

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 929 117**

51 Int. Cl.:

C12P 21/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.12.2018** **PCT/EP2018/084690**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2019** **WO19115672**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2018** **E 18816060 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2022** **EP 3724346**

54 Título: **Método para el procesamiento en cascada de algas frescas**

30 Prioridad:

15.12.2017 EP 17207640

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

24.11.2022

73 Titular/es:

SABIDOS B.V. (100.0%)
Buurtboslaan 8
6731 CZ Otterlo, NL

72 Inventor/es:

VERLEUN, THEODORUS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 929 117 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para el procesamiento en cascada de algas frescas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para procesar algas para recuperar proteína algácea. La invención también se refiere a la proteína recuperada mediante el procedimiento.

10 Antecedentes de la invención

Las algas son una fuente valiosa de polisacáridos, proteínas, minerales y aceites. Para aislar este constituyente valioso de las algas, las algas necesitan ser procesadas. Las algas de aguas dulces se pueden recolectar y procesar localmente. Para las algas de aguas saladas, las llamadas algas marinas, la recolección y el procesamiento tienen lugar en localizaciones separadas. Las algas marinas se recolectan mar adentro, se transportan a tierra firme y se procesan en tierra. En el momento en el que se inicia el procesamiento, se ha iniciado la descomposición y el deterioro de las algas marinas. Como consecuencia, las algas ya no se pueden usar para aplicaciones alimentarias, farmacéuticas o cosméticas, a no ser después de un procesamiento intensivo o usando cantidades sustanciales de agentes conservantes antimicrobianos. Además, se transporta una gran cantidad de agua mientras se llevan las algas a tierra firme, lo que es muy trabajoso y costoso.

Alternativamente, las algas se recolectan mar adentro y también se conservan mar adentro para prolongar el tiempo de almacenamiento o la vida útil antes del procesamiento. Las algas marinas conservadas se transportan a continuación a tierra firme o se procesan adicionalmente. Esto evita el transporte de una gran cantidad de agua, pero no evita el daño a los constituyentes algáceos como la proteína. La conservación es frecuentemente en forma de secado o congelación. Vilg & Undeland (2017) J. Appl. Phycol. 29:585 describe la extracción de proteína de algas marinas congeladas o liofilizadas. Postma y cols J Appl Phycol (2018) 30:1281 es un estudio de diferentes métodos de extracción de proteína de algas marinas secadas. Maehre y cols. 2016 Mar. drugs 14:196 describe una extracción optimizada de proteína alcalina desde algas marinas secadas. Harnedy & FitzGerald 2013 Food Sci technol 51:375 describe otra extracción optimizada de proteína alcalina desde Palmaria palmate secada al horno. La conservación, y en particular el calor usado para secar las algas marinas, puede conducir a una deformación o desnaturalización de la proteína y así a una disminución en la funcionalidad y una reducción del valor asociada. Además, el calentamiento para secar grandes cantidades de biomasa algácea húmeda requiere una cantidad sustancial de energía (costosa). Otra desventaja es que típicamente se añaden conservantes a la biomasa algácea. Estos conservantes pueden acabar en el producto alimenticio final o en el caso de tratamientos ácidos (ensilado) también destruirán los constituyentes algáceos, lo que no es deseable.

Sería deseable tener un método más eficaz, más económico y más suave para procesar algas marinas que diera un producto proteínico funcional de buena calidad, típicamente intacto, que se pudiera usar en aplicaciones alimentarias y que permitiera una revalorización desde la biomasa restante después del aislamiento de la proteína.

Breve descripción de la figura

Fig. 1 Un dispositivo para procesar algas frescas que comprende una unidad **2** de recolección y lavado; una unidad **3** de procesamiento para la digestión enzimática, una unidad **4** de recuperación para el aislamiento y la concentración de la proteína, una unidad **6** de procesamiento de digestión anaerobia, una unidad **7** de recuperación para la recuperación de los productos procedentes de **6** y una unidad **5** de formulación para la formulación de los productos **8** procedentes de las unidades **4** o **7** de recuperación.

Descripción detallada de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para procesar algas. El método comprende (i) someter las algas a un choque osmótico; (ii) tratar las algas sometidas a choque con una composición enzimática que comprende enzimas degradadoras de la pared celular; (iii) separar las algas tratadas enzimáticamente en una fase sólida y una fase líquida, donde el tratamiento enzimático de las algas se inicia en las tres horas posteriores a la recolección y la temperatura en la etapa (i) a la etapa (iii) está en el intervalo de 4 a 30 grados C.

En la industria convencional, si la recolección y el procesamiento tienen lugar en diferentes emplazamientos, la biomasa típicamente se transporta desde el emplazamiento de la recolección hasta el emplazamiento del procesamiento. En el método según la presente invención, en lugar de llevar la biomasa recolectada hasta el emplazamiento del procesamiento, la planta de procesamiento se lleva hasta el emplazamiento en el que se recolecta la biomasa a fin de procesar la biomasa tan fresca como sea posible, para obtener el valor funcional más alto de los constituyentes. En el método según la presente invención, las algas se procesan en o muy cerca del emplazamiento de recolección. Esto es particularmente ventajoso si las algas se recolectan en otro emplazamiento distinto del emplazamiento de procesamiento principal, p. ej. mar adentro, que típicamente es el caso de las algas marinas, también denominadas algas de mar o macroalgas. Usando el procedimiento de la invención, hay poca probabilidad de descomposición o deterioro de las algas antes de que haya empezado el procesamiento. También se evitan los altos costes del transporte de agua para llevar, p. ej., algas marinas a una planta de procesamiento (las algas marinas consisten en más de 90% p/p de agua). Por lo tanto, las proteínas obtenidas a partir de las algas son

de buena calidad, mostrando propiedades funcionales, por ejemplo buena solubilidad, se pueden producir más económicamente y se pueden usar para aplicaciones alimentarias.

Otra ventaja del método según la invención es que, después de la extracción de la proteína, la biomasa restante se puede usar para una revalorización. Por ejemplo, la biomasa se puede usar para la producción de biogás o para la recuperación de minerales. En una realización según la invención, la biomasa restante después de la extracción de la proteína se expone a una mezcla de enzimas carbohidrasa a fin de liberar azúcares. La masa hidrolizada rica en carbohidratos se alimenta a continuación a un digestor anaerobio para dar biogás y una corriente acuosa rica en minerales. La última se puede usar como o en una composición fertilizante. De esta fracción rica en carbohidratos también se pueden recuperar otros constituyentes alimentarios, tales como, por ejemplo, azúcares, alginatos, carragenina y fucoidano.

Aunque el método es muy ventajoso para procesar algas marinas, el método también se puede usar para cualquier tipo de procesamiento de algas, sea en tierra firme o mar adentro. El método se puede usar para el procesamiento mar adentro de algas, en particular algas marinas o macroalgas, en proteína, opcionalmente seguido por la producción adicional de biogás o una composición fertilizante a partir de la biomasa algácea restante después de la recuperación de proteína. El término "biogás" se refiere al producto de la digestión anaeróbica o la fermentación anaeróbica de biomasa. El biogás comprende principalmente metano y dióxido de carbono y puede tener pequeñas cantidades de sulfuro de hidrógeno, humedad y siloxanos.

El método de la invención es particularmente ventajoso cuando se recolecta biomasa, tal como algas, en una situación en la que el emplazamiento del procesamiento y la recolección están separados, debido a que el método permite el procesamiento inmediato de la biomasa. Típicamente, el procesamiento se inicia rápidamente para minimizar el tiempo en el que las algas están expuestas a aire u oxígeno, tal como en menos de 30 minutos, menos de 60 minutos, menos de 90 minutos, menos de 2 horas, menos de 2,5 horas o menos de 3 horas desde la recolección.

