

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 248**

51 Int. Cl.:

A23L 1/221 (2006.01)

A23L 1/222 (2006.01)

A23L 1/235 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2010 E 10734822 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 2448430**

54 Título: **Producción de aromas naturales de trufa a partir de micelio de trufa**

30 Prioridad:

03.07.2009 CH 10402009

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

18.06.2015

73 Titular/es:

SPLIVALLO, RICHARD (50.0%)

Av. de Senaleche 9

1009 Pully, CH y

MAIER, CHRISTOPHE (50.0%)

72 Inventor/es:

SPLIVALLO, RICHARD y

MAIER, CHRISTOPHE

74 Agente/Representante:

ZUAZO ARALUZE, Alexander

ES 2 538 248 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).

PRODUCCIÓN DE AROMAS NATURALES DE TRUFA A PARTIR DE MICELIO DE TRUFA**DESCRIPCIÓN****5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de aromas naturales de trufa (*Tuber ssp.*) a partir de micelio de trufa en cultivo, así como al uso de al menos un precursor de aroma para inducir la producción de compuestos volátiles del aroma natural de los cuerpos fructíferos de trufas (*Tuber ssp.*) a partir de micelio de trufa en cultivo.

Descripción de la técnica anterior

La trufa, (género: *Tuber*, familia: tuberáceas, orden pezizales) es un hongo ascomiceto que forma simbiosis (ectomicorrizas) con robles, hayas, avellanos, etc. Entre las 60 especies existentes, únicamente algunas se valoran por sus aromas y sus sabores, entre ellas *Tuber melanosporum* (trufa negra de Périgord), *Tuber magnatum* (trufa blanca del Piamonte), *Tuber aestivum* (trufa de verano), *Tuber brumale* (una trufa negra), *Tuber borchii* (o trufa blanca italiana). La producción mundial no deja de disminuir: aproximadamente 1000 toneladas al año a comienzos de siglo pero únicamente de 80 a 150 toneladas al año actualmente. Desde hace más de 50 años, el ser humano ha plantado árboles cuyas raíces se ven infectadas por la trufa. Menos del 5% de los árboles producen trufas, y esto generalmente sólo tras 5-10 años, ya que aún se conoce muy poco sobre la biología de los hongos.

El buqué aromático de las trufas contiene aproximadamente 50 moléculas, generalmente hidrocarburos que contienen grupos alcohol, cetona, aldehído, éster y átomos de azufre. Diferentes especies de trufas tienen un olor diferente ya que producen determinados compuestos volátiles específicos para la especie. No obstante, determinadas moléculas son comunes a todas las trufas pero cada especie las produce en proporciones muy específicas. Considerándolas por separado, ninguna de estas moléculas tiene olor a trufa, pero una vez combinadas en las proporciones exactas reproducen el aroma de trufa.

Actualmente, el aroma de trufa se obtiene o bien a partir de cuerpos fructíferos de trufas cuyas moléculas aromáticas se atrapan en un soporte sólido (por ejemplo, arroz, determinados quesos o *foie gras*) o líquido (aceites, cremas) mediante extracción o maceración, o bien a partir de aroma sintético de trufa esencialmente compuesto por sulfuro de dimetilo y por 2-metilbutanal según la solicitud de patente francesa FR 86 10871 A1 (Delmas, Institut National Polytechnique de Toulouse) o la patente italiana IT 1215936B (SENTOSA S.A.S MILANO) que describe el uso de los dos compuestos sintéticos sulfuro de dimetilo y metil etil cetona (también denominada 2-butanona) para reproducir el aroma de trufa negra.

El uso de compuestos químicos en proporciones muy precisas que describen las patentes francesa e italiana mencionadas anteriormente no permite, según la legislación europea, usar para los productos así obtenidos la denominación "aroma natural de trufa". Ahora bien, la invención descrita a continuación permite precisamente obtener un "aroma natural de trufa negra o blanca", ya que las moléculas aromáticas se producen directamente mediante el micelio de trufa.

Por otro lado, desde el descubrimiento del aroma sintético de la trufa, numerosos expertos internacionales están de acuerdo con el hecho de que el aroma sintético está lejos de presentar la complejidad y los matices del aroma natural de la trufa, simplemente por el hecho de que el aroma sintético sólo contiene algunas moléculas (de 2 a 5 en total) en comparación con un aroma natural de trufa que contiene muchos más compuestos volátiles (más de una veintena). Por otro lado, el coste de producción del aroma natural de la trufa está aumentando constantemente debido a la disminución de la producción de cuerpos fructíferos a nivel mundial (Fauconnet y Delher 1998; Hall y Yun 2001).

Por otro lado, los análisis de aromas realizados hasta ahora con el micelio de trufa (trufa blanca italiana *Tuber borchii*) han demostrado que aunque el micelio produce de manera espontánea numerosas moléculas aromáticas, éstas no reproducen ni la complejidad aromática ni el buqué de las trufas frescas (Tirillini *et al.*, 2000; Splivallo *et al.*, 2007). Además la empresa americana Truffles International que cultiva micelio de trufa negra en cultivos hidropónicos reconoce que el sabor y el aroma de sus productos son claramente diferentes de los de los cuerpos fructíferos de trufas, esencialmente debido a una concentración muy baja de compuestos azufrados (Fields, 2007; y véase también el sitio web de la empresa "Truffles International" http://www.trufflesinternational.com/truffle_science.html).

Con respecto a esto, debe destacarse que los medios de cultivo usados actualmente para cultivar el micelio de trufa contienen bajas concentraciones de aminoácidos (trazas), ya que estos medios de cultivo proceden a su vez de materia vegetal (por ejemplo, el extracto de patatas "potato dextrose broth" (caldo de dextrosa de patata) usado por Splivallo *et al.*, "Discrimination of truffle fruiting body versus mycelial aromas by stir bar sorptive extraction", *Phytochemistry* (Ámsterdam) oct. de 2007, vol. 6668, n.º 20, págs. 2584-2598). En efecto, los aminoácidos se usan con frecuencia en microbiología para favorecer el crecimiento de microorganismos. En el caso del micelio de trufa,

esta baja concentración de aminoácidos (trazas) no es suficiente para inducir la producción de productos volátiles clave del aroma de trufa.

5 El documento JP 2005295858 también aconseja el uso de aminoácidos con el fin de favorecer la nutrición nitrogenada del micelio de trufa negra y favorecer su crecimiento. No obstante, los autores de este documento admiten que el micelio así obtenido no reproduce en absoluto el olor de trufa, y recomiendan incluso secar el micelio así obtenido con el fin de hacer que el producto sea comercializable (lo cual destruye ciertamente cualquier molécula volátil).

10 En resumen, la presente invención permite inducir la producción de compuestos volátiles (compuestos azufrados y otros compuestos clave) de manera dirigida con el fin de obtener un buqué aromático característico del aroma natural de los cuerpos fructíferos de trufas.

