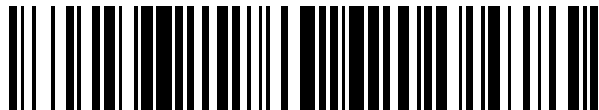


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 912**

51 Int. Cl.:

<b>A23G 1/02</b>	(2006.01)
<b>A23L 33/10</b>	(2006.01)
<b>A23L 25/00</b>	(2006.01)
<b>A23G 1/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2014 PCT/US2014/029998**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14145265**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2014 E 14763975 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 2986159**

54 Título: **Productos micelizados y métodos para preparar productos micelizados a partir de cacao y otros sustratos agrícolas**

30 Prioridad:

**15.03.2013 US 201361802256 P**  
**15.03.2013 US 201313844685**  
**09.04.2013 US 201313859719**  
**01.05.2013 US 201313874832**  
**10.07.2013 US 201361844498 P**  
**23.07.2013 US 201361857671 P**  
**15.08.2013 US 201361866371 P**  
**19.08.2013 US 201361867501 P**  
**06.09.2013 US 201314020512**  
**06.09.2013 US 201314020781**  
**15.09.2013 US 201361878037 P**  
**27.10.2013 US 201361896097 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.12.2019**

73 Titular/es:

**MYCOTECHNOLOGY, INC. (100.0%)**  
**18250 E. 40th, Suite 50**  
**Aurora, CO 80011, US**

72 Inventor/es:

**KELLY, BROOKS, JOHN y**  
**LANGAN, JAMES, PATRICK**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 733 912 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Productos micelizados y métodos para preparar productos micelizados a partir de cacao y otros sustratos agrícolas

5 **Campo técnico**

Los métodos y productos se refieren al uso de cepas fúngicas para mejorar el sabor en sustratos agrícolas, en particular, cacao y otros sustratos agrícolas.

10 **Antecedentes**

La mayor parte del cacao del mundo se cultiva en una banda que abarca 20 grados de latitud norte y sur del ecuador, ya que el árbol de cacao necesita un ambiente húmedo cálido tropical en el que hacer crecer y fructificar las vainas de cacao que contienen el grano de cacao. Cosechada cuando está madura, la vaina promedio de cacao produce entre 20 y 50 granos de cacao emulsionados en pulpa mucilaginoso. Generalmente, la vaina de cacao se prepara para el mercado mediante la fermentación de la vaina durante cuatro a siete días (para eliminar la pulpa) y los granos se secan durante otros cinco a catorce días. Hay alrededor de 20 variedades diferentes de cacao y cientos de híbridos. De estos, son comunes cuatro tipos principales de cacao en el mercado comercial del chocolate. El cacao Forastero representa aproximadamente el 95 % del mercado mundial de cacao. El cacao Criollo representa aproximadamente el 7 % del mercado mundial, y se caracteriza por ser un cacao gourmet más fino que es más difícil de cultivar que Forastero. El cacao Trinitario es un híbrido de Forastero/Criollo que crece bien en Trinidad. El cacao Nacional es apreciado por su bajo amargor y un aroma floral dulce, pero es difícil de cultivar comercialmente. La mayoría del cacao del mundo se produce en Costa de Marfil. Este volumen representa más de 1 millón de toneladas al año. Ghana, Indonesia, Camerún, Brasil y Nigeria también producen grandes cantidades de cacao. El cacao se consume en todo el mundo, generalmente en forma de chocolate, que es una mezcla de cacao con edulcorantes y otros componentes.

Es común que los granos de cacao sean tratados con vapor sobrecalentado para mitigar el contenido bacteriano. Se cree que tratar los granos de cacao con vapor saturado también elimina algunos de los componentes de sabor deseables. Los azúcares y otros edulcorantes se mezclan con el polvo de cacao para formar un chocolate de buen sabor. A menudo se añaden otros sabores. Actualmente, muchos defensores de la salud, aunque reconocen los beneficios para la salud del cacao, advierten contra los riesgos del uso excesivo de edulcorantes, incluido el azúcar y los edulcorantes artificiales.

Lo que se desea es una forma de fabricar cacao que logre un producto de gran sabor sin la necesidad de un endulzamiento excesivo. Lo que también se desea es una forma de procesar el cacao que retenga los componentes de sabor deseables minimizando al mismo tiempo los componentes de sabor menos deseables. Adicionalmente, es deseable confiar en procesos naturales para lograr un producto de gran sabor.

En la técnica sigue existiendo la necesidad de productos micelizados mejorados que tengan niveles reducidos de componentes de sabor indeseables y/o niveles aumentados de componentes que favorezcan el sabor y/o la salud en relación con los granos de cacao u otro sustrato agrícola, y de los métodos para obtener dichos productos.

El documento WO2011/012680 A2 describe composiciones microbianas para la fermentación de material de cacao. Describe el uso de una composición microbiana para regular la fermentación de materiales, en particular utilizando composiciones que comprenden combinaciones específicas de microorganismos, incluyendo al menos tres especies de *Lactobacillus* y una especie de levadura.

Schwan et al (Applied and Environmental Microbiology 1998, pág. 1477-1483) describen fermentaciones de cacao realizadas con un inóculo de cóctel microbiano definido. El cóctel utilizado consistió en una levadura, *Saccharomyces cerevisiae* var. *chevalieri*, dos especies bacterianas de ácido láctico, *Lactobacillus lactis* y *Lactobacillus plantarum*, y dos especies bacterianas de ácido acético, *Acetobacter acetii* y *Gluconobacter oxydans* subsp. *suboxydans*.

El documento GB2059243 describe un proceso para la fermentación de granos de cacao, que comprende las etapas de fermentar granos de cacao en dispersión en un medio acuoso, con agitación y aireación, con una cepa de levadura de actividad pectinolítica relativamente alta, a una temperatura de 30 a 40 °C, a un pH de 3,4 a 4,1 y una duración de 20 a 30 horas, seguido de la fermentación de los granos en un medio acuoso, con agitación y aireación, con una cepa de bacteria acética, a una temperatura de 40 a 50 °C, a un pH de 4 a 5 y una duración de 36 a 48 horas, recuperándose y secándose los granos resultantes. Ogundero (Mycopathologica 82, 159 165 (1983)) describe hongos termófilos y granos de cacao en fermentación en Nigeria. Los hongos estudiados fueron *Mucor pusillus* Lindt., *Aspergillus fumigatus* Fres. y *Thermoascus aurantiacus* Miehe sensu Apinis.

Crafack et. al., (Int. J. Food Microbiol. 167 (2013) 103-116) describieron cómo influyen en el sabor del cacao utilizando *Pichia kluyveri* y *Kluyveromyces marxianus* en un cultivo de inicio mixto definido para la fermentación del cacao.

65

**Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 es un diagrama de flujo de un método para crear un producto de micelio biodisponible de acuerdo con la presente invención.

La figura 2 es un diagrama de flujo de un método para crear un extracto de producto agrícola micelizado para consumo humano para efectuar la neuro-regeneración y la neuro-protección en seres humanos de acuerdo con la presente invención.

La figura 3 es un diagrama de flujo de un método para eliminar la cafeína de los granos de cacao u otro sustrato agrícola de acuerdo con la presente invención.

La figura 4 es un diagrama de flujo de un método para crear un producto de café micelizado.

La figura 5 es un diagrama de flujo de un método para crear un producto de café micelizado.

La figura 6 es un transportador utilizado de acuerdo con la presente invención.

La figura 7 es un transportador utilizado de acuerdo con la presente invención para entregar contenedores a un autoclave.

La figura 8(A), 8(B), 8(C) muestran bolsas autoclavables que tienen una superficie granulada, una pila de bolsas autoclavables, y un material autoclavables enrollado.

La figura 9 es un diagrama de flujo de un método para crear un producto de cacao micelizado.

La figura 10 es un diagrama de flujo de un método para crear un producto de cacao micelizado.

**Sumario de la invención**

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención proporciona un método para la preparación de un cacao micelizado. También se describen en el presente documento, pero no forman parte de la invención según se reivindica, los métodos para la preparación de otro producto de sustrato agrícola micelizado. Este método incluye la etapa para proporcionar granos de cacao preparados u otro sustrato agrícola, que incluye proporcionar granos de cacao u otro sustrato agrícola y esterilizar los granos de cacao u otro sustrato agrícola para proporcionar granos de cacao preparados u otro sustrato agrícola. El método también incluye la etapa de proporcionar un componente fúngico preparado. El método también comprende inocular los granos de cacao preparados u otro sustrato agrícola con el componente fúngico preparado y cultivar el inóculo para preparar el cacao micelizado u otro producto de sustrato agrícola.

El método puede incluir reducir la cantidad de componentes de sabor indeseables. La reducción de la cantidad de componentes de sabor indeseables incluye opcionalmente al menos una, o dos extracciones acuosas de granos de cacao u otro sustrato agrícola. Un componente de sabor indeseable incluye metilxantinas, tales como teobromina y/o 2-metoxi-3-isopropilpirazina.

El método puede incluir una etapa para hidratar los granos de cacao u otro sustrato agrícola, opcionalmente a aproximadamente el 60 %. Los métodos descritos también incluyen cuando el componente fúngico preparado es *G. lucidum*, opcionalmente, cepa 806 de *G. lucidum*, *C. sinensis*, y/o *T. melanosporum*. Los métodos pueden incluir el cribado de varias cepas de hongos y la selección de una cepa que tenga una capacidad mejorada para hacer crecer, metabolizar o utilizar granos de cacao u otro sustrato agrícola, y/o seleccionar una cepa que sea capaz de eliminar mejor uno o más componentes de sabor indeseables de los granos de cacao u otro sustrato agrícola, y/o la eliminación mejorada de la cafeína de los granos de cacao u otro sustrato agrícola.

El componente fúngico preparado se puede mantener en un medio indefinido que comprende un extracto acuoso de granos de cacao u otro extracto de sustrato agrícola y una fuente de energía, o, como alternativa, el medio comprende 2-metoxi-3-isopropilpirazina y/o metilxantinas, tal como teobromina. El mantenimiento de la cepa de hongos causa una adaptación de los hongos que da como resultado la mejora de capacidad de los hongos para hacer crecer, metabolizar o utilizar granos de cacao u otros sustratos agrícolas, y/o 2-metoxi-3-isopropilpirazina y/o metilxantinas, tal como teobromina.

Los métodos también pueden incluir cuando la etapa de cultivo puede ser una etapa de fermentación realizada en condiciones semi-anaerobias, opcionalmente durante aproximadamente 7 días.

Se describen en el presente documento, pero no se reivindican, y no forman parte de la invención, métodos que pueden dar como resultado productos micelizados de café que tienen niveles reducidos de componentes de sabor indeseables, tales como 2-metoxi-3-isopropilpirazina y/o metilxantinas, tal como teobromina, y niveles aumentados de productos de micelización, tales como beta glucanos, pirazinas y polisacáridos, con respecto a los granos de cacao u otro sustrato agrícola.

En el presente documento se proporciona un producto de cacao micelizado preparado por los métodos de la invención, y un cacao micelizado que tiene niveles reducidos de componentes de sabor indeseables y niveles aumentados de productos de micelización en relación con los granos de cacao de partida o sin tratar u otro sustrato agrícola.

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona un método para la preparación de un producto de cacao micelizado. Este método

incluye la etapa de proporcionar cacao preparado, que incluye proporcionar el cacao y esterilizar el cacao u otro sustrato agrícola para proporcionar cacao preparado u otro sustrato agrícola. El método también incluye la etapa de proporcionar un componente fúngico preparado. El método también comprende inocular el cacao preparado con el componente fúngico preparado y cultivar el cacao preparado u otro sustrato agrícola y el componente fúngico preparado para permitir que la micelización produzca el cacao micelizado. Estas etapas se pueden realizar en cualquier orden.

También se proporciona cacao preparado, que incluye la etapa de proporcionar cacao u otro sustrato agrícola.

Un sustrato agrícola incluye granos de cacao u otro sustrato agrícola. El café se refiere al género *Coffea*, que es un género de plantas con flores cuyas semillas, llamadas de forma variada granos de café o granos de café verdes, se utilizan para hacer café. Es un miembro de la familia Rubiaceae. Los granos de café pueden seleccionarse de una de varias variedades de café que son diversos cultivares derivados de la reproducción selectiva o la selección natural de las plantas de café. Los granos de café de la misma variedad cultivados en diferentes ubicaciones pueden tener características distintivas tal como el sabor (los criterios de sabor incluyen términos como "ácido", "cítrico" o "terroso"), contenido de cafeína, sensación en el cuerpo o en la boca, y acidez. Los granos de cacao u otro sustrato agrícola divulgados en el presente documento pueden ser cualquier especie de café, incluyendo *Coffea arabica* y *Coffea robusta* (también conocido *Coffea conephora*); otras especies de café útiles para la presente invención incluyen *Coffea benghalensis*, o café de Bengala; *Coffea congensis*, o café del Congo; *Coffea liberica*, o café liberiano; *Coffea stenophylla*, o café de Sierra Leona; *Coffea excelsia*, otro café liberiano; *Coffea bonnierii*; *Coffea gallienii*; y *Coffea mogenetii*. Muchas variedades Arábica se nombran después del país o región en los que se encuentran predominantemente, o en los que se originaron. Algunas de las variedades a modo de ejemplo del café Arábica incluyen Typica, Bourbon, Caturra, Catuai, Mundo Nova, y Blue Mountain. También se describen las especies derivadas de café, incluidas las cepas o cultivares genéticamente modificadas (OGM) y también cualquier cepa o cultivares de variedades de herencia (sin OGM) de café.

Un sustrato agrícola son los granos de cacao. *Theobroma cacao*, en lo sucesivo en el presente documento "cacao" o "cacao", pertenece al género *Theobroma* clasificado bajo la subfamilia Sterculioidea de la familia de las malvas Malvaceae. Existen aproximadamente 20 variedades diferentes de cultivares de cacao y cientos de híbridos, y todas son adecuadas para su uso en la presente invención, por ejemplo, los granos de cacao adecuados son cacao Forastero, Cacao Criollo, cacao Trinitario, y cacao Nacional. Los granos de cacao (o cacao) adecuados para la presente invención se han cosechado cuando la vaina de cacao está madura. La vaina promedio de cacao produce entre 20 y 50 granos de cacao emulsionados en pulpa mucilaginoso. Generalmente, la vaina de cacao se prepara para el mercado mediante la fermentación de la vaina durante cuatro a siete días (para eliminar la pulpa) y los granos se secan durante otros cinco a catorce días. Los granos secos son adecuados para la presente invención.

Los granos de cacao crudos tienen una gran cantidad de bacterias de origen natural y otros microbios. Es común que los granos de cacao sean tratados con vapor sobrecalentado para mitigar el contenido bacteriano. Se cree que tratar los granos de cacao con vapor saturado también elimina algunos de los componentes de sabor deseables. Los granos de cacao tratados con vapor sobrecalentado también son adecuados para la presente invención.

Los sustratos agrícolas que pueden ser micelizados por los métodos descritos en el presente documento pero que no se reivindican y no forman parte de la invención incluyen: todos los cereales, granos, todas las especies de trigo, centeno, arroz integral, arroz blanco, arroz rojo, arroz dorado, arroz silvestre, arroz, cebada, triticale, arroz, sorgo, avena, mijo, quinoa, trigo sarraceno, fonio, amaranto, teff y trigo duro; manzanas y peras, albaricoques, cerezas, almendras, melocotones, fresas, pasas, mandioca, cacao, plátano, Rubiaceae sp. (café), limones, naranjas y pomelos; tomates, patatas, pimientos, berenjena, pimienta inglesa, mango en polvo, Angélica, anís (*Pimpinella anisum*), mirto anís (*Syzygium anisatum*), achiote (*Bixa orellana*), mastranzo (*Mentha suaveolens*), Artemisia vulgaris, artemisa, asafétida (*Ferula assafoetida*), Berberis, plátano, albahaca (*Ocimum basilicum*), hojas de laurel, bistorta (*Persicaria bistorta*), cardamomo negro, comino negro, grosella negra, limón negro, fucus (*Fucus vesiculosus*), cohosh azul, Mallee de hoja azul (*Eucalyptus polybractea*), té de labrador (*Rhododendron groenlandicum*), boldo (*Peumus boldus*), cilantro boliviano (*Porophyllum ruderale*), borraja (*Borago officinalis*), cálamo, caléndula, colombo (*Jateorhiza calumba*), manzanilla, cannabis, alcaparra (*Capparis spinosa*), alcaravea, cardamomo, vaina de algarrobo, casia, casuarina, hierba gatera, uña de gato, chaya, pimienta de cayena, *Celastrus paniculatus*, consuelda, sal de apio, semilla de apio, centauro, perifollo (*Anthriscus cerefolium*), pamplina, achicoria, chile, polvo de chile, cinchona, cebollino (*Allium schoenoprasum*), perifollo (*Myrrhis odorata*), cilantro (véase coriandro) (*Coriandrum sativum*), canela (y *Cassia*), mirto canela (*Backhousia myrtifolia*), esclárea, azotalenguas, trébol, clavos, café, uña de caballo, consuelda, ruda común, condurango, coptis, cilantro, hierba de Santa María (*Tanacetum balsamita*), grama, perifollo verde (*Anthriscus sylvestris*), primula, árbol caminante (*Viburnum opulus*), berro, orégano cubano (*Plectranthus amboinicus*), hierba de pantano, comino, hoja de curry (*Murraya koenigii*), damiana (*Turnera aphrodisiaca*), diente de león (*Taraxacum officinale*), demulcente, garra del diablo (*Harpagophytum procumbens*), semilla de eneldo, eneldo (*Anethum graveolens*), pimienta de Dorrigo (*Tasmannia stipitata*), equinácea, Echinopanax Elatum, flor de las nieves, saúco, flor de saúco, elecampana, *Eleutherococcus senticosus*, epazote (*Chenopodium ambrosioides*), efedra, *Eryngium foetidum*, eucalipto, eucalipto (Foeniculum vulgare), fenogreco, matricaria, escrofularia, polvo de cinco especias (chino), Fo-ti-tieng, fumarica, galangal, Garam masala, berro de jardín, cebollino de ajo, ajo, jengibre (*Zingiber officinale*), Ginkgo biloba, ginseng, ginseng, ginseng siberiano (*Eleutherococcus senticosus*), ruda de la cabra (*Galega*

*officinalis*), Goada masala, vara de oro, hidrastis, Gotu Kola, amomo (*Aframomum melegueta*), granos de Selim (*Xylopiya aethiopyca*), extracto de semilla de uva, té verde, hiedra de tierra, guaco, menta de lobo, espinillo blanco (*Crataegus sanguinea*), árbol de espinillo blanco, cáñamo, hierbas de provenza, hibisco, acebo, cardo mariano, lúpulo, marrubio, rábano picante, cola de caballo (*Equisetum telmateia*), hisopo (*Hyssopus officinalis*), jalapa, jazmín, perla jazmín, yiaogulan (*Gynostemma pentaphyllum*), hierba de Joe Pye (eupatoria púrpura), Juan el conquistador, enebro, hojas de lima kafir (*Citrus hystrix*, *C. papedia*), Kaala masala, gigante chino, Kokam, té de labrador, sanjuanera, alchemilla, berro, lavanda (*Lavandula* spp.), ledum, melisa (*Melissa officinalis*), albahaca de limón, hierba limón (*Cymbopogon citratus*, *C. flexuosus*, y otras especies), corteza de hierro de limón (*Eucalyptus staigeriana*), menta limón, mirto de limón (*Backhousia citriodora*), tomillo de limón, verbena de limón (*Lippia citriodora*), regaliz - adaptógeno, flor de lima, *Limnophila aromatica*, linaza, regaliz, pimienta larga, apio monte (*Levisticum officinale*), fruta del monje, macis, Mahlab, Malabathrum, árbol del diablo (*Aralia manchurica*), mandrágora, mejorana (*Origanum majorana*), Marrubium vulgare, té de labrador de pantano, malvavisco, masilla, reina de los prados, Mei Yen, pimienta Melegueta (*Aframomum melegueta*), menta, cardo mariano (*Silybum*), bergamota (*Monarda didyma*), agripalma, escutelaria de montaña, gordolobo (*Verbascum thapsus*), mostaza, semilla de mostaza, *Nashia inaguensis*, nimbo de la India, menta gatuna, ortiga, *Nigella sativa*, Kolanji, alcaravea negra, noni, nuez moscada, macis, marihuana, onagra (*Oenothera biennis*), olida (*Eucalyptus olida*), orégano (*Origanum vulgare*, *O. heracleoticum*), raíz de lirio, perejil del monte, hoja de olivo (utilizada en té y como complemento de hierbas), *Panax quinquefolius*, hoja de pandan, pimentón, perejil (*Petroselinum crispum*), flor de la pasión, pachulí, poleo menta, pimienta (negra, blanca y verde), hierbabuena, goma de menta (*Eucalyptus dives*), perilla, banano, granada, Ponch phoran, semilla de amapola, primula (*Primula*), flores confitadas, mezclas secas de té, psilio, verdolaga, cuasia, cuatro especias, ajo de oso, frambuesa, frambuesa (hojas), reishi, gatuña, *Rhodiola rosea*, aliso cereza (*Syzygium luehmannii*), cohete/rúcula, manzanilla romana, roibos, rosa mosqueta, romero (*Rosmarinus officinalis*), bayas de Rowan, ruda, cártamo, azafrán, salvia (*Salvia officinalis*), canela de Saigón, hierba de San Juan, pimpinela menor (*Sanguisorba minor* o *Poterium sanguisorba*), salvia, pimienta de Sichuan (Sansho), sasafrás, ajedrea (*Satureja hortensis*, *S. montana*), schisandra (*Schisandra chinensis*), *Scutellaria costaricana*, senna (hierba), Senna obtusifolia, semilla de sésamo, acederilla, bolsa de pastor, sialogogo, ginseng siberiano (*Eleutherococcus senticosus*), Siraitia grosvenorii (fruta del monje), escutelaria, bayas de endrino, sahumero, cerraja, acedera (*Rumex* spp.), ajeno, menta verde, verónica, escila, anís estrellado, estevia, hojas de fresa, suma (*Pfaffia paniculata*), sumac, ajedrea de jardín, *Sutherlandia frutescens*, pasto dulce, perifollo oloroso (*Myrrhis odorata*), asperilla olorosa, pimienta de Szechuan (*Xanthoxylum piperitum*), tacamahaca, tamarindo, Tandoori masala, tanaceto, estragón (*Artemisia dracuncululus*), té, zamarilla, albahaca tailandesa, cardo, tomillo, guandú, tormentilla, *Tribulus terrestris*, albaha morada (*Ocimum tenuiflorum*), cúrcuma (*Curcuma longa*), uva de oso también conocido como Bearberry, vainilla (*Vanilla planifolia*), vasaka, verbena, vetiver, cilantro vietnamita (*Persicaria odorata*), wasabi (*Wasabia japonica*), berro de agua, semilla de zarzo, jengibre silvestre, lechuga silvestre, tomillo silvestre, ajedrea de invierno, hamamelis, bayas de Goji, hierba de San Benito, betónica, aspécula, ajeno, milenrama, yerba buena, yerba mate, yohimbina, Za'atar, raíz de cúrcuma zedoary, o derivaciones de los mismos en una o más soluciones acuosas o semiacuosas.

#### ETAPA DE HIDRATACIÓN Y LAVADO

40 Los granos de cacao u otro sustrato agrícola pueden prepararse para su uso en los métodos divulgados en el presente documento, dando como resultado un grano de cacao preparado u otro sustrato agrícola.

