$

3.4.5 Análisis de BCA

El análisis de la concentración de péptidos en las muestras de permeado y concentrado de los experimentos de filtración tangencial (apartado 3.3.2) se realizó por el método del ácido bicinconínico (BCA). Para este método se ha utilizado un kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (Fisher Scientific). Este kit consta de dos reactivos, de alta precisión y compatible para la determinación de la concentración de péptidos en diferentes muestras. Los reactivos proporcionan una determinación

precisa de la concentración de péptidos con la mayoría de los tipos de muestras que se encuentran en la investigación de proteínas.

Lo primero que se realizó fue la curva de calibrado empleando como patrón la proteína de albúmina de suero bovino (BSA). Para ello se siguió la siguiente Tabla 13 donde viene como se prepararon los patrones:

Patrón	Volumen agua (μL)	Volumen patrón BSA (μL)	Concentración ($\mu\text{L}/\text{mL}$)
A	0	300 stock	2000
B	125	375 stock	1500
C	325	325 stock	1000
D	175	175 de B	750
E	325	325 de C	500
F	325	325 de E	250
G	325	325 de F	125
H	400	100 de G	25
Blanco	400	0	0

Tabla 13. Concentración para la preparación de la curva de calibración.

El procedimiento tanto para la curva de calibrado como para el análisis de las muestras fue el siguiente:

- Se preparó el Working Reagent (WR) con las disoluciones A y B del kit. Las proporciones de A y B son 50:1 (A:B), y los volúmenes dependen del número de muestras que tengamos por la cantidad que se usa de WR, que en nuestro caso es de 2 mL.
- Se añadió 0.1 mL de muestra y 2 mL de WR en un eppendorf
- Se digirieron las muestras en un digestor a 37°C durante 30 minutos
- Por último, se midió la absorbancia en el espectro UV-Visible a $\lambda=562$ nm que permitió determinar la concentración de péptidos en función de la curva de calibrado obtenida previamente.

3.5. Cálculos para el diseño del proceso

Con los resultados obtenidos en las pruebas realizadas, podemos diseñar un sistema que englobe todo el proceso de extracción (UAEE y filtración). Este proceso se diseñará para el fotobiorreactor situado en las instalaciones de la Universidad de Valladolid. Como base de cálculo, el fotobiorreactor tratará un caudal de purín de 37.77 m³/d (correspondiente a la cantidad promedio de purín generado en dos granjas en explotaciones de nuestra región) diluido un 10%. La biomasa obtenida en este fotobiorreactor irá primero a un reactor encamisado con un ultrasonidos, donde también se añadirá la enzima para llevar a cabo el proceso de extracción. Después del tiempo de hidrólisis, la corriente irá a una centrífuga, donde se separará la fase

sólida y la líquida (hidrolizado), siendo ésta última fase la que nos interesa ya que es donde se encuentran los péptidos recuperados. Por último, el flujo de hidrolizado pasaría por el sistema de membranas, obteniendo al final de este circuito dos corrientes diferentes, un concentrado con alta cantidad de péptidos y un permeado con alta cantidad de carbohidratos. Todo este proceso se puede ver en el P&I que se encuentra en el Anexo 2.

El caudal obtenido en el fotobiorreactor es de 236 m³/d con una concentración de biomasa algal de 2 g/L. Con la concentración y la productividad (16.67 g/m²d) obteniendo un total de 472.12 kg/d de biomasa algal seca, el cual será el empleado en el proceso diseñado en este estudio.

En el trabajo se realizó un estudio más detallado de dos equipos diferentes, como son el reactor de UAEE y el sistema de filtración tangencial teniendo en cuenta los resultados obtenidos a escala de laboratorio. Se han elegido estos dos equipos debido a que son los principales del proceso propuesto.

3.5.1. Gasto energético del ultrasonidos

El equipo de ultrasonidos usualmente es el elemento que más consume energía en todo el proceso de valorización de la biomasa algal (Zhang et al., 2013), por eso es muy importante conocer cuál es el gasto que realiza el equipo a las diferentes amplitudes y a los diferentes tiempos para llevar a cabo un correcto diseño tecno-económico del proceso de extracción completo.

Para ello es necesario calcular el valor de la energía que consume el equipo de ultrasonidos para las distintas amplitudes y tiempo. Este cálculo se realizó utilizando la Ecuación 11:

$$\text{Energía} \left(\frac{\text{J}}{\text{g}} \right) = \frac{P_{\text{media}} \times t \times 60}{m_{\text{ar}}} \quad \text{Ecuación 11}$$

Siendo la P_{media} la potencia promedio en el proceso de extracción con ultrasonidos (W), la cual calculamos utilizando los valores de potencia inicial y final que obtuvimos de un voltímetro; t el tiempo que ha estado en funcionamiento el equipo de ultrasonidos (minutos) y m_{ar} la masa de alga real (g).

3.5.2. Cálculos para el diseño del equipo de UAEE

Para el diseño del equipo de hidrólisis enzimática asistida por ultrasonidos va a ser necesario realizar dos cálculos distintos: uno será la cantidad de enzima necesaria y el otro será el de los flujos de agua para mantener la temperatura de operación en 50°C (que es la empleada en la experimentación). Para calcular la masa de enzimas necesaria, m_e (Ecuación 13), primero hay que saber cuánta masa de biomasa seca, m_b (Ecuación 12), tenemos. Para ello multiplicamos la concentración de biomasa seca, c_{bs} , que es un dato conocido, por el volumen de agua, V_a . Para

calcular la cantidad de enzima necesaria, sería dividir los gramos de biomasa entre cien.

$$m_b = c_{bs} \times V_a \times 1000 \quad \text{Ecuación 12}$$

$$m_e = \frac{m_b}{100} \quad \text{Ecuación 13}$$

Para calcular el flujo de agua que ira por el encamisado será necesario aplicar la ecuación del balance de energía (Ecuación 14):

$$\dot{Q} = \dot{m} \times c_p \times \Delta T \quad \text{Ecuación 14}$$

Siendo la Q el calor transferido (W), la m sería el flujo (g/s), la c_p es el calor específico del agua (4186 J/kg/°C) y ΔT es la diferencia de temperaturas (°C), siendo 27°C la temperatura de entrada al reactor y 50°C la de salida. Este calor se resta al que produce el ultrasonidos y el agitador, para sacar el calor con el que calcularíamos el caudal de agua que ira por el encamisado. La temperatura de entrada del caudal de agua de enfriamiento al reactor será de 15°C y la salida será de 40°C.

El diseño físico del reactor que se utilizará empieza con el cálculo del volumen del reactor. Para ello partimos del volumen de biomasa (5% de suspensión), V_b . Como no se conoce el valor de la altura, H, ni el del diámetro, D, se igualan ambos valores, dejando solo una incógnita. A partir de este volumen, se calcula el volumen del reactor sobredimensionándolo. El porcentaje de sobredimensionado elegido es del 11.11%, por lo que el volumen del reactor V_r será calculado con la ecuación 15:

$$V_r = V_b + V_b \times \% \text{Sobredimensionado} \quad \text{Ecuación 15}$$

Los parámetros de diseño del reactor los calculamos a través de ecuaciones obtenidas en el código ASME Sección VIII, Div.1 (Equipment Costs for Plant Design and Economics for Chemical Engineers – 5th Edition, s. f.). Estos dependen de las temperatura y presión de operación, T_{oper} y P_{oper} (Ecuaciones 16 y 17):

$$T_{diseño} = T_{oper.} + \text{entre 20 y 50}^\circ\text{C} \quad \text{Ecuación 16}$$

$$P_{diseño} = 3.5 \text{ barg ya que } P_{oper.} < 2 \text{ barg} \quad \text{Ecuación 17}$$

El último paso es calcular el espesor de carcasa y de fondo. Para ello es necesario elegir el material que conformará el cuerpo del reactor. Estos materiales y sus características los podemos sacar del código ASME Sección VIII (Equipment Costs for Plant Design and Economics for Chemical Engineers – 5th Edition, s. f.)(Subsection A GENERAL REQUIREMENTS, s. f.). La siguiente ecuación se utilizó para calcular el espesor (Ecuación 18):

$$t = \frac{PR}{SE - 0.6P} \quad \text{Ecuación 18}$$

Siendo P la presión admisible (psi), R el radio interior (in), S la tensión máxima admisible, E la eficacia (igual a 1) y t el espesor mínimo de carcasa (in). A este espesor mínimo le sumaremos un sobreespesor de 0.3 cm para que haya más seguridad en caso de posible corrosión o rotura, por lo que el espesor real será la suma del mínimo y estos 0.3 cm.

La ecuación para calcular el espesor del fondo es bastante parecida a la anterior, pero cambiando el radio interior R por el diámetro interior D (in) (Ecuación 19):

$$t = \frac{PD}{2SE-0.2P} \quad \text{Ecuación 19}$$

Para diseñar el agitador del reactor, primero va a ser necesario elegir el tipo de impulsor que se va a utilizar. Los tres tipos más utilizados son la turbina de disco (Rushton), la turbina de palas planas y la de hélice. El uso de la turbina de hélice sería el más adecuado para nuestro diseño, ya que es el tipo más utilizado en cultivos de células vegetales y no produce un efecto alto de cizalla.

Una vez escogido el tipo de turbina, es necesario calcular el diámetro de la turbina. Este se saca con una relación geométrica que determina que este diámetro, D_a (m), es igual a un tercio del diámetro del reactor.

Para la potencia que será necesaria administrarle se utilizó un factor que es igual a 1 kW/m³ (Pérez et al., 2021).

3.5.3. Cálculos para el diseño del sistema de filtración

Los primeros cálculos que hay que realizar será el porcentaje de retención R, y el de recuperación r (Tsapiuk, 1997). La retención es el porcentaje de péptidos que no han pasado a través de la membrana. Esto se obtiene con los datos obtenidos en los análisis de las pruebas de filtración y sus valores se determinaron con las ecuaciones 20 - 21:

$$R = \left(1 - \frac{C_p}{C_i}\right) \times 100 \quad \text{Ecuación 20}$$

Siendo C_p y C_i las concentraciones obtenidas en el análisis de BCA para la muestra de permeado y la inicial (mg/L), respectivamente.