15 Se desprende que la presente invención también responde a una necesidad del mercado con respecto a los consumidores de productos de trufas y con aroma de trufa no satisfechos con los productos a base de aromas sintéticos y que no desean gastar una fortuna para adquirir productos a base de aromas naturales. Por otro lado, la presente invención también permite eliminar todas las limitaciones concretamente ecológicas asociadas con la sobreexplotación de los cuerpos fructíferos en la naturaleza.

20 Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de aromas naturales de trufa (*Tuber ssp.*) a partir de micelio de trufa en cultivo, que comprende al menos un precursor de aroma añadido al medio de cultivo de dicho micelio de trufa, confiriéndole así las características aromáticas de los cuerpos fructíferos de trufas y en el que dicho precursor de aroma se selecciona de los aminoácidos naturales o sintéticos de la L-metionina, la leucina, la isoleucina, la valina, la fenilalanina y/o sus mezclas, sus precursores y/o sus productos de degradación y en el que dicho precursor de aroma añadido al medio de cultivo de dicho micelio de trufa está presente en un gran exceso superior o igual a 10 mM.

30 La invención también se refiere al uso de al menos un precursor de aroma para inducir la producción de compuestos volátiles del aroma natural de los cuerpos fructíferos de trufas (*Tuber ssp.*) a partir de micelio de trufa en cultivo.

Tal como demuestran los resultados experimentales obtenidos (véanse los ejemplos 1 y 2), el extracto de malta tal como se describe en Splivallo *et al.* (2007) contiene, por ejemplo, concentraciones naturales de aminoácidos de 130 a 400 veces inferiores a las concentraciones usadas en la presente invención para inducir los aromas clave de la trufa (para las concentraciones naturales de aminoácidos en extracto de malta véase la página 1648 de la publicación de Flückiger-Isler *et al.*, 1993, The Journal of Nutrition).

40 La presente invención se refiere al uso de aminoácidos específicos en un gran exceso, no para inducir el crecimiento del micelio ya que a una concentración muy alta los aminoácidos pueden tener un efecto inhibitorio sobre el crecimiento del micelio, sino por el contrario para estimular de manera inesperada y específica la producción de compuestos clave del aroma de trufa.

45 Breve descripción de las figuras:

Figuras 1.A y 1.B: Cromatogramas del espacio de cabeza de cultivos de micelios de trufas blancas y negras complementadas con L-metionina. El extracto de malta contiene de manera natural bajas concentraciones de L-metionina (0,1 mM - Flückiger-Isler *et al.*, 1993). Un exceso de 50 mM de este aminoácido induce la producción de determinados compuestos azufrados característicos del olor de trufa.

50 Figura 2: Cromatogramas del espacio de cabeza de cultivos de micelios de trufa blanca complementada con leucina y con isoleucina. El extracto de malta contiene de manera natural bajas concentraciones de leucina (0,4 mM) y de isoleucina (0,2 mM), Flückiger-Isler *et al.*, 1993. Un exceso de 50 mM de estos aminoácidos induce la producción de determinados compuestos volátiles clave de la trufa.

55 Descripción detallada de la invención:

Un objeto de la presente invención consiste en un procedimiento de fabricación de aroma natural de trufa (*Tuber ssp.*). El procedimiento se basa en el uso de micelio de trufa en cultivo puro y en la transformación mediante este último de precursores de aromas con el fin de obtener los compuestos característicos del aroma de los cuerpos fructíferos de trufas blancas y negras.

65 En particular, el procedimiento de producción de aromas naturales de trufa (*Tuber ssp.*) a partir de micelio de trufa en cultivo según la invención, comprende al menos un precursor de aroma añadido al medio de cultivo de dicho micelio de trufa confiriéndole así las características aromáticas de los cuerpos fructíferos de trufas. Preferiblemente dicho precursor de aroma se selecciona de los aminoácidos naturales o sintéticos de la L-metionina, la leucina, la

isoleucina, la valina, la fenilalanina y/o sus mezclas, sus precursores y/o sus productos de degradación y en el que dicho precursor de aroma añadido al medio de cultivo de dicho micelio de trufa está presente en un gran exceso superior o igual a 10 mM.

5 Un aroma natural es de origen animal, vegetal o fúngico. Se obtiene exclusivamente mediante métodos físicos, microbiológicos o enzimáticos a partir de materia prima de origen vegetal, animal o fúngico (evidentemente no modificados genéticamente) (<http://dictionnaire.sensagent.com/ar%C3%B4me/fr-fr/>). Los aromas naturales de trufa están constituidos generalmente por hidrocarburos que contienen grupos alcohol, cetona, aldehído, éster y átomos de azufre.

10 Un aminoácido es una molécula orgánica que presenta un esqueleto de carbono y dos funciones: una amina (-NH₂) y un ácido carboxílico (-COOH). Los aminoácidos son las unidades estructurales de base de las proteínas. Miden aproximadamente 100 picómetros (pm).

15 Existen más de 100 α -aminoácidos presentes en la naturaleza. Los alimentos aportan los aminoácidos principalmente en forma de proteínas. Existe una variedad muy grande de aminoácidos, pero únicamente 20 se usan en la síntesis de las proteínas por los seres vivos. De esta veintena, 9 son indispensables, es decir que un aporte alimentario es obligatorio, no pudiendo sintetizarlos el organismo humano; otros 6 son “condicionalmente” indispensables ya que su síntesis endógena no siempre es suficiente para satisfacer las necesidades.

20 Los aminoácidos naturales comprenden la alanina (Ala), la arginina (Arg), la asparagina (Asn), el aspartato o ácido aspártico (Asp), la cisteína (Cys), el glutamato o ácido glutámico (Glu), la glutamina (Gln), la glicina (Gly), la histidina (His), la isoleucina (Ile), la leucina (Leu), la lisina (Lys), la metionina (Met), la fenilalanina (Phe), la prolina (Pro), la serina (Ser), la treonina (Thr), el triptófano (Trp), la tirosina (Tyr) y la valina (Val).

25 En oposición a los aminoácidos naturales, el esqueleto de carbono de los aminoácidos sintéticos no se encuentra en la naturaleza. Procede por ejemplo de la síntesis orgánica.

30 Los aminoácidos tienen como precursores metabolitos procedentes de rutas metabólicas tales como la glicólisis, el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, o la ruta de las pentosas fosfato. Más precisamente, estos precursores comprenden el α -cetoglutarato, el 3-fosfoglicerato, el oxaloacetato, el piruvato, el fosfoenolpiruvato y la eritrosa-4-fosfato, la ribosa-5-fosfato y cualquier otra molécula posterior o anterior de la ruta metabólica que conduce a esos precursores.

35 “Productos de degradación de aminoácidos”: los aminoácidos pueden experimentar una primera degradación que retira el grupo α -amina o bien mediante transaminación o bien mediante oxidación. El ion amonio se recupera y se recicla para formar otro aminoácido o se elimina. El esqueleto de carbono obtenido tras la salida del grupo aminado también puede recuperarse para sintetizar el aminoácido correspondiente o servir de precursor para la síntesis de glúcidos (caso de los aminoácidos glicogénicos) o convertirse en acetil-CoA para la síntesis de ácidos grasos (caso de los ácidos grasos cetogénicos).

