

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 108**

51 Int. Cl.:

| | |
|-------------------|-----------|
| A23L 17/60 | (2006.01) |
| A23K 10/00 | (2006.01) |
| A23K 30/15 | (2006.01) |
| A23K 40/00 | (2006.01) |
| A23L 29/00 | (2006.01) |
| A61K 36/05 | (2006.01) |
| C12N 1/12 | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2014 PCT/FR2014/051588**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2014 WO14207376**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2014 E 14750547 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017 EP 3019032**

54 Título: **Método para la producción de una biomasa de microalgas de calidad sensorial optimizada**

30 Prioridad:

26.06.2013 FR 1356110

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

07.08.2017

73 Titular/es:

**ROQUETTE FRÈRES (100.0%)
1 rue de la Haute Loge
62136 Lestrem, FR**

72 Inventor/es:

**DRUON, AMANDINE y
PATINIER, SAMUEL**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 629 108 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 la producción de una biomasa de microalgas de calidad sensorial optimizada

5 La presente invención se refiere a un método novedoso para producir una biomasa de microalgas del género *Chlorella* que permite la preparación de una harina que tiene un perfil sensorial optimizado. La presente invención por lo tanto permite la incorporación de esta harina de microalgas en formulaciones de alimentos sin generar gustos no deseables.

Presentación de la técnica anterior

Las algas, que históricamente han requerido "sólo agua y luz solar" para crecer, han sido consideradas desde hace mucho tiempo una fuente de alimentos.

10 Existen varias especies de algas que pueden utilizarse en alimentos, la mayoría siendo "microalgas" tales como alga marina, lechuga de mar (*Ulva lactuca*) y algas rojas del tipo *Porphyra* (cultivadas en Japón) o "dulce" (*Palmaria palmata*).

15 Sin embargo, además de estas microalgas, también hay otras fuentes de algas representadas por las "microalgas", es decir, algas microscópicas unicelulares fotosintéticas o no fotosintéticas, de origen marino y no marino, cultivadas para aplicaciones en biocombustibles o alimentos.

Por ejemplo, la espirulina (*Arthrospira platensis*) se cultiva en lagunas abiertas (en condiciones fototróficas) para su uso como un complemento de alimentos o se incorpora en pequeñas cantidades en productos de repostería o bebidas (generalmente menos de 0.5% de peso/peso).

20 Otras microalgas ricas en lípidos, incluyendo ciertas especies de *Chlorella*, también son muy populares en países asiáticos como complementos de alimentos (se hace mención de las microalgas que producen omega 3 del género *Cryptothecodinium* o *Schizochytrium*).

La producción y el uso de la harina de microalgas del tipo *Chlorella* se describen, por ejemplo, en los documentos WO 2010/120923 y WO 2010/045368.

25 La fracción de aceite de la harina de microalgas que puede estar compuesta esencialmente de aceites monoinsaturados puede proporcionar ventajas nutricionales y de salud en comparación con los aceites saturados, hidrogenados y poliinsaturados a menudo encontrados en productos alimenticios convencionales.

Cuando se desea producir industrialmente polvos de harina de microalgas a partir de la biomasa de dichas microalgas, persisten dificultades considerables, no sólo desde el punto de vista tecnológico, sino también desde el punto de vista del perfil sensorial de las harinas producidas.

30 En efecto, mientras que los polvos de algas, por ejemplo producidos con algas cultivadas fotosintéticamente en estanques exteriores o mediante fotobiorreactores, están comercialmente disponibles, tienen un color verde oscuro (asociado con la clorofila) y un sabor desagradable y fuerte.

35 Incluso formuladas en productos alimenticios o como complementos nutricionales, estos polvos de algas siempre proporcionan este color verde visualmente no atractivo al producto alimenticio o al complemento nutricional y tienen un gusto a pescado desagradable o el sabor a algas marinas.

Más aún, es conocido que ciertas especies de algas azules naturalmente producen moléculas químicas de olor tales como geosmina (trans-1,10-dimetil-trans-9-decalol) o MIB (2-metilisoborneol), que generan olores a tierra y moho.

40 En cuanto a *chlorellae*, el descriptor comúnmente aceptado en este campo es el sabor a "té verde", levemente similar a otros polvos vegetales verdes, tales como cebada verde en polvo o trigo verde en polvo, siendo el sabor atribuye a su contenido alto de clorofila.

A menudo su sabor se enmascara sólo cuando se mezclan con vegetales con un sabor fuerte o zumos de frutas cítricas.

45 Por lo tanto, aún hay una necesidad no satisfecha de tener un método para preparar biomasa de microalgas del género *Chlorella* de calidad organoléptica adecuada que permita el uso de la harina preparada a partir de dichas microalgas en productos alimenticios más numerosos y diversificados. Además, siempre en un sentido de optimización industrial, un método que proporciona de forma reproducible microalgas del género *Chlorella* de calidad organoléptica reproducible sería muy ventajoso.

Objeto de la invención

50 Con el fin de idear el método de la invención, la empresa solicitante primero elige formar un panel sensorial para evaluar las propiedades sensoriales de varios lotes de harina de biomasa de *Chlorella protothecoides*. La

descripción sensorial de los lotes de producción permite entonces la identificación de los pasos clave del método que permitirán la producción de harina de biomasa de microalgas de calidad organoléptica de acuerdo con las expectativas y de forma reproducible.

5 Al llevar a cabo su producción de la biomasa de microalgas mediante fermentación en condiciones heterotróficas y en ausencia de luz, como será ejemplificado más adelante, la empresa solicitante variará de este modo los diversos parámetros de fermentación y tratamiento de la biomasa para generar estos diversos lotes. La empresa solicitante finalmente logró demostrar una correlación entre la nota sensorial dada por el panel sensorial a cada lote producido y algunas de las condiciones para llevar a cabo el método para producir dichos lotes.

10 Esta correlación luego permitió a la empresa solicitante seleccionar los parámetros para llevar a cabo la fermentación y tratamiento de la biomasa que, tomada sola o en combinación, garantiza la producción de biomasa de *Chlorella* que tiene un perfil sensorial optimizado.

La empresa solicitante propuso entonces un método de producción para acondicionar una biomasa de microalgas del género *Chlorella*, preferiblemente *Chlorella protothecoides*, para la preparación de una harina que tiene un perfil sensorial optimizado.

15 La presente invención de este modo se refiere a un método para acondicionar una biomasa de microalgas del género *Chlorella*, preferiblemente *Chlorella protothecoides*, producida en condiciones heterotróficas y en ausencia de luz para la preparación de una harina que tiene un perfil sensorial optimizado, siendo el método de acondicionamiento caracterizado por que comprende los siguientes pasos:

20 - recolección de la biomasa directamente al final de la fermentación y almacenamiento durante menos de 8 horas antes del acondicionamiento de la misma,

- tratamiento de calor de alta temperatura / corto tiempo (HTST) de la biomasa recuperada y almacenada de este modo, durante 30 segundos a 1 min 30, a una temperatura por debajo de 70°C, y

- lavado de la biomasa con a lo sumo 3 volúmenes de agua por volumen de biomasa.

25 Preferiblemente, el tiempo de almacenamiento para la biomasa antes de ser acondicionada y molida es menos de 3 horas, preferiblemente menos de 1 hora.

Preferiblemente, el tratamiento de calor HTST se lleva a cabo durante 1 minuto a una temperatura de entre 60 y 68°C, preferiblemente 65°C ± 2°C, en particular 65°C.

Preferiblemente, la biomasa se lava con un volumen de agua por volumen de biomasa.

En una realización preferida, el tratamiento HTST se lleva a cabo antes del paso de lavado de la biomasa.

30 En una realización preferida, la biomasa acondicionada fue obtenida por fermentación de la microalga del género *Chlorella*, preferiblemente *Chlorella protothecoides*, a un pH inicial entre 6.5 y 7, preferiblemente 6.8 y con regulación del pH de la fermentación a un valor de entre 6.5 y 7, preferiblemente a un valor de 6.8.

35 La presente invención también se refiere a un método para producir una biomasa de microalgas del género *Chlorella*, preferiblemente *Chlorella protothecoides*, para la preparación de una harina que tiene un perfil sensorial optimizado que comprende:

- la producción de una biomasa mediante fermentación de microalgas del género *Chlorella*, preferiblemente *Chlorella protothecoides*, en condiciones heterotróficas y en ausencia de luz, siendo el pH inicial de la fermentación y la regulación del pH durante la fermentación fijados a un valor de entre 6.5 y 7, preferiblemente a un valor de 6.8; y

- el acondicionamiento de la biomasa por medio de un método como se describe en el presente documento.

40 Finalmente, la presente invención también se refiere a un método para preparar una harina de microalgas del género *Chlorella*, preferiblemente *Chlorella protothecoides*, que tiene un perfil sensorial optimizado que comprende:

- el acondicionamiento de la biomasa por medio de un método como se describe en el presente documento;

- la molienda de la biomasa acondicionada; y

- el secado de la biomasa molida.

45 Opcionalmente, el método también comprende, antes del acondicionamiento, la producción de una biomasa mediante fermentación de microalgas del género *Chlorella*, preferiblemente *Chlorella protothecoides*, en condiciones heterotróficas y en ausencia de luz, siendo el pH inicial de la fermentación y la regulación del pH durante la fermentación fijados a un valor de entre 6.5 y 7, preferiblemente a un valor de 6.8.

Descripción detallada de la invención

A los efectos de la invención, una harina de microalgas tiene un "perfil sensorial optimizado" cuando su evaluación por un panel sensorial en una formulación alimenticia o formulación de degustación (por ejemplo helado o receta de degustación como se describe en la presente) concluye que hay una ausencia de mal sabor que afecta a la calidad organoléptica de dichas formulaciones de alimentos que contienen esta harina de microalgas.

- 5 Estos malos sabores pueden estar asociados con la presencia de moléculas de olor y/o aromáticas específicas indeseables que se caracterizan por un umbral de percepción que corresponde al valor mínimo del estímulo sensorial requerido para despertar una sensación.

El "perfil sensorial optimizado" se refleja entonces por un panel sensorial al obtener las mejores puntuaciones en una escala de evaluación de los 4 criterios sensoriales (apariencia, textura, sabores y gustos).

- 10 A los efectos de la presente invención, la expresión "harina de microalgas" debe comprenderse en su interpretación más amplia y que denota, por ejemplo, una composición que comprende una pluralidad de partículas de biomasa de microalgas. La biomasa de microalgas deriva de células de microalgas, que pueden ser enteras o lisadas, o una mezcla de células enteras o lisadas.

- 15 Un cierto número de documentos de la técnica anterior, tal como la solicitud de patente internacional WO 2010/120923, describe métodos para la producción y el uso en alimentos de la biomasa de microalgas *Chlorella*.

- 20 Las microalgas objeto de la presente invención son microalgas del género *Chlorella*, más particularmente *Chlorella protothecoides*, incluso más particularmente *Chlorella* privada de pigmentos de clorofila, mediante cualquier método conocido de por sí por los expertos en la técnica (ya sea debido a que el cultivo se lleva a cabo en la oscuridad en ciertas condiciones operativas bien conocidas para los expertos en la técnica o porque la cepa ha mutado de modo que no produce más estos pigmentos).

El método fermentativo descrito en la presente solicitud WO 2010/120923 permite de este modo la producción de un cierto número de harinas de microalgas de calidad sensorial variable, si se varían las condiciones para la fermentación y tratamiento de la biomasa producida.