El término "procesamiento" en el presente contexto se refiere a un procedimiento que incluye la ruptura de las células algáceas o el tratamiento de la biomasa algácea con enzimas degradadoras de la pared celular. Solamente secar la biomasa algácea sin ruptura adicional de las células o sin tratamiento enzimático no se considera el inicio del procesamiento.

En el contexto de la presente invención, "mar adentro" se refiere a una localización de aguas marinas o dulces, tal como en un mar, océano, estuario, río o lago, la costa o la orilla del río. En una realización, la localización de las aguas marinas o dulces está al menos 1 km alejada de la tierra, la costa o la orilla del río, tal como entre 1 y 200 km, entre 1 y 50 km o entre 50 y 200 km alejada de la tierra, la costa o la orilla del río. Mar adentro no se refiere a estanques o canales en tierra.

Puesto que la temperatura durante el procesamiento nunca supera 30 grados C y preferiblemente está entre 4 y 30 grados C, entre 5 y 25 grados C o entre 15 y 25 grados C, la proteína que se aísla de las algas no se somete a deformación o desnaturalización y retiene sus propiedades funcionales, tales como, por ejemplo, su solubilidad. Usando el método según la invención, se puede obtener proteína algácea secada o líquida concentrada.

Se usan algas frescas en el método según la invención. En el contexto de la presente invención, "algas frescas" se refiere a las algas según se recolectan, sin procesamiento adicional tal como secado y congelación. Por lo tanto, el término "algas frescas" no incluye algas secadas, pulverizadas, rehidratadas, congeladas, ensiladas o descongeladas. Típicamente, las algas frescas tienen un contenido de agua en el intervalo de entre 80 y 95% p/p. Las algas recientemente recolectadas se recolectan menos de cuatro horas antes, tal como tres horas antes, dos horas antes o una hora antes.

Aparte de las algas, la recolección puede incluir pequeña vida marina u otros sólidos, tales como plástico, que preferiblemente se retiran antes de procesar las algas. Las algas pueden constituir de entre 86% y 100% p/p de la vida marina en la recolección. Se prefiere que las algas constituyan de 90% a 100% p/p o de 99% a 100% p/p de la vida marina en la recolección. Recolección se refiere a separar las algas del agua circundante, tal como recuperar algas de una localización de agua marina o dulce, tal como un lago, río o mar, estuario u océano. Las algas se pueden recolectar por cualquier medio adecuado, por ejemplo al recolectar algas que flotan libremente o al cortar o separar la biomasa algácea de redes y cuerdas sobre las que se sembraron y desarrollaron. En una realización, las algas o las algas marinas se siembran sobre cuerdas de cultivo. La recolección comprende entonces separar las algas o las algas marinas de las cuerdas.

Desde menos de 30 minutos hasta dos o tres horas después de la recolección de las algas de una localización de aguas marinas o dulces, las algas se someten a un choque osmótico que conduce a la ruptura de las algas y a la liberación del contenido de las células. El choque osmótico puede liberar el contenido de las células parcialmente o completamente. El choque osmótico puede romper todas las células algáceas o parte de las células algáceas, tal como, por ejemplo, al menos 50%, al menos 60% o al menos 75% de las células algáceas. El choque osmótico se puede efectuar por cualquier medio adecuado, tal como al usar agua, siempre que la temperatura no exceda nunca

30 grados C. La temperatura durante el choque osmótico está preferiblemente entre 4 y 30 grados C, entre 5 y 25 grados C o entre 15 y 25 grados C. En una realización, se usa agua desmineralizada para dar a las algas marinas un choque osmótico. El agua desmineralizada se usa preferiblemente en una relación de algas:agua de 1:1 a 1:10, basado en el peso las algas húmedas. El tratamiento de choque osmótico dura típicamente de 5 a 60 minutos, preferiblemente de 5 a 20 minutos.

Antes de que se sometan al choque osmótico, las algas se pueden dimensionar en fragmentos pequeños, por ejemplo al cortarlas o trocearlas o ponerlas en una mezcladora o cortadora. En una realización, las algas se dimensionan en fragmentos pequeños en agua desmineralizada, lo que significa que se dimensionan en fragmentos pequeños mientras se someten al choque osmótico.

Directamente o casi directamente después de la recolección, y antes de que se sometan a un choque osmótico, las algas se pueden lavar para retirar pequeña vida marina, tal como peces, crustáceos y cangrejos, y para retirar residuos, tales como plástico, madera a la deriva o boyas. Para el lavado, por ejemplo, se puede usar un exceso de agua marina de una temperatura entre 4 y 30 grados C.

Directamente o casi directamente después de la recolección, y antes de que se sometan a un choque osmótico, se puede retirar agua marina adherida. El agua marina adherida se puede retirar mediante centrifugación a baja velocidad a fin de no dañar las algas. En una realización, el agua marina adherida se retira mediante centrifugación a 100-500 rpm, preferiblemente a de 100 a 200 rpm o 200-300 rpm.

En el contexto de la presente invención, el término "algas" se refiere a un grupo de organismos acuáticos eucarióticos fotosintéticos unicelulares o multicelulares que viven en o bajo el mar, agua salobre o agua dulce y que contienen diversos compuestos bioactivos que se usan en la agricultura, la industria cosmética, la industria de alimentos o piensos o en la industria farmacéutica. En particular, las algas marinas son ricas en polisacáridos que muestran actividades antimicrobiana, antioxidante o antiviral. Las algas marinas contienen moléculas valiosas, tales como proteínas, vitaminas, elementos esporulantes, polifenoles, yodo, ácido algínico y derivados, carrageninas, clorofilas, carotenoides y agar. El método según la invención se puede usar para procesar algas, en particular algas marinas, también denominadas algas de mar o macroalgas, tales como algas rojas (*Rhodophyta*), algas verdes (*Chlorophyta*) y algas marrones (*Ochrophyta*, *Phaeophyceae*). Algas que se pueden usar en el método según la invención incluyen pero no se limitan a especies de *Alaria*, especies de *Ascophyllum*, especies de *Caulerpa*, especies de *Chondrus*, especies de *Durvillaea*, especies de *Enteromorpha*, especies de *Fucus*, especies de *Gracilaria*, especies de *Laminaria*, especies de *Pelvetia*, especies de *Pyropia*, especies de *Porphyra*, especies de *Sargassum*, especies de *Saccharina*, especies de *Ulva* y especies de *Undaria*. De particular interés son *Ascophyllum nodosum*, *Chondrus crispus*, *Enteromorpha intestinalis*, *Fucus spiralis*, *Fucus vesiculosus*, *Gracilaria bursa-pastoris*, *Gracilaria crassa*, *Gracilaria dura*, *Gracilaria longa*, *Gracilaria verrucosa*, *Laminaria digitata*, *Laminaria ochroleuca*, *Laminaria pallida*, *Lessonia nigrescens*, *Macrocystis integrifolia*, *Macrocystis pyrifera*, *Nemacystus decipiens*, *Nereocystis luetkeana*, *Palmaria palmata*, *Porphyra purpurea*, *Porphyra umbilicalis*, *Saccharinajaponica*, *Saccharina latissima*, *Saccharina longicuris*, *Saccharina sessilis*, *Sargassum filipendula*, *Sargassum fusiforme*, *Sargassum muticum*, *Ulva intestinalis*, *Ulva compressa*, *Ulva lactuca* y *Undaria pinatifida*. Una o más de las especies anteriores o una combinación de dos o más de las especies mencionadas se pueden procesar en el método según la invención. En una realización preferida, se procesan algas verdes, en particular especies de *Ulva*, más en particular *Ulva lactuca*.

