

JUSTIFICACIÓN TÉCNICA FINAL

PROYECTO:

**MEJORA Y VALORIZACIÓN DE LA TRUFA
DE ÁLAVA-ARABAKO BOILURRA
gehiLUR**



Socios participantes:

Solicitante: Cooperativa La Trufa de Álava – Arabako Boilurra Kooperatiba

Socio: AZTI

Socio: NEIKER-Tecnalia.



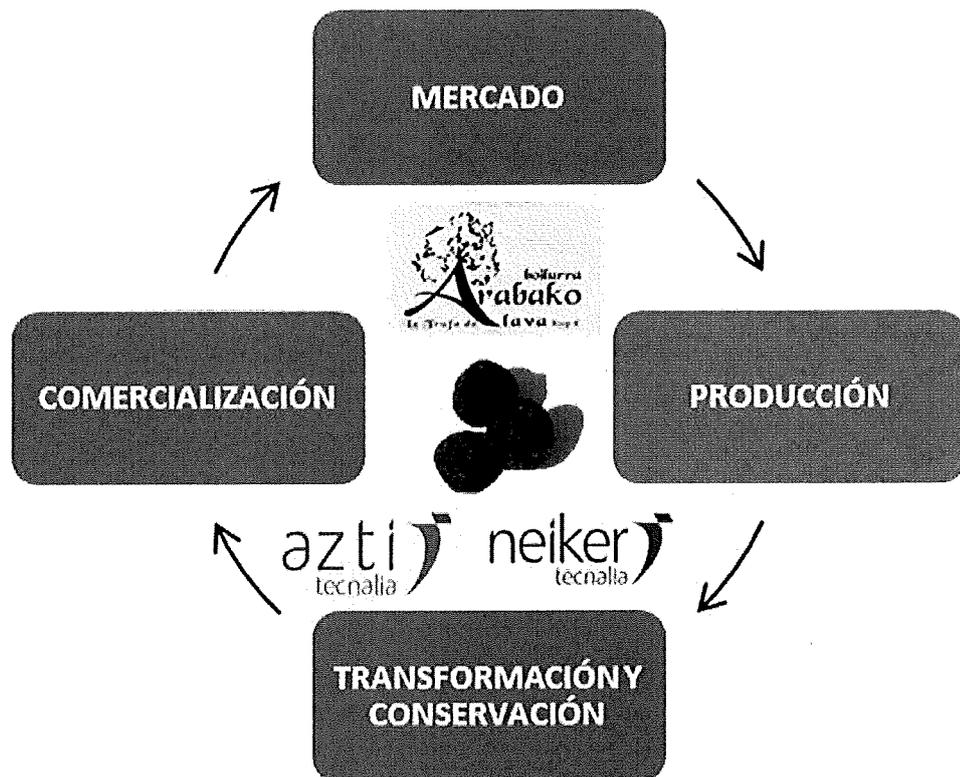
INDICE

1	DATOS BÁSICOS DEL PROYECTO	2
2	OBJETIVOS.....	4
3	DESCRIPCIÓN DE LAS TAREAS REALIZADAS Y GRADO DE AVANCE	4
	Fase I: Análisis de mercado-Coop Trufa de Álava	4
	Fase II: Aumento de la producción de trufa-NEIKER	5
	FASE III: Desarrollo de nuevos productos de mayor vida útil-AZTI	15
4	RESULTADOS OBTENIDOS	33
5	INCIDENCIAS.....	34



1 DATOS BÁSICOS DEL PROYECTO

- Inicio: 2016 y Finalización: 2018
- Puntos clave abordados en el proyecto y participantes del grupo operativo:





MEJORA Y VALORIZACIÓN DE LA TRUFA DE ALAVA

- Condicionantes y claves

La formación de este grupo operativo surge a partir de la estrecha relación previa entre la Cooperativa La trufa de Álava con AZTI y NEIKER de forma independiente. La unión de todos ellos en un único proyecto permite abordar todos los puntos de la cadena de valor de la trufa y cumple cuatro condiciones destacables:

1. **Innovación:** La innovación del presente proyecto radica principalmente en el desarrollo de productos de trufa novedosos a partir de porciones de trufa de menor valor comercial, la introducción de innovadoras tácticas de cultivo que favorezcan su productividad y la descripción de los factores claves para abrir nuevas zonas de cultivo.

2. **Proyecto piloto en beneficio del sector:** La cooperativa La Trufa de Álava actúa de tractor de un proyecto piloto para beneficio no sólo de sus socios sino de todo un sector que puede generarse en el resto de Los territorios de la CAPV. Así mismo se generará conocimiento complementario para otras iniciativas europeas, hasta ahora enfocadas en la explotación de recursos naturales de trufa sin procesado postcosecha. Conlleva un **beneficio directo para el sector de la CAPV ya** que aborda la implantación de ensayos piloto para la implementación del manejo y mejora de la productividad del cultivo de trufa y el desarrollo de nuevos productos de trufa de alto valor añadido que permitan abrir nuevos canales de comercialización superando la limitación temporal actual de la trufa fresca. Los parámetros a estudio estarán basados en las incertidumbres registradas por los actuales productores de la CAPV. Con este proyecto se pretende apoyar el desarrollo del sector para fomentar el desarrollo territorial y ser un complemento a la economía rural de la zona.

3. **En cooperación:** La cooperación entre los miembros del grupo operativo, un cooperativa agraria (Cooperativa La Trufa de Álava), un instituto de investigación (Neiker) y un centro tecnológico (AZTI) asegura la transmisión de necesidades, conocimientos y reflexiones entre los miembros. Esta colaboración contribuye a generar procesos y productos

innovadores potenciando la innovación en el sector agrario y la producción alimentaria. La cooperación entre todos los participantes que trabajan en los diferentes eslabones de la cadena de valor de la trufa es fundamental para la consecución de un producto final de calidad. Es decir, la calidad de los prototipos a desarrollar en el proyecto estará determinada tanto por los procesos de transformación aplicados en la trufa, los procesos de descontaminación y por la calidad de la trufa cultivada que será controlada mediante las técnicas de cultivo. Sin el trabajo cooperativo entre los participantes no se podría alcanzar la misma calidad en los productos finales.

Finalmente, el trabajo conjunto de 2 centros de investigación junto con la Cooperativa permitirá estimular la profesionalización del sector y mejorar su competitividad.



