

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 816 998**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/02** (2006.01)

**G01N 33/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.08.2014 PCT/FR2014/052046**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2015 WO15019023**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2014 E 14755887 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 3030896**

54 Título: **Composición de biomasa de microalgas ricas en proteínas de calidad sensorial optimizada**

30 Prioridad:

**07.08.2013 FR 1357843**

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

**06.04.2021**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**JEROSCH, HEIKE;  
DRUON, AMANDINE;  
GUILLEMANT, MARILYNE y  
PATINIER, SAMUEL**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 816 998 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**

Composición de biomasa de microalgas ricas en proteínas de calidad sensorial optimizada

5 La presente invención se refiere a un método para evaluar el perfil organoléptico de nuevas composiciones de biomasa de microalgas del género *Chlorella* rica en proteínas que presentan un perfil sensorial optimizado, lo que permite incorporarlas en formulaciones alimentarias sin generación de aromas no deseados.

**Presentación del estado de la técnica**

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

10 Comprenden principalmente 45% de proteínas, 20% de materias grasas, 20% de glúcidos, 5% de fibras y 10% de minerales y de vitaminas.

La utilización de biomasa de microalgas (y principalmente sus proteínas) como alimentos se considera cada vez más para encontrar fuentes alternativas para la demanda creciente de proteínas animales a nivel mundial (como ha sido informado por la FAO).

15 Por otra parte, la Unión Europea padece desde hace años de un déficit estructural de proteínas vegetales que alcanza en los últimos años a más de 20 millones de toneladas de equivalente de soja, importados en la actualidad de América del Sur.

La producción de masa de algunas microalgas ricas en proteínas se contempla entonces como una posibilidad de superar este “déficit de proteínas”.

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

Sin embargo, debido a los elevados costes de producción así como a las dificultades técnicas para integrar el material procedente de microalgas en preparaciones alimentarias organolépticamente aceptables, la difusión amplia de las proteínas de microalgas está todavía en ciernes.

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

Por su parte, varias solicitudes de patente en el estado de la técnica, tal como la solicitud de patente WO 2010/045368 muestran que es imposible ajustar las condiciones de cultivo de forma que aumente aún más el contenido de proteínas de la biomasa de microalgas.

30 Sin embargo, cuando se desean fabricar industrialmente polvos de biomasa de microalgas a partir de su biomasa, sigue habiendo importantes dificultades no solo desde el punto de vista tecnológico, sino también desde el punto de vista del perfil sensorial de las composiciones producidas.

En efecto aunque hay disponibles comercialmente polvos de algas, por ejemplo fabricados con algas cultivadas fotosintéticamente en estanques exteriores o en biorreactores, tienen un color verde oscuro (relacionado con la clorofila) y un gusto fuerte, desagradable.

35 Incluso aunque se formulen en productos alimentarios o como complementos nutricionales, estos polvos de algas transfieren siempre este color verde visualmente poco atractivo al producto alimentario o al complemento nutricional y tienen un gusto desagradable a pescado o sabor a algas marinas. La evaluación sensorial de las composiciones de biomasa de microalgas de los géneros *Chlorella* y *Spirulina* en pastas alimentarias se ha descrito, por ejemplo, en Fadrique, *J. Sci. Food Agric.* 2010; 90: 1656-1664. En cuanto a Sun, *J. Appl. Phycol.* (2012) 24: 1003-1013, esta  
40 técnica anterior muestra el análisis en compuestos orgánicos volátiles del alga verde *Capsosiphon fulvescens* según el método de extracción de los aceites esenciales con el fin de comprender el impacto aromático de este alga cuando se utiliza como fuente de proteínas en productos alimentarios. Además, el documento EP2948001 A0, documento que forma parte de la técnica anterior en el sentido del Artículo 54 (3) CBE, describe un método para mejorar la producción de harinas de microalgas según características organolépticas aceptables determinadas por la evaluación del  
45 contenido de compuestos orgánicos volátiles específicos.

Por otra parte, se sabe que algunas especies de algas azules producen naturalmente moléculas químicas olorosas, tales como la geosmina (trans-1,10-dimetil-trans-9-decalol) o el MIB (2-metilisoborneol), que generan olores terrosos o de moho.

50 En cuanto a las clorellas, el descriptor generalmente admitido en este campo es el de “té verde”, parecido al de otros polvos vegetales verdes tales como la cebada verde en polvo o el trigo verde en polvo, gusto atribuido a su alto contenido de clorofila.

Su sabor no está enmascarado habitualmente más que cuando se mezclan con legumbres de sabor fuerte o con zumos de cítricos.

Por lo tanto, hay todavía una necesidad no satisfecha de disponer de composiciones de biomasa de microalgas del género *Chlorella* de calidad organoléptica conveniente que permita su utilización en productos alimentarios más numerosos y diversificados.

### **Compendio de la invención**

La Solicitante ha encontrado que se podía responder a esta necesidad proponiendo composiciones de biomasa de microalgas ricas en proteínas que presenten un perfil sensorial optimizado, caracterizadas por un valor global de aromas de 4 compuestos orgánicos volátiles elegidos entre 11 compuestos particulares.

Así, la presente invención se refiere en primer lugar a un método para determinar la calidad organoléptica de una composición de biomasa de microalgas rica en proteínas que comprende como mínimo 50% de proteínas en peso seco de biomasa de microalgas, caracterizado por que el método comprende la determinación del contenido de 11 compuestos orgánicos volátiles siendo los 11 compuestos orgánicos volátiles el pentanal, el hexanal, el 1-octen-3-ol, el 2-pentilfurano, el octanal, el 3,5-octadien-2-ol (o 3-octen-2-ona), el 3,5-octadien-2-ona, el nonanal, el 2-nonenal, el (E,E)-2,4-nonadienal y el ácido hexanoico, comprendiendo la biomasa de microalgas más de 50% de proteínas en peso seco de biomasa y siendo las microalgas del género *Chlorella*.

Preferentemente, el contenido de cada uno de estos 11 compuestos orgánicos volátiles se determina por SPME/GC, preferentemente por SPME/GC-MS.

Preferentemente, el contenido de cada uno de estos 11 compuestos orgánicos volátiles se determina mediante el área de los picos cromatográficos según SPME/GC que corresponden a cada uno de estos 11 compuestos orgánicos volátiles.

Preferentemente, el contenido de cada uno de estos 11 compuestos orgánicos volátiles, en particular el área de los picos cromatográficos que corresponden a los 11 compuestos orgánicos volátiles se compara con la de la composición de biomasa de microalgas rica en proteínas de referencia para la cual o las cuales están definidas las calidades organolépticas, principalmente como aceptable o inaceptable.

La presente invención se refiere por último a la selección de 4 de los 11 compuestos orgánicos volátiles que presentan un umbral olfativo bajo (es decir, que impactan de forma considerable el olor global percibido por los miembros del panel sensorial), para elaborar un modelo simplificado que permita dar un valor de aroma global a las composiciones de biomasa de microalgas ricas en proteínas. Así, se refiere a un método para determinar la calidad organoléptica de una composición de biomasa de microalgas rica en proteínas que comprende como mínimo 50% de proteínas en peso seco de biomasa de microalgas, caracterizado por que el método comprende la determinación del contenido de 4 compuestos orgánicos volátiles, siendo estos 4 compuestos orgánicos el 3,5-octadien-2-ol, el 1-octen-3-ol, el 3,5-octadien-2-ona y el (E,E)-2,4-nonadienal y por que se calcula una suma de los valores de los aromas individuales (= concentración del compuesto/su umbral olfativo) del 3,5-octadien-2-ol, del 1-octen-3-ol, de la 3,5-octadien-2-ona y del (E,E)-2,4-nonadienal, comprendiendo la biomasa de microalgas más de 50% de proteínas en peso seco de biomasa y siendo las microalgas del género *Chlorella*.

