

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 830**

51 Int. Cl.:

C12N 1/00 (2006.01)

C12N 1/12 (2006.01)

C12N 1/02 (2006.01)

C12N 1/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.07.2014 PCT/FR2014/051918**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.01.2015 WO15011418**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2014 E 14750775 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2017 EP 3024923**

54 Título: **Procedimiento de optimización del rendimiento de producción, de la calidad organoléptica y de la estabilidad en el tiempo de una biomasa de microalgas ricas en proteínas**

30 Prioridad:

25.07.2013 FR 1357326

25.03.2014 FR 1452486

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

20.11.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

DRUON, AMANDINE;
PATINIER, SAMUEL y
TOURSEL, BÉATRICE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 642 830 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 optimización del rendimiento de producción, de la calidad organoléptica y de la estabilidad en el tiempo de una biomasa de microalgas ricas en proteínas

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento de optimización del rendimiento de producción, de la calidad organoléptica y de la estabilidad en el tiempo de una biomasa de microalgas ricas en proteínas, microalgas del género *Chlorella*, más particularmente *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* o *Chlorella protothecoides*.

Presentación del estado de la técnica

Es bien sabido por los expertos que las clorelas son una posible fuente de alimento, porque son ricas en proteínas y otros nutrientes esenciales.

- 10 Contienen particularmente 45 % de proteínas, 20 % de materias grasas, 20 % de glúcidos, 5 % de fibras y 10 % de minerales y vitaminas.

El uso de las microalgas (y principalmente sus proteínas) como alimentos es, cada vez más, considerado para encontrar fuentes alternativas a la demanda creciente de proteínas animales a nivel mundial (según informa la FAO).

- 15 La Unión Europea, desde hace años, sufre por otra parte de un déficit estructural en proteínas vegetales que se eleva, en estos últimos años, a más de 20 millones de toneladas de equivalente en soja, hoy en día importadas de América del Sur.

La producción de masa de ciertas microalgas ricas en proteínas se proyecta entonces como una posibilidad de subsanar ese « déficit en proteínas ».

- 20 Análisis exhaustivos y estudios nutricionales han demostrado que esas proteínas de algas son equivalentes a las proteínas vegetales convencionales, incluso de mejor calidad.

De todas formas, en razón de los altos costos de producción así como de las dificultades técnicas para integrar el material proveniente de las microalgas en preparaciones alimentarias organolépticamente aceptables, la difusión amplia de las proteínas de microalgas está todavía en sus primeras etapas.

- 25 Se ha informado de biomasa de microalgas de diferentes especies que presentan un elevado porcentaje de proteínas (véase la tabla 1 de Becker, *Biotechnology Advances* (2007)25:207-210).

Una cierta cantidad de solicitudes de patentes en el estado de la técnica, como la solicitud de patente WO 2010/045368, enseñan que es posible ajustar las condiciones de cultivo de manera de aumentar aún el contenido de proteínas en la biomasa de microalgas.

- 30 De manera preferente, para las microalgas que tienen la capacidad, el cultivo se realiza en heterotrofia, en ausencia de luz y en presencia de una fuente de carbono asimilable.

Esas vías de proliferación en heterotrofia permiten a la vez realizar producciones en masa de microalgas y mejorar la calidad organoléptica al inhibir la síntesis de clorofila por la microalga, que es el origen del gusto pronunciado a té verde en las preparaciones alimentarias que la contienen.

- 35 Para enriquecer el contenido en proteínas, la microalga se cultiva en un medio enriquecido en nitrógeno en presencia de una fuente de carbono abundante, como la glucosa. El nitrógeno es aportado entonces indistintamente por fuentes orgánicas o minerales.

La biomasa de microalgas producida de esta manera contiene habitualmente al menos 40 %, por ejemplo hasta 50 - 60 % de proteínas en peso seco de células.