Antes de las dos a tres horas después de la recolección, la biomasa algácea rota se trata con una composición que comprende enzimas degradadoras de la pared celular. La composición se usa para liberar proteínas conectadas o asociadas con otra masa celular, tal como paredes celulares y orgánulos celulares. La composición enzimática puede comprender al menos 0,10% p/p de enzimas degradadoras de la pared celular basado en el peso total de la composición enzimática, por ejemplo de 0,10% p/p a 100% p/p, de 0,20% p/p a 95% p/p, de 0,50% p/p a 90% p/p, de 1,0% p/p a 90% p/p, de 1,0% p/p a 10% p/p, de 1,0% p/p a 20% p/p, de 10% p/p a 20% p/p, de 20% p/p a 65% p/p, de 70% p/p a 95% p/p o de 80% p/p a 95% p/p, todo basado en el peso total de la composición enzimática. La composición enzimática también puede consistir en enzimas degradadoras de la pared celular.

Enzimas degradadoras de la pared celular adecuadas que pueden estar presentes en la composición enzimática incluyen pero no se limitan a celulasas (EC 3.2.1.4), xilanasas (EC 3.2.1.8 y EC 3.2.1.32), beta-glucanasas (EC 3.2.1.6), amilasas (EC 3.2.1.1 y EC 3.2.1.2), fitasas (EC 3.1.3.8 y EC 3.1.3.26), fosfolipasas (PLA1, PLA2, PLB, PLC, PLD, EC 3.1.1.4, EC 3.1.4.11 y EC 3.1.4.4) y poligalacturonasas (EC 3.2.1.15). La enzima degradadora de la pared celular puede ser la principal actividad en la composición enzimática, o la enzima degradadora de la pared celular puede ser una actividad lateral o secundaria en la composición enzimática. La composición enzimática comprende una o más de estas enzimas degradadoras de la pared celular. El experto entenderá que la mezcla óptima de enzimas puede variar entre tipos de algas y estaciones. Por lo tanto, cualquier mezcla de enzimas degradadoras de la pared celular se puede usar siempre que se use sobre algas frescas o recolectadas recientemente. Las algas rotas se pueden tratar con una composición enzimática que comprende una combinación de una celulasa, una endoxilanasas, una beta-glucanasa, una alfa-amilasa, una beta-amilasa, una fitasa, una poligalacturonasa y una fosfolipasa PLA2. La biomasa algácea rota también se puede tratar con una composición enzimática que comprende una fitasa (EC 3.1.3.8) y una fosfolipasa (PLA1, PLA2, PLB, PLC, PLD, EC 3.1.1.4, EC 3.1.4.11 y EC 3.1.4.4). La

biomasa algácea rota se puede tratar con una composición enzimática que comprende una endoxilanas (EC 3.2.1.8) y una fosfolipasa (PLA1, PLA2, PLB, PLC, PLD, EC 3.1.1.4, EC 3.1.4.11 y EC 3.1.4.4). Se puede usar una composición enzimática que comprende enzimas con una actividad hacia celulosa, xilano, beta-glucano, amilasa, fitasa, pectina, ácido galacturónico o fosfolípidos. Alternativamente, se puede usar una composición enzimática que comprende beta-glucanasa, fitasa, poligalacturonasa y fosfolipasa. Se puede usar una composición enzimática que comprende poligalacturonasa con una actividad de al menos 20.000 AVJP/g; endo-1,3-betaglucanasa con una actividad de al menos 80 BGLU/g; betaglucanasa fúngica con una actividad de al menos 100.000 BGF/g; amilasa bacteriana con una actividad de al menos 7500 U/g; fitasa con una actividad de al menos 5000 FTU/g; fosfolipasa A2 y una xilanas. Antes del uso, estas enzimas se mezclan en una relación de 1:1:1:1:1 y la mezcla se dosifica en 500 ml por 1000 kg de biomasa al 100% de materia seca. Estas enzimas están disponibles comercialmente, por ejemplo de DSM, Delft, Países Bajos.

Las enzimas degradadoras de la pared celular en la composición enzimática se pueden obtener mediante aislamiento, tal como de una planta, hongos o bacterias, mediante síntesis de novo o mediante mutagénesis de una enzima conocida.

Las enzimas degradadoras de la pared celular se usan para liberar parte de o todas las proteínas intracelulares, incluyendo las conectadas o asociadas con otra masa celular. En una realización, se libera al menos 30% p/p, al menos 40% p/p, al menos 50% p/p, al menos 60% p/p, al menos 70% p/p, al menos 80% p/p, al menos 90% p/p, tal como entre 30% p/p y 60% p/p, entre 45% p/p y 70% p/p o entre 50% y 90% p/p de la proteína intracelular.

Se puede usar cualquier dosificación adecuada de preparación enzimática. Se puede usar de 0,001% p/p a 5% p/p, de 0,005% p/p a 2% p/p o de 0,01% p/p a 1% p/p de composición enzimática degradadora de la pared celular por 1000 kg de biomasa al 100% de materia seca. El contenido de materia seca de las algas se puede determinar mediante cualquier método conocido en la técnica y típicamente comprende retirar toda la humedad en una muestra de las algas o las algas mediante evaporación de agua, por ejemplo al secar una muestra representativa de algas en un horno y pesar la muestra antes y después del secado.

Dependiendo de la dosificación de la enzima, pueden emplearse aproximadamente de 5 minutos a 50 horas, de 30 minutos a 48 horas, de 6 horas a 24 horas, de 18 horas a 30 horas o de 30 horas a 50 horas para disponer de parte o la totalidad de las proteínas intracelulares. La biomasa algácea rota se puede tratar enzimáticamente durante de 24 horas a 48 horas. Durante el tratamiento enzimático, la temperatura no supera 30 grados C y está preferiblemente entre 4 y 30 grados C, entre 5 y 25 grados C o entre 15 y 25 grados C.

No hay necesidad de ajustar el pH en ninguna de las etapas del procedimiento. Se usa el pH según está y está típicamente en el intervalo de pH 5,5 a pH 7,5, por ejemplo pH de 6,0 a 7,5.

Después del tratamiento enzimático, los sólidos y la fase líquida se separan (etapa (iii)), preferiblemente mediante centrifugación o filtración. Usando centrifugación, se obtienen una pella y un sobrenadante que contiene proteína. Usando filtración, se obtienen un retenido y un filtrado que contiene proteína.

La proteína se puede retirar del sobrenadante o el filtrado, típicamente mediante concentración. La concentración puede ser mediante cualquier medio adecuado tal como mediante ultrafiltración, centrifugación, precipitación o nanofiltración, siempre que la temperatura no supere 30 grados C y esté preferiblemente entre 4 y 30 grados C, entre 5 y 25 grados C o entre 15 y 25 grados C. La proteína concentrada se puede almacenar hasta el uso. La proteína concentrada se puede transportar fácilmente a otra localización, por ejemplo a la costa si la recolección y el procesamiento tenían lugar mar adentro. La proteína que se aísla de algas frescas tiene mejor funcionalidad que las proteínas algáceas comerciales, que frecuentemente se preparan a partir de algas secadas, y se puede usar en aplicaciones conocidas para proteínas o proteínas algáceas, tales como en la industria alimentaria, en la industria de los piensos, en la industria cosmética o en la industria farmacéutica, por ejemplo como un agente espumante, agente gelificante, espesante, emulsionante, colorante, pigmento, antioxidante o agente antimicrobiano.

Opcionalmente, la proteína se seca, mar adentro o en tierra firme, preferiblemente mediante un método de secado instantáneo, tal como secado por pulverización. En una realización, la proteína se seca instantáneamente mediante secado por pulverización usando una cámara secadora (Sanovo technology A/S, Odense, Dinamarca). Condiciones adecuadas para el secado en cámara son, por ejemplo, una temperatura de entrada en el intervalo de 175 a 185 grados C y una temperatura de salida en el intervalo de 90 a 97 grados C. La proteína se puede concentrar antes de o durante el secado.

Usando el método según la invención, la proteína se puede obtener con altos rendimientos, tal como, por ejemplo, se puede obtener un rendimiento de al menos 65% p/p, al menos 70% p/p, al menos 75% p/p, al menos 80% p/p, al menos 85% p/p o al menos 90% p/p, basado en la proteína total en las algas frescas.