Las composiciones de biomasa de microalgas ricas en proteínas según la invención presentan, por lo tanto, un perfil sensorial optimizado cuando su valor de aroma global es pequeño, preferentemente comprendido entre 0 y 40% con respecto al de una composición de harina de microalgas de referencia organoléptica inaceptable.

La presente invención se refiere igualmente a un método de selección de composiciones de biomasa de microalgas ricas en proteínas que presentan un perfil organoléptico aceptable, caracterizado por que la calidad organoléptica se determina por el método tal como se ha descrito anteriormente y por que la composición se elige cuando el valor de aroma global calculado por el método tal como se ha descrito anteriormente está comprendido entre 0 y 40% con respecto al de una composición de biomasa de microalgas de referencia organoléptica inaceptable. Preferentemente, la biomasa de microalgas comprende más de 50% de proteínas en peso seco de biomasa y las microalgas son del género *Chlorella*.

Preferentemente, las microalgas son del género *Chlorella*, elegidas en particular en el grupo constituido por *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* y *Chlorella protothecoides*, y más particularmente *Chlorella protothecoides*.

### **Descripción detallada de la invención**

En el sentido de la invención, una composición de biomasa de microalgas rica en proteínas presenta un "perfil sensorial optimizado" o una "calidad organoléptica optimizada" cuando su evaluación por un panel sensorial evidencia la ausencia de defectos que alteren la calidad organoléptica de dichas formulaciones alimentarias que contienen estas composiciones de biomasa de microalgas.

Por "calidad organoléptica" se entiende la propiedad de un alimento en términos de color y olor.

Estos defectos se asocian a la presencia de moléculas específicas olorosas y/o aromáticas no deseadas que se caracterizan por un umbral de percepción correspondiente al valor mínimo del estímulo sensorial necesario para iniciar una sensación.

5 El “perfil sensorial optimizado” o “calidad organoléptica optimizada” se traduce entonces para un panel sensorial mediante la obtención de las mejores puntuaciones en una escala de evaluación de los 2 criterios sensoriales (color y olores).

Por “aproximadamente” se entiende el valor más o menos 10% de este, preferentemente más o menos 5% de este. Por ejemplo, “aproximadamente 100” significa entre 90 y 110, preferentemente entre 95 y 105.

10 Por “composición de biomasa de microalgas” se entiende una composición que comprende como mínimo 50, 60, 70, 80 o 90% en peso seco de biomasa de microalgas. Sin embargo, otros ingredientes pueden estar comprendidos opcionalmente en esta composición.

Por “rica en proteína” se entiende un contenido de proteínas en la biomasa de más de 50% en peso seco, preferentemente de más de 55%, más preferentemente todavía más de 60, 65 y 70% en peso seco de biomasa.

15 En el sentido de la presente invención, el término “biomasa de microalgas” se debe comprender en su interpretación más amplia y como que denomina, por ejemplo, una composición que comprende varias partículas de biomasa de microalgas. La biomasa de microalgas se obtiene a partir de microalgas que están enteras.

Varios documentos del estado de la técnica, como la solicitud de patente internacional WO 2010/045368 describen métodos de fabricación y utilización en alimentación de la biomasa de microalgas de *Chlorella* rica en proteínas.

20 Las microalgas de las que trata la presente invención son, por lo tanto, microalgas del género *Chlorella*, más particularmente *Chlorella protothecoides*, más particularmente todavía *Chlorella* desprovistas de pigmentos clorofílicos, por cualquier método conocido en sí mismo por el experto en la técnica (bien por el hecho de que el cultivo se realiza en la oscuridad o bien porque la cepa ha sido mutada de forma que no produzca estos pigmentos).

25 Principalmente, las microalgas se pueden elegir, de forma no exhaustiva, entre la *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*. Así, en un modo de realización muy particular, la composición de biomasa de microalgas es una composición de biomasa de *Chlorella* y, en particular, de *Chlorella protothecoides*.

El procedimiento de fermentación descrito en la solicitud de patente WO 2010/045368 permite así la producción de un cierto número de composiciones de biomasa de microalgas de calidad sensorial variable.

30 El método tal como se describe en el presente documento permite, por lo tanto, seleccionar las composiciones de biomasa de microalgas ricas en proteínas que presentan un perfil organoléptico aceptable, principalmente para las aplicaciones alimentarias, sin para ello tener que organizar evaluaciones organolépticas por un panel de personas.

#### 1.- Definición del perfil sensorial por la detección de 11 compuestos orgánicos volátiles

35 La Solicitante ha descubierto que el perfil sensorial de una composición de biomasa de microalgas rica en proteínas se puede definir por la naturaleza y el umbral de detección de moléculas específicas olorosas, en particular de compuestos orgánicos volátiles particulares.

En efecto, ha identificado un conjunto de 11 compuestos orgánicos volátiles cuyo contenido en una composición de biomasa de microalgas rica en proteínas permite determinar la calidad organoléptica de esta.

40 Estos 11 compuestos orgánicos volátiles son los siguientes: el pentanal, el hexanal, el 1-octen-3-ol, el 2-pentilfurano, el octanal, el 3,5-octadien-2-ol (o 3-octen-2-ona), el 3,5-octadien-2-ona, el nonanal, el 2-nonenal, el (E,E)-2,4-nonadienal y el ácido hexanoico.

45 Así, la presente invención se refiere a un método para determinar la calidad organoléptica de una composición de biomasa de microalgas rica en proteínas que comprende la determinación del contenido de cada uno de estos 11 compuestos orgánicos volátiles, siendo los 11 compuestos orgánicos volátiles el pentanal, el hexanal, el 1-octeno-3-ol, el 2-pentilfurano, el octanal, el 3,5-octadieno-2-ol (o 3-octeno-2-ona), el 3,5-octadieno-2-ona, el nonanal, el 2-nonenal, el (E,E)-2,4-nonadienal y el ácido hexanoico.

El método no excluye la determinación del contenido de otros compuestos orgánicos volátiles. Sin embargo, los 11 compuestos orgánicos volátiles son suficientes para determinar la calidad organoléptica de una composición de biomasa de microalgas rica en proteínas.

50 Preferentemente, estos compuestos orgánicos se extraen por microextracción en fase sólida (SPME) y se analizan por cromatografía en fase gaseosa GC, en particular por GC-MS (cromatografía en fase gaseosa acoplada con espectrometría de masas).

## ES 2 816 998 T3

La fracción volátil se extrae de la muestra de la composición de biomasa de microalgas rica en proteínas calentando esta durante un tiempo suficiente en presencia de una fibra de SPME.

