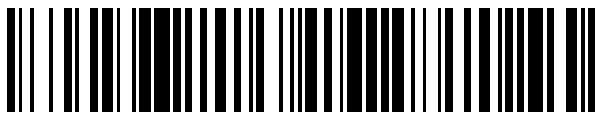




OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 975 155**

⑯ Número de solicitud: 202230984

⑮ Int. Cl.:

A23J 3/20 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCIÓN CON EXAMEN

B2

⑯ Fecha de presentación:

15.11.2022

⑯ Fecha de publicación de la solicitud:

03.07.2024

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

03.09.2024

Fecha de concesión:

14.01.2025

⑯ Fecha de publicación de la concesión:

21.01.2025

⑯ Titular/es:

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (100.00%)
Plaza del Colegio de Santa Cruz 8
47002 Valladolid (Valladolid) ES

⑯ Inventor/es:

DE LA FUENTE BALLESTEROS, Adrián y
VELA CORONA, Antonio José

⑯ Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

⑯ Título: **ALIMENTO ANÁLOGO DE LA CARNE QUE COMPRENDE MICOPROTEÍNAS Y MICROALGAS**

⑯ Resumen:

Alimento análogo de la carne que comprende micoproteínas y microalgas. La industria cárnica genera un gran impacto medioambiental y se caracteriza por tener un precio elevado que muchas personas no pueden permitirse. El consumo proteico es vital en la dieta humana lo cual depende en la mayoría de las ocasiones de un aporte cárnico. Los alimentos proteicos que no contienen carne en su composición están generalmente basados en proteína vegetal y se caracterizan por tener una carencia nutricional y no tener un perfil aminoacídico tan completo como la carne. La presente invención se trata de un sustituto cárnico hecho a base de micoproteínas y microalgas, rico en proteínas y enriquecidos con vitamina B12 y aceites omega-3, con una textura y sabor análogos al de la carne, que conlleva un impacto medioambiental significativamente menor al de la industria cárnica.

ES 2 975 155 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.

Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

ALIMENTO ANÁLOGO DE LA CARNE QUE COMPRENDE MICOPROTEÍNAS Y MICROALGAS

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

10

La presente invención se encuadra dentro del sector de la alimentación, específicamente dentro de la industria cárnica y más concretamente en los sustitutos cárnicos basados en microalgas y hongos.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La ingesta proteica del 95% de las personas se basa principalmente en carne. La producción de carne para el consumo humano genera desechos que contaminan las fuentes hídricas de sus alrededores y es responsable directo de la emisión de altas cantidades de metano al ambiente, lo que la posiciona como una de las mayores responsables del impacto en el calentamiento global.

Además, para alimentar a los animales de los que se obtendrá la carne, se depende principalmente de la actividad agrícola extensiva, lo que provoca la disminución de la biodiversidad natural, la degradación de los ecosistemas y una sobreexplotación de los recursos naturales. Se estima que entre el 70 y 85 % de la huella hídrica de las actividades humanas está asociada con las actividades agrícolas, y que es responsable de más del 30 % del total de gases de efecto invernadero emitidos por actividades humanas.

30

Si bien es importante tener un consumo adecuado de proteína para llevar una dieta equilibrada, no es recomendable un consumo excesivo de carnes rojas (las que proceden de mamíferos). Varios estudios han reportado que el consumo de estas carnes aumenta la susceptibilidad a desarrollar enfermedades cardiovasculares y puede incrementar la mortalidad (Zhong VW *et al.*, 2020. JAMA Intern Med. 180(4):503-512).

Estas preocupaciones han motivado a una parte de la población a optar por opciones vegetarianas y veganas, mientras otros consumidores habituales de productos cárnicos han decidido reducir su consumo buscando alternativas. Esto ha causado una rápida expansión 5 del mercado de los sustitutos cárnicos (<https://www.destatis.de/>; https://www.3tres3.com/ultima-hora/alemania-aumenta-la-produccion-de-productos-sustitutivos-de-la-carne_48043/).

Los alimentos proteicos que no contienen carne en su composición están generalmente 10 basados en proteína vegetal y se caracterizan por tener una carencia nutricional al no tener un perfil aminoacídico tan completo como la carne (Gorissen SHM *et al.*, 2018. *Amino Acids* 50, 1685-95). Además, carecen de una textura y sabor adecuados y su precio es significativamente más elevado.

15 Para facilitar la eliminación de la carne de la dieta, el sabor y la variedad de opciones es tomado en cuenta por los consumidores. Elzerman *et al.* (2011. *Food Quality and Preference*, Vol. 22 (3), 233-240) reportaron que el reemplazo de carne en una dieta no vegetariana es más fácil cuando el sustituto cárneo se incorpora en una comida, en comparación que cuando es tratado por separado. Por esta razón es importante dar a los productos una textura y sabor 20 adecuados.

Los análogos de carne son productos alimentarios que se aproximan a las cualidades 25 estéticas y a las características químicas de ciertos tipos de carne, pero que se elaboran a partir de proteínas no animales. Estos alimentos resultan atractivos para la industria por sus ventajas en cuanto a costes, su precio significativamente más estable debido a que están menos expuestos a las fluctuaciones estacionales de la oferta, su mayor vida útil y su almacenamiento más fácil. El término “análogo de la carne” o “sustituto cárneo” se ha utilizado 30 principalmente para referirse a productos cuya elaboración se basa en filamentos proteicos hilados, y productos derivados de proteínas vegetales texturizadas. Los análogos de la carne pueden obtenerse de un número cada vez mayor de fuentes de proteínas. Los principales ingredientes utilizados en la preparación de estos son proteínas de soja, legumbres, frutos secos, proteínas de cereales, verduras y micoproteínas. Actualmente, el ingrediente mayormente utilizado en sustitutos cárnicos es la soja, que sigue siendo la fuente común más barata de proteínas vegetales.

