



Informe final Proyecto I+D y T

NUEVAS ESPECIES DE MICROORGANISMOS MARINOS PRODUCTORAS DE COMPUESTOS DE INTERÉS PARA LA ELABORACIÓN DE ALIMENTOS FUNCIONALES

Cliente: DECO, Programa Berriker

Contacto Neiker:
Sonia Castañón de la Torre
scdelatorre@neiker.eus

Contacto Cliente:
DECO

1. Equipo participante de NEIKER - Tecnalia

Participantes de NEIKER - Tecnalia

- + Jefe de Proyecto: Sonia Castañón de la Torre
- + Otros participantes: Sonia Suarez; Iratxe Urreta

Otras entidades participantes o colaboradoras: AZTI TECNALIA

2. Informe sobre las actividades más destacadas de la investigación en el proyecto y resultados obtenidos

Incluir en este apartado

- + Actividades más destacadas por objetivo
- + Otros resultados obtenidos (si es necesario)

Informe técnico

1. RESULTADOS

T1.1. Muestreo

Durante el periodo de marzo-junio se llevaron a cabo 4 muestreos independientes, localizados en Plentzia, Urdaibai y Pobeña. Durante estos nuevos muestreos se optimizaron algunos puntos del protocolo de aislamiento previamente establecido como la concentración inicial de antibióticos, la Tª de incubación de las muestras y la composición nutricional de los medios de cultivo.

T1.2. Aislamiento de colonias potenciales y caracterización morfológica

Durante los primeros días de co-cultivo en presencia de polen no fue posible detectar ninguna célula adosada al polen. Solamente tras 5-7 días de cultivo se pudo detectar la presencia de células móviles (zoosporas) y otras adosadas a los granos de polen en las muestras. La presencia de hongos y bacterias en las muestras requirió un aumento en las concentraciones de antibióticos, preferentemente de penicilina y estreptomycin que se aumentaron a 500 y 250 mg/L, respectivamente.

El mantenimiento de las muestras a 15°C durante el proceso de adhesión al polen también permitió minimizar la aparición de microorganismos no deseados, junto con el aumento de las concentraciones de antibióticos. El cultivo en estático fue más idóneo para el aislamiento.

El uso de nauplios, ya fueran congelados o eclosionados en el laboratorio, no resultó satisfactorio. Se produjo mayor presencia de bacterias y dificultades para la siembra de los nauplios al ser de un tamaño mucho mayor que los granos de polen.

Los granos de polen con células adosadas a su pared fueron transferidos a diferentes medios de cultivo suplementados con nistatina (10 mg/L), rifampicina (50 mg/L), penicilina (250 mg/L) y estreptomycin (150 mg/L), y se incubaron a temperatura ambiente hasta la aparición de colonias.

Las colonias presentes en los medios selectivos fueron transferidas a medio 790By+ fresco suplementado con antibióticos hasta la obtención de cultivos puros, libres de otros microorganismos. Finalmente, las cepas se analizaron al microscopio para ver su morfología celular y/o la presencia de zoosporas.

Se obtuvieron 14 cepas puras, de las que el 100% provinieron de muestras de tejido foliar. En general, predominó el aislamiento de cepas formadoras de colonias blancas, con un

solo representante con pigmentación anaranjada. Las colonias mostraron diferentes grados de adhesión al agar, con diferentes texturas (duras, rugosas, blandas, o mucilaginosas).

T1.3 Caracterización morfológica de los aislados:

En la Tabla 1 (ANEXO) se da una descripción general de aspectos importantes para la determinación taxonómica de las cepas.

Estas cepas, junto con las aisladas en el año 2012-2013 en la playa de La Arena de Muskiz, forman la colección de 24 cepas de Neiker.

T2.1. Propagación en medio sólido y conservación de las especies

Las cepas aisladas se mantuvieron en el medio base 790By⁺ suplementado con agar 1.2%. El subcultivo se realizó cada 20 días, y las cepas se incubaron a 22°C con fotoperiodo de día largo en condiciones de luz tenue. Para mantener las cepas a largo plazo se almacenaron a -80°C siguiendo el protocolo de criopreservación descrito por Cox et al. (2009)

T2.2. Producción de inóculos

Para determinar la capacidad de crecimiento en medio líquido de las cepas se lanzaron inóculos en el medio base (medio 790By⁺) que establece la ATCC para *Schizochytrium limacinum* SR21, la cepa modelo.

Tras una semana de cultivo, las cepas que generaron biomasa se subcultivaron al medio B y se cosecharon a los 4 días.

La Tabla 2 nos muestra, de forma cualitativa, la capacidad de cada cepa para generar biomasa en cada medio de cultivo empleado. Muchas de las cepas no fueron capaces de generar una biomasa suficiente y en muchos casos el paso a un medio más complejo y nutritivo no resultó beneficioso.

Tabla 2. Crecimiento de las cepas activadas en cada medio de cultivo utilizado. El crecimiento se describe de forma cualitativa con los símbolos -, +, ++, y +++. Las cepas MLA fueron aisladas previamente.