5 La fibra se puede elegir, por ejemplo, de forma no exhaustiva, entre el grupo que consiste en carboxeno y polidimetilsiloxano (CAR/PDMS), divinilbenceno, carboxeno y polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS), una aleación de metal y de polidimetilsiloxano (PDMS), una fibra de Carbowax-Z® (carbono negro grafitizado), poliacrilato, Carbowax® polietilenglicol (PEG) y PDMS/DVB.

Preferentemente, se utiliza una fibra de DVB/CAR/PDMS (df 50/30 µm).

10 La Solicitante recomienda utilizar aquí una técnica de extracción en vía húmeda (suspensión acuosa) entre 40 y 70°C, preferentemente entre 50 y 65°C, en particular aproximadamente 60°C durante al menos 10 minutos, preferentemente al menos 15 minutos y, por ejemplo, entre 15 minutos y 1 hora.

Preferentemente, esta etapa de extracción se hace en un recipiente sellado. Se debe usar una cantidad suficiente de muestra, por ejemplo al menos 1 g, principalmente entre 1 y 10 g y en particular aproximadamente 2 g.

Estos 2 g se ponen entonces en suspensión en 7 mL de agua que contiene 1 g de CaCl<sub>2</sub>, 200 µL de HCl y 2,32 µg de hexanal-d12 (patrón interno), introducidos en un frasco de SPME (20 mL) sellado.

15 Los compuestos orgánicos volátiles se desorben a continuación a una temperatura compatible con el tipo de fibra de SPME utilizada, por ejemplo entre 220 y 250°C para la fibra usada en estos ensayos, más precisamente a 230°C, y se inyectan en el sistema de análisis.

Preferentemente, el análisis se hace por cromatografía en fase gaseosa GC, en particular GC-MS.

20 Hay varios dispositivos de GC/MS disponibles comercialmente, por ejemplo el espectrómetro GC/Masas Clarus (PerkinElmer, Estados Unidos), el cromatógrafo en fase gaseosa Hewlett Packard 6890 (Hewlett Packard, Estados Unidos) y el cromatógrafo en fase gaseosa Agilent 6890N acoplado con el detector de masas selectivo Agilent 5973.

Los métodos de ionización que se pueden utilizar en GC/MS son, por ejemplo, la espectroscopía de masas con ionización en modo impacto electrónico (EI), en modo impacto químico (CI), la ionización por electronebulizador, la descarga luminiscente, la desorción por campos (FD), etc.

25 Los volátiles extraídos se desorben aquí más precisamente en el inyector del sistema GC-MS TSQ de Thermo Scientific y después se separan en una columna CPwax52 (60 m x 0,25 mm, 0,25 µm) con gas helio a 1,5 mL/min.

El programa de temperatura es:

- isoterma a 50°C durante 3 minutos, después
- programación a 5°C/minuto hasta 230°C,
- 30 - después isoterma durante 20 minutos.

La detección se hace por espectrometría de masas (MS) en modo impacto electrónico (EI) y los compuestos se identifican por comparación con los espectros de EI de la biblioteca del NIST.

Así, la altura o el área del pico cromatográfico que corresponde al compuesto orgánico volátil se correlaciona con la cantidad de dicho compuesto.

35 Por "área del pico" se entiende la superficie de un ion específico bajo la curva en el cromatograma de SPME-GC/MS.

Preferentemente, el contenido de uno de los 11 compuestos orgánicos volátiles se determina mediante el área del pico del ion específico del cromatograma por SPME-GC/MS que corresponde a este compuesto orgánico volátil.

El contenido de compuestos orgánicos volátiles se determina principalmente por comparación con el del producto de referencia.

40 Así, globalmente, un contenido total pequeño de los 11 compuestos orgánicos volátiles se asocia con una calidad organoléptica optimizada. Por el contrario, un contenido total mayor de los 11 compuestos orgánicos volátiles se asocia con una calidad organoléptica media, incluso mala o inaceptable.

45 Por ejemplo, el contenido total de una composición de una calidad organoléptica aceptable es pequeño cuando es como mínimo dos veces inferior a la de una composición de una calidad organoléptica inaceptable, por ejemplo como mínimo 2, 3 o 4 veces inferior, y en un modo de realización más exigente, como mínimo 10 veces inferior.

2.- Modelo simplificado basado en cuatro compuestos orgánicos volátiles que afectan al olor global

5 En este modo de realización preferido, la Solicitante ha encontrado que se puede establecer ventajosamente un valor global de aroma para las composiciones de biomasa de microalgas ricas en proteínas que presentan un perfil sensorial optimizado, valor global basado en 4 compuestos orgánicos volátiles elegidos entre los 11 compuestos orgánicos identificados anteriormente.

Estos compuestos orgánicos volátiles se eligen en función de su criterio de pequeño umbral olfativo. El valor global de aroma se establece entonces según la relación:

Valor global de aroma =  $\Sigma$  de los valores de aroma individuales del 3,5-octadien-2-ol (o 3-octen-2-ona, opción que no forma parte de la invención), del 1-octen-3-ol, de la 3,5-octadien-2-ona y del (E,E)-2,4-nonadienal.

10 
$$VA \text{ total} = \Sigma [VA (3,5\text{-octadien-2-ol}), VA (1\text{-octen-3-ol}), VA (3,5\text{-octadien-2-ona}) \text{ y } VA ((E,E)\text{-2,4-nonadienal})]$$

siendo  $VA = \text{concentración del compuesto} \times \text{umbral olfativo del compuesto} \times$ .

Como se ilustrará a continuación, se garantiza que las composiciones de biomasa de microalgas ricas en proteínas que presentan un valor global de aroma pequeño, comprendido entre 0 y 40%, con respecto al de una composición de harina de microalgas de referencia organoléptica inaceptable, presentan un perfil sensorial optimizado.

15 La invención se comprenderá mejor por medio de los ejemplos siguientes.

**Ejemplos**

Ejemplo 1: Definición del ensayo sensorial

La percepción de la composición de biomasa de microalgas rica en proteínas se determina por disolución en agua, medio neutro por excelencia.

20 Por lo tanto se ha formado un panel sensorial para evaluar, según la metodología presentada anteriormente, las propiedades sensoriales de diferentes lotes de biomasa de microalgas ricas en proteínas, preparadas según las enseñanzas de la solicitud de patente WO 2010/045368.

Se han evaluado 18 lotes de biomasa de microalgas: lote 11, lote 12, lote 14, lote 33, lote 34, lote 42, lote 43, lote 44, lote 54, lote 81, lote 82, lote 83, lote 84, lote 85, lote 92, lote 93, lote 111 y lote 112.

25 Se presenta el resultado de dicha caracterización de los lotes para el descriptor muy característico de olor a "pintura".