Los sustitutos cárnicos actuales basados en proteínas de plantas no se asemejan a la textura real de la carne y presentan un perfil aminoacídico es deficiente, por lo que existe una necesidad de productos análogos de carne que tengan un perfil aminoacídico equiparable al de la carne, cuyo procedimiento de obtención tenga un impacto medioambiental menor que el de la producción de carne para consumo humano y que además su textura, sabor y aspecto sea agradable para el consumidor.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

- 10 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**
- En un primer aspecto, la invención se refiere a un producto alimenticio análogo a la carne de origen animal caracterizado por que comprende micoproteínas y biomasa de una microalga.
- 15 En un segundo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la obtención de un producto alimenticio análogo a la carne de origen animal, caracterizado por que el proceso comprende las siguientes etapas:
- 20 a. Obtención de biomasa de una microalga;
- b. cultivo de un hongo filamentoso en un biorreactor con flujo de aire en un medio que comprende glucosa, amonio, potasio, magnesio y fosfato;
- c. obtención de micoproteínas;
- d. mezclar las micoproteínas de la etapa c) con la biomasa de la microalga de la etapa a), un aglutinante y especias hasta obtener una pasta homogénea;
- 25 e. cocinar la pasta homogénea con vapor;
- f. dar forma a la pasta;
- g. congelación del producto; y
- h. almacenamiento del producto congelado.
- 30 Un tercer aspecto de la invención se refiere a un producto alimenticio análogo a la carne de origen animal obtenido a partir del procedimiento del segundo aspecto de la invención.

35 Un cuarto aspecto de la invención se refiere al uso de biomasa de *Chlorella vulgaris* y micoproteínas de *Fusarium venenatum* en la fabricación de un producto alimenticio análogo a la carne de origen animal.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de la descripción, un juego de figuras o dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1. Proceso de producción del análogo de carne de origen animal. (A) Cultivo de microalgas: (1) cultivo; (2) fermentador; (3) cultivo en fotobiorreactor (PBR); (4) centrifugación; (5) lavado; (6) secado; (7) almacenamiento independiente. (B) Cultivo de micoproteínas: (8) agua, glucosa, nutrientes y cepa fúngica; (9) biorreactor air-lift; (10) reducción de las unidades de ARN; (11) centrifugación; (12) aglutinante y especias; (13) mezclar; (14) marmita; (15) enfriador; (16) extrusión; (17) congelación; (18) almacenamiento.

Figura 2. (A) Análogo de carne obtenido del proceso de la invención después de la etapa de extrusión. (B) El análogo de carne después de cocinarse.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un producto alimenticio análogo a la carne de origen animal, que comprende proteínas de origen fúngico y microalgas.

A efectos de la presente invención, un producto alimenticio análogo a la carne de origen animal se refiere a un producto, apto para el consumo humano, que tenga un aspecto físico, textura y sabor equiparable por el consumidor al de la carne de origen animal (mamíferos o aves, preferiblemente aves).

En una realización, el producto comprende proteínas obtenidas a partir de un hongo (*Fusarium venenatum*) y/o (ii) la microalga *Chlorella vulgaris*. Preferiblemente, el producto comprende el hongo *Fusarium venenatum* y la microalga *Chlorella vulgaris*. Cualquier cepa de la especie del hongo es aceptable como fuente de micoproteínas en la presente invención.

Las proteínas de origen fúngico, o micoproteínas, hacen referencia a composiciones obtenidas a partir de filamentos de biomasa fúngica que se encuentran autorizados para el consumo humano. Al tratarse de un material fibroso, las micoproteínas pueden ser moldeadas

para obtener una textura que recuerde la textura de la carne, lo que las hace aptas para tener una mejor aceptación por parte de los consumidores. El término micoproteína a efectos de la presente invención hace referencia a un alimento proteico autorizado para el consumo humano obtenido de filamentos de biomasa de un hongo filamentoso, preferiblemente

5 *Fusarium venenatum*.

Las micoproteínas ha sido designada como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos de América desde el 2002 (Denny A *et al.* 2008. *Nutrition Bulletin*, Vol. 33 (4), 298-310). Sin embargo, tienen la 10 desventaja de tener un alto contenido de ARN (aproximadamente un 10 % en peso seco), mientras que la carne suele tener menos del 0.5 % (Souza-Filho PF *et al.*, 2019. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35:147). El consumo de altas cantidades de ARN puede causar el aumento de ácido úrico en el cuerpo.

15 Las micoproteínas presentan un bajo contenido de sodio y son una buena fuente de zinc, selenio y antioxidantes, pero su contenido de hierro y vitamina B12 es bajo en comparación con los productos cárnicos. La fibra presente en la micoproteína se compone de dos tercios de β -glucanos y un tercio de quitina, formando una matriz fibrosa de quitina-glucanos que presenta baja solubilidad en agua (88% insoluble) (Bottin JH *et al.*, 2016. *The British Journal 20 of Nutrition*, Vol. 116 (2), 360-374). Dado el alto contenido de proteína y de fibra en la micoproteína, se ha determinado que los alimentos hechos con micoproteína son capaces de incrementar la sensación de saciedad en los consumidores (Paddon-Jones D *et al.*, 2008. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 87, 1558-1561). Además, Smetana S *et al.* (2018. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, Vol. 4, 628-632) en un estudio sobre la energía, tierra 25 y agua necesaria para producir sustitutos cárnicos, determinaron que el uso de micoproteína es una de las alternativas más eficientes respecto al uso de tierra ($< 2 \text{ m}^2/\text{kg}$, en comparación con 5-7 m^2/kg para pollo y 7-8 m^2 para cerdo) y de agua ($\sim 500 \text{ L/kg}$).

30 En una realización preferida, el producto de la primera realización de la invención contiene entre 3 – 10 g/L de biomasa de *Fusarium venenatum*. En una realización más preferida, el producto contiene aproximadamente 5 g/L de biomasa del hongo.