El grano de cacao u otro sustrato agrícola opcionalmente no se seca antes de ser utilizado en los procesos. Después de cosechar el grano de cacao u otro sustrato agrícola, al grano de cacao u otro sustrato agrícola se le quita la pulpa opcionalmente mediante cualquier proceso conocido en la técnica (desmucilagización), tal como fermentación, y después el grano de cacao u otro sustrato agrícola se pueden utilizar en la presente invención sin tratamiento adicional del grano de cacao u otro sustrato agrícola, tal como secado. La pulpa también puede conservarse. Generalmente, después de una etapa de fermentación (desmucilagización), los granos de cacao tienen un contenido de humedad de aproximadamente el 55 % al 60 %. En este método, la etapa de hidratación y/o lavado como se describe a continuación no es necesaria o se evita mediante el uso del grano de cacao u otro sustrato agrícola sin secar. En algunos métodos, el grano de cacao u otro sustrato agrícola pueden secarse parcialmente y posteriormente hidratarse como se describe en el presente documento.

55 Los granos de cacao u otro sustrato agrícola se pueden preparar mediante una etapa de hidratación de los granos de cacao u otro sustrato agrícola. La hidratación es particularmente útil cuando los granos de cacao u otro sustrato agrícola se han secado. La hidratación garantiza que los sustratos tengan un contenido de humedad óptimo para el proceso de cultivo (micelización). La hidratación se puede realizar mediante una serie de métodos conocidos en la técnica.

60 La hidratación se puede realizar mediante un medio acuoso. El medio acuoso incluye agua y opcionalmente, excipientes adicionales. El agua puede ser, sin limitación, desionizada, de red, destilada o mineralizada. Se pueden añadir otros excipientes al agua, tales como los tampones para mantener un cierto pH, cloruro de sodio, ácido cítrico y/o ácido ascórbico. El pH puede ser neutro o ajustado. La temperatura del medio acuoso puede ser la temperatura ambiente, o una temperatura elevada para acelerar el proceso de hidratación.

65 La hidratación se puede lograr permitiendo que los granos de cacao u otro sustrato agrícola se remojen en el medio

- acuoso durante un periodo de tiempo apropiado, que varía de unos pocos segundos o menos hasta durante una noche. Los granos de cacao, por ejemplo, son bastante higroscópicos y requerirán menos tiempo para hidratarse. La etapa de remojo para la etapa de hidratación y/o extracción acuosa puede ser inferior a un segundo, al menos cinco segundos, al menos diez segundos, al menos treinta segundos, al menos un minuto, al menos cinco minutos, al menos diez minutos, al menos veinte minutos, al menos treinta minutos, al menos cuarenta minutos, al menos cincuenta minutos, al menos una hora, al menos una hora y media, al menos dos horas, al menos dos horas y media, al menos tres horas, al menos cuatro horas, al menos cinco horas, al menos seis horas, al menos siete horas, al menos ocho horas, al menos diez horas, al menos doce horas, o al menos quince horas, al menos dieciocho horas, al menos veinticuatro horas, al menos treinta y seis horas, o al menos cuarenta y ocho horas. Sin embargo, el tiempo para la etapa de hidratación debe seleccionarse en vista del hecho de que los granos de cacao u otro sustrato agrícola no son estériles y el remojo durante mucho tiempo puede estimular el crecimiento de organismos indeseables. El tiempo de hidratación debe seleccionarse para optimizar el contenido de humedad del sustrato y los componentes moleculares del grano de cacao u otros sustratos agrícolas.
- 15 Los granos de cacao u otro sustrato agrícola pueden hidratarse a cualquier temperatura que permita una hidratación eficaz; en una realización, la temperatura del componente acuoso es la temperatura ambiente. La temperatura de hidratación debe seleccionarse debido al hecho de que a altas temperaturas, los componentes de sabor deseables pueden alterarse.
- 20 La hidratación se puede realizar a presión atmosférica normal o se puede realizar bajo presiones aumentadas para acelerar el proceso de hidratación y/o el proceso de extracción acuosa, tal como entre 1 y 2 atmósferas, por ejemplo, a 1,5 atmósferas.
- 25 El contenido de humedad de los granos de cacao hidratados u otro sustrato agrícola está opcionalmente entre aproximadamente un 20 % y aproximadamente un 80 % de contenido de humedad, entre un 40 % y un 70 % de contenido de humedad. En un método, el contenido de humedad es de al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 50 %, o al menos aproximadamente el 60 %. En un método, para el grano de cacao, el contenido de humedad es de al menos aproximadamente el 36 %.
- 30 La etapa de hidratación puede tener lugar en un contenedor por cualquier método conocido en la técnica. En un método, el contenedor es un bidón, tal como un bidón de 55 galones, o un cubo de 5 galones. En este método, se deja reposar una relación volumétrica 1:1 (volúmenes iguales) de granos de cacao u otro sustrato agrícola:componente acuoso durante 5 minutos a 24 horas. Por ejemplo, el bidón de 55 galones o el cubo de 5 galones se llena hasta la mitad con granos de cacao u otro sustrato agrícola y se añade medio acuoso para sumergir los granos de cacao u otro sustrato agrícola. En este método, los granos de cacao u otro sustrato agrícola pueden absorber todo el componente acuoso. En otro método, los granos de cacao u otro sustrato agrícola, guardados en un contenedor, pueden llenarse con agua para sumergir completamente los granos, en un método, sin un exceso significativo.
- 40 La etapa de proporcionar granos de cacao preparados u otro sustrato agrícola incluye opcionalmente una etapa para eliminar componentes de sabor indeseables lavando o aclarando los granos de cacao u otro sustrato agrícola. El lavado o aclarado puede ser el medio acuoso como se describe anteriormente. En un método, los granos de cacao u otro sustrato agrícola opcionalmente se lavan o aclaran antes, durante o después de la etapa de hidratación opcional. El lavado, drenaje y/o aclarado de los granos de cacao u otro sustrato agrícola se puede realizar por cualquier método conocido en la técnica. Los granos de cacao u otro sustrato agrícola se pueden lavar una vez, al menos dos veces, al menos tres veces, al menos cuatro veces, al menos cinco veces, al menos diez veces, al menos quince veces, al menos veinte veces, al menos cincuenta veces o más. En un método, la etapa de lavado se realiza dos veces. La etapa de lavado o aclarado puede incluir tiempos de remojo opcionales como se describe en el presente documento.
- 50 Los granos de cacao u otro sustrato agrícola se pueden lavar mediante un método para llenar un contenedor que contiene los granos de cacao u otro sustrato agrícola con agua para sumergir el cacao u otros sustratos agrícolas, permitir que el agua se remoje durante 10 segundos a 4 horas, drenar el agua y repetir las etapas tantas veces como se desee, o para elevar los granos hasta el nivel de humedad deseado. La etapa de lavado o aclarado también puede realizarse hasta que los granos de cacao u otro sustrato agrícola hayan eliminado una cantidad determinada de componente de sabor indeseable.
- 55 Los granos de cacao u otro sustrato agrícola pueden lavarse a cualquier temperatura que permita la extracción eficiente de componentes de sabor indeseables; la temperatura del medio acuoso puede ser la temperatura ambiente. La temperatura de lavado debe seleccionarse teniendo en cuenta que a altas temperaturas, los componentes de sabor deseables pueden alterarse, destruirse y/o extraerse.
- 60 El exceso de medio o componente acuoso puede eliminarse y/o separarse y/o drenarse de los granos de cacao hidratados u otro sustrato agrícola después de la etapa de hidratación. Esta etapa también puede denominarse etapa de extracción acuosa. Esta etapa se puede hacer para eliminar los componentes de sabor indeseables.
- 65 Los componentes principales del café incluyen cafeína, minerales, ácido tánico, celulosa, agua, grasa, proteínas y fibras. El café contiene metilxantinas tales como cafeína, teofilina y teobromina, y otras clases de compuestos tales

como flavonoides, fenoles, ácidos fenólicos, alcaloides volátiles, alcaloides no volátiles y ácidos clorogénicos, entre otros. El café tostado también contiene algunos componentes de sabor indeseables. Estos componentes contribuirán a la percepción de un sabor áspero y/o amargo del café. Los granos de cacao también son amargos, resultante de compuestos tales como 2-metoxi-3-isopropilpirazina y metilxantinas tal como teobromina, por ejemplo. Estos componentes de sabor indeseables suelen mitigarse mediante la adición de azúcar o crema para enmascarar los componentes de sabor indeseables que añaden azúcar y grasas no deseadas a la dieta del usuario. La reducción de la amargura y/o la dureza se observa en las variedades de café más caras y de mayor calidad, tal como el café Arábica.

La etapa de hidratación, la etapa de extracción acuosa, la etapa de lavado y/o aclarado, individualmente o en combinación, opcionalmente pueden reducir y/o eliminar componentes de sabor indeseables de los granos de cacao u otro sustrato agrícola y se pueden realizar como se describe en el presente documento hasta que la cantidad deseada de componente de sabor no deseado se ha eliminado de los granos de cacao u otro sustrato agrícola.

En algunos métodos, los componentes de sabor indeseables se eliminan e incluyen métodos en los que se elimina el 5 % de los componentes de sabor indeseables; en otros métodos, hasta el 10 %, hasta el 15 %, hasta el 20 %, hasta el 25 %, hasta el 30 %, hasta el 35 %, hasta el 40 %, hasta el 45 %, hasta el 50 %, hasta el 55 %, hasta el 60 %, hasta el 65 %, hasta el 70 %, hasta el 75 %, hasta el 80 %, hasta el 85 %, hasta el 90 %, o hasta el 95 % de los componentes de sabor indeseables en los procesos de la presente invención, incluyendo la etapa de aclarado. Se puede eliminar de aproximadamente el 25 % a aproximadamente el 80 % de los componentes de sabor indeseables, o se puede eliminar aproximadamente el 45-50 % de los componentes de sabor indeseables.

La determinación de la extensión de la eliminación de al menos un componente de sabor indeseable puede determinarse por el aspecto, sabor y/o composición química (por métodos conocidos en la técnica) del producto micelizado. Como alternativa, la apariencia o composición química de los granos de cacao u otro sustrato agrícola se puede determinar por métodos conocidos. Esta determinación puede ser cuantitativa, por ejemplo, la composición química del producto micelizado puede medirse mediante métodos de ensayo, o determinarse cualitativamente mediante pruebas de sabor por expertos.

Se puede eliminar hasta el 5 % de uno o más de los componentes de sabor indeseables; en otros métodos, hasta el 10 %, hasta el 15 %, hasta el 20 %, hasta el 25 %, hasta el 30 %, hasta el 35 %, hasta el 40 %, hasta el 45 %, hasta el 50 %, hasta el 55 %, hasta el 60 %, hasta el 65 %, hasta el 70 %, hasta el 75 %, hasta el 80 %, hasta el 85 %, hasta el 90 %, o hasta el 95 % de uno o más de los componentes de sabor indeseables. En un método, uno o más de los componentes de sabor indeseables se eliminan cuantitativamente.

En un método, la reducción de los componentes de sabor deseables, tales como aceites volátiles, se minimiza mediante los procesos de la presente invención. En el procesamiento de granos de cacao u otro sustrato agrícola, la técnica enseña a tratar con vapor, extracto de vapor, o tira de vapor los granos de cacao u otro sustrato agrícola antes del tostado, que puede eliminar muchos aceites volátiles deseables. Los procesos pueden evitar la etapa de tostado al vapor, lo que ayuda a conservar los aceites volátiles deseables que contribuyen al sabor del cacao.

#### TRATAMIENTO TÉRMICO

Los métodos comprenden opcionalmente un método de tratamiento térmico tal como pasteurización y/o esterilización de los granos de cacao u otro sustrato agrícola. En un método, los granos de cacao u otro sustrato agrícola se esterilizan para proporcionar granos de cacao preparados u otro sustrato agrícola. Esta etapa puede realizarse por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, esta etapa puede realizarse a presión atmosférica o a presión aumentada. Esta etapa también puede denominarse "preprocesamiento". Esta etapa se realiza para reducir o eliminar los contaminantes de organismos microbianos o fúngicos no deseados en los granos de cacao u otro sustrato agrícola, particularmente las esporas de moho.

Los métodos para la pasteurización y/o esterilización se pueden realizar como se conoce en la técnica. Como ejemplo de pasteurización, los granos de cacao u otro sustrato agrícola pueden someterse a un tratamiento de calor seco a presión atmosférica de 145 °F a 190 °F durante 30 a 90 minutos, como alternativa, de 140 °F a 210 °F durante 20-100 minutos.

La esterilización de los granos de cacao u otro sustrato agrícola se puede realizar como se conoce en la técnica. Por ejemplo, los granos de cacao u otro sustrato agrícola se pueden esterilizar por calentamiento a presión a 15 lb/in<sup>2</sup> a 121-122 °C durante 20 a 100 minutos, como 90 minutos, y añadiendo ¼ lb por cada 1.000 pies sobre el nivel del mar, el vapor se sobrecalienta a 251-255 °F. En un método, los granos de cacao se esterilizan durante 80 minutos a 22 psi con vapor saturado ligeramente seco a 255 °C. Los granos de cacao u otro sustrato agrícola se pueden esterilizar en un contenedor. El contenedor puede ser opcionalmente el mismo contenedor que el contenedor utilizado para la etapa de extracción acuosa y/o hidratación. El contenedor puede estar opcionalmente sellado y los granos de cacao u otro sustrato agrícola pueden esterilizarse mediante la aplicación de calor al exterior del contenedor. En un método, el calor se proporciona aplicando vapor al exterior del contenedor durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la esterilización del contenido.

El contenedor sellado de algunos métodos puede proporcionar algunas ventajas. Por ejemplo, el sellado del contenedor minimiza la salida de componentes de sabor y componentes aromáticos de los granos de cacao u otro sustrato agrícola, lo que puede apreciarse notarse por la falta de aroma de los granos de cacao u otro sustrato agrícola del vapor de la olla a presión o autoclave durante el proceso de esterilización. El sellado también evita que el sabor soluble en agua y los componentes aromáticos escapen de los granos de cacao u otros granos de sustrato agrícola directamente en vapor, aire caliente o agua caliente.

Los contenedores adecuados incluyen contenedores conocidos en la técnica para el cultivo de setas. Opcionalmente, los contenedores tienen una sección para intercambiar aire o gases, pero no permiten el paso de ningún otro componente. Dichas secciones se conocen en la técnica e incluyen tiras de filtro. En un método, el contenedor es un bidón, por ejemplo, un bidón de 55 galones. En algunos métodos, los contenedores de la presente invención pueden ser bidones de vidrio, carbono y acero inoxidable, garrafas o bolsas o bidones de polipropileno. Los fermentadores y biorreactores también pueden usarse como contenedores de la presente invención. En algunos métodos, los contenedores tienen un medio para el intercambio de gases que impide el paso de contaminantes, tales como zonas de filtro o válvulas. En un método, el contenedor es una bolsa, por ejemplo, un autoclavable, una bolsa de polipropileno con tiras de filtro, y una bolsa de polietileno irradiada con rayos gamma con zonas de filtro.

Una ventaja adicional de las bolsas descritas anteriormente es que cuando están selladas, se ajustan a la forma de los granos de cacao u otros granos de sustrato agrícola cuando se presurizan durante la etapa de esterilización. La conformación de las bolsas con la forma de los granos de cacao u otro sustrato agrícola inhibe el movimiento de los granos de cacao u otro sustrato agrícola entre sí, previniendo o minimizando la degradación de la superficie de los granos o sustratos. Esta adaptación de la bolsa a la forma de los granos de cacao u otro sustrato agrícola también mejora la transferencia de calor, ya que la falta de aire evita el aislamiento del aire de los granos de cacao u otro sustrato agrícola del calor. Las bolsas pueden ser de cualquier dimensión. En un método, las bolsas se alargan o se aplanan para acelerar el proceso de calentamiento, por ejemplo, la longitud puede ser tres veces el diámetro de la bolsa. Esta dimensión también puede facilitar el apilamiento ventajoso de las bolsas o el posicionamiento de las bolsas para la esterilización.

El tamaño de las bolsas a usar se puede elegir de acuerdo con el volumen o la cantidad de granos de cacao u otro sustrato agrícola a tratar mediante los métodos divulgados en el presente documento. Las cantidades a modo de ejemplo de granos de cacao u otro sustrato agrícola a usar por bolsa incluyen de 1 lb a 150 lb de granos de cacao u otro sustrato agrícola, aunque se contemplan cantidades mayores y menores de granos de cacao u otro sustrato agrícola.

En otro método, las bolsas se aplanan, teniendo un grosor de 1/10 o menos que la suma de los bordes periféricos de cada bolsa. Las bolsas pueden ser de forma redonda, teniendo una circunferencia que define los bordes periféricos de cada bolsa. Como alternativa, las bolsas pueden ser rectangulares de manera que la suma de los lados defina los bordes periféricos de cada bolsa. Las bolsas se pueden unir para que una serie de bolsas rectangulares se puedan manipular fácilmente en un entorno de producción. Todas las bolsas tienen parches respirables (tiras de filtro) que proporcionan la aproximación de un entorno anaerobio. En aún otro método, las bolsas se aplanan para mantener una capa de granos que tiene menos de tres granos de espesor. Por consiguiente, el calor penetra rápidamente en las bolsas aplanadas hacia los granos para efectuar la esterilización o la pasteurización. En este método, debido a la presurización, la bolsa se ajustará a la forma de los granos de cacao u otro sustrato agrícola, y esto producirá una superficie granulada en la superficie exterior de cada bolsa cuando se aplique presión. La superficie granulada de la bolsa forma espacios intersticiales que permiten que el calor penetre entre las bolsas que se apilan para acelerar el proceso de esterilización o pasteurización. La superficie granulada de las bolsas también induce un flujo de fluido turbulento a lo largo de la superficie de la bolsa para mejorar la transferencia de calor a los granos de cacao u otro sustrato agrícola.

En otro método, los granos de cacao u otro sustrato agrícola se envasan al vacío en las bolsas para eliminar el aire que podría extraer el sabor volátil o los componentes aromáticos de las bolsas.

En otro método, las bolsas se reemplazan por láminas de material autoclavable, tal como plástico libre de BPA. Una lámina base se dispensa continuamente a lo largo de la parte superior de un transportador, los granos de cacao u otros sustratos agrícolas se colocan sobre la lámina base dispensada. Una segunda lámina superior se superpone sobre los granos de cacao u otro sustrato agrícola y se sella a la lámina base. Se aplica un vacío entre la lámina superior e inferior para evacuar el aire, luego las láminas se sellan a distancias predeterminadas para formar secciones. Cada sección contiene un volumen predeterminado de granos de cacao u otro sustrato agrícola. Las secciones se transportan a través de un autoclave, u horno, para efectuar el proceso de pasteurización o esterilización. El calor se puede aplicar en un ambiente presurizado o no presurizado en forma de vapor, agua caliente a presión, aire caliente en flujo turbulento o laminar sobre las láminas, u otro fluido calentado. En una variación, las secciones que contienen los granos de cacao u otro sustrato agrícola se enrollan y se colocan en un autoclave para su presurización o esterilización. Un rollo puede contener muchas secciones.

Dado que los granos de cacao u otro sustrato agrícola causan una superficie granulada en el exterior de las láminas, existe un espacio intersticial en la superficie exterior de las láminas para acelerar el proceso de pasteurización o



esterilización permitiendo que el fluido caliente penetre fácilmente entre las láminas. La superficie granulada de la lámina también induce un flujo de fluido turbulento que mejora aún más la transferencia de calor a los granos de cacao u otro sustrato agrícola. La superficie granulada inhibe el movimiento relativo entre los granos para asegurar que los granos de cacao u otro sustrato agrícola no se agrieten, se rompan o se froten.

5

## COMPONENTE FÚNGICO

El componente fúngico es como se define en las reivindicaciones adjuntas. En el presente documento también se describen los hongos del filo Basidiomycotina de Eumycota, incluidos los hongos que pertenecen a Polyporaceae y Hericiaceae, en los que los hongos seleccionados de Basidiomycotina de Eumycota incluyen Eumycota, incluyendo al menos uno seleccionado de Basidiomycotina y Ascomycotina, incluyendo las cepas: *Hericium erinaceus*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus citrinopileatus*, *Pleurotus djamor*, *Trametes versicolor*, *Lentinula edodes*, *Armillariella mellea*, *Tricholoma matsutake*, *Flammulina velutipes*, *Vovariella volvacea*, *Agaricus campestris*, *Agaricus blazei*, *Grifola frondosa*, *Pholiota nameko*, *Agrocybe cylindracea*, *Boletus ornatipes*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma tsugae*, *Hypsizygus marmoreus*, *Laricifomes officinalis*, *Morchella hortensis*, *Morchella angusticeps*, *Phellinus linteus*, *Auricularia auricula*, *Tremella fuciformis*, *Inonotus obliquus*, *Fomes fomentarius*, *Laetiporus sulphureus*, *Bridgeoporus nobilissimus*, *Cordyceps sinensis*, *Cordyceps militaris*, *Xylaria nigripes*, *Tuber melanosporum*, *Tuber magnatum*, *Polyporus umbellatus*.

10

15

20

25

30

Generalmente, la invención no contempla el uso de los siguientes hongos: *Rhizopus chinensis*, *R. oligosporus*, *Aspergillus flavusoryzae*, *A. tamari*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. sojae*, *Fusarium venenatum*, *F. graminearum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. exiguus*, *S. pombe*, *Saccharomycopsis (Candida) lipolytica*, *Candida utilis*, *C. krusei* o *C. tropicalis*, *Pichia saitoi*, *Kluyveromyces fragilis*, *Endomycopsis fibuliger*, el Ascomycete *Chaetomium*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Mucor racemosus*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium camemberti*, *P. notatum*, *P. griseofulvum*, *P. grisea*, *P. chrysogenum*, *P. roqueforti*, *P. nalgiovense*, *Neurospora intermedia*, *Amylomyces rouxii*, *Endomycopsis burtonii*, *Psilocybin*, *Monascus purpureus*, *Debaryomyces hansenii*, *Ashbya gossypii*, *Blakeslea trispora*, *Tolypocladium niveum*, *T. inflatum*, *Streptomyces*, *Neocosmospora*, *Stachybotrys*, *Beauveria*, *Cephalosporium acremonium*, *C. acremonium*, *Gibberella fujikuroi*, *Fusidium coccineum*, *Monascus ruber*, *Claviceps fusiformis*, *C. paspali*, *C. purpurea*, *Aminita muscaria*, o *A. phalloides*.

35

Los componentes fúngicos útiles en los métodos divulgados en el presente documento pueden prepararse mediante métodos como se describe en el presente documento. Por ejemplo, se puede usar una cepa pura de hongos. En algunos métodos, la cepa pura del hongo es capaz de hacer crecer y/o micelizar eficazmente los granos de cacao preparados u otro sustrato agrícola para preparar los productos micelizados. Se puede usar cualquier cepa de hongo identificado en el presente documento que sea capaz de hacer crecer eficazmente y/o micelizar granos de cacao preparados u otro sustrato agrícola.

40

45

Los componentes fúngicos pueden prepararse mediante métodos como se describe en el presente documento. Por ejemplo, se puede usar una cepa pura de hongos. Sorprendentemente, los inventores de la presente invención descubrieron que algunas cepas de hongos de una especie particular tienen una capacidad mejorada y/o aumentada para hacer crecer, metabolizar o utilizar y/o modificar de otro modo los granos de cacao u otro sustrato agrícola y/o eliminar uno o más componentes de sabor indeseables de los granos de cacao u otro sustrato agrícola y/o tolerar mejor la presencia de granos de cacao u otro sustrato (o extracto) agrícola en el medio. En un método, el componente de sabor indeseable son metilxantinas, tales como teobromina y/o 2-metoxi-3-isopropilpirazina. En otro, el componente fúngico reduce o elimina la cafeína de los granos de cacao u otro sustrato agrícola.