Tratamiento de los datos

Los análisis se han realizado por medio del programa informático R (de venta libre):

R versión 2.14.1 (22-12-2011)

Copyright© 2011 The R Foundation for Statistical Computing

30 ISBN 3-900051-07-0

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

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

Los módulos utilizados para el tratamiento de datos del perfil son los siguientes:

- 35
- para el ANOVA: paquete car versión 2.0-12
  - para la regresión lineal: paquete stats versión 2.14.1

El ANOVA muestra resultados significativamente diferentes de un producto al otro:

## ES 2 816 998 T3

Tabla ANOVA (ensayos de tipo III)

Respuesta: dato [,pintura]

	SCEM	ddl	Valor de F	Pr (>F)
(media)	327,94	1	234,1068	< 2,2 e-16
<b>Composición</b>	684,40	17	28,7393	<b>&lt; 2,2 e-16</b>
Panelista	118,84	19	4,4649	7,097 e-09
Residuos	410,44	293		

A continuación se muestran los valores medios obtenidos por los productos:

Composición	Media	Desviación estándar	Repetición
Lote 092	0,00	0,00	8
Lote 111	0,00	0,00	9
Lote 12	0,10	0,10	10
Lote 112	0,28	0,12	36
Lote 43	0,29	0,17	21
Lote 44	0,33	0,26	12
Lote 33	0,36	0,36	11
Lote 11	0,40	0,40	10
Lote 81	0,96	0,25	23
Lote 14	1,00	0,50	9
Lote 82	1,50	0,34	24
Lote 34	1,64	0,38	22
Lote 42	1,96	0,25	49
Lote 93	2,67	0,58	9
Lote 84	3,23	0,36	22
Lote 54	4,09	0,41	11
Lote 83	4,24	0,16	34
Lote 85	4,60	0,22	10

5 La figura 1 muestra la clasificación de los diferentes lotes con respecto a la nota atribuida por los panelistas en el criterio "pintura".

La clasificación es entonces la siguiente, por orden de nota "pintura" creciente:

Lote 92 > lote 111 > lote 12 > lote 112 > lote 43 > lote 44 > lote 33 > lote 11 > lote 81 > lote 14 > lote 82 > lote 34 > lote 42 > lote 93 > lote 84 > lote 54 > lote 83 > lote 85.

El lote 92 se define entonces como el testigo de calidad organoléptica aceptable para este descriptor pintura.

10 Por su parte, el lote 85 se define como el testigo de calidad organoléptica inaceptable para este descriptor pintura.

Esta clasificación organoléptica establecida de ahora en adelante es posible, eficazmente según la invención, analizar el perfil por SPME/GC-MS de estas muestras con el fin de identificar las dianas moleculares de referencia que permitirán definir la calidad de las composiciones fabricadas.

Ejemplo 2: Identificación de los compuestos orgánicos volátiles (VOC) por SPME/GC-MS relacionados con las clasificaciones organolépticas inaceptables de “olor a pintura”.

Para realizar el análisis por SPME/GC-MS de los 18 lotes diferentes de las composiciones de biomasa de microalgas se procede como se ha indicado anteriormente en suspensión acuosa.

5 *Análisis de los compuestos volátiles en los productos en suspensión acuosa*

Se han analizado los compuestos volátiles en suspensión acuosa con el fin de reducir el efecto matriz y se ha introducido un patrón interno.

Visualmente, como se muestra la figura 2, los cromatogramas por GC-MS siguen siendo muy complejos, con un gran número de compuestos.

10 La primera aproximación consiste en comparar los perfiles cromatográficos, integrar la totalidad de los picos entre 3,2 y 35,0 minutos (TIC, “total ion current”) y verificar si estos resultados “brutos” permiten obtener una relación con la clasificación sensorial.

La comparación de los perfiles cromatográficos y la integración de la totalidad de los picos entre 3,2 y 35,0 min (TIC, “total ion current”) -véase la figura 3- no permiten obtener la relación con la clasificación sensorial.

15 Debido a la gran complejidad de los cromatogramas, es difícil distinguir visualmente los productos aceptables de los inaceptables.

La integración de las áreas de los cromatogramas no permite tampoco tomar netamente una decisión entre las muestras aceptables y las inaceptables.

20 Además, este enfoque de los datos brutos no permite saber cuál o cuáles compuesto(s) volátil(es) es(son) responsable(s) de las notas atípicas negativas (*off-notes*) o gustos u olores no deseados, ni seguir específicamente su aparición, ni tener información sobre su vía de formación.

Un segundo enfoque ha consistido en completar la lista de los compuestos orgánicos volátiles del modelo anterior listando los compuestos volátiles identificados en los cromatogramas por SPME/GC-MS que parecen acompañar las clasificaciones organolépticas.

25 El análisis por GC-MS-Olfatometría de seis muestras había permitido establecer algunos compuestos volátiles, mayoritariamente aldehídos procedentes de la degradación de la fracción lipídica de las composiciones de biomasa de microalgas ricas en proteínas, que serían responsables de las notas atípicas negativas o los gustos u olores no deseados.

30 En este segundo enfoque, se ha decidido entonces monitorizar algunas de estas moléculas seleccionadas por GC-MS-Olfatometría y por GC-MS de los diferentes productos.

Para seleccionar los compuestos orgánicos volátiles representativos, se realiza una serie de análisis de la varianza para considerar únicamente los compuestos orgánicos volátiles que difieren efectivamente de una composición a otra, teniendo en cuenta la variabilidad de la medida por SPME-GC/MS.

35 El modelo es el siguiente: Compuesto orgánico volátil ~ Composición; se conservan únicamente los compuestos para los que la probabilidad crítica asociada al ensayo de Fisher es inferior a 0,05.

Se presentan a continuación 2 ejemplos de ANOVA para los compuestos 2-nonenal y 3,5-octadien-2-ona-2:

*2-nonenal*

Tabla ANOVA (ensayos de tipo III)

	SCEM	ddl	Valor de F	Pr (>F)
(media)	292,13	1	72,8516	3,51 e-06
<b>Composición</b>	664,79	17	9,7522	<b>0,0002394</b>
Residuos	44,11	11		

*3,5-octadien-2-ona pico 2)*

40

Tabla ANOVA (ensayos de tipo III)

	SCEM	ddl	Valor de F	Pr (>F)
(media)	56.334	1	20,0633	0,0009326
<b>Composición</b>	72.570	17	1,5201	<b>0,2424099</b>
Residuos	30.891	11		

Para el primer compuesto orgánico volátil (el 2-nonenal) se muestra que el efecto de la composición es significativo (probabilidad crítica < 0,00025), lo que significa que hay una diferencia significativa entre los productos teniendo en cuenta la variabilidad de la medida.

- 5 Para el 2º compuesto, (3,5-octadien-2-ona, pico 2), el efecto de la composición no es significativo (probabilidad crítica > 0,05). Por lo tanto, se considerará para el estudio el 2-nonenal, pero no la 3,5-octadien-2-ona.

Después de esta primera selección de compuestos volátiles, se establecen modelos de regresiones lineales: se trata de explicar la variable "pintura" para cada compuesto uno a uno.

Se construyen, por lo tanto, tantos modelos como compuestos. El modelo es el siguiente: *Pintura ~ Compuesto*.

- 10 Con el fin de elegir la lista final de compuestos identificados como responsables de las clasificaciones organolépticas inaceptables (notas atípicas negativas) observadas, solo se considerarán los compuestos para los que la probabilidad crítica asociada al test de Student sea inferior a 0,05 (test de nulidad del coeficiente de regresión lineal).

El R<sup>2</sup> asociado al modelo es un indicador para cuantificar el porcentaje de variabilidad explicado para el compuesto. Puede no ser demasiado grande pero ser significativo, por lo que se elige seleccionar los compuestos en función de la probabilidad crítica (con el fin de no rechazar un compuesto que influya poco pero significativamente sobre el olor de pintura descrito por el panel).