Los productos veganos carecen generalmente de nutrientes importantes para la salud humana como el hierro y la vitamina B12, presentes naturalmente en la carne.

El producto de la primera realización de la invención comprende además microalgas. Las microalgas son microorganismos, una fuente de proteínas, carbohidratos, pigmentos, vitaminas y minerales (Mata T *et al.*, 2010. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 14 (1), 217-232). Además, son capaces de adaptarse a una diversa gama de condiciones 5 adversas y prosperar en ellas, desde temperaturas de congelación hasta regiones desérticas.

En una realización preferida, el producto comprende una microalga seleccionada entre *Chlorella vulgaris* y *Spirulina platensis*. En una realización más preferida, el producto comprende *Chlorella vulgaris*. Las células de *Chlorella vulgaris* son células reproductivas no 10 móviles (auto esporas) que se reproducen rápidamente. Es posible incrementar el contenido proteico en estas microalgas controlando el aporte de nitrógeno durante la etapa de crecimiento. La presencia de *C. vulgaris* suple en el producto las deficiencias en vitamina B12 y ácidos grasos omega-3 del hongo.

15 El contenido proteico de *C. vulgaris* representa entre el 42 % y 58 % de la biomasa seca del alga, el cual varía dependiendo de las condiciones de crecimiento. La calidad nutricional de las proteínas es determinada por su perfil aminoacídico, y es favorable para la nutrición humana según los estándares propuestos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Food and Agricultural Organization (FAO), ya que estas células sintetizan aminoácidos 20 esenciales y no esenciales (Safi *et al.*, 2014. *Renewable and Sustainable Energy Review*, Vol. 35, 265-278).

En una realización preferida, el producto de la primera realización de la invención contiene 25 entre 0.4 y 0.8 g/L de biomasa de *Chlorella vulgaris*. En una realización más preferida, el producto contiene aproximadamente 0.6 g/L de biomasa de la microalga.

En una realización más preferida, el producto de la invención puede comprender otros 30 ingredientes de origen no animal. Estos ingredientes se seleccionan del grupo que comprende proteína de soja, hongos filamentosos comestibles (como, por ejemplo, *Fusarium graminearu*), gluten de trigo e hidratos de carbono (como, por ejemplo, gomas, almidón, maltodextrina, hidrocoloides, dextrinas, polidextrosa, pectina, inulina, hemicelulosa y celulosa).

En una realización todavía más preferida, el producto contiene saborizantes para que tenga 35 sabor a carne. Los ingredientes que producen este sabor se seleccionan entre aminoácidos

que contienen azufre, azúcares simples, caseinato y carragenanos (polisacáridos de alto peso molecular extraídos de algas marinas rojas, que se utilizan como aglutinantes en algunos alimentos).

- 5 El producto de la invención tiene una textura y sabor equiparable al de la carne y conlleva un impacto medioambiental significativamente menor al de la industria cárnica.

En una realización más preferida, el producto de la invención comprende los siguientes ingredientes:

- 10 60 – 90 % p/p de micoproteína de *F. venenatum* y
5 – 15 % p/p de biomasa de *C. vulgaris*.

- En una realización todavía más preferida, el producto de la invención además comprende uno o varios de los siguientes ingredientes: aromas, proteína de patata, nuez moscada, ajo negro
15 y pimienta negra.

En una realización más preferida, el producto de la invención comprende los siguientes ingredientes:

70 – 86 % p/p de micoproteína de *F. venenatum*

- 20 8.5 – 12 % p/p de biomasa de *C. vulgaris*
3 - 8 % v/p de agua
1 – 5 % p/p aromas
0.5 – 1.5 % p/p de proteína de patata
0.5 – 1.5 % p/p de nuez moscada
25 0.25 – 1.0 % p/p ajo negro
0.25 – 1.0 % p/p pimienta negra.

- Una segunda realización de la invención se refiere a un procedimiento para la obtención de un producto alimenticio no cárnico con apariencia y textura equivalente al de un producto
30 cárnico, en donde el proceso comprende las siguientes etapas:

- a) obtener de biomasa de una microalga;
- b) cultivar un hongo filamentoso en un biorreactor con flujo de aire en un medio que comprende glucosa, amonio, potasio, magnesio y fosfato;
- c) obtener las micoproteínas;

- d) mezclar las micoproteínas de la etapa c) con la biomasa de la microalga de la etapa a), un aglutinante y especias hasta obtener una pasta homogénea;
- e) cocinar la pasta homogénea con vapor;
- f) dar forma a la pasta;
- 5 g) congelar el producto; y
- h) almacenar el producto congelado.

La microalga en la etapa a) se siembra en recipientes aptos de pequeña escala para que se lleve a cabo una adaptación progresiva al medio de cultivo al que se le está introduciendo (por ejemplo, 100 mL). Tras una incubación entre 3 y 7 días, preferiblemente 5 días a 10 aproximadamente 21 °C, se trasvasan a recipientes de mayor tamaño (por ejemplo, 2 litros) y se incuban durante 5 días a 18 – 22 °C. Seguidamente se realiza un escalado a fotobiorreactores, en los que se incrementa el área disponible para la producción. Usualmente las microalgas se cultivan en estanques abiertos construidos al lado de industrias que generan 15 grandes cantidades de dióxido de carbono. Sin embargo, estos estanques abiertos tienen la limitación de requerir un estricto control ambiental para evitar la contaminación, la evaporación del agua, la presencia de contaminantes o bacterias invasoras y el riesgo de crecimiento de otras especies de algas. Además, las diferencias de temperatura no pueden ser controladas, ni la exposición a cantidades excesivas de CO₂ y luz solar (Safi C *et al.*, 2014. *Renewable and 20 Sustainable Energy Review*, Vol. 35, 265-278).