La empresa solicitante elige de este modo variar y analizar el impacto de los siguientes parámetros:

- 25 - pH inicial del medio de fermentación,
- pH durante la fermentación,
- acidificación durante la cosecha del mosto de fermentación,
- tratamiento de calor de la biomasa (tratamiento denominado HTST),
- lavado de la biomasa,
30 - molienda de la biomasa,
- ajuste del pH,
- pasteurización,
- secado y
- almacenamiento de la harina obtenida de este modo.
35 Como se ha ejemplificado más adelante, los pasos clave del método para acondicionar la biomasa de modo que optimice el perfil sensorial de las harinas de microalgas son los siguientes:
- recolección de la biomasa directamente al final de la fermentación y almacenamiento durante menos de 8 horas antes de su acondicionamiento precediendo la molienda de la misma,
- tratamiento HTST de la biomasa recuperada y almacenada de este modo, llevado a cabo durante entre 30 segundos y 1 min 30, a una temperatura por debajo de 70°C,
40 - lavado de la biomasa tratada con HTST con a lo sumo 3 volúmenes de agua por volumen de biomasa.

- Por lo tanto, la biomasa se recoge tan rápidamente como es posible para someterla a pasos de tratamiento de calor y/o de lavado posteriores. Se determinó que el almacenamiento debe ser tan corto como sea posible. Preferiblemente, el almacenamiento dura menos de 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 hora. Preferiblemente, el tiempo de almacenamiento para la biomasa antes de ser acondicionada y molida es menos de 3 horas, preferiblemente menos de 1 hora. Idealmente, el paso de almacenamiento está ausente y la biomasa recogida se somete directamente a los pasos de tratamiento de calor y/o lavado posteriores.
- 45

También se determinó que el tratamiento de calor HTST también tenía un impacto en el perfil sensorial y por tanto en la calidad organoléptica de la harina de microalgas. Por lo tanto, la temperatura es preferiblemente inferior o igual a 70°C y superior a 50°C. Puede ser de entre 55 y 70°C, preferiblemente entre 60 y 68°C, preferiblemente 65°C. El tiempo de tratamiento es preferiblemente 1 minuto.

5 También se mostró que el lavado podía ser optimizado mientras al mismo tiempo se mejoraba el perfil sensorial y de este modo la calidad organoléptica de la harina de microalgas. Por lo tanto, preferiblemente, la biomasa se lava con 3, 2.5, 2, 1.5 o 1 volumen de agua para un volumen de biomasa. En una realización, se utilizará un volumen de agua para un volumen de biomasa.

10 Finalmente, se mostró que el orden de los pasos de acondicionamiento tenía un impacto en el perfil sensorial y por tanto en la calidad organoléptica de la harina de microalgas. En particular, es preferible llevar a cabo el tratamiento de calor HTST antes del paso de lavado de la biomasa.

La biomasa de microalgas acondicionada es una biomasa preparada mediante fermentación, en condiciones heterotróficas y en ausencia de luz, de una microalga del género *Chlorella*, preferiblemente *Chlorella protothecoides*.

15 Opcionalmente, las microalgas utilizadas pueden elegirse, de manera no exhaustiva, de *Chlorella protothecoides*, *Chlorella kessleri*, *Chlorella minutissima*, *Chlorella sp.*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella luteoviridis*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella reisiigii*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella saccharophila*, *Parachlorella kessleri*, *Parachlorella beijerinckii*, *Prototheca stagnora* y *Prototheca moriformis*.

20 Preferiblemente, las microalgas utilizadas de acuerdo con la invención pertenecen a la especie *Chlorella protothecoides*. De acuerdo con este modo preferido, las algas destinadas a la producción de la harina de microalgas tienen el estado GRAS. El concepto GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro), creado en 1958 por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés), permite la regulación de sustancias o extractos agregados a alimentos y que son considerados inofensivos por un panel de expertos.

25 Las condiciones de fermentación son bien conocidas para los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo apropiadas para ser utilizadas están en particular descritas en el artículo por Ikuro Shihira-Ishikawa y Eiji Hase, "Nutritional Control of Cell Pigmentation in *Chlorella protothecoides* with special reference to the degeneration of chloroplast induced by glucose", *Plant and Cell Physiology*, 5, 1964.

30 Este artículo describe en particular que todos los grados de color pueden producirse por *Chlorella protothecoides* (incoloro, amarillo, verde amarillento y verde) al variar las fuentes y las relaciones de nitrógeno y carbono. En particular, las células "descoloridas" e "incolores" se obtienen utilizando medios de cultivo que son ricos en glucosa y escasos en nitrógeno.

La distinción entre células incoloras y células amarillas se realiza en este artículo. Además, las células descoloridas cultivadas en glucosa en exceso y en nitrógeno limitado tienen una tasa de crecimiento alta. Más aún, estas células contienen altas cantidades de lípidos.

35 Otros artículos, tales como el de Han Xu, Xiaoling Miao, Qingyu Wu, "High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters", *Journal of Biotechnology*, 126, (2006), 499-507, indican que las condiciones de cultivo heterotróficas, es decir en ausencia de luz, hacen posible obtener una biomasa aumentada con un alto contenido de lípidos en las células de las microalgas.

40 Los medios de crecimiento sólido y líquido están generalmente disponibles en la literatura, y las recomendaciones para preparar los medios particulares que están disponibles para una gran variedad de cepas de microorganismos pueden encontrarse, por ejemplo, en línea en www.utex.org/, un sitio web mantenido por la Universidad de Texas en Austin para su colección de cultivo de algas (UTEX).

A la luz de su conocimiento general y la técnica anterior mencionada, los expertos en la técnica responsables de cultivar las células de microalgas serán completamente capaces de ajustar las condiciones de cultivo para obtener una biomasa adecuada, preferiblemente rica en lípidos.

45 En particular, el protocolo de fermentación puede definirse en función del descrito de forma general en la solicitud de patente WO 2010/120923.

De acuerdo con la presente invención, las microalgas se cultivan en medio líquido para producir la biomasa como tal.

50 La producción de biomasa se lleva a cabo en fermentadores (o biorreactores). Los ejemplos específicos de biorreactores, las condiciones de cultivo y el crecimiento heterotrófico y métodos de propagación pueden combinarse en cualquier modo apropiado para mejorar la eficiencia del crecimiento microbiano y los lípidos y/o de producción de proteína.

En una realización particular, la fermentación se lleva a cabo en un modo de lote de alimentación con una tasa de flujo de glucosa ajustada de modo que mantiene la concentración de glucosa residual entre 3 a 10 g/l.

- 5 Durante la fase de alimentación de glucosa, el contenido de nitrógeno en el medio de cultivo está preferiblemente limitado de modo que permite la acumulación de lípidos en una cantidad de 30%, 40%, 50% o 60%. La temperatura de fermentación se mantiene a una temperatura adecuada, preferiblemente entre 25 y 35°C, en particular 28°C. El oxígeno disuelto se mantiene preferiblemente a un mínimo de 30% al controlar la aireación, la contrapresión y la agitación de la fermentadora.
- En una realización preferida, se mostró que el pH durante la fermentación tuvo un impacto en la calidad organoléptica del producto final. Por lo tanto, el pH inicial de la fermentación se fija entre 6.5 y 7, preferiblemente a un valor de 6.8 y luego se regula durante la fermentación a un valor de entre 6.5 y 7, preferiblemente a un valor de 6.8. El tiempo de fermentación de la producción es de 3 a 6 días, por ejemplo de 4 a 5 días.
- 10 Preferiblemente, la biomasa obtenida tiene una concentración de entre 130 g/l y 250 g/l, con un contenido de lípidos de aproximadamente 50% en peso seco, un contenido de fibra de 10% a 50% en peso seco, un contenido de proteína de 2% a 15% en peso seco y un contenido de azúcar de menos de 10% en peso.
- Luego, la biomasa obtenida al final de la fermentación se cosecha desde el medio de fermentación y se somete al método de acondicionamiento como se describió anteriormente.
- 15 Después del acondicionamiento, la biomasa se convierte en harina de microalgas. Los pasos principales para preparar la harina de microalgas comprenden en particular molienda, homogenización y secado.
- La harina de microalgas puede prepararse a partir de la biomasa de microalgas concentrada que ha sido mecánicamente lisada y homogenizada, donde el homogenado luego se seca por pulverización o secado rápido.
- 20 Las células de biomasa utilizadas para la producción de harina de microalgas son preferiblemente lisadas para liberar su aceite o lípidos. Las paredes celulares y los componentes intracelulares se muelen o reducen, por ejemplo, utilizando un homogeneizador, a partículas o desechos de células no aglomeradas. Preferiblemente, las partículas resultantes tienen un tamaño promedio de menos de 500 µm, 100 µm o incluso 10 µm o menos.
- Las células lisadas también pueden secarse. Por ejemplo, un interruptor de presión puede utilizarse para bombear una suspensión que contiene las células a través de un orificio restringido para lisar las células. Se aplica una presión alta (hasta 1500 bar), seguido por una expansión instantánea a través de una boquilla. Las células pueden romperse mediante tres mecanismos diferentes: viajando hacia la válvula, alto corte del líquido en el orificio y una caída repentina en la presión a la salida, provocando que la célula explote. Puede utilizarse un homogeneizador Niro (GEA Niro Soavi) (o cualquier otro homogeneizador de alta presión) para romper las células. Este tratamiento de la biomasa de algas a presión alta (aproximadamente 1500 bar) en general lisa más de 90% de las células y reduce el tamaño de las partículas a menos de 5 µ. Preferiblemente, la presión aplicada es de 900 bar a 1200 bar, en particular 1100 bar.
- 25 Además, y con el fin de aumentar el porcentaje de células lisadas, la biomasa de microalgas puede someterse a tratamiento doble de alta presión o incluso más (tratamiento triple, etc.). Preferiblemente, se utiliza una homogenización doble para aumentar el porcentaje de células lisadas superior al 50%, superior al 75% o superior al 90%. El porcentaje de células lisadas de aproximadamente 95% se ha observado gracias a este tratamiento doble.
- 35 La lisis de las células de microalgas es opcional pero preferida cuando se desea una harina rica en lípidos (en particular superior al 10%). Por lo tanto, la harina de microalgas puede estar opcionalmente en la forma de células no lisadas.
- Preferiblemente, se desea al menos una lisis parcial, es decir que la harina de microalgas esté en la forma de células parcialmente lisadas y contenga de 25% a 75% de células lisadas. Preferiblemente, se desea una lisis máxima o incluso total, es decir, que la harina de microalgas esté en la forma de células fuertemente o incluso totalmente lisadas y contenga 85% o más de células lisadas, preferiblemente 90% o más. Por lo tanto, la harina de microalgas es capaz de estar en una forma no molida hasta extremadamente molida con grados de molienda superiores al 95%. Ejemplos específicos se refieren a harinas de microalgas que tienen grados de molienda de 50%, 85% o 95% de lisis celular, preferiblemente 85% o 95%.
- 40 Alternativamente, puede utilizarse un molino de bolas. En este tipo de molino, las células se agitan en suspensión con pequeñas partículas abrasivas. La rotura de las células es provocada por las fuerzas de corte, la molienda entre las perlas y las colisiones con perlas. De hecho, estas perlas rompen las células para liberar el contenido celular de las mismas. La descripción de un molino de bolas apropiado se proporciona, por ejemplo en la patente US 5 330 913.
- 50 De este modo se obtiene una suspensión de partículas, opcionalmente de tamaño más pequeño que las células de origen, en la forma de una emulsión "aceite en agua".
- Esta emulsión puede entonces secarse por pulverización y el agua se elimina, dejando un polvo seco que contiene el residuo celular y los lípidos. Después del secado, el contenido de agua o el contenido de humedad del polvo es en general inferior al 10%, preferentemente inferior al 5% y más preferiblemente inferior al 3% en peso.