- 15

Coeficientes

	Estimador	Valor de la Desv. Est.	Valor de t	Pr (>  t )
(ordenada en el origen)	-0,669037	0,138335	-4,836	0,000182
<b>Hexanal</b>	0,019196	0,002593	7,404	<b>1,49 e-06</b>

Error estándar residual: 0,4444 sobre 16 grados de libertad

R<sup>2</sup> múltiple: 0,7741; R<sup>2</sup> ajustado: 0,76

Estadística F: 54,82 sobre 1 y 16 grados de libertad, probabilidad crítica: 1,491 e-06

Coeficientes

	Estimador	Valor de la Desv. Est.	Valor de t	Pr (>  t )
(ordenada en el origen)	-0,45338	0,24852	-1,824	0,0868
<b>3,5-octadien-2-ona (pico 1)</b>	0,04346	0,01614	2,693	<b>0,0160</b>

Error estándar residual: 0,7756 sobre 16 grados de libertad

R<sup>2</sup> múltiple: 0,3119; R<sup>2</sup> ajustado: 0,2689

Estadística F: 7,252 sobre 1 y 16 grados de libertad, probabilidad crítica: 0,016

Para estos 2 compuestos, el hexanal y la 3,5-octadien-2-ona (pico 1), la probabilidad crítica es inferior a 0,05, por lo tanto, se correlacionan con el olor de pintura descrito por el panel.

Se encuentra que los 11 compuestos del estudio están bien correlacionados con el descriptor "pintura".

- 20 Estas 11 moléculas elegidas se enumeran en la tabla siguiente:

	Molécula	Tiempo de retención (min)	Olor	Umbral olfativo (ppb)	Ion específico (m/z)
1	Pentanal	6,24	Verde	18*	44
2	Hexanal	8,24	Hierba cortada, manzana verde	4,5	82
3	1-octen-3-ol	17,99	Hongo-disolvente (pintura), hongo-tinta	1/0,05*	57
4	2-pentilfurano	12,10	Floral	6	81
5	Octanal	13,82	Floral-cítrico	0,7	84
6	3,5-octadien-2-ol o 3-octen-2-ona	17,03	Floral-corteza	0,1**	111
7	3,5-octadien-2-ona (2 picos)	19,96 + 21,24	Floral	0,1**	95
8	Nonanal	16,68	Floral-verde, floral	1	57
9	2-Nonenal	20,37	Vegetal, aceite	0,08	83
10	(E,E)-2,4-nonadienal	24,42	Oleoso-oxidado	0,09	81
11	Ácido hexanoico	27,51	Queso, rancio	3.000	60

\* Umbral olfativo según H. Jelen, *Journal of Chromatographic Science*, vol. 44, agosto 2006

\*\* Valor estimado

Si no se indica de otra forma, el umbral olfativo se toma de [www.leffingwell.com/odorthre.htm](http://www.leffingwell.com/odorthre.htm).

Como se muestra en la figura 4, los productos inaceptables parecen mucho más cargados en estos 11 compuestos volátiles que las muestra aceptables.

5 El análisis estadístico confirma que las 11 moléculas son todas significativas (excepto el segundo pico de la 3,5-octadien-2-ona a 21,24 min.).

En conclusión, el seguimiento de estas 11 moléculas (pentanal, hexanal, 1-octen-3-ol, 2-pentilfurano, octanal, 3,5-octadien-2-ol o 3-octen-2-ona, 3,5-octadien-2-ona (primero de los 2 picos), nonanal, 2-nonenal, (E,E)-2,4-nonadienal y ácido hexanoico) permite distinguir los productos aceptables de los no aceptables según el criterio "pintura", por análisis de los volátiles del producto en suspensión acuosa.

#### 10 *Elaboración del modelo simplificado*

Con el fin de simplificar el modelo, se decide mantener los compuestos que tienen un mayor impacto sobre el olor global de las composiciones de biomasa de microalgas ricas en proteínas según la invención, es decir los compuestos con umbrales olfativos extremadamente bajos.

Estos valores de aromas individuales (= concentración del compuesto/su umbral olfativo) se representan en la figura 5.

15 Teniendo en cuenta la concentración y el umbral olfativo de cada compuesto, cuatro compuestos parecen particularmente importantes para las propiedades sensoriales de las composiciones de biomasa de microalgas ricas en proteínas según la invención: el 3,5-octadien-2-ol (o 3-octen-2-ona, opción que no forma parte de la invención) (floral-corteza), el 1-octen-3-ol (hongo-disolvente, pintura, hongo-tinta), la 3,5-octadien-2-ona (el primero de los dos picos, floral) y el (E,E)-2,4-nonadienal (oleoso-oxidado).

20 Los descriptores individuales de estos cuatro compuestos reúnen muy bien el olor global percibido de las composiciones de biomasa de microalgas ricas en proteínas según la invención inaceptables.

Por lo tanto, es posible establecer un valor de aroma global para las composiciones de biomasa de microalgas ricas en proteínas, basado en estos cuatro compuestos:

25 Valor global de aroma =  $\Sigma$  de los valores individuales del 3,5-octadien-2-ol (o 3-octen-2-ona, opción que no forma parte de la invención), del 1-octen-3-ol, de la 3,5-octadien-2-ona y del (E,E)-2,4-nonadienal.

Como muestra la figura 6, a partir de ahora es fácil clasificar los diferentes lotes de composiciones de biomasa de microalgas ricas en proteínas en dos familias:

- aceptables: se trata de los lotes 111, 92, 12, 112, 43, 33, 33, 81, 14, 44, 82 y 34;
- inaceptables: se trata de los lotes 83, 84 y 85.

5 Nótese que el lote 85, lote de calidad organoléptica inaceptables según el ejemplo 1, presenta un valor de aroma de 100%.

Los lotes aceptables presentan, por lo tanto, un valor de aroma global comprendido entre 0 y 40% con respecto al de la composición de harina de microalgas de referencia organoléptica inaceptable, en este caso el lote 85.

10 Los lotes 42, 93 y 54 presentan un valor global de aroma, en base a los cuatro compuestos organolépticos, muy superior al del lote 85 de referencia.

Sin embargo, es preciso tener en cuenta que el lote 85 ha sido definido como inaceptable según el descriptor único "pintura".

Los lotes 42, 93 y 54, en el plano del análisis de los compuestos orgánicos volátiles, son particularmente marcados, sin duda por un efecto de sinergia entre los compuestos orgánicos volátiles.

15 Esto no impide que el modelo simplificado basado en esta selección de los 4 compuestos orgánicos volátiles entre los 11 de referencia permita clasificar las composiciones de biomasa de microalgas ricas en proteínas en dos familias distintas fácilmente identificables.

#### **Descripción de las figuras**

Figura 1: Nota media obtenida para el descriptor "pintura" por cada una de las composiciones.

20 Figura 2: Cromatogramas (TIC) de los compuestos orgánicos volátiles extraídos de las muestras pro SPME en suspensión acuosa.

Figura 3: Integración de la totalidad de los picos para la zona de 3,2-35,0 min de los cromatogramas (SPME en suspensión acuosa).

25 Figura 4: Contenidos relativos de los 11 compuestos elegidos extraídos en el espacio de las muestras por SPME en suspensión acuosa.