- 40 Sin embargo nada se adquiere, en el sentido que, aparte de los trabajos desplegados para los procedimientos de fase anterior (término inglés « *Upstream Process* ») de producción de biomasa ricas en proteínas - particularmente la búsqueda de condiciones de fermentación adaptadas - nacen otras dificultades del tratamiento de fase final de dicha biomasa (término inglés « *Downstream Process* ») para incorporarla en las preparaciones alimentarias de interés.

Clásicamente, el tratamiento de fase final comprende varias etapas.

- 45
- recolección de microalgas separadas de su medio de proliferación,
 - pasteurización y lavado,
 - eventualmente ruptura de las células a fin de liberar de ellas las moléculas de interés,

- secado.

La primera etapa de recolección de las células se realiza mediante la puesta en práctica de una o varias etapas de separación sólido/líquido.

5 La biomasa se recoge habitualmente por sedimentación, centrifugación o filtración, y alguna vez es necesaria una etapa de floculación complementaria.

A continuación de esta primera etapa, que puede permitir concentrar la suspensión de 50 a 200 veces, dicha suspensión de microalgas debe ser tratada rápidamente a falta de lo cual se degrada rápidamente.

10 Una primera operación consiste en pasteurizar dicha suspensión, es decir calentarla de manera de limitar o inhibir la carga microbiana (multiplicación de bacterias contaminantes), pero también de manera de inactivar ciertas enzimas capaces de generar gustos u olores indeseables (« Off-Flavors »).

Esta operación se lleva a cabo clásicamente a alta temperatura durante un tiempo corto (procedimiento denominado « High Temperature Short Time » o HTST o a ultra alta temperatura o UHT)

Una segunda operación es el lavado, recomendado sobre células intactas (con volúmenes de agua destilada o desionizada) de manera de eliminar las impurezas solubles.

15 En el caso en el que se proyecta una etapa de ruptura celular, son posibles varias vías: mecánicas (homogeneizadores, trituración por bolas o ultrasonido), o no mecánicas (vía alcalina, ciclos de congelación/descongelación, solventes orgánicos o choques osmóticos).

La elección del método es en función de la naturaleza de la pared celular de la microalga que se va a romper y de la naturaleza del producto que se va a aislar.

20 La última etapa del tratamiento de fase final consiste en la deshidratación de dicha suspensión (células intactas o lisadas). Se han empleado varios métodos para secar las microalgas de género *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Spirulina*. Los más clásicos son la atomización, el secado en secadora de tambor y la liofilización. La atomización es el método utilizado con mayor frecuencia a escala industrial.

Sin embargo, la sensibilidad de alguna biomasa a la oxidación impone el agregado de antioxidantes.

25 A pesar de esta diversidad de métodos, y de la combinación de métodos adaptados a las microalgas, siguen existiendo seis dificultades principales (enumeradas de a) a f) a continuación) que aún no han sido resueltas de manera satisfactoria por los expertos, en particular:

a) la pérdida de rendimiento en proteínas en el curso del tratamiento de fase final (*Downstream Process*),

30 b) la pérdida del contenido en proteínas deplorado después de la etapa de desactivación térmica de la biomasa (que puede llegar a un 25 % de pérdida),

c) la generación de gustos u olores indeseables (Off-Notes) no controlados, a pesar de las etapas de lavado recomendadas,

d) la ausencia de estabilidad en el tiempo de los lotes producidos aún sin explicación, y de reproducibilidad en la estabilidad puesto que algunos lotes son estables y otros no,

35 e) los riesgos de contaminación microbiana del producto terminado, y

f) la caída del rendimiento energético global del procedimiento de purificación basado en la mala gestión del factor de concentración de la biomasa.

Resumen de la invención

40 Para remediar esas dificultades, la sociedad Solicitante ha elegido conducir trabajos sobre la puesta en práctica de etapas de tratamiento de fase final adaptadas y cuya eficacia puede ser medida:

a) mediante el cálculo del rendimiento y el contenido de proteínas en la biomasa producida y/o el contenido de biomasa seca, pero asimismo

b) mediante métodos de análisis sensorial, y/o

45 c) de medición de la estabilidad en el tiempo de los lotes producidos, gracias a un método de envejecimiento acelerado totalmente particular, desarrollado por la sociedad Solicitante.