50

55

Los métodos descritos en el presente documento pueden tener como etapa adicional opcional un método para seleccionar un componente fúngico que tenga una capacidad mejorada y/o mayor para hacer crecer, metabolizar o utilizar y/o modificar de otro modo los granos de cacao u otro sustrato agrícola y/o eliminar uno o más componentes de sabor indeseables de los granos de cacao u otro sustrato agrícola, y/o eliminar la cafeína, y/o tolerar mejor la presencia de granos de cacao u otro sustrato (o extracto) agrícola en el medio. Este método comprende el cribado de varias cepas de una especie de hongos deseada para seleccionar un componente (cepa) fúngico adecuado que muestre la capacidad mejorada y/o mayor de hacer crecer, metabolizar o utilizar y/o modificar de otra manera los granos de cacao u otro sustrato agrícola y/o eliminar uno o más componentes de sabor indeseables y/o cafeína de los granos de cacao u otro sustrato agrícola, y usar estas cepas seleccionadas en los métodos de la invención.

60

En un método, una cepa adecuada generará un anillo distintivamente oscuro de materia de café alrededor del perímetro de la colonia en una placa de petri, que muestra que la cepa rechaza y excluye activamente ciertos aspectos del café como fuente de alimento. El color oscuro del anillo, sin quedar ligado a la teoría, muestra que el ácido clorogénico se rechaza como fuente de alimento y se elimina/volatiliza de la cepa, y/o se digiere antes del crecimiento excesivo de hongos.

65

En un método, se utiliza una cepa pura de cualquier *Ganoderma lucidum* disponible comercialmente como componente fúngico. Si bien todas las cepas de *Ganoderma lucidum* son eficaces para la presente invención, se encontró sorprendentemente que algunas cepas seleccionadas tienen las capacidades mejoradas útiles para la presente invención como se describe en el presente documento. Una de dichas cepas útiles para el componente fúngico de la

presente invención es la cepa 806 de *Ganoderma lucidum*, (Alice Chen; Buffalo, NY; 4/94) disponible comercialmente en la Pennsylvania State University (The Pennsylvania State University Mushroom Culture Collection, disponible en el College of Agriculture Sciences, Department of Plant Pathology and Environmental Microbiology, 117 Buckhout Laboratory, The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, USA 16802). Esta cepa o cepas seleccionadas se depositaron con la ATCC como se describe a continuación en el presente documento.

Esta cepa se determinó sorprendentemente por los presentes inventores para hacer crecer de manera más eficiente, metabolizar o utilizar y/o modificar de otro modo los granos de cacao u otro sustrato agrícola y/o eliminar uno o más componentes de sabor indeseables de los granos de cacao u otro sustrato agrícola, incluido el ácido clorogénico y/o tolerar mejor la presencia de granos de cacao u otro sustrato (o extracto) agrícola en el medio. Esta cepa puede eliminar y/o reducir la cantidad de cafeína en los granos de cacao u otro sustrato agrícola. Por lo tanto, en un método, el componente fúngico es la cepa 806 de *Ganoderma lucidum* Alice Chen; Buffalo, NY; 4/94. Esta cepa o cepas seleccionadas se depositaron con la ATCC como se describe a continuación en el presente documento.

En un método, se utiliza una cepa pura de cualquier *Cordyceps sinensis* disponible comercialmente como componente fúngico. Si bien todas las cepas de *Cordyceps sinensis* son eficaces para la presente invención, se encontró sorprendentemente que algunas cepas seleccionadas tienen las capacidades mejoradas útiles para la presente invención como se describe en el presente documento. Una de dichas cepas útiles para el componente fúngico de la presente invención es *Cordyceps sinensis* (Cepa 1009, hongo oruga; Colorado Corp, 1/2014), disponible comercialmente en la Pennsylvania State University (The Pennsylvania State University Mushroom Culture Collection, disponible en el College of Agriculture Sciences, Department of Plant Pathology and Environmental Microbiology, 117 Buckhout Laboratory, The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, USA 16802).

Esta cepa se determinó sorprendentemente por los presentes inventores para hacer crecer de manera más eficiente, metabolizar o utilizar y/o modificar de otro modo los granos de cacao u otro sustrato agrícola y/o eliminar uno o más componentes de sabor indeseables de los granos de cacao u otro sustrato agrícola, incluyendo las metilxantinas, tales como teobromina y/o 2-metoxi-3-isopropilpirazina y/o tolerar mejor la presencia de granos de cacao u otro sustrato (o extracto) agrícola en el medio. Esta cepa puede eliminar y/o reducir la cantidad de cafeína en los granos de cacao u otro sustrato agrícola. Por lo tanto, en un método, el componente fúngico es *Cordyceps sinensis* (Cepa 1009, hongo oruga; Colorado Corp, 1/2014). Esta cepa o cepas seleccionadas se depositaron con la ATCC como se describe a continuación en el presente documento.

De forma similar, las cepas seleccionadas para *H. erinaceus*, *T. versicolor*, *L. edodes*, *T. matsutake*, *F. velutipes*, *A. blazei*, *G. frondosa*, *P. nameko*, *L. officinalis*, *M. hortensis*, *M. angusticeps*, *A. auricula*, *T. fuciformis*, *I. obliquus*, *F. fomentarius*, *L. sulfureus*, por ejemplo, (o para cualquier especie de hongos mencionada en el presente documento) se obtuvieron al cribar varias cepas de cada especie para seleccionar un componente (cepa) fúngico adecuado que exhibe la capacidad mejorada y/o aumentada para hacer crecer, metabolizar o utilizar y/o modificar de otra manera los granos de cacao u otro sustrato agrícola y/o eliminar uno o más componentes de sabor indeseables y/o la cafeína de los granos de cacao u otro sustrato agrícola, y/o es más capaz de tolerar la presencia de granos de cacao u otro sustrato agrícola, y usando esta cepa o cepas seleccionadas en los métodos de la invención. Por lo tanto, en algunos métodos, la cepa o cepas seleccionadas de *H. erinaceus*, *T. versicolor*, *L. edodes*, *T. matsutake*, *F. velutipes*, *A. blazei*, *G. frondosa*, *P. nameko*, *L. officinalis*, *M. hortensis*, *M. angusticeps*, *A. auricula*, *T. fuciformis*, *I. obliquus*, *F. fomentarius*, *L. sulfureus* se usan en los procesos divulgados en el presente documento. Esta cepa o cepas seleccionadas se depositaron con la ATCC como se describe a continuación en el presente documento.

En un método, una cepa pura de *Tuber melanosporum* se obtiene comercialmente. En otro, al menos una cepa se genera a partir de trufas silvestres y se usa como el componente fúngico. Aunque se pueden usar antibióticos en el cultivo, se encontraron cepas en crecimiento más vigorosas donde el medio de cultivo carecía de antibióticos. Por ejemplo, una cepa pura que comprende una cepa materna a la trufa original puede generarse mediante cultivo en agar indefinido que comprende hojas de roble y ramas de roble. una cepa pura que comprende una cepa paterna a la trufa original puede generarse mediante cultivo en agar indefinido que comprende hojas de roble y ramas de roble. Una cepa pura que comprende una cepa que comprende un cultivar derivado de recombinación genética no sexual o anastomosis de ambos tipos de emparejamiento materno y paterno puede generarse mediante el cultivo en agar indefinido que comprende hojas de roble y ramas de roble. En algunos métodos, los aislamientos apropiados (cepas) a usar incluyen aislamientos que dan como resultado un agradable aroma/sabor sabroso en el café micelizado, que recuerda a las flores (en algunos métodos, logrados por las cepas maternas a una trufa como se describe en el presente documento), o aislados (cepas) que dan como resultado un agradable aroma/sabor sabroso, que recuerda a las trufas, (en algunos métodos, se logra mediante un cultivar derivado de la recombinación genética no sexual o la anastomosis de los tipos de emparejamiento materno y paterno, como se describe en el presente documento). Esta cepa o cepas seleccionadas se depositaron con la ATCC como se describe en el presente documento.

Los métodos descritos en el presente documento pueden incluir el cribado de varias cepas de *T. melanosporum*, creadas como se describe anteriormente, para seleccionar un componente fúngico adecuado que muestre la capacidad mejorada y/o aumentada para hacer crecer, metabolizar o utilizar y/o modificar de otra manera los granos de cacao u otro sustrato agrícola y/o eliminar uno o más componentes de sabor indeseables y/o la cafeína de los granos de cacao u otro sustrato agrícola, y/o es más capaz de tolerar la presencia de granos de cacao u otro sustrato

agrícola, y usando esta cepa o cepas seleccionadas en los métodos de la invención. Esta cepa o cepas seleccionadas se depositaron con la ATCC como se describe en el presente documento.

Las cepas mencionadas en el presente documento están disponibles públicamente en The Pennsylvania State University Mushroom Culture Collection, disponible en el College of Agriculture Sciences, Department of Plant Pathology and Environmental Microbiology, 117 Buckhout Laboratory, The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, EE.UU. 16802, y de Fungi Perfecti, PO Box 7634, Olympia, WA 98507, EE.UU.

Todas las cepas a las que se hace referencia en el presente documento se depositan en la ATCC en 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209 EE.UU. según las disposiciones del Tratado de Budapest. El depósito estará disponible irrevocablemente y sin restricción o condición para el público tras la emisión de una patente y se mantendrá bajo los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los fines del Procedimiento de Patentes. Estos depósitos se hicieron simplemente como una conveniencia para los expertos en la técnica y no son una admisión de que se requiera un depósito bajo el Artículo 35 U.S.C. §112. Sin embargo, debe entenderse que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para practicar la invención objeto en la derogación de los derechos de patente concedidos por la acción gubernamental. El depósito se mantendrá sin restricciones en el Depositario de la ATCC, que es un depósito público, durante un periodo de 30 años, o 5 años después de la solicitud más reciente, o durante por la vigencia de la vida de la patente, lo que sea más largo, y se reemplazará si alguna vez se vuelve inviable durante ese periodo.

## MANTENIMIENTO Y ADAPTACIÓN DEL COMPONENTE FÚNGICO

Los componentes fúngicos pueden prepararse mediante métodos como se describe en el presente documento. Por ejemplo, en un método, el componente fúngico opcionalmente se hace crecer, se mantiene y/o se propaga en un medio indefinido que comprende granos de cacao u otro extracto de sustrato agrícola antes de su uso para la inoculación de los granos de cacao u otro sustrato agrícola. En un método, el componente fúngico se mantiene indefinidamente en el medio indefinido que comprende granos de cacao u otro extracto de sustrato agrícola en morfologías de estado sólido, flotantes y sumergidas de varios volúmenes.

Cuando el sustrato agrícola son los granos de cacao, el extracto de granos de cacao puede reemplazarse o enriquecerse por componentes de sabor del grano de cacao que se desea minimizar, metabolizar, reducir o eliminar. Por ejemplo, se pueden usar componentes con sabor a cacao, tal como 2-metoxi-3-isopropilpirazina y metilxantinas, tal como teobromina, obtenida comercialmente como compuestos químicos, añadidos al medio como una solución de tampón 0,1 M a través de una jeringa filtrada en línea. Las proporciones relativas de los componentes de sabor se pueden ajustar o equilibrar en el medio para lograr los objetivos específicos del perfil de sabor. Este entrenamiento también se puede utilizar para entrenar, adaptar el componente fúngico para producir componentes deseables, tal como pirazinas, por ejemplo, metil pirazina.

Sin quedar ligados a la teoría, los inventores creen que el mantenimiento del componente fúngico en medio indefinido que comprende granos de cacao u otro sustrato agrícola desempeña un papel importante en la viabilidad y la salud a largo plazo del componente fúngico. Se cree que los cambios perpetuos y sutiles realizados de lote a lote de agar y medio líquido cuando se usa un medio indefinido que comprende granos de cacao u otro sustrato agrícola evitan eficazmente el fenómeno de la deriva genética indeseable que se producirá con el tiempo en el componente fúngico cuando se mantienen en medio idéntico (definido).

El medio indefinido que comprende granos de cacao u otro extracto de sustrato agrícola puede prepararse mediante varios métodos. En un método, el medio indefinido comprende granos de cacao acuosos puros u otro extracto de sustrato agrícola. Opcionalmente, se pueden añadir fuentes de energía adicionales. Los materiales son opcionalmente orgánicos y el agua es al menos filtrado RO. Los inventores han encontrado sorprendentemente que el medio puede comprender cacao acuoso u otro extracto de sustrato agrícola sin ningún excipiente adicional añadido, tal como una fuente de energía adicional para los hongos en crecimiento de la presente invención.

Medio sólido que comprende un medio indefinido que comprende granos de cacao u otro extracto de sustrato agrícola. En un método, un medio indefinido que comprende granos de cacao u otro medio de agar de sustrato agrícola para hacer crecer hongos con el fin de micelizar los granos de cacao esterilizados u otro sustrato agrícola puede comprender el filtrado de granos de cacao u otro sustrato agrícola. En un método, 0,1 - 100 lb de granos de cacao u otro sustrato agrícola están en 0,1 - 100 l de agua, respectivamente, durante 1 minuto a 12 horas. El filtrado se recogió a través de 1 - 3 filtraciones de la mezcla, y se añadieron 14-17 g/l de agar. La solución de extracto base se puede usar en solitario o mezclada conjuntamente con extractos vegetales y/o fuentes de azúcar adicionales, tal como zumo de frutas.

Esta solución base se puede mezclar opcionalmente con el filtrado de extracto acuoso vegetal indefinido (de cualquier tipo, pero idealmente orgánico), tal como extracto de malta, extracto de levadura, patata, etc. En un método, la verdura es patata. La mezcla acuosa de patata se puede preparar al ablandar 1 - 300 g de masa de patata en agua hirviendo o a presión, en puré, y el filtrado se recogió a través de 1-3 filtraciones. Opcionalmente, también se puede añadir zumo de fruta sin azúcares añadidos a los granos de cacao base u otro medio de agar de sustrato agrícola. En un método,

el medio comprende el 0,1-10 % en peso de extracto de malta, el 0,1-10 % en peso de extracto vegetal indefinido con esencia de grano de cacao, el 0,1-10 % en peso de extracto de levadura, el 0,1-10 % en peso de peptona, el 0,1-10 % en peso de glucosa, el 20-80 % en peso de agua, y el 1-90 % en peso de granos de cacao enteros u otro sustrato agrícola o extracto de grano de café verde.

5 Como ejemplo no limitativo del medio, por ejemplo, 2 lb de granos de cacao u otro sustrato agrícola, pulverizado o entero, se pueden mezclar con agua de 1/4 de galón a temperatura ambiente. La mezcla se puede mezclar. Después, se deja que la mezcla se extraiga durante 20 minutos con agitación, después se filtra tres veces a través de una malla fina. Esta solución se puede usar en solitario o mezclada con lo siguiente: aproximadamente 5 patatas orgánicas se  
10 colocan en 10 l de agua y se esterilizan en autoclave durante 20 minutos para ablandar las patatas. Después, las patatas se pulverizan con un triturador de patatas y después se filtran a través de una malla fina tres veces. Se puede añadir 1 l de zumo de fruta sin azúcar comercial. El extracto de patata se añade al extracto de cacao y se esteriliza en autoclave.

15 En otro método, el medio puede comprender un licor de chocolate, que puede prepararse mediante métodos conocidos en la técnica, tal como obteniendo un fondo fino que es un líquido. El licor se puede usar puro o se puede diluir como se desee. Un medio de licor de chocolate debe ser agitado.

20 Una vez preparado, el medio puede esterilizarse por cualquier método conocido en la técnica. Una vez que el medio se enfría, se puede verter en placas petri y los cultivos fúngicos se propagan de placa a placa en una operación estéril, como se conoce en la técnica. Las preparaciones para tubos de ensayo y matraces se pueden preparar mediante este método. Las placas de Petri se pueden inocular con cultivo tisular líquido flotante y sumergido, y con sustrato micelizado.

25 Medio líquido, medio indefinido, que comprende granos de cacao u otro extracto de sustrato agrícola. Los granos de cacao u otro extracto de sustrato agrícola, y el extracto vegetal indefinido se prepararon como se describe para un medio sólido, excepto que no se añade agar. Si se preparaba para hacer un cultivo flotante, se añadieron de 1 a 10  
30 cucharadas de harina a la mezcla, en un método, aproximadamente 1 cucharada por cada 10-15 l de cultivo. El medio puede esterilizarse por métodos conocidos en la técnica. Una vez refrigerado, el recipiente se puede inocular en una operación estéril con una placa petri de sección colonizada, de otros cultivos de tejido líquido, o de muestras de sustrato micelizado.

35 El componente fúngico para la inoculación en granos de cacao u otro sustrato agrícola puede prepararse mediante cultivo tisular líquido sumergido usando el medio indefinido que comprende granos de cacao u otro medio líquido de extracto de sustrato agrícola como se define en el presente documento y se agita en una mesa de agitación. En un método, la velocidad de agitación es de 50-240 rpm, o de 85-95 RPM, y se incuba durante 4-90 días. En un método, la temperatura de incubación es de 87-89 °F.

40 En un método, el componente fúngico se entrena y/o se adapta y/o se mantiene en su capacidad para hacer crecer de manera eficiente, metabolizar o utilizar y/o modificar de otro modo los granos de cacao u otro sustrato agrícola. En un método, el componente fúngico se selecciona y/o entrena y/o se adapta y/o se mantiene en su capacidad para eliminar o reducir uno o más componentes de sabor indeseables de los granos de cacao u otro sustrato agrícola o para eliminar o reducir la cantidad de cafeína. Los métodos para determinar si un componente de sabor indeseable y/o la cafeína se han reducido o eliminado se han descrito en el presente documento y también se han encontrado  
45 en la técnica.

50 En un método, el componente fúngico entrenado y/o adaptado y/o mantenido se prepara a partir de hongos silvestres y sanos desinfectados. Dichos hongos con propiedades modificadas, mejoradas y adaptadas como se describen en el presente documento, con respecto a las cepas de partida, ya sea seleccionadas o no seleccionadas, se desarrollaron por estos métodos. Estas cepas adaptadas se depositaron en la ATCC como se describe en otra parte del presente documento. En un método, el componente fúngico entrenado y/o adaptado y/o mantenido se prepara a partir de *Ganoderma lucidum*. En un método, el componente fúngico entrenado y/o adaptado y/o mantenido se prepara a partir de la cepa 806 de *Ganoderma lucidum* Alice Chen; Buffalo, NY; 4/94. En otro método, el componente fúngico  
55 entrenado y/o adaptado y/o mantenido se prepara a partir de *Cordyceps sinensis* (Cepa 1009, hongo oruga; Colorado Corp, 1/2014). En un método, el componente fúngico entrenado y/o adaptado y/o mantenido se prepara a partir de *H. erinaceus*, *T. versicolor*, *L. edodes*, *T. matsutake*, *F. velutipes*, *A. blazei*, *G. frondosa*, *P. nameko*, *L. officinalis*, *M. hortensis*, *M. angusticeps*, *A. auricula*, *T. fuciformis*, *I. obliquus*, *F. fomentarius*, *L. sulfureus*. En un método, el componente fúngico entrenado y/o adaptado y/o mantenido se prepara a partir de una cepa pura de *Tuber melanosporum*, obtenida mediante el cultivo de una trufa mediante los métodos descritos en el presente documento.  
60 Estos hongos que han cambiado, mejorado y adaptado como se describe en el presente documento, con respecto a las cepas de partida, se depositaron con la ATCC como se describe en el presente documento.

65 La etapa de entrenamiento y/o adaptación y/o mantenimiento como se describe en el presente documento puede realizarse opcionalmente en un medio indefinido que comprende granos de cacao u otro medio líquido de extracto de sustrato agrícola o medio sólido como se define en el presente documento. En un método, los hongos pueden cultivarse durante 4 - 90 días a cualquier temperatura conocida en la técnica para cultivar hongos, por ejemplo, 87 -

89 °F. La reinoculación del componente fúngico cultivado en medio fresco como se describe en el presente documento puede realizarse en un momento apropiado según lo determine un experto en la técnica, dependiendo de la velocidad de crecimiento, el ciclo de crecimiento y la apariencia del componente fúngico. El ciclo de crecimiento y reinoculación del componente fúngico en medio fresco, en algunos métodos, se realiza más de una vez, más de dos veces, más de tres veces, más de cuatro veces, más de cinco veces, más de diez veces, más de quince veces, más de veinte veces, más de veinticinco veces, más de treinta veces, más de cuarenta veces, más de cincuenta veces, más de setenta y cinco veces, o cien veces o más. El componente fúngico por estos métodos, por ejemplo, puede reconocer mejor los granos de cacao u otro sustrato agrícola o cualquier componente particular de los granos de cacao u otro sustrato agrícola como fuente de energía, tolerar mejor la presencia de granos de cacao u otro extracto de sustrato agrícola en el medio (según lo medido por una velocidad de crecimiento mejorada, por ejemplo), eliminar mejor los componentes de sabor indeseables, o eliminar mejor la cafeína. En un método, el componente de sabor indeseable que se debe eliminar y/o reducir son metilxantinas, tales como teobromina o 2-metoxi-3-isopropilpirazina.

Por lo tanto, los métodos tienen como una etapa adicional opcional, un método para preparar un componente fúngico entrenado y/o adaptado y/o mantenido que comprende un componente fúngico que tiene una capacidad mejorada y/o aumentada para hacer crecer, metabolizar o utilizar y/o modificar de otro modo los granos de cacao u otro sustrato agrícola y/o eliminar uno o más componentes de sabor indeseables de los granos de cacao u otro sustrato agrícola, y/o eliminar la cafeína. Por lo tanto, el uso del componente fúngico entrenado y/o adaptado y/o mantenido se contempla para la presente invención. Los métodos comprenden además el uso de cualquiera de los componentes de hongos entrenados, adaptados y/o mantenidos como se describe en el presente documento.

#### PREPARACIÓN DEL COMPONENTE FÚNGICO PARA LA INOCULACIÓN DE HABAS DE CACAO U OTRO SUSTRATO AGRÍCOLA

Los métodos para preparar el componente fúngico para inocular los granos de cacao preparados u otro sustrato agrícola pueden incluir la ampliación de un componente fúngico como se define en el presente documento en cultivo líquido. Dicho componente fúngico que se prepara para la inoculación de los granos de cacao preparados u otro sustrato agrícola se denomina "componente fúngico preparado".

En un método descrito en el presente documento, el componente fúngico preparado está en cultivo sólido. En otro, el componente fúngico preparado está en cultivo líquido. En otro, el componente fúngico preparado es una mezcla de cultivo sólido y líquido. El cultivo líquido se puede lograr por cualquier medio conocido en la técnica e incluye el uso de un biorreactor. Por ejemplo, cuando se usa un biorreactor para preparar el componente fúngico, el biorreactor se puede preparar diluyendo un medio indefinido que comprende granos de cacao u otro medio líquido de sustrato de sustrato agrícola hasta 1000x con agua filtrada/RO. La camisa del biorreactor se puede vaporizar en un método para esterilizar el medio, o como alternativa, el medio se pueden esterilizar inyectando vapor en el recipiente.

