

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 695 874**

21 Número de solicitud: 201730896

51 Int. Cl.:

C11B 1/10

(2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

05.07.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

11.01.2019

Fecha de concesión:

31.05.2019

45 Fecha de publicación de la concesión:

07.06.2019

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)
C/ Serrano, 117
28006 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**IBÁÑEZ EZEQUIEL, M^a Elena;
GILBERT LÓPEZ, Bienvenida;
MENDIOLA LEÓN, José Antonio;
CIFUENTES GALLEGO, Alejandro y
HERRERO CALLEJA, Miguel**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Procedimiento para la obtención secuencial de compuestos de alto valor añadido a partir de biomasa húmeda**

57 Resumen:

Procedimiento para la obtención secuencial de compuestos de alto valor añadido a partir de biomasa húmeda

La presente invención se refiere a un procedimiento que permite la recuperación de los distintos compuestos de alto valor añadido (proteínas, lípidos, pigmentos y carbohidratos) a partir de biomasa húmeda mediante extracciones sucesivas con agua subcrítica presurizada, con etanol expandido con CO₂ sub- o supercrítico y, finalmente, con CO₂ supercrítico.

ES 2 695 874 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

**Procedimiento para la obtención secuencial de compuestos de alto valor
añadido a partir de biomasa húmeda**

DESCRIPCIÓN

5 La presente invención se refiere a un procedimiento que permite la recuperación de los distintos compuestos de alto valor añadido (proteínas solubles, lípidos, pigmentos y carbohidratos) a partir de biomasa húmeda mediante extracciones sucesivas con agua subcrítica presurizada, con etanol expandido con CO₂ sub- o supercrítico y, finalmente, con CO₂ supercrítico.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

Uno de los retos más importantes en el desarrollo de las bio-refinerías de microalgas es la mejora de procesos que permitan la recuperación integral de los compuestos de alto valor añadido procedentes de la biomasa algal (proteínas, carbohidratos, lípidos, pigmentos, compuestos fenólicos). Aunque se ha avanzado mucho en este campo, la práctica totalidad de los procesos se inician con el secado de la biomasa después de su cosechado (para eliminar el contenido en agua, hasta un 80%) empleando procedimientos de secado, como por ejemplo la liofilización, y que requieren altos costes energéticos y de operación.

20

Por ejemplo, el documento: Bienvenida Gilbert-López, José A. Mendiola, Javier Fontecha, Lambertus A. M. van den Broek, Lolke Sijtsma, Alejandro Cifuentes, Miguel Herrero and Elena Ibáñez, Green Chem., 2015, 17, 4599, presenta un proceso en cuatro etapas secuenciales para la extracción de distintos compuestos biológicamente funcionales como son proteínas solubles, lípidos y pigmentos a partir de microalgas. Previamente al proceso de extracción en 4 etapas, se procede con un procedimiento de liofilización de las microalgas.

30

El alto coste energético de estos procesos de secado de la biomasa húmeda algal queda reflejado en el siguiente documento: Hou Jian, Yang Jing, and Zhang Peidong, The Scientific World Journal, Volume 2015 (2015), Article ID 920968, 9 pages, donde se explica la diferencia en el gasto energético entre extraer lípidos a partir de alga seca o de alga húmeda, mediante co-disolventes subcríticos, consiguiéndose una mejoría del 43,83% en el ratio energético del alga húmeda sobre el alga seca. Por lo tanto se consume menos energía para extraer compuestos a partir de alga húmeda que de alga seca.

35

Adicionalmente la patente US9328310 (B1) cita un procedimiento para la extracción de lípidos a partir de algas húmedas con agua subcrítica. Para ello, en una realización preferida, el documento indica que una torta de biomasa húmeda, que no se liofiliza, y que está constituida por algas, se presuriza en un reactor y se procede con una extracción con líquido a presión, utilizando agua como disolvente.

En consecuencia de los documentos estudiados, estos procesos de extracción de biomasa formada por algas o microalgas, presentan varios inconvenientes como son: el alto gasto energético asociado a los procesos de secado en unos casos, así como también el gasto asociado al número de operaciones o extracciones necesario para alcanzar altos porcentajes de obtención de los compuestos de alto valor añadido que se extraen de la biomasa de partida en otros.