2 OBJETIVOS

El objetivo general del proyecto es **aumentar la competitividad del sector de la Trufa vasca para garantizar su sostenibilidad ambiental, económica y social.**

Para la consecución de este objetivo, se establecen los siguientes objetivos específicos:

- Poner en valor la Trufa de Álava frente a la de otras regiones
- Conocer el mercado de productos de trufa y con base de trufa, especialmente los mercados más avanzados como el francés o italiano, mediante un estudio de mercado.
- Aumentar la producción de trufa de calidad mediante el aumento de las áreas de cultivo de la trufa y el establecimiento de sistemas de producción óptimos.
- Mejora de la seguridad alimentaria y calidad de la trufa, a través de nuevas aplicaciones de descontaminación y procesado.
- Dar valor añadido a la trufa de la CAPV como materia prima para la producción de nuevos productos de mayor vida útil, diversificando el sector a través de nuevos productos basados en la revalorización las porciones de trufas con menor valor comercial.
- Fomentar alianzas con otros agentes de la transformación y distribución, para establecer nuevas vías de comercialización de la trufa transformada.
- Estimular la profesionalización del sector y mejorar su competitividad.
- Garantizar la sostenibilidad ambiental, económica y social de la producción de la trufa.

3 DESCRIPCIÓN DE LAS TAREAS REALIZADAS Y GRADO DE AVANCE

Cooperativa de trufa de Álava

Fase I: Análisis de mercado

TAREA 1: Análisis de mercado

En la anualidad 2017 se realizó una vigilancia de mercado sobre los productos con base de trufa lanzados entre 2015 y 2017, centrada principalmente en mercados español, francés e italiano. La vigilancia fue centrada en productos deshidratados, conservas y congelados.

Entre todos los productos observados, se destacan aquellos en los que la trufa se combina con otro tipo de ingredientes, principalmente en una base grasa, como son los untables, tanto en su versión dulce como salada, en productos como cremas de verduras, cremas de chocolate y avellanas, mousses lácteas o cárnicas, salsas tipo mayonesa o mantequilla.

Además de los untables, se observan una gran variedad de productos en los que se ha introducido trufa, principalmente en el mercado francés, como son los embutidos, salchichas, pastas, arroces, quesos y bombones (Ilustración 1).

Algunos de los productos observados en la vigilancia, como la sal o las perlas, pueden tener un principal interés para los clientes potenciales de la trufa de Álava, al igual que ocurre con el aceite de trufa que actualmente se está comercializando.



Ilustración 1. Productos de mercado a base de trufa

A partir de este análisis se realizó una reflexión junto con los técnicos de AZTI, para orientar los trabajos a realizar en la Fase III y tarea 2 del presente proyecto, previstos para la anualidad 2018.



MEJORA Y VALORIZACIÓN DE LA TRUFA DE ALAVA

NEIKER-Tecnalia

FASE II: Aumento de la producción de trufa

TAREA 1: Análisis físico-químico, mesoclimático y geoespacial para la localización de zonas de óptima producción de trufa

Los parámetros condicionantes de la producción de trufa se agrupan en dos ámbitos:

Meteorológicos: Especialmente aquellos que condicionan tanto el crecimiento y vigor de los árboles sobre los que está inoculado el hongo como los que condicionan el microclima de la zona radicular y de las cuales depende la supervivencia y desarrollo del hongo.

Edáficos: Independientemente de los parámetros meteorológicos, la estructura física y la química del suelo de cultivo condicionan el desarrollo fúngico. Factores como permeabilidad y drenaje, pH o retención de agua son factores edáficos determinantes de la calidad y cantidad de trufa en las parcelas de cultivo.

Los parámetros arriba expuestos, junto a otros adicionales relativos a profundidad, pendiente y vientos dominantes, han sido tenidos en cuenta para determinar las zonas óptimas de producción trufera en la Comunidad Autónoma del País Vasco. Durante las anualidades 2017 y 2018 se realizó la recopilación de datos en los 3 territorios históricos y está prevista la finalización del análisis estadístico global de los mismos en marzo de 2019. Para el análisis geoespacial de los datos ha sido necesario contar con la colaboración de la Universidad Friedrich Schiller de Jena (FSU) que se encuentra en la ciudad Alemana de Jena. En estos momentos estamos trabajando en la finalización del mapa de aptitud para el cultivo de trufa en el País Vasco con mayor resolución al obtenido anteriormente, resolviendo mediante el análisis de capas agroclimáticas las condiciones edafo-ambientales óptimas para el desarrollo de este cultivo. La finalización del mapa completo está prevista para Marzo de 2019, sin embargo en esta memoria entregamos un mapa preliminar con los resultados obtenidos.

Hasta el momento el mapa descrito preliminar está recogido en la figura anexo 1 a esta memoria.

TAREA 2: Determinación de componentes bióticos de suelo, planta e inóculo ligados al óptimo desarrollo de la trufa

Preliminares condicionantes de esta tarea:

España, Francia e Italia, por su climatología mediterránea, lideran la producción de *Tuber melanosporum* (conocida comúnmente como trufa negra) a nivel mundial. En la última década se ha incrementado notablemente en España la superficie dedicada a plantaciones truferas. La producción de trufa de invierno de alta calidad es la producida por esta especie, como es el caso de la producción alavesa objetivo de este estudio. Sin embargo, hay otras especies, entre ellas



MEJORA Y VALORIZACIÓN DE LA TRUFA DE ALAVA

Tuber brumale, que se considera un contaminante de las plantaciones. Esta última especie, es denominada comúnmente como trufa de invierno, que es el período de su recolecta. Morfológicamente, es de color negro, muy similar a *T. melanosporum* pero con un aroma muy profundo y de muy inferior cotización en el mercado, aunque se recolecta junto a la trufa negra en algunas zonas trufieras.

El control de especies del género *Tuber* tanto en preplantación (árboles de vivero inculados previamente a la plantación en campo) como una vez que se ha realizado la plantación, es fundamental para establecer la calidad y productividad de las plantaciones trufieras. Durante la plantación, el establecimiento de *T. melanosporum* depende de la microbiota edáfica y las especies del género *Tuber* que pudieran desplazar a la población de *T. melanosporum* inoculada previamente.

En lo que se refiere a contaminación por otras especies de trufas distintas a *T. melanosporum* con mucho menor interés comercial, los tres países europeos de mayor producción de trufa negra (Italia, Francia y España), tienen actualmente una problemática parecida, y los datos técnicos recopilados en este proyecto indican que existe una contaminación de plantaciones trufieras por *Tuber brumale* más allá de lo esperado, y más allá de lo conocido por sus propietarios y por los viveristas.

Morfológicamente no es tan fácil como se dice diferenciar a *Tuber brumale* de *Tuber melanosporum*. La variabilidad fenotípica de ambas especies es tan elevada que cuando se han realizado análisis genéticos de lotes de comerciantes de *T. melanosporum*, se han detectado en ellos *Tuber brumale*.

Metodología y fases de ejecución:

Para abordar la cuestión del bajo rendimiento de la trufa en algunas plantaciones del País Vasco y teniendo en cuenta los condicionantes antes expuestos, esta tarea se ha abordado en dos fases:

- a) Puesta a punto de técnicas de detección de *Tuber melanosporum* y *T. brumale* por métodos moleculares a partir de muestras de trufa y de raíz inoculada de lotes comerciales certificados de viveros autorizados.
- b) Cuantificación de la cantidad de material fúngico ligado a *T. melanosporum* y *T. brumale* en las plantaciones trufieras en producción de Álava.