Figura 5: Valores de los aromas individuales de los 11 compuestos seleccionados.

Figura 6: Valor del aroma global basado en 4 compuestos.

## REIVINDICACIONES

- 5 1.- Método para determinar la calidad organoléptica de una composición de biomasa de microalgas rica en proteínas que comprende como mínimo 50% de proteínas en peso seco de biomasa de microalgas, caracterizado por que el método comprende la determinación del contenido de 11 compuestos orgánicos volátiles, siendo los 11 compuestos orgánicos volátiles el pentanal, el hexanal, el 1-octen-3-ol, el 2-pentilfurano, el octanal, el 3,5-octadien-2-ol (o 3-octen-2-ona), el 3,5-octadien-2-ona, el nonanal, el 2-nonenal, el (E,E)-2,4-nonadienal y el ácido hexanoico, comprendiendo la biomasa de microalgas más de 50% de proteínas en peso seco de biomasa y siendo las microalgas del género *Chlorella*.
- 10 2.- Método según la reivindicación 1, en el que el contenido de los 11 compuestos orgánicos volátiles se determina por SPME/GC, preferentemente por SPME/GC-MS.
- 3.- Método según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que el contenido de los 11 compuestos orgánicos volátiles se determina mediante el área de los picos cromatográficos según SPME/GC.
- 15 4.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizado por que el contenido de los 11 compuestos orgánicos volátiles, en particular el área de los picos cromatográficos que corresponden a los 11 compuestos orgánicos volátiles se compara con el de biomasa(s) de microalgas rica en proteínas de referencia para la que o las que se han definido las calidades organolépticas principalmente como inaceptable o aceptable.
- 20 5.- Método para determinar la calidad organoléptica de una composición de biomasa de microalgas rica en proteínas que comprende como mínimo 50% de proteínas en peso seco de biomasa de microalgas, caracterizado por que el método comprende la determinación del contenido de 4 compuestos orgánicos volátiles, siendo estos 4 compuestos orgánicos el 3,5-octadien-2-ol, el 1-octen-3-ol, la 3,5-octadien-2-ona y el (E,E)-2,4-nonadienal y por que se calcula un valor de aroma global mediante la suma de los valores individuales, calculándose dichos valores de aromas individuales dividiendo la concentración del compuesto por su umbral olfativo, del 3,5-octadien-2-ol, del 1-octen-3-ol, de la 3,5-octadien-2-ona y del (E,E)-2,4-nonadienal, comprendiendo la biomasa de microalgas más de 50% de proteínas en peso seco de biomasa y siendo las microalgas del género *Chlorella*.
- 25 6.- Método de selección de composiciones de biomasa de microalgas ricas en proteínas que presentan un perfil organoléptico aceptable, caracterizado por que la calidad organoléptica se determina por el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y por que la composición se elige cuando el valor del aroma global calculado por el método según la reivindicación 5 está comprendido entre 0 y 40% con respecto al de una composición de biomasa de microalgas de referencia organoléptica inaceptable, caracterizado por que la biomasa de microalgas comprende más de 50% de proteínas en peso seco de biomasa y por que las microalgas son del género *Chlorella*.
- 30 7.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado por que las microalgas se eligen entre el grupo constituido por *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* y *Chlorella protothecoides*, y más particularmente *Chlorella protothecoides*.