La fase sólida obtenida en la etapa (iii) después de la separación de la proteína, por ejemplo pella o retenido, contiene carbohidratos, incluyendo azúcares, grasas, aceites y minerales. Los carbohidratos, que son los principales constituyentes de la fase sólida, se pueden usar para la producción de energía renovable, tal como biogás, bioetanol

o bioplástico. Los minerales se pueden usar como un fertilizante. Las grasas y aceites se pueden usar para aplicación alimentaria, a piensos, cosmética o farmacéutica. Después de la extracción de la proteína, la biomasa restante se puede usar así para una revalorización.

Se han publicado muchos métodos adecuados para producir biogás a partir de biomasa mediante digestión anaeróbica, tales como procedimientos en un paso, usando un reactor, y procedimientos en dos pasos, usando dos reactores, incluyendo ambos procedimientos las etapas de (a) hidrólisis y acidificación y (b) acetogénesis o metanogénesis. En los procedimientos en dos pasos, la etapa (a) y (b) se realizan en reactores o compartimentos separados. Estas etapas se pueden realizar ambas microbianamente. Alternativamente, la etapa (a) se realiza enzimáticamente, usando una preparación enzimática, y la etapa (b) se realiza microbianamente, por ejemplo según se describe en el documento WO2013/000928. En una realización preferida para la producción de biogás, la fase sólida restante después de la extracción de proteína se somete a un procedimiento en dos pasos y en primer lugar se somete a un tratamiento enzimático antes de la digestión microbiana mediante organismos metanogénicos. Enzimas degradadoras de carbohidratos adecuadas que pueden estar presentes en la composición enzimática incluyen pero no se limitan a amilasas (EC 3.2.1.1 y EC 3.2.1.2), glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4), celulasas (EC 3.2.1.4), xilanasas (EC 3.2.1.8 y EC 3.2.1.32), beta-glucanasas (EC 3.2.1.6), fitasas (EC 3.1.3.8 y EC 3.1.3.26), fosfolipasas (PLA1, PLA2, PLB, PLC, PLD, EC 3.1.1.4, EC 3.1.4.11 y EC 3.1.4.4) y poligalacturonasas (EC 3.2.1.15). La composición enzimática puede comprender una o más enzimas degradadoras de carbohidratos. El experto entenderá que la mezcla óptima de enzimas puede variar entre tipos de algas y estaciones. Por lo tanto, se puede usar cualquier mezcla de enzimas degradadoras de carbohidratos siempre que se use sobre la biomasa obtenida después de la extracción de la proteína a partir de algas frescas o recolectadas recientemente. La enzima degradadora de carbohidratos de la célula puede ser la principal actividad en la composición enzimática, o la enzima degradadora de carbohidratos puede ser una actividad lateral o secundaria en la composición enzimática. Todas las enzimas están disponibles comercialmente, por ejemplo de DSM, Delft, Países Bajos. Se puede usar cualquier dosificación adecuada de preparación enzimática. Se puede usar una mezcla de enzimas que comprende una celulasa con una actividad de al menos 3500 CMC U/g, una glucanasa con una actividad de al menos 100.000 BGF/g, a xilanasas con una actividad de al menos 120.000 AVJP/g y una fitasa con una actividad de al menos 5000 FTU/g, preferiblemente que comprende las enzimas en una relación en peso de 1:2:2:1 y la mezcla dosificada en 0,05 ml por kg de peso húmedo de biomasa después de la extracción de la proteína.

Preferiblemente, la hidrólisis enzimática de los carbohidratos y la digestión microbiana tienen lugar en reactores separados o compartimentos separados. Se puede usar cualquier configuración adecuada del reactor para la producción de biogás según la invención, por ejemplo un reactor de depósito agitado continuamente (CSTR), un reactor discontinuo secuencial (SBR) o un biorreactor de membrana anaeróbico (AnMBR). Preferiblemente, se usan sistemas más sofisticados tales como un manto de lodo anaeróbico de flujo ascendente (UASB) o un lecho de lodo granular expandido (EGSB).

La producción de biogás a partir de algas frescas de las que se ha retirado en primer lugar la fracción proteínica es muy ventajosa, debido a que puede conducir a rendimientos de biogás superiores y a un biogás más puro que contiene menos impurezas nitrogenadas, en comparación con procedimientos de obtención de biogás convencionales en los que la proteína no se ha retirado antes del tratamiento enzimático. Los rendimientos de biogás pueden ser del orden de 250 a 600 Nm³, tal como de 300 a 500 Nm³ o de 400 a 500 Nm³ de biogás/1000 kg de peso seco al 100% de algas en de 60% a 80%, tal como 70% de metano, después de aproximadamente 12 horas de tiempo de permanencia. En una realización, se producían 460 Nm³ de biogás/1000 kg de peso seco al 100% de algas marinas en 70% de metano a las 12 horas de tiempo de permanencia.

Por lo tanto, también se describe biogás puro producido a partir de algas marinas frescas después de la retirada de la mayoría o la totalidad de la proteína algácea.

El experto entenderá que la proteína se puede extraer o no de la fase líquida que contiene proteína después de la separación de la fase sólida para la producción de biogás. En cualquier caso, se obtendrá biogás puro. Por lo tanto, en una realización, la invención se refiere a un método de

(i) someter las algas a un choque osmótico;

(ii) tratar las algas sometidas a choque con una composición enzimática que comprende enzimas degradadoras de la pared celular;

(iii) separar las algas tratadas enzimáticamente en una fase sólida y una fase líquida, donde el tratamiento enzimático de las algas se inicia en las tres horas después de la recolección y la temperatura en la etapa (i) a la etapa (iii) está en el intervalo de 4 a 30 grados C

(iv) someter la fase sólida obtenida en la etapa (iii) a un procedimiento de digestión anaeróbica en dos pasos que comprende la hidrólisis con una preparación de enzimas degradadoras de carbohidratos seguido por metanogénesis microbiana,

(v) opcionalmente, recuperar proteína de la fase líquida obtenida en la etapa (iii).

El biogás se produce preferiblemente mediante un procedimiento en dos pasos que comprende la hidrólisis enzimática de la fase sólida usando una enzima carbohidrasa seguido por metanogénesis microbiana. Alternativamente, la fase sólida se puede convertir en gas de síntesis usando procedimientos de gasificación conocidos en la técnica.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una preparación de proteína algácea que se puede obtener mediante un procedimiento según la invención, es decir a partir del procesamiento de algas frescas. La preparación de proteína algácea obtenida a partir de algas frescas tendrá buenas propiedades funcionales de la proteína, tales como, por ejemplo, solubilidad. Su solubilidad típicamente es mejor que, tal como dos veces o tres veces, la solubilidad de proteína preparada a partir de algas marinas conservadas, tal como secadas. La preparación proteínica obtenida a partir de algas frescas puede tener una solubilidad de al menos 55% p/p, al menos 60% p/p, al menos 65% p/p o al menos 70% p/p, basado en la proteína total llevada a dispersión a un pH en el intervalo de pH 3 a 10. La solubilidad también es buena en presencia de NaCl y típicamente mejor que, tal como tres veces o cuatro veces, la solubilidad de proteína preparada a partir de algas marinas conservadas, tal como secadas. La preparación proteínica obtenida a partir de algas frescas puede tener una solubilidad de al menos 55% p/p, al menos 60% p/p, al menos 65% p/p, al menos 70% p/p, al menos 75% p/p o al menos 80% p/p en presencia de NaCl, basado en la proteína total llevada a dispersión. La proteína según la invención puede tener una solubilidad de 1 mg/ml a cualquier concentración de NaCl en el intervalo de 0,05 a 3% p/v de NaCl. La proteína según la invención puede tener una solubilidad de al menos 55%, p/p al menos 60% p/p, al menos 65% p/p, al menos 70% p/p, al menos 75% p/p o al menos 80% p/p a cualquier pH en el intervalo de pH 3 a 10 y una solubilidad de al menos 55% p/p, al menos 60% p/p, al menos 65% p/p, al menos 70% p/p, al menos 75% p/p o al menos 80% p/p en presencia de 0,05 a 3% p/v de NaCl. La solubilidad a diferentes valores de pH o concentraciones de NaCl se puede determinar, por ejemplo, al dispersar una cierta cantidad de producto seco en agua desmineralizada, a continuación fijar el pH con ácido fosfórico o hidróxido sódico, o a continuación fijar las concentraciones de sal con NaCl, y posteriormente centrifugar las dispersiones/soluciones. A continuación, la proteína solubilizada se puede medir en el sobrenadante, por ejemplo al usar un estuche comercial, tal como un Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Bleiswijk, Países Bajos) y medir la absorción a 562 nm en un espectrómetro. La proteína puede tener un punto isoeléctrico a un pH en el intervalo de 7,5 a 8,5.