Para la consecución de este trabajo se ha tenido apoyo por parte de la asociación de truficultores del País Vasco en la disponibilidad de parcelas, consecución de muestras e información adicional. Se realizó un diseño experimental de recogida de trufa en 6 plantaciones con los propietarios voluntarios. Se les suministraron materiales para marcar árboles y recoger las muestras de raíz en la campaña 2018.



MEJORA Y VALORIZACIÓN DE LA TRUFA DE ALAVA

a) Secuencia de técnicas y resultados más relevantes de la puesta a punto de técnicas de detección e identificación de trufa negra.

- Se comparó la especificidad de tres conjuntos de cebadores publicados previamente diseñados para amplificar la especie *T. melanosporum* y un nuevo conjunto de cebadores específico para *T. melanosporum* (Paolucci *et al.*, 1999; Sejalon-Delmas *et al.*, 2000; Douet *et al.*, 2004). Se siguieron estrictamente las condiciones previamente publicadas para todos los conjuntos de cebadores.
- Partiendo de las secuencias previamente publicadas, en NEIKER se diseñaron nuevos cebadores con objeto de mejorar la selectividad y discriminación de grupos de compatibilidad de la especie. El nuevo conjunto de cebadores selectivos para *T. melanosporum* (T.mel_for TTG CTT CCA CAG GTT AAG TGA; T.mel_rev TAA AGT CCG TCG TTC ATG C) se diseñó sobre la base de haplotipos ITS de *T. melanosporum* representativos (Murat *et al.*, 2004; Bonito *et al.*, 2005; Jeandroz *et al.*, 2008).
- La especificidad de estos cuatro conjuntos de cebadores (3 previamente publicados y uno diseñado por el equipo de NEIKER), se probó en ADN extraído de trufa fresca. Estos incluían *T. melanosporum* y especies estrechamente relacionadas y morfológicamente similares a esta trufa negra: *T. indicum* grupo A, *T. indicum* grupo B, *T. brumale*.
- Cada una de las ocho secuencias de cebadores de *T. melanosporum* fueron secuenciadas y comparada su secuencia mediante la herramienta BLAST contra GenBank (Basic Local Alignment Search Tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), de esta manera se evaluó la especificidad *in silico* de los cebadores utilizados en este trabajo, así como los diseñados por primera vez por nuestro equipo, y sobre muestras comercializadas en viveros distribuidores habituales en Álava.
- Se consiguió identificar los dos grupos de compatibilidad sexual de *T. melanosporum* MAT1-1 y MAT1-2, factor en algunos casos que pudiera estar relacionado con la producción trufera
- Una vez conocida la especificidad de los cebadores utilizados, se puso a punto la metodología qPCR y se logró realizar una cuantificación relativa de la cantidad de inóculo en la raíz de los árboles en campo. La qPCR o PCR cuantitativa (en inglés, quantitative polymerase chain reaction; qPCR o Q-PCR) o PCR en tiempo real (en inglés real time PCR) es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ácido desoxirribonucleico (ADN).
- Se consiguió detectar EN RAÍZ DE ARBOLES del género *Quercus* inoculados específicamente con la especie *T. melanosporum*, diferenciándola de las demás especies del género *Tuber* y fenotípicamente muy similares. Por lo tanto, en este proyecto se ha puesto apunto una técnica molecular de detección de *T. melanosporum* en encinas.



MEJORA Y VALORIZACIÓN DE LA TRUFA DE ALAVA

b) Secuencia de técnicas y resultados más relevantes de la cuantificación de la cantidad de material fúngico ligado a trufas negras en las plantaciones truferas en producción de Álava:

Teniendo en cuenta los resultados de la fase primera anteriormente expuestos, se diseñó un ensayo en campo que nos permita saber si podemos detectar diferencias en cantidad de trufa detectada en raíz, así como de tipos de apareamiento o Mating types (MATs) entre árboles productivos y no productivos.

Se diseñó un protocolo de marcado de árboles y muestreo para árboles productivos y árboles no productivos, 4 muestras por árbol orientadas hacia el norte sur este y oeste. Se proporciona material para realizar el muestreo y un GPS para el marcaje de las coordenadas.

Las muestras se recogieron de 6 parcelas:

- Agricultor 1, Gastiain (Navarra)
- Agricultor 2: Campezo (Araba)
- Agricultor 3: Gamiz (Araba)
- Agricultor 4: Orbiso (Araba)
- Agricultor 5: Kuartango (Araba)
- Agricultor 6: Bohilur S Coop (Araba)

Se procedió a realizar la extracción de ADN de todas las muestras de raíz. Se cuantificó la cantidad de ADN presente (mezcla de la raíz y del hongo). Tras la qPCR se identificó la especie de las trufas presentes en las muestras puras y secuencialmente diluidas, así como en controles positivos y negativos de referencia de las especies truferas (120 submuestras en total). Este paso previo es esencial, como referencia de cuantificación de las poblaciones en Álava.

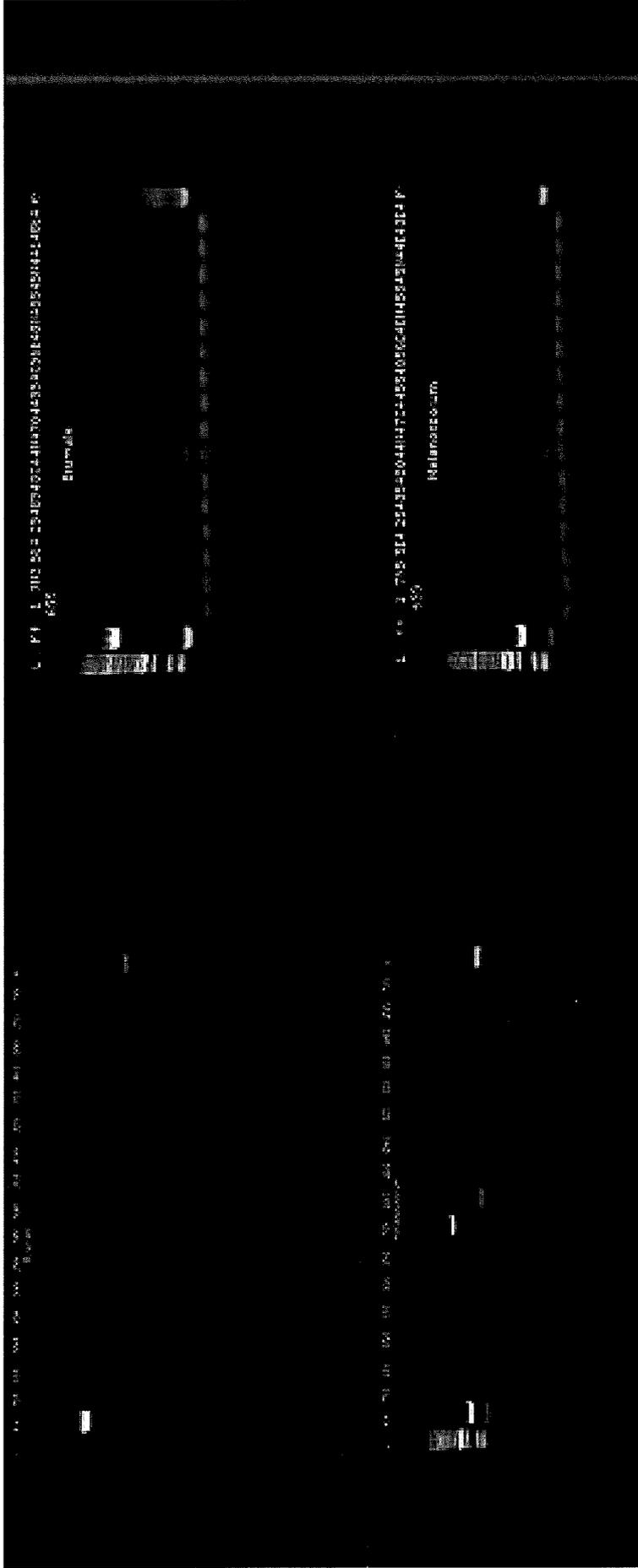
Tras la detección de ADN específico de las especies del género *Tuber* y como se puede observar en las imágenes obtenidas de los productos de amplificación de la PCR resultantes (figuras 1 a 6), los resultados positivos son muy escasos, hasta el extremo que resulta inviable realizar el estudio con este material ya que no se puede llegar a ninguna conclusión con tan solo 4 resultados positivos para *T. melanosporum*, y uno para *T. brumale*.