Figura 1

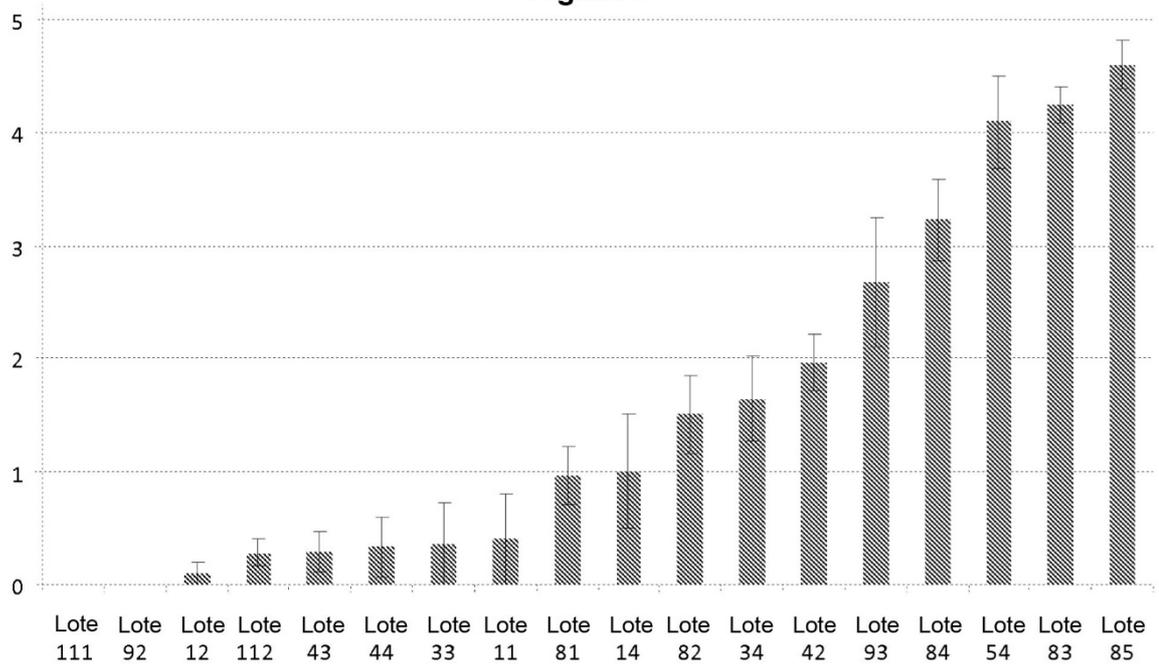


Figura 2

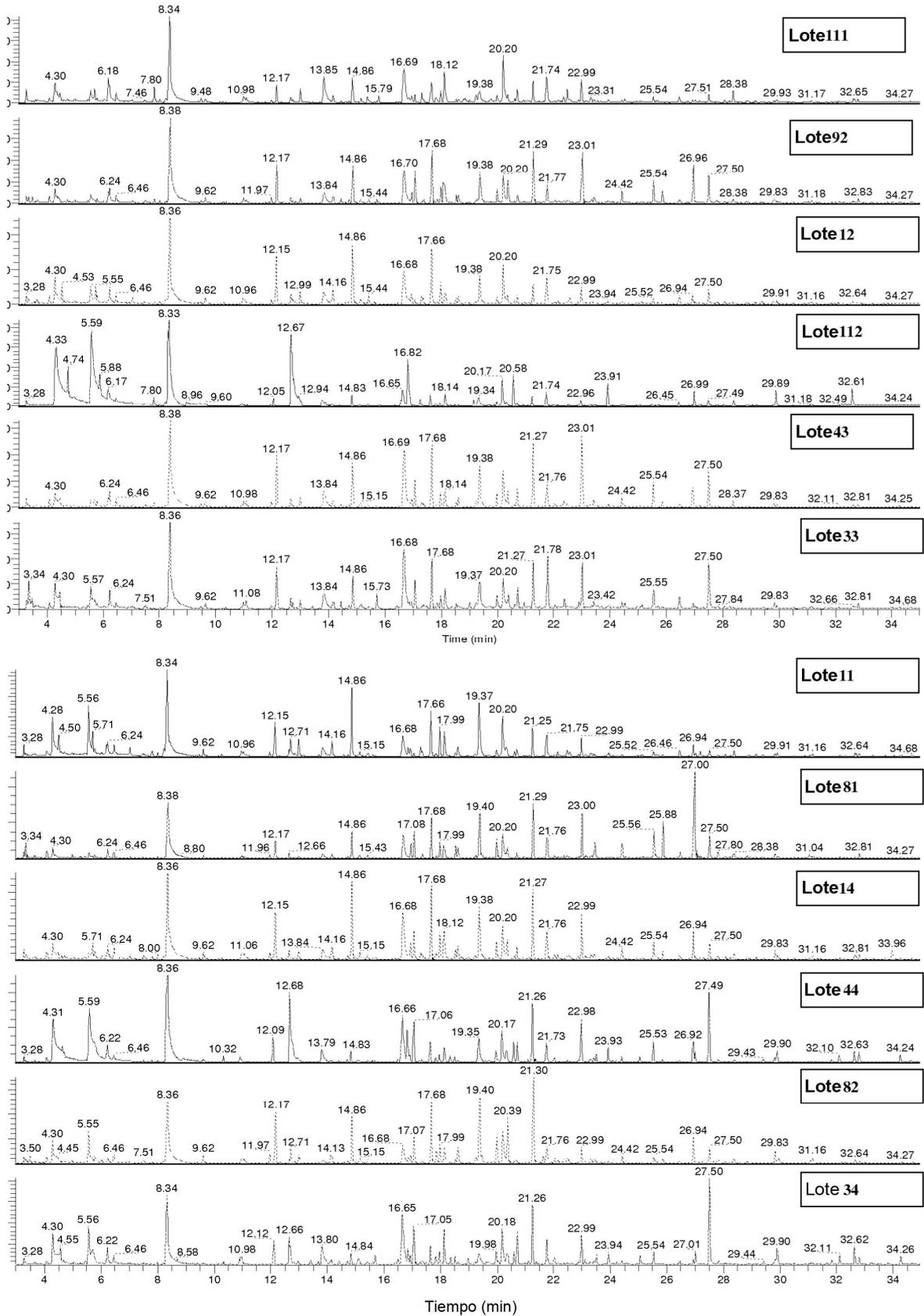


Figura 2 (continuación)

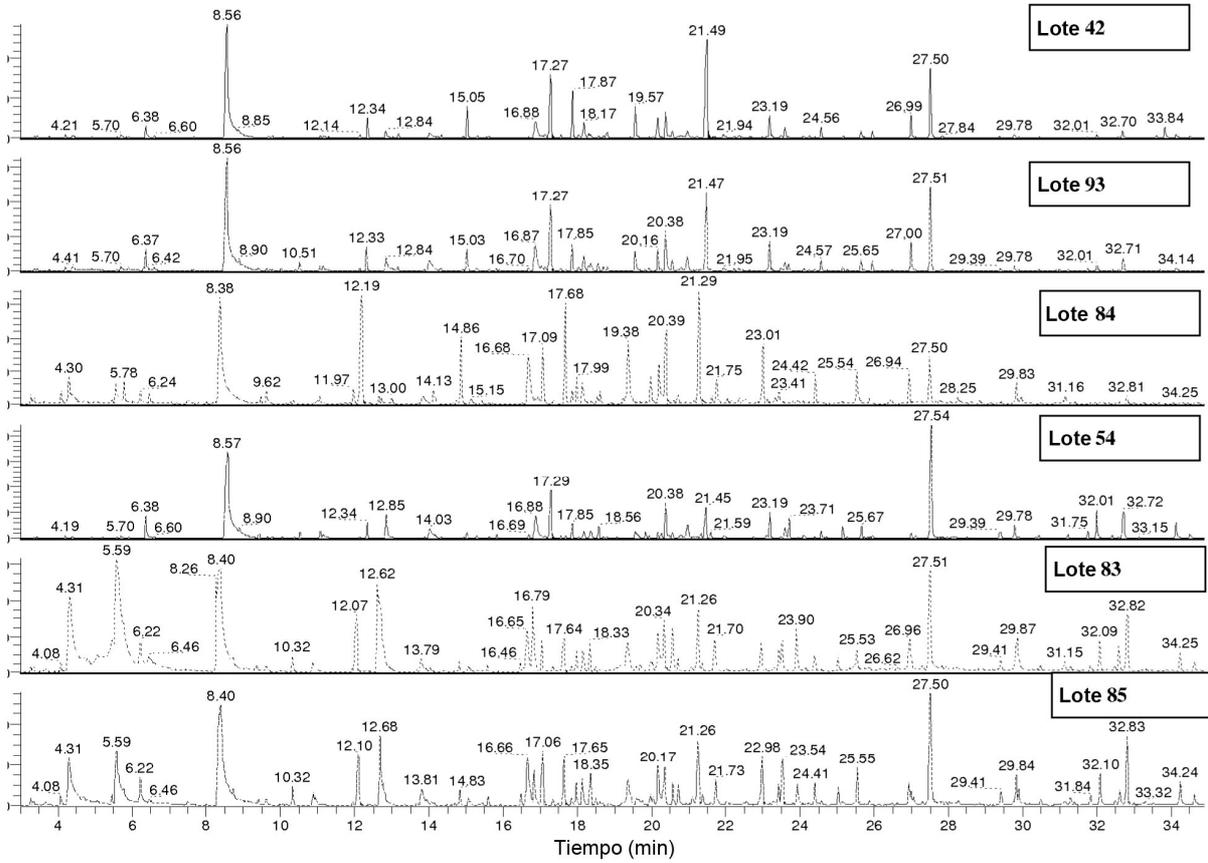
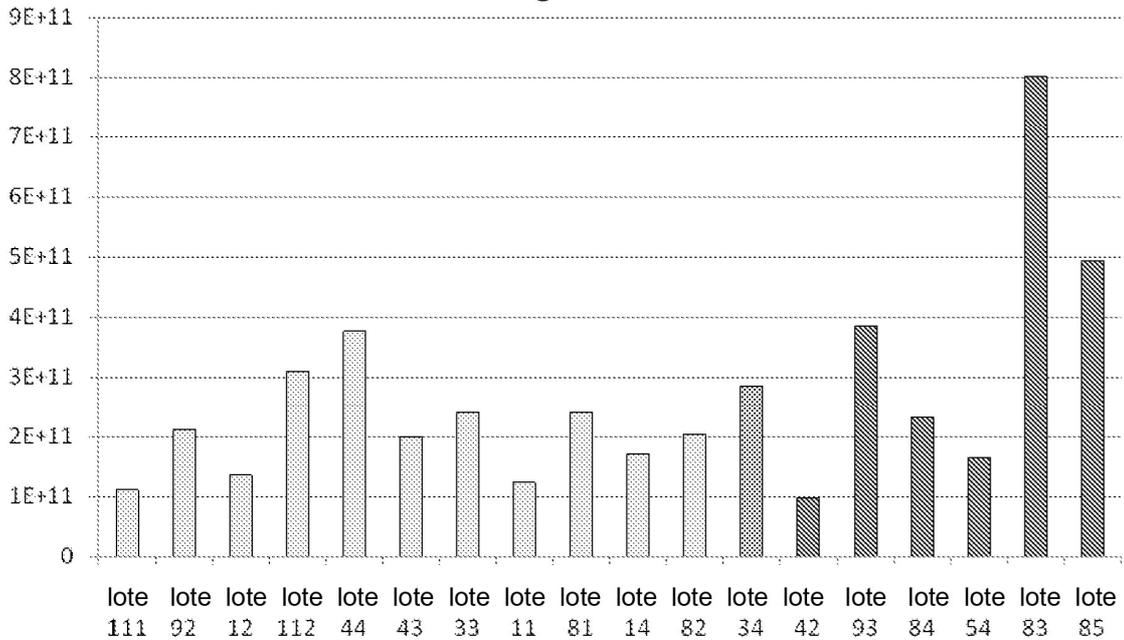
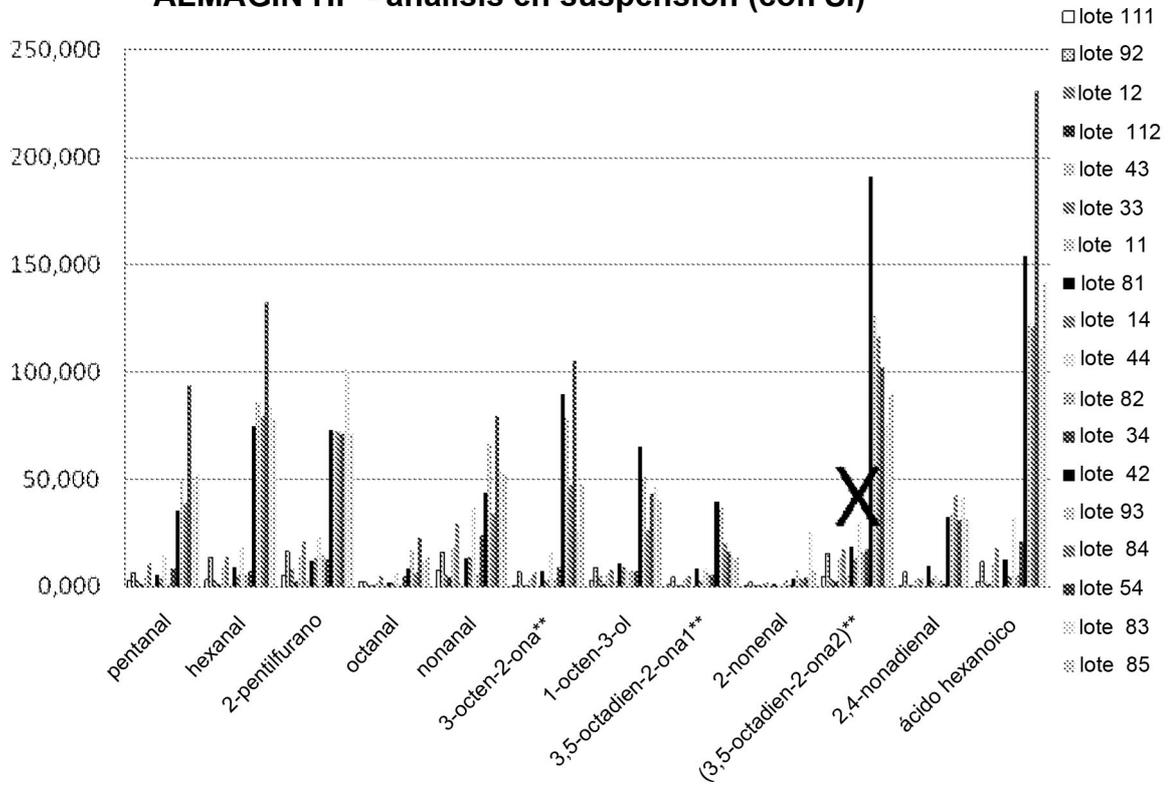