La presente invención se refiere a un procedimiento de optimización del tratamiento de fase final de una biomasa de microalgas del género *Chlorella* rica en proteínas, preparada previamente por fermentación en condiciones heterotróficas y en ausencia de luz, que comprende:

1) proporcionar una biomasa que contenga más de 50 % de proteínas en peso seco de la biomasa;

5 **luego, efectuar** a una temperatura inferior 8 °C, preferentemente inferior a 4 °C:

2) la recolección de la biomasa al final de la fermentación,

3) el lavado y la concentración de la biomasa

4) opcionalmente, la lisis de la biomasa,

luego, sin restricción de la temperatura inferior a 8 °C.

10 5) opcionalmente, concentrar la suspensión de biomasa,

6) aplicar un tratamiento térmico,

7) secar la biomasa obtenida de esa manera para obtener el producto,

una etapa de ajuste del pH a 7 que se aplica antes o después de la etapa 6) de tratamiento térmico.

15 Preferentemente, la biomasa contiene más de 50 % en peso seco de proteínas, preferentemente más de 55 %, aún más preferentemente más de 60, 65 o 70 %.

Cuando las etapas se efectúan a temperatura baja, la temperatura se mantiene inferior a 8 °C, preferentemente inferior a 4 °C. Preferentemente, esta temperatura baja se aplica todo a lo largo de las etapas 2) a 4) del procedimiento según la invención.

20 Preferentemente, el tratamiento térmico es un tratamiento térmico a alta temperatura/tiempo corto (HTST) durante 30 segundos a 5 minutos, a una temperatura inferior a 100 °C.

Alternativamente, el tratamiento térmico es un tratamiento térmico a ultra alta temperatura (UHT) a una temperatura comprendida entre 100 °C y 150 °C, durante 5 a 30 segundos.

Preferentemente, el lavado de la biomasa se realiza con un máximo de 6 volúmenes de agua para 1 volumen de biomasa, preferentemente con un máximo de 3 volúmenes de agua.

25 Preferentemente, la neutralización de la suspensión de biomasa a pH 7 se realiza mediante agregado de KOH o NaOH, preferentemente mediante agregado de KOH.

Preferentemente, la lisis de las células de la biomasa se realiza por trituración, preferentemente mediante trituración por bolas.

Preferentemente, la concentración de la biomasa se realiza por centrifugación o evaporación.

30 Opcionalmente, los efectos de las etapas de tratamiento de la biomasa de microalgas sobre la calidad del producto pueden ser determinadas mediante uno o varios de los parámetros siguientes:

- medición del peso seco de las células en la biomasa;

- medición del contenido de azúcares;

- determinación de la cantidad de proteínas;

35 • análisis de los compuestos orgánicos volátiles;

- medición de actividades enzimáticas, en particular la actividad de lipooxigenasa;

- medición de la coloración o del contenido de pigmentos:

- medición del contenido de metales, en particular hierro, cobre o níquel;

- determinación del grado de oxidación.

40 En particular, se comparan, para la calidad del producto, los efectos de varios tratamientos de biomasa y se eligen el tratamiento o los tratamientos que dan los mejores resultados.

En un modo de realización particular, las microalgas de género *Chlorella* se eligen del grupo constituido por *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* y *Chlorella protothecoides*, y son más particularmente *Chlorella protothecoides*.

El objetivo de este procedimiento es en particular la puesta a punto de un procedimiento optimizado de producción de alto rendimiento de biomasa de microalgas ricas en proteínas, sin gustos ni olores indeseables y estable en el tiempo.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento optimizado que permite satisfacer todas las exigencias propias de la producción de biomasa de microalgas ricas en proteínas, más particularmente en términos del rendimiento de producción en proteínas, de la calidad organoléptica y de la estabilidad en el tiempo de dicha biomasa.