Se concluye que tan sólo en 5 muestras de las 120 analizadas había cantidad suficiente de ADN como para proseguir el estudio, lo que reduce el muestreo a un 3,3 % de las muestras lo cual hace el estudio inviable.

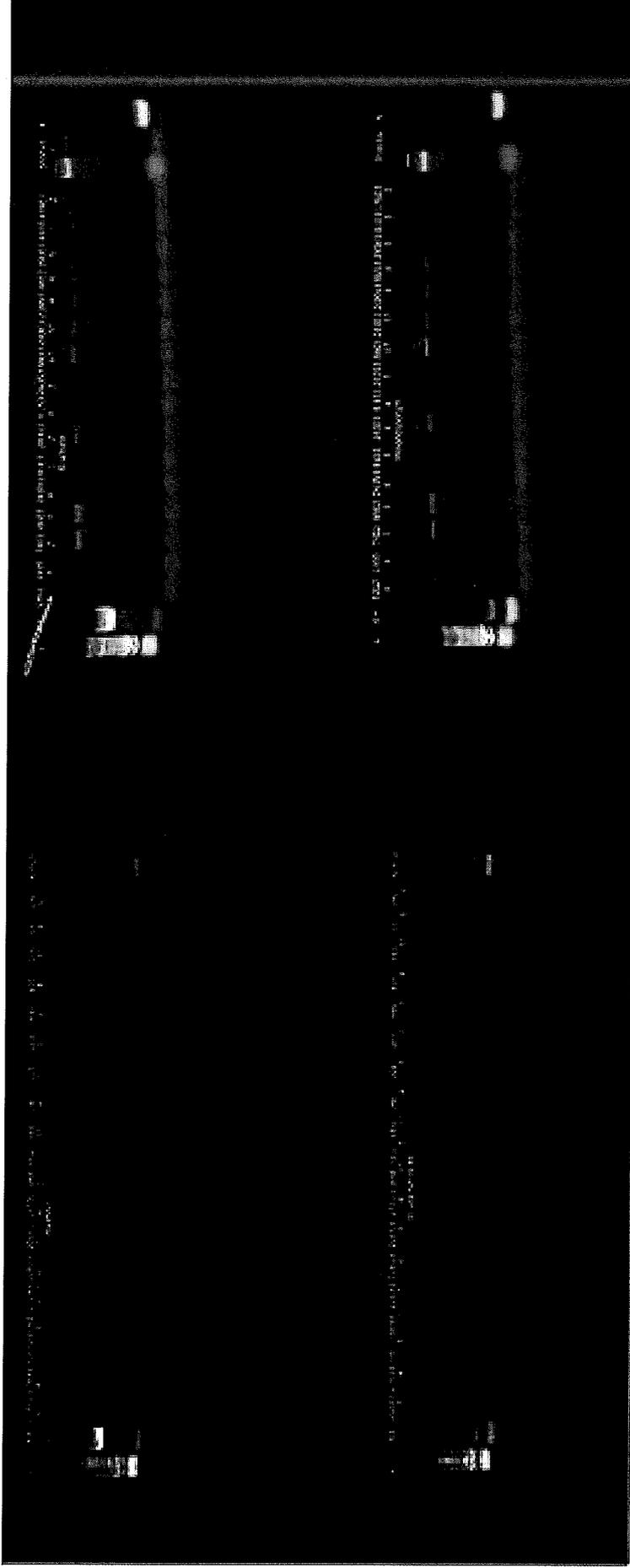


MEJORA Y VALORIZACIÓN DE LA TRUFA DE ALAVA

Ante estos resultados, se toma la determinación de repetir de nuevo la toma de muestras en plantaciones en las que la cosecha 2018-2019 haya obtenido resultados relevantes de la cantidad y calidad de cosecha relevante.