Para superar las limitaciones que presentan los sistemas estanques abiertos se ha implementado la tecnología de los fotobiorreactores cerrados, que permiten un crecimiento de la biomasa en un ambiente controlado (pH, intensidad de luz, temperatura, concentración de 25 dióxido de carbono) y así obtener una mayor concentración de células, y tener una mayor pureza en la producción, en especial cuando está destinada para la industria farmacéutica y de la alimentación.

En una realización preferida, la biomasa de la microalga se obtiene mediante su crecimiento 30 en un fotobiorreactor cerrado. El fotobiorreactor cerrado en el procedimiento de la presente invención permite el crecimiento de la biomasa en un ambiente controlado, preferiblemente a pH= 6 – 7, más preferiblemente a 6.6 y temperatura entre 20 y 30 grados, más preferiblemente a 25 °C, para obtener una mayor concentración de células, y tener una mayor pureza en la producción. En una realización particular, el fotobiorreactor utilizado consiste en tubos 35 transparentes de aproximadamente 20 cm de diámetro y un grosor de aproximadamente 5

milímetros, lo que permite una absorción apropiada de la luz. Los reactores se alimentan con CO₂ mediante corrientes de burbujas, y se utilizan luces fluorescentes (19,5 – 58,60 µEm² s⁻¹; 40W) colocadas a aproximadamente 10 cm del cultivo, en caso de que los tubos no cuenten con suficiente exposición a la luz solar. La instalación de los fotobiorreactores puede ser

5 fácilmente incrementada, ya que su instalación es relativamente simple, lo que permite tener una mayor producción de microalgas en el momento que llegue a ser necesario. En una realización preferida, la proteína de la microalga en la etapa a) se obtiene a partir de *C. vulgaris*. La microalga *Chlorella vulgaris* aporta compuestos bioactivos como hierro, vitamina B12 y omega-3.

10 La técnica de cosechado de biomasa consiste en el proceso de centrifugación (5000 rpm, 15 min) debido a que tiene una alta eficiencia (recuperación del 95%), requiere poco tiempo y permite trabajar con grandes volúmenes. La morfología de, por ejemplo, *C. vulgaris* permite un alto estrés centrífugo sin dañar su estructura durante el proceso.

15 A continuación, las microalgas se lavan utilizando, por ejemplo, aspersores de agua mientras las algas se trasladan utilizando una cinta transportadora, con el objetivo de eliminar el remanente líquido del medio de cultivo. Posteriormente las algas se secan para eliminar el agua del lavado y evitar cualquier contaminación microbiana. Por ejemplo, el secado puede

20 tener lugar utilizando bandejas (30 x 40 x 4 cm) situadas en torres de secado a 50 °C durante 2 horas. Una vez seco, la biomasa de la microalga se almacena en seco a aproximadamente 20 °C para su utilización como ingrediente en la elaboración del producto de la invención. No se conocen limitaciones en cuanto al tiempo de almacenaje de la biomasa.

25 El cultivo del hongo filamentoso en la etapa b) comprende, en primer lugar, activar el microorganismo en un recipiente con glucosa y solución salina. Preferiblemente, el recipiente contiene 0.5 % p/v de glucosa y 0.5 % v/v de solución salina. Una vez que el microorganismo se ha adaptado al medio (aproximadamente 1 semana), se transfiere la solución a un fermentador. En una realización de la invención, el proceso se realiza en un equipo de

30 fermentación continua utilizando un fermentador agitado por aire, por ejemplo, tipo air-lift.. Estos se introducen continuamente al fermentador y comprenden glucosa, amonio (como fuente de nitrógeno), potasio, magnesio y fosfato. Es importante controlar y ajustar constantemente la temperatura, pH y concentración de los nutrientes y del oxígeno en el medio para obtener un ritmo de crecimiento óptimo. En una realización preferida, la temperatura es de 28 – 32 °C a pH 6 – 7 (preferiblemente 6.6) y la concentración de los

35

nutrientes/oxígeno entre 1.5 y 2.5 nM (preferiblemente entre 1.96 – 2.11 nM). Los fermentadores pueden utilizarse alrededor de 6 semanas antes de tener que detener el proceso para limpiar e iniciar un nuevo cultivo.

- 5 Para realizar la cosecha, se retira la fracción del hongo por centrifugación, se calienta entre 67 – 72 °C durante 30 – 45 minutos para disminuir la cantidad de ARN. El contenido de ARN en la biomasa fúngica se encuentra alrededor del 10 % de su peso seco. El consumo de altas cantidades de ARN puede causar el aumento de ácido úrico en el cuerpo, por lo que debe ser reducido antes de su utilización para el desarrollo de alimentos. El tratamiento térmico detiene el crecimiento, destruye ribosomas y activa ARNsas endógenas que rompen células de ARN a nucleótidos de 5' que se difunden a través de las membranas celulares y reducen el contenido intrínseco de ARN en la micoproteína a aproximadamente 1%, un nivel similar al de las fuentes proteicas animales. En una realización preferida, el cultivo tratado es pasteurizado.
- 10
- 15 El micelio fúngico formado (micoproteína) después del tratamiento térmico se separa por centrifugación para formar una pasta. Los sólidos resultantes son seguidamente concentrados mediante enfriamiento (por ejemplo, al vacío). El extracto fúngico obtenido en este punto tiene aproximadamente un 24 % de micoproteína respecto de los sólidos totales del extracto.
- 20 En una realización preferida, la micoproteína se obtiene a partir del hongo *Fusarium venenatum*.

La etapa d) consiste en mezclar la micoproteína de la etapa c) con los demás ingredientes: aglutinante, la microalga seca de la etapa a), y especias para dar el sabor deseado. El aglutinante en la etapa se puede seleccionar entre albúmina de huevo o proteína de patata (como opción vegana). Las especias se seleccionan del grupo que comprende nuez moscada, ajo molido, pimienta negra, orégano, pimentón, comino, albahaca, cilantro, cardamomo y tomillo. Los ingredientes se mezclan hasta obtener una pasta homogénea. Esto es importante para garantizar una correcta textura en el producto final.