40 Preferiblemente, el procedimiento de producción de aromas naturales de trufa según la invención se basa en el uso de aminoácidos en el medio de cultivo seleccionados de los aminoácidos alifáticos, aromáticos, azufrados o sus mezclas.

45 Preferiblemente, estos aminoácidos se seleccionan de la L-metionina, la leucina, la isoleucina, la valina, la fenilalanina y/o sus mezclas. En efecto, la actividad inventiva del procedimiento se encuentra en el uso de los precursores de aromas (L-metionina, leucina, isoleucina, valina, fenilalanina y/o sus mezclas, sus precursores y/o sus productos de degradación) para inducir la producción de compuestos volátiles característicos del aroma de los cuerpos fructíferos de trufas. Una dosis elevada de estos aminoácidos fuerza al micelio de trufa al catabolismo de dichos aminoácidos, lo que da como resultado una concentración más elevada de las moléculas volátiles aromáticas buscadas. Según la invención, el precursor de aroma añadido al medio de cultivo de dicho micelio de trufa está presente en un gran exceso preferiblemente superior o igual a 10 mM.

50 Por “gran exceso” se entiende una concentración de dicho precursor de aroma de al menos 20 veces, preferiblemente 100 veces superior a las concentraciones descritas en el extracto de malta (Splivallo *et al.* (2007)) que contiene, por ejemplo, bajas concentraciones de leucina (0,4 mM), de isoleucina (0,2 mM) o de metionina (0,1 mM) (véase Flückiger-Isler *et al.*, 1993). Así, las concentraciones naturales de aminoácidos descritas en el extracto de malta son de 130 a 400 veces inferiores a las concentraciones usadas en la presente invención para inducir los aromas clave de la trufa. Los resultados obtenidos son totalmente inesperados y sorprendentes (véase, por ejemplo, la tabla 1).

55 De manera ideal, dicho precursor de aroma añadido al medio de cultivo de dicho micelio de trufa está presente en el medio de cultivo a una dosis comprendida entre 5 y 1000 mM, preferiblemente en un gran exceso superior o igual a 10 mM, ventajosamente a una dosis comprendida entre 10 y 1000 mM, preferiblemente entre 10 y 500 mM, y más preferiblemente de 50 a 500 mM.

En particular, en el caso de la L-metionina o de la valina añadidas al medio de cultivo de dicho micelio de trufa, la dosis usada es preferiblemente superior o igual a 50 mM.

5 En el caso de la leucina o de la isoleucina añadidas al medio de cultivo de dicho micelio de trufa, la dosis usada es preferiblemente superior o igual a 100 mM.

En el caso de la fenilalanina o del ácido 2-oxo-4-metiltiobutírico, producto de degradación de la L-metionina, añadidos al medio de cultivo de dicho micelio de trufa, la dosis usada es preferiblemente superior o igual a 10 mM.

10 Ventajosamente, los aminoácidos se seleccionan de la L-metionina, la isoleucina, sus precursores, sus productos de degradación y/o sus mezclas.

15 Según un modo preferido de realización de la invención, el micelio de trufa en cultivo procede de al menos una de las siguientes especies: *Tuber melanosporum*, *Tuber magnatum*, *Tuber aestivum*, *Tuber uncinatum*, *Tuber brumale*, *Tuber borchii*, *Tuber mesentericum* o *Tuber indicum* y/o sus mezclas.

20 Por otro lado, el cultivo de micelio de trufa también puede contener además bacterias y/o levaduras, huéspedes naturales de los cuerpos fructíferos de dichas trufas. La adición de estos simbiontes en cultivos permitirá mejorar el rendimiento y la producción de las moléculas volátiles aromáticas buscadas. La población bacteriana huésped de los cuerpos fructíferos y del micelio de trufas blancas (*Tuber magnatum* y *Tuber borchii*) se ha descrito por Barbieri *et al.*, ("Phylogenetic Characterization and In Situ Detection of a Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides Phylogroup Bacterium in *Tuber borchii* Vittad. Ectomycorrhizal Mycelium" Applied and Environmental Microbiology, nov. de 2000, vol. 66, n.º 11, págs. 5035-5042; "New evidence for bacterial diversity in the ascoma of the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii* Vittad." FEMS Microbiology Letters 247 (2005) 23-25; y "Occurrence and diversity of bacterial communities in *Tuber magnatum* during truffle maturation" Environmental Microbiology (2007) 9(9), 2234-2246). Entre ellas, pueden citarse las alfa-proteobacterias tales como el grupo *Sinorhizobium/Ensifer* con las especies *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, las beta-proteobacterias, las gamma-proteobacterias, los *Bacteroidetes*, los *Firmicutes*, las actinobacterias así como las cepas de *Pseudomonas* o las bacterias que forman esporas tales como las especies *Micrococcus*, *Moraxella*, *Corynebacterium* y *Staphylococcus*. El aroma de trufa se produce principalmente por el propio micelio, pero las bacterias y los microbios huésped que encierran los cuerpos fructíferos también pueden participar en la fabricación de este cóctel de moléculas volátiles.

35 Según el procedimiento de la invención, el cultivo de los micelios de trufas en presencia de al menos un precursor de aroma puede mantenerse durante al menos 7 días a una temperatura comprendida entre 10 y 30°C. No obstante, podrán mantenerse los micelios de trufas en presencia de al menos un precursor de aroma durante 1 mes, incluso dos meses o más a una temperatura de cultivo preferiblemente comprendida entre 15 y 20°C.

40 El aroma natural de trufa obtenido según la presente invención es una molécula volátil que comprende sulfuro de dimetilo, disulfuro de dimetilo, 2-metilbutanal, 2-metilpropanal, 3-metil-1-butanal, 2-feniletanol, 2,4-ditiapentano, 1-octen-3-ol, 3-octanona, sus derivados oxidados o reducidos y/o sus mezclas.

45 Según un modo de realización preferido de la invención, dicho precursor de aroma añadido al medio de cultivo de dicho micelio de trufa comprende además ácido linoleico, que le confiere al aroma de trufa una ligera nota fúngica.

50 La presente invención también se refiere al uso de al menos un precursor de aroma para inducir la producción de compuestos volátiles del aroma natural de los cuerpos fructíferos de trufas (*Tuber ssp.*) a partir de micelio de trufa en cultivo. Preferiblemente, dicho precursor de aroma se selecciona de los aminoácidos naturales o sintéticos de la L-metionina, la leucina, la isoleucina, la valina, la fenilalanina y/o sus mezclas, sus precursores y/o sus productos de degradación y en el que dicho precursor de aroma añadido al medio de cultivo de dicho micelio de trufa está presente en un gran exceso superior o igual a 10 mM.