La presente invención se refiere también a un procedimiento de optimización del tratamiento de fase final de una biomasa de microalgas del género *Chlorella* rica en proteínas, preparada previamente por fermentación en condiciones heterotróficas y en ausencia de luz, que comprende:

- 1) proporcionar una biomasa que contenga más de 50 % de proteínas en peso seco de la biomasa;

luego, efectuar a una temperatura inferior 8 °C, preferentemente inferior a 4 °C:

- 2) la recolección de la biomasa al final de la fermentación,
- 3) el lavado y la concentración de la biomasa,
- 4) opcionalmente, la lisis de la biomasa,

luego, sin restricción de la temperatura inferior a 8 °C.

- 5) opcionalmente, concentrar la suspensión de biomasa,

- 6) aplicar un tratamiento térmico,

- 7) secar la biomasa obtenida de esa manera para obtener el producto,

una etapa de ajuste del pH a 7 que se aplica antes o después de la etapa 6) de tratamiento térmico.

Según la etapa 1) del procedimiento según la invención, la biomasa contiene al menos 50 % en peso seco de proteínas. De manera aún más preferida, contiene al menos 55, 60, 65 o 70 % en peso seco de proteínas.

Las microalgas preferidas de la invención pueden proliferar en condiciones heterotróficas (en azúcares como fuente de carbono y en ausencia de luz). La sociedad Solicitante recomienda elegir microalgas del género *Chlorella* ricas en proteínas. Las microalgas utilizadas se pueden elegir, y de manera no exhaustiva, entre las *Chlorella protothecoides*, *Chlorella kessleri*, *Chlorella minutissima*, *Chlorella sp.*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella luteoviridis*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella reisiigii*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella saccarophila*, *Parachlorella kessleri*, *Parachlorella beijerinckii*, *Prototheca stagnora* y *Prototheca moriformis*. De manera preferida, las microalgas utilizadas según la invención pertenecen a la especie *Chlorella protothecoides*.

En un modo muy particular, la cepa de *Chlorella sorokiniana* es la cepa UTEX 1663 - *The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin*- USA. En un modo muy particular, la cepa de *Chlorella protothecoides* es la cepa CCAP211/8D- *The Culture Collection of Algae and Protozoa*, Scotland, UK. Las microalgas se cultivan en medio líquido para producir la biomasa como tal. Según la invención, las microalgas se cultivan en un medio que contiene una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno en ausencia de luz (condiciones heterotróficas). Los medios de cultivo sólidos y líquidos se encuentran generalmente disponibles en la bibliografía, y las recomendaciones para la preparación de los medios particulares que convienen a una gran cantidad de cepas de microorganismos se pueden encontrar, por ejemplo, en línea en www.utex.org/, un sitio mantenido por la universidad de Texas en Austin para su colección de cultivo de algas (UTEX). La producción de biomasa se realiza en fermentadores (o biorreactores).

Los ejemplos específicos de biorreactores, las condiciones de cultivo, la proliferación heterótrofa y los métodos de preparación se pueden combinar de cualquier manera adecuada para mejorar la eficacia de la proliferación de las microalgas y el contenido de proteínas. Los métodos de producción de una biomasa ese tipo son bien conocidos por los expertos.

Las etapas 2 a 4 del procedimiento según la invención, se realizan a una temperatura baja, es decir una temperatura mantenida por debajo de 8 °C, preferentemente por debajo de 4 °C. Esta temperatura baja permite detener o frenar el metabolismo celular así como el desarrollo de contaminantes microbianos.

Por otra parte, como ha destacado la sociedad Solicitante, otra ventaja de esta realización a baja temperatura es que el enfriamiento así como la oxigenación limitada favorecen la limitación de los fenómenos oxidativos generadores de los « *off notes* » y fuente de inestabilidad del producto terminado.

Más particularmente:

- 5

 - En la etapa 2) del procedimiento según la invención, se recoge la biomasa al final de la fermentación.