Cepas	Crecimiento Medio 790By+	Crecimiento Medio B	Cepas	Crecimiento Medio 790By+	Crecimiento Medio B
MLA1	+	++	TX 2.4	-	-
MLA2	+	+++	TX 2.7	-	-
MLA3	+	++	PI 6.2	-	-
MLA5	+	+++	Pob 1.3	-	-
MLA6	+	+++	Pob 1.1	+	+
MLA9	+	+++	Pob 2.1	-	-
MLA11	+	++	Pob 2.2	+	++
MLA12	-	-	Pob 2.4	+	++
MLA16	-	-	Pob 6.2	-	-
MLA17	+	-	B1.1	+	+
MLA18	+	-	B1.1Er1	+	+
TX 3.1	+	-	B1.1X1	+	+

T3.1 Caracterización bioquímica

Se pudo observar las cepas generaron lípidos entre un 19-39% del peso seco, siendo la cepa MLA2 la más oleogénica. El mayor contenido de carbohidratos lo mostraron las cepas MLA1 y MLA11, mientras que en proteínas los valores oscilaron entre el 19-33% del peso seco. Tabla 3. Caracterización proximal de la biomasa de algunas cepas aisladas.

El contenido de DHA y omega 3 varió considerablemente entre las cepas testadas, siendo las cepas MLA1, MLA9 y MLA11 las más productoras. Cabe destacar los bajos niveles de DHA de las cepas carotenogénicas (MLA2, MLA5 y MLA6), que por otro lado acumularon valores elevados de ácido oleico.

T3.2. Caracterización molecular

El análisis de las secuencias del gen 18S frente a la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda MD, 20894 USA) nos permitió asignar las cepas analizadas al grupo de los *thraustochytridos*. Todas las secuencias mostraron alta homología a secuencias pertenecientes a cepas de *Thraustochytridos* descritas por otros autores.

El árbol filogenético nos permitió identificar las cepas que se encontraban genéticamente más próximas entre sí (Figura 1). La cepa MLA3 formaba una línea diferenciada del resto, y las cepas propias también se diferenciaban de *Scenedesmus caparrensensis* que se incluyó como representante de un grupo taxonómico externo

Cepa	Lípidos (%PS)	Carbohidratos (% PS)	Proteínas (% PS)	Resto (%PS)	Contenido omega 3 (% AGT) DHA	DHA y total $\omega 3$
MLA 1	25.3 \pm 3.6	21.3 \pm 0.7	19	34.4	17	25,5
MLA 2	38.8 \pm 1.9	8.9 \pm 0.3	22	30.3	9,5	14,5
MLA 5	25.6 \pm 1.3	9.3 \pm 0.2	24	41.1	4	5.8
MLA 6	30.9 \pm 4	8 \pm 0.2	33	28.1	3	4
MLA 9	36.3 \pm 4.4	6.6 \pm 0.4	28	29.1	17	25
MLA 11	19.9 \pm 1.2	25.3 \pm 4.4	28	26.8	21	25.7

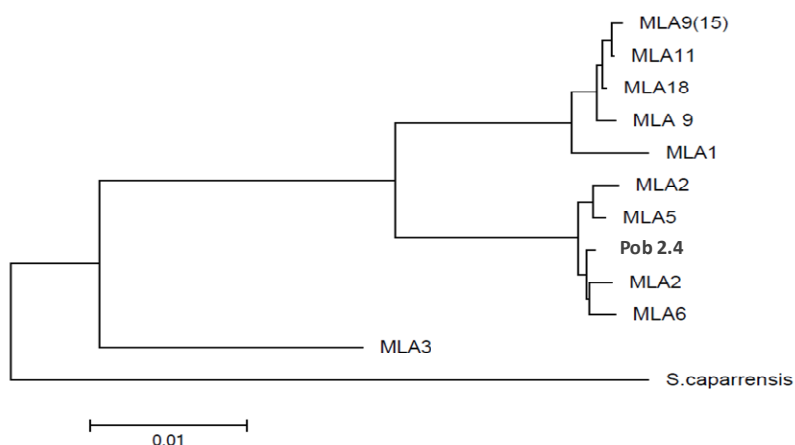


Figura 1. Análisis filogenético de algunas de las cepas seleccionadas, basado en la homología del gen 18S del RNA ribosómico. *S. caparrensensis* se incluye como grupo externo.

Entre el resto de las cepas se observaron dos bifurcaciones en las que se englobaron, por un lado, las que tienen pigmentos anaranjados (MLA2, 5, 6, Pob 2.4), y por otro lado las que no los tienen. La cepa MLA1 pareció distanciarse ligeramente de las cepas MLA9, 11 y 18.

En general, todas las diferencias o similitudes morfológicas se correlacionaban con los datos moleculares.

T2.3. Análisis de factores y condiciones de cultivo: cepa MLA9

A la vista de los resultados anteriores, se optó por elegir la cepa MLA9 para analizar el efecto de las condiciones de cultivo sobre el crecimiento y la producción de DHA. Por lo tanto, la cepa MLA9 se constituye en la cepa modelo de Neiker.

Los factores y condiciones de cultivo testados fueron los siguientes:

- Salinidad
- Concentración de la fuente de carbono
- Tipo de fuente de carbono
- Concentración de la fuente de nitrógeno
- Tipo de fuente de nitrógeno

Todos estos factores se testaron bajo unas condiciones de cultivo comunes y que se mantuvieron a lo largo de todos los ensayos. Éstos incluyeron la temperatura de cultivo (24°C), la agitación orbital (140 rpm), la OD₆₆₀ inicial del inóculo (0.5), el pH del medio (6 \pm 0.3) y la duración del proceso (168h). Los resultados obtenidos en este apartado referentes a la cepa

ML9 no se muestran en su totalidad porque forman parte de un artículo científico que se está elaborando en la actualidad. Se expone un breve resumen.