- Preferiblemente, la harina de microalgas se prepara en forma de gránulos. Los gránulos de harina de microalgas se pueden obtenerse por medio de un proceso de secado por pulverización particular, que utiliza boquillas de pulverización a alta presión en una torre de flujo paralelo que dirige las partículas a una cinta en movimiento ubicada en el fondo de la torre. El material se transporta entonces como una capa porosa a través de zonas de post-secado y enfriamiento, que le proporciona una estructura crujiente, como la de una torta, que se deshace en el extremo de la cinta. El material se procesa entonces para obtener el tamaño de partícula deseado. Para llevar a cabo la granulación de la harina de algas, de acuerdo con este principio de secado, puede utilizarse por ejemplo una secadora por pulverización Filtermat™ vendida por la empresa GEA Niro o un sistema de secado Tetra Magna Prolac Dryer™ vendido por la empresa Tetra Pak.
- 5
- 10 En una realización preferida, posterior al método de acondicionamiento, el método para preparar los gránulos de harina de microalgas puede comprender los siguientes pasos:
- 1) preparar una emulsión de harina de microalgas con un contenido de sólidos de entre 15% y 40% en peso seco,
 - 2) introducir esta emulsión en un homogeneizador de alta presión. Esta homogeneización de alta presión de la emulsión se puede acompañar en un dispositivo de dos etapas, por ejemplo, un homogeneizador Gaulin vendido por la empresa APV, con una presión de 100 a 250 bar en la primera etapa, y 10 a 60 bar en la segunda etapa,
 - 15 3) pulverizar en una secadora por pulverización vertical equipada con una cinta en movimiento en su base y con una boquilla de alta presión en su parte superior, mientras al mismo tiempo regula:
 - a) la presión aplicada en el nivel de las boquillas de pulverización a valores de más de 100 bar, preferiblemente entre 100 y 200 bar y más preferiblemente entre 160 y 170 bar,
 - 20 b) la temperatura de entrada comprendida entre 150°C y 250°C, preferiblemente entre 180°C y 200°C, y
 - c) la temperatura de salida en esta zona de secado por pulverización comprendida entre 60°C y 120°C, preferiblemente entre 60°C y 110°C y más preferiblemente entre 60°C y 80°C,
 - 25 4) regular las temperaturas de entrada de la zona de secado en la cinta en movimiento comprendida entre 40°C y 90°C, preferiblemente entre 60°C y 90°C, y la temperatura de salida comprendida entre 40°C y 80°C, y regular las temperaturas de entrada de la zona de enfriamiento a una temperatura entre 10°C y 40°C, preferiblemente entre 10°C y 25°C y la temperatura de salida comprendida entre 20°C y 80°C, preferiblemente entre 20°C y 60°C,
 - 5) recoger los gránulos de harina de microalgas obtenidos de este modo.

De acuerdo con la invención, la biomasa extraída del medio de fermentación por cualquier medio conocido para un experto en la técnica luego:

- 30 - se concentra (por ejemplo mediante centrifugación),
- opcionalmente se conserva al agregar conservantes estándar (benzoato de sodio y sorbato de potasio por ejemplo),
- se muele celularmente.

La invención se comprenderá más claramente a partir de los ejemplos a continuación, que pretenden ser ilustrativos y no limitativos.

35

Ejemplos

Ejemplo 1. Preparación de varios lotes de harina de biomasa de *Chlorella protothecoides*

A. Descripción del protocolo estándar: de la producción de biomasa a la producción de harina

1. Fermentación

40 El protocolo de fermentación se adapta del descrito en general en la solicitud de patente WO 2010/120923.

El fermentador de producción se inocula con un pre-cultivo de *Chlorella protothecoides*. El volumen después de la inoculación alcanza 9000 l.

La fuente de carbono utilizada es 55% peso/peso de jarabe de glucosa esterilizado a 130°C durante 3 minutos.

La fermentación se lleva a cabo en un modo de lote de alimentación con tasa de flujo de glucosa ajustada de modo que mantiene una concentración de glucosa residual de 3 a 10 g/l.

45

El tiempo de fermentación de la producción es de 4 a 5 días.

Al final de la fermentación, la concentración celular alcanza 185 g/l.

Durante la fase de alimentación de glucosa, el contenido de nitrógeno en el medio de cultivo está limitado para permitir la acumulación de lípidos en una cantidad de 50%.

La temperatura de fermentación se mantiene a 28°C.

- 5 El pH de la fermentación antes de la inoculación se ajusta a 6.8 y luego se regula en este mismo valor durante la fermentación.

El oxígeno disuelto se mantiene a un mínimo de 30% al controlar la aireación, la contrapresión y la agitación de la fermentadora.

2. Acondicionamiento de la biomasa

- 10 El mosto de fermentación se trata con calor en una zona de alta temperatura /corto tiempo ("HTST", por sus siglas en inglés) durante 1 min a 75°C y se enfría a 6°C.

La biomasa entonces se lava con agua potable descarbonatada con una relación de dilución de 6 volúmenes de agua para 1 volumen de biomasa y se concentra mediante centrifugación utilizando un Alfa Laval Feux 510.

- 15 La biomasa entonces se acidifica a pH 4 con 75% de ácido fosfórico y luego se agregan conservantes (500 ppm benzoato de sodio / 1000 ppm sorbato de potasio).

3. Molienda de biomasa

La biomasa se muele entonces con un molino de bolas Netzsch LME500 utilizando bolas de silicato de circonio de 0.5 mm de diámetro.

El grado de molienda objetivo es de 85% a 95%.

- 20 El producto se mantiene frío en todo este proceso durante las fases de almacenamiento y mediante enfriamiento en línea con intercambiadores dedicados.

Se agregan antioxidantes (150 ppm/secos de ácido ascórbico y 500 ppm/secos de una mezcla de tocoferoles) como prevención de la degradación mediante oxidación.

El medio se ajusta a pH 7 con hidróxido de potasio.

- 25 4. Secado de la harina

El producto entonces se pasteuriza a 77°C durante 3 minutos en línea con la operación de secado.

Esto último se lleva a cabo en un Filtermat FMD125 con un ciclón. La presión de la boquilla es de 160-170 bar.

B. Definición del panel sensorial y de los descriptores que permiten la evaluación de la calidad organoléptica de las harinas de microalgas obtenidas de la biomasa

- 30 Se reunió un conjunto de 14 individuos para evaluar los diversos lotes de biomasa producidos utilizando los siguientes descriptores:

| Descriptores | | Referencia |
|--------------|---------------------------|--|
| Apariencia | Color (de claro a oscuro) | |
| Textura | Recubrimiento | Leche entera + 5% de crema |
| Sabores | Dulce | 1% de sacarosa |
| Gustos | Hongos | 100 g de hongos en 100 ml de agua fría / dilución X 4 |
| | Cereales | 10% de solución Ebly |
| | Manteca/producto lácteo | |
| | Aceite rancio | 1.5% de aceite oxidado |
| | Retrogusto vegetal | Harina de microalgas muy inaceptable |

ES 2 629 108 T3

La empresa solicitante descubrió entonces que la matriz de degustación está construida de manera ventajosa a partir de la siguiente fórmula:

- 7% de harina de microalgas

- 1% de azúcar granulada

5 - 0.25% de esencia de vainilla de uso doméstico

- 91.75% de leche descremada.

La mezcla se homogeniza con una mezcladora de inmersión hasta que se obtiene una mezcla homogénea (aproximadamente 20 segundos) y luego se calienta a 75°C durante 5 minutos en un baño de agua.

10 En cada sesión de degustación, 4 o 5 productos son evaluados con respecto a cada descriptor en comparación con un lote de referencia 1 de harina de microalgas.

Todos los productos son evaluados uno tras otro, en escalas en el rango de 1 a 9 del siguiente modo:

Valor de 1: el descriptor evaluado no está presente en el producto.

Valor de 5: el descriptor evaluado está presente en el producto en exactamente el mismo modo que en el producto de referencia 1.

15 Valor de 9: el descriptor evaluado está muy presente en el producto.

El lote de referencia 1 es una harina de microalgas que cumple con los requisitos en el sentido que tiene un perfil sensorial que "satisface" todos estos descriptores.

20 Preferiblemente, el lote de referencia 1 no debe considerarse como la harina de microalgas que tiene el perfil sensorial optimizado: es una harina de microalgas percibida por el panel sensorial como "satisfactoria", en particular que tiene una nota de 5 en todos los descriptores evaluados.

Por lo tanto, los otros lotes de harina de microalgas serán clasificados por el panel sensorial en cada lado de este lote de referencia 1.

25 Preferiblemente, también se incluye un lote de referencia 2 considerado "muy inaceptable" ya que no satisface los descriptores que se refieren a las notas aromáticas, en particular de Sabores y Gustos. Este lote está por lo tanto tan distante como es posible del lote de referencia 1.

Los análisis de varianza (ANOVA) se llevan a cabo para evaluar la capacidad discriminante de los descriptores (descriptores cuyo valor p asociado con la prueba Fisher, ANOVA tipo 3, es menor que 0.20 para el efecto de la Harina en el descriptor modelo ~ Harina + juez).

30 El efecto de la Harina se interpreta como la capacidad discriminante de los descriptores: si no hay efecto (Probabilidad crítica > 0.20), las harinas no fueron discriminadas de acuerdo con este criterio. Cuanto más pequeña es la probabilidad crítica, más discriminante el descriptor.

Se lleva a cabo entonces un Análisis de Componente Principal (PCA, por sus siglas en inglés) para obtener un mapeo sensorial de las harinas y una representación simultánea de todas las harinas con respecto a todos los descriptores.

35 Programa informático de procesamiento de datos

Los análisis se llevaron a cabo utilizando el programa informático R (vendido libremente):

R versión 2.14.1 (22 de diciembre de 2011)

Derecho de autor (C) 2011 La Fundación R para Cálculo Estadístico

ISBN 3-900051-07-0

40 Plataforma: i386-pc-mingw32/i386 (32-bit)

El programa informático es un entorno de trabajo que requiere la carga de módulos que contienen las funciones de cálculo.

Los módulos utilizados en este estudio son los siguientes:

- Para PCA: Paquete *FactoMineR* versión 1.19

- Para ANOVA: Paquete *car* versión 2.0-12

C. Impacto del pH de la fermentación

5 Las condiciones del pH de la fermentación se definen convencionalmente en el protocolo estándar comenzando con la premisa de que el pH de la fermentación debe fijarse a un valor de 6.8 (pH de crecimiento óptimo conocido para los expertos en la técnica para microalgas del género *Chlorella protothecoides*), pero sin que el impacto de este valor de pH en las propiedades organolépticas de las harinas de microalgas sea estudiado o establecido.

Se producen de este modo dos series de lotes de harina a partir de biomasa, preparados en dos condiciones de pH: neutras (6.8) y ácidas (5.2). Este valor de 5.2 de manera que se tuviesen en cuenta unas restricciones bacteriológicas (siendo un pH ácido relativamente desfavorable para el crecimiento de bacterias contaminantes).