Por lo tanto, es necesario desarrollar un procedimiento de extracción para aprovechar todos los compuestos de alto valor añadido y biológicamente funcionales presentes en la biomasa (por ejemplo, biomasa algal) y que permita reducir el gasto energético asociado a los diferentes procesos que intervienen en la misma y los pretratamientos necesarios para realizar las extracciones tal y como se venían realizando hasta ahora.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Sorprendentemente, la realización de manera secuencial de extracciones con fluidos comprimidos a partir de biomasa húmeda directamente, como son las algas, que se desarrolla en la presente invención, no solo elimina la necesidad de secado o liofilización de la biomasa de partida que se realiza en los procedimientos del estado de la técnica, con el pertinente ahorro energético, sino que además conduce a unos rendimientos porcentuales de los compuestos extraídos superiores a los esperados o a los descritos en el estado de la técnica siguiendo otros procedimientos diferentes al de la presente invención.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la recuperación de compuestos de alto valor añadido a partir de biomasa húmeda que comprende las siguientes etapas:

- (a) extracción de con agua subcrítica a una presión de entre 1-11 MPa y una temperatura de entre 30-50 °C para obtener un primer extracto con

compuestos de alto valor añadido y un residuo, y posterior secado del residuo obtenido;

5 (b) extracción del residuo obtenido en la etapa a) mediante un proceso de extracción a una presión de 5-10 MPa y una temperatura de entre 40-60 °C con CO₂ sub- o supercrítico (ScCO₂) empleando un porcentaje de etanol entre 40-80%, para obtener un segundo extracto con compuestos de alto valor añadido y un segundo residuo, y posterior secado del segundo residuo obtenido; y

10

(c) por último, extracción del segundo residuo obtenido en la etapa b) mediante un proceso de extracción con CO₂ supercrítico a una presión de entre 25-60 MPa y a una temperatura de entre 40-70 °C para obtener un tercer extracto con compuestos de alto valor añadido y un tercer residuo.

15

En una realización preferida la biomasa húmeda de partida puede estar congelada o a una temperatura comprendida entre 10-30 °C.

20 En otra realización preferida los compuestos de alto valor añadido son proteínas, lípidos (polares, de polaridad media y de baja polaridad) y pigmentos (carotenoides, xantofilas y clorofilas) y carbohidratos. Preferiblemente las proteínas extraídas son aquéllas solubles en agua y etanol.

25 En otra realización preferida del procedimiento, los extractos obtenidos en las etapas a), b) y c) se recogen en recipientes protegidos de la luz.

En otra realización preferida del procedimiento descrito, la biomasa húmeda comprende biomasa algal, microalgas o mezcla de las anteriores.

30

En otra realización preferida del procedimiento, el etanol del extracto obtenido en la etapa b) se elimina a presión reducida y temperatura entre 25-35 °C, así se evita que el etanol pueda degradar los compuestos de alto valor añadido extraídos en dicha etapa b).

35

En otra realización preferida del procedimiento, el extracto obtenido en la etapa a) se congela para evitar la degradación de los compuestos de alto valor añadido extraídos en dicha etapa a).

5 En otra realización preferida, la biomasa húmeda comprende microalgas, y más preferiblemente las microalgas son seleccionadas de la lista que comprende *Isochrysis galbana*, *Scenedesmus obliquus*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Nannochloropsis gaditana*, *Anacystis nidulans*, *Neochloris oleoabundans* *Spirulina*, *Dunaliella*, *Haematococcus* y cualquier mezcla de las anteriores.

10

En otra realización preferida del procedimiento descrito, el secado de los residuos de las etapas a) y b) se lleva a cabo en N₂ a una presión inferior a 1,5 MPa en un tiempo de entre 10 y 70 minutos. Más preferiblemente el secado de los residuos de las etapas a) y b) se lleva a cabo en N₂ a una presión de entre 0,03 y 1 MPa durante un tiempo de entre 20 y 60 minutos.