Uno de los factores que más afectan el escalado a nivel comercial lo representan las sales del medio ya que pueden ocasionar problemas de corrosión en los equipos de fermentación, sobre todo por la presencia de sales de potasio. Además, también suponen un incremento en el coste económico del medio de cultivo. Por esta razón, el primer factor a optimizar fue la salinidad. Se probaron diferentes concentraciones de sales Reef; 0, 4.5, 9, 18 y 36 g/L. La concentración más alta representa el 100% de la salinidad del agua marina. Exceptuando la salinidad más alta, se observó que a mayor salinidad, más rápidamente se consumía la fuente de carbono. La acumulación de lípidos se analizó a las 96h y 168h de cultivo. El contenido de DHA varió entre el 2-2.8% de la biomasa, aumentando con la salinidad. Respecto al perfil general de AG, destacaron el palmítico y el oleico.

Uno de los factores que más impacto puede ejercer sobre el crecimiento de un microorganismo es la concentración de nutrientes, entre los que destaca la fuente de carbono. La glucosa es la fuente de carbono más utilizada en el cultivo de *thraustochytrids*.

Por ello, se analizó el efecto de aumentar la concentración de glucosa del medio B de 15 g/L a 30, 40, 60 y 90 g/L. El crecimiento celular se vio beneficiado al aumentar la concentración de glucosa, sin embargo, las curvas de consumo de glucosa mostraron que a partir de 40 g/L el cultivo no era capaz de consumir toda la glucosa aportada, desperdiciando entre el 41-46% de la misma. Respecto al enriquecimiento del medio de cultivo, se pudo observar que duplicando el aporte nutricional, casi se duplicó la cantidad de biomasa a las 96h, y casi se triplicó al final del cultivo. La acumulación de DHA en la biomasa no se vio beneficiada por el aumento de la concentración de glucosa.

Además de la glucosa, existen otras fuentes de carbono que podrían abaratar el coste del medio (dextrosa, sacarosa), o suponer una fuente revalorizable (glicerol), o simplemente darnos una idea de la capacidad metabólica de nuestra cepa (maltosa, fructosa). Por estas razones, se analizó el efecto de las fuentes de carbono citadas a 15 g/L para compararlas con la glucosa. La cepa MLA9 fue capaz de crecer en presencia de dextrosa y glicerol. Sin embargo, no fue capaz de utilizar maltosa, fructosa, ni sacarosa.

El nitrógeno es un nutriente indispensable para la síntesis de proteínas, entre otras biomoléculas. En el cultivo de *thraustochytrids* el nitrógeno orgánico se aporta mediante extracto de levadura (YE) y/o peptona (P). En este apartado se analizaron diferentes condiciones:

- (1) el efecto de cada compuesto por separado (YE:P)
- (2) el efecto de la concentración de ambos compuestos. Testamos concentraciones en el rango de 2, 4, 6, 8, y 10 g/L de YE y P (ambos). De esta manera podemos determinar el efecto del ratio C/N sobre los parámetros del cultivo

En el primer ensayo se pudo determinar que tanto el YE como la P por separado permitían obtener aproximadamente 6 g/L de biomasa, mientras que en combinación duplicaban el peso seco.

La observación microscópica reveló que el aumento de nitrógeno producía un deterioro en la morfología celular con presencia de rotura celular, células más desprovistas de glóbulos lipídicos, así como presencia de una matriz extracelular

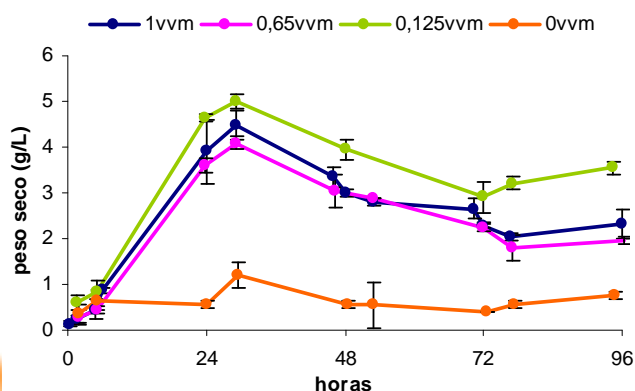
T4.1. Producción de biomasa en bioreactores

El empleo de bioreactores nos permite no solo aumentar el volumen de cultivo, y por tanto el del producto de interés, sino también controlar y monitorizar los parámetros de cultivo más importantes como el pH, la agitación, la temperatura o la aireación. Además, estos equipos nos permiten obtener lotes homogéneos del producto gracias a la reproducibilidad que ofrecen.

En el caso de la cepa MLA9, la aireación es un parámetro importante a testar ya que en *erlenmeyers* no es posible controlarla, y puede ser determinante en el metabolismo celular.

Por ello, se testaron 4 condiciones de aireación, partiendo de 1vvm (volumen de aire/vol de medio/ minuto), lo que equivaldría a 2Lpm (litros de aire por minuto), hasta 0.65, 0.125 y 0 vvm.

El cultivo mostró un patrón de crecimiento similar en todas las condiciones analizadas, excepto en ausencia de aireación.