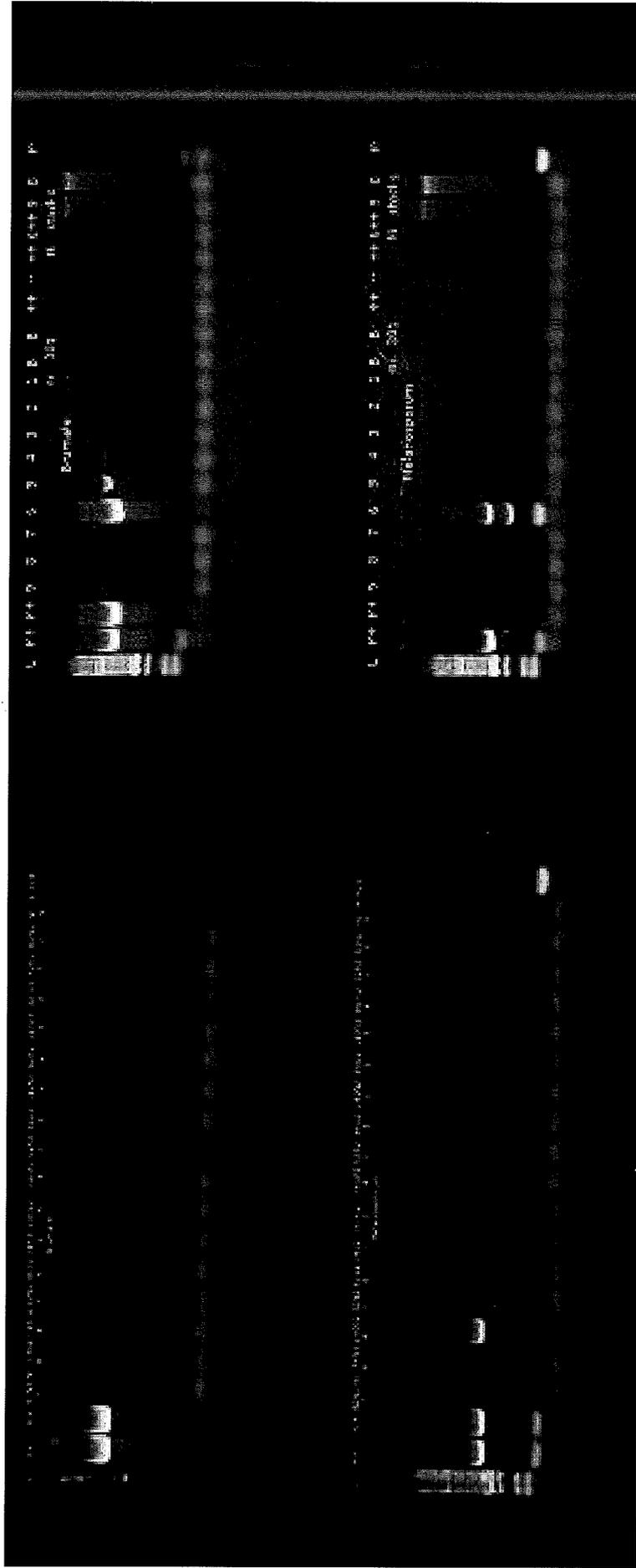
Figuras 1 y 2: Fragmentos de amplificación de ADN con cebadores específicos de *T. melanosporum* y *T. brumale* en muestras de raíz de encinas tomadas en campos de producción trufiera de Gastrialm (Navarra), Itzda) y Campezo (Araba) (Dcha)



Figuras 3 y 4: Fragmentos de amplificación de ADN con cebadores específicos de *T. melanosporum* y *T. brumale* en muestras de raíz de encinas tomadas en campos de producción trufiera de Gamiz (Araba) (Izda) y Orbiso (Araba) (Dcha)



MEJORA Y VALORIZACIÓN DE LA TRUFA DE ALAVA



Figuras 5 y 6: Fragmentos de amplificación de ADN con cebadores específicos de *T. melanosporum* y *T. brumale* en muestras de raíz de encinas tomadas en campos de producción trufera de Kuartango (Araba) (Izda) y Bohilur S Coop (Araba) (Dcha)



MEJORA Y VALORIZACIÓN DE LA TRUFA DE ALAVA

TAREA 3: Implantación de ensayos piloto

Tal y como se anunció en anteriores informes de seguimiento, se han realizado varias reuniones de trabajo entre los socios y se han ejecutado las siguientes acciones:

- Análisis del estado sanitario y productivo de los campos truferos en Álava
- Toma de contacto con tres grupos de investigación en el área de truficultura: IRTA de Cataluña y CITA de Zaragoza, así como con el grupo nacional de investigación en trufa
- Para la implantación de ensayos, se reestructuró la tarea para poder obtener datos que permitan llegar al objetivo previamente planteado. Junto con la Cooperativa de trufa de Álava, se han seleccionado 12 campos productivos, teniendo en cuenta 3 parámetros diferenciales en Álava: tipo de LABOREO, PODA Y RIEGO. En cada unidad (campo control) se tomarán 1920 datos relativos a:
 - o Trufa: Volátiles, hongo asociado, MAT y signos
 - o Árbol: hongo asociado y signos asociados a los quemados
 - o Análisis de suelo
 - o Estrés hídrico y Temperatura de suelo entre 10-40 cm

Tras los resultados obtenidos sobre la población de trufa, expuestos anteriormente, se ha decidido realizar una nueva prospección en la campaña 2018-19, a partir de la cual se haga un análisis multiparamétrico y poder definir los parámetros agroclimáticos determinantes de la producción y calidad trufera.

El Grupo Operativo formado en este proyecto seguirá trabajando en cooperación para la consecución de los objetivos planteados en este proyecto.



MEJORA Y VALORIZACIÓN DE LA TRUFA DE ALAVA

AZTI

FASE III: Desarrollo de nuevos productos de mayor vida útil

TAREA 1: Caracterización y descontaminación de las trufas

Durante la anualidad 2017 se realizó una caracterización inicial de trufa fresca en cuanto a contaminación microbiológica de *Pseudomonas* presuntivas (PP) tras recolección y limpieza para conocer la situación de partida y así poder plantear los tratamientos de descontaminación a ensayar.

Se analizaron trufas de tres fincas, en dos grados de madurez diferentes y en tres situaciones diferentes: recolectada, tras dos días en refrigeración a 4°C en condiciones de humedad y tras limpieza con cepillo bajo agua y dejando secar (máximo 1h30min). Se consideraron estos puntos a modo de reproducir las condiciones previas a la comercialización de la trufa fresca.

Las fincas de las cuales se analizaron trufas fueron: Finca 1 (F1): Acedo, Finca 2 (F2): Ancin y Finca 3 (F3): Gastien.

Para los dos grados de madurez se siguió el mismo protocolo de trabajo: el mismo día de la recepción de las trufas en AZTI, se tomaron tres trufas al azar de cada una de las fincas anteriormente nombradas. Una de ellas se analizó al momento y las otras dos se guardaron en refrigeración (4°C) en condiciones de humedad (envueltas en paño mojado) durante 2 días. Tras este tiempo, una de las trufas se analizó y la otra se limpió frotando con cepillo bajo agua de grifo y se dejó secar hasta su totalidad a T ambiente (máximo 1h30min, Tª ambiente: 15°C).

En Figura 1 se muestran los resultados de este estudio inicial.

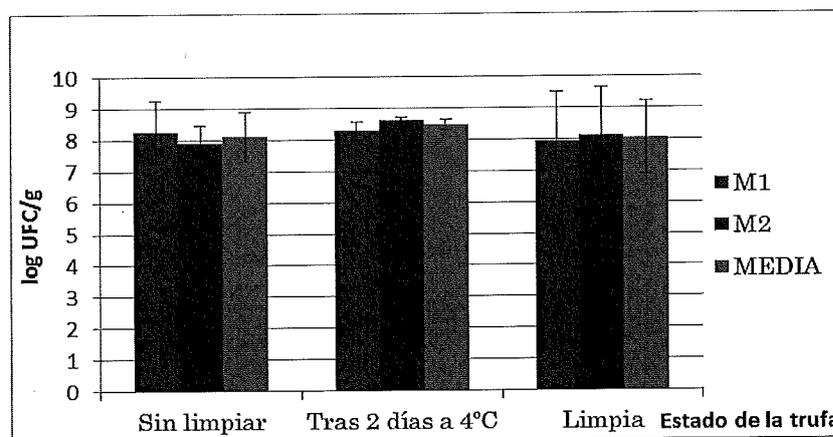


Figura 1. Nivel de contaminación por *Pseudomonas* spp. Presuntivas en trufa fresca para los grados de madurez 1 y 2 y de forma global (media).