El siguiente paso es el cálculo de la concentración de péptidos presentes en el caudal inicial (Ecuación 21) y el del permeado, c_p (Ecuación 22). La concentración en la muestra inicial se calculó multiplicando la masa de biomasa seca, m_{bs} , por el porcentaje de péptidos recuperados en la corriente líquida de salida del UAEE (porcentaje para nuestras condiciones óptimas) y dividiendo entre el volumen, V. Por otro lado, la concentración del permeado se obtiene multiplicando el valor de la

concentración de proteínas en la biomasa inicial, c_i , el cual se ha determinado previamente, por un valor de retención, R.

$$c_i = \frac{m_{bs} \times \frac{\%Péptidos}{100}}{V \times 1000} \quad \text{Ecuación 21}$$

$$c_p = c_i \times \left(1 - \frac{\%R}{100}\right) \quad \text{Ecuación 22}$$

Para calcular el caudal de permeado, Q_p (Ecuación 23), necesitamos multiplicar el valor del caudal inicial, Q_i , el cual conocemos, por el porcentaje de recuperación, r. Este valor de r lo obtenemos de dividir un valor de flujo medido de permeado entre el valor del flujo inicial.

$$Q_p = Q_i \times \frac{\%r}{100} \quad \text{Ecuación 23}$$

A través de un balance de materia podemos calcular el valor del caudal de concentrado, Q_c (Ecuación 24) y la concentración de proteínas en el concentrado, c_c (Ecuación 25). En el cálculo se desprecia el posible volumen que pueda quedar retenido en las membranas debido a que al ser tan bajo se puede despreciar:

$$Q_c = Q_i - Q_p \quad \text{Ecuación 24}$$

$$Q_i c_i = Q_p c_p + Q_c c_c \quad \text{Ecuación 25}$$

El último cálculo sería el del área de membrana necesaria a escala industrial (Ecuación 26), A, el cual se calcula dividiendo el caudal de entrada a la membrana entre un valor de flux, J. Este valor de flux se cogió de los resultados obtenidos en las experiencias y se calcula a través de la Ecuación 4.

$$A = \frac{Q_i \times 1000}{J} \quad \text{Ecuación 26}$$

3.5.3 Bombas

Para completar el diseño del proceso, se calculó la energía que será necesaria suministrar a las bombas para que funcionen. Esta potencia, P_b , se mide en kW, y se calculó multiplicando el caudal Q en m^3/s por el incremento de presión Δp (50KPa) y dividiendo por el rendimiento de la bomba (0.7) (Ecuación 27):

$$P_b = \frac{Q \times \Delta P}{0.7} \quad \text{Ecuación 27}$$

4. Resultados experimentales

4.1 Optimización del proceso de extracción con ultrasonidos

4.1.1 Solubilización y recuperación de proteínas

En la Tabla 14 se pueden ver los resultados de solubilización de proteínas en la optimización del proceso de ultrasonidos, junto con las pérdidas de nitrógeno producidas en cada experimento.

Amplitud (%)	Tiempo (min)	% Solubilización P	% Recuperación P	% Pérdidas N
0%	15 min	13.91	13.81	0.1
50%		30.99	27.45	3.5
75%		31.06	26.51	4.5
100%		29.39	25.44	3.9
0%	30 min	19.23	17.83	1.4
50%		40.38	30.01	10.4
75%		36.96	29.73	7.2
100%		33.91	25.98	7.9
0%	60 min	22.82	20.02	2.8
50%		51.04	42.64	8.4
75%		42.75	45.17	-2.4
100%		50.60	42.42	8.2

Tabla 14. Valores obtenidos de solubilización de proteínas y pérdidas de nitrógeno.

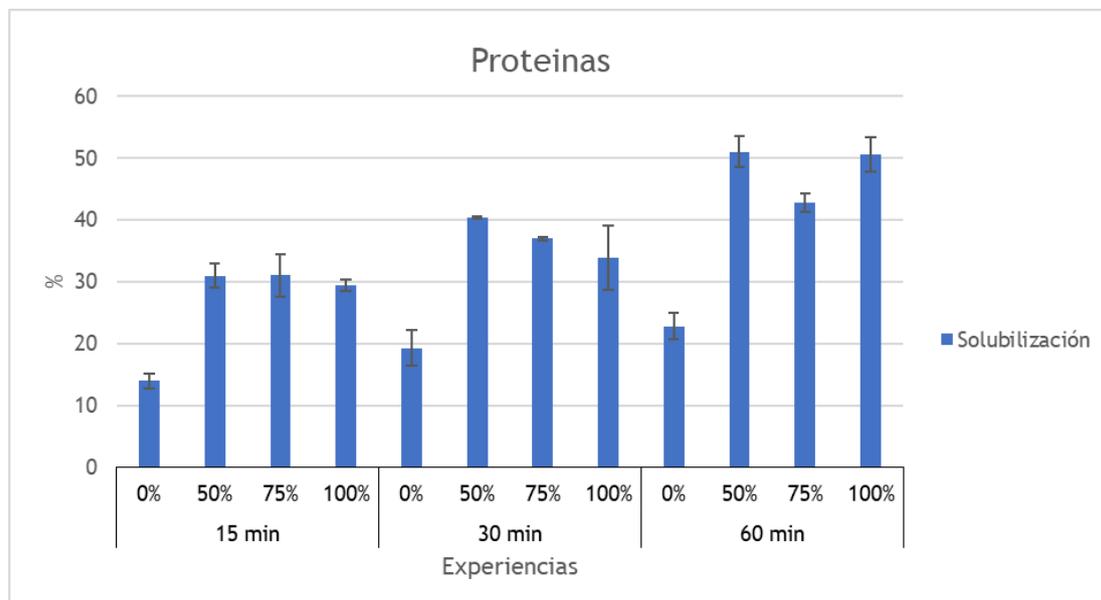


Figura 6. Comparación de solubilización de las proteínas a distintos tiempos y amplitudes.

Como se aprecia en la Figura 6, el porcentaje de solubilización de proteínas aumentó con el tiempo hasta llegar a un máximo de 51% después de 1 hora y empleando una amplitud del 50%. Sin embargo, se puede apreciar que estos rendimientos no aumentaron con el incremento de la amplitud, manteniéndose más o menos constante (en el caso de los experimentos con 30 minutos, el rendimiento fue disminuyendo ligeramente con la amplitud). Esto nos indicó que un aumento de la amplitud no influyó de forma significativa en los resultados, siendo más importante el tiempo de hidrólisis. Por el contrario, Dridi et al. (2021), trabajando con bebidas fermentadas y no fermentadas enriquecidas con proteínas de grillo (un 60% de concentración), y con tres tipos diferentes de enzima: pepsina, tripsina y alcalasa, y el ultrasonido al 70% de amplitud, comprobaron que un aumento del tiempo (en su caso de 10 minutos a 40) no incrementó el valor de la solubilización, siendo suficiente 10 minutos (~22%). En nuestro caso, el aumento del porcentaje de solubilización y de recuperación se debe al tiempo al que el hidrolizado está expuesto al ultrasonido y a la enzima no viéndose influida por la variación en la amplitud. Sin embargo, la combinación de ultrasonidos y enzimas mejoró la extracción de proteínas, ya que los experimentos de control sin US proporcionaron menores rendimientos a los tres tiempos ensayados (13.9%, 19.2% y 22.8%). Similares rendimientos de solubilización fueron obtenidos por Rojo et al. (2021) quienes realizaron la extracción de proteínas de un consorcio de microalgas y bacterias mediante hidrólisis enzimática con Protamex, alcanzando unos rendimientos de ~20% después de 1 hora de proceso a 50°C.

Cuando se compararon los resultados de la filtración de la hidrólisis con UAEE con los de la hidrólisis enzimática se pudo comprobar que con el método UAEE se obtuvieron péptidos de menor tamaño. Esto se debe a que el uso del ultrasonidos rompe las moléculas para producir péptidos más pequeños.

4.1.2 Carbohidratos

Al igual que se ha hecho con las proteínas, se han determinado los rendimientos de solubilización, de recuperación y de pérdidas de carbohidratos, obteniendo los valores indicados en la Tabla 15:

Amplitud (%)	Tiempo (min)	% Solubilización CH	% Recuperación CH	% Pérdidas
0%	15 min	38.53	13.36	25.17
50%		45.94	13.87	32.07
75%		48.72	13.66	35.06
100%		47.03	12.93	34.10
0%	30 min	38.9	13.51	25.39
50%		52.35	14.81	27.55
75%		54.84	15.54	39.29

100%	60 min	54.25	13.52	40.73
0%		43.81	13.69	30.12
50%		62.33	10.27	52.07
75%		58.76	12.11	46.66
100%		60.84	14.51	46.33

Tabla 15. Valores obtenidos de solubilización y recuperación para los carbohidratos.

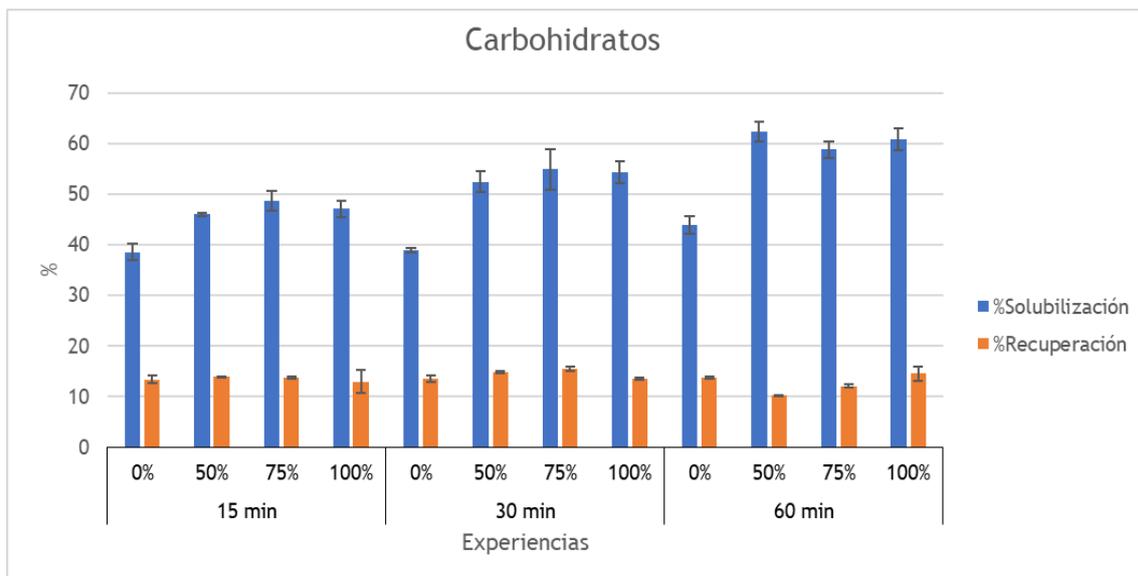


Figura 7. Comparación de solubilización y recuperación de los carbohidratos a distintos tiempos y amplitudes

Como se aprecia en la Figura 7, y al igual que ocurrió con las proteínas, los rendimientos de solubilización de carbohidratos aumentaron ligeramente con el tiempo, alcanzando el valor máximo de 62.3% después de 1 hora y empleando una amplitud del 50% (en estas mismas condiciones se consiguió también la máxima solubilización de proteínas). Nuevamente, el aumento de la amplitud no influyó en la solubilización de carbohidratos obteniendo resultados similares en las 3 amplitudes (~46%, ~53% y ~60% respectivamente). Así mismo, se puede observar como la combinación de enzimas y US sí mejoró la extracción, pero no al mismo nivel que en las proteínas, aumentando los rendimientos de solubilización hasta un 44% en los experimentos de 1 hora. Respecto a la recuperación de monosacáridos, los rendimientos fueron similares y bajos en todos los experimentos (10-15%), no observándose diferencias con el incremento de tiempo y/o amplitud, aunque disminuyó ligeramente en los ensayos de 1 hora, debido a un aumento en el porcentaje de pérdidas por degradación. Rojo et al. (2021) también estudiaron la recuperación de monosacáridos mediante hidrólisis enzimática de un consorcio de microalgas y bacterias obteniendo valores del 20%, un poco mayores que en nuestros experimentos de control sin US.