Evolución temporal de la producción de biomasa de la cepa MLA9 bajo diferentes condiciones de aireación.

La visualización de las células al microscopio mostró que éstas sufrían un proceso de lisis celular a partir de las 48h y hasta el final de cultivo. La monitorización de los parámetros del reactor nos mostró que durante la primera fase de crecimiento activo, los cultivos consumían por completo el oxígeno del medio hasta las 32h, momento en el que la pO_2 aumentaba hasta valores iniciales, evidenciando que el cultivo no estaba consumiendo oxígeno. A este respecto, cabe destacar que los cultivos no consumieron la fuente de carbono en ninguno de los casos. Ren y col. (2010) indican que a mayor aireación mayor es el pH del cultivo, aunque en nuestros ensayos el pH ha mostrado la misma tendencia cada vez. Por lo tanto, la aireación no parece ser la responsable de que los cultivos sufran un proceso de lisis celular a las 48h.

Teniendo en cuenta estos resultados, se optó por optimizar el proceso fijando el pH a 7 cuando éste alcanzara ese valor, para determinar si el pH estaba siendo negativo para el cultivo. Se utilizó la aireación más baja y se suministró mediante microsparguer. El medio se sustituyó por el medio B, con menor aporte de nutrientes para observar antes los cambios.

El cultivo no solo sobrevivió a las 48h sino que se alargó a las 168h igual que en condiciones de erlenmeyer (flask). EL pH subió hasta 7 en 24h, momento en el que se fijó el parámetro en el equipo. Además de consumir la glucosa de forma similar, el cultivo también generó una biomasa parecida que no sufrió ningún proceso de lisis celular.

Para el desarrollo de matrices alimentarias enriquecidas en omega-3 (DHA) se utilizó biomasa rica en lípidos de *Schizochytrium limacinum* SR21, ante la imposibilidad de obtener suficiente biomasa de la cepa MLA9.

T5.1. Caracterización de compuestos de interés agroalimentario

Los *thraustochytridos* han sido descritos como fuente de diferentes compuestos de interés, entre los que cabe destacar pigmentos antioxidantes, esteroides, EPS (Extracellular Polymeric Substances) o enzimas extracelulares.

La presencia de cepas de color anaranjado en la colección nos indica la posibilidad de que éstas produzcan algún tipo de pigmento. Tras extraer los pigmentos mediante la técnica de fluidos supercríticos, los extractos se caracterizaron por HPLC-MS.

Debido a su modo de alimentación saprofitica, los *thraustochytridos* han sido descritos como productores de una amplia batería de enzimas que degradan la materia orgánica. La detección cualitativa de estas enzimas se puede hacer de forma rápida y sencilla mediante el cultivo de los microorganismos de interés en medio sólido suplementado con un sustrato específico para cada enzima.

En esta tarea se analizó la presencia de 4 tipos de enzimas; proteasas, lipasas, celulasas y amilasas.

En la Tabla se muestran los resultados obtenidos del cribado de gran parte de la colección. La presencia de proteasas fue la más extendida (81% de las cepas), seguida de amilasas (44%), lipasas (31%) y celulasas (31%). Cabe destacar que las cepas de color

anaranjado mostraron la presencia de las 4 enzimas mientras que el 12.5% de las cepas no mostró ninguna actividad enzimática. Curiosamente, solo las cepas anaranjadas mostraron actividad lipasa.

Tabla. Detección de actividades enzimáticas entre las cepas de la colección de Neiker. (+), presencia; (-) ausencia.

Cepa	Proteasa	Lipasa	Amilasa	Celulasa
MLA1	+	-	-	-
MLA2	+	+	+	+
MLA6	+	+	+	+
Pob 2.2	-	-	-	-
Pob 1.1	-	-	-	-
B1-1X1	+	-	-	+
MLA9	+	-	+	-
MLA17	+	-	+	-
MLA11	-	-	-	-
Pob 6.2	+	-	-	-
B1-1	+	-	-	-
MLA3	+	+	+	-
MLA5	+	+	+	+
Pob 2.4	+	+	+	+
TX 3.1	+	-	-	-
B1-1Er1	+	-	-	-

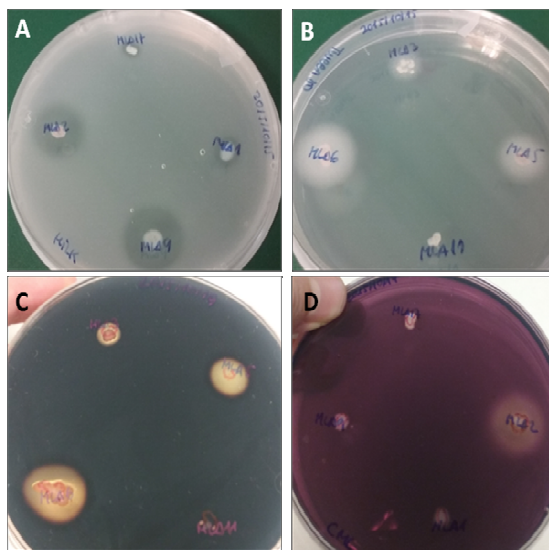


Figura. Detección de las actividades enzimáticas mediante la aparición de halos de degradación. A, proteasa; B, lipasa; C, amilasa; y D, celulasa. En B y C, la cepa MLA11 es negativa. En D, las cepas MLA7, MLA1 y MLA9 también son negativas.