10 La Tabla I a continuación presenta las referencias de los lotes producidos en estos dos valores de pH.

Tabla I

| lotes | pH |
|----------|-----|
| lote 21 | 6.8 |
| lote 23 | 6.8 |
| lote 24 | 5.2 |
| lote 31 | 6.8 |
| lote 53 | 5.2 |
| lote 61 | 5.2 |
| lote 111 | 6.8 |
| lote 131 | 6.8 |

Cada uno de estos lotes se evalúa después por el panel sensorial de acuerdo con los descriptores presentados anteriormente.

15 Se analizaron 8 lotes diferentes (lote 21, lote 23, lote 24, lote 31, lote 53, lote 61, lote 111 y lote 131) de acuerdo con el método descrito anteriormente.

Aquí se presentan dos ejemplos con respecto a los descriptores "manteca/productos lácteos" y "retrogusto vegetal".

"retrogusto vegetal": Análisis de la tabla de varianzas

| | Df | Suma cu. | Media cu | Valor F | Pr(>F) |
|---------------|-----|----------|----------|---------|-------------------|
| Harina | 9 | 109.693 | 12.1881 | 18.2423 | < 2e-16 |
| Juez | 13 | 18.732 | 1.4409 | 2.1566 | 0.01298 |
| Residuos | 185 | 123.603 | 0.6681 | --- | |

"manteca/productos lácteos": Análisis de la tabla de varianzas

| | Df | Suma cu. | Media cu | Valor F | Pr(>F) |
|---------------|-----|----------|----------|---------|------------------|
| Harina | 9 | 8.292 | 0.92131 | 1.4530 | 0.1699 |
| Juez | 13 | 8.235 | 0.63347 | 0.9991 | 0.4547 |
| Residuos | 160 | 101.451 | 0.63407 | --- | |

20 Como puede observarse, las probabilidades críticas asociadas con el efecto de Harina para los 2 descriptores estudiados son inferiores a 0.2: los 2 descriptores son por tanto discriminantes. La probabilidad crítica es menor con respecto al descriptor "retrogusto vegetal" que con respecto al descriptor "manteca/productos lácteos", lo que significa que se observa una mayor diferencia entre las Harinas con respecto al primer criterio que con respecto al segundo.

25 A continuación la Tabla II resume las probabilidades críticas obtenidas para los efectos de Harina y juez para todos los descriptores.

Tabla II

| | Harina | Juez |
|-----------------------|----------|-----------------------|
| Color | 1.62E-31 | 1.16 ^E -05 |
| Retrogusto vegetal | 1.60E-21 | 1.30 ^E -02 |
| Sabor a aceite rancio | 4.00E-06 | 9.00 ^E -04 |
| Recubrimiento | 1.48E-05 | 1.63 ^E -02 |
| Cereales | 4.05E-04 | 1.94 ^E -07 |
| Hongos | 1.37E-03 | 5.66 ^E -05 |
| Dulce | 3.23E-03 | 4.02 ^E -04 |
| Productos lácteos | 1.70E-01 | 4.55 ^E -01 |

Todos los descriptores son discriminantes; todos se mantienen para establecer el PCA.

5 Ya que el aroma es un criterio esencial de las harinas, el PCA se llevó a cabo sobre los descriptores que se relacionan sólo con los sabores (hongos, cereales, retrogusto vegetal, producto lácteo, rancio). La representación gráfica de este PCA está en las figuras 1 y 2.

Puesto que el primer eje de PCA resume más del 75% de la información, son las coordenadas de los productos en este eje las que nos sirven como "variable/clasificación". Esta clasificación por tanto da cuenta claramente de las distancias sensoriales entre los productos.

10 Este método hace posible establecer una clasificación de la calidad organoléptica de varias harinas de microalgas, que pueden representarse de la siguiente manera:

lote 111 > lote 31 > lote 21 > lote 23 > lote de referencia 1 > lote 131 > lote 24 > lote 53 > lote 61 > lote de referencia 2, con una clara separación entre, por un lado, los lotes 111, 31, 21, 23 y 131 y, por otro lado, los lotes 24, 53 y 61.

15 Desde un punto de vista general, el panel juzgó los lotes 111, 31, 21, 23 y 131 aceptables y los lotes 24, 53 y 61 inaceptables.

Por lo tanto, estos resultados ilustran claramente el impacto del pH de la fermentación en presencia de un retrogusto totalmente inaceptable para la aceptabilidad del producto.

A pH 5.2, el perfil sensorial sistemáticamente tiene un retrogusto vegetal, mientras que a pH 6.8, el perfil sensorial es en general más neutral, sin un retrogusto vegetal significativo.

20 En una primera lectura parece, por lo tanto, que controlar el pH de la fermentación a un valor de 6.8 es un criterio clave para la preparación de una harina de microalgas que tiene un perfil sensorial adecuado o incluso optimizado (lote 111).

Sin embargo, dada la variabilidad organoléptica de los lotes producidos a pH 6.8, debe destacarse que el pH no es el único parámetro responsable de los efectos observados.

25 **D. Medición del impacto de los pasos para acondicionar la biomasa antes de la molienda de la misma en la calidad organoléptica de la harina producida**

También se estudia la influencia de los dos pasos principales de acondicionamiento (= pre-molienda) de la biomasa antes de la molienda de la misma, el tratamiento de calor HTST y el lavado.

30 Comenzando a partir de la misma biomasa producida a pH 6.8 de acuerdo con el paso 1 del método estándar descrito anteriormente, los pasos de acondicionamiento de la biomasa se llevaron a cabo de acuerdo con 4 combinaciones diferentes (figura 3).

Dichos pasos permitieron la producción de 4 lotes: No. 1 a 4:

- Combinación No.1 es el testigo sin tratamiento HTST ni lavado
- Combinación No.2: solo lavado

- Combinación No.3: solo HTST
- Combinación No.4: HTST antes del lavado.

5 Se producen 4 lotes de harina de acuerdo con estas 4 combinaciones. El resto de los pasos son comunes a cada serie y hacen posible acondicionar la muestra para el análisis sensorial. La Tabla III a continuación presenta la lista de descriptores que son discriminantes en este conjunto de productos (valor p menor que 0.2 con respecto al efecto de Harina):

Tabla III

| | Harina | Juez |
|----------------------------------|----------|----------|
| Recubrimiento | 2.30E-02 | 5.79E-03 |
| Color | 3.08E-02 | 5.30E-02 |
| Dulce | 1.22E-01 | 6.61E-02 |
| Retrogusto vegetal | 1.69E-01 | 7.37E-01 |
| Manteca/productos lácteos | 3.74E-01 | 2.50E-03 |
| Hongos | 3.88E-01 | 4.02E-02 |
| Cereal | 5.56E-01 | 3.33E-02 |

10 Un Análisis del Componente Principal se lleva a cabo para representar las diferencias entre las diversas harinas producidas (en comparación con una harina seleccionada como Referencia 1, es decir, como se explicó anteriormente, harina de microalgas percibida por el panel sensorial como "satisfactoria", en particular que tiene una nota de 5 en todos los descriptores evaluados).

Los resultados están presentes en las figuras 4 y 5.

Se observa que:

- 15 - la harina de referencia 1 es menos dulce que los 4 lotes producidos, más colorida, más recubrimiento;
- las harinas 1 y 3 son ambas las más dulces; el lavado es por lo tanto un paso importante para asegurar la neutralidad del producto;
- 20 - las harinas 1 y 2 tienen un retrogusto, que muestra la ventaja del tratamiento HTST. En estas 2 harinas, el panel nota un aroma diferente, nunca encontrado previamente, descrito de la siguiente manera: acidez del yogur, "herbal", amargor, químico, picante, siendo este más intenso/característico en la harina 1 que en la harina 2.

Cuando se agrega un paso de lavado después de la operación de tratamiento de calor HTST, la neutralidad sensorial de la muestra se mejora, con una reducción en la nota dulce.

25 La combinación que integra los pasos de HTST y luego el lavado de la biomasa antes de la molienda hace posible de este modo mejorar las propiedades organolépticas del producto final al eliminar una nota característica de la biomasa "cruda", al mejorar su neutralidad y al reducir la nota dulce.

Las combinaciones adicionales fueron evaluadas para refinar la caracterización del impacto sensorial del método de "pre-molienda". Figura 6

Aquí, el HTST y las operaciones de lavado se invierten:

Combinación 4: HTST luego lavado (misma combinación que antes)

30 Combinación 5: HTST después del lavado.

La Tabla IV a continuación presenta la lista de descriptores que son discriminantes en este conjunto de productos (valor p menor que 0.2 con respecto al efecto de harina):

Tabla IV

| | Harina | Juez |
|---------------------------|----------|------|
| Color | 5.33E-04 | 0.05 |
| Dulce | 0.01 | 0.64 |
| Cereales | 0.06 | 0.61 |
| Hongo | 0.17 | 0.29 |
| Recubrimiento | 0.25 | 0.64 |
| Retrogusto vegetal | 0.43 | 0.89 |
| Manteca/productos lácteos | 0.71 | 0.78 |
| Rancio | 0.98 | 0.88 |

Un Análisis del Componente Principal se lleva a cabo para representar las diferencias entre las dos harinas diferentes producidas (aún con respecto al testigo: lote de referencia 1).

5 Los resultados están presentes en las figuras 7 y 8.

Cuando los dos pasos se invierten, la harina de microalgas correspondiente al lavado antes de HTST (Combinación 5) tiene un aroma que es más fuerte en términos de hongo/cereales y dulce.

Además, los panelistas comentaron que el producto era "picante".

10 La Combinación 4 es en este caso preferida por su perfil sensorial más neutral y más favorable en aplicaciones de alimentos.

E. Impacto del tratamiento de calor en sí sobre la calidad de la biomasa

La operación del tratamiento de calor provoca una desactivación celular que tiene un efecto en las propiedades de la biomasa.

15 La desactivación celular porcentual (expresada como % de células viables residuales después de 1 minuto de tratamiento de calor) en función de las condiciones de tratamiento de calor se presenta en la figura 9.

Para que un tratamiento de calor dure 1 minuto, se alcanza una desactivación porcentual superior al 90% comenzando a 50°C.

La desactivación celular está acompañada por un fenómeno de liberación de materiales solubles intracelulares en el medio extracelular. Este fenómeno está probablemente unido a una permeabilización parietal.

20 Una disminución en la pureza celular, unida a un aumento en el contenido de sólidos del medio extracelular, se observa en general después del tratamiento de calor de la biomasa (figura 10). Los materiales solubles liberados consisten principalmente en sacarosa y, en menor grado, sales y proteínas.

Se produjo un diseño experimental en el cual las condiciones de tratamiento de calor se hacen variar.

25 La tabla a continuación presenta los lotes producidos mientras se hacen variar las condiciones del tratamiento de calor (HTST).

| lotes | Condiciones operativas |
|-------|------------------------|
| 42 | Sin tratamiento HTST |
| 23 | HTST 1 min a 75°C |
| 43 | HTST 1 min a 65°C |
| 45 | HTST 1 min a 50°C |
| 46 | HTST 3 min a 95°C |

La Tabla V a continuación presenta la lista de descriptores que son discriminantes en este conjunto de lotes (valor p menor que 0.2 con respecto al efecto producido):

Tabla V

| | Harina | juez |
|----------------------------------|--------|------|
| Retrogusto vegetal | 0.09 | 0.93 |
| Color | 0.10 | 0.05 |
| Recubrimiento | 0.18 | 0.61 |
| Hongo | 0.29 | 0.01 |
| Manteca/productos lácteos | 0.31 | 0.52 |
| Rancio | 0.44 | 0.90 |
| Cereales | 0.48 | 0.72 |
| Dulce | 0.54 | 0.01 |

- 5 El PCA se lleva a cabo para representar las diferencias entre los diversos lotes (figuras 11 y 12).