Teniendo en cuenta todo lo explicado anteriormente, podemos concluir que los mejores resultados que se obtuvieron fueron para la amplitud del 50% y una duración de 60 minutos. Estos valores son los mejores debido a que la solubilización de ambos compuestos es la más alta y serán lo utilizados en el diseño del equipo de ultrasonidos y el hidrolizado empleado en los ensayos de separación por membranas.

4.1.3 Gasto energético del equipo de ultrasonidos

En la tabla 16 se recogen los datos de la potencia al principio y final de las experiencias, y el valor de la energía que se ha obtenido en cada uno de los ensayos. Como se puede apreciar en la tabla, según incrementamos la amplitud, la potencia (y en consiguiente la energía) aumenta, siendo aproximadamente el doble de energía que en 50% para el 100%. Como cabe esperar de la ecuación 11 para el cálculo de la energía, ésta aumenta con el tiempo:

Tiempo (min)	Amplitud	Potencia (W)		Energía (J/g)
		Inicial	Final	
15	50	141.1	121.1	9,345
	75	212	156.6	13,137
	100	334.6	238.4	20,422
30	50	141	116	18,319
	75	204.4	161.6	26,088
	100	325.8	230	39,617
*60	50	134.7	115	59,329
	75	201.1	164.5	86,867
	100	315.5	269.4	138,972

Tabla 16. Consumos de potencia (W) y energía en cada experimento de extracción. *Para los valores a 60 minutos se utilizo distinta cantidad de masa (debido a problemas).

Como hemos elegido para realizar el diseño la amplitud del 50% durante 60 minutos, la energía que va a ser necesaria para el diseño del equipo de extracción con ultrasonidos será de 59,329 J/g.

4.2. Separación de péptidos mediante filtración tangencial

Para la separación de los péptidos de los monosacáridos presentes en el hidrolizado se realizaron tres ensayos, que se reflejaron en la tabla 10.

4.2.1. Membranas microfiltración 0.45, 0.2 y 0.1 μm

Estas membranas se utilizaron para eliminar la mayor cantidad posible de sólidos de gran tamaño, ya que éstos pueden saturar las membranas de ultrafiltración y provocar un aumento de tiempos y menor flujo de permeado. Villacorte et al. (2015) utilizaron tres tipos de algas (*Alexandrium tamarense*,

Chaetoceros affinis y *Microcystis* sp.) y emplearon membranas de microfiltración de 0.4 y 0.1 μm y de ultrafiltración de 100KDa y 10 KDa. Para las membranas de microfiltración, el porcentaje de rechazo de biopolímeros oscilaba entre 14% y 56%, mientras que para las de ultrafiltración estaba entre 83% y 97%. Estos porcentajes nos muestran que los sólidos de gran tamaño quedaron retenidos en las membranas de microfiltración (0.4 y 0.1 μm), consiguiendo un fluido con la menor cantidad posible de sólidos y mejor preparado para el proceso de ultrafiltración.

Para comprobar que en las filtraciones con las tres membranas de poro más grande no se pierden péptidos, en una de las pruebas, se cogieron muestras de los permeados de cada filtración y se analizaron por BCA. Los resultados obtenidos son los siguientes (Tabla 17):

	Absorbancia		Abs. Media	Concent. (ppm)
0.45 μm	0.56	0.54	0.55	437.46
0.2 μm	0.52	0.57	0.54	431.03
0.1 μm	0.53	0.58	0.56	442.90

Tabla 17. Concentraciones de péptidos en los experimentos de microfiltración.

Como se ve, el valor de la concentración casi no varía, lo que demuestra que en estas filtraciones no hemos perdido péptidos durante el proceso y por lo tanto es un proceso necesario para el mejor funcionamiento de la posterior filtración tangencial con membranas de poro más pequeño.

4.2.2. UAEE 50 y 10 kDa

La primera membrana que se ha utilizado en esta prueba es de 50 kDa y después una de 10 kDa. Los resultados de flujo por unidad de área obtenidos para estas membranas son los siguientes (Tablas 18-20). Gráficamente se aprecia mejor que el flujo J disminuye hasta casi volverse lineal al llegar al estado estacionario (Figuras 8, 9 y 10). En estas muestras, que fueron prefiltradas con membranas de 0.45 y 0.2 μm , fue necesario cambiar la membrana de 50 kDa que llegó a taponarse al poco tiempo del inicio en las dos pruebas realizadas. El punto rojo en estas figuras indica el momento en el que se cambió dicha membrana.

Tiempo (min)	Masa permeado (g)	J (kg/h/m ²)	Parámetros	
			Area (m ²)	
0	0.0	25	Area (m ²)	0.00206
10	5.0	14.56	V _o (mL)	200
20	9.1	11.94	V _p (mL)	60
30	12.7	10.49		
34	15.1	6.99		
40	20.7	16.31		
50	28.9	23.88		
60	34.8	17.18		

70	39.9	14.85
80	44.5	13.40
90	49.1	13.40
100	53.3	12.23
110	57.3	11.65
120	60.9	10.49

Tabla 18. Resultados de filtración con membrana 50 kDa, a 2 bar y $1.37 \cdot 10^{-3} \text{m}^3/\text{h}$.

Tiempo (min)	Masa permeado (g)	J (kg/h/m ²)	Parámetros	
0	0.0	25	Area (m ²)	0.00206
10	11.1	32.33	V _o (mL)	190
20	16.9	16.89	V _p (mL)	80
30	21.7	13.98		
40	25.7	11.65		
50	29.6	11.36		
60	33.7	11.94		
70	42.2	24.76		
80	47.2	14.56		
90	52.0	13.98		
100	56.1	11.94		
110	59.8	10.78		
120	70.3	30.58		

Tabla 19. Resultados de filtración con membrana 50 kDa, a 2-3 bar y $1.37 \cdot 10^{-3} \text{m}^3/\text{h}$.

Tiempo (min)	Masa permeado (g)	J(kg/h/m ²)	Parámetros	
0	0.0	25	Area (m ²)	0.00206
10	10.9	31.75	V _o (mL)	80
20	19.0	23.59	V _p (mL)	10
30	26.4	21.55		
40	33.3	20.10		
50	39.8	18.93		
60	45.6	16.89		

Tabla 20. Resultados de filtración con membrana 10 kDa, a 3 bar y $2.19 \cdot 10^{-3} \text{m}^3/\text{h}$.

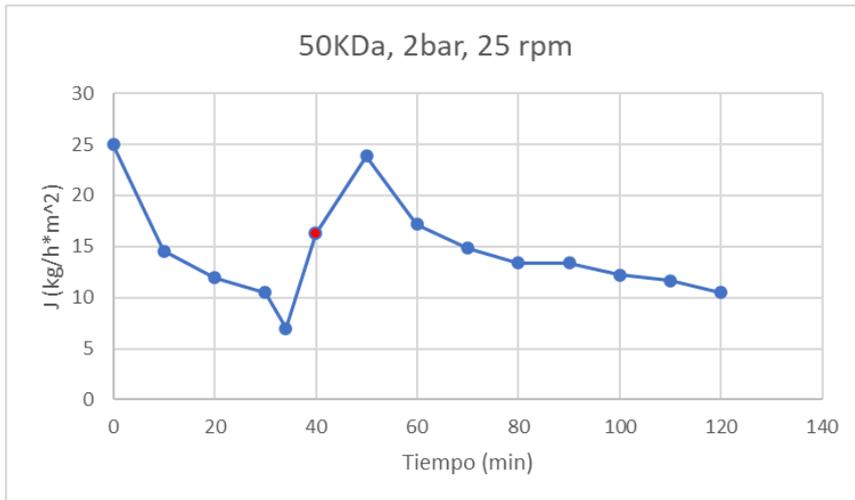


Figura 8. Evolución de J en el tiempo para la membrana de 50 kDa a 2 bar y $1.37 \cdot 10^{-3} \text{m}^3/\text{h}$.

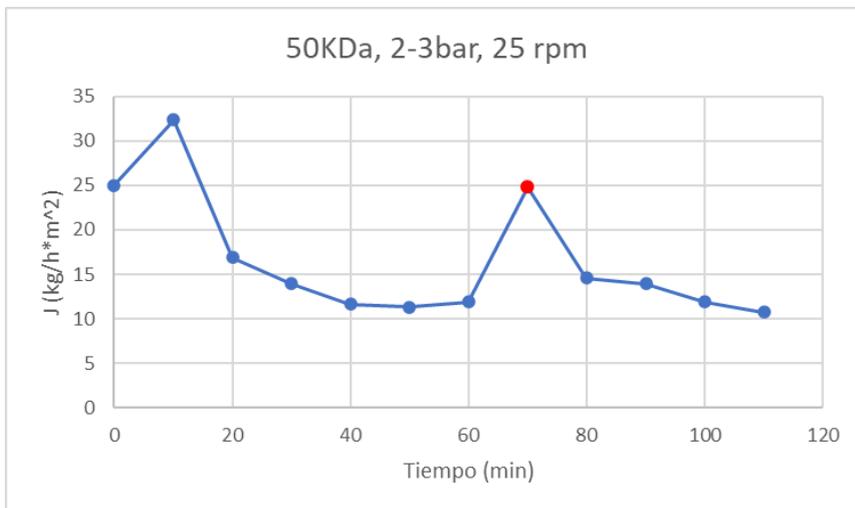


Figura 9. Evolución de J en el tiempo para la membrana de 50 kDa, 2-3 bar y $1.37 \cdot 10^{-3} \text{m}^3/\text{h}$.

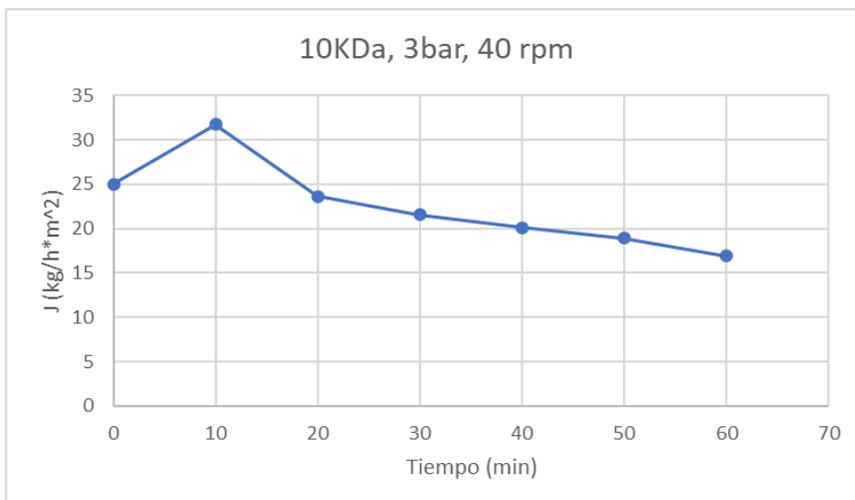


Figura 10. Evolución de J en el tiempo para la membrana de 10 kDa a 3 bar y $2.19 \cdot 10^{-3} \text{m}^3/\text{h}$.