15

En otra realización preferida del procedimiento descrito, la extracción con agua subcrítica de la etapa a) se realiza a una presión de entre 9-11 MPa y una temperatura de entre 30-40 °C. Más preferiblemente, la extracción con agua subcrítica de la etapa a) se realiza a una presión de 10 MPa y una temperatura de 30 °C.

20

En otra realización preferida del procedimiento descrito, la extracción empleando un porcentaje de etanol expandido de entre 40-80% con CO₂ sub- o supercrítico de la etapa b) se realiza a una presión de entre 6,5-8 MPa y una temperatura de entre 45-55 °C. Más preferiblemente, la extracción empleando un porcentaje de etanol expandido de entre 40-80% con CO₂ de la etapa b) se realiza a una presión de 7 MPa y una temperatura de 50 °C.

25

En otra realización preferida del procedimiento descrito, la extracción con fluidos supercríticos de la etapa c) se realiza a una presión de entre 25-60 MPa y a una temperatura de entre 60-70 °C. Más preferiblemente, la extracción con fluidos supercríticos de la etapa c) se realiza a una presión de 30 MPa y una temperatura de 70 °C.

30

En una realización preferida, se realiza una etapa previa a la etapa (a) del procedimiento descrito en la presente invención, caracterizada porque la biomasa

35

húmeda se mezcla con un relleno en unas condiciones de temperatura de entre 10 °C y 30 °C y en una relación en peso entre la biomasa húmeda y el relleno de entre 1:5 y 1:20, donde el relleno es un material inerte seleccionado de la lista que comprende
 5 bolas de vidrio, anillos Raschig, anillos Fenske, arena de mar, gel de sílice de tamaño de poro de 60 Ånström y gel de sílice de tamaño de poro de 120 Ånström. En este caso será la biomasa húmeda junto al relleno la que se introduzca en la etapa (a) para realizar la extracción con agua supercrítica.

En la presente invención se entiende por anillos Raschig a piezas de geometría
 10 tubular cuyo diámetro es aproximadamente igual a su longitud y que se emplean como relleno para columnas en procesos de destilación y en otros procesos químicos ingenieriles.

En la presente invención se entiende por anillos Fenske a piezas de vidrio en forma de
 15 hélice con un diámetro definido y que se emplean como relleno para columnas en procesos de destilación y en otros procesos químicos ingenieriles.

En la presente invención, como es bien conocido para un experto en la materia, se
 entiende por gel de sílice a una forma granular y porosa de dióxido de silicio fabricado
 20 sintéticamente a partir de silicato sódico. A pesar del nombre, el gel de sílice es sólido.

En la presente invención se entiende por "biomasa húmeda" a aquella que contiene un
 porcentaje de contenido en peso de agua superior al 20% en peso, superior al 40%,
 superior al 60% y más preferiblemente un contenido en peso de agua de entre el 65%
 25 y el 90%.

En la presente invención se entiende por "biomasa algal" a la cantidad total de materia
 obtenida a partir de cultivos de algas y/o microalgas en reactores abiertos, estanques,
 fotobioreactores o cualquier tipo de procedimiento empleado para su producción y
 30 crecimiento. En la presente invención la biomasa algal ha sido suministrada por Fitoplancton Marino S.L. (Cádiz, España), y que se utilizan como materia prima de los procesos de extracción descritos en la presente invención.

En la presente invención, los extractos obtenidos preferiblemente se preservan de la
 35 luz para evitar la degradación de los compuestos de alto valor añadido obtenidos.

En la presente invención se entiende por "extracción con fluidos comprimidos" aquellas en las que el extractante utilizado es un compuesto sometido a alta presión, y comprende cualquiera de las siguientes técnicas bien conocidas como: Extracción con fluidos supercríticos (SFE), extracción con líquidos presurizados (PLE), como por ejemplo con agua pura o etanol puro, y extracción en condiciones subcríticas o con líquidos expandidos.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

El Proyecto que lleva a esta solicitud de patente ha recibido su financiación del VII Programa marco para la investigación, desarrollo tecnológico y demostración bajo el acuerdo de subvención no. 613588.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1 Histograma que representa el porcentaje de recuperación de proteínas, carbohidratos, lípidos y pigmentos para el procedimiento en tres etapas para cada una de esas etapas.