El experto entenderá que la composición exacta de aminoácidos de la proteína obtenida puede variar con el tipo de alga marina, pero la proteína según la invención puede tener altos niveles de asparagina o glutamina, por ejemplo al menos 10% p/p o al menos 15% p/p basado en el peso de los aminoácidos totales. También puede tener cantidades sustanciales de glicina, prolina o alanina, por ejemplo al menos 5% p/p, al menos 7% p/p o al menos 10% p/p basado en el peso de los aminoácidos totales.

La proteína también puede tener buenas propiedades nutritivas así como funcionales, tales como propiedades espumantes, emulsionantes o de unión a agua, y se puede usar en muchas aplicaciones, en particular en aplicaciones alimentarias, farmacéuticas y cosméticas, así como piensos.

Se describe una proteína o preparación proteínica algácea que comprende dos o más de las siguientes características:

- a) comprender al menos 10% p/p o al menos 15% p/p de asparagina o glutamina, basado en el peso de los aminoácidos totales;
- b) comprender al menos 5% p/p, al menos 7% p/p o al menos 10% p/p de glicina, prolina o alanina, basado en el peso de los aminoácidos totales;
- c) comprender una solubilidad de al menos 55% p/p, al menos 60% p/p, al menos 65% p/p, al menos 70% p/p, al menos 75% p/p o al menos 80% p/p a cualquier pH en el intervalo de pH 3 a 10;
- d) una solubilidad de al menos 55%, p/p al menos 60% p/p, al menos 65% p/p, al menos 70% p/p, al menos 75% p/p o al menos 80% p/p a cualquier concentración de NaCl en el intervalo de 0,05 y 3% p/v de NaCl;
- e) comprender una solubilidad de al menos 1 mg/ml a cualquier concentración de NaCl en el intervalo de 0,05 y 3% p/v de NaCl;
- f) comprender un punto isoeléctrico a un pH en el intervalo de pH 7 a pH 9;
- g) comprender propiedades emulsionantes comparables a la proteína del huevo.

La proteína o preparación proteínica algácea según la invención tendrá todas estas características.

Se describe un dispositivo 1 (Fig. 1) para procesar algas según el método de procesamiento de la invención. El dispositivo 1 es móvil y por lo tanto se puede mover hasta o ser trasladado al emplazamiento de la recolección. El dispositivo comprende una unidad 2 de recolección para recolectar, purificar y lavar; una unidad 3 de procesamiento para la digestión enzimática de la cosecha; y una unidad 4 de recuperación para el aislamiento y la concentración de la proteína. El dispositivo puede comprender además opcionalmente una unidad 6 de procesamiento de digestión anaeróbica, una unidad 7 de recuperación para la recuperación y opcionalmente la concentración de los productos procedentes de 6 y una unidad 5 de formulación para la formulación de los productos procedentes de las unidades 4 o 7 de recuperación. El dispositivo puede comprender o estar instalado dentro de, en, sobre o hacia una unidad móvil que puede estar navegando o se puede remolcar hasta lugares en los que florecen, crecen o se cultivan algas, por ejemplo hasta un barco, una barcaza o un contenedor. De este modo, las algas se pueden recolectar en un emplazamiento específico en el que las algas están presentes en un cierto momento del año.

Se describe un método para procesar algas, donde el método comprende

- (i) someter las algas a un choque osmótico;
 - (ii) tratar las algas sometidas a choque con una composición enzimática que comprende enzimas degradadoras de la pared celular;
 - (iii) separar las algas tratadas enzimáticamente en una fase sólida y una fase líquida, donde el tratamiento enzimático de las algas se inicia en las tres horas posteriores a la recolección, y la temperatura en la etapa (i) a (iii) está en el intervalo de 4 a 30 grados C;
 - (iv) secar la fase líquida de la etapa (iii) para obtener la proteína, preferiblemente mediante secado por pulverización;
 - (v) opcionalmente, usar la fase sólida obtenida en la etapa (iii) para producir biogás, bioplástico o bioetanol,
- donde la etapa (i) a la etapa (v) se llevan a cabo mar adentro en un dispositivo móvil.

EJEMPLOS

Materiales y Métodos

Preparación enzimática A

La preparación enzimática usada para liberar contenido de la célula contenía las siguientes enzimas (todas de DSM, Delft, Países Bajos, excepto cuando se indique lo contrario):

- 2 ml de celulasa (Filtrase BRX)
- 2 ml de xilanasa (Filtrase NLC),
- 2 ml de amilasa (MATS classic),
- 2 ml de fitasa (Phytase 5000L),
- 2 ml de fosfolipasa A2 (Purifinae PLA2) y
- 90 ml de agua desmineralizada
- 2 g de beta-glucanasa/endoxilanas (Battong, Oenobrand, Montferrier-sur-lez, Francia) que se disolvieron bajo agitación suave en las enzimas mencionadas anteriormente en forma líquida.

Para una preparación enzimática diluida, la preparación enzimática se diluyó con agua desmineralizada.

Ejemplo 1 Procesamiento de algas verdes usando el método según la invención

Se recolectaron algas verdes (*Ulva Lactuca*, 5 kg) frescas y se lavaron usando un exceso de agua marina fresca de una temperatura máxima de 20 grados C. El agua ligada se retiró mediante centrifugación a baja velocidad. A continuación, se añadieron 5 litros de agua desmineralizada refrigerada y la mezcla se trocó en un mezclador hasta que se obtenían fragmentos de aproximadamente 1 mm cuadrado. La biomasa cortada se dividió en dos partes. A una parte, el control, se añadieron 25 ml de agua desmineralizada. La otra parte se incubó con 25 ml de una preparación enzimática A diluida diez veces para la liberación del contenido celular en una hora después de la recolección.

Ambas partes se agitaron durante 24 horas a temperatura ambiente (realmente < 20C) y a continuación se centrifugaron a 4 grados C, 4500 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se recogió. La pella se resuspendió en agua desmineralizada, se centrifugó de nuevo y el sobrenadante se recogió y se añadió al primer sobrenadante. Los sobrenadantes recogidos se congelaron hasta un análisis adicional. El análisis adicional mostraba que el sobrenadante contenía proteína. Esto muestra que se puede aislar proteína de algas usando el procedimiento suave según la invención. La proteína se secó al secar por pulverización el sobrenadante y almacenar para un análisis adicional.

Ejemplo 2 Procesamiento de algas rojas usando el método según la invención

Se recolectaron algas rojas (*Gracillaria*, 5 kg) frescas y se lavaron usando un exceso de agua marina fresca de una temperatura máxima de 20 grados C. El agua ligada se retiró mediante centrifugación a baja velocidad y se cortaron en fragmentos de aproximadamente 1 mm cuadrado y se trataron adicionalmente como se describe en el Ejemplo 1, incluyendo el tratamiento enzimático en las dos horas posteriores a la recolección. Los sobrenadantes recogidos se congelaron hasta un análisis adicional. El análisis adicional mostraba que el sobrenadante procedente de *Gracillaria* contenía proteína. Además, otro tipo de algas rojas, *Chondrus*, frescas se recolectaron y se procesaron usando el protocolo que se describe en el Ejemplo 1, incluyendo el tratamiento enzimático en las dos horas posteriores a la recolección. Los sobrenadantes recogidos se congelaron hasta un análisis adicional. El análisis adicional mostraba que el sobrenadante procedente de *Chondrus* contenía proteína. Esto muestra que se puede aislar proteína de algas rojas usando el procedimiento suave según la invención.