Cada cierto tiempo y volúmenes del permeado durante la filtración, se han cogido muestras del concentrado para analizar por BCA y determinar la concentración de péptidos y si el proceso se está comportando de forma correcta o no (es decir, si el sistema de filtración consiguió o no separar los péptidos de los monosacáridos del hidrolizado). A estas muestras las hemos llamado t_x , siendo X el número de muestra, por ejemplo, la muestra t_0 sería la muestra inicial. También se cogieron muestras del permeado (P) y del concentrado (C) al final del proceso (Tablas 21-23).

50 kDa, 2 bar, 25 r.p.m				
Muestra	Vol. (mL)	Abs. Media	Concent. (ppm)	% Retención
t_0	200	0.437	325.66	9.27
t_1	150	0.446	334.57	
t_2	125	0.440	329.13	
t_3	100	0.472	360.29	
t_4	75	0.452	341.00	
C	-	0.462	350.40	
P	-	0.406	295.49	

Tabla 21. Resultados de concentración de péptidos durante proceso filtración con membrana 50 kDa, a 2 bar.

50 kDa, 2-3 bar, 25 r.p.m				
Muestra	Vol. (mL)	Abs. Media	Concent. (ppm)	% Retención
t_0	190	0.499	387.50	9.83
t_1	150	0.465	353.36	
t_2	125	0.517	404.81	
t_3	100	0.493	381.07	
t_4	75	0.507	395.41	
C	50	0.526	413.71	
P	-	0.461	349.41	

Tabla 22. Resultados de concentración de péptidos durante proceso filtración con membrana 50 kDa, a 2-3 bar.

10 kDa, 3 bar, 40 r.p.m.				
Muestra	Vol (mL)	Abs. Media	Concent. (ppm)	% Retención
t_0	60	0.452	340.50	
t_1	100	0.483	371.17	
t_2	50	0.468	356.33	

t_3	25	0.454	342.48	
C	-	0.468	356.33	
C_1	-	0.449	337.54	
P	-	0.368	257.90	24.26
P_1	-	0.390	279.66	24.65

Tabla 23. Resultados de concentración de péptidos durante proceso filtración con membrana 10 kDa, a 3 bar.

Vemos que la membrana de 50 kDa concentra péptidos, aunque la diferencia de concentración entre el concentrado y la muestra inicial no es muy grande, obteniendo una retención de péptidos de sólo 9.3 y 9.8%. Esto nos indica que hay poca cantidad de péptidos más grandes que el tamaño de poro de esta membrana y que la mayoría son más pequeñas y atraviesan la membrana. Estudios de retención de esta membrana con una solución de polivinipirrolidona, PVP K30 (Penha et al., 2015) proporcionan valores en el rango del 75% al 88%. En nuestro caso, en las dos experiencias la retención es bastante menor, lo que se atribuye a que los péptidos presentes en nuestra muestra son mayoritariamente de tamaño inferior a 50 kDa.

Sin embargo, con la membrana de 10 kDa se obtuvo una retención mayor de hasta el 24%, por lo que podemos intuir es que los péptidos presentes aún son de menor tamaño que el del poro de esta membrana, encontrándose algunas de un tamaño entre 10 y 50kDa. Para este tamaño de poro, el artículo anterior de Penha et al. (2015) nos dio un rango de retención entre 63% y 85%, estando nuestros dos valores otra vez por debajo de estos resultados.

4.2.3 UAEE 50 y 5 kDa

Debido a los problemas de operación, se realizaron nuevos experimentos filtrando con membranas de microfiltración de 0.45, 0.2 y 0.1 μm . El uso de una membrana de microfiltración de 0.1 μm dio los resultados esperados, no llegándose a obstruir las membranas de ultrafiltración en esta nueva serie de experimentos. De la membrana de 5 kDa no se pudo realizar un seguimiento en el tiempo del flujo, debido a la gran velocidad con la que se filtró. Los resultados de flujo por unidad de área obtenidos para esta membrana son los siguientes (Tabla 24) representados en la Figura 11:

Tiempo (min)	Masa permeado (g)	J(kg/h/m ²)	Parámetros	
0	0.0	25	Área (m ²)	0.00206
10	13.6	39.61	V_0 (mL)	200
20	20.5	20.10	V_p (mL)	60
30	26.3	16.89		
40	31.6	15.44		
50	36.4	13.98		

60	40.9	13.11
70	45.2	12.52
75	49.6	12.82
80	53.6	11.65
90	59.1	16.02
100	63.5	12.82
110	67.4	11.36
120	71.1	10.78

Tabla 24. Resultados de filtración con membrana 50 kDa, a 2 bar y $1.37 \cdot 10^{-3} \text{m}^3/\text{h}$.

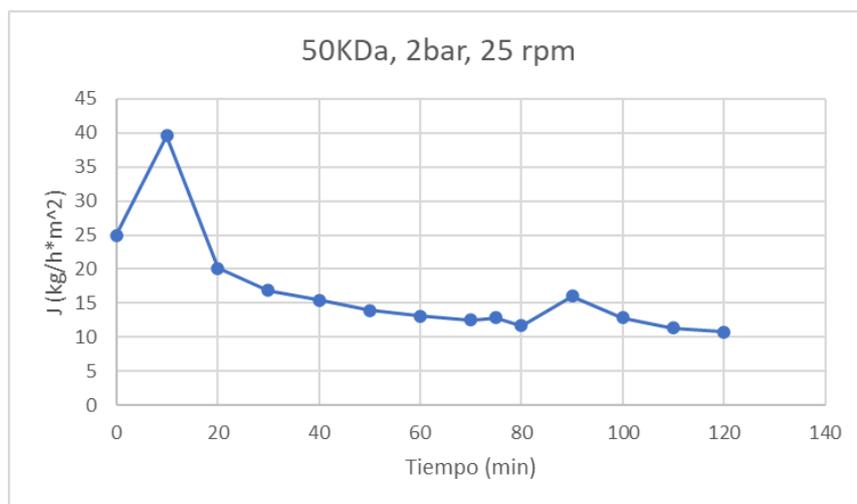


Figura 11. Evolución de J en el tiempo para la membrana de 50 kDa a 2 bar y $1.37 \cdot 10^{-3} \text{m}^3/\text{h}$.

De ambas membranas se tomaron muestras para analizar por BCA, obteniendo los valores de la Tabla 25.

Muestra	Vol (mL)	Abs. Media	Concent. (ppm)	% Retención
0 (50)	165	0.450	338.52	
1 (50)	125	0.444	333.08	
2 (50)	100	0.415	303.90	
3 (50)	75	0.451	340.01	
4 (50)	50	0.451	340.01	
P (50)	80	0.397	286.59	15.34
C (50)	85	0.459	347.43	
1 (5)	40	0.367	256.41	
P (5)	14	0.290	180.24	37.11
C (5)	-	0.416	304.89	

Tabla 25. Resultados de concentración de péptidos durante proceso filtración.

Como en el caso anterior, la membrana de 50 kDa concentra péptidos, ahora algo más eficazmente que en el caso anterior, pero aún con valores de retención

bajos, del 15.3%. En el caso de la membrana de 5 kDa, vemos que sí concentra péptidos, lo que quiere decir que hay péptidos de mayor tamaño que el poro de esta membrana y que en nuestro hidrolizado cierta cantidad de ellas tienen un tamaño entre 5 y 10 kDa. En el artículo de Penha et al. (2015) nos dan un rango para esta membrana de 91%-98%, siendo mucho más pequeño nuestro valor. Esto se puede deber a que el hidrolizado contiene mayoritariamente péptidos de menor tamaño de poro que el de la membrana (tal y como se indicó en el anterior experimento) mientras que estos autores emplearon unos hidrolizados sintéticos con moléculas de mayor tamaño.

4.2.4 Prueba control sólo hidrólisis enzimática

En esta prueba se trabajó con un hidrolizado a partir de una hidrólisis enzimática sin asistencia de ultrasonidos como control. Cabe esperar que, sin bien la concentración de péptidos es más baja, su tamaño debiera ser mayor y, por tanto, más fáciles de separar. El hidrolizado enzimático se prefiltró por las membranas de 0.45, 0.2 y 0.1 antes de pasar por las membranas de ultrafiltración. La primera membrana que se ha utilizado en esta prueba es de 50 kDa y después una de 30 kDa. De la membrana de 30 kDa no se pudo realizar un seguimiento en el tiempo del flujo, debido a la gran velocidad con la que se filtró (lo que significó que los péptidos presentes tenían un tamaño mucho menor). Como se realizaron tres ensayos en la membrana de 50 kDa, se nombrarán Ensayo Control 1, 2 y 3. Los resultados de flujo por unidad de área obtenidos para esta membrana son los siguientes (Tablas 26 - 28) representándose gráficamente en las Figuras 12 y 13:

Tiempo (min)	Masa permeado (g)	J (kg/h/m ²)	Parámetros	
0	0.0	25	Area (m ²)	0.00206
10	7.7	22.43	V _o (mL)	325
20	13.5	16.89	V _p (mL)	30
30	18.2	13.69		
40	22.5	12.52		
50	26.6	11.94		
60	30.1	10.19		

Tabla 26. Resultados de filtración con membrana 50 kDa, a 3-4 bar y $1.37 \cdot 10^{-3} \text{m}^3/\text{h}$ (Ensayo Control 1).

Tiempo (min)	Masa permeado (g)	J (kg/h/m ²)	Parámetros	
0	0.0	25	Area (m ²)	0.00206
10	8.3	24.17	V _o (mL)	250
20	14.0	16.60	V _p (mL)	30
30	18.7	13.69		
40	23.9	15.15		

50	26.7	8.16
60	30.3	10.49

Tabla 27. Resultados de filtración con membrana 50 kDa, a 3-4 bar y $1.91 \cdot 10^{-3} \text{m}^3/\text{h}$ (Ensayo Control 2).

Tiempo (min)	Masa permeado (g)	J(kg/h/m ²)	Parámetros	
0	0.0	25	Area (m ²)	0.00206
10	7.4	21.55	V _o (mL)	220
20	12.0	13.40	V _p (mL)	18.5
30	16.0	11.65		
37	18.7	7.86		

Tabla 28. Resultados de filtración con membrana 50 kDa, a 3-4 bar y $1.91 \cdot 10^{-3} \text{m}^3/\text{h}$ (Ensayo Control 3).