FIG. 2 Histograma que representa el porcentaje de recuperación de proteínas, carbohidratos, lípidos y pigmentos para el procedimiento en cuatro etapas de la bibliografía para cada una de esas etapas.

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Ejemplo 1: Procedimiento de extracción secuencial de compuestos de alto valor añadido a partir de biomasa algal húmeda según el procedimiento de la presente invención

Se lleva a cabo el procedimiento de extracción secuencial de una muestra de 25 g de biomasa húmeda (con una humedad del 72%) que comprende *I. galbana* en un extractor de fluidos supercríticos "Spe-ed Helix". La muestra se deposita en una cesta
5 de 300 ml y la misma se coloca en la celda de extracción de acero inoxidable de alta presión. Se bombea CO₂ presurizado para el acondicionamiento previo de la cámara y se precalienta hasta la temperatura de extracción la torta de biomasa presurizada.

La extracción se realiza en tres pasos secuenciales utilizando como disolventes de cada extracción (i) agua pura (PLE) (ii) una extracción de líquido expandido, de etanol
10 expandido con CO₂ supercrítico y (iii) una extracción con CO₂ supercrítico (SFE), con un secado con N₂ a baja presión entre cada una de las extracciones.

La extracción con líquido presurizado utilizando agua como extractante (i) se lleva a
15 cabo alimentando la celda con agua hasta alcanzar una presión de 10 MPa, y manteniendo una temperatura de 30 °C. La extracción de compuestos polares contenidos en la muestra de las microalgas se realiza en un solo ciclo estático durante 30 minutos. A continuación se realiza un secado de la muestra de biomasa con N₂ a 1 MPa durante 40 minutos.

La extracción de líquido expandido, en particular de etanol expandido con CO₂ (ii), se
20 lleva a cabo bombeando ScCO₂ hasta 7 MPa a 50 °C, al mismo tiempo que se alimenta la celda de extracción con un caudal de 2,5 ml/min de etanol. La extracción se realiza de manera dinámica durante un tiempo de 90 minutos. A continuación se
25 realiza un secado de la muestra de biomasa con N₂ a 1 MPa durante 30 minutos.

La extracción con fluidos supercríticos con ScCO₂ (iii) se lleva a cabo bombeando
ScCO₂ hasta 30 MPa a 70 °C en la celda de extracción. La extracción se realiza de
30 manera dinámica durante un tiempo de 90 minutos.

Todos los recipientes de recolección de cada una de las extracciones son protegidos
de la luz. Finalmente, para la mejor preservación de los compuestos extraídos, por un
lado, para el extracto de la segunda etapa con etanol expandido con ScCO₂, se
elimina el etanol mediante presión reducida y temperatura de 30 °C, y, por otro lado, el
35 extracto obtenido en la primera etapa de extracción en agua a presión, se debe
congelar.

Ejemplo 2: Procedimiento de extracción secuencial de compuestos de alto valor añadido a partir de biomasa algal seca (liofilizada)

5 A modo de comparación se relaciona a continuación un proceso de extracción de biomasa algal seca en cuatro etapas sucesivas empleando fluidos comprimidos:

Se lleva a cabo el procedimiento de extracción secuencial de una muestra de 10 g de biomasa liofilizada que comprende *I. galbana* en un extractor de fluidos supercríticos "Spe-ed Helix". La muestra se mezcla de manera homogénea con 30 g de arena de mar y el conjunto se deposita en una cesta de 300 ml que se coloca en la celda de extracción de acero inoxidable de alta presión. Se bombea CO₂ presurizado para el acondicionamiento previo de la cámara y se precalienta hasta la temperatura de extracción la torta de biomasa presurizada.

15 La extracción se realiza en cuatro pasos secuenciales utilizando como disolventes de cada extracción (i) CO₂ supercrítico (ii) una extracción de líquido expandido, de etanol expandido con CO₂ supercrítico (iii) una extracción con etanol puro presurizado (PLE) y (iv) una extracción con agua pura.