55 Preferiblemente, dicho precursor de aroma añadido al medio de cultivo de dicho micelio de trufa está presente a una dosis comprendida entre 10 y 1000 mM, preferiblemente entre 10 y 500 mM, y más preferiblemente de 50 a 500 mM o a las dosis específicas para cada aminoácido tal como se describieron anteriormente para el procedimiento de producción de aromas naturales de trufa (*Tuber ssp.*) a partir de micelio de trufa en cultivo.

60 De manera aún más preferida, los aminoácidos se seleccionan de la L-metionina, la isoleucina, sus precursores, sus productos de degradación y/o sus mezclas.

65 Otro objeto de la invención consiste en el uso de micelio de trufas (*Tuber ssp.*) en cultivo en combinación con bacterias y/o levaduras, huéspedes naturales de los cuerpos fructíferos de dichas trufas, con el fin de generar las moléculas volátiles características del aroma de la trufa. Dichos micelios de trufas (*Tuber ssp.*) en cultivo en combinación con dichas bacterias y/o levaduras, huéspedes naturales de los cuerpos fructíferos de dichas trufas, se cultivan según el procedimiento de la presente invención. Dichas bacterias y/o levaduras, huéspedes naturales de los cuerpos fructíferos de dichas trufas, se describieron anteriormente.

Se preferirá el micelio de trufa en cultivo procedente de al menos una de las siguientes especies: *Tuber melanosporum*, *Tuber magnatum*, *Tuber aestivum*, *Tuber uncinatum*, *Tuber brumale*, *Tuber borchii*, *Tuber mesentericum* o *Tuber indicum* y/o sus mezclas.

5 Según un modo de realización preferido, el medio de cultivo de dicho micelio de trufa podrá contener además bacterias y/o levaduras, huéspedes naturales de los cuerpos fructíferos (tal como se describieron anteriormente) de dichas especies de trufas.

10 Un objetivo esencial de la invención es también fabricar un producto aromático estable con olor y sabor de trufa fresca, que se presta a un acondicionamiento industrial sin alteración de la calidad, y a una distribución en cualquier periodo del año. También es esencial proporcionar un producto aromático cuya calidad sea adecuada para satisfacer a los entendidos y a los profesionales.

15 Los productos aromáticos con olor y con sabor natural del cuerpo fructífero de trufa, comprenden las moléculas volátiles naturales concentradas extraídas del micelio de trufa según la invención.

20 El producto aromático según la invención puede prepararse en forma concentrada, mezclando directamente los compuestos en proporciones apropiadas. No obstante, para permitir un uso directo y más fácil del producto, estos compuestos se diluyen preferiblemente en un disolvente alimentario o un vector líquido no tóxico de volatilidad elevada, adecuado para dispersarlos en medio homogéneo o heterogéneo.

25 Como disolvente puede usarse en particular un aceite alimentario con el fin de obtener un producto aromático que se presta a un uso directo por el consumidor, concretamente para perfumar alimentos en el momento de su preparación. También puede usarse como vector volátil protóxico de nitrógeno o triclorofluorometano con el fin concretamente de realizar impregnaciones industriales de soportes sólidos.

30 En el caso más habitual de uso alimentario, la razón en peso de dilución de los compuestos está ventajosamente comprendida entre 100 y 10.000.

35 De manera sorprendente, haciendo que crezca el micelio de trufa en un medio de cultivo al que se le añade el aminoácido L-metionina, se obtienen productos azufrados característicos de la trufa, tales como el sulfuro de dimetilo o el disulfuro de dimetilo. Asimismo, la adición del aminoácido isoleucina al medio de cultivo induce la producción del compuesto volátil 2-metilbutanal. El uso de los dos precursores de aromas L-metionina e isoleucina permite obtener las moléculas volátiles que son la base del aroma de trufa. Por otro lado, el uso de otros aminoácidos tales como la leucina, la valina, la fenilalanina, permite la producción de 2-metilpropanal y de 3-metil-1-butanol y de 2-feniletanol, moléculas volátiles que, combinadas con el sulfuro de dimetilo, disulfuro de dimetilo y el 2-metilbutanal, mejoran la calidad y complejidad del aroma de trufa. Las moléculas volátiles así obtenidas pueden combinarse en diferentes proporciones con el fin de reproducir un aroma natural de trufa blanca y negra. La invención se extiende al uso de dicho producto con el fin de conferir el aroma de la trufa a soportes sólidos y líquidos, esencialmente en la industria alimentaria y la industria de los aromas.

45 Otras características y ventajas de la presente invención aparecerán a lo largo de los siguientes ejemplos de realización, facilitados evidentemente a modo ilustrativo y no limitativo.

EJEMPLO 1:

50 Se cultiva previamente el micelio de trufas blancas (por ejemplo, *Tuber borchii* o *Tuber magnatum*) o negras (por ejemplo, *Tuber melanosporum*) en condiciones estériles en placas de Petri en un medio propicio para el crecimiento (por ejemplo, medio sólido a base de agar (10 g/l) que contiene extracto de malta al 1% o "agar de patata y dextrosa" (15 g/l) con un pH ajustado entre 6,5-7,0, y esto hasta que el diámetro de la colonia de micelios alcanza 1-2 centímetros (de algunas semanas a algunos meses en función de la especie de trufa)

55 En esta fase, se transfiere micelio procedente del borde de la colonia (por ejemplo, 0,2 cm²) a un medio de cultivo líquido tal como extracto de malta al 1,5%, pH 6,5-7,0. Se mantiene el medio de cultivo tal cual o se complementa con metionina (concentración final del orden de 50 mM) con el fin de comparar el aroma producido por el micelio que crece en el extracto de malta puro y en el extracto de malta complementado con metionina. El medio así inoculado con el micelio de trufa debe encerrarse en un recipiente hermético con el fin de no perder las moléculas volátiles producidas a medida que crece el micelio.

60 Tras 1 mes de crecimiento a 15-20°C en un recipiente de 20 ml, las moléculas volátiles inducidas por los precursores de aromas pueden detectarse por la nariz humana y presentan las características de los compuestos clave de la trufa tales como, por ejemplo, los compuestos azufrados. El olor de los cultivos de micelios de trufa blanca y negra que crecen en el extracto de malta no complementado con metionina se parece esencialmente al aroma del extracto de malta, con un pequeño olor fúngico (seta de París) que no recuerda no obstante en absoluto al olor de la trufa. Por el contrario, para el micelio de trufa blanca y negra complementado con metionina se detectan a simple olfato

aromas azufrados de fermentación tales como el olor de col (trufa negra) con un ligero olor de huevo podrido (trufa blanca). Los análisis mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG/EM) confirman los resultados organolépticos descritos anteriormente (figuras 1A y 1B). En efecto, la adición de metionina (concentración final de 50 mM) induce en la trufa negra una importante producción de disulfuro de dimetilo, compuesto volátil con olor característico de col. Este mismo aminoácido induce en la trufa blanca la producción de disulfuro de dimetilo pero también de trisulfuro de dimetilo (compuesto volátil con olor característico de huevo podrido).