T6. Valoración nutricional de los extractos de microalgas producidos por NEIKER

Se realizó la valoración nutricional de los diferentes lotes de microalgas producidos por NEIKER. De esta forma será posible estimar el potencial de la biomasa producida, como ingrediente para incorporarse en la formulación de prototipos alimentarios con objeto de conseguir una alegación de salud de acuerdo a la legislación vigente sobre alimentos con propiedades nutricionales y de salud (CE 1924/2006).

En la tabla 1 se presentan los resultados del perfil lipídico para los lotes de microalgas Batch 1, Batch 2 y Batch 3.

Tabla: Perfil lipídico de las biomásas de microalgas. Los resultados se expresan en % respecto al peso seco.

FAME	BATCH 1	BATCH 2	BATCH 3
C14:0	0,97	0,76	0,69
C15:0	0,48	0,29	0,73
C16:0 Palmítico	14,25	9,58	9,02
C17:0	0,28	0,18	0,37
C18:0	0,58	0,43	0,47
C20:0	-	-	0,27
C23:0	0,18	0,14	
C22:2 cis	0,21	0,17	0,17
C20:5	0,17	0,15	0,19
C22:6 DHA	13,32	9,05	8,49

Los resultados muestran que el Batch 1 presenta el mejor perfil lipídico ya que es el que contiene los niveles más altos de omega 3: EPA (C20:5) y DHA (C22:6) en un total de 13,49%.

En la tabla 2, se muestra el contenido lipídico de las muestras relativas a los batch 6, 7 y 8:

Tabla 2: Contenido lipídico de las muestras relativas a los batch 6, 7 y 8:

Batch Nº	Lípidos (%PS)	desviación	Error
6	40,37	2,20	1,27
7	40,58	7,28	4,20
8	41,78	4,17	2,41

Teniendo en cuenta el perfil lipídico obtenido para los batches 6, 7 y 8 de biomasa de microalgas, podemos estimar el aporte de DHA y omega 3 total por gramo de biomasa empleado como ingrediente para formular alimentos (ver Tabla 3).

La adición de 1 gramo de microalga aportaría el siguiente contenido en DHA según lotes.

Tabla 3: Contenido en DHA y omega3 total en 1g de biomasa relativas a los batch 6, 7 y 8:

Batch Nº	% grasa total	DHA(g)	Omega 3 total(g)
6	0,4037	0,1332	0,1349
7	0,4058	0,905	0,092
8	0,4178	0,849	0,0868

Por tanto, un aporte de 1g de biomasa permitiría la alegaciones nutricional “**Alto contenido de Omega 3**” en todos los lotes. Según el tratamiento térmico y degradación por procesado en cada prototipo habría que considerar las kcal totales del nuevo prototipo y la degradación térmica de los Omega 3 (EPA y DHA). Esto podría suponer una reducción que dejaría margen para la declaración “Fuente de Omega 3”.

Además, permitiría alegaciones de salud relacionadas con el contenido en DHA como: “**contribuyen al funcionamiento normal del corazón**”, contribuye a mantener el funcionamiento normal del cerebro” y “contribuye al mantenimiento de la visión en condiciones normales”.

T6.1. Estudio del comportamiento tecnológico y culinario de la harina de microorganismo marino autóctono seleccionado y/o sus lípidos de interés

A partir de la caracterización de los compuestos bioactivos de las cepas aisladas, principalmente del perfil lipídico obtenido en la tarea anterior, se ha seleccionado la cepa que presentó el perfil lipídico y características más adecuadas para su aplicación en una matriz alimentaria.

Se ha estudiado el comportamiento del ingrediente de microalgas según diferentes condiciones o modelos alimentarios (agua, leche y zumo) que permitan su uso en prototipos alimentarios en la siguiente tarea 6.2.

1 Estudio en agua

Se ha estudiado el comportamiento de la harina de alga seleccionada en agua. Se ha trabajado en tres concentraciones (0.66%, 1% y 2%) y el mezclado se ha llevado a cabo de forma manual con cuchara o con túrmix.

En las Figuras 1 y 2 se puede apreciar la disolución parcial de la harina de alga.



Figura 1: Mezcla de harina de microalga con agua de forma manual a diferentes concentraciones.



Figura 2: Mezcla de harina de microalga con agua empleando túrmix a diferentes concentraciones.

Los resultados muestran que es necesaria una agitación fuerte como el túrmix para conseguir la disolución de la harina de alga en agua. Mediante el mezclado manual con cuchara no se consigue la disolución de la harina (ver tablas 4 y 5) quedan restos sólidos como se aprecia en las imágenes (Figura 1 y 2). Con ambos tipos de mezclado la disolución que se obtiene es turbia. Se obtiene un caldo con aroma de mar, con notas que recuerdan a un caldo "Dashi"

Tabla 4: Análisis organoléptico de la mezcla de harina de alga en diferentes concentraciones y disolución manual (cuchara)

1g de alga	Manual (cuchara)		
Agua (mL)	50	100	150
aspecto	Turbio. no disolvió alga en agua	Turbio. no disolvió alga en agua	Turbio. no disolvió alga en agua
olor	caldo de "Dashi en polvo"	aroma de mar	aroma de mar menos intenso
sabor	agua de mar sin salado	agua de mar sin salado	agua de mar sin salado menos intenso
textura	agua	agua	Agua