20 La extracción con fluido supercrítico con ScCO₂ (i) se lleva a cabo bombeando ScCO₂ hasta 30 MPa a 50 °C en la celda de extracción. La extracción se realiza de manera dinámica durante un tiempo de 60 minutos.

25 La extracción con un líquido expandido, en particular de etanol expandido con CO₂ (ii), se lleva a cabo bombeando ScCO₂ hasta 7 MPa a 50 °C al mismo tiempo que se alimenta la celda de extracción con un caudal de 2,5 ml/min de etanol. La extracción se realiza de manera dinámica durante un tiempo de 120 minutos.

30 La extracción con líquido presurizado utilizando etanol como extractante (iii) se lleva a cabo alimentando la celda con agua hasta alcanzar una presión de 10 MPa, y manteniendo una temperatura de 80°C. La extracción de compuestos de polaridad media-alta contenidos en la muestra de las microalgas se realiza en un solo ciclo estático durante 30 minutos.

35

A continuación se realiza un secado de la muestra de biomasa con N₂ a 1 MPa durante 30 minutos.

5 La extracción con líquido presurizado utilizando agua como extractante (iv) se lleva a cabo alimentando la celda con agua hasta alcanzar una presión de 10 MPa, y manteniendo una temperatura de 80 °C. La extracción de compuestos polares contenidos en la muestra de las microalgas se realiza en un solo ciclo estático durante 30 minutos.

10 Todos los recipientes de recolección de cada una de las extracciones son protegidos de la luz. Finalmente, para la mejor preservación de los compuestos extraídos, por un lado, los extractos de la segunda y tercera etapas (con etanol expandido con ScCO₂ y etanol puro, respectivamente), se elimina el etanol mediante rotavapor (a presión reducida), y por otro lado, el extracto obtenido en la cuarta etapa de extracción en
15 agua a presión, se debe congelar.

Ejemplo 3: Comparación de los rendimientos de compuestos de alto valor añadido obtenidos en los procesos de los ejemplos 1 y 2 anteriormente descritos

20 Recuperación obtenida para cada tipo de compuesto en el extracto, con respecto a la cantidad inicial en el alga, obtenido para cada etapa del proceso de extracción para el procedimiento de 4 y de 3 etapas.

25 Tabla 1: Muestra los rendimientos (en % en peso respecto al porcentaje de cada compuesto en la muestra de biomasa algal de partida) de cada uno de los compuestos de alto valor añadido obtenidos en el procedimiento del ejemplo 1 (con biomasa húmeda) y 2 (con biomasa seca).

	Lípidos%	Proteínas%	Azúcares%	E-Fucoxantina%	Cenizas %	Agua		
Composición inicial del alga	26,27	40,74	7,61	0,999	12,8	4,39		
Recuperaciones, %(w/w) Proceso biomasa seca (n=3)								
Isochrysis	Lípidos%	Proteínas%	Azúcares%	E-Fucoxantina%	SD lípidos	SD proteínas	SD azúcares	SD fucox.
Etapa (i) Sc-CO2	17,13	-	-	3,92	0,27	-	-	0,54
Etapa (ii) CXE 45% Etanol	37,83	-	-	43,98	3,24	-	-	3,56
Etapa (iii) PLE Etanol	13,47	1,05	4,79	10,16	0,82	0,03	0,12	1,11
Etapa (iv) PLE agua	-	1,65	3,93	0,44	-	0,12	1,14	0,21
Total proceso secuencial	68,43	2,70	8,71	58,50	6,17	0,60	1,74	6,19
Recuperaciones, %(w/w) Proceso biomasa húmeda (n=2)								
Isochrysis	Lípidos%	Proteínas%	Azúcares%	E-Fucoxantina%	SD lípidos	SD proteínas	SD azúcares	SD fucox.
Etapa (i) PLE agua	-	4,88	12,83	1,26	-	0,36	1,06	0,20
Etapa (ii) CXE 50% Etanol	75,80	13,59	25,89	64,74	7,41	0,37	0,80	11,06
Etapa (iii) Sc-CO2	6,41	-	-	5,51	0,39	-	-	2,81
Total proceso secuencial	82,22	18,47	38,72	71,51	7,80	3,26	10,41	14,86

n representa el número de repeticiones del proceso completo.