Tras la caracterización inicial se aplicaron a las trufas frescas diferentes tratamientos, con el objetivo de reducir la carga microbiológica del PP inicial. Para los tratamientos de descontaminación se utilizaron 2 tecnologías: ultrasonidos (ULT) y altas presiones hidrostáticas (HHP).



MEJORA Y VALORIZACIÓN DE LA TRUFA DE ALAVA

Las condiciones de proceso para cada una de las tecnologías se eligieron en base a una revisión bibliográfica previa (Tabla 1).

El objetivo no solo fue valorar el grado de descontaminación alcanzado en el tiempo 0, sino también a lo largo del tiempo de almacenamiento en congelación. Por ello las trufas frescas una vez tratadas fueron almacenadas en congelación a -18°C durante 11 meses y analizadas a tiempo 0 (tras tratamiento), tiempo 6 meses y tiempo 11 meses de almacenamiento en congelación.

Tabla 1. Condiciones de tratamiento de ultrasonidos y altas presiones hidrostáticas aplicadas en trufa fresca.

Tratamiento	Nombre	Condiciones de proceso
Ultrasonidos	ULT1	40Hz,10min, 50%EtOH-50%H ₂ O, relación p/√ 0.24.
Ultrasonidos	ULT2	40Hz,10min, 60%EtOH-40%H ₂ O, relación p/√ 0.24.
Altas Presiones Hidrostáticas	HHP 1	3000bar,5min
Altas Presiones Hidrostáticas	HHP 2	5000bar,5min
Altas Presiones Hidrostáticas	HHP 3	3000bar,10min
Altas Presiones Hidrostáticas	HHP 4	5000bar,10min

Además de trufas frescas, se utilizaron trufas congeladas (sin tratamiento de descontaminación) con un año de almacenamiento en -18°C con el objetivo de conocer la contaminación microbiológica referente al PP.

Descontaminación de PP a tiempo 0, 6 y 11 meses en trufa fresca

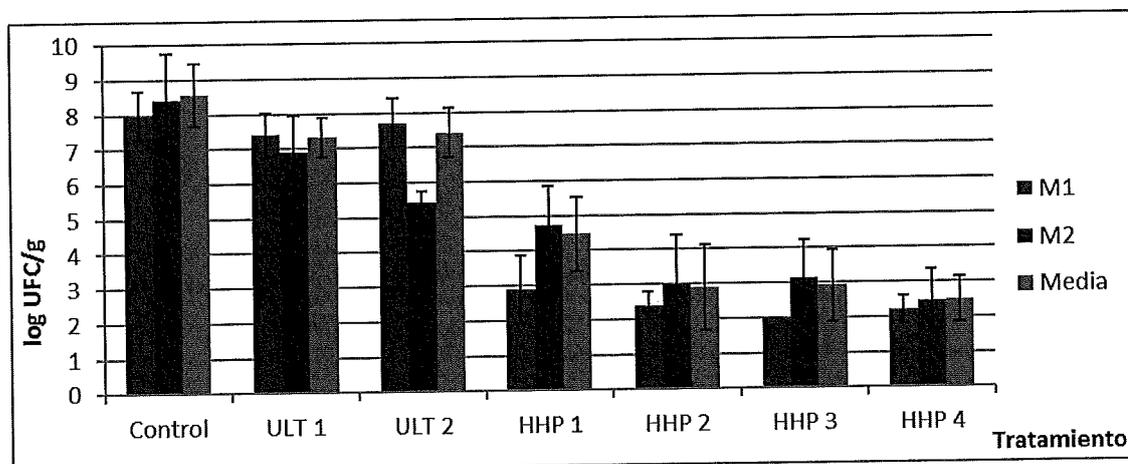


Figura 2. Nivel de contaminación por *Pseudomonas* spp. Presuntivas en trufa fresca en función del tratamiento aplicado para trufas de madurez 1 (M1, n=3) y madurez 2 (M2, n=3) y en conjunto (media, n=6).

De la misma manera se presentan los resultados en referencia a descontaminación de los tiempos 6 y 11 meses.



MEJORA Y VALORIZACIÓN DE LA TRUFA DE ALAVA

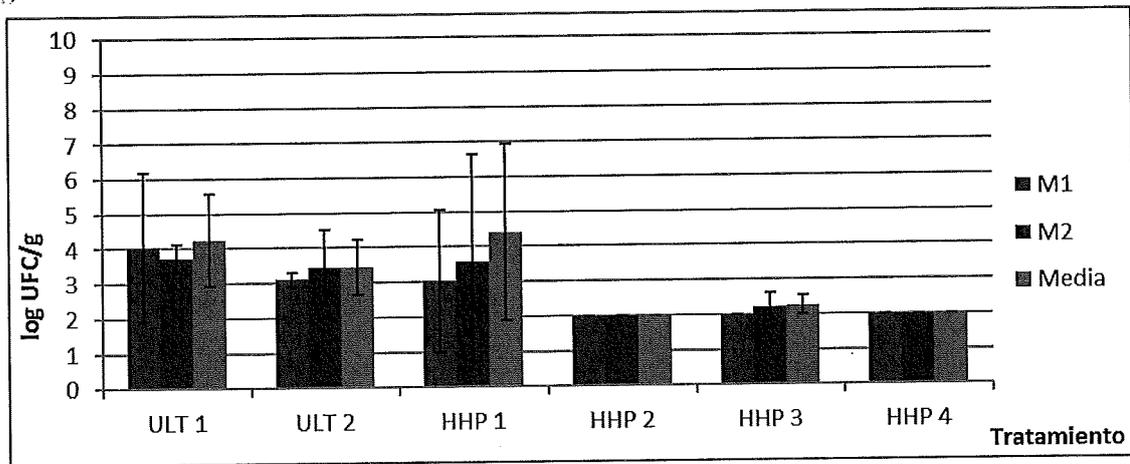


Figura 3. Nivel de contaminación por *Pseudomonas* spp. Presuntivas tras 6 meses de congelación de trufa fresca descontaminada en función del tratamiento aplicado para trufas de madurez 1 (M1, n=3) y madurez 2 (M2, n=3) y en conjunto (media, n=6).