Ejemplo 3 Procesamiento de algas marrones usando el método según la invención

Se recolectaron algas marrones (*Fucus*) frescas y se lavaron usando un exceso de agua marina fresca de una temperatura máxima de 20 grados C. El agua ligada se retiró mediante centrifugación a baja velocidad y se cortaron en fragmentos de aproximadamente 1 mm cuadrado y se trataron adicionalmente como se describe en el Ejemplo 1, incluyendo el tratamiento enzimático en las dos horas posteriores a la recolección. Los sobrenadantes recogidos se

congelaron hasta un análisis adicional. El análisis adicional mostraba que el sobrenadante contenía proteína. Este ejemplo muestra que el procedimiento según la invención también se puede usar para el aislamiento de proteína a partir de algas marrones.

5 **Ejemplo 4 Procesamiento a gran escala de *Ulva* fresca para el aislamiento de proteína y la producción de biogás en un procedimiento en cascada.**

Se recolectaron algas verdes (*Ulva lactuca*, 76 kg) y se lavaron usando un exceso de agua marina fresca de una temperatura máxima de 20 grados C. El agua ligada se retiró mediante centrifugación a baja velocidad. Porciones de 1 kg de algas marinas se mezclaron con 1 litro de agua desmineralizada y se trocearon en un Robot Coupe Cutter R10 en fragmentos de aproximadamente 1 mm cuadrado. Con 1 litro adicional de agua desmineralizada las algas marinas troceadas se pusieron en un nuevo IBC de 1000 litros limpio. Los 76 kg totales de *Ulva* se incubaron durante 24 horas con 600 litros de agua desmineralizada bajo agitación suave constante en las tres horas después de la recolección. Al principio del período de incubación de 24 horas, se añadió la preparación enzimática A (500 ml de mezcla de enzimas / 1000 kg de biomasa de materia seca al 100%). Después del período de incubación, los sólidos de algas marinas restantes se retiraron mediante la filtración de la suspensión total sobre una estopilla plegada 4 veces. El filtrado, fracción que contenía proteína, líquido que pasaba a través de la estopilla se recogió y la proteína se secó al secar por pulverización el sobrenadante usando una cámara secadora (Sanovo technology A/S, Odense, Dinamarca) con una temperatura de entrada de 180 grados C y una temperatura de salida de 94 grados C. La proteína secada por pulverización se caracterizó entonces como se describe en los Ejemplos posteriores.

La eficacia de extracción de proteína mediante el método según la invención se presenta en la Tabla 1 y era aproximadamente 81% p/p basado en el peso seco y como porcentaje de proteína total presente en la materia prima. La proteína se midió usando el ensayo BCA (Thermo Scientific, Bleiswijk, Países Bajos).

Tabla 1

Materia prima (<i>Ulva</i> fresca)		Eficacia de extracción	Rendimiento (producto de GOA)	
76	kg de algas marinas			
14%	p/p de materia seca			
10,6	kg de materia seca		4,5	kg de polvo rico en proteína producidos
12%	de materia seca es proteína		23%	de proteína
1,28	kg de proteína presentes		1,04	kg de proteína producidos
		81% p/p		

A continuación, los sólidos retenidos, en la estopilla, se reincubaron durante 48 horas con preparación enzimática de carbohidrasa que comprende celulasa Methaplus L100 (> 3500 CMC U/g) / glucanasa; Axiase 100 (>120000 AVJP/g) / xilanasa; Filtrase NLC (>100000 BGF/g) y fitasa; Maxamyl P (> 5000 FTu/g) en una relación en peso de 1:2:2:1 (todas las enzimas de DSM. Delft, Países Bajos) y se dosificaron a 0,05 ml (mezcla) por kg de biomasa en peso húmedo después de la extracción de proteína, a fin de hidrolizar tanto como sea posible los carbohidratos de la solución. Estos sólidos hidrolizados se transfirieron a un digestor anaeróbico (EGSB-skid de Hydrothane) para la producción de biogás y una corriente acuosa rica en minerales, corriente mineral que se puede usar como un fertilizante. La conversión de biogás mostraba que no había necesidad de estabilizantes del pH ni de nutrientes adicionales y en un tiempo de permanencia de 12 horas se podía alcanzar un resultado de 460 Nm³ de biogás / 1000 kg de algas marinas al 100% en peso seco en metanol al 70%. Este es un rendimiento muy superior de lo que podría esperarse cuando se usaba un procedimiento totalmente microbiano, es decir sin tratamiento enzimático, o cuando se usaban algas marinas totales, sin extraer proteína en primer lugar.

Ejemplo 5 Análisis por SDS Page de la proteína de GOA aislada según el método de la invención.

La proteína secada por pulverización obtenida en el Ejemplo 4 se analizó usando SDS-PAGE. La electroforesis se realizó según Laemmli (1970) Nature 227:5259. Una muestra de proteína que se obtuvo a partir de *Ulva* después de secar el alga marina con aire caliente, triturarla en escamas y almacenarla durante ocho semanas antes de aislar la proteína (Hello Seaweed, Fuzhou Beautiful Agricultural development Co, China) se tomó como referencia. Para el análisis por SDS-PAGE, ambas muestras se expusieron a agua dulce. La muestra de algas marinas secada recibió pocas horas de tiempo de rehidratación y la muestra de GOA recibió la misma cantidad de tiempo para redisolverse, ambos bajo agitación suave.

Después de la centrifugación, la pella se descartó y el sobrenadante que contenía la proteína se recuperó. Una parte alícuota de cada muestra se pipeteó del sobrenadante, a continuación se diluyó con tampón de extracción (1,5% de SDS, 20% de glicerol y 0,01% de azul de bromofenol) hasta una concentración de proteína similar. Las bandas de proteína del gel se desarrollaron en un gel de tinción rápida listo para usar (SERVA electrophoresis GmbH, Alemania). El análisis del gel se realizó con un programa gratuito: GelAnalyzer 2010. Se usó un grupo de

marcadores de 6 kDa - 67 kDa. El análisis por SDS-PAGE mostraba que la muestra de proteína de GOA, obtenida a partir de alga marina *Ulva* fresca, contiene más proteínas con un tamaño molecular mayor de 40 kDa que la muestra de referencia de *Ulva* obtenida a partir de material seco. La muestra de GOA tiene casi dos veces la cantidad de proteína de 27-30 kDa y contiene menos proteína con un tamaño menor que el intervalo de 6 kDa (Tabla 2). Estos resultados indican que la muestra de proteína obtenida a partir de algas marinas frescas contiene más proteína intacta y menos proteína degradada que la muestra procedente de algas marinas secadas. Más proteína intacta también significa más proteína funcional. La degradación de proteína es perjudicial para propiedades funcionales tales como la emulsificación, la viscosidad y la gelificación por termoendurecimiento.