Tabla 5: Análisis organoléptico de la mezcla de harina de alga en diferentes concentraciones y disolución con túrmix

1g de alga	Túrmix		
Agua (mL)	50	100	150
aspecto	Marrón amarillo. Turbio. disolvió alga en agua	Beige. Turbio. disolvió alga en agua	Beige suave. Turbio. disolvió alga en agua
olor	caldo de "Dashi en polvo"	aroma de mar	aroma de mar menos intenso
sabor	Caldo de dashi sin salado	Caldo de ostras o mejillones sin salado	Caldo de alga nori sin salado menos intenso
textura	agua	agua	Agua

2. Estudio en matriz láctea

Tras las primeras pruebas realizadas en agua, se ha estudiado el comportamiento de la harina de alga seleccionada en leche entera. Se ha trabajado en tres concentraciones (0.66%, 1% y 2%) y se ha llevado a cabo el mezclado con túrmix junto con calentamiento para favorecer la disolución.

En la Figura 3 se puede apreciar la disolución de la harina de alga en leche y el color obtenido.

**Figura 3:** Mezcla de harina de microalga con leche a diferentes concentraciones.

Los resultados muestran que la adición de harina de alga en la leche cambia sustancialmente el sabor original de la leche. Se aprecian notas de calabacín por lo que puede ser una aplicación muy interesante para trabajar en un prototipo de crema de calabacín. Asimismo, se observa un ligero cambio en el color y sin cambios en la textura (ver tabla 6).

Tabla 6: Análisis organoléptico de la mezcla de harina de alga con leche empleando túrmix y calentamiento a diferentes concentraciones

1g de leche	Túrmix y calentamiento		
Leche (mL)	50	100	150
aspecto	Beige muy suave	leche condensado	leche
olor	Sandia verde. Pate de atún.	leche con calabacín cocido	leche con calabacín cocido
sabor	leche con calabacín cocido un poco salado	leche con calabacín cocido un poco salado menos intenso que respecto a 50g	leche con calabacín cocido un poco salado menos intenso que respecto a 100g
textura	leche	leche	Leche

3. Estudio en medio ácido (zumo)

Se ha estudiado el comportamiento de la harina de alga seleccionada en un medio ácido como el zumo de naranja. Se ha trabajado en dos niveles de concentración (1% y 2%) y se ha llevado a cabo el mezclado con túrmix. Se ha estudiado la aplicación de calor para valorar cómo afecta a la disolución de las algas y a la textura del producto final.

En la Figura 4 se puede apreciar la disolución de la harina de alga en zumo de naranja después del mezclado con túrmix con y sin aplicación de calor.

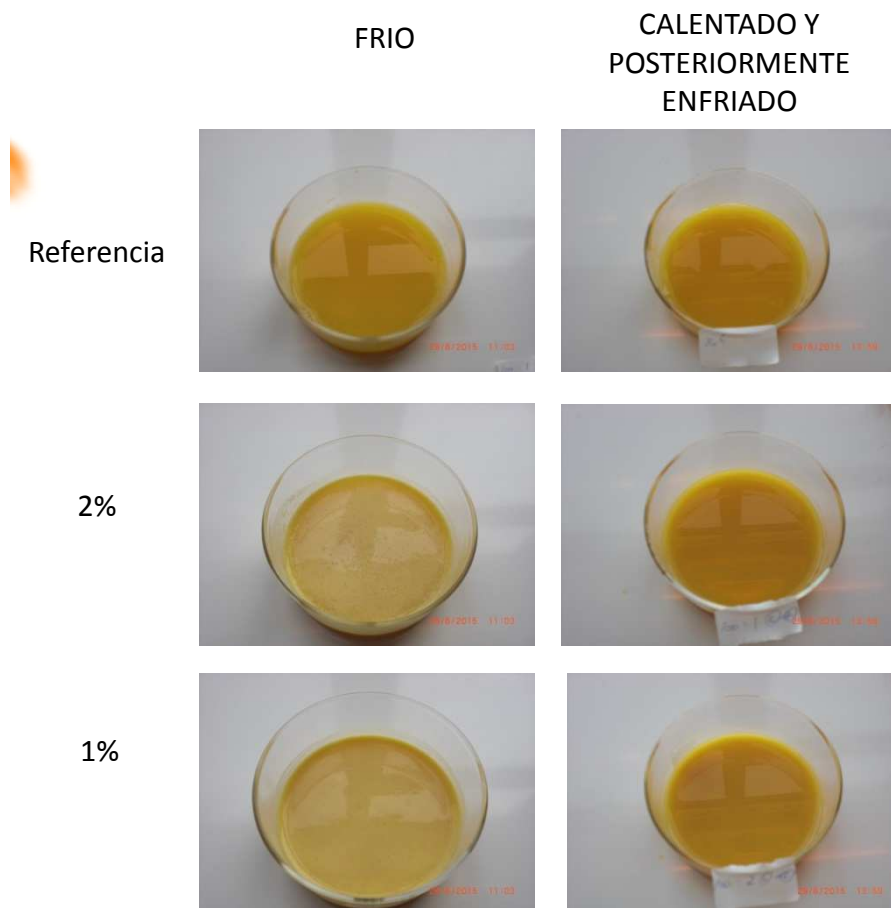


Figura 4: Mezcla de harina de microalga con zumo de naranja a dos concentraciones (1% y 2%) junto con la referencia sin alga añadida.

