

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 189**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/14** (2006.01)

**C07K 1/34** (2006.01)

**C07K 1/36** (2006.01)

**C07K 14/405** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.07.2015 PCT/FR2015/051941**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2016 WO16009146**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2015 E 15753723 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 3169696**

54 Título: **Procedimiento de extracción de proteínas solubles de biomásas de microalgas**

30 Prioridad:

**18.07.2014 FR 1456946**

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

**29.01.2020**

73 Titular/es:

**CORBION BIOTECH, INC. (100.0%)  
One Tower Place, Suite 600  
South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**PATINIER, SAMUEL**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 739 189 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

Procedimiento de extracción de proteínas solubles de biomásas de microalgas

La presente invención se refiere a un procedimiento de extracción de proteínas solubles de la biomasa de microalgas.

También se presentan los aislados de proteínas de microalgas obtenidos de este modo.

### 5 **Presentación del estado de la técnica**

Es bien conocido por el experto en la técnica que las clorelas son una fuente potencial de alimento, ya que son ricas en proteínas y otros nutrientes esenciales.

Se ha descrito que contienen un 45 % de proteínas, un 20 % de materias grasas, un 20 % de glúcidos, un 5 % de fibras y un 10 % de minerales y de vitaminas.

10 Dada su abundancia y su perfil de aminoácidos, las proteínas de microalgas se consideran, por tanto, una fuente alternativa a las proteínas de soja o de guisante en alimentación.

La fracción proteica también se puede valorar como agente funcional en la industria cosmética, incluso farmacéutica.

15 No obstante, los desarrollos en aplicaciones alimentarias de las proteínas de microalgas no han sido significativos, ya que la presencia, en dichas fracciones, de compuestos indeseables (tales como la clorofila) conduce a cambios no deseados de color, sabor y estructura de las composiciones alimentarias que las contienen.

Para aumentar su potencialidad en aplicaciones alimentarias y para aumentar también su valor comercial, estas proteínas deben, por lo tanto, ser extraídas de las microalgas sin afectar a su estructura molecular.

20 Por lo tanto, serían necesarias técnicas «suaves» de extracción para aislar las proteínas de gran solubilidad y de buenas propiedades técnico-funcionales, pero la rigidez de las paredes de las microalgas, concretamente de las microalgas verdes, se opone a ello fundamentalmente, ya que perturba la extracción y la integridad de las proteínas intracelulares.

Por tanto, por el contrario, se utilizan condiciones físicas o químicas clásicamente «duras» para romper la pared de las microalgas.

25 De este modo, numerosos estudios proponen tecnologías tales como la extracción por disolventes orgánicos u homogeneización a alta presión.

En estas elecciones tecnológicas, sin embargo, la desnaturalización de proteínas no se consideró un problema, ya que la mayoría de estos métodos se desarrollaron con fines analíticos o pretendían proporcionar un sustrato para la digestión enzimática que produce hidrolizados proteicos.

30 Ahora bien, un procedimiento de desintegración eficaz que preserve la integridad de los componentes celulares debe maximizar no solamente el rendimiento sino también la calidad de los productos extraídos.

En otras palabras, un procedimiento de desintegración optimizado de la pared debe evitar, por ejemplo:

- la contaminación química de los productos diana,
- la aplicación de una energía de ruptura demasiado grande; pudiendo esto ocasionar una degradación o desnaturalización irreversible de las moléculas intracelulares de interés.

35 Por otro lado, para producciones a gran escala, es importante que el procedimiento elegido sea extrapolable a esta escala.

Finalmente, la introducción de esta etapa de desintegración celular debe ser fácil y no debe tener un impacto negativo sobre las etapas de procedimiento/tratamiento posteriores.

40 Todas estas limitaciones influyen en la eficacia del procedimiento de desintegración y, por lo tanto, su consumo energético.

Esta es la razón por la cual se prefiere la tecnología de molienda con bolas, ya que está considerada eficaz para liberar las proteínas intracelulares en su forma nativa.

En un molino de bolas, las células se agitan en suspensión con pequeñas partículas esféricas. La rotura de las células es provocada por las fuerzas de cizallamiento, la molienda entre las bolas, y las colisiones con las bolas.