El medio a usar en la preparación de un componente fúngico para su uso para inocular los granos de cacao preparados u otro sustrato agrícola, puede ser cualquier medio adecuado conocido en la técnica, o puede prepararse mediante los métodos divulgados en el presente documento. El medio puede comprender además elementos traza y sustancias orgánicas tales como agua, ácidos nucleicos y minerales. El medio puede diluirse hasta 1000x con agua filtrada/RO. La dilución puede ser 1x, aproximadamente 2x, aproximadamente 3x, aproximadamente 4x, aproximadamente 5x, aproximadamente 6x, aproximadamente 7x, aproximadamente 8x, aproximadamente 9x, aproximadamente 10x, aproximadamente 15x, aproximadamente 20x, aproximadamente 25x, aproximadamente 30x, aproximadamente 35x, aproximadamente 40x, aproximadamente 45x, aproximadamente 50x, aproximadamente 55x, aproximadamente 60x, aproximadamente 65x, aproximadamente 70x, aproximadamente 80x, aproximadamente 90x, aproximadamente 100x, aproximadamente 150x, aproximadamente 200x, aproximadamente 250x, aproximadamente 300x, aproximadamente 350x, aproximadamente 400x, aproximadamente 450x, aproximadamente 500x, aproximadamente 550x, aproximadamente 600x, aproximadamente 650x, aproximadamente 700x, aproximadamente 750x, aproximadamente 800x, aproximadamente 850x, aproximadamente 900x, aproximadamente 950x o aproximadamente 1000x. En algunos métodos, la dilución es de aproximadamente 5x a aproximadamente 100x. Para un biorreactor de 100 l, el medio pueden diluirse aproximadamente 10x, por ejemplo.

En un método, para inocular el reactor, el medio se puede bombear desde otro reactor a través de una línea esterilizada con una bomba en línea, o creando una presión positiva mediante la inyección de aire en el reactor con un compresor de aire que hace recorrer el aire a través de filtros de cápsula de 0,2/0,5 micrómetros en línea y después a través de una válvula de retención con una presión de craqueo específica, por ejemplo, 2-3 psi.

Los métodos para inocular el biorreactor para preparar el componente fúngico incluyen inocular el biorreactor con una sección colonizada extirpada de la placa de Petri y/o una muestra de cultivo líquido usando un procedimiento estéril, o verter un cultivo tisular líquido flotante o sumergido en el biorreactor a través de la boquilla.

Opcionalmente, el componente fúngico se puede agitar durante el cultivo por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en un biorreactor, la agitación se puede lograr mediante una combinación de aire rociado y una paleta motorizada que permite tanto un entorno turbulento y una fuerza mecánica de corte. Los inventores, sin limitación, han encontrado que la combinación es superior a la ejecución de cualquier método individualmente, ya que el aire rociado

crea la mayor turbulencia en la mitad superior del cultivo, mientras que afecta menos al fondo, que puede mantenerse agitado por una paleta motorizada, mientras que la paleta no tiene que funcionar a una RPM tan alta como se usa normalmente en la técnica. La combinación crea los tamaños de esferas de hifas pequeñas adecuadas sin dañar los micelios.

5 Las técnicas de agitación y turbulencia de fermentación en estado líquido se conocen en la técnica e incluyen cizallamiento mecánico con barras de agitación magnética, impulsores de acero inoxidable, inyección de aire ambiente estéril a alta presión, inyección a alta presión de medio estéril y/o el uso de mesas de agitación. Mayores tasas de agitación y turbulencia, junto con inyecciones de aire y medio, producen pequeñas esferas de micelios.

10 El componente fúngico se puede hacer crecer hasta que esté listo para la inoculación de los granos de cacao preparados u otro sustrato agrícola según se determine por un experto en la técnica. En algunos métodos, el componente fúngico se puede hacer crecer durante 48 horas antes de usarlo para inocular los granos de cacao u otro sustrato agrícola. La determinación de si los cultivos fúngicos que comprenden el componente fúngico son adecuados para la inoculación de los granos de cacao preparados u otro sustrato agrícola puede determinarse por un experto en la técnica. Por ejemplo, en un método, el cultivo de hongos, cuando está en un medio líquido, es adecuado para la inoculación, aunque en fase de crecimiento exponencial, temprana o tardía. Se pueden usar cultivos senescentes y cultivos en fases de crecimiento más tempranas con menores cantidades de micelios/ml, pero no se prefieren. El componente fúngico preparado, opcionalmente, aparece bien cultivado a través del medio, con micelios visibles que crecen a través de cada ml visible mediante microscopio y visión no asistida.

20 Con el fin de realizar la micelización más eficiente de los granos de cacao u otro sustrato agrícola, el componente fúngico ha definido tamaños de esfera de hifas que permiten el crecimiento de hifas en tres dimensiones alrededor del conglomerado esférico del cultivo de la cepa fúngica. En un método, el tamaño de esfera de hifas es menor de 10 mm de diámetro, menor de 2 mm de diámetro, menor de 1 mm de diámetro, menor de 100 micrómetros de diámetro, menor de 10 micrómetros de diámetro, menor de 5 micrómetros de diámetro, menor de 2 micrómetros de diámetro, o menor de 1 micrómetro de diámetro. En otro método, el conglomerado esférico de hifas tiene un rango de tamaño de 5 micrómetros a 1 milímetro de diámetro, o un rango de tamaño de 10-50 micrómetros de diámetro.

30 Estos métodos dan como resultado un componente fúngico preparado para la inoculación de granos de cacao preparados u otro sustrato agrícola.

#### INOCULACIÓN Y MICELIZACIÓN DE LOS GRANOS DE CACAO PREPARADOS U OTRO SUSTRATO AGRÍCOLA

35 Los granos de cacao preparados u otro sustrato agrícola se inoculan con el componente fúngico preparado. El componente fúngico preparado a usar puede ser cualquier componente fúngico que se define en el presente documento. La inoculación del componente fúngico preparado en los granos de cacao preparados u otro sustrato agrícola puede realizarse por cualquier método conocido en la técnica. Esta etapa puede denominarse de diversas maneras como la etapa de cultivo, la etapa de fermentación y/o la etapa de micelización.

40 La micelización puede tener lugar en un contenedor tal como se describe en el presente documento. En un método, la micelización tiene lugar en un bidón de 55 galones como se describe en el presente documento. En este método, los bidones de 55 galones tienen una tapa que contiene dos puertos, y un puerto se puede usar como puerto de inoculación, mientras que el otro se puede usar para rociar aire filtrado al fondo del cultivo, y al mismo tiempo sirve de ventilación. En algunos métodos, el puerto de inoculación es un enchufe de desconexión rápida, que se conecta a un enchufe de desconexión rápida al final de una línea de recolección durante la inoculación. Opcionalmente, los granos de cacao preparados u otro sustrato agrícola en una pluralidad de bidones se pueden micelizar en un ciclo a través de un colector esterilizado conectado a una línea de recolección del biorreactor, con la infraestructura incluida para dirigirse a cualquier bidón en singular o todos juntos a la vez. En un método, se usa un sistema para la dispensación volumétrica consistente de inoculante por cultivo.

50 En un método, el cultivo puede inyectarse neumáticamente en un recipiente que comprende los granos de cacao preparados u otro sustrato agrícola. La humedad puede inyectarse opcionalmente en bolsas para optimizar el crecimiento del micelio. En otro método, los granos de cacao u otro sustrato agrícola se inoculan vertiendo el cultivo en el contenedor que contiene los granos de cacao esterilizados u otro sustrato agrícola, ya sea manualmente o a través de una válvula incorporada en el fermentador o el biorreactor, de cualquier variedad de cultivo tisular líquido.

60 En un método, los granos de cacao preparados u otro sustrato agrícola se enfrían a una temperatura de entre 80 y 100 °F antes de la inoculación con el componente fúngico preparado. El enfriamiento se puede realizar por refrigeración o a temperatura ambiente. La etapa de micelización de los granos de cacao preparados u otro sustrato agrícola puede tener lugar durante entre 4 y 90 días, durante entre aproximadamente siete y veintiún días, y en un método, durante aproximadamente siete días, y a cualquier temperatura, por ejemplo, a 87 - 89 °F. La multiplicación de los micelios fúngicos mediante fermentación se realiza controlando eficientemente la luz ambiental, tal como un modelo de control del 40 % de iluminación y el 60 % de oscuridad, y también controlando el flujo de aire estéril y la temperatura a 86-88 u 87 - 89 °F, o entre 12 y 35 °C, o entre 24 °C y 32 °C.

65

La humedad relativa de este cultivo, la micelización y/o la fermentación está entre el 20 % y el 80 %, en algunos métodos, al menos aproximadamente el 60 %. En algunos métodos, la humedad relativa es de al menos aproximadamente el 36-40 %.

- 5 En un método alternativo, antes de la adición del componente fúngico, los granos de cacao se preparan para el cultivo de micelización (fermentación) líquida. Los granos de cacao se muelen en partículas finas, preferiblemente, de menos de 1 mm de diámetro como tamaño de partícula aproximado. En un método, las partículas tienen un tamaño de 20-50 micrómetros. Después, los granos de cacao se colocan en una solución acuosa que tiene una viscosidad regulada o ajustada para suspender las partículas de cacao. Preferiblemente, la solución acuosa tiene una viscosidad adaptada al tamaño de partícula de cacao para permitir que las partículas de cacao se suspendan en la solución acuosa cuando se agitan. El medio acuoso que contiene el componente fúngico y las partículas de cacao se pueden depositar en un biorreactor de cualquier tamaño. Preferiblemente, el biorreactor está dimensionado para contener al menos 10 litros de medio acuoso. Más preferiblemente, el biorreactor está dimensionado para contener varios miles de litros, o más.
- 10
- 15 En un método, se agita el cultivo de micelización líquida. El medio de agitación están regulado para optimizar la solución acuosa para mantener la masa de micelio fúngico en pequeñas partículas. Preferiblemente, el micelio fúngico tendrá esferas de hifas, o conglomerados, con tamaños que están entre 1-100 micrómetros de diámetro. En otro método, las conglomeraciones de hifas son más pequeñas que el tamaño de partícula del cacao.
- 20 En el cultivo de micelización líquida, el biorreactor se mantiene a una temperatura y presión adecuadas para permitir que el micelio digiera los componentes del cacao para eliminar los componentes de sabor amargo, el cacao se separa de la solución acuosa. Esto se puede hacer cesando la agitación y permitiendo que el cacao se precipite. Esto también se puede lograr filtrando el cacao de la solución acuosa. Después de retirar el cacao de la solución acuosa, se puede preparar para su procesamiento (incluido el secado del cacao en polvo). Una etapa secundaria se realiza opcionalmente para extraer la solución acuosa después de la retirada del cacao. Este extracto se puede utilizar para recuperar los componentes del sabor del cacao solubles en agua. Estos componentes de sabor solubles en agua se pueden procesar y se pueden volver a añadir al cacao como un polvo o un aerosol o baño acuoso. El polvo de cacao es el resultado. Se añade un sabor complementario, según sea necesario, para mejorar adicionalmente el sabor del cacao.
- 25
- 30 Por ejemplo, se pueden añadir edulcorantes o extractos de sabor de cacao en este momento del proceso.

Por consiguiente, el cacao está listo para formar cualquier producto de cacao, es decir, chocolate.

- 35 La etapa de micelización de los granos de cacao preparados u otro sustrato agrícola se realiza preferiblemente en un entorno anaerobio o semianaerobio. Los métodos conocidos en la técnica se pueden usar para inducir y/o mantener la actividad metabólica anaerobia facultativa del componente fúngico preparado como se describe mediante el efecto Pasteur. En un método alternativo, los granos de cacao u otro sustrato agrícola se retiran de las láminas y se depositan en grandes cubas de acero inoxidable en un ambiente estéril. Las cubas regulan los niveles de oxígeno y la temperatura, y permiten la actividad anaerobia facultativa y el crecimiento de micelios en los granos de cacao preparados u otro sustrato agrícola. La actividad anaerobia facultativa metaboliza más celulosa por unidad de tiempo, lo que significa que los granos de cacao u otro sustrato de sustrato agrícola se consumen a una velocidad más rápida que en un entorno aerobio. En algunos casos, el crecimiento micelial es nueve veces más rápido que en un entorno aerobio (es decir, se metabolizan nueve veces más moléculas de celulosa en ATP). Otro beneficio es que el entorno anaerobio inhibe el crecimiento del cuerpo de fruta. Un entorno anaerobio también asegura una reducción en el crecimiento bacteriano no deseado, y otro crecimiento microbiano no deseado.
- 40
- 45

La expansión de los micelios fúngicos se controla mediante microscopía, y los planes de crecimiento se documentan mediante fotografía.

- 50 Cuanto más largo sea el periodo de incubación, mayor será la producción del peso seco del micelio y mayor será el aumento del sabor de los granos de cacao u otro sustrato agrícola. Algunas cepas formarán tejidos primordiales y cuerpos frutales a los 30 días (*Hericium erinaceus* es particularmente propenso a la fructificación mientras está en cultivo, al igual que *Ganoderma lucidum* y *Flamulina velutipes*). En algunos métodos, la recolección de los granos de cacao micelizados u otros granos de sustrato agrícola se realiza antes del cultivo del tejido corporal de las frutas. Sin embargo, un periodo prolongado de incubación de un hongo específico no garantiza una alta producción de metabolito o la acumulación de micelios y/o productos de micelización.
- 55

- La determinación de cuándo cosechar el producto micelizado se puede determinar mediante varios métodos. La recolección se realiza generalmente con un tiempo para optimizar el perfil de sabor del producto micelizado de acuerdo con el perfil de sabor deseado. Por ejemplo, el experto capacitado puede utilizar el perfil de aroma del cultivo de micelización para determinar cuándo está listo el cultivo. La determinación de la apariencia del cultivo también puede realizarse por el experto capacitado. En algunos métodos, la recolección se puede realizar cuando la cantidad de micelios en el cultivo es de aproximadamente de 2-3 placas de petri completamente cultivadas (tamaño estándar) (para *G. lucidum*), o cuando la cantidad de micelios está en las cantidades aproximadas de 10-12 placas de petri estándar completamente desarrolladas (para *C. sinensis*), por 8 lb de granos de cacao u otro sustrato agrícola. Se pueden emplear métodos analíticos de análisis que incluyen cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para
- 60
- 65

realizar la medición de las biomoléculas totales con el fin de determinar la composición óptima y las condiciones de cultivo y el tiempo o tiempos apropiados para la recolección de los hongos.

En un ejemplo no limitante, aproximadamente 8 lb de granos de cacao preparados u otro sustrato agrícola de acuerdo con los procesos de la invención, en un contenedor sellado como se describe en el presente documento, se inocularon con aproximadamente 25 ml de componente fúngico preparado como se describe en el presente documento. Se obtuvo un entorno de oxígeno reducido. Se permitió que la micelización o cultivo continuara durante siete días a 87 - 89 °F, aunque también es adecuado tan solo como cuatro días o hasta sesenta o más días. La recolección se realizó cuando los observadores determinaron que se había obtenido un perfil de sabor apropiado para el producto micelizado.

#### REDUCCIÓN DE COMPONENTES DE SABOR INDESEABLES DURANTE LA MICELIZACIÓN

Los granos de cacao y otros sustratos agrícolas pueden contener componentes de sabor indeseables. Dichos componentes de sabor indeseables pueden ser definidos o indefinidos. Tal componente de sabor desfavorable incluye 2-metoxi-3-isopropilpirazina. Este componente es metabolizado por el componente fúngico en polisacáridos, tales como beta 1,3-glucanos y beta 1,6-glucanos. Otros componentes de sabor indeseables incluyen componentes de sabor amargo. Tal componente amargo son las metilxantinas, tal como teobromina. Al micelizar el cacao crudo se obtiene un grano de cacao que es menos amargo que el cacao crudo que no se miceliza.

La micelización del cacao también hace que la cáscara del grano se avente más fácilmente para obtener ventajas en el procesamiento de los granos de cacao.

La etapa de cultivo o micelización también puede provocar la reducción y/o eliminación de componentes de sabor indeseables como se describe en el presente documento y/o la cafeína. En algunos métodos, la determinación de la extensión de la eliminación de al menos un componente de sabor indeseable se determina por el aspecto, sabor y/o composición química del producto micelizado como se conoce en la técnica. Esta determinación puede ser cuantitativa, por ejemplo, la composición química del producto micelizado puede medirse mediante métodos de ensayo para uno o más de los componentes de sabor indeseables mediante métodos de ensayo como se conoce en la técnica, o puede determinarse cualitativamente mediante prueba de sabor por los expertos.

En un método, se eliminan hasta el 5 % de uno o más de los componentes de sabor indeseables; en otros métodos, hasta el 10 %, hasta el 15 %, hasta el 20 %, hasta el 25 %, hasta el 30 %, hasta el 35 %, hasta el 40 %, hasta el 45 %, hasta el 50 %, hasta el 55 %, hasta el 60 %, hasta el 65 %, hasta el 70 %, hasta el 75 %, hasta el 80 %, hasta el 85 %, hasta el 90 %, o hasta el 95 % de uno o más de los componentes de sabor indeseables se eliminan en los procesos de la presente invención. En un método, uno o más de los componentes de sabor indeseables se eliminan cuantitativamente. La divulgación también se refiere a productos micelizados que tienen niveles reducidos de componentes de sabor indeseables como se describe en el presente documento.

En un método, el componente de sabor indeseable es ácido clorogénico y se eliminan hasta un 5 % de ácidos clorogénicos; en otros, hasta el 10 %, hasta el 15 %, hasta el 20 %, hasta el 25 %, hasta el 30 %, hasta el 35 %, hasta el 40 %, hasta el 45 %, hasta el 50 %, hasta el 55 %, hasta el 60 %, hasta el 65 %, hasta el 70 %, hasta el 75 %, hasta el 80 %, hasta el 85 %, hasta el 90 %, o hasta el 95 % de ácidos clorogénicos se eliminan en los procesos de la presente invención. La divulgación también se refiere a productos de café micelizados que tienen niveles reducidos de ácido clorogénico como se describe en el presente documento.

En un método, la cafeína se elimina de los granos de cacao u otro sustrato agrícola durante la etapa de cultivo o micelización. En un método, se elimina hasta el 5 % de cafeína; en otros, hasta el 10 %, hasta el 15 %, hasta el 20 %, hasta el 25 %, hasta el 30 %, hasta el 35 %, hasta el 40 %, hasta el 45 %, hasta el 50 %, hasta el 55 %, hasta el 60 %, hasta el 65 %, hasta el 70 %, hasta el 75 %, hasta el 80 %, hasta el 85 %, hasta el 90 %, o hasta el 95 % de cafeína se elimina en los procesos de la presente divulgación. La divulgación también se refiere a productos micelizados que tienen niveles reducidos de cafeína como se describe en el presente documento.

La eliminación de componentes de sabor indeseables puede permitir aumentar el valor de productos de cacao u otros productos agrícolas de menor calidad y/o hacerlos más comestibles. Los productos micelizados producidos por este método se pueden usar para mezclar con granos de cacao u otro sustrato agrícola, lo que lleva a un producto de menor coste con mejores propiedades de sabor. La cantidad de azúcar, leche y sustitutos de los mismos a añadir a los productos micelizados puede reducirse. Los presentes métodos conducen a un mejor perfil de sabor de los productos micelizados debido a la percepción de que los productos micelizados proporcionan un alimento más rico, más suave y/o más dulce con sabores menos amargos, ásperos y/o ácidos.

#### ADICIÓN DE SABOR Y/O COMPONENTES QUE PROMUEVEN LA SALUD

Los procesos de cultivo o micelización de la presente divulgación, en algunos métodos, proporcionan un grano de cacao micelizado u otro producto de sustrato agrícola con sabor añadido y/o componentes que promueven la salud. Por ejemplo, los granos de cacao micelizados u otros productos de sustrato agrícola pueden contener componentes antitumorales e inmunomoduladores que promueven la salud, añadidos exógenamente.



Los hongos son metabólicamente similares a los animales pero estructuralmente similares a las plantas en que poseen una pared celular rígida formada en gran parte por largas cadenas de moléculas de azúcar unidas por enlaces beta (b-) algo difíciles de digerir y, en menor medida, por enlaces alfa (a-) más fáciles de digerir junto con proteínas unidas a membrana. Por el contrario, las paredes celulares vegetales (tales como los granos de cacao u otro sustrato agrícola) están hechas de polisacáridos de celulosa cuyos enlaces de glucosa glucosídica 1->4 son igualmente difíciles de digerir por los seres humanos, pero son digeribles por los hongos. Las paredes celulares fúngicas están compuestas principalmente por enlaces glucosídicos 1->3, con 1->6 cadenas laterales unidas y, por lo tanto, se pueden descomponer mediante un procesamiento mínimo utilizando agua, calor y tratamiento mecánico en moléculas de polisacárido más pequeñas, más fácilmente digeribles, inmunológicamente activas de tamaño de micropartícula variable llamadas beta glucanos y compuestos de glucoproteínas relacionados. La respuesta inmune al beta glucano depende de la estructura del a- o b-glucano, que tiene estructuras terciarias primarias, secundarias y quirales, lo que explica las diferencias en la respuesta inmune al perfil único de a y b-glucano de cada hongo. Por lo tanto, los granos de cacao micelizados u otros productos de sustrato agrícola han añadido componentes que promueven la salud, incluidas las moléculas descritas anteriormente. Otros componentes que promueven la salud presentes en los granos de cacao micelizados u otros productos de sustrato agrícola pueden ser componentes que tienen diversas propiedades tales como propiedades inmunomoduladoras, antienvjecimiento, afrodisíacas, antitumorales, antivíricas, antibacterianas y antifúngicas e incluyen compuestos tales como a- y b-glucanos, glucoproteínas, proteínas, ergosteroles, esteroides, triterpenos y ácidos grasos, glucomanano, riboglucano, ácido esterpúrico, manitol, ribitol, guanosina y adenosina.

Las metil pirazinas, que se desarrollan de forma natural en el cacao, se encuentran entre los compuestos de sabor deseables más importantes que se encuentran en el cacao. En presencia de calor, tal como el tostado, se producen mediante reacciones de Maillard, es decir, entre azúcares y aminoácidos o péptidos. Sin quedar ligado a la teoría, se cree que las metil pirazinas también se producen a través de la fermentación y/o la micelización, lo que conduce a un aumento y/o alteración de las metil pirazinas en granos de cacao micelizados y otros productos agrícolas. Usando este método de fabricación de cacao, una sola cepa de hongos descompone el contenido de celulosa, alcaloide, grasa y proteína contenido en los granos de cacao esterilizados crudos, lo que le da un sabor amargo al cacao y cambia la estructura de la sustancia y la concentración de los granos de cacao. Por otro lado, se obtiene una calidad uniforme y constante de cacao mediante el método de fermentación de esta invención para procesar granos de cacao crudos. Al utilizar los métodos descritos en el presente documento inducidos por este proceso de fermentación limpia, el sabor de los granos crudos de cacao aumenta, lo que hace que el cacao resultante sea mucho más rico, suave, dulce y único (en comparación con el cacao natural hecho de granos no micelizados).

El grupo carbonilo reactivo del azúcar reacciona con el grupo amino nucleófilo del aminoácido, y forma una mezcla compleja de moléculas mal caracterizadas responsables de un rango de olores y sabores. Este proceso se acelera en un ambiente alcalino (por ejemplo, lejía aplicada para oscurecer los pretzels), ya que los grupos amino están desprotonados y, por lo tanto, tienen un aumento de la nucleofilicidad. El tipo de aminoácido determina el sabor resultante. Esta reacción es la base de la industria de los aromas. A altas temperaturas, se puede formar acrilamida.

Puede usarse *Agaricus blazei* para la adición de glucanos únicos y destellados llamados glucomanano y riboglucano, que son antivirales, en los granos de cacao micelizados u otro producto de sustrato agrícola. Otros extractos de polisacáridos de *A. blazei* pueden tener efectos anticancerosos y pueden ser terapéuticos conjuntamente con otro extracto micelial de hongos enumerados en el presente documento. Se han informado métodos para optimizar la biomasa y la producción de polisacáridos extracelulares. Por lo tanto, la micelización con *A. blazei* y los granos de cacao micelizados u otros productos de sustrato agrícola que contienen sabor y/o componentes que promueven la salud derivados de *A. blazei* como se describe en el presente documento, también se incluyen en la presente invención.