Pocos descriptores son discriminantes con respecto a este espacio producido ya que el mal sabor fue percibido con respecto a otros descriptores diferente de los de la evaluación.

De hecho, los lotes 42 y 45, además de tener un color más oscuro, son particularmente amargos, picantes y fermentados, dejando una sensación metálica en la boca.

- 10 Estos 2 lotes son los tratados con menos calor (42 no recibió ningún tratamiento HTST y 45: 1 min a 50°C).

El lote 46, por su parte, tiene un retrogusto vegetal; el tratamiento de calor durante 3 min a 95°C sería de este modo desfavorable para la calidad sensorial del producto.

El lote 23 tiene un perfil intermedio; el tratamiento de calor para 1 min/65°C (lote 43) es más favorable para obtener un perfil sensorial neutral.

15 **F. Impacto del lavado**

En el mismo modo que previamente, la empresa solicitante exploró el acoplamiento de estas nuevas condiciones de tratamiento de calor optimizadas con un paso de lavado optimizado, que hace posible atrapar estos materiales solubles extracelulares, para obtener propiedades organolépticas mejoradas de las harinas de microalgas producidas.

- 20 Se evaluaron varias condiciones de lavado.

La tabla a continuación presenta los lotes producidos al variar las condiciones de lavado (de acuerdo con una relación volumen de agua/volumen de biomasa).

| Lotes | Condiciones operativas |
|-------|---------------------------|
| 47 | Sin lavado |
| 49 | Lavado 6/1 (agua/biomasa) |
| 50 | Lavado 1/1 (agua/biomasa) |
| 51 | Lavado 3/1 (agua/biomasa) |

- 25 Se destacará que este diseño experimental hace posible analizar el impacto por el lavado "creciente" (del "menos lavado" al "más lavado", lote 47 <lote 50 <lote 51 <lote 49).

La Tabla VI a continuación presenta la lista de descriptores que son discriminantes en este conjunto de lotes (valor p menor que 0.2 con respecto al efecto de harina):

Tabla VI

| | Harina | juez |
|---------------------------|--------|------|
| Color | 0.00 | 0.00 |
| Recubrimiento | 0.02 | 0.19 |
| Dulce | 0.10 | 0.01 |
| Hongo | 0.24 | 0.00 |
| Cereales | 0.46 | 0.00 |
| Retrogusto vegetal | 0.51 | 0.01 |
| Manteca/productos lácteos | 0.60 | 0.27 |
| Rancio | 0.84 | 0.04 |

- 5 El PCA se lleva a cabo para representar las diferencias entre los diversos lotes. Los resultados están representados en las figuras 13 y 14.

Este estudio claramente demuestra la naturaleza esencial del lavado. El producto 47, que no está lavado, es más dulce y fue juzgado inaceptable. El producto no lavado (47) se distingue de los otros ya que es más dulce y tiene un sabor atípico diferente.

- 10 Los otros productos de este estudio tienen un perfil sensorial similar.

Sin embargo se destacará que un "simple" lavado (solo 1 volumen de agua por volumen de biomasa) conduce a una calidad de producto que es completamente adecuada y, por lo mismo, a un ahorro económico apreciable en la escala industrial (1 volumen útil de agua más que 6 volúmenes de agua por volumen de biomasa tratada).

G. Impacto de la acidificación durante la cosecha de la biomasa

- 15 Uno de los parámetros que no es considerado en absoluto en el control de los pasos responsables por la calidad organoléptica de las harinas producidas es el efecto del protocolo para detener la fermentación.

Convencionalmente, cuando al final de la fermentación el valor de pO_2 vuelve a subir, que es un signo de consumo total de la glucosa residual, el protocolo del final de la fermentación consiste en los siguientes pasos:

- Detener la regulación del pH,
- 20 - Enfriar la fermentadora a $T_p < 20^\circ C$,
- Reducir la agitación y la tasa de flujo de aire y
- Mantener una presión de aire en el domo.

En general ocurre una caída gradual en el pH de la fermentación inicial (ya sea que esté además fijado a 5.2 o a 6.8) a un pH cerca de 4.

- 25 Se demostró por la empresa solicitante que esta acidificación se correlaciona con una secreción de ácido láctico que resulta de un metabolismo limitado en términos de suministro de O_2 .

Esta observación fue, por lo tanto, evaluada desde un punto de vista sensorial para medir el impacto de la duración de la fase de almacenamiento antes del acondicionamiento de la biomasa, conduciendo dicho almacenamiento a esta acidificación.

- 30 Se producen dos lotes: con almacenamiento para un periodo de 8 horas (favoreciendo la acidificación) y sin almacenamiento.

La Tabla VII a continuación presenta la lista de descriptores que son discriminantes en este conjunto de productos (valor p menor que 0.2 con respecto al efecto de Harina):

Tabla VII

| | Harina | juez |
|---------------------------|----------|----------|
| Recubrimiento | 1.71E-02 | 7.50E-02 |
| Retrogusto vegetal | 2.27E-02 | 6.29E-02 |
| Hongo | 2.35E-02 | 1.25E-02 |
| Cereal | 7.40E-02 | 7.30E-02 |
| Dulce | 9.41E-02 | 3.69E-01 |
| Manteca/productos lácteos | 1.10E-01 | 7.27E-02 |
| Rancio | 2.61E-01 | 3.25E-01 |
| Color | 6.10E-01 | 4.29E-03 |

El PCA se lleva a cabo para representar las diferencias entre las harinas. Los resultados están representados en las figuras 15 y 16.

5 Los 3 productos (incluyendo el lote de referencia 1) se clasifican en un eje en el rango de manteca/productos lácteos/dulce a cereal/hongo/retrogusto vegetal/recubrimiento.

El lote "sin almacenamiento/acidificación" es el más dulce con manteca/productos lácteos más pronunciados. La referencia 1 es más recubrimiento con cereal/hongo/retrogusto vegetal; la prueba de "con almacenamiento/acidificación" se sitúa entre los dos.

10 Si las pruebas "con almacenamiento/acidificación" y "sin almacenamiento/acidificación" se comparan relativamente, la prueba "sin almacenamiento/acidificación" es de este modo más "neutral", tiene menos mal sabor que la prueba "con almacenamiento/acidificación".

El análisis sensorial claramente demuestra de este modo que una fase de almacenamiento larga acoplada a este fenómeno de acidificación degrada levemente el perfil sensorial del producto final ya que aparece una nota de cereal/hongo/retrogusto vegetal de intensidad débil.

15 **Descripción de las figuras**

FIGURA 1: Representación gráfica de los diversos lotes (nube de puntos) del PCA. Impacto del pH de la fermentación.

FIGURA 2: Círculo de correlación del PCA que representa los perfiles sensoriales de los diversos lotes. Impacto del pH de la fermentación.

20 **FIGURA 3:** Combinaciones de pre-molienda evaluadas.

FIGURA 4: Representación gráfica de los diversos lotes (nube de puntos) del PCA, impacto de los pasos para acondicionar la biomasa antes de ser molida.

FIGURA 5: Círculo de correlación del PCA que representa los perfiles sensoriales de los diversos lotes, impacto de los pasos de acondicionamiento de la biomasa antes de ser molida.

25 **FIGURA 6:** Otras combinaciones de pre-molienda evaluadas.

FIGURA 7: Representación gráfica de los diversos lotes (nube de puntos) del PCA, impacto de los pasos para acondicionar la biomasa antes de ser molida.

FIGURA 8: Círculo de correlación del PCA que representa los perfiles sensoriales de los diversos lotes, impacto de los pasos de acondicionamiento de la biomasa antes de ser molida.

30 **FIGURA 9:** Porcentaje de células viables residuales después de 1 minuto de tratamiento de calor en función de las condiciones de tratamiento de calor.

FIGURA 10: Comparación de la composición de la fracción de sobrenadante extraída de la biomasa antes y después del tratamiento de calor (HTST).

35 **FIGURA 11:** Representación gráfica de los diversos lotes (nube de puntos) del PCA, impacto del tratamiento de calor.

FIGURA 12: Círculo de correlación del PCA que representa los perfiles sensoriales de los diversos lotes, impacto del tratamiento de calor.

FIGURA 13: Representación gráfica de los diversos lotes (nube de puntos) del PCA, impacto del lavado.

5 **FIGURA 14:** Círculo de correlación del PCA que representa los perfiles sensoriales de los diversos lotes, impacto del lavado.

FIGURA 15: Representación gráfica de los diversos lotes (nube de puntos) del PCA, impacto de la acidificación durante la cosecha de la biomasa.

FIGURA 16: Círculo de correlación del PCA que representa los perfiles sensoriales de los diversos lotes, impacto de la acidificación durante la cosecha de la biomasa.

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para acondicionar una biomasa de microalgas del género *Chlorella*, preferiblemente *Chlorella protothecoides*, producida en condiciones heterotróficas y en ausencia de luz para la preparación de una harina que tiene un perfil sensorial optimizado, donde el método de acondicionamiento se caracteriza por que comprende los siguientes pasos:
- recolección de la biomasa directamente al final de la fermentación y almacenamiento durante menos de 8 horas antes del acondicionamiento de la misma,
 - tratamiento de calor de alta temperatura / corto tiempo (HTST) de la biomasa recuperada y almacenada de este modo, durante de 30 segundos a 1 min 30, a una temperatura de entre 60 y 68°C y
- 10 - lavado de la biomasa tratada con HTST con a lo sumo 3 volúmenes de agua por volumen de biomasa.
2. El método como se reivindica en la reivindicación 1, caracterizado por que el tiempo de almacenamiento para la biomasa antes de ser acondicionada y molida es de menos de 3 horas, preferiblemente menos de 1 hora.
3. El método como se reivindica en la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que el tratamiento de calor HTST se lleva a cabo durante 1 minuto a una temperatura de 65°C ± 2°C, preferiblemente de 65°C.
- 15 4. El método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la biomasa se lava con un volumen de agua por volumen de biomasa.
5. El método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el tratamiento HTST se lleva a cabo antes del paso de lavado de la biomasa.
- 20 6. El método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la biomasa se obtuvo con fermentación de la microalga del género *Chlorella* a un pH inicial entre 6.5 y 7, preferiblemente 6.8 y con regulación del pH de la fermentación a un valor de entre 6.5 y 7, preferiblemente a un valor de 6.8.
7. Un método para producir una biomasa de microalgas del género *Chlorella*, preferiblemente *Chlorella protothecoides*, para la preparación de una harina que tiene un perfil sensorial optimizado que comprende:
- 25 - la producción de una biomasa mediante fermentación de microalgas del género *Chlorella*, preferiblemente *Chlorella protothecoides*, en condiciones heterotróficas y en ausencia de luz, donde el pH inicial de la fermentación y la regulación del pH durante la fermentación se fijan a un valor de entre 6.5 y 7, preferiblemente a un valor de 6.8; y
 - el acondicionamiento de la biomasa por medio de un método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 30 8. Un método para preparar una harina de microalgas del género *Chlorella*, preferiblemente *Chlorella protothecoides*, que tiene un perfil sensorial optimizado que comprende:
- el acondicionamiento de la biomasa por medio de un método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5;
 - la molienda de la biomasa acondicionada; y
- 35 - el secado de la biomasa molida.
9. El método para preparar una harina de microalgas del género *Chlorella*, preferiblemente *Chlorella protothecoides*, que tiene un perfil sensorial optimizado, como se reivindica en la reivindicación 8, que también comprende, antes del acondicionamiento, la producción de una biomasa mediante fermentación de microalgas del género *Chlorella*, preferiblemente *Chlorella protothecoides*, en condiciones heterotróficas y en ausencia de luz, siendo el pH inicial de la fermentación y la regulación del pH durante la fermentación fijados a un valor de entre 6.5 y 40 7, preferiblemente a un valor de 6.8.