Tabla 2

Intervalo de kDa	Perfil de proteína de GOA (de <i>Ulva</i> frescas)	Perfil de proteínas (de <i>Ulva</i> secadas)	Relación material fresco frente a seco
58-62	2,5%	-	N.A
50-55	9,5%	8%	1,2
40-45	14%	7,5%	1,9
27-30	71%	39%	1,8
18-22	-	18,5 %	N.A
<6	3%	27%	0,1

Ejemplo 6 Composición de aminoácidos de la muestra de proteína según la invención

La composición de aminoácidos de la muestra de proteína seca por pulverización del Ejemplo 4 se determinó mediante hidrólisis ácida y HPLC y se presenta en la Tabla 3. La proteína contenía altos niveles de asparagina (15% de aminoácidos totales) y glutamina (20% de aminoácidos), así como cantidades sustanciales de glicina, prolina y alanina

Tabla 3

Aminoácido	g/kg	% del total
Triptófano		
Alanina	17,4	10,5
Arginina	4,3	2,6
Asparagina	25,1	15,1
Cisteína	2,7	1,6
Glutamina	34,1	20,6
Glicina	12,5	7,5
Hidroxiprolina	1,8	1,1
Histidina	1,7	1,0
Isoleucina	6,3	3,8
Leucina	6,6	4,0
Lisina	5,0	3,0
Metionina	2,1	1,3
Fenilalanina	6,9	4,2
Prolina	10,0	6,0
Serina	5,9	3,6
Treonina	6,5	3,9
Tirosina	5,9	3,6
Valina	10,9	6,6
TOTAL	165,7	100%

Ejemplo 7 Solubilidad de la proteína a diferentes valores de pH

Para analizar la solubilidad de la proteína de una muestra de proteína secada por pulverización obtenida en el Ejemplo 4 (muestra de GOA), 1 g de producto seco de la muestra de proteína de GOA se dispersó en 100 ml de agua desmineralizada. Una muestra obtenida a partir de Ulva secada y molida se probó en el mismo experimento. De la muestra de Ulva, se usaron 2 g de Ulva seca/100 ml de agua desmineralizada a fin de tener una cantidad comparable de carga de proteína en la prueba. Las dispersiones se graduaron a pH 3, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9 con ácido fosfórico (pH bajo) e hidróxido sódico (pH alto). A continuación, las dispersiones/soluciones se centrifugaron. Una parte alícuota de 100 microlitros se pipeteó desde los sobrenadantes en los respectivos tubos de ensayo y se diluyó hasta un intervalo de concentración adecuado para el análisis de proteínas solubles con un Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Bleiswijk, Países Bajos) usando un espectrómetro UV/VIS Shimadzu a 562 nm. Los mg/ml de proteína medidos se corrigen a continuación para el peso de muestra y el factor de dilución usados en el ensayo BCA. La solubilidad de las proteínas de algas marinas mostraba poca variación y era relativamente constante. La Tabla 4 es una comparación de las solubilidades de proteínas de Ulva y GOA y muestra claramente que la solubilidad de la muestra de proteína de GOA es de 3 a 12 veces superior que la solubilidad de la muestra de referencia de Ulva. La solubilidad media de la proteína es 5 veces superior para la muestra de proteína de GOA. Los resultados también muestran una variabilidad de 38% para Ulva frente a una variabilidad de solo 5% para GOA, indicando que Ulva es mucho más sensible al pH que GOA, mostrando Ulva una solubilidad mínima a pH 6. Esto significa que aislar la proteína de algas marinas frescas permite la preparación de una muestra de proteína con una solubilidad muy superior y que es mucho más constante a lo largo de todo el intervalo de pH que una muestra de proteína procedente de algas marinas secadas.

Tabla 4

pH	% de proteína soluble a partir de Ulva secadas	% de proteína soluble a partir de GOA frescas	relación frescas/secadas
3	22 - 24	75 - 77	3,3
4	16 - 18	78 - 80	4,6
4,5	13 - 15	73 - 76	5,3
5	16 - 18	76 - 77	4,5
6	5 - 7	73-74	12,1
7	11 - 13	72-73	6,0
8	18 - 19	66 - 69	3,7
9	26 - 28	75 - 77	2,8

Los resultados presentados también indican diferentes puntos isoelectricos para las tres muestras de proteína. Una caída en la solubilidad es indicativa de un punto isoelectrico. De este modo, el punto isoelectrico para la muestra de GOA alrededor de pH 8 y para la muestra de referencia de Ulva alrededor de pH 6. Estos resultados indican que aislar proteína de algas marinas frescas conduce a una proteína con un punto isoelectrico diferente y así un comportamiento de pH diferente en la aplicación.

Tabla 5

muestra	punto isoelectrico estimado (pH)
albúmina de huevo	4,5
Ulva secada	6
muestra de GOA invención	8

Ejemplo 8 Sensibilidad a la sal de la muestra de proteína procedente de algas marinas frescas

Para analizar la solubilidad de proteína en presencia de diferentes concentraciones de NaCl, 1 g de muestra de proteína secada por pulverización obtenida en el Ejemplo 4 (muestra de GOA) se dispersó en 100 ml de agua desmineralizada. Una muestra de albúmina de huevo (EA) y una muestra obtenida a partir de Ulva secada y molida se probaron en el mismo experimento como referencia. De la muestra de Ulva, 2 g se usaron a fin de tener una cantidad comparable de carga de proteína en la prueba. Las proteínas solubilizadas procedentes de GOA, Ulva y EA se diluyeron en agua desmineralizada para disminuir los efectos de la sal sobre la muestra. Las muestras diluidas se fijaron a continuación a concentraciones de NaCl de 0 - 3%. Las soluciones de proteína se centrifugaron y se pipetearon 100 µl desde los sobrenadantes de las muestras respectivas para el análisis de proteínas solubles con un Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Bleiswijk, Países Bajos) usando un espectrómetro UV/VIS de

Shimadzu a 562 nm. A continuación, los mg/ml de proteína medidos se corrigieron para el peso de muestra y el factor de dilución usados en el ensayo de BCA. Las medidas se realizaron por duplicado. A todas las concentraciones de sal, la muestra de proteína de GOA tiene una solubilidad muy superior que la muestra de Ulva. Para Ulva, de media, 44 ± 12 mg de proteína eran solubles frente a porcentajes de sal crecientes. Para GOA, 192 ± 11 mg de proteína eran solubles frente a porcentajes de sal crecientes. Los porcentajes de solubilidad en presencia de NaCl se muestran en la Tabla 6. Se puede apreciar que la solubilidad media de proteína es 4 veces superior para GOA que para Ulva, y que la variabilidad para Ulva es 27% frente a una variabilidad de solo 6% para GOA, indicando que Ulva es más sensible a cambios en la concentración de sal. Esto permite que una muestra de proteína obtenida según la invención, procedente de algas marinas frescas, tenga una solubilidad superior que muestras de proteína procedentes de algas marinas secadas, estabilidad que no se ve afectada por altas concentraciones de sal.

Tabla 6

% de NaCl	% de proteína soluble procedente de Ulva secadas	% de proteína soluble procedente de GOA frescas	relación frescas/secadas
0	20 - 20	77 - 79	3,9
0,1	25 - 27	83 - 85	3,2
0,5	20-21	74-75	3,6
1	11 - 13	69-70	5,8
1,5	28 - 29	80-82	2,8
2	15 - 15	76 - 77	5,1
2,5	20-21	77 - 79	3,8
3	18 - 19	72 - 74	4,0

Ejemplo 9 Preparación de una galleta esponjosa

Receta estándar (versión de galletas italianas): 9 gramos de huevo entero en polvo, 221 gramos de agua, 210 gramos de azúcar, 150 gramos de harina de trigo y 75 gramos de almidón de pata. El huevo entero en polvo se reemplazó por proteínas como soja, suero, girasol o la proteína de GOA según la invención. La mezcla se amasó en una masa usando un Hobart N50. La masa se cortó en círculos de 10 cm para formar la galleta. La masa se horneó en un horno a 180 grados C durante 22 minutos, hasta que las galletas tuvieran un agradable color dorado/amarillo. Las galletas se retiraron del horno y se dejaron enfriar. Las galletas preparadas a partir de proteína de algas marinas (GOA) tenían un aspecto muy agradable, comparable a las galletas de proteína de huevo entero. Las galletas de algas marinas (GOA) mantenían la forma redonda y no se desmenuzaban, a diferencia de las galletas procedentes de otras proteínas como proteína de soja, suero y girasol que se desmenuzaban cuando se tocaban o que tenían una superficie muy rugosa/irregular. Esto muestra que para la consistencia de la masa y las propiedades de horneado, la proteína de GOA (algas marinas) se puede usar como sustituto del huevo entero en polvo.