- 30
- 35 En la etapa e), la pasta homogénea se cocina utilizando vapor a 85 – 90 °C, durante aproximadamente 30 minutos. Esta etapa desnaturaliza las proteínas del aglutinante (huevo o patata), lo que produce la formación de una textura más fibrosa. La fuerza del sistema formado por micoproteína y proteínas (del ingrediente aglutinante) depende de las propiedades de formar una matriz de las fibras y la gelatinización de las proteínas. La

temperatura de la pasta cocida se baja, preferiblemente a aproximadamente 20 °C, para obtener una textura más sólida, con lo que se puede dar la forma deseada a las piezas.

En la etapa f) se da forma a la pasta enfriada, por ejemplo, utilizando un extrusor, que permite

5 cortar las piezas en la forma y tamaño deseado.

Finalmente, en la etapa g), las piezas formadas en la etapa f) se congelan. Se debe alcanzar una temperatura de aproximadamente -10°C en aproximadamente 30 minutos para poder tener un proceso lento y controlado. Esta etapa permite que se formen cristales de hielo entre

10 las fibras de la micoproteína, lo que ocasiona que se obtenga una textura similar a la de carne.

La congelación debe realizarse a velocidad controlada para obtener el tamaño de cristales de hielo que consiga empujar y juntar los filamentos al punto de que formen una estructura fibrosa, una característica sensorial deseada en los sustitutos cárnicos. Aproximadamente el

15 50 % de la textura del producto final se forma después del congelado, ya que la textura

evoluciona durante el periodo de almacenamiento, aproximadamente durante 3 semanas. El

15 producto obtenido en este procedimiento se conserva congelado hasta el momento en el que

se desee consumir. Se sabe que el producto puede almacenarse al menos durante seis meses.

20 En una realización más preferida, el procedimiento para la obtención de un análogo de la carne sin proteínas cárnicas comprende las siguientes etapas:

a) obtener biomasa seca de una microalga de *Chlorella vulgaris* a partir de fermentación en un recipiente cerrado;

b) cultivar el hongo filamento *Fusarium venenatum* en un biorreactor con flujo de aire en un medio que comprende 1.5 – 2.5 mM de glucosa, amonio, potasio, magnesio y fosfato a 28- 32 °C y pH 6-7;

b1) retirar la fracción sólida que contiene el hongo del cultivo;

b2) incubar la fracción sólida a 67 – 72 °C durante 30 – 45 minutos;

b3) separar el micelio fúngico para formar una pasta;

30 b4) concentrar la pasta;

c) obtener las micoproteínas;

d) mezclar las micoproteínas de la etapa c) con la biomasa de la microalga de la etapa a), un aglutinante seleccionado entre albúmina de huevo o proteína de patata, y especias hasta obtener una pasta homogénea;

- e) cocinar la pasta homogénea con vapor a 85 – 90 °C durante aproximadamente 30 minutos;
- 5 e1) enfriar la pasta después del cocinado a aproximadamente 20 °C
- f) dar forma a la pasta;
- g) congelar el producto a -10 °C durante aproximadamente 30 minutos; y
- h) almacenar a aproximadamente -18 °C al menos tres semanas.

En relación con la expresión “aproximadamente” en el presente texto, el experto en la materia sabe que los valores numéricos relacionados con las mediciones están sujetos a errores de medición que limitan su precisión. En la presente invención el error de medición es de ± 2 °C en el caso de temperaturas, ± 5 minutos en el caso de tiempos, y ± 1 % sobre el valor de un porcentaje específico. Cuando no se dan otros márgenes de error, el margen máximo se determina aplicando la convención de redondeo al último lugar decimal (ver decisión EPO T 175/97) (GL EPO G-V, 8.1).

15 Los microorganismos de la invención tienen la ventaja de poder producirse en fermentadores en los cuales se controlan las condiciones óptimas para su crecimiento, y una vez se ha finalizado el proceso de producción pueden limpiarse y utilizarse las veces que sean necesarias. Este aspecto solventa el gran impacto medioambiental que tiene la industria 20 cárnea, tanto de forma directa (macro granjas que generan una elevada cantidad de gases de efecto invernadero) como indirecta (extensas áreas de cultivo dedicadas exclusivamente a la producción de alimento del ganado).

25 Un tercer aspecto de la invención se refiere a un producto alimenticio análogo a la carne de origen animal obtenido a partir de cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente. El producto se caracteriza por comprender un 60 – 90 % p/p de microproteínas de *F. venenatum* y 5 – 15 % p/p de biomasa de *C. vulgaris*.

30 Un cuarto aspecto de la invención se refiere al uso de biomasa de *C. vulgaris* y micoproteínas de *F. venenatum* en la fabricación de un producto alimenticio análogo a la carne de origen animal. El producto alimenticio que carece de proteínas de origen cárneo cuyo aspecto físico y textura es equivalente al de la carne. En una realización preferida, el producto se usa como análogo a la carne de ave.

Un quinto aspecto de la invención se refiere al uso del producto del primer aspecto, o del producto obtenido del procedimiento del segundo aspecto de la invención como análogo de carne en alimentación. En una realización preferida, el producto se usa como análogo a la carne de ave.

5 El producto de la primera realización de la invención y el producto obtenido por el procedimiento anterior combaten el desperdicio alimentario dado que se trata de un producto congelado cuya vida útil es de 6 meses.

10 La huella de carbono e hídrica generada para producir la micoproteína es 40 veces menor que la que conlleva la producción de la misma cantidad de carne, y 6 veces menor que el pollo.