EJEMPLO 2:

Se cultiva previamente el micelio de trufas blancas en condiciones estériles en placas de Petri en un medio propicio para el crecimiento (por ejemplo, medio sólido a base de agar (10 g/l) que contiene "agar de patata y dextrosa" (15 g/l) con un pH ajustado entre 6,5-7,0, y esto hasta que el diámetro de la colonia de micelios alcanza 1-2 centímetros.

Las colonias se transfieren al medio líquido (50 ml en un recipiente Erlenmeyer de 250 ml) y se trituran con ayuda de una mezcladora estéril. Se cultiva el micelio así obtenido a 23°C y con agitación (130 revoluciones por minuto, rpm) hasta la obtención de una biomasa importante (~10 gramos de micelio por Erlenmeyer). A continuación se transfieren 2-3 gramos de micelio así obtenido a pequeños recipientes herméticos complementados o no con leucina o con isoleucina (concentración final de 60 mM en extracto de malta al 1%). Al cabo de 3 semanas, se procede a las pruebas organolépticas en paralelo a los análisis cromatográficos mediante CG/EM (cromatografía en fase gaseosa / espectrometría de masas). A simple olfato, el micelio que crece en el extracto de malta no complementado con aminoácidos tiene un ligero olor de "seta de París". El micelio que crece en el extracto de malta complementado con isoleucina desprende por su parte un olor complejo de chocolate y de frutas exóticas (característico de la producción de 2-metilbutanal y 2-metilbutanol, véase la figura 2), en cuanto al micelio que crece en presencia de leucina, desprende un ligero olor de whisky ahumado, que indica la presencia de 3-metilbutanal y 3-metilbutanol, véase la figura 2.

Los compuestos volátiles así obtenidos pueden extraerse a continuación y combinarse entre sí (por ejemplo, con los compuestos azufrados del ejemplo 1) en las proporciones que reproducen el aroma natural de trufa. Alternativamente, también puede usarse directamente el micelio para la preparación de productos aromáticos y/o alimentarios.

EJEMPLO 3:

Se cultiva micelio de trufa negra (por ejemplo, *T. melanosporum*, *T. brumale* o *T. indicum*) según uno de los procedimientos descritos en el ejemplo 1 ó 2, con el medio de cultivo complementado con aminoácidos (L-metionina, isoleucina, leucina, valina, fenilalanina) a una concentración final de 100 mM.

Tras 2 meses de cultivo, se extraen los compuestos volátiles en un soporte apropiado (por ejemplo, aceite de oliva o crema) y se combinan entre sí para obtener un olor característico de trufa negra. Por ejemplo, un extracto de trufa que contiene una gran proporción de compuestos azufrados recuerda al olor de la trufa negra de Périgord (*T. melanosporum*) mientras que una proporción muy inferior de compuestos azufrados recuerda al olor menos intenso de la trufa de China *Tuber indicum*.

Por otro lado, el producto así obtenido puede mejorarse aun más haciendo crecer el micelio de trufa con otros precursores de aromas tales como ácido linoleico que induce, por ejemplo, la producción de 1-octen-3-ol, molécula volátil que tiene un olor característico de seta de París. Además de las moléculas volátiles descritas anteriormente, el buqué aromático obtenido con la adición del 1-octen-3-ol reproduce el olor de la trufa blanca de Italia *T. borchii*.

EJEMPLO 4:

Se cultiva micelio de trufa negra o blanca tal como se describió en el ejemplo 2 durante 2 meses hasta la obtención de una biomasa importante y en presencia de aminoácidos L-metionina, isoleucina, leucina, valina, fenilalanina a una concentración de 80 mM. Durante estos 2 meses de cultivo, los compuestos volátiles se extraen continuamente de los cultivos de micelios y se atrapan en un soporte líquido (aceite vegetal). Tras 2 meses de cultivo, se transfiere el micelio complementado con metionina (sin el medio líquido) a un recipiente hermético y estéril y se inoculara el micelio con bacterias y levaduras previamente aisladas de los cuerpos fructíferos de trufas blancas (*T. magnatum*). Tras 2 semanas de cultivo, se recogen los productos volátiles así obtenidos en el mismo soporte líquido usado anteriormente. Este extracto tiene un olor característico azufrado, astringente y con un fuerte olor de col y de ajo. Combinado con los productos volátiles de micelios en proporciones exactas, el aroma así obtenido se parece al de la trufa blanca de Alba.

EJEMPLO 5:

Se cultiva micelio de trufa blanca tal como se describió en el ejemplo 2 durante 2 meses hasta la obtención de una biomasa importante. Se tritura el micelio así obtenido con ayuda de una mezcladora estéril y se transfiere a

5 recipientes herméticos que contienen o bien extracto de malta puro o bien extracto de malta al que se le añaden los siguientes compuestos (aminoácidos: L-metionina, leucina, isoleucina, valina, fenilalanina y cisteína como control negativo o incluso ácido 2-oxo-4-metiltiobutírico, producto de degradación de la L-metionina). La concentración de estos compuestos está comprendida entre 1 mM y 400 mM tal como se indica en la tabla 1. Se cultiva el micelio en estos medios diferentes y tras 2 semanas un panel de expertos evalúa las características sensoriales (olor) de cada recipiente.

En la tabla 1, se describen los resultados sensoriales.

- 10 • A simple olfato, se observa en primer lugar que el micelio cultivado en extracto de malta puro (sin adición de aminoácidos) desprende un olor de “malta y de seta” (tabla 1).
- La cisteína que sirve en este caso de control negativo no estimula en absoluto la producción de aromas de trufa.
- 15 • Los demás aminoácidos (L-metionina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina) y el producto de degradación de la L-metionina, el ácido 2-oxo-4-metiltiobutírico, producen por su parte aromas característicos de la trufa únicamente si están presentes a concentraciones muy superiores a sus concentraciones naturales en el extracto de malta. Estas concentraciones varían en función de los precursores de aromas (aminoácidos o productos de degradación) y están comprendidas entre 10 mM y 400 mM según la tabla 1.
- 20