*Cordyceps sinensis* (*C. sinensis*) produce ácido cordicéptico, adenosina, D-manitol y cordicepinadenosina que son inmunomoduladores y antivirales. Los extractos de *C. Sinensis* han demostrado ser antienvjecimiento y afrodisíacos. Se ha demostrado que los esteroides micelizados aislados de *C. sinensis* inhiben la proliferación de numerosas líneas celulares de cáncer. Se ha demostrado que los extractos de polisacárido micelial de *C. sinensis* inducen hipoglucemia. Por lo tanto, la micelización con *C. sinensis* y los granos de cacao micelizados u otros productos de sustrato agrícola que contienen sabor y/o componentes que promueven la salud derivados de *C. sinensis* como se describe en el presente documento, también se incluyen en la presente divulgación.

Se ha demostrado que el micelio de *Flammulina velutipes* tiene un perfil de polisacárido que es inmunomodulador. El micelio de *F. velutipes* comprende un perfil único de ergosterol y aminoácidos, ácido esterpúrico, manitol, ribitol, y los nucleósidos guanosina y adenosina. Las enokipodinas A-D extraídas del micelio de *F. velutipes* son terpenos antimicrobianos de amplio espectro. Las proteínas flamulina y velutina exhiben actividad anti-VIH y anti-VPH. Por lo tanto, la micelización con *F. velutipes* y los granos de cacao micelizados u otros productos de sustrato agrícola que contienen sabor y/o componentes que promueven la salud derivados de *F. velutipes* como se describe en el presente documento, también se incluyen.

Se ha demostrado que el perfil de polisacárido de *Ganoderma lucidum* es inmunomodulador en líneas celulares

humanas y también en estudios clínicos. Los extractos miceliales de *G. lucidum* tienen propiedades antiperoxidativas, antiinflamatorias y antimutagénicas. Se ha demostrado que los extractos de *G. lucidum* son antienvjecimiento y afrodisíacos. Se ha determinado y demostrado que el perfil triterpenoide de *G. lucidum* es antihepatotóxico y hepatoprotector, antitumoral, antiangiogénico, antihipertensivo, hipocolesterolémico, antihistamínico y anti-VIH. *G. lucidum*, además de producir polisacáridos y glucoproteínas, también produce triterpenos, tales como ácidos ganodéricos y lucidénicos, compuestos fenólicos, y esteroides que también tienen una alta actividad biológica y propiedades terapéuticas y son en sí mismos antioxidantes, antitumorales, antibacterianos, anticancerosos, antiinflamatorios, antihistamínicos, hipotensores, sedantes y meditativos después del consumo oral. Por lo tanto, la micelización con *G. lucidum* y los granos de cacao micelizados u otros productos de sustrato agrícola que contienen sabor y/o componentes que promueven la salud derivados de *G. lucidum* como se describe en el presente documento, también se incluyen.

Se ha demostrado que el perfil de polisacárido de *Grifola frondosa* es inmunomodulador y antioxidante, *G. frondosa* produce ergosteroles y un perfil antioxidante de ácidos grasos. Los efectos antitumorales de los extractos de *G. frondosa* en líneas celulares de cáncer *in vitro* se han investigado, y se muestran prometedoros para los pacientes con diabetes que están hipoglucémicos. Por lo tanto, la micelización con *G. frondosa* y los granos de cacao micelizados u otros productos de sustrato agrícola que contienen sabor y/o componentes que promueven la salud derivados de *G. frondosa* como se describe en el presente documento, también se incluyen en la presente divulgación.

Se ha demostrado que los extractos miceliales y de cuerpos frutales de *Hericium erinaceus* son antimutagénicos e inmunomoduladores a través de diversas líneas celulares. *H. erinaceus* produce de forma única las hericenonas en los cuerpos frutales y las erinacinas en el micelio, compuestos estructuralmente determinados que pueden pasar la barrera hematoencefálica y promover la secreción del factor de crecimiento nervioso (NGF) en ciertas regiones del cerebro. Se ha demostrado que los erinacenos son mayores potenciadores de la expresión de NGF que las hericenonas. Por lo tanto, la micelización con *H. erinaceus* y los granos de cacao micelizados u otros productos de sustrato agrícola que contienen sabor y/o componentes que promueven la salud derivados de *H. erinaceus* como se describe en el presente documento, también se incluyen.

Los aspectos del perfil de polisacáridos de *Lentinula edodes* se han determinado y se ha demostrado que son inmunomoduladores y antivirales. Lentinano y otros metabolitos han sido estudiados por sus numerosos beneficios para el cuidado de la salud. En algunos países, el lentinano se clasifica como un "polisacárido antineoplásico" y está disponible para su uso clínico. Se ha demostrado que la adición de lentinano a las terapias estándar contra el cáncer produce un aumento de la necrosis tumoral con un carcinoma hepatocelular y una mejor calidad de vida en pacientes con carcinoma de esófago. Por lo tanto, la micelización con *L. edodes* y los granos de cacao micelizados u otros productos de sustrato agrícola que contienen sabor y/o componentes que promueven la salud derivados de *L. edodes* como se describe en el presente documento, también se incluyen.

Se ha mostrado que los extractos de *Phellinus linteus* exhiben actividad antitumoral. Los extractos de polisacáridos de *Polyporus umbellatus* se han estudiado y se ha demostrado que son anticanceroso, inmunomoduladores, antimaláricos y hepatoprotectores. El extracto de polisacárido micelial de *Inonotus obliquus* ha demostrado propiedades antitumorales, hipoglucémicas y antioxidantes. Se ha demostrado que el micelio de *Pleurotus ostreatus* y la composición del cuerpo frutal son muy similares, y se diferencian solo en el contenido de aminoácidos. El perfil del polisacárido micelial consiste principalmente en laminarina, cuyo extracto se ha demostrado ser inmunomodulador. La Lovastatina, aislada del caldo micelial de *P. ostreatus*, exhibe actividad anticancerosa, inhibe el crecimiento de bacterias y hongos y reduce el colesterol. *Trametes versicolor* produce heteroglucanos con enlaces glucosídicos a-(1-4) y b-(1-3) con fucosa en PSK (Krestina) y ramnosa y arabinosa en PSP, han demostrado ser antitumorales e inmunomoduladores. PSK, un fármaco aprobado, es un extracto micelial que exhibe propiedades inmunomoduladoras, antivirales y reguladoras del colesterol. Se ha demostrado que los extractos de polisacáridos miceliales de *Tremella fuciformis* son terapéuticos para diversos trastornos circulatorios, neurológicamente saludables, anticarcinomas, antitumorales y antienvjecimiento.

Por lo tanto, también se divulgan en el presente documento la micelización con *Phellinus linteus*, *Polyporus umbellatus*, *Inonotus obliquus*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, y/o *Tremella fuciformis* (y cualquier otra especie fúngica descrita en el presente documento) y granos de cacao micelizados u otros productos de sustrato agrícola que contienen componentes de aroma y/o componentes que promueven la salud derivados de *Phellinus linteus*, *Polyporus umbellatus*, *Inonotus obliquus*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, y/o *Tremella fuciformis* (o cualquier otra especie fúngica descrita en el presente documento).

Las cantidades de componentes de sabor o componentes que promueven la salud añadidos por el componente fúngico como se describe en el presente documento pueden estimarse por un experto en la técnica, e incluyen hasta 1 ng del componente por unidad de granos de cacao micelizados u otro producto de sustrato agrícola, o hasta 5 ng, hasta 10 ng, hasta 50 ng, hasta 100 ng, hasta 500 ng, hasta 1 µg, hasta 5 µg, hasta 10 µg, hasta 50 µg, hasta 100 µg, hasta 500 µg, hasta 1 mg, hasta 2 mg, hasta 5 mg, hasta 10 mg, hasta 20 mg, hasta 50 mg, hasta 100 mg, o hasta 500 mg por unidad de granos de cacao micelizados u otro producto de sustrato agrícola. Una unidad de granos de cacao micelizados u otro producto de sustrato agrícola puede definirse de manera diversa como 1 g, 1 lb, 1 kg, y similares.

## PROCESAMIENTO ADICIONAL DEL PRODUCTO MICELIZADO

En algunos métodos, una vez micelizados completamente, los granos de cacao micelizados u otro producto de sustrato agrícola se aclaran opcionalmente después de la micelización. El aclarado puede realizarse para eliminar algunas o todas las partes de los micelios y/u otros granos diferentes de cacao u otro material de sustrato no agrícola.

En algunos métodos, una vez completamente micelizado, el producto micelizado se seca opcionalmente. El secado se puede lograr por medios conocidos en la técnica para secar granos de cacao u otro sustrato agrícola. Por ejemplo, el producto micelizado puede extenderse sobre una superficie seca para que se seque. En un método, el producto micelizado se seca hasta un contenido de humedad de aproximadamente el 11 al 13 %.

Opcionalmente, el producto micelizado seco o no secado puede hornearse y/o tostarse por métodos convencionales conocidos en la técnica. La etapa de tostado opcional proporciona la desactivación del hongo, lo que puede ser deseable para reducir el riesgo de micosis.

El cacao micelizado puede someterse a etapas de procesamiento conocidas de cacao no micelizado. Por consiguiente, la presente divulgación se puede usar para hacer masa de cacao micelizada, manteca de cacao micelizada, licor de chocolate micelizado y todas las formas de chocolate derivadas de los mismos, según se hace por temple, y otros métodos conocidos en la técnica. Los beneficios adicionales de dicho procesamiento de alimentos involucran el perfil nutricional único (principalmente el perfil de polisacárido y metabolito) imbuidos en estos alimentos por la micelización.

En un método, el extracto de grano de cacao micelizado se usa para productos nutracéuticos en forma de extracto, o en forma de polvo que se logra al deshidratar el extracto. En otro método, el extracto de grano de cacao micelizado se usa como aditivo en alimentos funcionales para reforzar el sabor y el contenido de nutrientes. Este extracto puede estar en forma acuosa, infundido en una base de alcohol, o en glicerina vegetal, por ejemplo. Se puede lograr una forma en polvo deshidratando el extracto. La forma en polvo se puede añadir a cualquier alimento envasado. Un ejemplo de un alimento funcional incluye una bebida embotellada, un aperitivo, o una mezcla en polvo con alto contenido de proteínas que se usa para hacer batidos de proteínas. La forma en polvo también se puede utilizar en helados.

El producto micelizado puede extraerse opcionalmente para preparar un extracto para su uso en productos alimenticios y/o bebidas. Por ejemplo, 1000 g de grano de cacao tostado micelizado o sustrato agrícola pueden extraerse completamente, con agitación; utilizando de 10 a 1000 ml de agua a presión a 121-122 °C como tampón, que contiene del 0,01 % al 10 % de ácido cítrico y del 0,01 al 10 % de ácido ascórbico. El extracto acuoso resultante se puede purificar y concentrar adicionalmente usando métodos convencionales. Los extractos de grano cacao micelizados o de productos de sustrato agrícola pueden tener una vida útil prolongada por métodos conocidos en la técnica, tal como la formulación en alcohol del 18 % al 24 %, glicerol del 45 % al 60 %, o la adición de 2,5 volúmenes de miel o azúcar similar. tal como jarabe de arce o azúcar de caña evaporada.

La eliminación de los componentes de sabor y/o la cafeína indeseados, y/o la adición de productos de micelización que aumentan el sabor y/o promueven la salud, darán como resultado productos de grano de cacao o de sustrato agrícola micelizado, y pueden aumentar el valor de un grano de cacao o sustrato agrícola de calidad inferior y/o hacerlos más comestibles. Los productos micelizados de granos de cacao o sustratos agrícolas producidos por este método pueden usarse para mezclarlos con los granos de cacao o sustratos agrícolas menos costosos, lo que conduce a un producto de menor coste con mejores propiedades de sabor, tal como un alimento más rico, más suave y/o más dulce con un sabor menos amargo, áspero y/o ácido.

El cacao micelizado sabe más dulce que el cacao natural porque el micelio elimina los componentes amargos del grano. Por consiguiente, un beneficio de usar el cacao micelizado en alimentos funcionales es que una versión con bajo contenido de azúcar (o bajo edulcorante) de cualquier alimento funcional, incluido el cacao, puede tener un buen sabor en comparación con el cacao natural que tiene más edulcorantes (es decir, azúcar, estevia, etc., edulcorantes sintetizados).

## MÉTODOS

La figura 1 muestra un diagrama de flujo de una realización de un método para crear un extracto de producto agrícola micelizado (tal como un producto de café micelizado) para consumo humano. La etapa 10 proporciona un sustrato agrícola, la etapa 12 inocula el sustrato mediante un medio líquido que comprende un alícuota de cultivo derivado de la fermentación en estado líquido, la etapa 14 permite el crecimiento del micelio y la etapa 16 hace crecer el micelio sobre el sustrato, la etapa 18 incluye hervir el sustrato en agua y la separación de la mezcla de agua-sustrato en componentes acuosos y no acuosos después de que el crecimiento del micelio en el sustrato alcance una fase deseada, la etapa 20 añade una mezcla de componentes de molécula pequeña a los componentes acuosos, por lo que los componentes acuosos se mezclan en una combinación biodisponible con los componentes de molécula pequeña para facilitar la solubilidad en agua del extracto.

En un método, la etapa 24 utiliza un cultivo de hongos Basidiomycota para permitir la etapa 12. En un método

alternativo, la etapa 26 utiliza los hongos Ascomycota para permitir la etapa 12.

La figura 2 muestra un método para crear un extracto de producto agrícola micelizado para consumo humano para efectuar la neuro-regeneración y la neuro-protección en seres humanos de acuerdo con la presente invención.

5 El método incluye la etapa 30 para proporcionar un sustrato agrícola, la etapa 32 para inocular el sustrato mediante un medio líquido que comprende un alícuota de cultivo derivado de la fermentación en estado líquido, la etapa 34 para permitir el crecimiento del micelio y el crecimiento del micelio en el sustrato, la etapa 36 de hervir el sustrato en agua y separar la mezcla de agua-sustrato en componentes acuosos y no acuosos. La etapa 36 tiene lugar después de que el crecimiento del micelio en el sustrato alcance la fase deseada. La etapa 38 añade una mezcla de componentes de molécula pequeña a los componentes acuosos para aumentar la solubilidad en agua del extracto para mejorar la absorción pasiva y la absorción en seres humanos.

15 La etapa 32 de inoculación incluye la etapa 40 de inoculación con un componente fúngico de la presente invención.

La etapa 34 de habilitar y hacer crecer el micelio en el sustrato incluye regular la temperatura y la humedad en un entorno estéril. El micelio crece entonces automáticamente. El micelio se hace crecer en un contenedor que permite que solo una pequeña cantidad de aire estéril entre en el contenedor. Los volúmenes de aire estéril se regulan tapando el contenedor. Esto modula el oxígeno ambiental en el contenedor.

20 La etapa 34 hace crecer el micelio hasta una fase deseada, por ejemplo, donde comienzan a aparecer cuerpos frutales en la superficie del sustrato.

25 La etapa 36 hierve el sustrato en agua para separar los polisacáridos en el micelio y otros componentes beneficiosos para suspender en el agua, separando el componente acuoso de los sólidos del sustrato residual. El componente no acuoso incluye los sólidos del sustrato. La separación del componente acuoso del componente no acuoso se puede lograr mediante filtración o sifonamiento. Puede apreciarse que pueden utilizarse otros métodos conocidos en la técnica.

30 La etapa 38 añade una mezcla de componentes de molécula pequeña al componente acuoso. Esto permite que los componentes acuosos estén más biodisponibles *in vivo*.

35 La figura 3 muestra un método de la presente invención 10. El método 10 incluye la etapa 12 de proporcionar un componente fúngico en un medio líquido de cultivo tisular, la etapa 14 de añadir una mezcla que incluye cafeína, tal como el medio indefinido que contiene extracto de grano de café verde, al medio de cultivo tisular líquido para entrenar el componente fúngico para consumir la cafeína, la etapa 16 de pasteurizar o esterilizar los granos de cacao u otro sustrato agrícola, la etapa 18 de hidratar los granos de cacao u otro sustrato agrícola hasta un contenido de humedad del 10-80 %, la etapa 20 de inocular los granos de cacao u otro sustrato agrícola con el componente fúngico, la etapa 22 de proporcionar la temperatura, contenido de oxígeno y humedad óptimos para permitir el crecimiento de hongos, y la etapa 24 de secar y tostar los granos de cacao u otro sustrato agrícola.

40 La figura 4 muestra un método 48 de fabricación de café de acuerdo con la presente invención. El método 48 incluye la etapa 50 que proporciona granos de café en un contenedor. Preferiblemente, el contenedor es una bolsa autoclavable.

45 La etapa 22 incluye la reducción de los niveles de oxígeno para facilitar el crecimiento del micelio anaerobio facultativo en los granos de cacao u otro sustrato agrícola para maximizar las tasas de consumo de cafeína por el micelio del componente fúngico. En la etapa 50, el contenedor está sellado, permitiendo solo una fuga mínima.

50 La etapa 52 hidrata los granos de café hasta un contenido óptimo de humedad. En un método, la etapa 52 de hidratar los granos de café incluye remojar los granos de café en agua durante dos horas, y drenar los granos de café durante dos horas antes de la esterilización de la pasteurización. Esta es una etapa importante porque la hidratación de los granos de café acelera el crecimiento micelial. La etapa de hidratar los granos de café también elimina el residuo no deseado, y puede eliminar algunos componentes indeseables solubles en agua de los granos de café. En un método alternativo, se utiliza un fluido distinto del agua. Por ejemplo, el agua infundida con una enzima puede eliminar los componentes indeseables del café antes de la etapa 54 de esterilización. El pH del agua se puede regular para optimizar la etapa de hidratación 52. Se puede usar agua destilada, o agua mineralizada, para la etapa 52 de hidratación 52.

60 La etapa 54 esteriliza los granos de cacao u otro sustrato agrícola con vapor y la etapa 56 presuriza el contenedor. La etapa 56 de presurización del contenedor se incluye normalmente con la etapa de esterilización 54. Por consiguiente, la etapa de esterilización 54 se realiza con una presión que varía de 5 a 25 lb por pulgada cuadrada. Preferiblemente, la presión es de 10-20 lb por pulgada cuadrada. En un método, la presión es de 15 lb por pulgada cuadrada.

65 La esterilización bajo la etapa 54 se puede lograr en las condiciones de 121- 122 °C a 15 lb/pulgada<sup>2</sup>; 115-116 °C a 10/pulgada<sup>2</sup>; y 108-109 °C a 5 lb/pulgada<sup>2</sup> durante un periodo de tiempo de 20 a 100 minutos, o pasteurización en las

condiciones de tratamiento de calor seco a 140 °C - 210 °C durante un periodo de 20 a 100 minutos. Estos parámetros pueden ser variados.

La etapa 58 inocula las bolsas con un componente fúngico. En un método, la etapa 58 se realiza con un cultivo tisular líquido que tiene tamaños de esferas de hifas fúngicas de 5 a 100 micrómetros de diámetro para asegurar una inoculación consistente. En otro, el cultivo tisular en estado sólido se añade al café y se mezcla con el café de manera consistente. En otro cultivo tisular líquido y cultivos tisulares en estado sólido, ambos se añaden a los granos de café en el contenedor para reducir el tiempo requerido para propagar el micelio fúngico en los granos de café esterilizados como se describe en la etapa 60.

En un método, la etapa 58 se realiza enfriando el contenedor a 80-100 °F después de las etapas 54 y 56 e inyectando cultivo tisular líquido fúngico directamente en el contenedor. La etapa 60 propaga el micelio fúngico dentro del mismo contenedor. El contenedor se puede agitar o girar para asegurar una distribución consistente del cultivo tisular líquido fúngico. En un método alternativo, los granos de café se transfieren de los contenedores a una cuba para la etapa 58 de la inoculación.

En otro método, la etapa 58 se realiza con un cultivo tisular líquido derivado de la fermentación en estado líquido. El cultivo tisular líquido produce un cultivo puro de una cepa fúngica que comprende un conglomerado esférico con un tamaño inferior a 2 milímetros de diámetro, que permite el crecimiento de hifas en tres dimensiones alrededor del conglomerado esférico del cultivo de la cepa fúngica. En una variación de este método, la fermentación en estado líquido produce un cultivo puro de una cepa fúngica que comprende un conglomerado esférico con un tamaño que varía de 5 micrómetros a 1 milímetro de diámetro debido al corte de las estructuras de hifas durante un proceso de agitación o removido de medio líquido. Los procesos de agitación y/o turbulencia pueden incluir, pero sin limitación, por ejemplo, cizallamiento mecánico con barras de agitación magnéticas, impulsores de acero inoxidable, inyección de aire ambiente estéril a alta presión, inyección a alta presión de medio estéril y el uso de mesas de agitación. Mayores tasas de agitación y turbulencia, junto con inyecciones de aire y medio, producen pequeñas esferas de micelios, cuyas alícuotas se utilizan para inocular uno o más sustratos agrícolas para la posterior fermentación semianaerobia. Óptimamente, las conglomeraciones esféricas miceliales tienen menos de 100 micrómetros de diámetro, y más preferiblemente, dentro del intervalo de 10-50 micrómetros de diámetro.

La etapa 58 de inocular las bolsas incluye el uso de un cultivo en estado líquido flotante o sumergido, un sustrato micelizado, tal como grano o café, o el cultivo en placa de Petri se inocula en un medio de cultivo en estado sólido compuesto por granos de cacao esterilizados o pasteurizados u otro sustrato agrícola. Se presta especial atención a las subcepas que exhiben una mayor capacidad para fermentar el café. Estas cepas pueden seleccionarse y propagarse, cultivándose en placa de petri y un medio líquido compuesto por una cierta concentración de extracto de grano de café verde (aquí, se añaden de cuatro a cinco granos de cacao u otro sustrato agrícola a la preparación de medio de cultivo tisular líquido), en un estado líquido sumergido o flotante, y después se usan para inocular granos de cacao esterilizados u otro sustrato agrícola a una velocidad mayor que las cepas y subcepas que no están acondicionadas para fermentar el café.

La etapa 60 de propagación de micelio fúngico en los granos de café esterilizados se realiza preferiblemente en un entorno anaerobio. Por consiguiente, una vez que el sustrato (granos de café) se ha esterilizado o pasteurizado, la actividad metabólica anaerobia facultativa de los hongos, según lo descrito por el Efecto Pasteur, puede inducirse después de la etapa 58 de inoculación.

La figura 5 muestra un método 10 de la presente invención. El método 10 incluye la etapa 12 de proporcionar granos de cacao u otro sustrato agrícola en un contenedor, y la etapa 14 de preparar los granos de cacao u otro sustrato agrícola para la micelización de hongos mediante la eliminación de ácidos clorogénicos. En una realización, la etapa 14 incluye aclarar los granos en una solución acuosa.

El método 10 incluye además la etapa 16 de pasteurizar o esterilizar los granos de cacao u otro sustrato agrícola, la etapa 18 hidrata los granos de cacao u otro sustrato agrícola hasta un contenido de humedad del 10 %-80 %, la etapa 20 inocula los granos de cacao u otro sustrato agrícola con un componente fúngico, la etapa 22 regula la temperatura, el oxígeno y la humedad en el contenedor para micelizar los granos de cacao u otro sustrato agrícola. Esta etapa 22 optimiza la tasa de micelización.

La etapa 24 aclara los granos de café micelizados para eliminar la acumulación en la superficie de los metabolitos miceliales y otro material indeseado causado por la etapa de micelización 22.