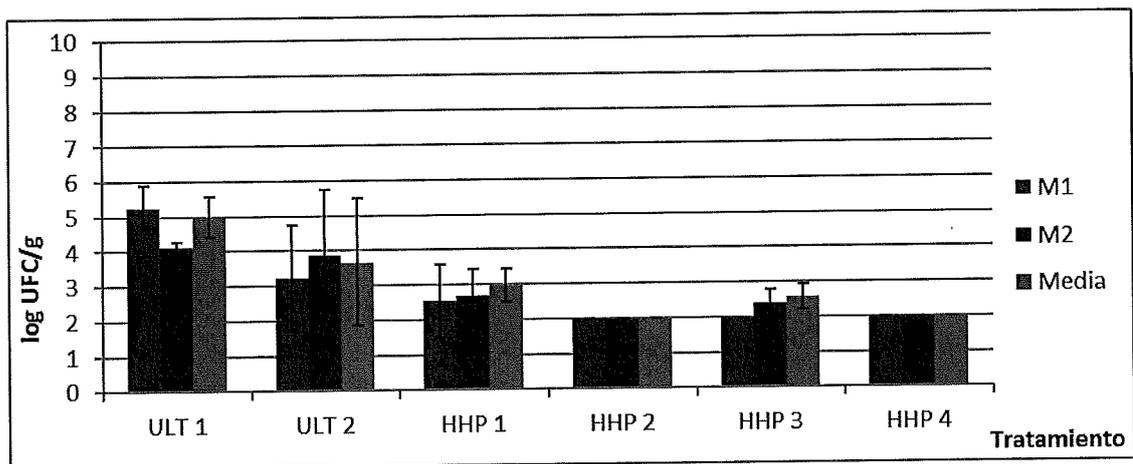
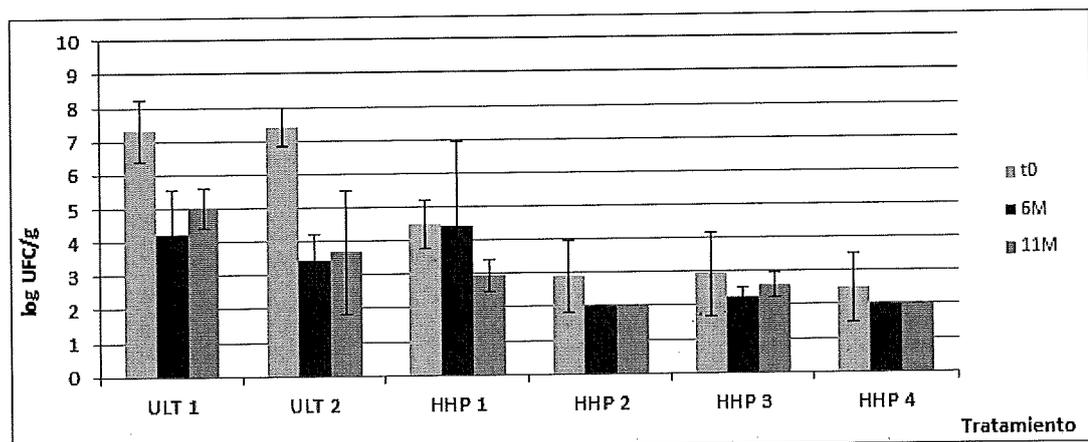


Figura 4. Nivel de contaminación por *Pseudomonas* spp. Presuntivas tras 11 meses de congelación de trufa fresca descontaminada en función del tratamiento aplicado para trufas de madurez 1 (M1, n=3) y madurez 2 (M2, n=3) y en conjunto (media, n=6).

A continuación, se presenta la evolución en el tiempo de la carga microbiana por PP de trufa congelada previamente descontaminada para cada una de las fincas y grados de madurez considerados (Figura 5).





MEJORA Y VALORIZACIÓN DE LA TRUFA DE ALAVA

Figura 5. Nivel de contaminación por *Pseudomonas* spp. Presuntivas en función del tratamiento aplicado y posterior congelación para trufas de madurez 1 (M1, n=3) y madurez 2 (M2, n=3) y en conjunto (media, n=6).

Impacto sensorial de la aplicación de tecnologías de descontaminación.

El impacto sensorial, a nivel de color e intensidad aromática solo fue estudiado en la trufa fresca a tiempo 0. Los catadores no observaron diferencias significativas entre tratamientos.

Se realizó un tratamiento estadístico para cada uno de los parámetros de color analizados (L^* , a^* , b^*) con el fin de detectar diferencias significativas entre el color de las muestras control y el color de las muestras tratadas con cada uno de los tratamientos de descontaminación descritos. (Figura 6).

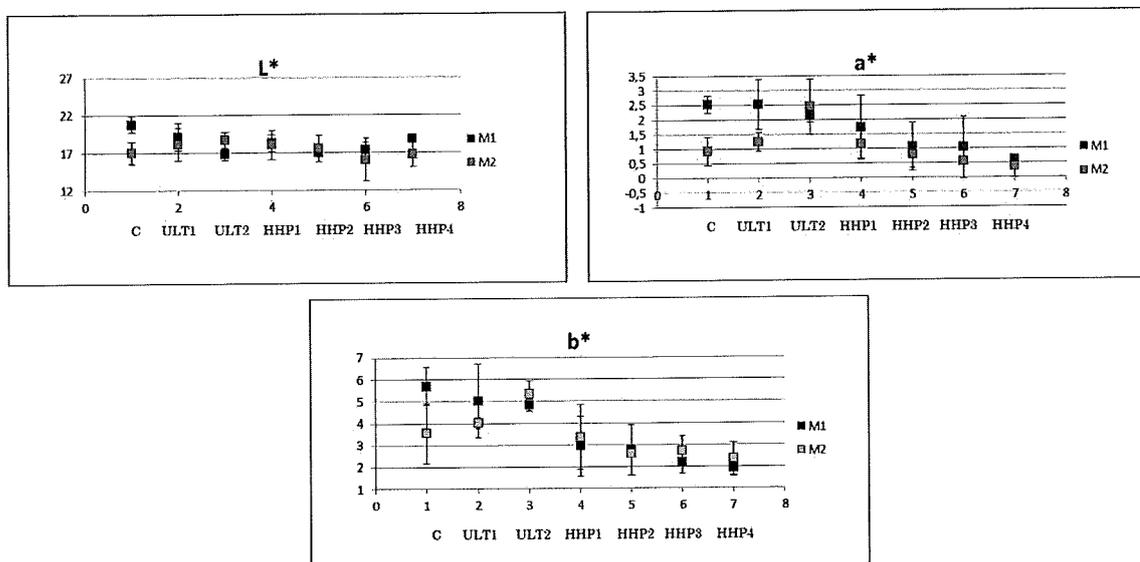
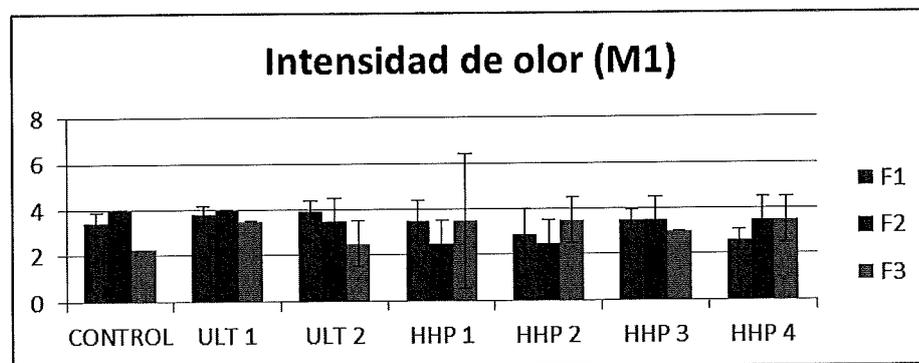


Figura 6. Variación de los parámetros de color L^* , a^* , b^* en función de los tratamientos de color, para cada grado de madurez de trufa fresca. M1: madurez 1; M2: madurez 2.