Figura 3



**Figura 4**  
**ALMAGIN HP - análisis en suspensión (con SI)**



**Figura 5**  
**ALMAGIN HP - valores de aromas individuales (SI)**

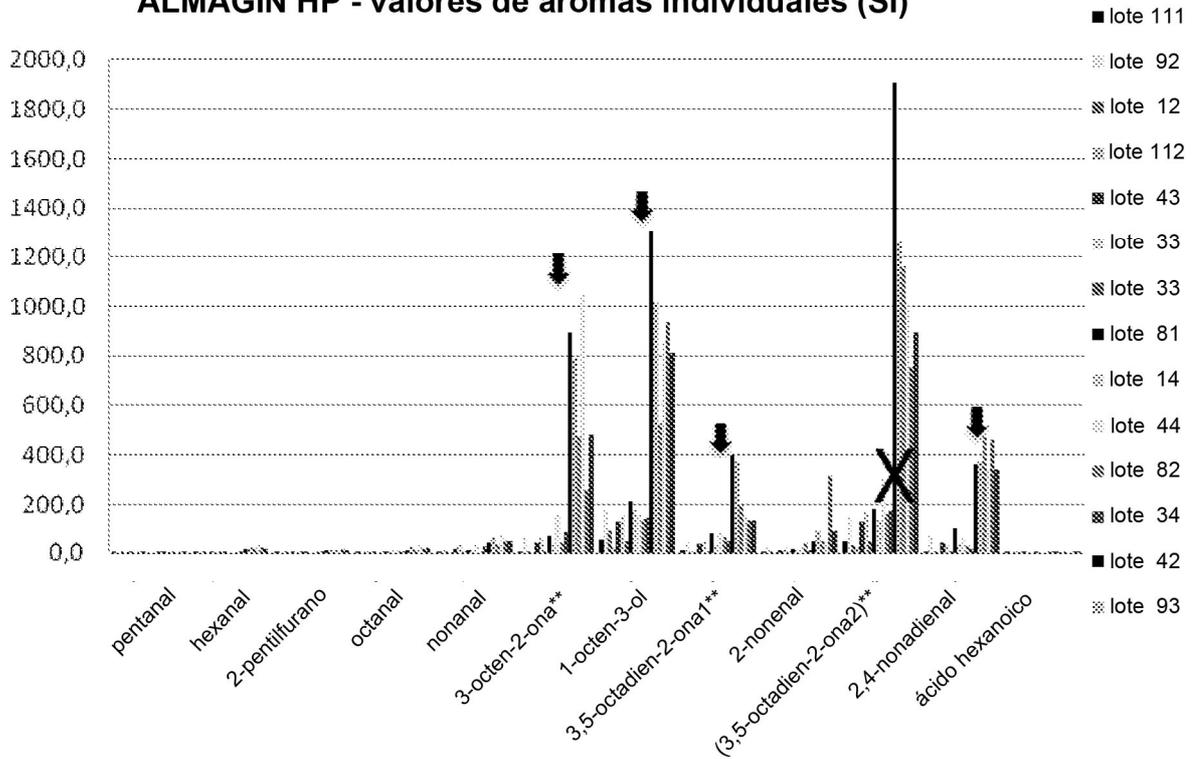


Figura 6

VALOR DE AROMA GLOBAL (2,4-nonadienal + 1-octen-3-ol + 3-octen-2-ona + 3,5-octadien-2-ona1)