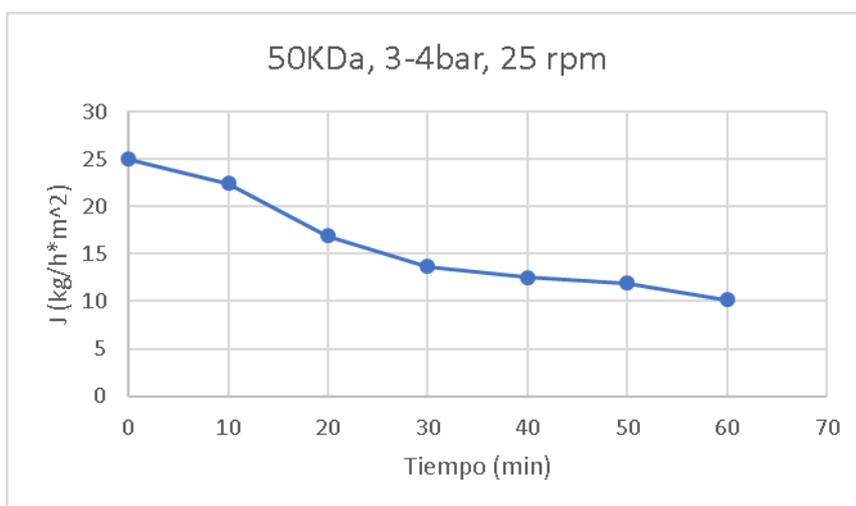


Figura 12. Evolución de J en el tiempo para la membrana de 50 kDa, 3-4 bar y $1.37 \cdot 10^{-3} \text{m}^3/\text{h}$ (Ensayo Control 1).

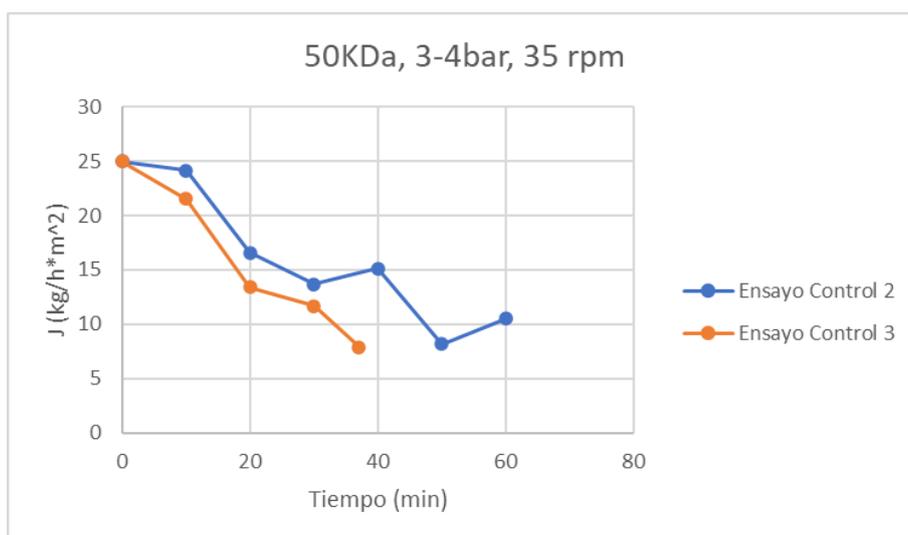


Figura 13. Evolución de J en el tiempo para la membrana de 50 kDa a 3-4 bar y $1.91 \cdot 10^{-3} \text{m}^3/\text{h}$ (Ensayos Control 2 y 3).

Los análisis de BCA dieron los siguientes resultados de concentración de proteínas en las muestras obtenidas durante la filtración (Tablas 29 y 30):

Muestra	Vol (mL)	Abs. Media	Concent. (ppm)	% Retención
O	325	0.279	169.35	36.80
P	30	0.216	107.03	
C	250	0.308	198.04	

Tabla 29. Resultados de concentración de proteínas durante proceso filtración (Ensayo Control 1).

	Muestra	Vol (mL)	Abs. Media	Concent. (ppm)	% Retención
Membrana 50 kDa Ensayo Control 2	0	250	0.290	180.24	22.78
	1	200	0.293	183.70	
	P	30	0.248	139.18	
	C	175	0.317	207.44	
Membrana 50 kDa Ensayo Control 3	2	150	0.335	225.25	36.67
	C ₂	125	0.329	219.31	
	P ₂	20	0.252	142.64	
Membrana 30 kDa	O	80	0.251	142.15	17.75
	C	10	0.233	124.34	
	P	40	0.226	116.92	

Tabla 30. Resultados de concentración de proteínas durante proceso filtración (Ensayos Control 2 y 3).

Se aprecia que la membrana de 50 kDa concentra proteínas, lo que demuestra la presencia de proteínas de un tamaño mayor que el tamaño de poro de esta membrana. Los valores de retención de las pruebas de 50 kDa comparados con los valores de los apartados anteriores muestra que estos valores son mayores. Esto se debe a que, al no haberse aplicado ultrasonidos que rompa las moléculas, hay proteínas de mayor tamaño. La membrana de 30 kDa concentra poco, por lo que las proteínas resultantes mayoritariamente serán más pequeñas que el tamaño de poro de la membrana.

Con los datos que se ha obtenido se ha decidido diseñar un sistema de filtración formado en dos etapas: prefiltración y ultrafiltración con una membrana de 50 kDa. Se ha elegido esta membranas debido a que con ella se ha obtenido resultados prometedores. Aunque los valores de retención de la membrana de 50 kDa no son muy altos, se ve que concentra, por lo que sí se incluye en el sistema se evitará que las membranas de 10 kDa y 5 kDa se obstruyan.

5. Diseño proceso global

El diseño global del proceso estudiado se engloba en el P&ID del Anexo 1. En este P&ID se representa todo el proceso que tendrá la planta, desde la entrada de la biomasa hasta la separación de las proteínas. El proceso comienza con la corriente 1 de biomasa algal, que es la entrada de materia prima del reactor (R-100). Junto a la corriente 1, entra la corriente 1', que es la de enzimas. Por otro lado, las corrientes 2 y 3 forman un circuito cerrado, y será el flujo de refrigeración del reactor para mantener una temperatura constante de trabajo (50°C). La corriente 4 es la que sale del reactor una vez finalizado el proceso de extracción con ultrasonidos. Esta irá directa a la centrifugadora (C-100), que tras 10 minutos de funcionamiento nos dará dos corrientes diferentes: una que contendrá los sólidos residuales, que será la corriente 5, y la corriente líquida de hidrolizado de interés, que es la corriente 6.

La corriente 6 todavía contendrá una pequeña cantidad de sólidos, ya que la eficacia de la centrifugadora es del 95%, por lo que habrá que someter a esta corriente a una prefiltración. Antes de entrar al sistema de prefiltración, el hidrolizado irá a un tanque de almacenamiento (T-200), ya que el uso de un tanque nos ayuda a prevenir que el hidrolizado vuelva a la centrifugadora en caso de que el flujo no pueda atravesar la membrana o se acumule. La corriente 7 es la corriente de salida del tanque y que irá a la prefiltración de 0.1 μm (PF-200). Esta corriente será del mismo valor que la corriente 6. De la prefiltración obtenemos dos corrientes: la corriente 8, que será la corriente por la que saldrán los sólidos que no se fueron en la centrifugación previa; y la corriente 9, limpia de sólidos y con los péptidos de nuestro interés. El último paso es la ultrafiltración, que se realizará con una membrana de 50 KDa (M-200). Al igual que en la prefiltración, el hidrolizado irá antes a un tanque de almacenamiento (T-201) para evitar problemas de funcionamiento del proceso. La corriente 10 es la corriente de entrada a la membrana, la cual nos dará dos corrientes: la de permeado (corriente 14) y la de concentrado (corriente 11). La corriente 11, la cual contienen una elevada concentración de proteínas, nos dará también dos corrientes: una de purga (corriente 12) que será nuestro producto, y la corriente 13, que se recircula al tanque de almacenamiento ya que el sistema de ultrafiltración funciona de forma continua como un circuito cerrado, tal y como se explicó anteriormente.

Finalmente, la corriente 15 es la corriente de limpieza de la membrana de ultrafiltración. Este flujo se realiza a contracorriente, y tendrá el mismo valor de flujo que la corriente 7. Para impulsar este flujo se utilizará la misma bomba que la que se utiliza en la corriente 10.

6. Diseño del proceso de extracción y filtración

La planta que se va a diseñar funcionará siguiendo un proceso Batch o por lotes, realizándose 7 cargas diarias. Ésta estará en funcionamiento un total de 251 días al año, que son los días laborales presentes en un año.

6.1 Ultrasonidos e hidrólisis enzimática

Con los datos obtenidos en el laboratorio se puede decidir que amplitud debería tener el ultrasonidos y el tiempo de aplicación de este. En esta parte también es necesario calcular la cantidad de enzima necesaria para la hidrólisis. Aplicando las Ecuaciones 12 y 13, nos da que el flujo másico es de 472.12 kg/d de alga seca y que la masa de enzimas necesaria es de 4.72 kg/d.

Los mejores resultados en laboratorio se han obtenido para valores de amplitud del 50% y un tiempo de hidrólisis de 1 h. Estos valores se han obtenido para un valor constante de frecuencia de 20 Hz y una temperatura constante de 50°C. El flujo másico de biomasa debe entrar al reactor con una concentración del 5% ($W/W_{\text{biomasa seca}}$) que es la misma empleada en los experimentos en el laboratorio. Teniendo en cuenta esto, el caudal total a tratar será de 9.45 m³/d y el reactor será de 1.35 m³, de forma cilíndrica con encamisado y de acero al carbono SA-515. Con el sobredimensionado del $\approx 11\%$ se obtiene un volumen final de reactor de 1.5 m³. La altura y el diámetro para este volumen es de 1.24 m. Las condiciones de diseño y operación se recogen en la tabla 31:

P_{operacion}	0	Barg
T_{operacion}	50	°C
P_{diseño}	3.5	Barg
T_{diseño}	100	°C

Tabla 31. Condiciones de operación y diseño del reactor.

Una vez elegido el material del reactor, y conociendo sus características podemos calcular los espesores de la carcasa y del fondo (Tablas 32-33):

S	13700	Psi
P	14.7	Psi
R	24.41	in
T	0.026	in
	0.066	cm
Sobrespesor	0.3	cm
t real	0.37	cm

Tabla 32. Características del material y espesor de la carcasa.

S	13700	Psi
----------	-------	-----

P	14.7	psi
D	40.94	in
T	0.026	in
	0.066	cm
Sobrespesor	0.3	cm
t real	0.37	cm

Tabla 33. Características del material y espesor del fondo.

El agitador del reactor estará compuesto por una turbina de tipo hélice (3 aspas). El diámetro de esta turbina será igual a 0.41 m. Al ser un reactor de 1.5 m³ de volumen, la potencia que consumirá será de 1.5 kW.