15 La micoproteína fúngica tiene una estructura fibrosa que al ser compactada recuerda al tejido muscular de la carne. Además, cuenta con todos los aminoácidos esenciales para una correcta alimentación. Por otra parte, las microalgas cuentan con la vitamina B12 al contrario que algunos de los sustitutos cárnicos que son deficientes en esta.

20 Se trata de un producto nutricionalmente equiparable a la carne. Además, el producto de la invención carece de conservantes artificiales.

25 Al desarrollar alimentos a base de microorganismos, se propone un cambio profundo en el sistema agroalimentario mundial que actualmente depende de una agricultura extensiva y sobreexplotación de recursos naturales. Este punto se alinea con el objetivo 2 de los ODS (Objetivos de Desarrollo Sostenible) de la Organización de las Naciones Unidas (ONU).

Por último, el procedimiento aquí descrito reduce la generación de gases de efecto invernadero al disminuir la dependencia de la sociedad sobre la proteína de origen animal.

30

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Producción del análogo cárneo a base de micoproteínas y biomasa de microalgas

35 La microalga *C. vulgaris* se sembró en un recipiente de 100 mL contenido agua para que

se adaptase progresivamente al medio (1). Transcurridos cinco días, se trasvasó el cultivo a un matraz Erlenmeyer de 500 mL y posteriormente a matraces de 2 L (2). A continuación, se escaló el cultivo a un fotobiorreactor cerrado (PBR, *photobioreactor*) de 8 L en el que se mantuvo durante 15 días a 25 ± 2 °C y pH 6.6, con iluminación mediante lámparas fluorescentes con ciclo de luz/oscuridad 12-12 horas (3). Los fotobiorreactores utilizados consisten en tubos transparentes de 20 cm de diámetro y un grosor de 5 milímetros, lo que permite una absorción apropiada de la luz. Los reactores se alimentaron con CO₂ mediante corrientes de burbujas, y se utilizaron luces fluorescentes (19,5 – 58,60 $\mu\text{Em}^2 \text{ s}^{-1}$; 40W) colocadas a 10 cm del cultivo, para los casos en los que los tubos no cuenten con suficiente exposición a la luz solar.

La biomasa se cosechó centrifugando a 5000 rpm durante 15 minutos (4). Se recuperó el 95 % de la biomasa.

Posteriormente se lavó utilizando aspersores de agua mientras las algas se trasladaron utilizando una cinta transportadora, con el objetivo de eliminar el remanente líquido del medio de cultivo (5). Las algas se secaron utilizando bandejas (30 x 40 x 4 cm) situadas en torres de secado a 50 °C durante 2h para eliminar el agua del lavado y evitar cualquier contaminación microbiana (6). El producto fue almacenado en seco a 20 °C para su utilización como ingrediente en la elaboración de productos (7).

El hongo filamento *Fusarium venenatum* se cultivó en una solución nutritiva fresca de glucosa 0.5 % p/v y solución salina 0.5 % v/v rica en minerales (8). Después de una semana, el cultivo se transfirió a un equipo de fermentación continua en el que se introdujo amonio junto con aire comprimido en la base del fermentador (dados que *F. venenatum* es capaz de usar nitrógeno inorgánico como parte de sustrato). El fermentador fue de tipo agitado por aire air-lift (9). La cantidad de amoniaco se reguló en función del pH del cultivo (generalmente pH = 6) y la temperatura se mantuvo a 28 - 32 °C mediante un intercambiador de calor. Además, se introdujeron glucosa, amonio, potasio, magnesio y fosfato en concentraciones variables 1,96 – 2,11 mM para el crecimiento del microorganismo durante 48 horas. Durante la fase de crecimiento el dióxido de carbono (CO₂) se inyectó en la base del fermentador causando que ascienda y recircule el líquido del medio.

La concentración de biomasa y el flujo producido pueden ser controlados mediante la alimentación de CO₂ al fermentador. Esto se realiza hasta alcanzar un adecuado nivel de

sólidos en el medio líquido. Después de seis semanas, la fracción del hongo se calentó a 65 °C durante 30 minutos (10). El tratamiento térmico detiene el crecimiento, destruye ribosomas y activa ARNsas endógenas que rompen células de ARN a nucleótidos de 5' que se difunden a través de las membranas celulares y reducen el contenido intrínseco de ARN en la 5 micoproteína a aproximadamente 1%, un nivel similar al de las fuentes proteicas animales. Finalmente, el cultivo tratado fue pasteurizado a 72 °C durante 1 minuto.

El micelio fúngico formado (micoproteína) se separó por centrifugación del medio líquido durante 15 minutos a 5000 rpm para formar una pasta (11). Los sólidos resultantes fueron 10 seguidamente concentrados mediante enfriamiento al vacío, lo que resultó en una concentración de micoproteína de aproximadamente el 24% de los sólidos totales.

Un 10 % p/p de la biomasa de microalga seca y un 76 % de las micoproteínas se mezclaron junto con aglutinante y especias (12). Los aromas y especias se pueden modificar en función 15 de las características organolépticas del producto final deseado. En este caso se añadió 5 % (v/v) de agua, 5 % (p/v) de proteína de patata, 2 % (p/v) de aromas de humo y barbacoa, 1 % (p/v) nuez moscada, 0.5 % (p/v) de ajo molido y 0.5 % (p/v) de pimienta negra. Todos los ingredientes se mezclan utilizando un tornillo mezclador hasta obtener una pasta homogénea (13). Es importante obtener una dispersión homogénea, para garantizar una correcta textura 20 en el producto final.

La pasta se cocinó utilizando vapor durante 30 minutos a una temperatura entre 85 y 90 °C en una marmita (14). Esto desnaturaliza la proteína del aglutinante, lo que comienza a formar una textura más fibrosa. La fuerza del sistema formado por micoproteína y proteínas del 25 aglutinante depende de la gelatinización de las proteínas.