De manera ventajosa, se recoge la biomasa desde el agotamiento de la fuente nutritiva residual (en particular de la glucosa residual). Estas condiciones permiten optimizar los rendimientos de producción de la biomasa producida y limitar la concentración de compuestos solubles residuales a eliminar en la etapa de lavado.
 - En la etapa 3) del procedimiento según la invención, se efectúa el lavado y la concentración de la biomasa.

La biomasa se lava, eliminando los compuestos solubles residuales del fin de la fermentación (sales, azúcares no metabolizadas, ...) por dilución con agua.

10 La biomasa se lava con un máximo de 6 volúmenes de agua por volumen de biomasa, preferentemente con un máximo de 3 volúmenes de agua por volumen de biomasa, y en un modo de realización muy particular con aproximadamente un volumen de agua por volumen de biomasa.

Esta operación permite mejorar significativamente la pureza celular (disminuir la parte de materia seca del fin de la fermentación procedente de un componente no celular).

15 Por esa vía, se disminuye la carga de esos compuestos solubles, potencialmente fuente de degradación de las propiedades sensoriales de la biomasa. Esta operación se lleva a cabo ventajosamente en condiciones de baja temperatura.

A continuación la biomasa se concentra hasta 15 a 40 % de materia seca, preferentemente hasta 20 - 30 % de materia seca.

20 Se puede concentrar por centrifugación, por ejemplo utilizando la centrífuga Alfa Laval FEUX 510.
 - En la etapa 4, de manera opcional, se lisa la biomasa así obtenida.

Las paredes celulares y los componentes intracelulares se trituran o reducen.

Se dispone de diferentes técnicas para realizar la lisis como la trituración por microbolas y la tecnología de homogeneización a alta presión.

25 El modo preferido es la trituración por microbolas, en particular trituración mediante trituración por bolas « Bead Mill ».

Clásicamente, se utiliza un triturador de bolas NETZSCH Labstar con bolas de silicato de circonio de 0,5 mm de diámetro. La tasa de lisis puede ser variable. Por ejemplo, se puede proyectar una tasa de lisis de 50, 60, 70, 80, 90 o 95 % de las células.
- 30 Las tres últimas etapas del procedimiento según la invención se realizan sin restricción de temperatura baja.

En la etapa 5), de manera opcional, se concentra la suspensión de biomasa así obtenida.

La biomasa se concentra por evaporación. Se puede utilizar todo tipo de evaporador, por ejemplo un evaporador rotativo, de corriente forzada, de flujo descendente o de película agitada.

35 La concentración por evaporación participa de la mejora del factor de concentración antes del secado al optimizar los rendimientos energéticos del procedimiento. Esta concentración permite asimismo una eliminación (« stripping ») de los volátiles potencialmente nefastos en relación con las propiedades sensoriales del producto terminado.

 - En la etapa 6), se aplica un tratamiento térmico,

Ese tratamiento térmico actúa como una seguridad de cara a los riesgos microbiológicos sobre el producto terminado.

40 Clásicamente, consiste en un tratamiento HTST o UHT. Por otra parte, ese tratamiento térmico participa de la mejora de las propiedades sensoriales del producto terminado.

Se consideran en particular dos tipos diferentes de tratamientos térmicos. El primer tipo es un tratamiento térmico a alta temperatura/tiempo corto (HTST) de la biomasa, por ejemplo durante 30 segundos a 5 minutos, a una temperatura inferior a 100 °C.

El segundo tipo es un tratamiento térmico UHT (ultra alta temperatura). Preferentemente, el tratamiento térmico UHT se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 100 y 150 °C durante 5 a 30 segundos, preferentemente a una temperatura comprendida entre 120 y 140 °C durante 5 a 15 segundos.

- En la etapa 7), se seca la biomasa así obtenida para obtener el producto.

5 De manera preferencial, se efectúa el secado por atomización. La atomización se realiza en un atomizador en el que la suspensión líquida se pulveriza bajo la forma de una dispersión de finas gotitas en una corriente de aire caliente, el material acarreado se seca rápidamente y forma un polvo seco.