El encamisado del reactor tendrá las mismas condiciones de operación que el reactor (Tabla 31), ya que el máximo valor de temperatura será el del reactor. El espesor del encamisado también será el mismo que el del reactor, ya que por él solo circula agua.

Es necesario saber el caudal de agua que tendrá que utilizarse para mantener el hidrolizado a 50°C y que no suba de esa temperatura. El caudal de biomasa es de 9.45 m³/d a temperatura ambiente (27°C), por lo que aplicando la Ecuación 14, y queriendo mantenerlo a 50°C, obtenemos un flujo de calor (Q) de 10.52 kW. El calor cedido por el ultrasonidos será igual a la energía necesaria que escogimos en el apartado 4.1.3, que es 59329 J/g, por la cantidad de biomasa seca, que es un flujo másico de 472.12 kg/d. El valor de energía consumida por el sistema de ultrasonidos es igual a 1.11 MW, que sumándole la potencia del agitador y restando el anterior flujo de calor obtenemos un flujo de 1.10 MW, que será el que determinará el flujo necesario de agua del encamisado. Para una temperatura de agua de 15°C y suponiendo que a la salida salga a 40°C, obtenemos un flujo de agua necesario de 37.93 m³/h. Tras este proceso, el fluido que se ha obtenido pasará a una centrífuga donde se separará la fase sólida residual del hidrolizado líquido.

Para calcular el coste económico de operación del equipo de ultrasonidos se tendrá en cuenta el precio de la electricidad en el primer semestre de 2022, el cual se situó en 0.15 €/kWh (*EL PRECIO DE LA ELECTRICIDAD EN ESPAÑA*, s. f.) y el tiempo de trabajo, que son 7 horas al día (7 cargas). El coste en agitación del reactor será 1.58 €/d (395.33 €/año), mientras que el coste de operación del ultrasonicador será 1,167.10 €/d (292,942.15 €/año). Por lo tanto, el coste total de electricidad del equipo completo de hidrólisis será 1,168.68 €/d (293,337.48 €/año). Por otro lado, el coste de enfriamiento se calculó a partir del flujo de agua necesario y el coste de agua de enfriamiento, que es de 0.06 €/m³ (Pérez et al., 2021), obteniendo un coste total 9.10 €/d (3,320.45 €/año).

La cantidad de la enzima que se utiliza es igual 4.72 kg/d, lo que será un total de 1,722.8 kg/año. El precio de la enzima es de 10 €/kg (Romero-García et al., 2022), por lo que el coste total será 47.2 €/d (11,847.20 €/año).

El coste del reactor se ha realizado con un simulador de costes de equipos (*Matches' 275 Equipment Cost Estimates.*, s. f.), el cual dándole los datos de nuestro reactor nos da un precio de 55,200.00 \$ en 2014. Ahora debemos tener en cuenta la inflación (17.51%) para obtener el coste en 2022. El valor que obtenemos es 64,865.515 \$, que en euros es 58,968.65 € (1 € = 1.10 \$). El coste del ultrasonificador se calculó a partir del coste del reactor, siendo un 25 % del valor del reactor (Adeyi et al., 2021), por lo que el coste total del equipo sonicador será de 14,742.16 €. El coste de la inversión total para el reactor junto al ultrasonidos será 73,710.82 €.

Para la centrífuga nos vamos a basar en una centrífuga de disco de la marca Flottweg (*CENTRÍFUGA DE DISCOS FLOTTWEG AC*, n.d.). Para nuestro caso nos vale el modelo AC1000. Esta tiene una capacidad de 10,000 L/h (con esta capacidad se puede centrifugar en 10 minutos la suspensión) consiguiendo una separación del 95% a una concentración de 90 g/L. Su potencia de motor es de 5.5 kW, por lo que el gasto energético sería de 0.825 €/h o 0.014 €/minuto, ya que nosotros sólo la vamos a utilizar 10 minutos. Sabiendo esto obtenemos un gasto de 0.96 €/d (241.59 €/año). Basándonos en los datos de esta centrífuga, y en (*Matches' 275 Equipment Cost Estimates.*, s. f.), obtenemos un valor de 123,300.00 \$ en 2014, que en la actualidad serían 131,718.03 €.

El coste de las bombas depende de la potencia de éstas. Habrá un total de 5 bombas: dos que tendrán un caudal de 9.442 m³/d (entrada y salida reactor); dos que tendrán un caudal de 6.453 m³/d (salida de centrifugadora y entrada a prefiltración) y otra que tendrá un caudal de 11.688 m³/d, que será la que entre a la membrana de ultrafiltración. La potencia total que consumen las bombas es de 0.126 kW, por lo que el coste será de 0.13 €/d (33.24 €/año). Los costes de los equipos se calcularon con (*Matches' 275 Equipment Cost Estimates.*, s. f.), obteniendo un total de 5,020.88 €.

6.2 Sistema de filtración

En la centrífuga se obtienen dos corrientes: una líquida que será la que vaya al sistema de filtración, y una sólida, la cual desecharemos o será aprovechada en otros procesos ajenos al nuestro (como digestión anaerobia).

El sistema de filtrado estará dividido en dos partes: la primera será la formada por la membrana de microfiltración (0.1 µm). Esta se encargará de que posibles sólidos grandes que no se hayan conseguido separar en la centrifugación no pasen a la membrana de ultrafiltración y la bloqueen. Como hemos comprobado, en esta

parte del filtrado no se pierden proteínas. En esta membrana la presión necesaria no es muy elevada (1-2 bar), ya que el tamaño de poro es grande.

La segunda parte del proceso estaría formada por la membrana de ultrafiltración. La entrada a la membrana de ultrafiltración es 11.688 m³/d. Con los resultados obtenidos se decidió coger la membranas de tamaño de poro de 50 kDa.

Antes de entrar a ambas membranas, las corrientes irán a tanques de almacenamiento. Estos serán tanques cilíndricos de acero inoxidable y tendrán un volumen de 2.5 m³. El coste de ambos es de 28,629.71 € (*Matches' 275 Equipment Cost Estimates.*, s. f.).

Para la membrana de 50 kDa partimos del anterior flujo con una concentración de proteínas inicial de 13.259 g/L. Se ha utilizado el valor de retención obtenido en la Tabla 24, y el valor de flux de la Tabla 24 a 20 minutos, ya que a ese tiempo la presión no variaba tanto y la membrana funcionaba correctamente. Los valores obtenidos son los siguientes (Tabla 34):

Retención Péptidos	15.34 %
Retención Monosacáridos	15 %
Porcentaje Purga	10 %
Flux	20.1 kg/m ² /h
Caudal permeado	5.84 m ³ /d
Caudal purga	0.58 m ³ /d
Área	41.53 m ²

Tabla 34. Valores calculados para la membrana de 50 kDa.

El flujo total que se saca del sistema en la purga es igual a 0.58 m³/d con una concentración de péptidos de 17.49 g/L.

Para los costes de membrana, según el artículo Pérez et al. (2022) el coste de las membranas es de aproximadamente 50 €/m². Con un área de 41.53 m², obtenemos un coste de membranas 2,076.72 €. El tiempo de vida de las membranas está entre 3 y 5 años (*Bbagua | Especialistas en tratamientos de Agua*, s. f.) s, por lo que para 10 años el coste sería de 4,153.44 €. Hay que tener en cuenta, que es necesario disponer también del equipo de ultrafiltración donde colocar las membranas y que éstas deben cambiarse y/o limpiarse cada cierto tiempo. El coste de este equipo se determinó a partir de los datos proporcionados por Slegers et al. (2020), obteniendo un coste total de 72,645.01 €, por lo que el coste total del sistema de ultrafiltración será de 76,798.45 €.

6.2.1 Presión

La presión es un parámetro muy importante y que nos ha dado muchos problemas durante las pruebas, debido a que el equipo era experimental y al poco

de que se alcanzara una presión mayor de 2 bar las tuberías cedían. La ultrafiltración se basa en hacer pasar las moléculas por una membrana a través de someter la solución a presión. Es obvio que cuanto mayor sea la presión que apliquemos, mayor velocidad de filtrado habrá. Es conveniente trabajar en un rango de presiones entre 2 y 6 bar, para que la filtración sea lo más rápida posible y disponer de un buen sistema de control que regule este parámetro.

6.2.2 Limpieza de membranas

La suciedad es un factor muy importante que hay que tener en cuenta, ya que afecta en gran medida a la filtración. Como hemos visto en los cálculos, el flujo va disminuyendo hasta casi hacerse estable. Esto se debe a la formación de una torta en la superficie de la membrana, la cual está formada por aquellos sólidos que tienen un tamaño superior al del poro. Esto es un problema, ya que, si se forma la torta, los poros de la membrana quedarán bloqueados y el tiempo de filtrado aumentaría. Para evitar estas situaciones existen métodos físicos y químicos para eliminar esta torta y que la membrana se pueda volver a utilizar.

- **Físico (“Backflushing”)**: Este método consiste en invertir el flujo de permeado, provocando que la torta se desprenda de la membrana. Existen tres tipos de “backflushing” dependiendo de la frecuencia y la intensidad de la inversión de flujo. El primero sería el “backwash”, el cual se hace uno o dos segundos cada pocos minutos; el segundo sería el “backpulse”, que se hace con mayor frecuencia e intensidad, y por último está el “backshock”, que es el más agresivo y se trata de invertir el flujo cada pocos segundos y durante menos de un segundo.
- **Químicos**: Consiste en lavar la membrana con algún producto químico. Es un método efectivo pero su uso provoca el acortamiento de la vida útil de la membrana. Dentro de este encontramos dos métodos:
 - **CEB (“Chemical Enhanced Backwash”)**: Este método es un lavado a contracorriente mejorado químicamente. Consiste en añadir al agua de lavado un producto químico de limpieza para el filtrado, aumentando de esta manera la efectividad de la limpieza.
 - **CIP (“Cleaning unplace”)**: Se usa cuando el método anterior no es efectivo. Consiste en introducir una solución química en el equipo y tenerlo apagado durante un largo tiempo.

Para la prefiltración será mejor un método físico, ya que permitirá durante el mismo proceso que los sólidos se suelten de la membrana. Este cambio de sentido la puede realizar la misma bomba, y nos basta con usar el método “backwash”.

Para nuestra membrana de ultrafiltración se ha escogido el método CEB, ya que para nuestro caso bastaría con este. Este proceso de limpieza se aplicará cada 15 días, ya que un uso excesivo acortaría la vida útil de la membrana, con un caudal

de 0.02 m³/min durante 10 minutos y una presión de 2 bar. Como producto químico para la limpieza se emplea NaOH 0.1 M al que hay que diluir para conseguir NaOH 0.01 M, que tiene un pH de 12. En total se necesitan 3400 L/año de la disolución, lo que serían 340 L/año de NaOH 0.1 M, y 3.06 m³/año de agua. El coste del NaOH 0.1M es de 119.50 € los 10 L (*Sodium Hydroxide 0.1 mol/L 0.1 N CAS 1310-73-2 - PanReac AppliChem, s. f.*) y el del agua es el mismo que el que se ha utilizado para el agua de refrigeración. El coste total será de 4,063.18 €/año.