45 La descripción de un molino de bolas apropiado se realiza, por ejemplo, en la patente US 5.330.913. Estas bolas rompen las células para liberar su contenido celular. Se obtiene entonces una suspensión de partículas de menor

tamaño que las células originales en forma de una emulsión de «aceite en agua».

Esta emulsión generalmente se atomiza y el agua se elimina, dejando un polvo seco que contiene, no obstante, una mezcla heterogénea compuesta por restos celulares, por compuestos solubles intersticiales y por aceite.

5 La dificultad a resolver en el empleo de estas tecnologías de desintegración celular es el aislamiento del contenido intracelular en solitario (con la exclusión de los restos de membranas, de los azúcares, de las fibras y de las materias grasas) y la preservación, concretamente, de la calidad de la carga proteica.

En el caso de la microalga del género *Tetraselmis sp*, Anja Schwenzfeier *et al* (Bioresource Technology, 2011, 102, 9121 - 9127) propusieron un procedimiento que garantiza la solubilidad y la calidad del aminograma de las proteínas aisladas y con contaminantes eliminados (tales como las sustancias colorantes), que comprende las etapas siguientes:

- 10
- desintegración celular por molienda con bolas,
  - centrifugación de la suspensión de microalgas molidas,
  - diálisis del sobrenadante,
  - pase sobre resina de intercambio iónico,
  - diálisis del eluato,
- 15
- decoloración, y a continuación
  - lavado y redisolución.

No obstante, este procedimiento de laboratorio (para tratar 24 g de biomasa) no es extrapolable a escala industrial, donde más bien se implementa el procedimiento de molienda con bolas para recuperar una biomasa completa.

20 Por otro lado, este procedimiento no está adaptado a las microalgas que contienen en su biomasa un contenido de lípidos no despreciable (por ejemplo en *Chlorella protothecoides*, el contenido de lípidos es de más del 15 %).

En efecto, incluso después de esta ruptura de la pared celular «relativamente suave», el material molido celular se presenta en forma de una emulsión compleja de «aceite en agua» relativamente estable.

La extracción de los componentes celulares se realiza, por lo tanto, más clásicamente en esta fase por disolvente o por vía mecánica, pero en detrimento de su integridad.

25 Una primera solución propuesta por el estado de la técnica, probada además por la compañía solicitante, consiste en acoplar la molienda mecánica con una evaporación con el fin de intentar desestabilizar la emulsión, y a continuación en separar la fracción grasa por centrifugación.

No obstante, la mala calidad de la etapa de separación (cremado grosero) hace a este procedimiento de desfase poco eficaz.

30 Incluso la adición de etanol, recomendada en esta fase (20 - 30 %/bruto), aunque mejora la desestabilización de la emulsión, solamente permite, no obstante, una deslipidación del orden del 50 %, y aun así con escaso rendimiento.

Por otro lado, la vía mecánica es particularmente difícil o incluso imposible de implementar cuando la fracción lipídica está vinculada a la matriz proteica/polisacáridica.

35 Otra solución propone utilizar disolventes neutros. Pero esta presenta grandes limitaciones (calidad, seguridad, reglamentación...). El documento WO2011/057406 describe un procedimiento de preparación de un aislado proteico de la biomasa de microalgas del género *Chlorella*, pero no discute la desestructuración de la emulsión.

### Objeto de la invención

40 Resulta que sigue habiendo una necesidad insatisfecha de disponer de una tecnología de extracción y de estabilización de los componentes celulares de las microalgas de interés, siendo dichos componentes celulares liberados por una molienda mecánica.

La compañía solicitante ha descubierto que esta necesidad se podía satisfacer proponiendo un procedimiento alternativo a los conocidos en el estado de la técnica, combinando un procedimiento de molienda mecánica de las células de microalgas con etapas de desestructuración de la fracción lipídica producida por un tratamiento seleccionado del grupo de los tratamientos alcalino y enzimático, seguido de una etapa de centrifugación.

45 La fracción soluble deslipidada se clarifica a continuación por microfiltración y a continuación se ultrafiltra para obtener el aislado de proteínas.