La temperatura de la pasta cocida se redujo para obtener una textura más sólida, con lo que se puede dar la forma deseada a las piezas (15). La temperatura se disminuyó a aproximadamente 20 °C y se moldeó el producto con un extrusor en la forma y tamaño 30 deseado (filete, tiras, bolas...) (16). Las piezas formadas se congelaron a -10°C en 30 minutos (17). La congelación debe realizarse a velocidad controlada para obtener el tamaño de cristales de hielo que consiga empujar y juntar los filamentos al punto de que formen una estructura fibrosa, una característica sensorial deseada en los sustitutos cárnicos. Aproximadamente el 50% de la textura del producto final se forma después del congelado, ya 35 que la textura evoluciona durante el periodo de almacenamiento, aproximadamente durante

3 semanas. Los sustitutos cárnicos de la invención se conservan congelados hasta el momento en el que se deseen consumir. Una vez abierto, el producto se puede consumir durante 24 horas (18).

- 5 La **Figura 1** muestra un esquema del procedimiento descrito en este ejemplo, con las etapas (1) a (18). La **Figura 2** muestra una fotografía del producto después de la extrusión.

La huella de carbono e hídrica generada para producir micoproteína es 40 veces menor que la que conlleva la producción de la misma cantidad de carne, y 6 veces menor que el pollo.

10 El producto es nutricionalmente equiparable a la carne. Además, al desarrollar alimentos a base de microorganismos, se propone un cambio profundo en el sistema agroalimentario mundial que actualmente depende de una agricultura extensiva y sobreexplotación de recursos naturales. Además, se reduce la generación de gases de efecto invernadero al 15 disminuir la demanda cárnea por parte de la sociedad.

Ejemplo 2. Análisis de perfil nutricional del producto

A continuación, se analizó el perfil nutricional del producto obtenido en el ejemplo 1:

20 **Tabla 1.** Información nutricional del análogo de carne

	Análogo de carne (100 g)
Energía (kcal)	86.0
Proteínas (g)	11.5
Carbohidratos (g)	1.7
- de los cuales azúcares (g)	0.8
Grasas (g)	2.9
- de las cuales saturadas (g)	0.6
Fibra (g)	6.0
Sal (g)	0.1
Zinc (mg)	9.0
Se (mg)	20.0
Vitamina D (μg)	1.6

La calidad nutricional del producto hace que sea catalogado como saludable de acuerdo con el sistema de clasificación Nutri-Score A (Galan P *et al.* 2019. Nutr Hosp 36(5) 1213- 22).

Además, se analizó la información nutricional (valores medios) del producto en relación con la ingesta de referencia de un adulto medio (IR, 8400 kJ). La Tabla 2 muestra la información.

Tabla 2: Información nutricional del análogo de carne en relación con la ingesta de referencia

5 de un adulto medio (IR: ingesta de referencia, VRN: valor de referencia de nutrientes).

Información nutricional	Análogo de carne (100 g)	IR (100 g)	VRN (100 g)
Valor energético	550 kJ	6.2 %	-
Grasas	2.8 g	3.5 %	-
- saturadas	0.2 g	1.8 %	-
Fibra alimentaria	6.7 g	-	-
Proteínas	25 g	40 %	-
Sal	1.2 g	21 %	-
Hierro	8 mg	-	54 %
Vitamina B12	2.5 µg	-	85 %
Fósforo	200 mg	-	29 %
Magnesio	80 mg	-	20 %
Zinc	2 mg	-	20 %

Ejemplo 3. Preparación de productos a base de micoproteínas y biomasa de microalgas

- 10 A partir del producto del ejemplo 1 se procedió a la preparación de diferentes productos alimenticios:
- “DELI-Burguer”: el producto se moldeó en forma de filetes previo a su congelación. Para prepararlo se frió en una sartén con unas gotas de aceite.
 - “DELI-Tiras”: el producto se moldeó en forma de tiras finas previamente a su congelación. Para elaborar el producto se salteraron las tiras en una sartén con aceite durante 5 minutos sin descongelar. Para su incorporación en guisos, se añadieron una vez cocinadas como último ingrediente antes de servir el guiso.
 - “DELI-Nuggets”: el producto se moldea antes de su congelación en forma de bolas aplastadas (Nuggets). Para la elaboración del producto se sumergieron los Nuggets en abundante aceite durante 4 minutos.

20 La **Figura 2B** muestra una fotografía del producto después de cocinarse.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Producto alimenticio análogo a la carne de origen animal que comprende micoproteínas y biomasa de una microalga, caracterizado por que las micoproteínas proceden del hongo *Fusarium venenatum* y la microalga se selecciona del grupo que consiste en *Chlorella vulgaris* y *Spirulina platensis*.
- 10 2. Producto alimenticio de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que la microalga es *Chlorella vulgaris*.
- 15 3. Producto alimenticio de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que comprende 60 – 90 % (p/p) de micoproteínas de *F. venenatum* y 5 – 15 % (p/p) de biomasa de *C. vulgaris*.
- 20 4. Producto alimenticio de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que además puede comprender un aglutinante y una o varias especies.
- 25 5. Producto alimenticio de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado por que el aglutinante es una proteína seleccionada entre albúmina de huevo o proteína de patata.
- 30 6. Producto alimenticio de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado por que las especies se seleccionan entre nuez moscada, ajo o negro y pimienta negra.
- 35 7. Producto alimenticio de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que comprende:
- 70 – 86 % p/p de micoproteína de *F. venenatum*
 8.5 – 12 % p/p de biomasa de *C. vulgaris*
 3 - 8 % v/p de agua
 1 – 5 % p/p aromas
 0.5 – 1.5 % p/p de proteína de patata
 0.5 – 1.5 % p/p de nuez moscada
 0.25 – 1.0 % p/p ajo negro y
 0.25 – 1.0 % p/p pimienta negra.