Tabla 1 – Resultados de la evaluación sensorial

Concentración de aminoácido añadida a extracto de malta	Exceso con respecto al extracto de malta	Descripción del aroma	¿Se parece a la trufa? (--- = no; √ = sí)
Extracto de malta puro Véase Flückiger-Isler <i>et al.</i>			
	0	malta, fúngico	---
Cisteína (control negativo)			
1 mM	140	malta, fúngico	---
10 mM	1400	malta, fúngico	---
50 mM	7000	malta, fúngico	---
100 mM	14000	malta, fúngico	---
200 mM	28000	malta, fúngico	---
400 mM	42000	malta, fúngico	---
L-Metionina			
1 mM	100	malta, fúngico	---
10 mM	1000	ligera nota azufrada	---
50 mM	5000	col, huevo podrido	√
100 mM	10000	col intensa, ajo	√
Leucina			
1 mM	30	malta, fúngico	---
10 mM	260	malta, fúngico	---
50 mM	1300	whisky	---
100 mM	2600	whisky con notas ahumadas	√
200 mM	5200	whisky con notas ahumadas, intenso	√
Isoleucina			
1 mM	50	malta, fúngico	---
10 mM	500	malta, fúngico	---
50 mM	2500	malta, fúngico	---
100 mM	3000	acre, afrutado	√
200 mM	6000	acre, afrutado	√
Valina			
1 mM	30	malta, fúngico	---
10 mM	300	acre, poco intenso	---
50 mM	1500	acre, mordiente	√
100 mM	3000	acre, mordiente	√
200 mM	6000	acre, mordiente	√
400 mM	12000	acre, mordiente, fuerte	√
Fenilalanina			

1 mM	50	fúngico, muy ligero, nota de rosa	---
10 mM	500	rosa poco intensa	√
50 mM	2400	rosa intensa	√
100 mM	4800	rosa intensa	√
<hr/>			
Ácido 2-oxo-4-			
metiltiobutírico (producto			
de degradación de la L-			
metionina)			
1 mM	---	ligera nota azufrada	---
10 mM	---	col, huevo podrido	√
50 mM	---	col intensa, ajo	√

Bibliografía

- 5 Delmas M, Gaset A, Montant C, Pebeyre JP, Talou T (1986) Procédé de fabrication d un produit aromatique à odeur et goût de truffe noire, produit et corps aromatisés obtenus. Solicitud de patente francesa FR 86 10871 y solicitud de patente europea n.º EP 0257666.
- Documento IT 1215936B (SENTOSA S.A.S MILANO).
- 10 Fauconnet C, Delher G (1998) Influence des facteurs climatiques sur la production des truffes en Quercy. Le Trufficulteur Français 24(3):19-21.
- Fields B (1997) Meet the professor. Local flavor. nov. de 2007, págs. 32-33.
- 15 Flückiger-Isler R, Mörikofer-Zwez S, Kahn JM, Walter P (1994). Dietary components of malt extract such as malto-dextrins, proteins and inorganic salts have distinct effects on glucose uptake and glycogen concentrations in rats. The Journal of Nutrition, págs. 1647-1653.
- 20 Hall I, Yun W (2001) Truffles and other edible mycorrhizal mushrooms-some new crops for the Southern Hemisphere. Edible Mycorrhizal Mushrooms and their cultivation. Hall I, Yun W, Danell E, Zambonelli A (eds). Proceedings of the second International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms. Nueva Zelanda. págs. 1-7.
- Splivallo R, Bossi S, Maffei M, Bonfante P (2007a) Discrimination of truffle fruiting body versus mycelial aromas by stir bar sorptive extraction. Phytochemistry 68: 2584-98.
- 25 Tirillini B, Verdelli G, Paolocci F, Ciccioli P, Frattoni M (2000) The volatile organic compounds from the mycelium of Tuber borchii Vitt. Phytochemistry 55:983-985.
- 30 Barbieri *et al*, "Phylogenetic Characterization and In Situ Detection of a Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides Phylogroup Bacterium in Tuber borchii Vittad. Ectomycorrhizal Mycelium" Applied and Environmental Microbiology, nov. de 2000, vol. 66, n.º 11, págs. 5035-5042; "New evidence for bacterial diversity in the ascoma of the ectomycorrhizal fungus Tuber borchii Vittad." FEMS Microbiology Letters 247 (2005) 23-25; y "Occurrence and diversity of bacterial communities in Tuber magnatum during truffle maturation" Environmental Microbiology (2007) 9(9), 2234-2246.
- 35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de producción de aromas naturales de trufa (*Tuber ssp.*) a partir de micelio de trufa en cultivo, que comprende al menos un precursor de aroma añadido al medio de cultivo de dicho micelio de trufa confiriéndole así las características aromáticas de los cuerpos fructíferos de trufas y caracterizado porque dicho precursor de aroma se selecciona de los aminoácidos naturales o sintéticos de la L-metionina, la leucina, la isoleucina, la valina, la fenilalanina y/o sus mezclas, sus precursores y/o sus productos de degradación y en el que dicho precursor de aroma añadido al medio de cultivo de dicho micelio de trufa está presente en un gran exceso superior o igual a 10 mM.
- 10 2. Procedimiento de producción de aromas naturales de trufa según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho precursor de aroma añadido al medio de cultivo de dicho micelio de trufa está presente a una dosis comprendida entre 10 y 1000 mM.
- 15 3. Procedimiento de producción de aromas naturales de trufa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque dicho precursor de aroma añadido al medio de cultivo de dicho micelio de trufa está presente a una dosis comprendida entre 10 y 500 mM.
- 20 4. Procedimiento de producción de aromas naturales de trufa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque dicho precursor de aroma añadido al medio de cultivo de dicho micelio de trufa está presente a una dosis comprendida entre 50 y 500 mM.
- 25 5. Procedimiento de producción de aromas naturales de trufa según la reivindicación 1, caracterizado porque la L-metionina o la valina añadidas al medio de cultivo de dicho micelio de trufa están presentes a una dosis superior o igual a 50 mM.
- 30 6. Procedimiento de producción de aromas naturales de trufa según la reivindicación 1, caracterizado porque la leucina o la isoleucina añadidas al medio de cultivo de dicho micelio de trufa están presentes a una dosis superior o igual a 100 mM.
- 35 7. Procedimiento de producción de aromas naturales de trufa según la reivindicación 1, caracterizado porque la fenilalanina o el ácido 2-oxo-4-metilbutírico, producto de degradación de la L-metionina, añadidos al medio de cultivo de dicho micelio de trufa están presentes a una dosis superior o igual a 10 mM.
- 40 8. Procedimiento de producción de aromas naturales de trufa según la reivindicación 1, caracterizado porque los aminoácidos se seleccionan de la L-metionina, la isoleucina, sus precursores, sus productos de degradación y/o sus mezclas.
- 45 9. Procedimiento de producción de aromas naturales de trufa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el micelio de trufa en cultivo procede de al menos una de las siguientes especies: *Tuber melanosporum*, *Tuber magnatum*, *Tuber aestivum*, *Tuber uncinatum*, *Tuber brumale*, *Tuber borchii*, *Tuber mesentericum* o *Tuber indicum*.
- 50 10. Procedimiento de producción de aromas naturales de trufa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque el cultivo de micelio de trufa contiene además bacterias y/o levaduras, huéspedes naturales de los cuerpos fructíferos de dichas trufas.
- 55 11. Procedimiento de producción de aromas naturales de trufa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque dichos micelios de trufas se cultivan en presencia de al menos un precursor de aroma y se mantienen en cultivo durante al menos 7 días a una temperatura comprendida entre 10 y 30°C.
- 60 12. Procedimiento de producción de aromas naturales de trufa según la reivindicación 11, caracterizado porque la temperatura de cultivo está comprendida entre 15 y 20°C.
- 65 13. Procedimiento de producción de aromas naturales de trufa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque el aroma natural de trufa es una molécula volátil que comprende sulfuro de dimetilo, disulfuro de dimetilo, trisulfuro de dimetilo, 2-metilbutanal, 2-metilpropanal, 3-metil-1-butanal, 2-feniletanol, 2,4-ditiapentano, 1-octen-3-ol, 3-octanona, sus derivados oxidados o reducidos y/o sus mezclas.
14. Procedimiento de producción de aromas naturales de trufa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque dicho precursor de aroma añadido al medio de cultivo de dicho micelio de trufa comprende además ácido linoleico.
15. Uso de al menos un precursor de aroma para inducir la producción de compuestos volátiles del aroma natural de los cuerpos fructíferos de trufas (*Tuber ssp.*) a partir de micelio de trufa en cultivo, caracterizado porque dicho precursor de aroma se selecciona de los aminoácidos naturales o sintéticos de la L-metionina,