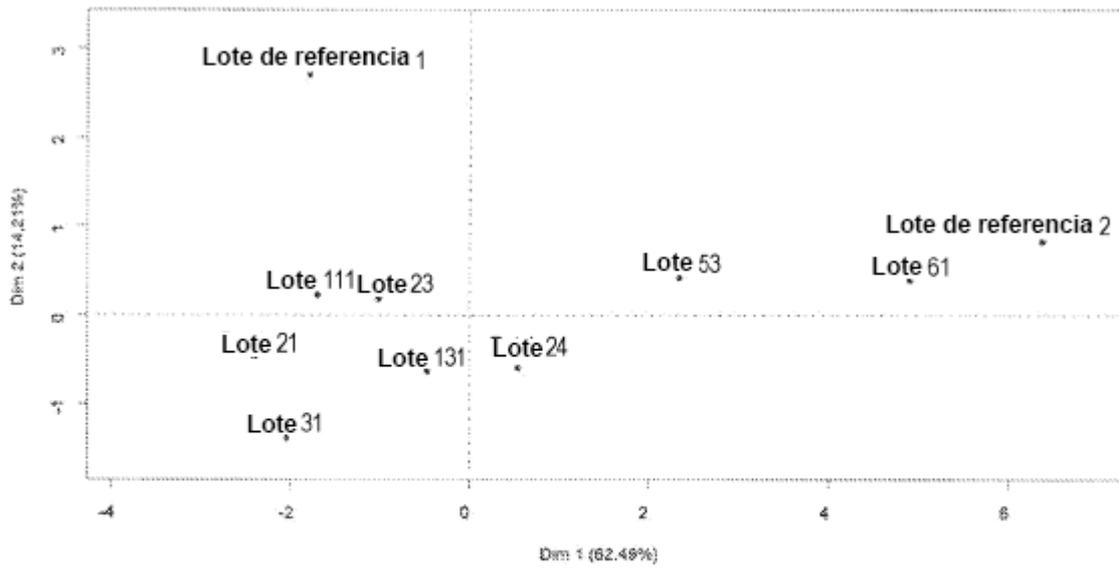


FIGURA 1

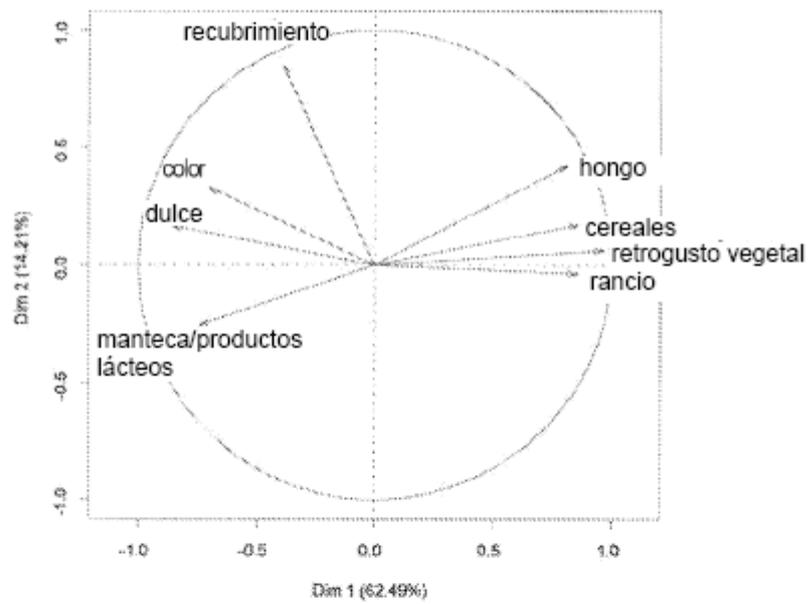


FIGURA 2

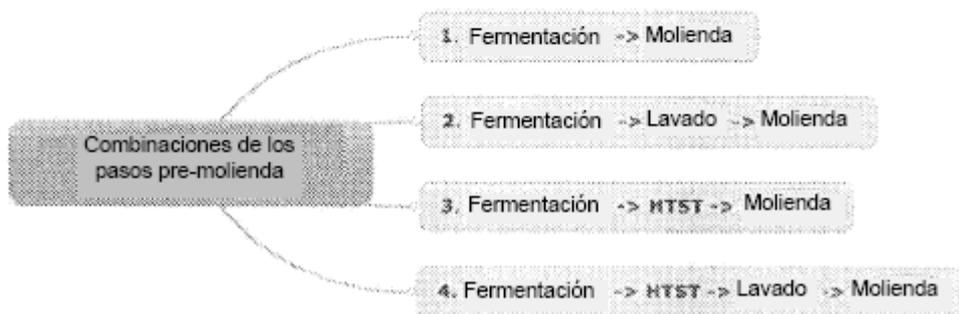


FIGURA 3

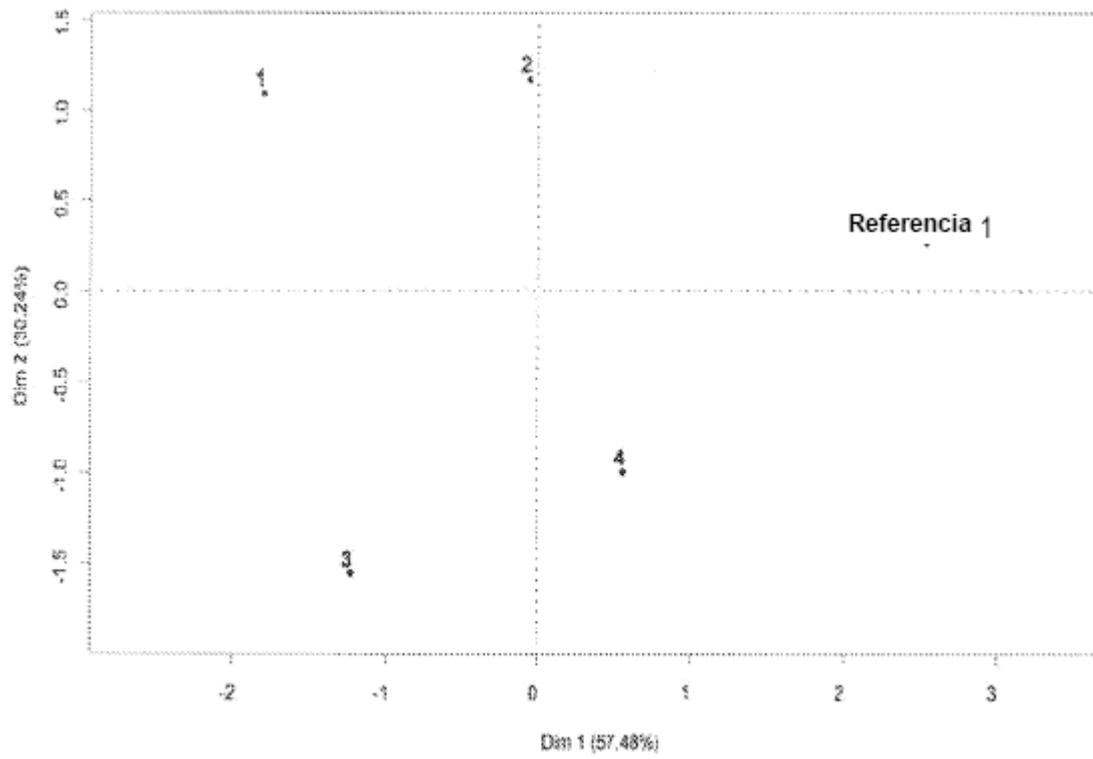


FIGURA 4

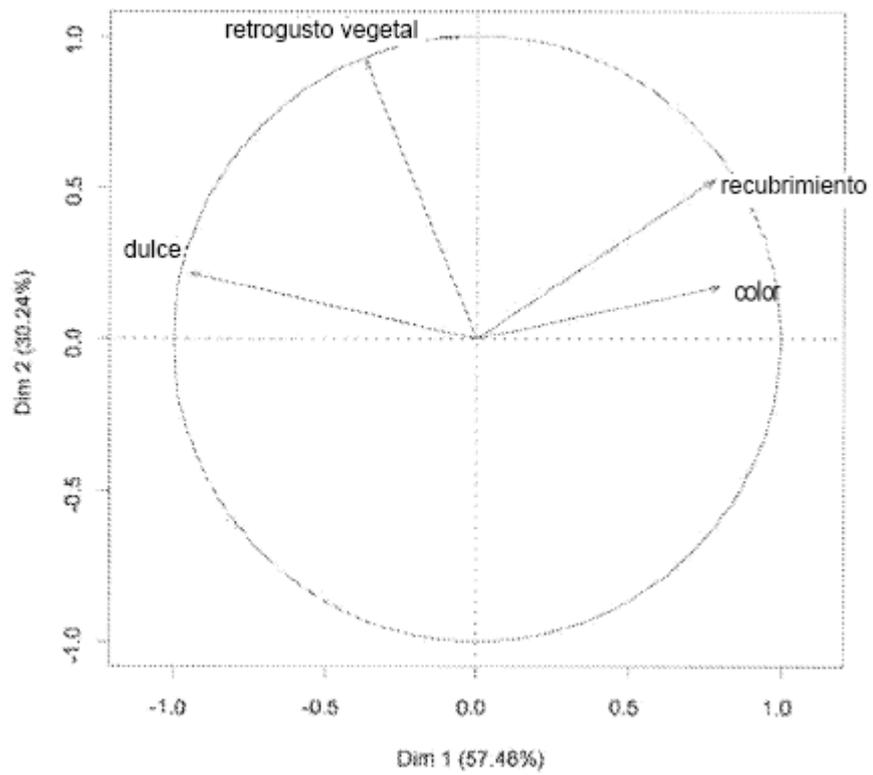