10 Existen en el estado de la técnica múltiples dispositivos de secado por atomización de compuestos ricos en lípidos. Se pueden encontrar fácilmente en la bibliografía ilustraciones de las tecnologías y los equipos propuestos: por ejemplo en el Spray Drying Handbook, de K. MASTERS, fundamentalmente en su 5ª edición, publicada en 1991 y vuelta a publicar en 1994 por Longman Scientific & Technical (disponible en la British Library o en la Library of Congress con el ISBN 0-470-21743-X) o en el BETE® Spray Dry Manual, 2005 (accessible en la dirección de Internet www.bete.com).

15 Por ejemplo, la atomización se puede realizar en una torre de atomización a efecto simple NIRO-Minor Mobil o en un Filtermat FMD125 con un ciclón.

Una última etapa clave consiste, antes o después de la etapa 6) de tratamiento térmico, en neutralizar la suspensión de biomasa (no lisada o lisada) a pH 7.

20 Esta neutralización se puede hacer por ajuste del pH a 7 mediante agregado de NaOH o KOH, preferentemente de KOH. Esta neutralización con potasa concentrada permite suavizar las fluctuaciones posibles de pH posteriormente y entre los lotes de producción, pero asimismo mejorar las propiedades sensoriales.

También se puede elegir agregar uno o varios oxidantes (antes o después de la etapa de neutralización del pH a un valor de 7).

Se puede elegir ventajosamente ácido ascórbico y/o una mezcla de tocoferoles, preferentemente una combinación de ácido ascórbico y tocoferoles.

25 Clásicamente las proporciones utilizadas son de 150 ppm/seca de ácido ascórbico y 500 ppm/seca de una mezcla de tocoferoles. (x ppm/seca significa x mg por kg de de biomasa seca).

Se entiende que la naturaleza del antioxidante depende de las propiedades de la matriz que se va a estabilizar. Éstos deben mejorar la estabilidad del producto terminado de cara a los riesgos de alteración oxidativa y así mejorar su conservación manteniendo una estabilidad del perfil fisicoquímico y sensorial.

30 Por otra parte se pueden determinar los efectos de las etapas de tratamiento de la biomasa de microalgas sobre la calidad del producto mediante:

- la medición de la pérdida de rendimiento, en particular el análisis de la pérdida de materia seca celular así como la pérdida de contenido proteico proveniente fundamentalmente de la « solubilización » durante el tratamiento térmico y su eliminación en el lavado si esta última etapa se coloca posteriormente.

35 Se ha demostrado que cierta pérdida de materia seca está mayoritariamente constituida por una fracción proteica (lo que permite responder a las dificultades a) y b) identificadas precedentemente);

- la determinación de la calidad sensorial de los lotes producidos, fundamentalmente por un panel sensorial formado para evaluar las propiedades sensoriales de lotes diferentes (para responder en la dificultad c)) ;

40 ◦ la medición de la estabilidad en el tiempo, fundamentalmente mediante una prueba de envejecimiento acelerado, que consiste en un análisis sensorial comparativo de la muestra inicial y de esa misma muestra colocada 10 días a 60 °C en la estufa en condiciones herméticas (para responder a la dificultad d));

El análisis sensorial se efectúa conforme a la prueba descrita. Este análisis permite poner en evidencia descriptores eventuales de oxidación, permitiendo así evaluar la estabilidad de la muestra de cara a cierta degradación oxidativa.

45 ◦ medir la evolución de la carga microbiana en el transcurso del tiempo en las diferentes etapas del procedimiento (para responder a dificultad e)).

- el análisis de la evolución de la materia seca (factor de concentración) en el curso de ese encadenamiento de la operación (para responder a la dificultad f)).

Tres características esenciales de la evaluación de la calidad han sido definidas por la sociedad Solicitante:

- el contenido de biomasa seca y/o de proteínas en el producto;
- la calidad organoléptica del producto; y
- la estabilidad en el tiempo del producto.