la leucina, la isoleucina, la valina, la fenilalanina y/o sus mezclas, sus precursores y/o sus productos de degradación y en el que dicho precursor de aroma añadido al medio de cultivo de dicho micelio de trufa está presente en un gran exceso superior o igual a 10 mM.

- 5 16. Uso según la reivindicación 15, caracterizado porque dicho precursor de aroma añadido al medio de cultivo de dicho micelio de trufa está presente a una dosis comprendida entre 10 y 1000 mM.
17. Uso según la reivindicación 15, caracterizado porque los aminoácidos se seleccionan de la L-metionina, la isoleucina, sus precursores, sus productos de degradación y/o sus mezclas.
- 10 18. Uso de micelio de trufas (*Tuber ssp.*) en cultivo en combinación con bacterias y/o levaduras, huéspedes naturales de los cuerpos fructíferos de dichas trufas, con el fin de generar las moléculas volátiles características del aroma de la trufa, caracterizado porque dichos micelios de trufas (*Tuber ssp.*) en cultivo en combinación con dichas bacterias y/o levaduras, huéspedes naturales de los cuerpos fructíferos de dichas trufas, se cultivan según el procedimiento de las reivindicaciones 1 a 14.
- 15 19. Uso según la reivindicación 18, caracterizado porque el micelio de trufa en cultivo procede de al menos una de las siguientes especies: *Tuber melanosporum*, *Tuber magnatum*, *Tuber aestivum*, *Tuber uncinatum*, *Tuber brumale*, *Tuber borchii*, *Tuber mesentericum* o *Tuber indicum*.
- 20

Micelio de trufa negra

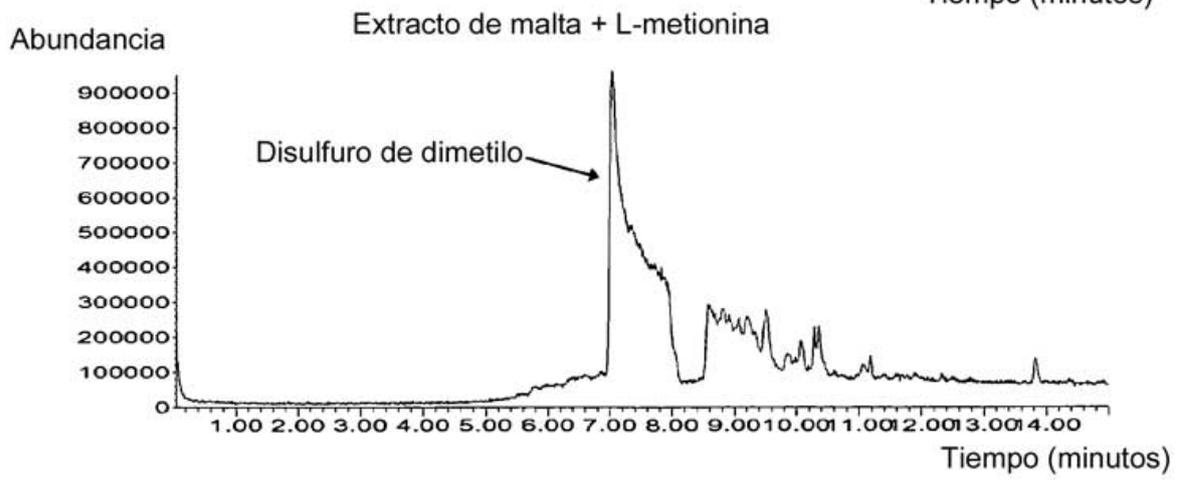
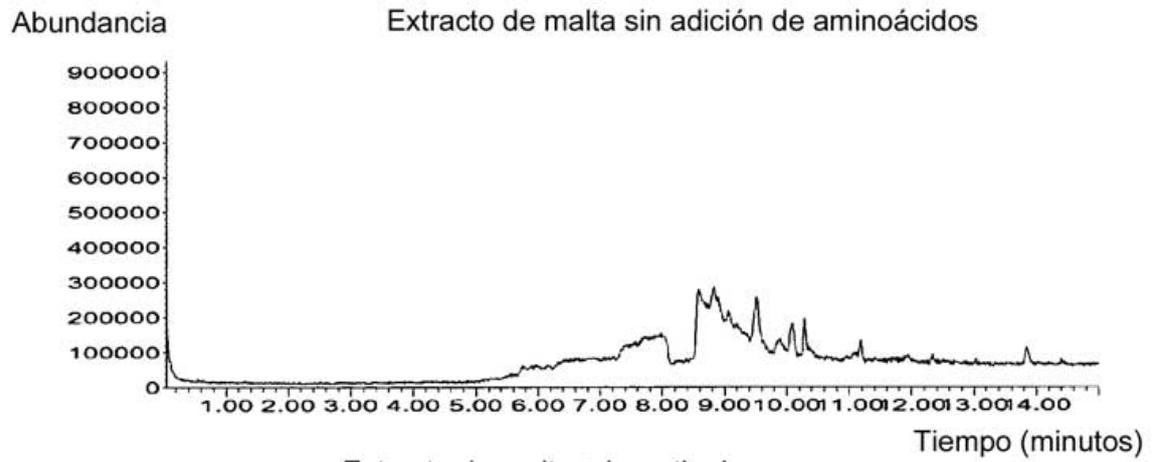