Los resultados muestran que el calentamiento favorece la disolución del alga dando un color al zumo similar al de referencia, mientras que en el prototipo que no lleva aplicación de calor se observa un color más blanquecino (Figura 4). Por otro lado, la aplicación de calor favorece la aparición de sabores no deseados a mar en el zumo de naranja. Por tanto, se establece una dosis máxima de microalga en zumo de naranja del 1% para no alterar el sabor y no comprometer el aspecto final.

Tabla 7: Análisis organoléptico de la mezcla de harina de alga con zumo de naranja empleando túrmix sin calentamiento a diferentes concentraciones

frio	Referencia	1%	2%
aspecto	zumo de naranja	Está nublado a más color blanco	Está nublado a color blanco
olor	zumo de naranja	zumo de naranja	zumo de naranja
textura	zumo de naranja	un poco más viscoso que zumo de naranja	más viscoso que zumo de naranja
sabor	zumo de naranja	zumo de naranja	zumo de naranja

Tabla 8: Análisis organoléptico de la mezcla de harina de alga con zumo de naranja empleando túrmix y calentamiento a diferentes concentraciones

calentado	Referencia	1%	2%
aspecto	zumo de naranja	muy ligeramente nublado a color blanco	ligeramente nublado a color blanco
olor	zumo de naranja	zumo de naranja	muy ligeramente tiene olor de ostras
textura	zumo de naranja	un poco más viscoso que zumo de naranja	mas viscoso que zumo de naranja
sabor	zumo de naranja	Principio zumo de naranja. Luego al final se nota algo de mar	Se nota ya algo de mar. Se queda sabor de alga.

T6.2: Diseño de prototipos novedosos y saludables

Una vez realizada la caracterización de la biomasa de microalgas a nivel tecnológico y culinario, teniendo en cuenta el comportamiento en los diferentes modelos alimentarios testados en la tarea anterior, se ha trabajado en un prototipo a escala cocina: pan con microalgas

Se ha trabajado en la formulación que incorpora la harina de microalgas a tres niveles de concentración (5, 7 y 11%). Se ha empleado la Thermomix para el mezclado y amasado de los ingredientes y se ha llevado a cabo una doble fermentación y posterior horneado.

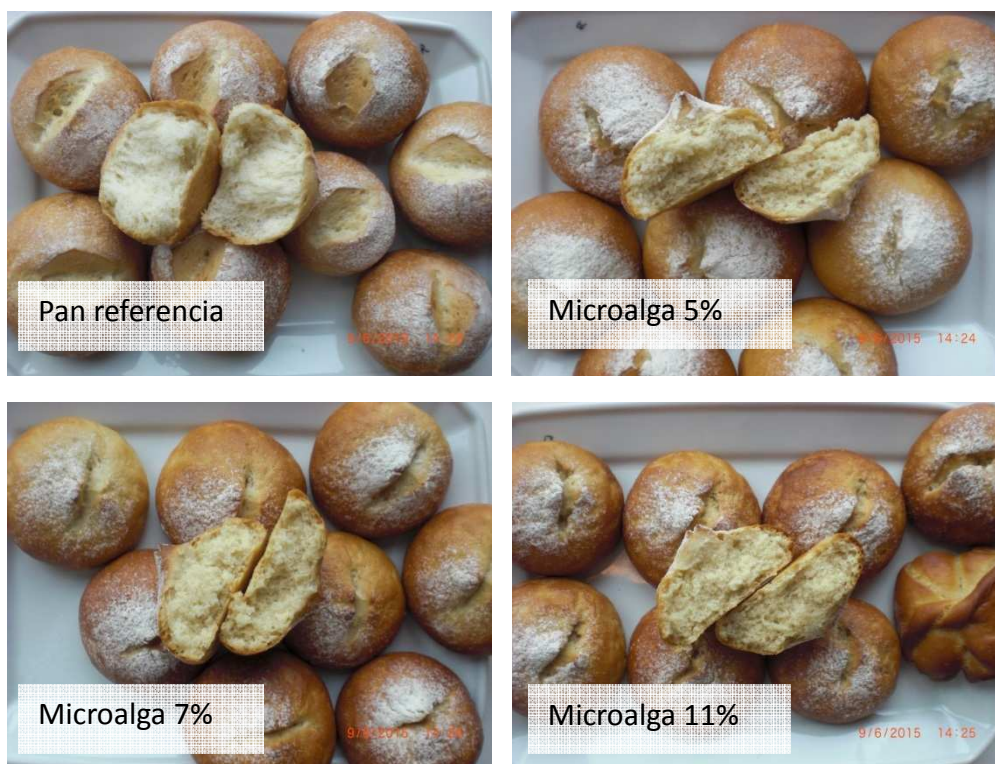


Figura 5: Prototipos de panes con harina de microalga a tres niveles de concentración (5, 7 y 11%) junto con la referencia sin alga añadida.

Se ha llevado a cabo un estudio sensorial con un panel entrenado de catadores de pan. Los resultados muestran que los panes que incorporan harina de microalga en su formulación tienen un color más oscuro y la masa se hincha menos tras el horneado comparándolo con el pan de referencia sin algas (Figura 5). Además, se percibe el sabor de las algas con los tres niveles de concentración de microalgas. Por lo tanto, la adición de microalgas al pan altera considerablemente las características sensoriales del producto de partida.