La presente invención se refiere, de este modo, a un procedimiento de preparación de un aislado proteico de la biomasa de microalgas del género *Chlorella*, que comprende las etapas siguientes:

- provisión de una biomasa de microalgas producida por fermentación,
- lavado de la biomasa para eliminar los compuestos solubles intersticiales y concentración,
- 5 - molienda mecánica de la biomasa lavada y concentrada, llevada a cabo en un sistema de tipo molino de bolas horizontal, para obtener una emulsión,
- desestructuración de la emulsión obtenida de este modo, mediante una de las etapas descritas en las reivindicaciones,
- 10 - separación trifásica para separar la fracción soluble de las fracciones que contienen los lípidos y los restos celulares,
- recuperación, y opcionalmente clarificación, de la fracción soluble obtenida de este modo, concretamente por microfiltración para eliminar de ella los insolubles residuales, con el fin de obtener el aislado proteico soluble,
- opcionalmente, ultrafiltración de la fracción soluble clarificada en una membrana de umbral de corte inferior a 5 kDa, preferiblemente comprendido entre 1 y 5 kDa con el fin de obtener un aislado proteico soluble,
- 15 - opcionalmente, neutralización a pH 7,
- evaporación, pasteurización y atomización de dicho aislado proteico.

Elección de la biomasa de microalgas

Preferiblemente, las microalgas del género *Chlorella* se seleccionan del grupo constituido por *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* y *Chlorella protothecoides*, y son, más particularmente, *Chlorella protothecoides*.

20 En una realización particular, la cepa es *Chlorella protothecoides* (cepa UTEX 250 - *The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin* – EE. UU.).

En otra realización particular, la cepa es *Chlorella sorokiniana* (cepa UTEX 1663 - *The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin* – EE. UU.).

25 El cultivo en condiciones heterotróficas y en ausencia de luz conduce clásicamente a la producción de una biomasa de clorelas que presenta un contenido de proteínas (evaluado por la medida de la tasa de nitrógeno N x 6,25) del 45 al 70 % en peso de células secas.

Como se ejemplificará más adelante, este cultivo se realiza en dos etapas:

- precultivo en un medio que contiene glucosa y extracto de levaduras durante 72 h a 28 °C con agitación, y a continuación
- 30 - cultivo para producción de la biomasa propiamente dicho en glucosa y extracto de levaduras durante más de 36 h a 28 °C, con agitación y a pH 6,5 regulado con amoníaco,

lo que conduce a aproximadamente 80 g/l de biomasa con un contenido de proteínas (evaluado por N x 6,25) del orden del 52 % en peso de células secas.

35 La biomasa se recoge a continuación por separación sólido-líquido, por filtración frontal o tangencial o por cualquier medio conocido, por otro lado, por el experto en la técnica.

De manera ventajosa, la compañía solicitante recomienda a continuación lavar y concentrar la biomasa para eliminar los compuestos solubles intersticiales mediante una sucesión de concentración (por centrifugación)/dilución de la biomasa.

40 A escala industrial, se elige ventajosamente proceder a una dilución en línea y separación por centrifugación en 1 o 2 fases.

En el sentido de la invención, se entiende por «compuestos solubles intersticiales» todos los contaminantes orgánicos solubles del medio de fermentación, por ejemplo los compuestos hidrosolubles tales como sales, glucosa residual, oligosacáridos de grado de polimerización (o DP) 2 o 3 o péptidos.

45 Esta biomasa purificada de este modo de sus compuestos solubles intersticiales se ajusta a continuación preferiblemente a una materia seca comprendida entre el 15 y el 30 % en peso, preferiblemente a una materia seca comprendida entre el 20 y el 30 %.

Para el resto del procedimiento de la invención, la biomasa obtenida de este modo se puede utilizar tal cual, o permeabilizada térmicamente (por un procedimiento de alta temperatura y tiempo corto - acrónimo anglosajón HTST - desarrollado, por otro lado, por la compañía solicitante y protegido en una de sus solicitudes aún no publicada) para liberar de ella el contenido de péptidos solubles.

5 Las proteínas residuales de esta biomasa se pueden extraer como resultado de las etapas siguientes.

Molienda de la biomasa

La compañía solicitante recomienda utilizar la tecnología «Bead Mill» (molino de bolas horizontal).

Más particularmente, la molienda se puede realizar ventajosamente según un procedimiento que la compañía solicitante ha desarrollado y protegido en una de sus solicitudes de patente aún no examinada, en el que:

- 10
- las bolas, de silicato de zirconio, presentan una densidad aparente comprendida entre 2 y 3,5 kg/l, y
  - la tasa de llenado de la cámara de molienda es superior o igual a 80 %.