La figura 6 muestra un transportador 10, una primera lámina 12 de material autoclavable, una segunda lámina 14 de material autoclavable, y una tolva 16 que distribuye granos de café entre las láminas 12 y 14. La primera lámina 12 se extiende desde un rollo 24 de material autoclavable y se coloca en el transportador 10. La tolva 16 libera granos de café en la primera lámina 12. La segunda lámina 14 se enrolla inicialmente en un rollo 26 y después se coloca sobre los granos de café y la primera lámina 12. La primera lámina 12 tiene bordes 22a y 22b. La segunda lámina 14 tiene bordes 20a y 20b, que se sellan contra los bordes 22a y 22b de la primera lámina 12 para formar una bolsa grande autoclavable, que se puede enrollar como se muestra en la figura 8c y está diseñada para contener más de 150 lb de

granos de café.

Se puede aplicar opcionalmente un vacío para extraer aire de entre las láminas 24a y 24b, lo que optimiza la transferencia de calor a los granos de café 18 cuando los granos de café 18 se entregan a una cámara de esterilización.  
 5 El vacío también inhibe el movimiento relativo entre los granos de café 18. El transportador 10 entrega los granos de café 18 a una cámara de esterilización.

La figura 7 muestra el transportador 10. La tolva 16 entrega granos de café a una bolsa autoclavable 30. La bolsa autoclavable 30 se sella entonces y se coloca sobre el transportador 10. El transportador 10 transporta numerosas  
 10 bolsas autoclavables 30, 32, 34, 36, 38 y 40, hasta un autoclave 42. El autoclave 42 en un método aplica fluido calentado, tal como vapor y presión, a las bolsas autoclavables 30, 32, 34, 36, 38 y 40 para realizar la esterilización o pasteurización de los granos de café 18.

La figura 8a muestra una bolsa autoclavable 30 llena de granos de café. La bolsa autoclavable 30 está a presión, lo que causa una superficie granulada 44. Como alternativa, la bolsa autoclavable 30 se sella al vacío para causar la  
 15 superficie granulada 44.

La figura 8b muestra bolsas autoclavables 30, 32, 34, 36 y 38 apiladas para su esterilización o pasteurización en un autoclave. La superficie granulada 44 mejora la transferencia de calor a los granos de café verde encerrados en la  
 20 bolsa 30. La bolsa autoclavable 30 incluye al menos un parche de respiración 45 adherido a la superficie granulada de la bolsa 30. Preferiblemente, el parche de respiración 45 incluye respiraderos que tienen un diámetro de 0,2 micrómetros para permitir que una cantidad mínima de aire fluya a través de la bolsa 30 y asegurar que el micelio propagado dentro de la bolsa 30 se propague de forma semiaerobia. Se puede apreciar que los parches de respiración pueden tener poros de entre 2 - 100 micrómetros de diámetro. Preferiblemente, los respiraderos del parche de  
 25 respiración 45 tienen un diámetro de respiradero de 5 micrómetros o menos. Se puede adherir más de un parche de respiración 45 a la superficie granulada de la bolsa 30, y se puede usar en contenedores distintos de las bolsas de acuerdo con la presente invención.

La figura 8c muestra una bolsa continua 46 de material autoclavable que contiene granos de café. La bolsa continua  
 30 46 está sellada para permitir que la bolsa 46 sea esterilizada o pasteurizada en un autoclave. En un método alternativo, la bolsa 46 se sella en secciones, de modo que la bolsa continua 46 tiene múltiples secciones, que están aisladas entre sí para inhibir el movimiento de aire y el café entre las secciones. El flujo de aire turbulento durante la esterilización se muestra con flechas que pasan a través de la bolsa 46 y alrededor de sus superficies.

La figura 9 muestra un método de la presente invención generalmente designado con el número de referencia 10. El  
 35 método 10 incluye la etapa 12 de proporcionar un componente fúngico en un medio líquido de cultivo tisular, la etapa 14 de añadir una mezcla que incluye un extracto de cacao al medio de cultivo tisular líquido para entrenar el componente fúngico para consumir componentes del sabor del cacao indeseables, la etapa 16 de pasteurizar o esterilizar los granos de cacao crudos, la etapa 18 de hidratar los granos de cacao crudos hasta un contenido de  
 40 humedad del 10-80 %, la etapa 20 de inocular los granos de cacao crudos con el componente fúngico, la etapa 22 de proporcionar la temperatura, contenido de oxígeno y humedad óptimos para permitir el crecimiento fúngico, y la etapa 24 de secar y tostar los granos crudos de cacao.

La etapa 22 incluye la reducción de los niveles de oxígeno para facilitar el crecimiento del micelio anaerobio facultativo  
 45 en los granos de cacao crudos para maximizar las velocidades de consumo de 2-metoxi-3-isopropilpirazina y teobromina por el micelio del componente fúngico.

La figura 10 muestra un método 26 de micelización acuosa de cacao en una solución acuosa. El método 26 incluye la  
 50 etapa 28 de proporcionar cacao crudo o tostado, la etapa 30 de moler cacao en pequeñas partículas de menos de 1 mm de diámetro, la etapa 32 de proporcionar una solución acuosa en un biorreactor, la solución tiene una viscosidad adecuada para suspender las pequeñas partículas de cacao cuando se agita, la etapa 34 de añadir cultivo tisular líquido de un componente fúngico tal como micelio de una cepa fúngica pura, la etapa 36 de habilitar la micelización fúngica del cacao en la solución acuosa mediante la regulación de la temperatura, la actividad de agitación, y los niveles de oxígeno para asegurar el crecimiento anaerobio facultativo del micelio, la etapa 38 de separar el cacao de  
 55 la solución acuosa y secar el cacao separado, y la etapa 40 de seleccionar y extraer componentes de sabor de cacao soluble en agua seleccionados de la solución acuosa y añadir al menos una porción de los componentes de sabor de cacao soluble en agua seleccionados de nuevo al cacao separado para producir un polvo o líquido de cacao sabroso.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

Las cepas de hongos específicas y puras obtenidas de colecciones de referencia se manipularon en ambientes  
 65 estériles en bolsas de plástico de 1 gal a 10 gal, un frasco de vidrio de 1 ct a 1 gal, o en placas de petri de 10 cm a 15 cm, usando fruta orgánica indefinida y un medio a base de vegetales, incluyendo extracto de grano de café verde o granos de cacao u otro extracto de sustrato agrícola con agar al 1,5 % (p/v), para controlar y asegurar el vigor general

y la salud de las cepas.

Las muestras de micelio se hicieron crecer en un flujo de aire estéril suave y a temperatura ambiente durante 2 a 4 semanas, después se escindieron de las placas de petri y posteriormente se usaron para la inoculación en fermentación en estado líquido empleando una fruta indefinida similar y un medio a base de vegetales (pero sin agar), utilizando aire ambiente, en frascos de vidrio de 1 ct a 1 gal. Algunas muestras se hicieron crecer en agitación y algunas se hicieron crecer en cultivos sin agitar en aire ambiente en tanques de acero inoxidable diseñados para la elaboración y/o fermentación de cerveza comercial.

La fermentación en estado líquido sin agitación formó una masa flotante de hifas que mostró un crecimiento continuo en la interfaz de líquido y aire. El micelio de los cultivos agitados y/o en turbulencia creció muy rápidamente a medida que las esferas de hifas, que se hidrataron, permanecieron sumergidas, y tenían la apariencia de perlas gelatinosas en un diámetro pequeño. Las esferas de hifas hidratadas colapsaron tras la desecación, en las que se usaron para inocular placas de petri para la propagación de cepas y el control de calidad.

El diámetro de la esfera en la fermentación en estado líquido se encontró que es inversamente proporcional a la intensidad y el volumen de agitación. El cizallamiento de hifas se hizo más eficiente a mayor agitación e intensidad de turbulencia, y una vez cortadas, las hifas formaron nuevas esferas del menor diámetro posible, creciendo en tamaño hasta que se cortaron nuevamente. Cuando se emplearon en la fermentación continua en estado líquido, existía una relación constante de diámetros de esfera y, por lo tanto, se produjo un suministro constante de esferas del orden de micrómetros.

Por lo tanto, este ejemplo demostró que el diámetro de la esfera micelial se manipuló para una inoculación más eficiente, siendo la eficacia de la inoculación inversamente proporcional al diámetro de la esfera.

### Ejemplo 2

Los cultivos miceliales de fermentación en estado líquido no agitado (periodo de crecimiento de 2 a 4 semanas) formaron una masa flotante de hifas, que se mezclaron suavemente con un dispositivo de corte estéril y afilado antes de usarse para la inoculación. La mezcla suave se logró mediante la mezcla o baja homogeneización en una licuadora comercial en ráfagas cortas a velocidades lentas. Se utilizaron alícuotas de cultivo en estado líquido mezcladas para inocular frutas y/o verduras sin procesar esterilizadas, granos de cereales y/o semillas culinarias, o especias culinarias pasteurizadas, hierbas medicinales, aromas naturales, mezclas de té, vainas de vainilla verde, semillas de cacao verde, y granos de cacao u otro sustrato agrícola.

### Ejemplo 3

Los sustratos para la micelización (que contenían tanto el sustrato como el cultivo micelial inoculado) en frascos o bolsas se mezclaron suavemente cada pocos días hasta que infundieron el sustrato y se volvieron algo resistentes a la mezcla o la agitación, usualmente de 2 a 4 semanas, dependiendo de la cepa. Los productos estaban entonces en forma de tempeh. Las vainas de vainilla verdes micelizadas se cocieron o se hornearon; los granos de cacao verdes micelizados se hornearon o se tostaron; y los granos de cacao micelizados u otro sustrato agrícola se tostaron o se hornearon. El grano micelizado presentado en forma tempeh, o como un ingrediente en los alimentos, incluyendo sopas, salteados, panes y sustitutos de carne, se hizo seguro para comer y biodisponible, cocinándose de fuego medio a bajo, de 145 °F a 165 °F, durante 10 min a 60 min, en algún momento antes del consumo. Otros cultivos en frascos o bolsas, tales como hierbas y especias, se secaron a una temperatura de 100 °F a 145 °F durante 1 h a 24 h, se envasaron y se usaron de manera convencional.

Las formulaciones de miel micelizadas se agitaron durante 10 min a 90 min a 100 °F a 125 °F, después se vertieron en pequeñas botellas de vidrio. Además, los productos agrícolas micelizados se reformularon en productos de valor añadido tales como fideos de huevo, sustitutos de carne, aromas especiales, salsas para cocinar, ingredientes para sopas, y similares.

### Ejemplo 4

Para una gran operación en estado líquido y estado sólido discontinua, los cultivos puros se hicieron crecer de forma aerobia y se inocularon en grandes procesadores comerciales grandes en estado líquido y estado sólido operados de forma continua y semianaerobia para la fermentación a gran escala de productos alimenticios. Después de que los cultivos de medio se volvieron completamente blancos o con un color representativo de los mismos para una especie en particular, y crecieron en exceso y se infundieron completamente al medio y eran resistentes a una mezcla suave, se recogió el contenido, se eliminó en bolsas de plástico y se refrigeró para un uso rápido a 40 °F, o se congeló para su almacenamiento a largo plazo, y utilización posterior, a -20 °F. Los medios fermentados se prepararon en alimentos gourmet para humanos que incluyen: sustitutos de carne al estilo "tempeh", fideos de huevo, aromas especiales, panes, extractos y salsas para cocinar, o se usaron directamente como ingrediente fresco en la sopa y/o las recetas fritas o envasadas.

**Ejemplo 5**

Los sustratos agrícolas se micelizaron completamente inoculando cultivos puros de cepas fúngicas seleccionadas de *A. blazei*, *C. sinensis*, *G. lucidum*, *H. erinaceus*, *G. frondosa*, *P. eryngii*, *P. ostreatus*, *P. citrinopileatus*, *P. djamor*, *T. versicolor*, *L. edodes*, *F. velutipes*, *V. volvacea*, *H. marmoreus*, *P. nameko*, *T. melanosporum*, *M. hortensis*, *P. umbellatus*, y *T. fuciformis* se sometieron a tratamiento con calor de 1 hora 24 horas antes de la recogida durante 1 min a 2 horas de 145 °F a 195 °F seguido de recuperación a temperatura ambiente durante 45 min a 48 horas. Este proceso mostró una disminución notable en los niveles de ARN y se formularon en diferentes composiciones nutraceuticas.

**Ejemplo 6**

71 lb de granos de cacao se empaparon en un volumen equivalente de agua durante 5 minutos, después de lo cual el agua se eliminó por filtración y el cacao se distribuyó por igual en 10 bolsas de polipropileno con parches de respiración de 0,2 micrómetros. Las partes superiores de las bolsas se plegaron sobre la bolsa y tenían bandas de caucho enrolladas alrededor de cada lado de la bolsa. Las bolsas se esterilizaron durante 80 minutos a 22 psi con vapor saturado ligeramente seco a 255 °C. Después, las bolsas se enfriaron en un ambiente estéril durante 8 horas, y posteriormente se inocularon con cultivos tisulares líquidos sumergidos de *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps sinensis*, *Tuber melanosporum*, o *Morchella angusticeps*, con herramientas estériles y en una operación estéril dentro de una campana de flujo laminar estéril. Los inoculantes se cultivaron en matraces de 4 l, en 1,5 l de medio preparado a partir de la mezcla con 10 l de extracto de patata orgánica, 2 l de extracto de grano de cacao crudo, y 1 l de zumo de mango orgánico, y se utilizaron 50 ml de inoculante para cada uno bolsa de cacao después de que el inoculante hubiera crecido durante 7 días a 60 RPM de agitación de 1 pulgada de radio. Los cultivos se micelizaron durante dos semanas, después de lo cual se secaron y degustaron. Se observó que el cacao *Tuber melanosporum* confería el sabor menos amargo (el mejor sabor).

**Ejemplo 7**

La muestras de cebada, arroz integral, trigo sarraceno, mulgur (trigo quebrado), semillas de lino, grano, mijo, avena, pan de avena, cereal de avena, harina de avena, palomitas de maíz, copos de cereal de trigo integral, muesli, copos de avena, quinoa, centeno, sorgo, espelta, triticale, cebada integral, granos de trigo, harina de maíz integral, centeno integral, pan de trigo integral, cuscús de trigo integral, y arroz salvaje se mezclaron individualmente con la mitad de su volumen de agua en frascos de cuarto de galón preparados apropiadamente o bolsas autoclavable con parches de respiración y se esterilizaron a 15 psi durante 90 minutos o 22 psi durante 80 minutos. Una vez fríos, los frascos de grano se inocularon con la mitad de las colonias enteras de cultivos fúngicos flotantes o sumergidos seleccionados de uno de los siguientes: *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps sinensis*, *Tuber melanosporum*, *Hericium erinaceus*, *Agaricus blazei*, *Grifola frondosa*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Laetiporus sulphureus*, *Flammulina velutipes*, *Lentinula edodes*, *Morchella angusticeps*, *Morchella crassipes*, *Morchella hesculenta*, *Tremella fuciformis*, e *Inonotus obliquus*, donde los cultivos flotantes se hicieron crecer en un medio orgánico indefinido frascos de cuarto o medio de galón, y donde los cultivos sumergidos se hicieron crecer en matraces de 4 l en 1,5 l de medio indefinido. Después de la micelización durante dos semanas, los frascos se cultivaron en profundidad, y se pasteurizaron a 212 °F en una caldera doble durante 7 minutos antes de cocinarlos y consumirlos como tempeh, o se formularon de nuevo en un producto nutraceutico (es decir, formulados en 2 galones de miel en asociación con ácido ascórbico (1 g) y ácido cítrico (10 g) de molécula pequeña con 8 ml de aceites esenciales de naranja y mandarina). Esta etapa de formulación comenzó mezclando el cultivo pasteurizado con 2 litros de agua, o no, y después se añadieron ácido ascórbico y ácido cítrico a la mezcla, después los aceites esenciales, luego la miel, después la formulación se calentó en una caldera doble, se embotelló y se pasteurizó una vez embotellado para garantizar un sellado seguro.

**Ejemplo 8**

Trabajo en lote pequeño-café

48 lb de café se dividieron en 48 porciones iguales en frascos limpios de cuarto de galón con tapas construidas para permitir la difusión gaseosa más allá de un collar. Estas 48, 1 lb de masas de café se empaparon con 3/4 de galón de agua durante dos horas. El agua en las mezclas se eliminó por filtración. Los frascos de café se sometieron entonces a 90 minutos de temperatura de esterilización a 15 psi, y se colocaron en un flujo de aire laminar estéril para que se enfrió durante 8 horas. Una vez fríos, los granos de café se inocularon con colonias de hongos de la mitad a la totalidad seleccionados de uno de los siguientes: *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps sinensis*, *Tuber melanosporum*, *Hericium erinaceus*, *Agaricus blazei*, *Grifola frondosa*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Laetiporus sulphureus*, *Flammulina velutipes*, *Lentinula edodes*, *Morchella angusticeps*, *Morchella crassipes*, *Morchella hesculenta*, *Tremella fuciformis*, e *Inonotus obliquus*, haciendo tres de cada uno, creciendo en un medio de agar vegetal y de zumo de fruta indefinido que contenía extracto de café verde como se describe en el Ejemplo 8, con herramientas estériles y en funcionamiento estéril dentro de la campana de flujo laminar. Los cultivos se micelizaron durante 7 a 21 días, y se extrajeron muestras de cada uno para su secado y tostado los días 7, 14 y 21. El olor del cultivo y el sabor del café el 7º día indicaron que los cultivos estaban completos, aunque los periodos de micelización más largos produjeron una mayor masa celular.



## Trabajo en lote grande--café

528 lb de granos de cacao u otro sustrato agrícola se empaparon en dos procedimientos diferentes. En el primer procedimiento, los granos se empaparon tres veces, durante 20 minutos cada remojo, en el segundo procedimiento, los granos se empaparon durante 20 minutos a través de una corriente constante de agua filtrada. Después, los granos se envasaron en bolsas de polipropileno con parches de respiración de 0,2 micrómetros, con la parte superior de las bolsas plegada con bandas de caucho enrolladas alrededor de los lados de las bolsas, de tal forma que la difusión de vapor y gas podría tener lugar a través del parche de respiración y a través de los lados plegados de las bolsas. Las bolsas se esterilizaron bajo un ciclo de líquido a 22 psi durante 80 minutos y después se dejaron enfriar durante 8 horas. Las bolsas se inocularon con hongos de las siguientes especies: *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps sinensis*, *Tuber melanosporum*, y *Morchella angusticeps*. El cultivo de *Ganoderma lucidum* se hizo crecer en un biorreactor, con 10 l de extracto de patata orgánica, 2 l de extracto de café verde y 1 l de zumo de mango orgánico diluido a 100 litros con agua RO. El biorreactor se roció con aire comprimido filtrado a través de dos filtros de cápsula hidrófoba de 0,2 micrómetros en línea, y el reactor se mantuvo a 2-3 psi a través del uso de válvulas de retención en el suministro de aire y las líneas de ventilación con puntuaciones de presión de craqueo de 2-3 psi. El inoculante se hizo crecer fácilmente en 48 horas y se recogió a través de una válvula de diafragma ubicada en la parte inferior del reactor, lo que condujo a una línea de recolección que se había derivado en T y con válvula cerrada al acceso a una línea de vapor y una trampa de vapor, con una válvula de retención en línea, a través de seis pies de manguera flexible de acero inoxidable, a una válvula solenoide conectada a un temporizador e interruptor de pedal, seguido de una válvula de medición de flujo a un conector sanitario acodado. Mientras se cocía al vapor, el conector sanitario acodado estaba conectado a una válvula de bola que se conectaba al colector de escape de vapor. La válvula de bola se cerró después de vaporizar la línea, y la válvula de bola se separó de la línea de recolección una vez que entró en una campana de flujo laminar, para mantener la línea completa estéril. Los cultivos de *Cordyceps sinensis*, *Tuber melanosporum*, y *Morchella angusticeps* se hicieron crecer en matraces de 4 l, en 1,5 l del mismo medio utilizado en la predilución del biorreactor. Estos cultivos se hicieron crecer durante seis días y se usaron para inocular las bolsas de granos de cacao esterilizados u otro sustrato agrícola. Los granos se micelizaron durante 7 días, donde su olor confirió el perfil de sabor deseado de la bebida hecha de granos micelizados tostados, con lo cual se secaron el día 8 a un contenido de humedad del 13 %.

**Ejemplo 9**

Se preparó un hongo adecuado para su uso en los métodos de la presente invención mediante los siguientes métodos. Las siguientes cepas de *G. lucidum* se adquirieron comercialmente de la colección de cultivos de hongos de la Pennsylvania State University: 496 Ling ZHI; línea comercial de Singapur; 7/85; 502 IFO #8436; IFO-Japón; 7/30/85; 510 Red oak, State College, PA; D.J. Royse; 9/85; 549 Y.H. Park, ASI-Corea; 12/5/85; 550 Y.H. Park, ASI-Corea; 12/5/85; 551 Y.H. Park, ASI-Corea; 12/5/85; 580 Y.H. Park, ASI-Corea; 2/10/85; 607 Y.H. Park, ASI-Corea; 2/19/85; 617 Y.H. Park, ASI-Corea; 2/25/85; 618 Y.H. Park, ASI-Corea; 2/25/85; 619 Y.H. Park, ASI-Corea; 2/25/85; 620 Y.H. Park, ASI-Corea; 2/25/85; 621 Y.H. Park, ASI-Corea; 2/25/85; 622 Y.H. Park, ASI-Corea; 2/25/85; 623 Y.H. Park, ASI-Corea; 2/25/85; 624 Y.H. Park, ASI-Corea; 2/25/85; 625 Y.H. Park, ASI-Corea; 2/25/85; 626 Y.H. Park, ASI-Corea; 2/25/85; 627 Y.H. Park, ASI-Corea; 2/25/85; 665 Quimio; Filipinas; 3/6/86; 669 Y.H. Park, ASI-Corea; 3/25/86; 686 B. W. Yoo; 4/28/86; 724 T. Mitchel, Lawn PSU Forestry Bldg. 9/16/90; 806 Alice Chen; Buffalo, NY; 4/94; 807 Alice Chen; North Carolina; 4/94; 841 White Oak; PSU Campus; J. Peplinski; 8/99. Las cepas anteriores se cultivaron utilizando los medios descritos en el presente documento que comprendían granos de cacao u otro extracto de sustrato agrícola (véase el Ejemplo (10)). Muchas cepas no pudieron crecer y/o murieron en el medio. Sorprendentemente, los inventores encontraron que la cepa 806 de *G. lucidum* Alice Chen; Buffalo, NY no pudo crecer en el medio que comprendía extracto de grano de café verde y se seleccionó para su uso posterior de acuerdo con la presente invención.

**Ejemplo 10**

Los hongos (incluyendo la cepa 806 de *G. lucidum*, *C. sinensis*, y *T. melanosporum* como se describe en el presente documento, también *H. erinaceus*, *T. versicolor*, *L. edodes*, *T. matsutake*, *F. velutipes*, *A. blazei*, *G. frondosa*, *P. nameko*, *L. officinalis*, *M. hortensis*, *M. angusticeps*, *A. auricula*, *T. fuciformis*, *I. obliquus*, *F. fomentarius*, *L. sulfureus*) se mantuvieron en un cultivo que comprendía un medio indefinido que incluía extracto de granos de cacao. Los experimentos mostraron que el uso del medio, incluido el extracto de granos de cacao para el cultivo, mantenía la capacidad de los hongos para tolerar, hacer crecer, metabolizar, eliminar o reducir la cafeína o los componentes de sabor indeseables. También se encontró que las propagaciones sucesivas de hongos como se definió anteriormente causaron una potenciación y/o mejora de la capacidad de los hongos para tolerar, hacer crecer, metabolizar, eliminar o reducir la cafeína o disminuir los componentes de sabor indeseables, dando como resultado el entrenamiento o adaptación de los hongos a medio indefinido incluyendo extracto de granos de cacao. Dichos hongos con propiedades modificadas, mejorado y adaptado como se describe en el presente documento, con respecto a las cepas de partida, ya sea seleccionadas o no seleccionadas, se desarrollaron. Estas cepas adaptadas se depositaron en la ATCC como se describe en otra parte del presente documento.