7. Balance Económico

Una vez se han obtenido los costes individuales de cada equipo diseñado, se realizó un estudio de la viabilidad económica de la planta (Gómez Diente, 2020).

7.1 Coste total de la planta

El coste total de la planta, C, se puede obtener a través del método de Lang. Este coste se obtiene de multiplicar la suma del coste de los equipos, E, por un factor determinado. En nuestro caso, la planta trabaja con un flujo formado por sólidos y líquidos, por lo que el factor de Lang, F, será igual a 4.74 (Ecuación 28):

$$C = F \cdot \sum E \quad \text{Ecuación 28}$$

Costes Reactor + Ultrasonidos	73,710.82 €
Costes sistema de ultrafiltración	76,798.45 €
Coste Centrífuga	131,718.03 €
Coste Bombas	5,020.88 €
Coste Tanques	28,629.71 €
Factor de Lang	4.74
Coste total	1,497,261.18 €

Tabla 35. Resumen de costes de inversión de la planta.

Por lo tanto, según el método de Lang, nuestro coste de inversión será de 1,497,261.18 € (Tabla 35).

7.2 Análisis de la viabilidad y sensibilidad económica de la planta

Para conocer la viabilidad económica de la planta, se partirá de la inversión inicial obtenida en el apartado anterior y se deberán determinar los costes de operación de la planta. En la tabla 36 se recogen los costes energéticos anuales, de materia prima y de personal. También en esta tabla incluimos las ganancias que generará esta planta con la venta del hidrolizado con péptidos.

Coste energético	293,611.54 €/año
Coste materia prima	138,307.17 €/año
Coste de personal	24,193.89 €/año
Ganancias anuales	513,385.82 €/año

Tabla 36. Resumen de costes y ganancias de la planta.

El coste de la producción de biomasa es de 1 €/kg, por lo que para un caudal de 472.12 kg/d se obtiene un coste de 472.12 €/d (118,502.12 €/año) (Romero-García et al., 2022). A este valor se le suma el del agua y el de la enzima, dando el coste total de la materia prima.

El personal que se dedicará a este proceso será ya alguien que trabaja en dicha planta, por lo que solo se tiene en cuenta en este caso una subida de sueldo. Un operario de planta tiene un sueldo base promedio de 10.33 €/h en España (*Sueldo*

de Operario/a de planta en España, s. f.). Para el coste total real será necesario añadir un tercio de este valor, es decir, 3.44 €/h, por lo que el coste de personal será de 13.77 €/d (24,193.89 €/año).

El producto de la planta diseñada es el hidrolizado con un concentrado de péptidos del 17.5 g/L procedente de las algas, las cuales pueden alcanzar un precio de 3.5 €/kg (Romero-García et al., 2022). Con este dato se obtiene una ganancia de 2,045.36 €/d (513,385.82 €/año).

En este punto se calculará el VAN (valor actual neto), que indica la rentabilidad del proyecto a partir del análisis de flujo de caja, y el TIR (tasa interna de retorno), que nos indica el porcentaje cuando el VAN vale cero.

Calculando el VAN con una tasa de retorno del 8%, y el TIR con una estimación del 10% (Gómez Diente, 2020), obtengo los valores de la tabla 37:

VAN	-1,112.95 K€
TIR	-15%

Tabla 37. VAN y TIR del proyecto.

Como se puede observar, se ha obtenido un VAN y un TIR negativo, lo que indica que no es viable. Por lo tanto, sería necesario una mayor optimización del proceso para disminuir los costes o determinar el precio mínimo de venta del producto con la ecuación 29 (González-Viar et al., 2016):

$$\text{Precio mínimo } \left(\frac{\text{€}}{\text{L}}\right) = \frac{r \times (1+r)^t}{(1+r)^t - 1} \times \text{Inversión} + \text{Costes de operación} \quad \text{Ecuación 29}$$

donde r es la tasa de retorno (%) y t el tiempo de vida del proceso (10 años). Sustituyendo todos los parámetros se obtiene un precio mínimo de venta de 4.64 €/L, cercano al obtenido por Romero-García et al. (2022), con el cual se obtienen unos valores de VAN y TIR indicados en la Tabla 38:

VAN	9,087.07€
TIR	8%

Tabla 38. VAN y TIR del proyecto.

En este caso, tanto el VAN como el TIR son positivos, lo cual indicaría que el proceso es viable económicamente si el precio de venta del producto es de 4.64 €/L.

Este precio mínimo de venta se puede disminuir optimizando el proceso (menores costes energéticos, mayores rendimientos de extracción, etc...). Otro punto para tener en cuenta son los residuos sólidos obtenidos en el proceso de extracción asistida con ultrasonidos. Estos contienen péptidos y monosacáridos residuales, por lo que podemos utilizarlos para la producción de biogás o biofertilizante, obteniendo así unas ganancias adicionales y alcanzando un proceso de valorización integral de la biomasa algal, lo cual es la base de la biorrefinería y la economía circular.

También se puede tener en cuenta la corriente de monosacáridos y aminoácidos a la salida de la filtración. Al contener elevadas concentraciones de estos compuestos, se puede aprovechar para otros procesos, como la producción de biogás.

8. Estudio Ambiental

8.1 Objetivos

El objetivo de este apartado es determinar los aspectos ambientales asociados a la planta y asegurar que estos se tienen en cuenta en la definición de los objetivos ambientales.

El diseño del proceso debe tener en cuenta todas las posibles fuentes de contaminación y, cuando sea posible, la selección de los procesos que eliminen o reduzcan esta generación de residuos (Rojo, 2015).

8.2 Aspectos ambientales e impactos asociados

En este documento se estudian los siguientes efectos ambientales y se analiza su impacto medioambiental:

- Residuos sólidos
- Residuos líquidos
- Ruido

8.2.1 Residuos sólidos

Un residuo sólido es cualquier material que procedente de un proceso de fabricación, transformación, utilización, consumo o limpieza, tiene como destino ser desechado. Tienen difícil eliminación y muchos de ellos no se descomponen o tardan mucho tiempo en hacerlo.

En este proceso, los sólidos emitidos al medio ambiente son aquellos que provienen de la centrifugación empleada en la posterior separación de la suspensión obtenida tras el proceso de UAEE y los que provienen de la prefiltración, que son aquellos que no se han conseguido separar en la centrifugación. Estos sólidos contienen péptidos y monosacáridos, además de posibles restos de enzimas.

Impacto ambiental asociado:

Si no se gestionan de forma correcta, pueden provocar grandes impactos. Por ejemplo, pueden contaminar las aguas subterráneas y del suelo, deterioro del paisaje y malos olores.

Por lo tanto, estos sólidos deben gestionarse de forma adecuada siguiendo la legislación vigente. Algunas opciones son la recogida selectiva o el compostaje de la materia orgánica con el fin de valorizar los nutrientes remanentes.

Estos sólidos al ser ricos en péptidos y monosacáridos se pueden utilizar en la producción de biogás, lo que nos daría también un aumento de ganancias.

Legislación:

- Directiva 75/442/CEE, sobre residuos (DOCE L 194, de 27/05/1975)
- Directiva 91/156/CEE, reforma (DOCE L 78, de 26/03/1991)
- Ley 22/2011, de 28 de Julio de residuos y suelos contaminados (BOE nº181, de 29/07/2011)

8.2.3 Residuos líquidos

Consiste en los vertidos de agua ya tratados en el proceso. En este caso, la única corriente que se vierte hacia el medio es la corriente residual que se genera en la limpieza de la membrana.

Impacto ambiental asociado:

El agua que se vierte hacia el medio ambiente no tiene un impacto negativo siempre y cuando sus propiedades físico-químicas se encuentren por debajo del límite establecido por la directiva 91/271:

DQO < 125 mg/l

DBO < 25 mg/l

TSS < 35 mg/l

TP < 2 mg/l

TN < 15 mg/l

Siendo el DQO la demanda química de oxígeno; DBO la demanda biológica de oxígeno; TSS los sólidos suspendidos totales; TP el fosforo total y TN el nitrógeno total.

Legislación:

- Directiva 91/271/CEE, relativa al tratamiento de aguas residuales urbanas (DOCE L 135 de 30/5/91).

Real Decreto Legislativo 4/2007 (que modifica el RDL 1/2001) relativa a la Ley de Aguas (BOE nº287 de 30/11/2007).

8.2.2 Ruido

El ruido puede causar una molestia grave en los alrededores de una planta de proceso. Puede ser producido por distintos equipos del proceso tales como las bombas, el ultrasonidos, intercambiadores...

Impacto ambiental asociado:

La intensidad de este impacto depende del nivel de decibelios emitidos y la distancia del receptor. La legislación vigente es seguida estrictamente con el fin de evitar problemas de salud a largo plazo, tanto para los operarios de la planta como la población aledaña.

Si los equipos que producen estos ruidos se encuentran en edificaciones cerradas, el ruido que pueda llegar a producir será mínimo o imperceptible.

Legislación:

- Directiva 89/392/CEE de emisión sonora de máquinas
- I.R.D. 1316/89 del 27 de octubre sobre protección de los trabajadores frente a riesgos derivados de la exposición al ruido durante el trabajo (BOE nº263 de 2/11/89)
- Ley 37/2003 del 17 de noviembre de ruido (BOE 18/11/2003)

9. Estudio de seguridad

El estudio de seguridad realizado para la planta es un estudio HAZOP. Este estudio se encuentra en el Anexo 3. Este estudio de seguridad estudiara los posibles problemas que se pueden presentar durante el proceso, sus posibles consecuencias y las soluciones que se le pueden dar. Los tres equipos que se estudian en el HAZOP son: El ultrasonidos y todo lo que le rodea (refrigeración, entrada y salida de corrientes y ultrasonidos); la centrifugadora y sus tres corrientes; y el sistema de filtración.

10. Conclusiones

La optimización del ultrasonidos es un proceso que depende de muchos parámetros como la frecuencia, la temperatura, la amplitud... En nuestro caso no tenemos la posibilidad de variar la frecuencia, ya que el equipo que se ha utilizado es de frecuencia constante. En este caso, se ve que la forma de operación óptima es a una amplitud del 50% y durante 60 minutos, obteniendo un porcentaje de solubilización de 51.04 para los péptidos, y un porcentaje de solubilización de 62.33 para los monosacáridos. Sin embargo, la energía que consumida es muy alta, alcanzando un valor de 59329 J/g que conlleva elevados gastos energéticos. Esta optimización experimental se podría mejorar, investigando otros parámetros diferentes como frecuencia, concentración y tipo de biomasa, temperatura...