3. CONCLUSIONES

Como conclusiones generales del proyecto podemos destacar las siguientes:

1. La técnica del “polen baiting” nos ha permitido aislar microorganismos pertenecientes a la familia *Thraustochytridae* de zonas costeras del País Vasco. La obtención de una colección de cepas propias nos sirve de material de partida para realizar un cribado de moléculas o compuestos que puedan resultar interesantes para la industria alimentaria vasca.
2. El análisis de las condiciones de cultivo realizado con cepa MLA9 nos ha permitido obtener información útil para optimizar el proceso de producción de omega 3 (DHA).
 - 2.1. Es posible bajar la salinidad del medio de cultivo de al 25% de la salinidad del agua de mar. Bajo estas condiciones el DHA representa entre el 2.4-2.7% de la biomasa.
 - 2.2 La sustitución de las sales Reef por sulfato sódico permite cultivar la cepa MLA9 sin pérdida de biomasa y aumentando ligeramente los valores de DHA al 2.5-2.8%.
 - 2.3. El aumento de la concentración de glucosa en el medio no supone una mejora en la capacidad de la cepa para acumular DHA. Por lo tanto el uso de medios menos nutritivos resulta más idóneo para acumular DHA y más barato para el cultivo.
 - 2.4. La cepa MLA9 es capaz de utilizar glucosa, dextrosa y glicerol para crecer, pero no lo hace en presencia de fructosa, sacarosa, ni maltosa. A pesar de no obtener los mismos valores de DHA que con la glucosa, la capacidad de la cepa para crecer en glicerol la hace idónea para la revalorización de este compuesto proveniente de procesos de elaboración de biodiesel. El cultivo con glicerol permite acumular el 1.15% de DHA en la biomasa.
 - 2.5. El uso combinado del extracto de levadura y la peptona permite obtener valores de biomasa superiores, pero cuando se usan por separado la capacidad de la cepa para acumular lípidos es superior. Además, el extracto de levadura es el que aporta más capacidad de producción de DHA.
 - 2.6. El aumento de la concentración de nitrógeno con una concentración fija de glucosa disminuye la capacidad de la cepa para acumular DHA, y lípidos.
 - 2.7. La cepa es capaz de crecer en presencia de CSL, una fuente alternativa y barata de nitrógeno orgánico. El DHA 2 veces superior en el caso de la concentración más alta testada, respecto a su homólogo con extracto de levadura y peptona.
 - 2.8. La aireación del cultivo provoca un aumento del pH del medio que parece provocar lisis celular.
 - 2.9. El control del pH a las 24h a 7 unidades en el escalado es importante para evitar la lisis celular.
 - 2.10. Es posible escalar el cultivo a 2L obteniendo una producción de biomasa similar a la de erlenmeyer en agitación orbital.
3. El análisis preliminar realizado sobre las cepas aisladas revela la presencia de pigmentos con potencial antioxidante y proteasas, lipasas, amilasas y celulasas extracelulares.
4. Las microalgas obtenidas presentan un perfil lipídico muy interesante en cuanto a su contenido en DHA y EPA, y por tanto resulta un ingrediente de posible aplicación alimentaria, con alegación nutricional “Fuente de Omega 3”. Y alegaciones de salud relacionadas con el contenido en DHA como: “contribuyen al funcionamiento normal del corazón”, contribuye a mantener el funcionamiento normal del cerebro” y “contribuye al mantenimiento de la visión en condiciones normales”.
5. En la caracterización culinaria de las harinas, se ha observado que;
 - 5.1. Para disolver este ingrediente en base acuosa sería necesario el empleo de un equipo de agitación mecánica debido principalmente a su baja disolución. En este tipo de matrices genera desde un punto de vista sensorial, aromas de mar, con notas que recuerdan a caldo “Dashi”.
 - 5.2. La adición de harina de alga en matriz láctea, necesita además de la agitación la aplicación de calor para la completa disolución. En cuanto a la aplicación sensorial la matriz láctea cambia sustancialmente de su sabor original y se aprecian notas de calabacín.
 - 5.3. La disolución del alga en matrices vegetales del tipo zumos de frutas, necesita además de la agitación la aplicación de calor para la completa disolución. En referencia al sensorialidad, con dosis de un 1% no se aprecian cambios de coloración ni de textura en la matriz.
6. Las aplicaciones alimentarias están restringidas por la legislación vigente, siendo necesario tramitar un dossier Novel Food a la EFSA para su uso alimentario. Las pruebas realizadas de caracterización nutricional y culinaria, muestran un potencial interesante como

ingrediente en alimentación. Una de las aplicaciones testadas referidas en masa panaria (autorizada para otras especies de microlagas) puede tener un potencial desde el punto de vista de innovación alimentaria.

3. Información científica generada

El trabajo que se presenta contiene información científica relevante que dará lugar a dos publicaciones internacionales que se están elaborando en la actualidad.

1. Effect of salinity on growth and DHA production of a new thraustochytrid-like microorganism isolated from the Basque Country coast
2. Effect of culture conditions on DHA production of *Thraustochytrium* sp. isolated from a Basque marshland

4. Actividades de formación y transferencia realizadas

No se han realizado

5. Desviaciones con respecto a la memoria del proyecto

No procede