El medio indefinido que incluye el extracto de granos de cacao se hicieron de la siguiente manera: 2 lb de granos de cacao u otro sustrato agrícola, se pulverizaron con 1/4 de galón de agua a temperatura ambiente. La mezcla se dejó

5 extraer durante 20 minutos con agitación, después se filtra tres veces a través de una malla fina. Por separado, se colocaron 5 patatas orgánicas en 10 l de agua y se sometieron a autoclave durante 20 minutos para ablandar las patatas. Después, las patatas se pulverizaron con un triturador de patatas y después se filtraron a través de una malla fina tres veces. Se añadió 1 l de zumo de fruta sin azúcar comercial. Estas soluciones se combinan y se someten a autoclave. Esta receta también se amplió o se redujo según fue necesario.

Los granos de cacao lavados se lavaron en agua y el contenido de humedad se elevó a aproximadamente el 30 %. En otros momentos, el contenido de humedad se elevó a aproximadamente el 60 %.

10 Cultivo líquido: El cultivo que comprende hongos para su uso en la inoculación de los granos de cacao preparados u otro sustrato agrícola se agitó con aire rociado y una paleta motorizada para crear un ambiente turbulento y para cortar hifas con fuerza mecánica pura. El método de agitación dual fue superior a cualquiera de los dos métodos individualmente, ya que el aire rociado creaba la mayor parte de la turbulencia en la mitad superior del cultivo, mientras que afectaba menos al fondo, que se agitó por una paleta motorizada. A cambio, la paleta podría hacerse funcionar a una RPM más baja y aun así obtener el tamaño de la esfera de hifas obtenido por una RPM más rápida en ausencia de rociado. El tamaño de hifas era de aproximadamente 2-5 micrómetros de diámetro). Este micelio no dañado y la morfología adecuada en los hongos preparados se prepararon mediante este método y se utilizaron para el cultivo y/o la micelización.

## 20 Ejemplo 11

Las trufas negras italianas de invierno Perigord [Trufa 1 (T1), y Trufa 2 (T2)], se manipularon asépticamente en el entorno de laboratorio de micología para obtener una serie de nuevos cultivares de trufa para trabajo comercial, incluyendo aislados de tipo de emparejamiento opuestos, por los siguientes 4 métodos.

25 Método 1: Se colocaron trozos enteros intactos frescos (de menos de una semana de edad) de T1 (trozos de gleba de trufa de aproximadamente 10 mm por 20 mm de tamaño) en agar de roble (un medio de agar general indefinido basado en hojas de roble y ramas de roble), en 50 placas de petri, que se sellaron con parafilm para permitir que los cultivos se incubaran a temperatura ambiente (23 °C) durante 5 semanas. Después de 5 semanas, se observó que los pedazos de T1 se regeneraban en micelios descritos por los siguientes cultivares: (a) micelio blanco vigoroso con tonalidades púrpuras, en 6 placas de petri, (b) micelio dorado vigoroso con tonalidades púrpuras, en 3 placas, (c) micelio blanco y dorado vigoroso, en 6 placas, (d) micelio morado y dorado tenue no vigoroso en 2 placas, y (e) micelio blanco y dorado tenue no vigoroso en 2 placas. El resto de las placas de petri (37 placas) se descartó después de haber crecido excesivamente por contaminación (bacteriana y fúngica). Se determinó que los aislados (a), (b) y (c) tienen potencial comercial. El (a) aislado blanco vigoroso es el micelio de emparejamiento materno a la trufa original, mientras que el aislado (b) es el micelio de emparejamiento paterno a la trufa original, y (c) es un cultivar derivado de la recombinación genética no sexual o anastomosis de ambos tipos de emparejamiento (a) y (b). Después de 5 a 6 semanas de crecimiento en agar de roble, los cultivos del (c) micelio blanco y dorado vigoroso comienzan a producir pequeños frutos de trufa (0,1 mm a 2,0 mm). Después de cultivar las estructuras en placas de petri frescas, y en medio agrícola similar, estos cultivos produjeron trufas negras en constante crecimiento.

45 Método 2: Se colocaron esporas intactas frescas (de menos de una semana) de T1 (0,01 g a 0,1 g de acumulaciones de esporas de una masa de aproximadamente 0,1 mm por 0,1 mm de tamaño) en medio de agar de roble sazonado en placas de petri (40 placas), que se sellaron con parafilm durante 5 semanas para permitir que las esporas brotasen a temperatura ambiente (23 grados C). Después de 5 semanas, se observó que las esporas brotaban en micelios en 10 placas; sin embargo, todo el micelio que brotó de las esporas, aunque era viable, fue extremadamente tenue y creció lentamente.

50 Método 3: Se colocaron trozos enteros intactos frescos (de menos de una semana) de T1 (40 g de trozos de gleba de aproximadamente 10 mm por 20 mm de tamaño) en 2 botellas, cada una de las cuales contenía 400 ml de agua estéril y 50 µg/ml de cada uno los siguientes antibióticos: Ampicilina, Penicilina, Cloranfenicol, Eritromicina, Neomicina, Estreptomina, con cierres pero no apretados, donde se dejaron incubar sin interrupción durante 5 semanas a temperatura ambiente (23 °C) con una agitación suave ocasional. Después de 5 semanas, los trozos intactos se retiraron del tampón de antibiótico y se echaron en medio de agar indefinido general (que contenía los mismos niveles de antibióticos), basándose en hojas y ramas de roble, en 50 placas de Petri que después se sellaron con parafilm para permitir que los cultivos se incubaran durante 2 semanas a temperatura ambiente (23 °C). Después de 2 semanas de regeneración en agar, los trozos de T1 se regeneraron en los siguientes cultivares miceliales: (a) micelio blanco en 12 placas de petri, (b) micelio dorado en 4 placas, (c) micelio blanco y dorado en 2 placas. El resto de las placas de petri (32 placas) se desechó después de no mostrar crecimiento o después de haber sido cubierto por la contaminación fúngica. Los aislados obtenidos a través del Método 3, aunque muy similares a los aislados del Método 1, fueron mucho menos vigorosos.

65 Los aislados (a), (b) y (c) del Método 1 se prepararon como se describe en el presente documento y se usaron para la micelización de sustratos. Se preparó eran granos de cacao preparados. La micelización de los granos de cacao preparados se dejó avanzar hasta que se alcanzó el sabor de café deseado para los granos de cacao tostados resultantes y el chocolate resultante, aproximadamente 7 días. Los granos de cacao micelizados resultantes se

tostaron y se convirtieron en chocolate, y se degustaron por catadores capacitados. Se encontró que cuando se utilizó el aislado descrito para el método 1, se usó el aislado (a), se logró un agradable aroma/sabor sabroso en el chocolate micelizado, que recuerda a las flores. Cuando se usó el aislado descrito para el método 1, el aislado (c), se logró un aroma/sabor agradable y agradable, que recuerda a las trufas.

5

**Ejemplo 12**

Los granos de café y las molindas que se producen por los métodos de la presente invención contenían polisacáridos y beta glucanos añadidos. Un análisis mostró que los granos de café Robusta producidos por los métodos de la invención tenían 30,54 mg de dextrano por gramo de granos de café. Este resultado proporcionó la cantidad total de polisacáridos en el sustrato a través de un método espectrofotométrico basado en un enfoque de ácido fenol-sulfúrico modificado. El análisis también mostró que los granos de café Robusta producidos por los métodos de la invención tenían beta glucanos al 0,432 %, según se midió por el método MYBG utilizando fuertes condiciones de hidrólisis para hidrolizar beta glucano con cuantificación por un método espectrofotométrico. Esto representa una ventaja sobre el consumo de beta-glucanos de los setas Reishi, ya que estas setas son una seta no culinaria por razones de amargor, lignificación y dureza, o en forma de píldora.

10

15

**Ejemplo 13**

20 Comparación de sabores 1, granos de arábica de Sumatra, peruanos y hondureños

Un profesional del café y propietario de un negocio de tostado de café (catador) y un empleado capacitado probaron el sabor, en un estudio de doble ciego, una comparación de los granos de café premium estándar utilizando granos de arábica de Sumatra, peruanos y hondureños (granos de control) con granos de café producidos por los métodos de la presente invención (granos micelizados). Tanto los granos micelizados como los granos de control se tostaron el día del ensayo. Estos se colocaron en tazas junto con el control, utilizando técnicas estándar de degustación de café.

25

Se confirmaron los efectos de mejora de sabor de la micelización. Los catadores tomaron muestras de preparaciones micelizadas y normales de cada variedad en esta ensayo ciego de sabor. Se tomaron notas. Al término de la degustación, se identificaron los granos de café utilizados para cada taza.

30

Comentando primero sobre el Sumatra micelizado, se describió que tenía un cuerpo más completo, más complejo y un sabor menos amargo que el Sumatra de control. Los catadores declararon que éste era el único proceso que conocían que realmente eliminaba un defecto del sabor y realmente mejoraba el sabor.

35

El micelizado peruano también mostró una notable mejora en el sabor, siendo menos amargo, más dulce y marcadamente "más brillante" cuando se micelizó. A pesar de ser un grano de alta calidad, el peruano de control sabía "plano" en comparación.

40

De los dos catadores, un catador pudo probar una diferencia en la preparación hondureña. Los métodos de la invención dieron como resultado la eliminación de los compuestos amargos que se encuentran en el café, dando como resultado una taza de café de mejor sabor.

45

Comparación del sabor 2 Granos de arábica

Se realizó una prueba de sabor de café micelizado en una cafetería. El barista/tostador (catador) entregó la taza formal de su café arábica Sulawesi (de origen indonesio). Los granos se seleccionaron del inventario y tanto los granos micelizados como los granos de control (Arábica) se tostaron el día de la cata. Los resultados mostraron que el café micelizado (producido por los métodos de la invención) tenía un perfil de sabor mejorado.

50

El catador describió el café micelizado como menos ácido, más dulce, con más cuerpo, más complejo y, en general, con mejor sabor que el grano original. Varios otros participantes en la prueba de sabor también notaron la mejora del sabor que se encontraba en el café micelizado.

55

Comparación del sabor 3 Granos robusta

Un profesional del café y propietario de un negocio de tostado de café (catador) y un empleado capacitado probaron el sabor, en un estudio de doble ciego, una comparación de los granos de café Robusta de control con los granos de café Robusta producidos por los métodos del presente invención. El café hecho de granos Robusta al 100 % generalmente se considera no bebible debido a la alta acidez y amargura de Robusta. Por lo tanto, los granos de café Robusta normalmente no se usan solos, en cambio, los granos Robusta normalmente se procesan previamente (por ejemplo, al vapor), y después se mezclan con los granos más caros para que sean sabrosos.

60

65

Este grano de menor calidad se considera no bebible por algunos debido a su amargor, pero Robusta se usa comercialmente en mezclas de café para bajar el precio. Está aumentando el uso de Robusta y el segmento de

Robusta del mercado del café ha crecido del 39 % del mercado en 2008 al 41 % del mercado en 2013.

5 Los catadores acordaron que el Robusta micelizado es "sin duda" una mejor taza de café que el no micelizado. Un catador comentó que "usted ha demostrado más allá de toda duda que su tecnología funciona"; el otro catador comentó que es un snob del café autoproclamado y que "tomaría este Robusta micelizado a diario", y al mismo tiempo comentó que el café no micelizado era desagradable. Más específicamente, notó una notoria falta de amargura y acidez en la taza, con más cuerpo en el sabor. Los catadores comentaron que un catador de café no profesional sería capaz de probar y apreciar la diferencia, y que el Robusta micelizado tiene un gran valor en el mercado. Otros empleados de la empresa tostadora también notaron la diferencia.

10 Los resultados de las pruebas de sabor demuestran claramente que los procesos instantáneos mejoran el sabor del café. Los resultados mostraron que los procesos de la invención eliminaron los defectos del sabor como la amargura de los granos de café Arábica y Robusta y aumentaron su sabor y valor. Los procesos dan como resultado café más dulce, con más cuerpo y de sabor más complejo, ya sea con granos Robusta o Arábica.

15 Comparación del sabor 4 Granos de cacao

20 Los granos de cacao preparados por el método del Ejemplo 6 se procesaron en chocolate y se probaron para compararlos con el chocolate elaborado con granos que no se habían sometido al proceso del Ejemplo 6. El catador declaró que el chocolate del chocolate micelizado tenía un aroma y un sabor más rico, suave y dulce con sabores y aromas menos amargos, ásperos y/o ácidos en comparación con el chocolate hecho con los granos de cacao sin tratar. El catador declaró que se necesitaba menos azúcar y/u otro edulcorante, tal como lácteos, para crear un chocolate que fuera altamente apetecible en comparación con el chocolate hecho con los granos de cacao sin tratar.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para la preparación de un producto de cacao micelizado, que comprende:
  - 5 a) proporcionar granos de cacao preparados, que comprende las etapas de:
    - i. proporcionar granos de cacao;
    - ii. esterilizar los granos de cacao preparados;
  - 10 b) proporcionar un componente fúngico preparado como un cultivo líquido;
  - c) inocular los granos de cacao preparados con el componente fúngico preparado; y
  - d) cultivar los granos de cacao preparados y el componente fúngico preparado para permitir la micelización para preparar el producto de cacao micelizado, en donde el cacao micelizado es menos amargo que el cacao crudo que no está micelizado, en donde el componente fúngico preparado se selecciona del grupo que consiste en *G. lucidum*, *H. erinaceus*, *T. versicolor*, *L. edodes*, *T. matsutake*, *F. velutipes*, *A. blazei*, *G. frondosa*, *P. nameko*, *L. officinalis*, *M. hortensis*, *M. angusticeps*, *A. auricula*, *T. fuciformis*, *I. obliquus*, *F. fomentarius*, *L. sulfureus*, *C. sinensis*, *T. melanosporum*, y combinaciones de los mismos.
  - 15
2. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de proporcionar granos de cacao preparados comprende además hidratar los granos de cacao.  
20
3. El método de la reivindicación 2, en el que los granos de cacao se hidratan a un nivel de humedad del 60 % o a un nivel de humedad del 30 %.
- 25 4. El método de la reivindicación 1, en el que el componente fúngico preparado es *G. lucidum*.
5. El método de la reivindicación 4, en el que el componente fúngico preparado es la cepa 806 de *G. lucidum*.
6. El método de la reivindicación 1, en el que el componente fúngico preparado es *C. sinensis*.  
30
7. El método de la reivindicación 1, en el que el componente fúngico preparado se prepara mediante un método que comprende mantener una cepa de hongos en un medio indefinido que comprende un extracto acuoso de grano de cacao y una fuente de energía.
- 35 8. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de cultivo se realiza durante 7 días.
9. Un producto de cacao micelizado preparado por el método de la reivindicación 1.