Respecto a la filtración tangencial, hemos podido comprobar que es un método efectivo para separar y concentrar péptidos. El problema se encontró en la presión de trabajo que dificultó la operación del sistema, por lo que se obtuvieron valores muy bajos de retención de péptidos. Los mejores resultados se obtuvieron en la filtración con las membranas de 50 KDa y de 5 KDa, siendo sus valores de retención de péptidos 15.34% y 37.11% respectivamente. Este problema de operación se podría mejorar con un mejor equipo y un sistema de control, capaz de soportar y controlar la presión del sistema. Además, si aguanta mejor la presión se podrían mejorar los tiempos de filtración, ya que cuanto mayor sea la presión, más rápida será la filtración.

Con los datos obtenidos de las experiencias, se ha conseguido realizar un diseño preliminar que consiga producir péptidos de biomasa algal para un caudal algal de 472.12 kg/d, compuesto por un reactor encamisado con ultrasonidos, una centrifuga, una prefiltración y un sistema de ultrafiltración. Este proceso todavía se encuentra en la fase de estudio, y todavía habría que realizarse muchos tipos de pruebas para poder encontrar un sistema óptimo capaz de obtener valores deseables a unas condiciones deseadas y con un menor gasto energético.

11. Bibliografía

Adeyi, O., Adeyi, A. J., Oke, E. O., Okolo, B. I., Olalere, A. O., Otolorin, J. A., & Taiwo, A. E. (2021). Techno-economic and uncertainty analyses of heat- and ultrasound-assisted extraction technologies for the production of crude anthocyanins powder from *Hibiscus sabdariffa* calyx. *Cogent Engineering*, 8(1). <https://doi.org/10.1080/23311916.2021.1947015>

Blanco-Llamero, C., García-García, P., & Señoráns, F. J. (2021). Combination of synergic enzymes and ultrasounds as an effective pretreatment process to break microalgal cell wall and enhance algal oil extraction. *Foods*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/foods10081928>

Bbagua | Especialistas en tratamientos de Agua. (s. f.). Recuperado 24 de febrero de 2023, de <https://bbagua.com/blog/>

CENTRÍFUGA DE DISCOS FLOTTWEG AC. (n.d.).

Chew, K. W., Yap, J. Y., Show, P. L., Suan, N. H., Juan, J. C., Ling, T. C., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2017). Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresource Technology*, 229, 53-62. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.006>

CROSSFLOW FILTRATION HANDBOOK. (s. f.).

Damar, I., Cinar, K., & Gulec, H. A. (2020). Concentration of whey proteins by ultrafiltration: Comparative evaluation of process effectiveness based on physicochemical properties of membranes. *International Dairy Journal*, 111. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104823>

Doan, N. T. T., & Lai, Q. D. (2021). Ultrafiltration for recovery of rice protein: Fouling analysis and technical assessment. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 70. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102692>

Dridi, C., Millette, M., Aguilar, B., Manus, J., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2021). Effect of physical and enzymatic pre-treatment on the nutritional and functional properties of fermented beverages enriched with cricket proteins. *Foods*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/foods10102259>

EL PRECIO DE LA ELECTRICIDAD EN ESPAÑA. (s. f.). Recuperado 17 de marzo de 2023, de <https://www.eoi.es/blogs/merme/el-precio-de-la-electricidad-en-espana/>

Garcia-Moscoso, J. L., Teymouri, A., & Kumar, S. (2015). Kinetics of peptides and arginine production from microalgae (*Scenedesmus* sp.) by flash hydrolysis. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 54(7), 2048-2058. <https://doi.org/10.1021/ie5047279>

Gómez Diente, E. (2020). *Dimensionado de una planta para la extracción y purificación de ácido clorogénico*.

González-Viar, M., Díez-Montero, R., Molinos-Senante, M., De-Florio, L., Esteban-García, A.L., Sala-Garrido, R., Hernández-Sancho, F., Tejero, I., 2016. Cost-effectiveness analysis of sewer mining versus centralized wastewater treatment: Case study of the Arga river basin, Spain. *Urban Water J* 13, 321–330. <https://doi.org/10.1080/1573062X.2014.991742>

Gifuni, I., Pollio, A., Safi, C., Marzocchella, A., & Olivieri, G. (2019). Current Bottlenecks and Challenges of the Microalgal Biorefinery. *Trends in Biotechnology*, 37(3), 242-252. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.09.006>

Laurens, L. M. L. (2013). *Summative Mass Analysis of Algal Biomass – Integration of Analytical Procedures; Laboratory Analytical Procedure (LAP) (Revised)*. www.nrel.gov/publications.

Lee, J., Choi, O. K., Oh, D., Lee, K., Park, Y., & Kim, D. (2020). Stimulation of lipid extraction efficiency from sewage sludge for biodiesel production through hydrothermal pretreatment. *Energies*, 13(23). <https://doi.org/10.3390/en13236392>

Matches' 275 Equipment Cost Estimates. (n.d.). Retrieved January 12, 2023, from <https://www.matche.com/equipcost/Default.html>.

Microdyn Nadir Membrane Filters, UP005, PES, UF, 150mm, 5/pk - 11. (s. f.). Recuperado 7 de noviembre de 2022, a partir de <https://www.sterlitech.com/microdyn-nadir-membrane-filters-up005-pes-uf-150mm-5-pk.html#nadir>

Nielsen, S. S. (s. f.). *Food Science Text Series Food Analysis*. www.springer.com/series/5999

Pandey, A., Dayal Tyagi, R., & Varjani, S. (2021). *Biomass, Biofuels, Biochemicals: Circular Bioeconomy - Current Developments and Future Outlook*.

Penha, F. M., Rezzadori, K., Proner, M. C., Zanatta, V., Zin, G., Tondo, D. W., Vladimir De Oliveira, J., Petrus, J. C. C., & di Luccio, M. (2015). Influence of different solvent and time of pre-treatment on commercial polymeric ultrafiltration membranes applied to non-aqueous solvent permeation. *European Polymer Journal*, 66, 492-501. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.03.010>

Pérez, V., Moltó, J. L., Lebrero, R., & Muñoz, R. (2021). Ectoine Production from Biogas in Waste Treatment Facilities: A Techno-Economic and Sensitivity Analysis. *Cite This: ACS Sustainable Chem. Eng*, 2021. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c06772>

Pérez, V., Moltó, J. L., Lebrero, R., & Muñoz, R. (2022). Ectoine production from biogas: A sensitivity analysis. Effect of local commodity prices, economy of scale, market trends and biotechnological limitations. *Journal of Cleaner Production*, 369. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.133440>

Polyethersulfone Membrane (Hydrophilic) - Medical OEM Manufacturing. (s. f.). Recuperado 6 de noviembre de 2022, a partir de <https://shop.pall.com/us/en/medical/diagnostics/sample-preparation/zidgri78lte?CategoryName=sample-preparation&CatalogID=medical&tracking=searchterm:Supor+450+%2528S80710%2529>

Protamex® | Novozymes. (n.d.). Retrieved November 24, 2022, from <https://biosolutions.novozymes.com/en/animal-protein/products/protamex>.

Rojo, E. M. (2015). Diseño de un sistema de tratamientos de aguas residuales en piscifactorias mediante fotobiorreactores de microalgas para la reutilización de agua y valorización de nutrientes.

Rojo, E. M., Filipigh, A., Moldes, D., Vega, M., & Bolado, S. (2022). Potential of Microalgae for Protein Production. En *Algal Biorefineries and the Circular Bioeconomy* (pp. 91-132). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003195405-4>

Rojo, E. M., Piedra, I., González, A. M., Vega, M., & Bolado, S. (2021). Effect of process parameters on the valorization of components from microalgal and microalgal-bacteria biomass by enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 335. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125256>

Romero-García, J. M., González-López, C. V., Brindley, C., Fernández-Sevilla, J. M., & Ación-Fernández, F. G. (2022). Simulation and Techno-Economical Evaluation of a Microalgal Biofertilizer Production Process. *Biology*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/biology11091359>

Saidi, S., Deratani, A., Belleville, M. P., & Amar, R. ben. (2014). Production and fractionation of tuna by-product protein hydrolysate by ultrafiltration and nanofiltration: Impact on interesting peptides fractions and nutritional properties. *Food Research International*, 65(PC), 453-461. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.026>

Slegers PM, Olivieri G, Breitmayer E, Sijtsma L, Eppink MHM, Wijffels RH and Reith JH (2020). Design of Value Chains for Microalgal Biorefinery at Industrial Scale: Process Integration and Techno-Economic Analysis. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8:550758. doi: 10.3389/fbioe.2020.550758

Sodium Hydroxide 0.1 mol/L 0.1 N CAS 1310-73-2 - PanReac AppliChem. (s. f.). Recuperado 18 de marzo de 2023, de

<https://www.itwreagents.com/germany/en/product/sodium+hydroxide+0.1+moll+%280.1n%29+volumetric+solution/181693>

Soria, A. C., Brokk, M., Sanz, M. L., & Martínez-Castro, I. (2012). Sample Preparation for the Determination of Carbohydrates in Food and Beverages. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation: Analytical Techniques for Scientists*, 213–243. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00135-6>

Sueldo de Operario/a de planta en España. (s. f.). Recuperado 14 de febrero de 2023, de <https://es.indeed.com/career/operador-de-planta/salaries>

Subsection A GENERAL REQUIREMENTS. (n.d.).

Tchabo, W., Ma, Y., Engmann, F. N., & Zhang, H. (2015). Ultrasound-assisted enzymatic extraction (UAEE) of phytochemical compounds from mulberry (*Morus nigra*) must and optimization study using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 63, 214–225. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.053>

Trujillo-Roldán, M. A., & Valdez-Cruz, N. A. (2006). Nos. 3-4 Julio-Septiembre (Vol. 48).

Tsapiuk, E. A. (1997). Calculation of the product composition and the retention coefficient by pressure driven membrane separation of solutions containing one and two solutes. In *Journal of Membrane Science* (Vol. 124).

UIP1000hdT - Homogeneizador potente y versátil. (s. f.). Recuperado 3 de noviembre de 2022, a partir de https://www.hielscher.com/es/i1000_p.htm

Villacorte, L. O., Ekowati, Y., Winters, H., Amy, G., Schippers, J. C., & Kennedy, M. D. (2015). MF/UF rejection and fouling potential of algal organic matter from bloom-forming marine and freshwater algae. *Desalination*, 367, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2015.03.027>

Wycken, S. van, & Laurens, L. M. L. (2013a). *Determination of Total Carbohydrates in Algal Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP) (Revised)*. www.nrel.gov/publications.

Wycken, S. van, & Laurens, L. M. L. (2013b). *Determination of Total Solids and Ash in Algal Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP) (Revised)*. www.nrel.gov/publications.

Zhang, J., Zhou, H., Liu, D., & Zhao, X. (2019). Pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient enzymatic saccharification of cellulose. En *Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels* (pp. 17-65). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815936-1.00002-2>

Zhang, G., Hu, M., He, L., Fu, P., Wang, L., & Zhou, J. (2013). Optimization of microwave-assisted enzymatic extraction of polyphenols from waste peanut shells and evaluation of its antioxidant and antibacterial activities in vitro. *Food*

and Bioproducts Processing, 91(2), 158–168.
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.09.003>