5 Por otra parte, se pueden tomar en cuenta asimismo otros parámetros para evaluar la calidad del producto, especialmente los siguientes:

- medición del peso seco de las células en la biomasa;
- medición del contenido de azúcares;
- determinación de la cantidad de proteínas;
- 10 • análisis de los compuestos orgánicos volátiles;
- medición de actividades enzimáticas, en particular la actividad de lipooxigenasa;
- medición de la coloración o del contenido de pigmentos;
- medición del contenido de metales, en particular hierro, cobre o níquel;
- determinación del grado de oxidación.

15 La invención se comprenderá mejor con ayuda de los ejemplos siguientes, los cuales se desean ilustrativos y no limitantes.

Ejemplos

Se produjeron varios lotes por tratamiento de fase final de una biomasa de *Chlorella protothecoides* preparada por fermentación en condiciones heterotróficas y en ausencia de luz. La cepa utilizada es la *Chlorella protothecoides* con referencia UTEX 250.

Las diferentes etapas se realizaron según se definen a continuación.

Tratamiento HTST: tratamiento térmico a alta temperatura/tiempo corto (HTST) de la biomasa, durante 30 segundos a 5 min, a una temperatura inferior a 100 °C, especialmente durante 1 minuto a 75 °C.

Lavado: con un máximo de 6 volúmenes de agua por volumen de biomasa.

25 Agregado de antioxidante: agregado de ácido ascórbico y de una mezcla de tocoferoles, preferentemente con las proporciones de 150 ppm/seca de ácido ascórbico y 500 ppm/seca de una mezcla de tocoferoles.

Atomización: atomización en una torre de atomización a efecto simple NIRO-Minor Mobil o en un Filtermat FMD125 con un ciclón.

30 Trituración: trituración mediante trituración por bolas « Bead Mill ». Clásicamente, se utiliza un triturador de bolas NETZSCH Labstar con bolas de silicato de circonio de 0,5 mm de diámetro.

Concentración: concentración/evaporación por evaporador rotativo (a escala de laboratorio) o cualquier otro tipo de evaporador a escala más grande (de corriente forzada, de flujo descendente, de película agitada...) de 20 a 30 % de materia seca.

35 Tratamiento UHT: a una temperatura comprendida entre 100 y 150 °C durante 5 a 30 segundos, preferentemente a una temperatura comprendida entre 120 y 140 °C durante 5 a 15 segundos.

La calidad de los lotes obtenidos se estudia de la manera siguiente. Se determinaron o midieron uno o varios de los parámetros siguientes.

40 La calidad sensorial: la calidad sensorial de los lotes producidos es evaluada por un panel sensorial de aproximadamente 18 personas con relación a un conjunto de descriptores sensoriales. El panel de expertos evalúa las propiedades olfativas de los lotes a 3 % en agua a 55 °C (muestras presentadas en un pote de vidrio cerrado) con escalas de intensidad ordinal (NF V 09-015: 1985).

La estabilidad en el tiempo: se mide durante una prueba de envejecimiento acelerado puesta a punto por la sociedad Solicitante que consiste en un análisis sensorial comparativo de la muestra inicial y de la misma muestra colocada

10 días a 60 °C en la estufa en condiciones herméticas. El análisis sensorial permite poner en evidencia descriptores eventuales de oxidación, que permiten de esta manera evaluar la estabilidad de la muestra de cara a cierta degradación oxidativa.

La medición de la pérdida de rendimiento:

- 5
- Medición del peso seco de las células (DCW). y/o
 - Medición de la biomasa seca. y/o
 - Contenido de proteínas.

Por otra parte, se pueden evaluar asimismo parámetros complementarios.

- 10 El contenido de azúcares: Determinación del contenido de azúcares (glucosa, maltosa, fructosa, sacarosa) por cromatografía líquida. Luego de la separación por cromatografía de intercambio de iones, las diferentes especies se detectan por amperometría.