En cuanto a la ejecución de la molienda, esta se realiza en modo continuo, por ejemplo por pases sucesivos en serie.

La densidad de las microalgas a moler se selecciona a una tasa inferior a 250 g/l.

Al terminar la molienda, se obtiene una emulsión.

15 Desestructuración de la emulsión y separación de sus componentes

La separación de los componentes de la emulsión con el fin de extraer de ella la fracción péptica o polipeptídica de interés necesita una desestructuración/desestabilización de la emulsión resultante de la molienda celular (mezcla compleja de lípidos, proteínas - péptidos y polipéptidos - y restos celulares).

Esta desestructuración/desestabilización de la emulsión se facilita:

- 20
- bien por predigestión enzimática, concretamente por proteasas específicas, por tratamiento con disolvente polar y/o por tratamiento alcalino dirigido a la fracción proteica de la emulsión,
  - o bien por ajuste del pH y de la temperatura, por tratamiento con un disolvente polar y/o por digestión enzimática, concretamente de tipo celulasa, dirigida a la interfase con la fracción lipídica de la emulsión.

25 De este modo, el material molido celular se condiciona en un reactor agitado equipado con un módulo de agitación de bajo cizallamiento, para limitar la emulsificación al tiempo que se permite una mezcla homogénea que favorece el tratamiento específico elegido (ajuste a pH, acción de la enzima lítica...).

Por ejemplo, en el caso de un tratamiento que pretende desestabilizar la emulsión tratando la fracción proteica en mezcla por vía enzimática, por ejemplo con una proteasa básica, la temperatura y el pH de la emulsión se ajustan a las condiciones de reacción de dicha proteasa:

- 30
- la temperatura se ajusta a un valor superior a 30 °C, preferiblemente del orden de 60 °C, y
  - el pH se ajusta a un valor superior a 7, preferiblemente del orden de 8 (incluso opcionalmente del orden de 10 si se aprovecha únicamente la acción del pH).

La duración de la reacción está comprendida entre 2 y 8 h.

35 A finalizar la lisis, se puede efectuar opcionalmente una adición de etanol a más del 5 % (v/v) en la mezcla de reacción como agente de desestabilización de la emulsión (en el caso de una forma de emulsión de aceite en agua).

La emulsión desestabilizada de este modo se puede romper (parcialmente) por separación trifásica, por ejemplo por centrifugación.

De este modo se obtienen 3 fases:

- 40
- un cremado lipídico superior,
  - una fase acuosa/compuestos solubles (e insolubles residuales) intermedios (= solubles «brutos»), y
  - un sedimento que concentra los restos celulares.

La fracción soluble está compuesta esencialmente por una fracción proteica mayoritaria, por azúcares solubles, por sales y por glóbulos lipídicos residuales.

Separación membranaria

Para liberar péptidos y polipéptidos, el procedimiento de la invención conduce a continuación al aislamiento de las proteínas de interés, preferiblemente por fraccionamiento membranario.

La compañía solicitante recomienda, de este modo, proceder en tres etapas:

- 5
- recuperación y clarificación de la fracción soluble obtenida de este modo por microfiltración para eliminar de ella los insolubles residuales,
  - ultrafiltración de la fracción soluble clarificada en una membrana de umbral de corte inferior a 5 kDa, preferiblemente comprendido entre 1 y 5 kDa, y
  - opcionalmente neutralización a un pH comprendido entre 6 y 8, preferiblemente a un valor de 7.

10 El aprovechamiento de estas vías permite purificar los péptidos y polipéptidos solubles de sus sales y azúcares residuales.

Precipitación al pHi

De manera alternativa, para aislar los péptidos y polipéptidos de interés, se puede elegir proceder en tres etapas:

- 15
- precipitación de las proteínas a su pHi, ajustando el pH del medio a un valor comprendido entre 4 y 5,
  - centrifugación o microfiltración con el fin de recuperar las proteínas precipitadas, y
  - solubilización en agua a un pH comprendido entre 6 y 8, preferiblemente 7.

Cabe destacar que estas dos últimas etapas, aunque permiten, según el procedimiento de la invención, obtener aislados de proteínas que tienen un contenido de proteínas de más del 80 %, preferiblemente de más del 90 % en peso, conducen, por sus modos de implementación, a composiciones de naturaleza distinta.