FIGURA 5

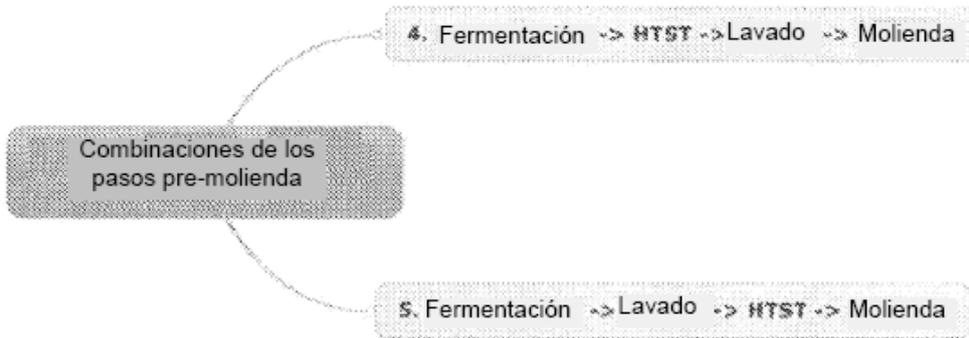


FIGURA 6

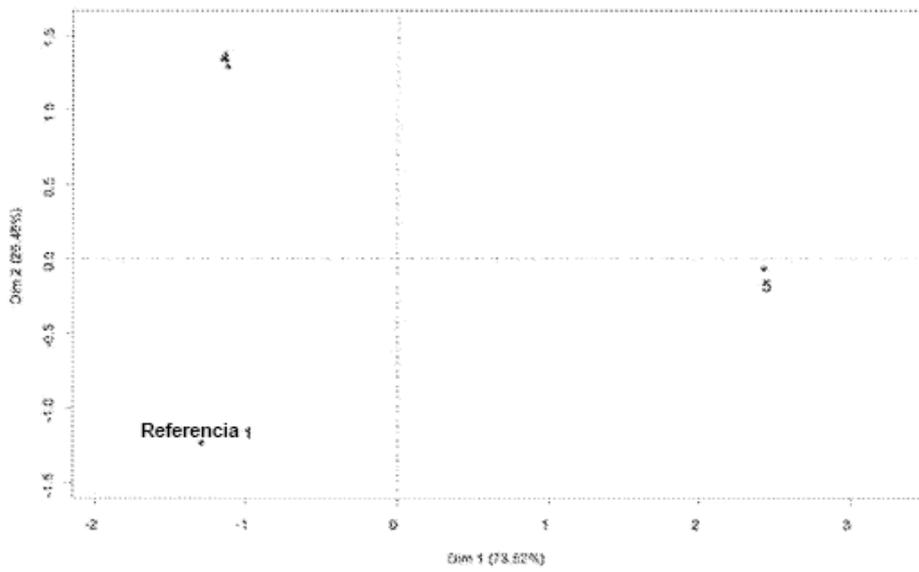


FIGURA 7

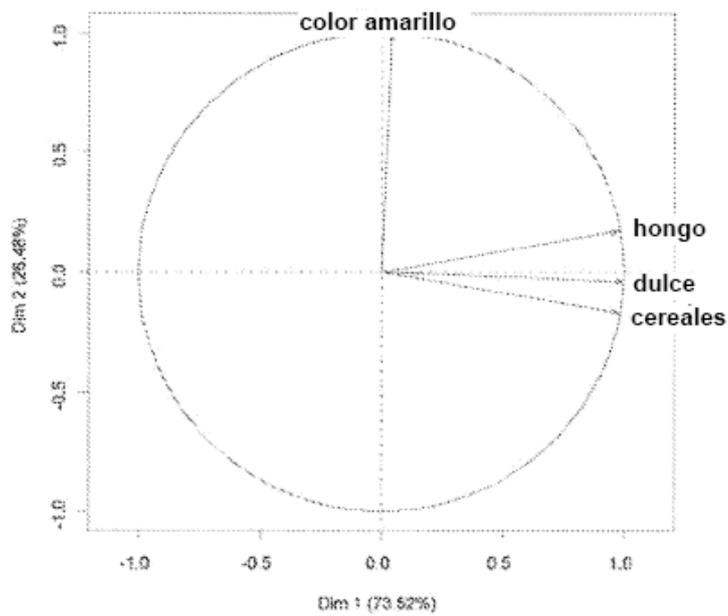
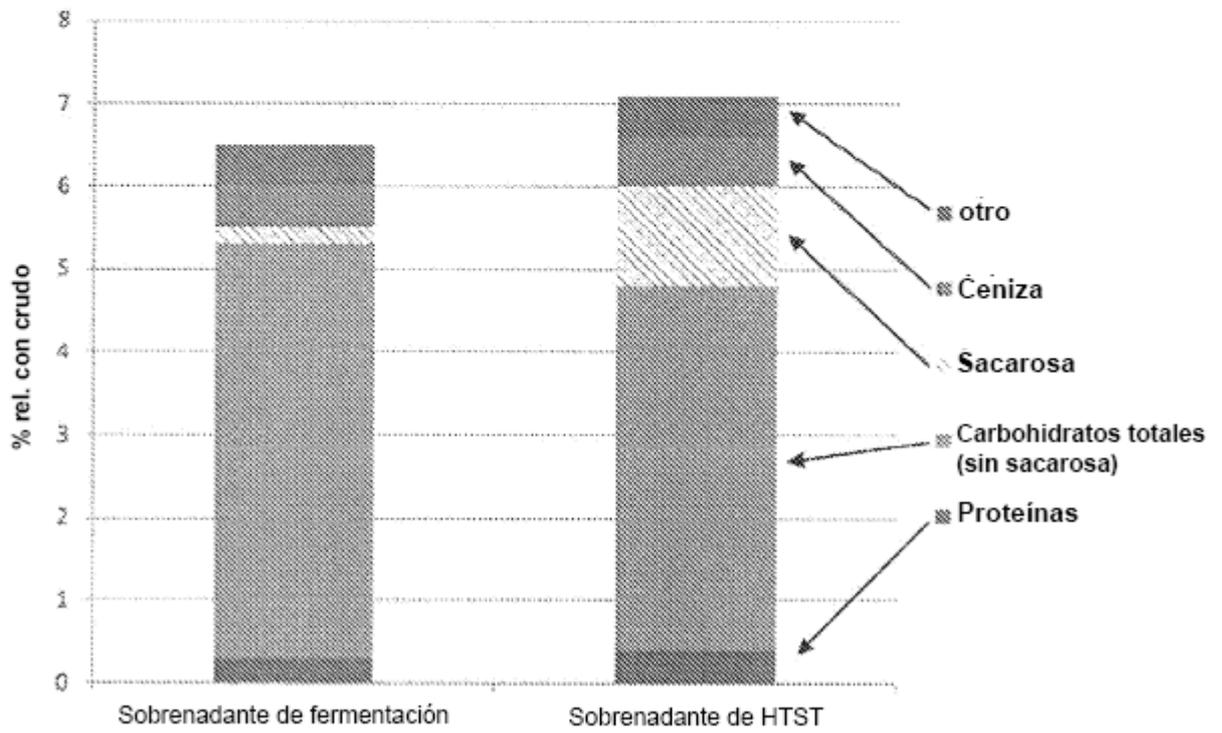
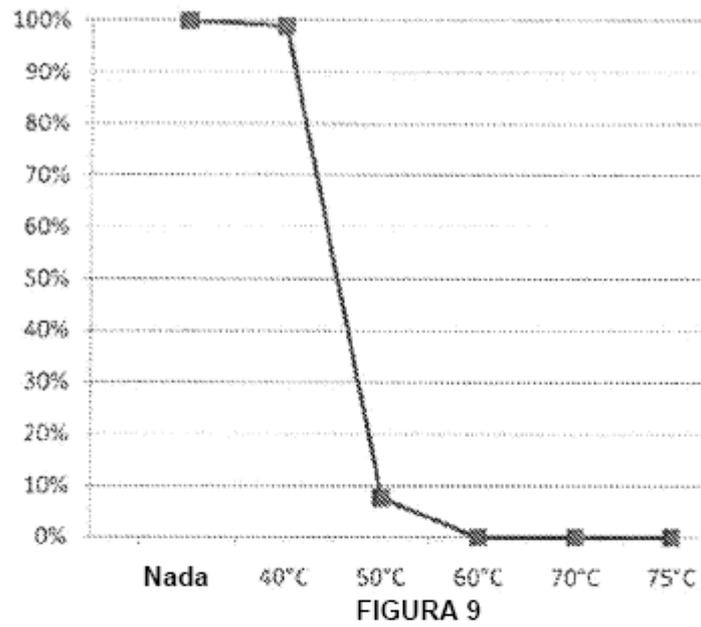