SD se define como la desviación estándar relativa

5 Tal y como se puede observar en la tabla 1, los rendimientos obtenidos en el proceso correspondiente a la presente invención son claramente superiores a los obtenidos mediante el procedimiento a partir de biomasa seca (liofilizada) conocidos en el estado del arte. Para los compuestos de interés cuantificados (lípidos, proteínas, azúcares y el pigmento fucoxantina), las recuperaciones son superiores, alcanzando valores mayores de 80% de recuperación de los lípidos presentes en la biomasa algal y 70% de fucoxantina, ambos extraídos principalmente en las etapas (ii) y (iii) del proceso secuencial. En cuanto al contenido en proteínas y azúcares, el proceso correspondiente a la presente invención permite recuperar un porcentaje de proteínas superior al 18% y un porcentaje de azúcares superior al 35%, fundamentalmente en las etapas (i) y (ii) del proceso secuencial.

15

El residuo del proceso de extracción secuencial contiene fundamentalmente azúcares y proteínas y corresponde al porcentaje no extraído en las etapas secuenciales.

20

Adicionalmente, al no existir una etapa previa de secado o liofilización en el procedimiento de la presente invención, éste implica una mejora a nivel de consumo energético respecto al procedimiento conocido en el estado de la técnica.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la obtención secuencial de compuestos de alto valor añadido a partir de biomasa húmeda que comprende las siguientes etapas:

5

(a) extracción de la biomasa húmeda con agua subcrítica a una presión de entre 1-11 MPa y una temperatura de entre 30-50 °C para obtener un primer extracto que comprende compuestos de alto valor añadido y un residuo, y posterior secado de ese residuo obtenido;

10

(b) extracción del residuo seco obtenido en la etapa (a) mediante un proceso de extracción a una presión de 5-10 MPa y una temperatura de entre 40-60 °C con CO₂ sub- o supercrítico empleando un porcentaje de etanol entre 40-80%, para obtener un segundo extracto que comprende compuestos de alto valor añadido y un segundo residuo, y posterior secado de ese residuo; y

15

(c) extracción del residuo seco obtenido en la etapa (b) mediante un proceso de extracción con CO₂ supercrítico a una presión de entre 25-60 MPa y a una temperatura de entre 40-70 °C para obtener un tercer extracto que comprende compuestos de alto valor añadido y un tercer residuo.

20

2. Procedimiento según la reivindicación anterior donde los compuestos de alto valor añadido de cada uno de los extractos obtenidos en las etapas (a), (b) y (c) se seleccionan entre proteínas, lípidos, pigmentos, carbohidratos o combinaciones de ellos.

25

3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde los extractos obtenidos en las etapas (a), (b) y (c) se recogen en recipientes protegidos de la luz.

30

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el etanol del extracto obtenido en la etapa b) se elimina a presión reducida y temperatura de entre 25-35 °C.

35

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el extracto obtenido en la etapa (a) se congela.
- 5 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la biomasa húmeda comprende biomasa algal, microalgas o cualquier mezcla de las anteriores.
- 10 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la biomasa húmeda comprende microalgas seleccionadas de la lista que comprende *Isochrysis galbana*, *Scenedesmus obliquus*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Nannochloropsis gaditana*, *Anacystis nidulans*, *Neochloris oleoabundans*, *Spirulina*, *Dunaliella*, *Haematococcus* y cualquier mezcla de las anteriores.
- 15 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la biomasa húmeda está congelada o a una temperatura comprendida entre 10 y 30 °C.
- 20 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el proceso de secado de las etapas (a) y (b) se lleva a cabo con N₂ a una presión inferior a 1,5 MPa en un tiempo de entre 10 y 70 minutos.
- 25 10. Procedimiento según la reivindicación 9 donde el proceso de secado de las etapas (a) y (b) se lleva a cabo en N₂ a una presión de entre 0,03 y 1 MPa durante un tiempo de entre 20 y 60 minutos.
- 30 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la extracción con agua subcrítica de la etapa (a) se realiza a una presión de entre 9-11 MPa y una temperatura de entre 30-40 °C.
- 35 12. Procedimiento según la reivindicación 11 donde la extracción con agua subcrítica de la etapa (a) se realiza a una presión de 10 MPa y una temperatura de 30 °C.
13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la extracción empleando un porcentaje de etanol expandido de entre 40-80% con CO₂ de la etapa (b) se realiza a una presión de entre 6,5-8 MPa y una temperatura de entre 45-55 °C.