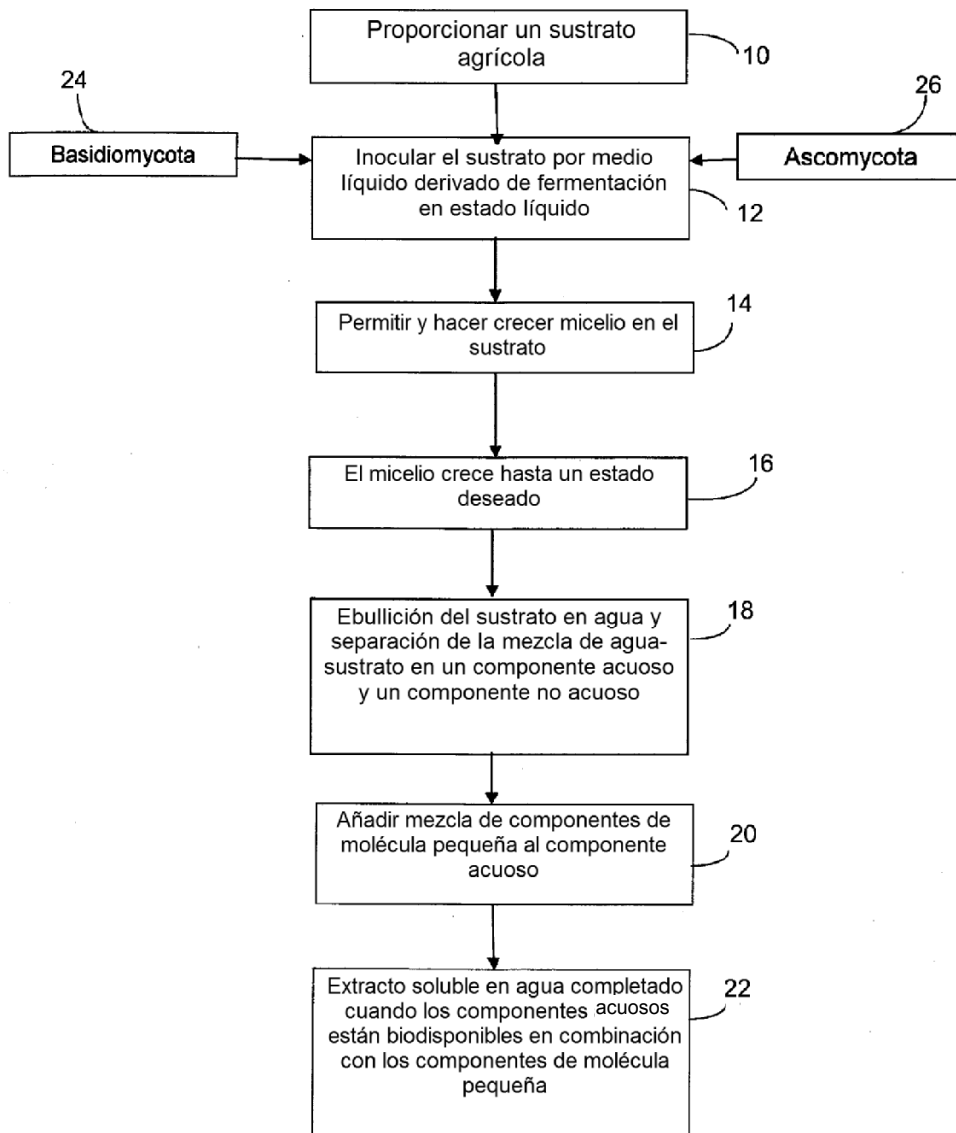


FIGURA 1

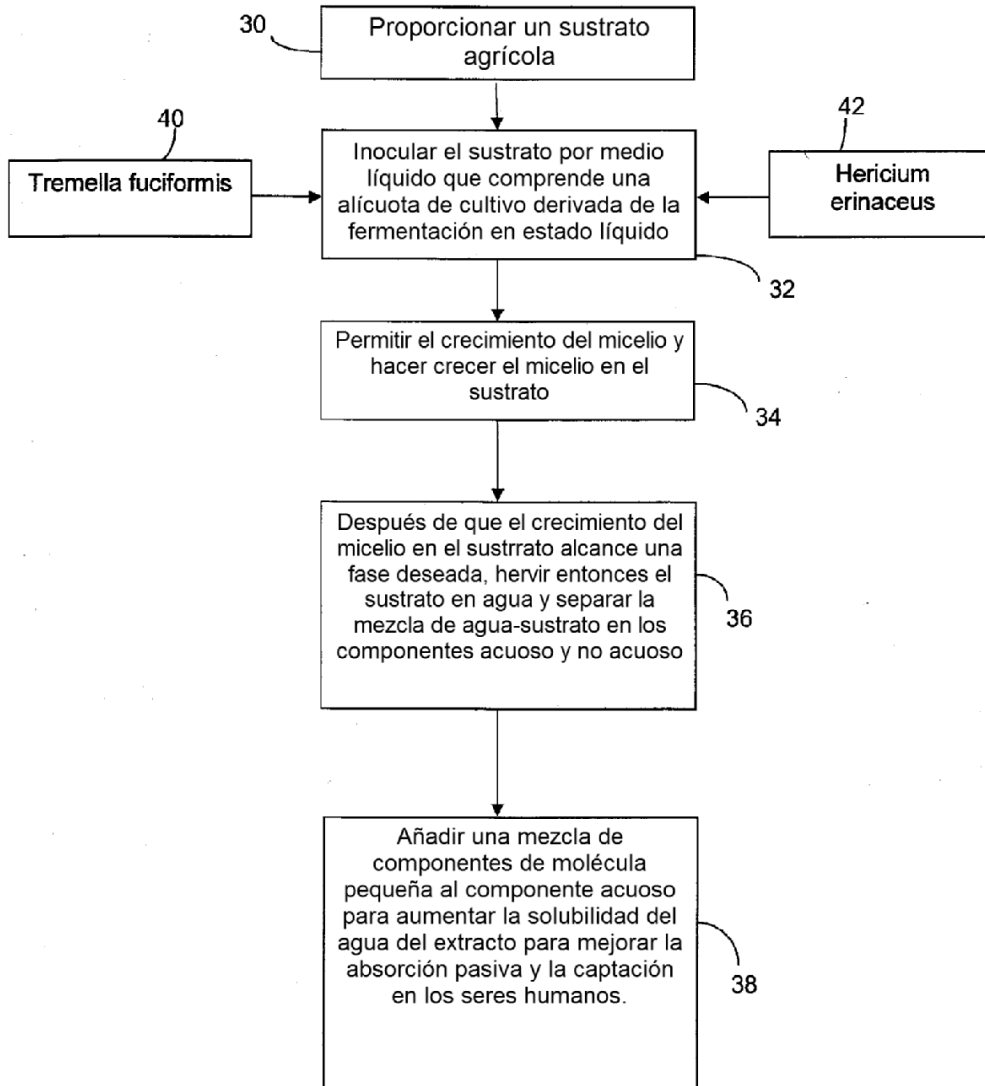


FIGURA 2

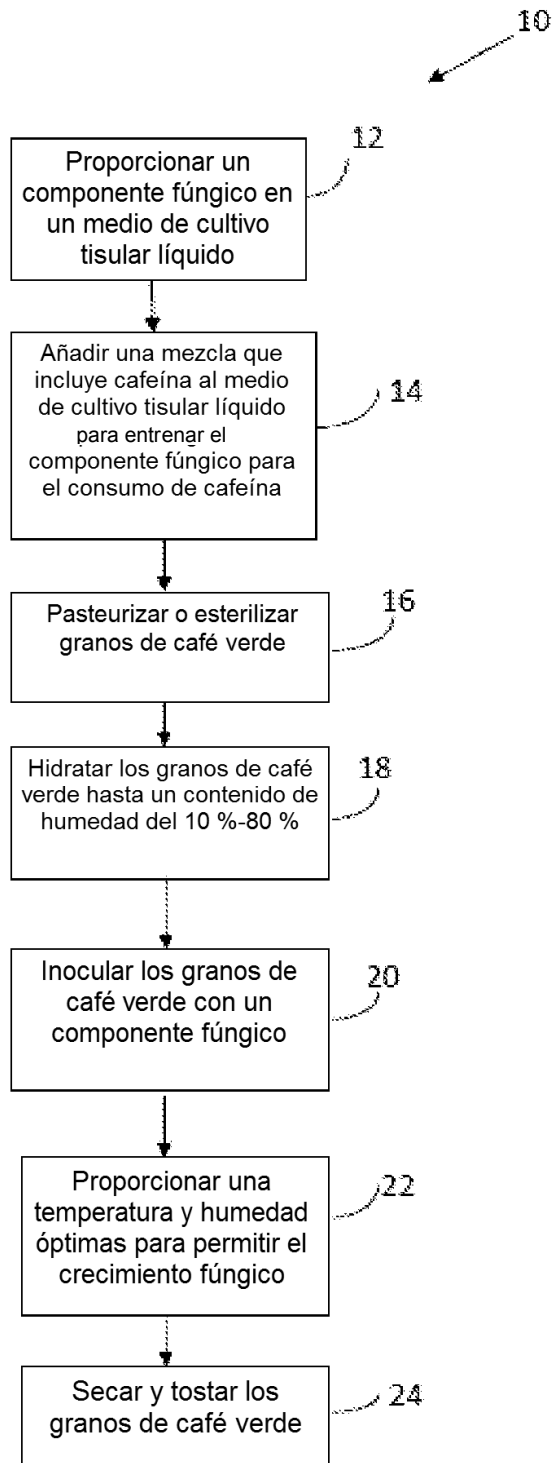


FIGURA 3



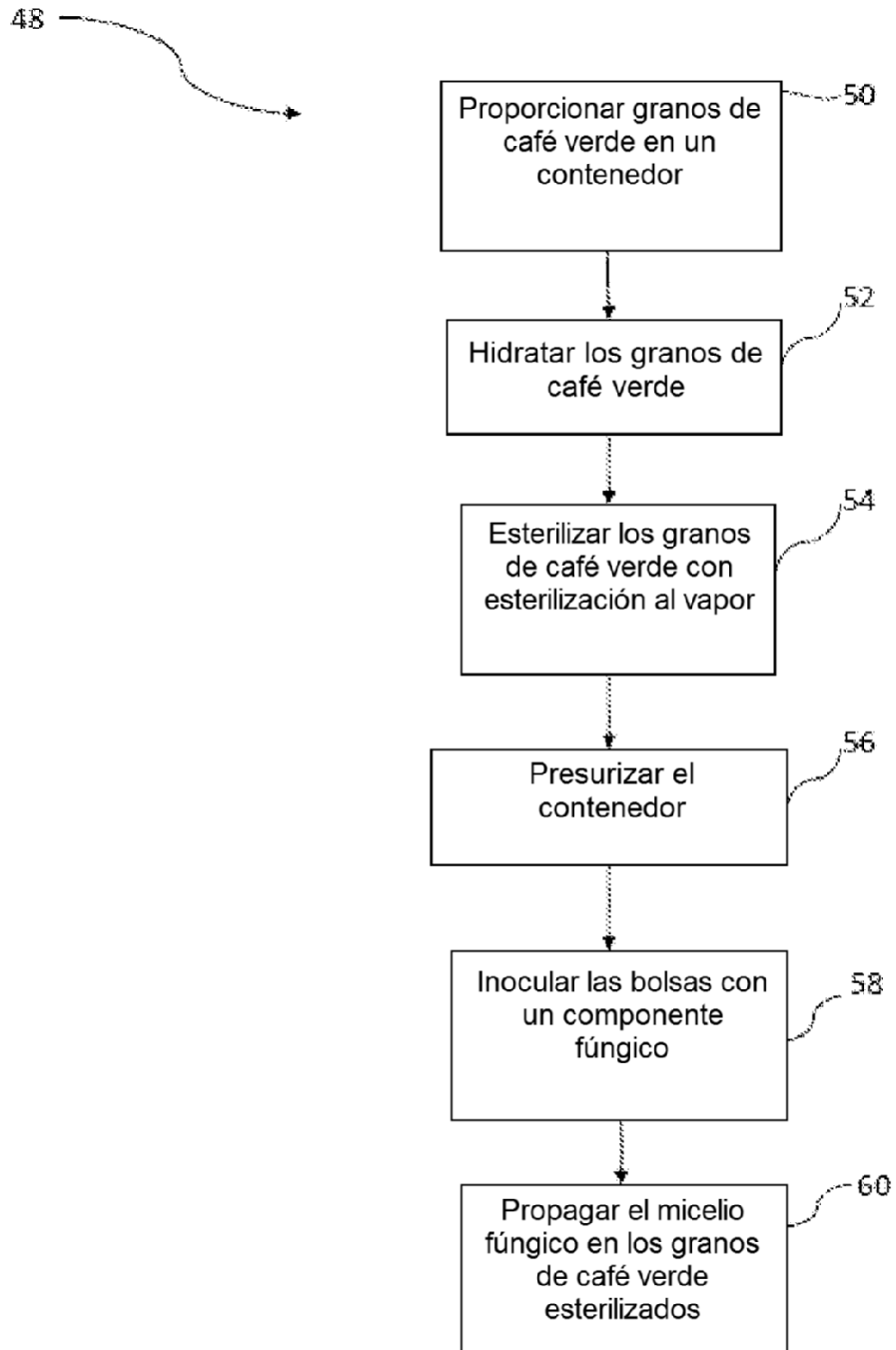


FIGURA 4

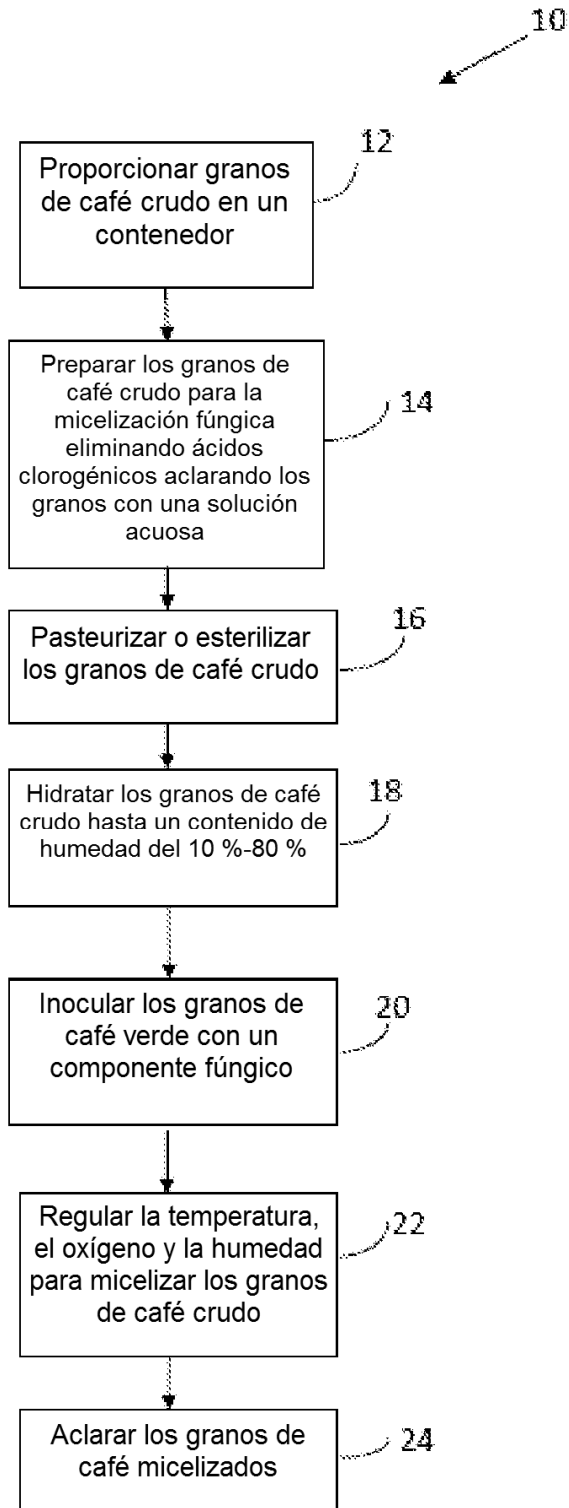


FIGURA 5

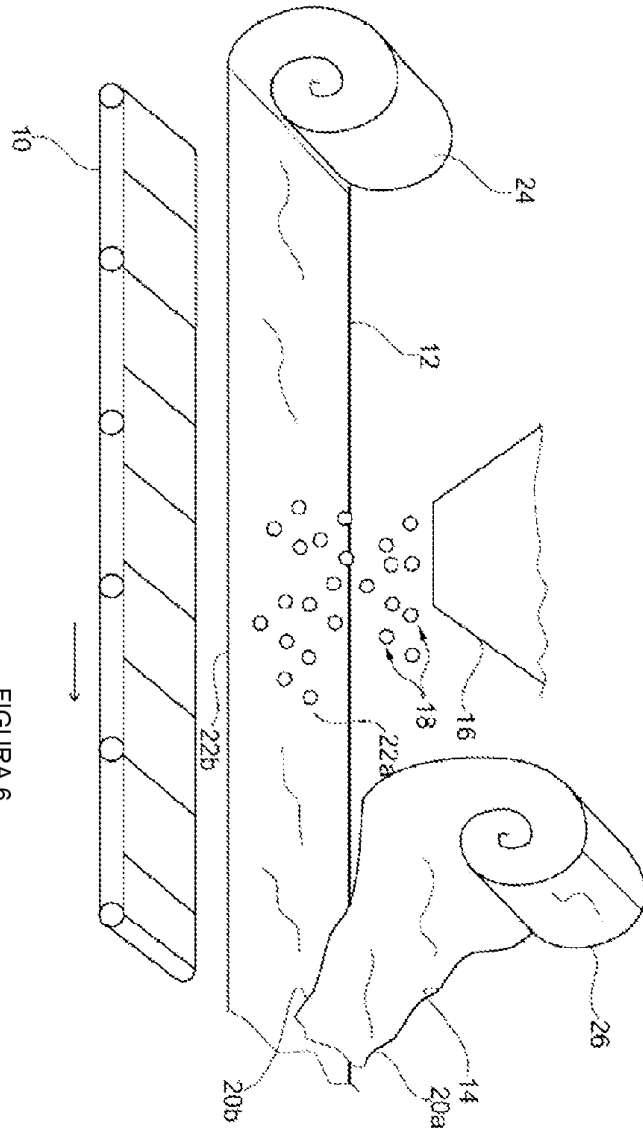


FIGURA 6

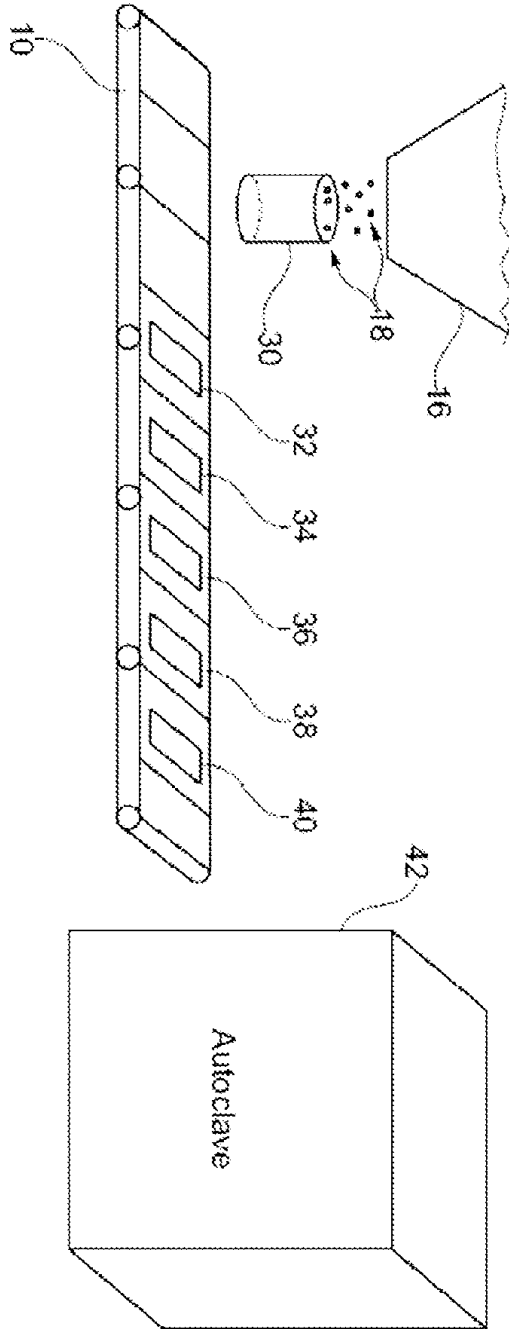


FIGURA 7

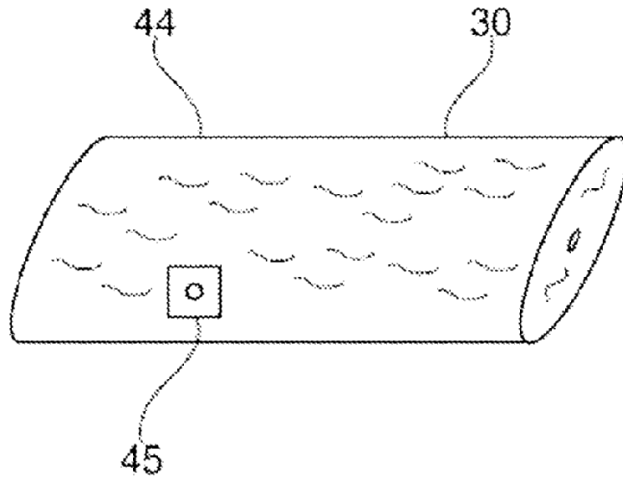


FIGURA 8(A)

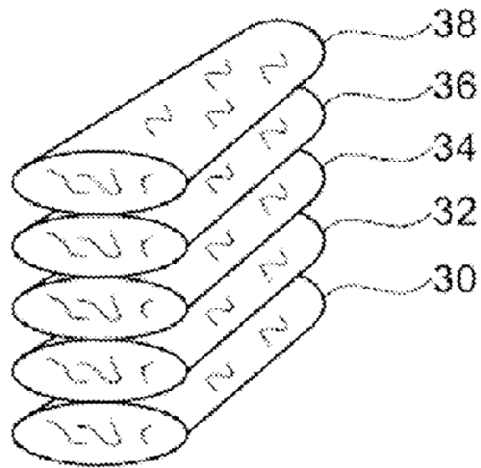


FIGURA 8(B)

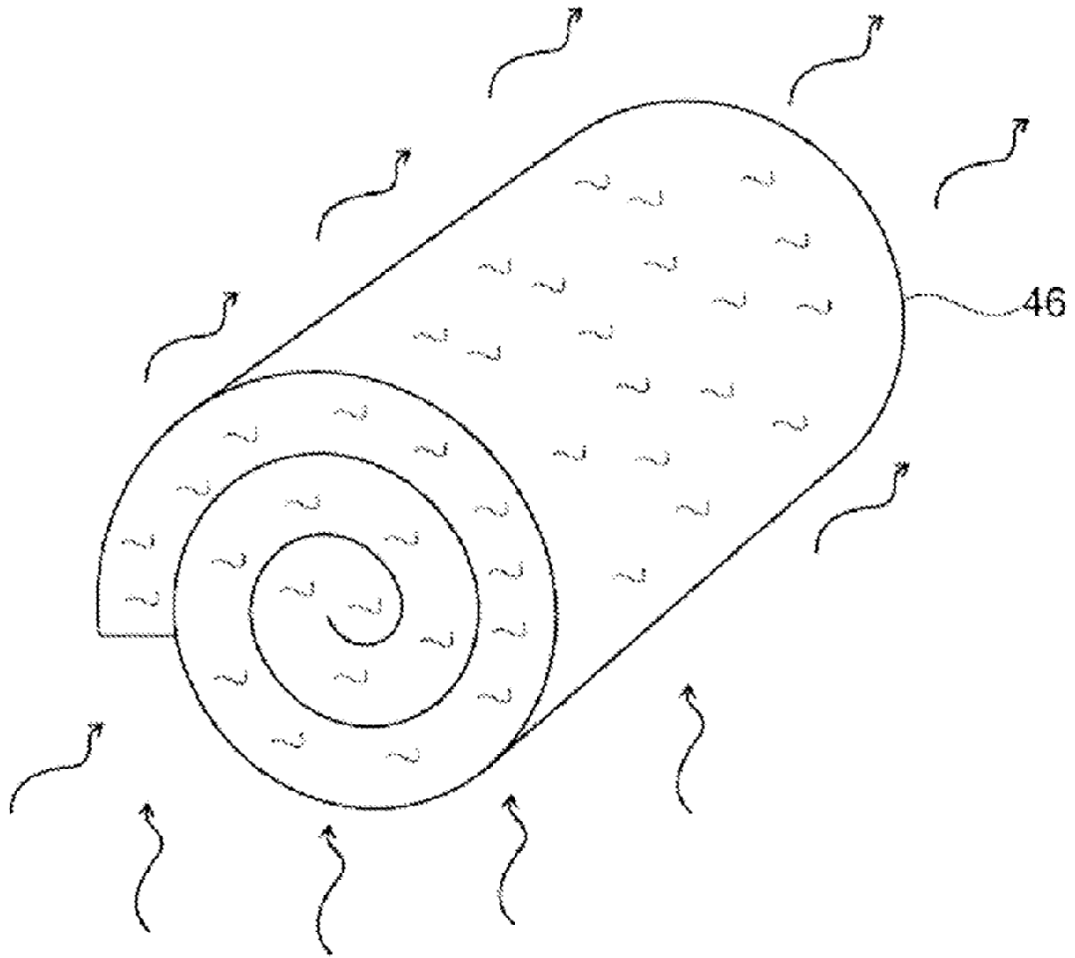


FIGURA 8C

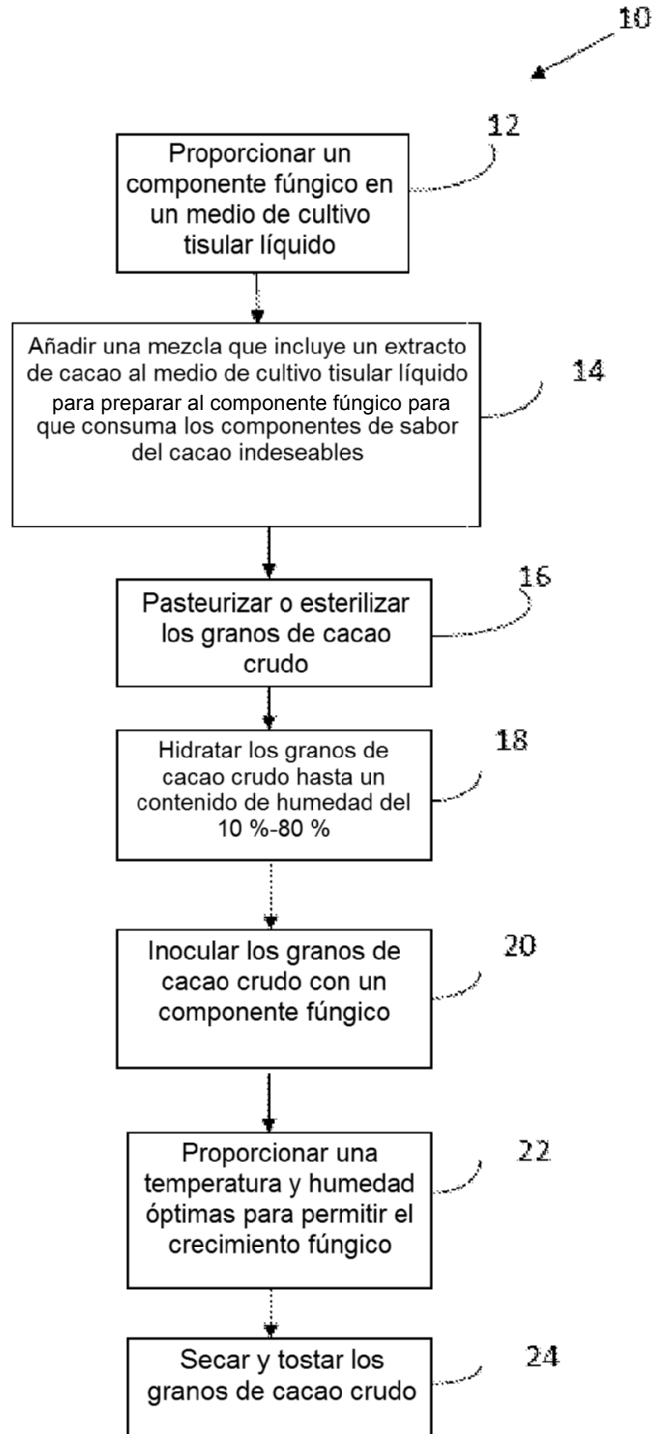


FIGURA 9

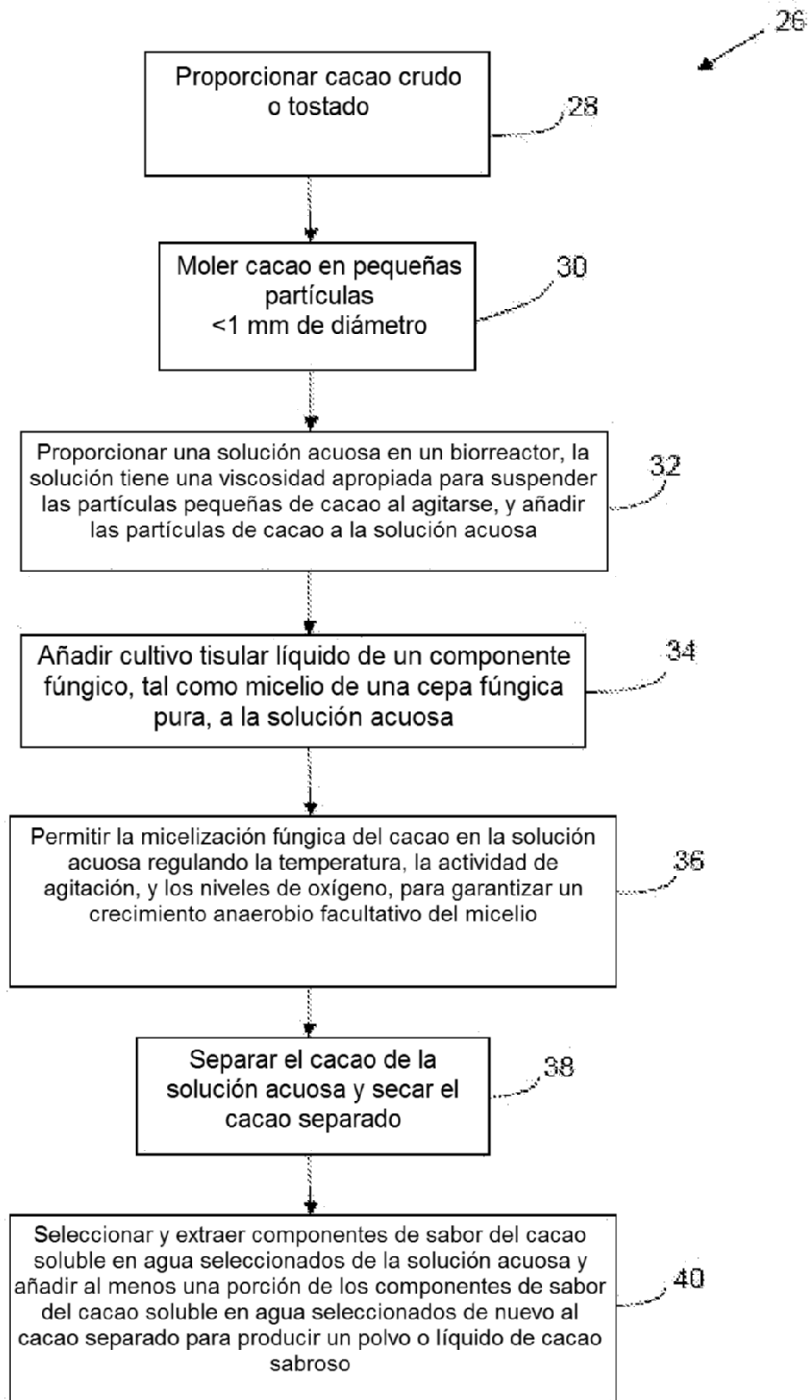


FIGURA 10