Figura 1.A

Micelio de trufa blanca

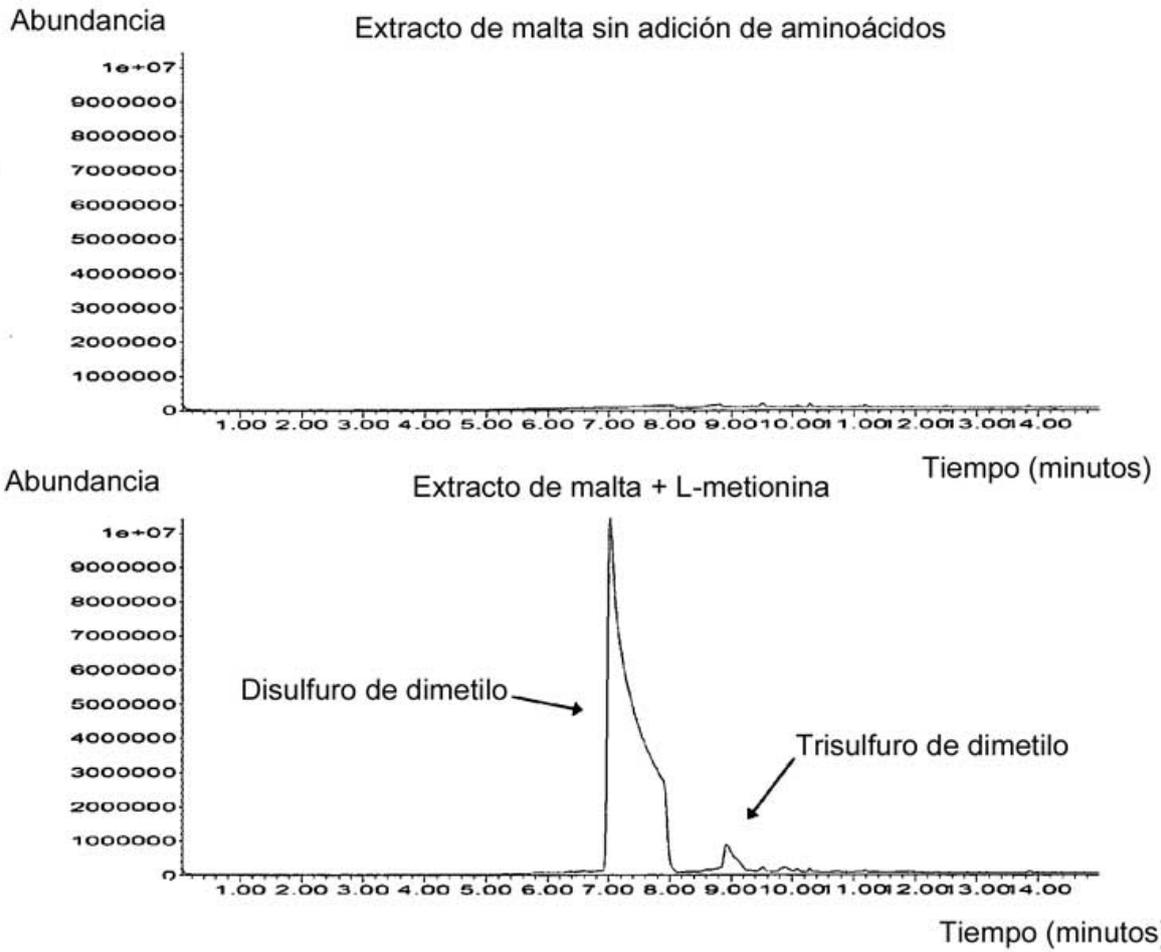


Figura 1.B

Micelio de trufa blanca

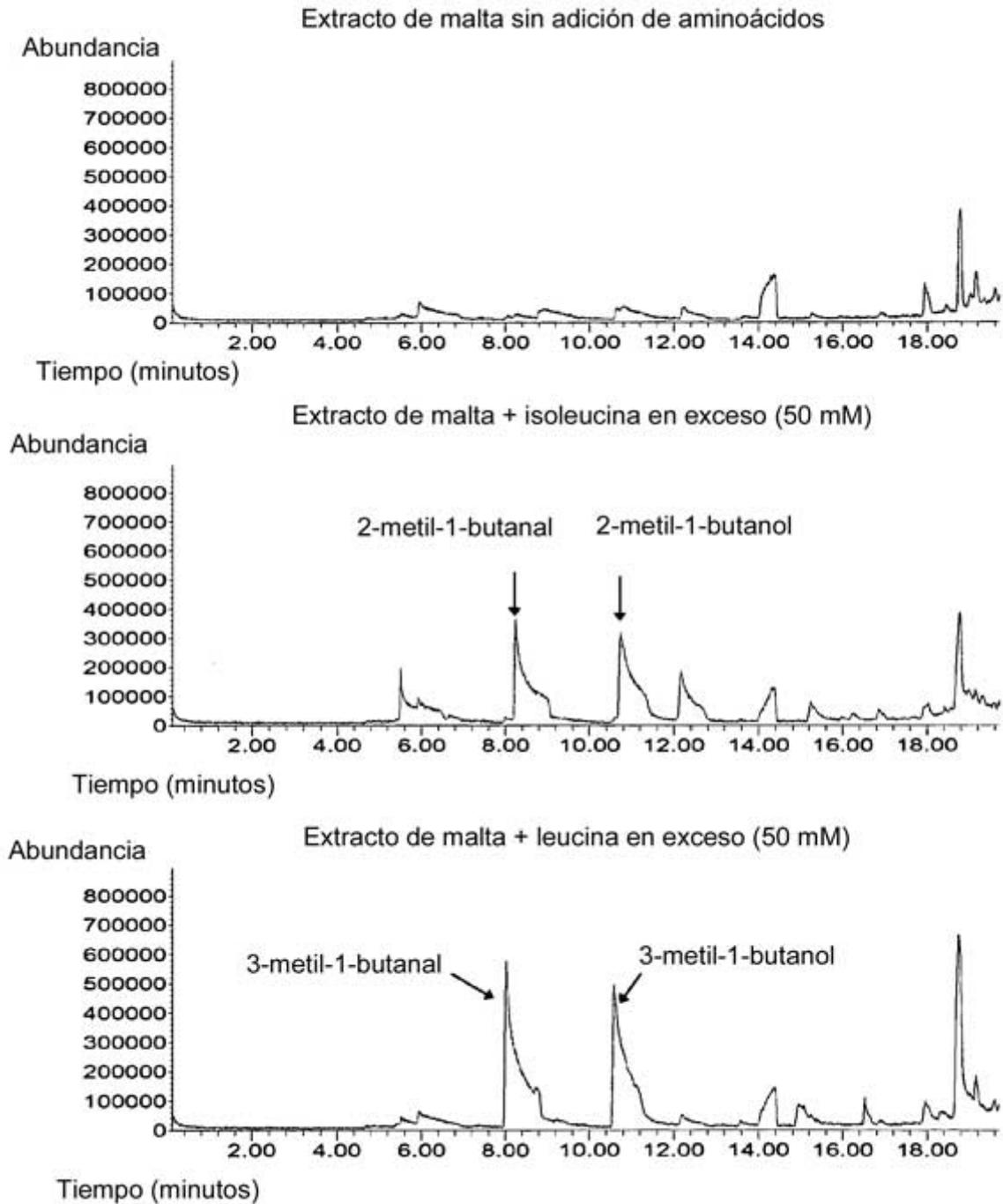


Figura 2