FIGURA 8



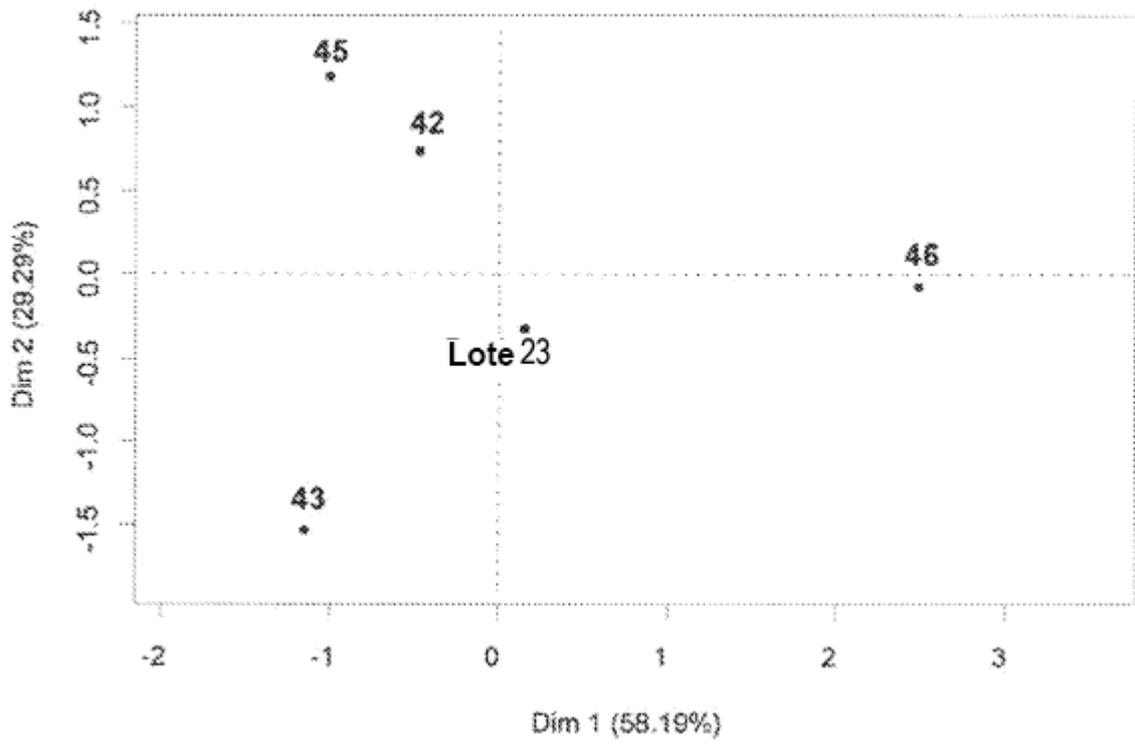


FIGURA 11

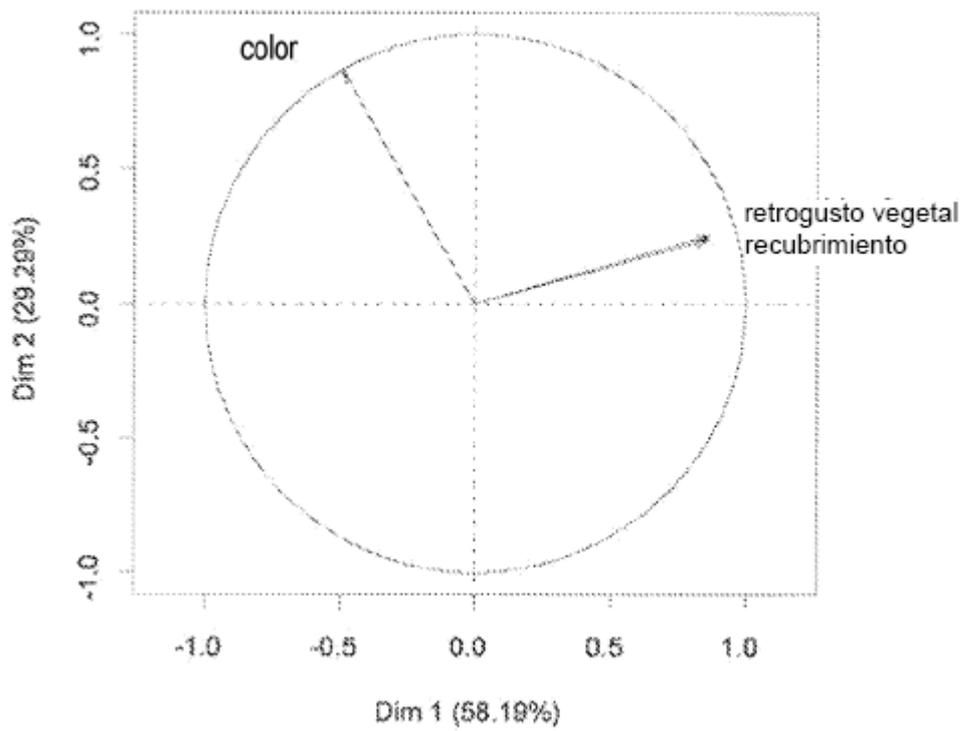


FIGURA 12

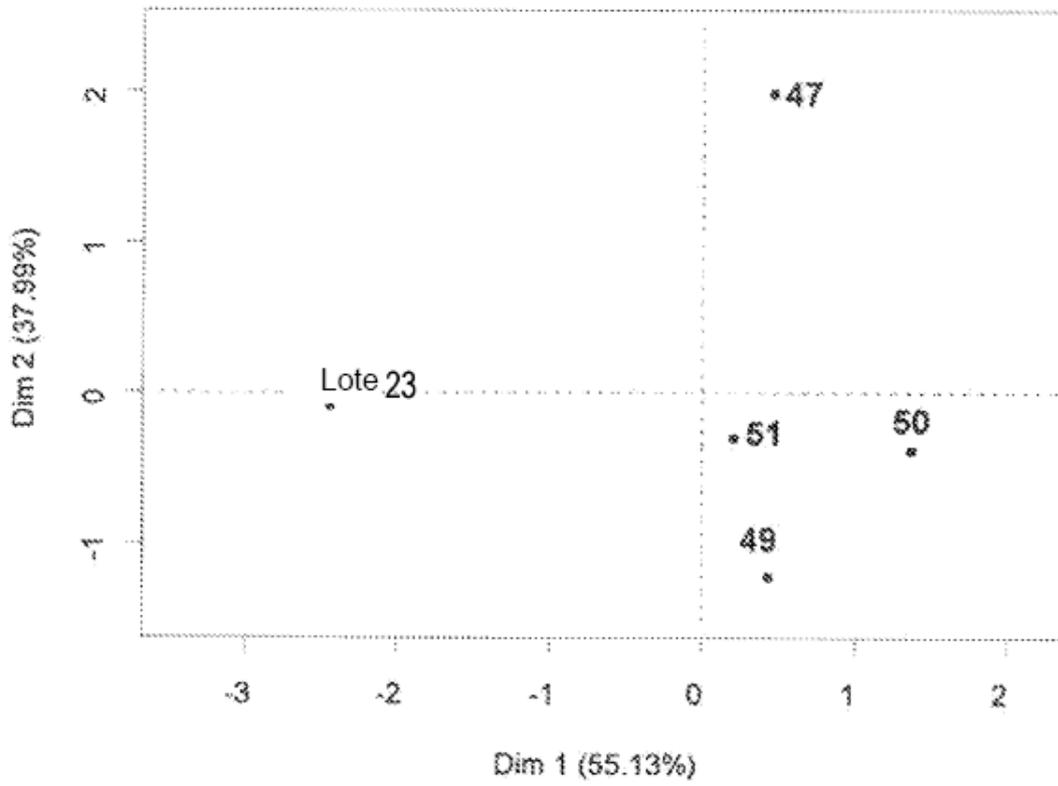


FIGURA 13

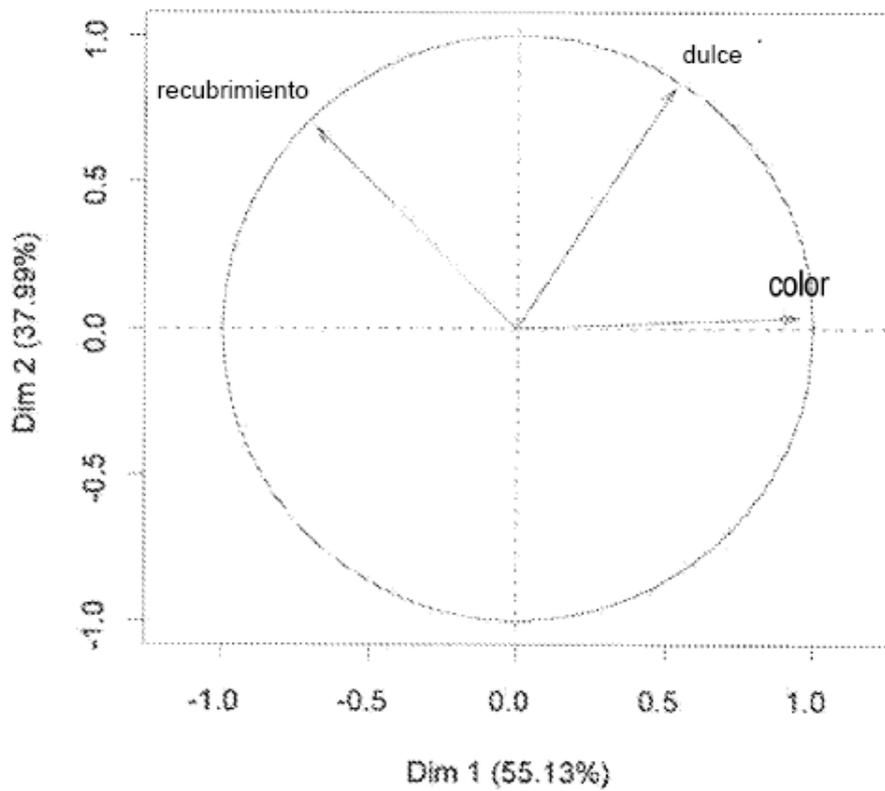


FIGURA 14

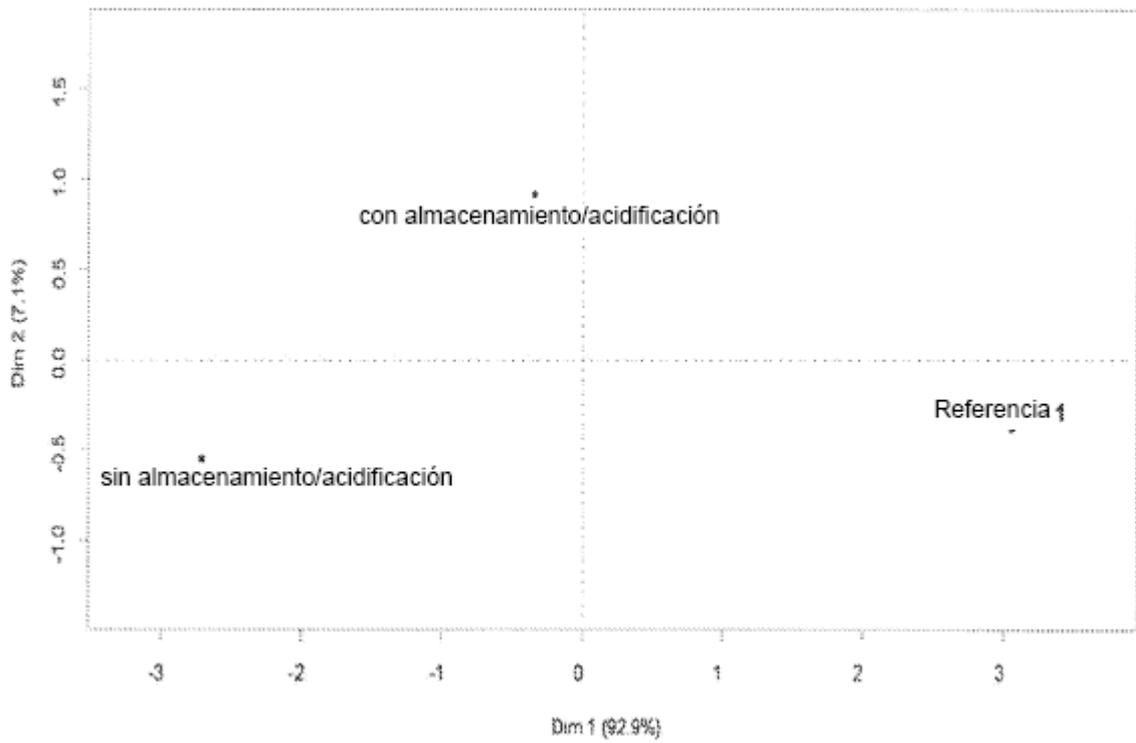


FIGURA 15

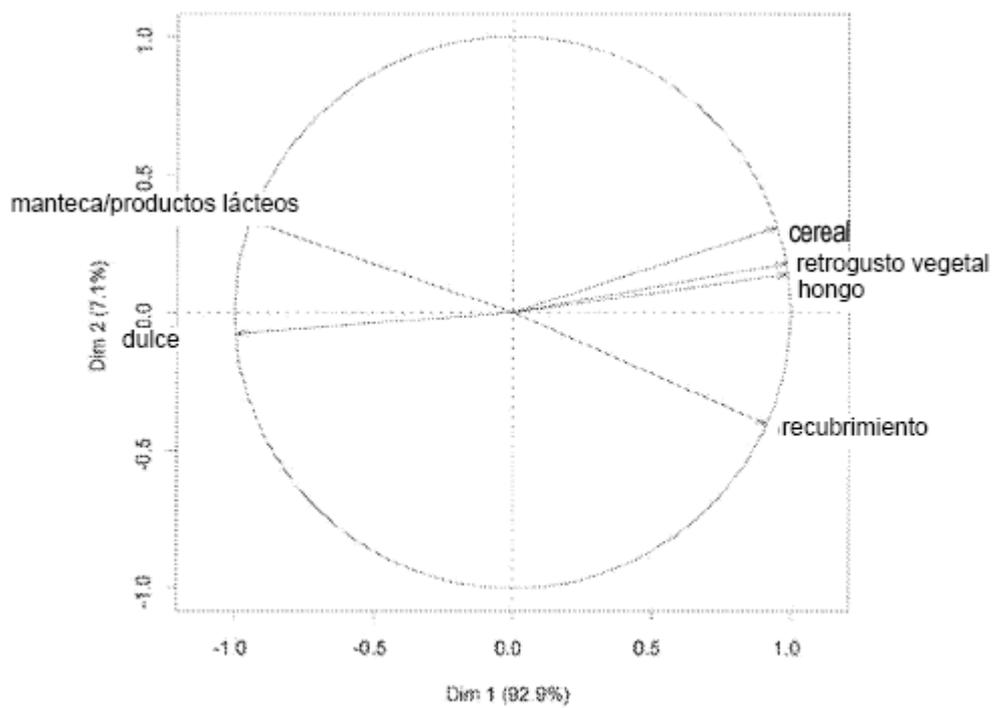


FIGURA 16