8. Producto alimenticio de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque además comprende proteína de soja, hongos filamentosos comestibles, gluten de trigo o hidratos de carbono.
- 5 9. Un procedimiento para la obtención de un producto alimenticio análogo a la carne de origen animal, caracterizado por que el proceso comprende las siguientes etapas:
- obtener biomasa de una microalga seleccionada del grupo que consiste en *Chlorella vulgaris* y *Spirulina platensis*;
 - cultivar el hongo filamentoso *Fusarium venenatum* en un biorreactor con flujo de aire en un medio que comprende glucosa, amonio, potasio, magnesio y fosfato;
 - obtener las micoproteínas;
 - mezclar las micoproteínas de la etapa c) con la biomasa de la microalga de la etapa a), un aglutinante y especias hasta obtener una pasta homogénea;
 - 10 cocinar la pasta homogénea con vapor;
 - dar forma a la pasta;
 - congelar el producto; y
 - almacener el producto congelado.
- 20 10. El procedimiento de la reivindicación 9, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:
- obtener biomasa seca de una microalga de *Chlorella vulgaris* a partir de su crecimiento en un recipiente cerrado;
 - cultivar el hongo filamentoso *Fusarium venenatum* en un biorreactor con flujo de aire en un medio que comprende 1.5 – 2.5 nM de glucosa, amonio, potasio, magnesio y fosfato a 28- 32 °C y pH 6-7;
 - 15 retirar la fracción sólida que contiene el hongo del cultivo;
 - incubar la fracción sólida a 67 – 72 °C durante 30 – 45 minutos;
 - separar el micelio fúngico para formar una pasta;
 - 25 concentración de la pasta
 - obtener las micoproteínas;
 - mezclar 70 – 86 % p/p de las micoproteínas de la etapa c) con 8.5 – 12 % de la biomasa de la microalga de la etapa a), un aglutinante seleccionado entre albúmina y proteína de patata, y especias hasta obtener una pasta homogénea;
 - 30 cocinar la pasta homogénea con vapor a 85 – 90 °C durante aproximadamente 30 minutos;
 - 35 enfriar la pasta después del cocinado a aproximadamente 20 °C;

- f. dar forma a la pasta;
- g. congelar el producto a -10 °C durante aproximadamente 30 minutos; y
- h. almacenar a aproximadamente – 18 °C al menos tres semanas.

- 5 11. Uso de biomasa de *Chlorella vulgaris* y micoproteínas de *Fusarium venenatum* en la fabricación de un producto alimenticio análogo a la carne de origen animal.
12. Uso de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizado por que el producto se usa como análogo de la carne de ave.
- 10 13. Uso de producto alimenticio de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, en la fabricación de un producto alimenticio análogo a la carne de origen animal.
- 15 14. Uso de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizado por que el producto se usa como análogo de la carne de ave.

FIG. 1

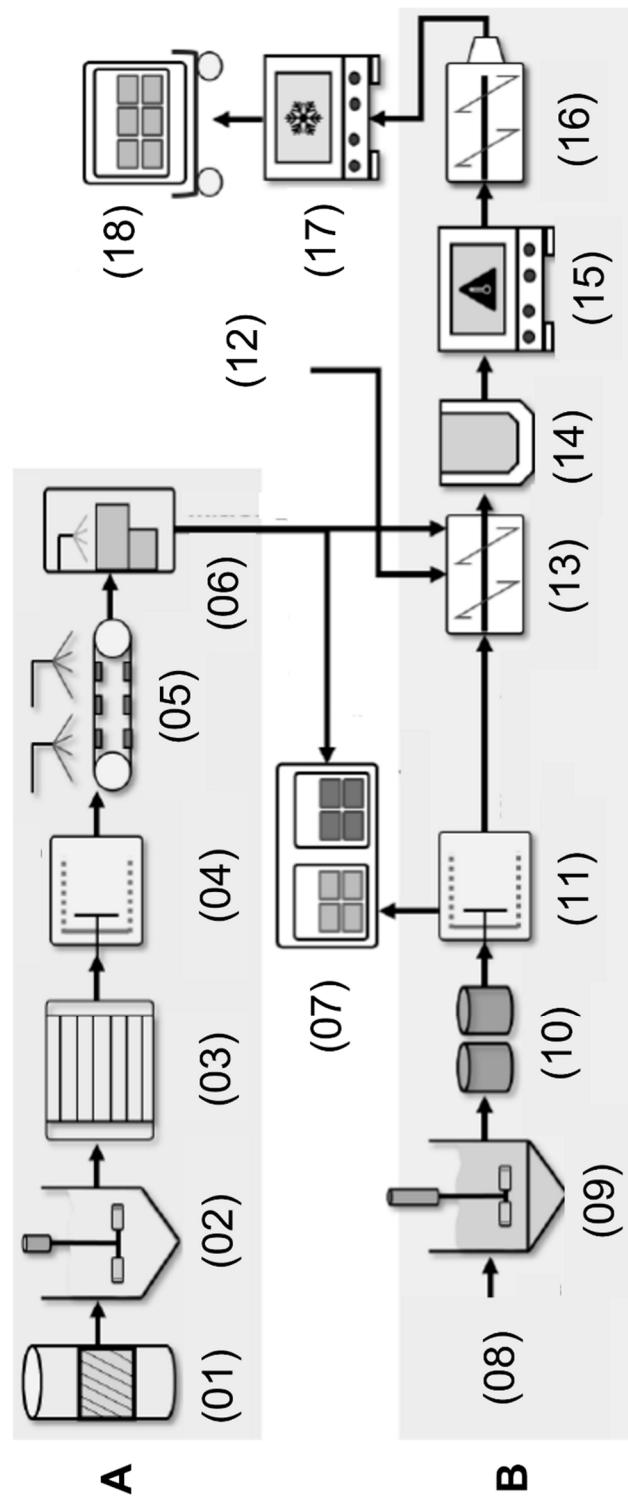


FIG. 2

A



B