Obtención del aislado en forma de polvo

20 El aislado proteico en forma soluble obtenido de este modo puede ser:

- concentrado por evaporación,
- pasteurizado y finalmente
- atomizado.

La invención se entenderá mejor con ayuda de los siguientes ejemplos.

25

**Ejemplos**

Ejemplo 1: Producción de *Chlorella orotothecoides* en fermentación de tipo semidiscontinuo (fed-batch)

La cepa utilizada es *Chlorella protothecoides* UTEX 250.

Precultivo:

- 5 - 500 ml de medio en un Erlenmeyer de 2 l;
- Composición del medio (en g/l):

Tabla 1.

10	Macro elementos (g/l)	Glucosa	40
		K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3
		Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3
		MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,25
		(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1
		Ácido cítrico	1
		Clerol FBA3107 (antiespumante)	0,1
15	Microelementos y Vitaminas (mg/l)	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	30
		FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1
		MnSO <sub>4</sub> .1 H <sub>2</sub> O	8
		CoSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1
		CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,2
		ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
		H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,1
		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> - 2H <sub>2</sub> O	0,4
		Tiamina HCl	1
		Biotina	0,015
		B12	0,01
		Pantotenato de calcio	0,03
		Ácido p-aminobenzoico	0,06
		20	
25			

La incubación se desarrolla en las siguientes condiciones: duración: 72 h; temperatura: 28 °C; agitación: 110 rpm (Incubadora Infors Multitron).

El precultivo se transfiere a continuación a un fermentador de 30 l de tipo Sartorius.

Cultivo para producción de biomasa:

- 30 El medio es el siguiente:

Tabla 2.

5	Macro elementos (g/l)	Glucosa	40
		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8
		NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,4
		MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3,4
		(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,2
		Clerol FBA3107 (antiespumante)	0,3
10	Microelementos y Vitaminas (mg/l)	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	40
		FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	12
		MnSO <sub>4</sub> .1 H <sub>2</sub> O	40
		CoSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1
		CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,5
		ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	50
		H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	15
		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> - 2H <sub>2</sub> O	2
		Tiamina HCl	6
		Biotina	0,1
		B12	0,06
		Pantotenato de calcio	0,2
		Ácido p-aminobenzoico	0,2

20 El volumen inicial (Vi) del fermentador se ajusta a 17 l después de la siembra. Se lleva a de 20 a 25 l aproximadamente al final.

Los parámetros de ejecución de la fermentación son los siguientes:

Tabla 3.

25	Temperatura	28 °C
	pH	5,0 - 5,2 con NH <sub>3</sub> 28 % p/p
	pO <sub>2</sub>	20 % +/- 5 % (mantenida por agitación)
	Agitación	300 RPM mini
	Caudal de aire	15 l/min

30 Cuando la concentración residual de glucosa cae por debajo de 10 g/l, se realiza un aporte de glucosa en forma de una solución concentrada a 800 g/l aproximadamente para mantener el contenido de glucosa entre 0 y 20 g/l en el fermentador.

### Resultados

En 40 h, se obtienen 80 g/l de biomasa que contiene un 52 % de proteínas.

35 Ejemplo 2. Molienda de la biomasa de *Chlorella protothecoides* y recuperación de la fracción soluble - desestructuración de la emulsión por tratamiento de la fracción peptídica y polipeptídica

La biomasa obtenida según el ejemplo 1 se lava y se concentra por centrifugación para llevarla a una materia seca de 220 g/l y a una pureza de más del 90 % (pureza definida por la relación entre la materia seca de la biomasa respecto a materia seca total).

40 A continuación se muele por molienda con bolas (molino horizontal) con bolas de silicato de zirconio (0,6 mm de diámetro, densidad aparente de 2,4).

La biomasa molida se agita a continuación en un reactor equipado con una hélice marina y deflectores. La temperatura se ajusta a 60 °C y el pH a 8 con potasa. Una proteasa básica en combinación con una celulasa se añade al tiempo que se mantienen estas condiciones de reacción durante un periodo de 6 h.

5 La emulsión se centrifuga a continuación en centrífuga trifásica que permite obtener 3 fases: un cremado lipídico superior, una fase acuosa/compuestos solubles (e insolubles residuales) intermedios (= solubles «brutos») y un sedimento que concentra los restos celulares.