14. Procedimiento según la reivindicación 13 donde la extracción empleando un porcentaje de etanol expandido de entre 40-80% con CO₂ de la etapa (b) se realiza a una presión de 7 MPa y una temperatura de 50 °C.

5

15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la extracción con CO₂ supercrítico de la etapa (c) se realiza a una presión de entre 25-60 MPa y a una temperatura de entre 60-70 °C.

10

16. Procedimiento según la reivindicación 15 donde la extracción con CO₂ supercrítico de la etapa (c) se realiza a una presión de 30 MPa y una temperatura de 70 °C.

15

17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde se realiza una etapa previa a la etapa (a), caracterizada por que la biomasa húmeda se mezcla con un relleno en unas condiciones de temperatura de entre 10 °C y 30 °C y en una relación en peso entre la biomasa húmeda y el relleno de entre 1:5 y 1:20, donde el relleno es un material inerte seleccionado de la lista que consiste en bolas de vidrio, anillos Raschig, anillos Fenske, arena de mar y gel de sílice de tamaño de poro de entre 60 y 120 Ånström.

20

Isochrysis biomasa húmeda

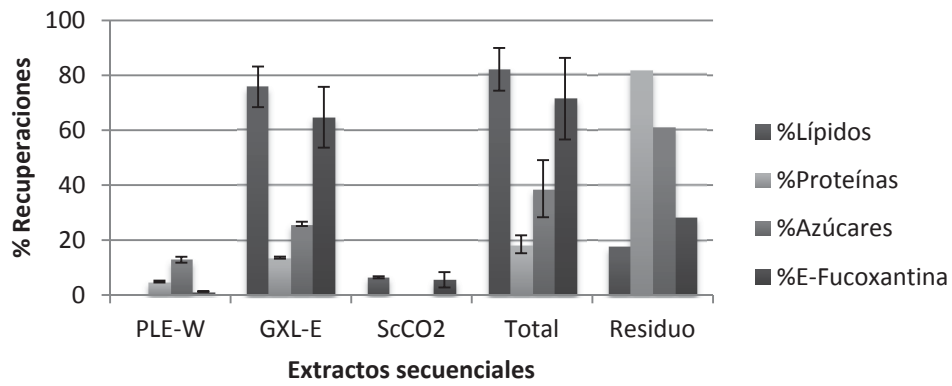


FIG. 1

Isochrysis biomasa seca

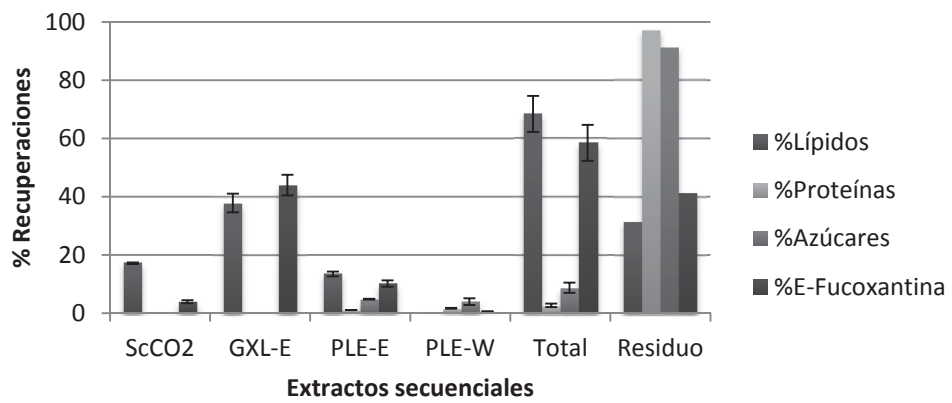


FIG. 2