Ejemplo 10 Preparación de mayonesa al 75%

Se usó una receta estándar (grupo Sanovo de la industria del huevo); 15% de yema de huevo en polvo, 107 gramos de agua, 2 gramos de sal, 375 gramos de aceite (de colza) y 10 gramos de vinagre. Todos se añadieron suavemente y en orden consecutivo y se mezclaron al usar un mezclador rápido (Bosch 300W tipo 4179 o Hobart N50). La emulsión se almacenó durante 24 horas a 2-5 grados C para estabilizar. Después de 24 horas, se midió la viscosidad. Para comparación, la yema de huevo en polvo se reemplazó por proteína de GOA (algas marinas), proteínas de soja, guisante, girasol. También se probaron mezclas (50/50) de huevo entero en polvo / proteína de GOA (algas marinas).

La mayonesa procedente de la proteína de algas marinas (GOA) obtenida en el Ejemplo 4 era de buena consistencia. La emulsión de proteína de soja – mayonesa o la emulsión de proteína de guisante – mayonesa se rompe incluso antes de que se forme. Esto muestra que la proteína de GOA tiene buenas propiedades emulsionantes comparables a la yema de huevo. También muestra la buena capacidad de manejo con cuchara y extensión de la emulsión de proteína de GOA. Las mezclas de huevo entero en polvo/proteína de GOA no se comportaban peor que las proteínas puras individuales.

La principal diferencia observada para la proteína de GOA se mostraba en la sinéresis muy baja de la emulsión. La última muestra que la proteína de GOA forma emulsiones más estables en comparación con el huevo entero en polvo y claramente que las otras emulsiones probadas de proteína de soja, guisante o girasol. Después de 4 semanas de almacenamiento refrigerado a 2-5 grados C, todavía no existe sinéresis en la emulsión de proteína de GOA (algas marinas), mientras que todas las otras se han vuelto casi completamente líquidas. El experimento se detuvo debido a la formación de moho sobre todas las muestras.

En conclusión, a) una proteína aislada mediante el método según la invención permite una gran formación de emulsiones; b) las mezclas de proteína según la invención y huevo no deterioran las propiedades de la emulsión; c) las proteínas según la invención muestran una sinéresis muy inferior que proteínas probadas como proteína de soja, proteína de suero, proteína de girasol o proteína de guisante, lo que ofrece nuevas oportunidades para el uso de esta emulsión en aplicaciones alimentarias.

5

REIVINDICACIONES

1. Un método para procesar algas, comprendiendo el método:

- 5 (i) someter las algas a un choque osmótico
- (ii) tratar las algas sometidas a choque con una composición enzimática que comprende enzimas degradadoras de la pared celular;
- 10 (iii) separar las algas tratadas con enzima en una fase sólida y una fase líquida;

caracterizado por que el tratamiento enzimático de las algas se inicia en las tres horas posteriores a la recolección de las algas y la temperatura en la etapa (i) a la etapa (iii) está en el intervalo de 4 a 30 grados C.

15 2. Un método según la reivindicación 1, caracterizado por que el procesamiento de las algas tiene lugar a una temperatura en el intervalo de 5 a 25 grados C, preferiblemente en el intervalo de 15 a 25 grados C.

3. Un método según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que el choque osmótico dura de 5 a 20 minutos.

20 4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el pH durante el procesamiento no se ajusta y preferiblemente está entre pH 5,5 y 7,5.

5. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que las algas son algas marinas.

25 6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la composición enzimática degradadora de la pared celular comprende una o más de celulasas, xilanasas, beta-glucanasas, alfa-amilasas, beta-amilasas, fitasas, poligalacturonasas y fosfolipasas.

30 7. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el método comprende además secar la fase líquida de la etapa (iii) para obtener proteína, preferiblemente mediante secado por pulverización.

35 8. Un método según la reivindicación 7, caracterizado por que el rendimiento de proteína es al menos 70% p/p, basado en la proteína total en las algas.

9. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el método comprende además someter la fase sólida obtenida en la etapa (iii) a digestión anaeróbica para producir biogás.

40 10. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el biogás se produce a partir de la fase sólida obtenida en la etapa (iii) mediante un procedimiento de digestión anaeróbica en dos pasos que comprende la hidrólisis con una preparación de enzimas degradadoras de carbohidratos seguida por metanogénesis microbiana.

45 11. Un método según la reivindicación 10, caracterizado por que el método comprende además recuperar una corriente acuosa que contiene minerales de la digestión anaeróbica.

12. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el método comprende además

- 50 - convertir los carbohidratos de la fase sólida obtenida en la etapa (iii) en bioplástico o bioetanol, o
- aislar minerales, grasas o aceites de la fase sólida obtenida en la etapa (iii).

55 13. Proteína algácea obtenible mediante un método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

14. Proteína según la reivindicación 13, caracterizada por tener una solubilidad de al menos 60% p/p, basado en el peso de proteína total, a un pH en el intervalo de pH 2 a 10 o a una concentración de NaCl en el intervalo de 0,05 y 3% p/v de NaCl.

60 15. Uso de una proteína según la reivindicación 13 o 14 en la industria alimentaria, la industria de los piensos, la industria cosmética o la industria farmacéutica.

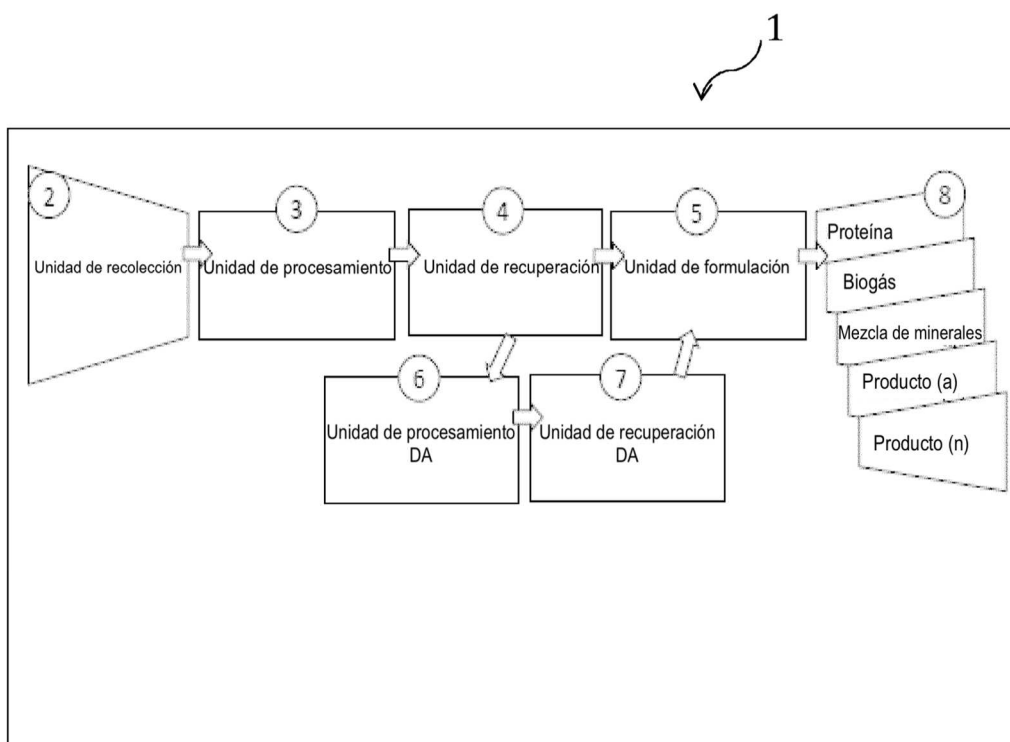


Fig. 1