La fracción de solubles brutos se clarifica por microfiltración. El permeado «P1» de microfiltración titula entre el 55 y el 70 % de péptidos y proteínas (expresados en aminoácidos totales), y a continuación se ultrafiltra en una membrana de umbral de corte < 5 kDa.

10 El retenido «R2» de ultrafiltración obtenido de este modo contiene más del 80 % de péptidos que presentan un peso molecular superior o igual a 5 kDa.

El permeado «P2» contiene, por su parte, péptidos que presentan un peso molecular inferior a 5 kDa y oligosacáridos y sales residuales.

15 Este permeado «P2» puede filtrarse concretamente en membrana de ósmosis inversa (que presenta una tasa de rechazo en NaCl del 93 %), para obtener:

- un retenido «R3» que contiene péptidos que presentan un peso molecular inferior a 5 kDa y oligosacáridos de DP 2, tales como sacarosa; y
- un permeado «R3» que contiene oligosacáridos de DP1, sales, aminoácidos libres y ácidos orgánicos.

El aislado proteico «R2» a continuación:

- 20
- se neutraliza a pH 7 con potasa,
  - se concentra por evaporación al 35 % de materia seca (MS),
  - se pasteuriza y después
  - se atomiza.

25 Ejemplo 3. Molienda de la biomasa de *Chlorella orototrichoides* y recuperación de la fracción soluble - desestructuración de la emulsión por tratamiento de la fracción lipídica

Según la misma secuencia que el ejemplo 2, la biomasa molida se agita en un reactor equipado con una hélice marina y deflectores. La temperatura se ajusta a 50 °C sin ajuste de pH (naturalmente entre 5 y 6).

Una celulasa que presenta una actividad óptima en este intervalo de pH y de temperatura se añade al tiempo que se mantienen estas condiciones de reacción durante un periodo de 6 h.

30 Al finalizar la reacción, el pH se ajusta a 8 previamente a la separación en 3 fases.

El resto de las operaciones se describe en el ejemplo 2.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de preparación de un aislado proteico de la biomasa de microalgas del género *Chlorella*, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:
  - provisión de una biomasa de microalgas producida por fermentación,
  - 5 - lavado de la biomasa para eliminar los compuestos solubles intersticiales y concentración,
  - molienda mecánica de la biomasa lavada y concentrada, llevada a cabo en un sistema de tipo molino de bolas horizontal, para obtener una emulsión,
  - desestructuración de la emulsión obtenida de este modo,
  - 10 - separación trifásica para separar la fracción soluble de las fracciones que contienen los lípidos y los restos celulares,
  - recuperación de la fracción soluble obtenida de este modo con el fin de obtener el aislado proteico soluble, y a continuación
  - evaporación, pasteurización y atomización de dicho aislado proteico, realizándose la desestructuración de la emulsión:
  - 15 - bien por predigestión enzimática, por tratamiento con disolvente polar y/o por tratamiento alcalino dirigido a la fracción proteica de la emulsión,
  - bien por ajuste del pH y de la temperatura, por tratamiento con un disolvente polar y/o por digestión enzimática dirigida a la interfase con la fracción lipídica de la emulsión.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que las microalgas del género *Chlorella* se seleccionan del grupo constituido por *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* y *Chlorella protothecoides*, y son más particularmente *Chlorella protothecoides*.
3. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por que la separación trifásica de la emulsión desestructurada se realiza por centrifugación.
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la obtención del aislado proteico soluble a partir de la fracción soluble se realiza por:
  - clarificación de dicha fracción soluble por microfiltración para eliminar de ella los insolubles residuales,
  - ultrafiltración de la fracción soluble clarificada en una membrana de umbral de corte inferior a 5 kDa, y
  - opcionalmente, neutralización a un pH comprendido entre 6 y 8, preferiblemente a un valor de 7.
- 5.- 5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la obtención del aislado proteico soluble a partir de la fracción soluble se realiza por:
  - precipitación de las proteínas a su pHi, ajustando el pH del medio a un valor comprendido entre 4 y 5,
  - centrifugación o microfiltración con el fin de recuperar las proteínas precipitadas, y
  - solubilización en agua a un pH comprendido entre 6 y 8, preferiblemente 7.