Compuestos orgánicos volátiles: El contenido de compuestos orgánicos volátiles se determina por SPME/GC.

Análisis del tratamiento térmico: por observación de los cambios de morfología celulares inducidos en microscopia óptica.

- 15 Medición de la coloración: medición con ayuda de un espectrocolorímetro de las medidas de reflectancia a las longitudes de onda de 400 nm a 700 nm bajo iluminador D65 o iluminador C y con el observador CIE 1931 (2°). Determinación de los índices « L », « a », « b » donde « L » corresponde a la luminancia, « a » corresponde a la escala del verde al rojo y « b » a la escala del azul al amarillo.

- 20 El contenido de pigmentos: después de la ruptura de las células, los pigmentos se extraen con acetona al 90 %. Después el extracto se analiza por espectrofotometría. La cuantificación de los pigmentos se realiza por cálculos a partir de las absorbancias obtenidas a diferentes longitudes de onda.

La dosificación de los metales: destrucción de las materias orgánicas por mineralización con ayuda de una mezcla sulfonítrica y determinación, luego de una dilución apropiada, por espectrometría de emisión.

Determinación del grado de oxidación: después de la dilución en isooctano, medición de la absorbancia a 232 nm.

25

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de optimización del tratamiento de fase final de una biomasa de microalgas del género *Chlorella* rico en proteínas, preparada previamente por fermentación en condiciones heterotróficas y en ausencia de luz, que comprende:

- 5 1) proporcionar una biomasa que contenga más de 50 % de proteínas en peso seco de la biomasa;

luego, efectuar a una temperatura inferior 8 °C, preferentemente inferior a 4 °C:

- 2) la recolección de la biomasa al final de la fermentación,
- 3) el lavado y la concentración de la biomasa,
- 4) opcionalmente, la lisis de la biomasa,

- 10 **luego, sin restricción de la** temperatura inferior a 8 °C:

- 5) opcionalmente, concentrar la suspensión de biomasa,
- 6) aplicar un tratamiento térmico,
- 7) secar la biomasa obtenida de esa manera para obtener el producto,

una etapa de ajuste del pH a 7 que se aplica antes o después de la etapa 6) de tratamiento térmico.

- 15 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la biomasa contiene más de 60 % de proteínas en peso seco de la biomasa, preferentemente más de 65 o 70 %.

3. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** el tratamiento térmico es un tratamiento térmico a alta temperatura/tiempo corto (HTST) durante 30 segundos a 5 minutos, a una temperatura inferior a 100 °C.

- 20 4. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** el tratamiento térmico es un tratamiento térmico a ultra alta temperatura (UHT) a una temperatura comprendida entre 100 °C y 150 °C durante 5 a 30 segundos.

- 25 5. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** el lavado de la biomasa se realiza con un máximo de 6 volúmenes de agua por 1 volumen de biomasa, preferentemente con un máximo de 3 volúmenes de agua.

6. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** la neutralización de la suspensión de biomasa a pH 7 se realiza por agregado de KOH o NaOH.

7. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** la lisis de las células de la biomasa se realiza por trituración, preferentemente mediante trituración por bolas.

- 30 8. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** la concentración de la biomasa se realiza por centrifugación o evaporación.

9. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado porque** los efectos de las etapas de tratamiento de la biomasa de microalgas sobre la calidad del producto se determinan asimismo por uno o varios de los parámetros siguientes:

- 35 - medición del peso seco de las células en la biomasa;
- medición del contenido de azúcares;
- determinación de la cantidad de proteínas;
- análisis de los compuestos orgánicos volátiles;
- medición de actividades enzimáticas, en particular la actividad de lipooxigenasa;
- 40 - medición de la coloración o del contenido de pigmentos;
- medición del contenido de metales, en particular hierro, cobre o níquel;
- determinación del grado de oxidación.

10. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado porque** las microalgas del género *Chlorella* se eligen del grupo constituido por *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* y *Chlorella protothecoides*, y son más particularmente *Chlorella protothecoides*.