Las valoraciones obtenidas en cuanto a intensidad de olor característico para las trufas en función de tratamiento y grado de madurez considerado son presentadas gráficamente (Figura 7).



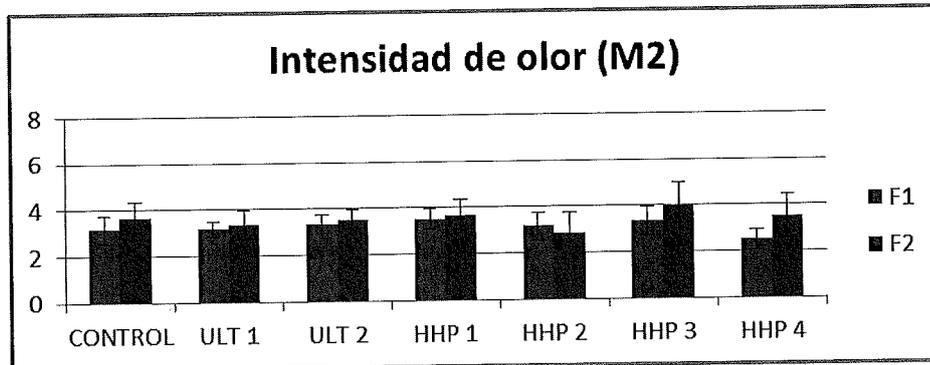


Figura 7. Intensidad de aroma observada por catadores expertos para la trufa fresca en función del tratamiento aplicado y grado de madurez. M1: Participación de 5 catadores F1, y de 2 catadores F2 y F3. M2: Participación de 6 catadores.

Resultados obtenidos de descontaminación del PP en trufa congelada

Con el fin de obtener más datos de los niveles de descontaminación obtenidos según el tratamiento aplicado, se trabajó también partiendo de trufa congelada (un año de congelación). En este caso, la trufa, una vez descongelada, se sometió a los tratamientos y protocolos anteriormente descritos. Para ello se realizó un duplicado de los análisis. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 8 (media de los resultados). Al igual que se ha descrito anteriormente, en el caso de no obtener un resultado exacto, para realizar la media se consideraron los niveles máximos obtenidos.

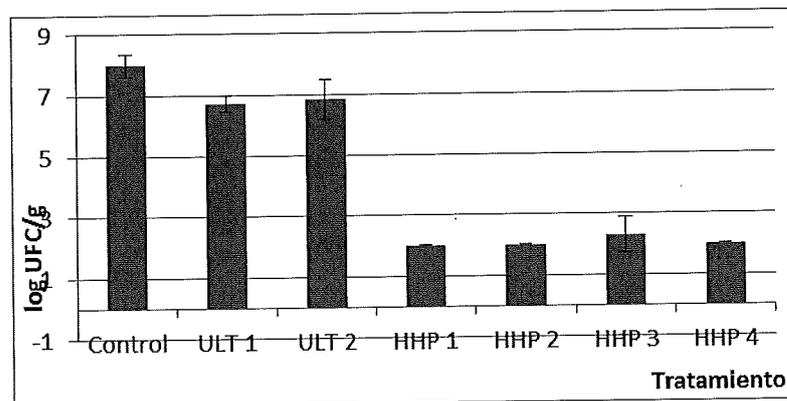


Figura 8. Nivel de contaminación por *Pseudomonas* spp. Presuntivas en trufa congelada en función del tratamiento aplicado. Resultados expresados como media (n=2) con intervalo de confianza.

A partir de los resultados obtenidos en 2017 en descontaminación de trufa fresca mediante las tecnologías de altas presiones hidrostáticas y ultrasonidos, se planteó para la anualidad 2018 una nueva serie de experimentos para verificar los resultados de la anualidad anterior y así poder obtener una trufa descontaminada apta para su utilización en el desarrollo de nuevos productos a partir de trufa. Para ello, la tecnología de descontaminación debía disminuir el nivel de contaminación microbiológica, manteniendo la identidad sensorial de la trufa fresca y/o congelada.

Se seleccionaron los siguientes tratamientos de descontaminación:



MEJORA Y VALORIZACIÓN DE LA TRUFA DE ALAVA

1. Un tratamiento de alta presión correspondiente al de mayor presión aplicada, para conseguir el mayor grado de descontaminación (6 logaritmos decimales).
2. Diferentes tratamientos de ultrasonidos. La primera consistió en la no utilización de etanol en el medio, para ver si con la aplicación de ultrasonidos más congelación en el tiempo sería suficiente para ver cierta reducción microbiológica. Las otras opciones incluyeron el uso de Etanol en diversos porcentajes: 50% y 70%. El tratamiento con 50% etanol seguido de congelación ya había demostrado cierta reducción microbiológica en el tiempo, así como el tratamiento con 70% etanol (bibliografía). Sin embargo, este tratamiento se había desechado en 2017 por el olor a alcohol que dejaba en el producto tras su aplicación.

La utilización de diferentes porcentajes podría afectar tanto al nivel de descontaminación como a nivel sensorial en el producto resultante. Atendiendo a la sensorialidad, también se decidió hacer una variante en la forma de lavado de las trufas para uno de los procesos, con el fin de evaluar la reducción de olor a alcohol en el proceso final.

Así, los tratamientos finalmente utilizados aparecen descritos en la Tabla 2.

Tabla 2. Protocolos de descontaminación utilizados

Tratamiento	Nombre	Condiciones de proceso
Altas Presiones Hidrostáticas	HHP 1	5000bar, 6°C, 5min
Ultrasonidos	ULT0	40Hz, 10min, 100%H ₂ O, relación p/v ~ 0.24. L Lavado bajo grifo+3min en 1L H ₂ O
Ultrasonidos	ULT1	40Hz, 10min, 50%EtOH-50%H ₂ O, relación p/v ~ 0.24. Lavado bajo grifo+3min en 1L H ₂ O
Ultrasonidos	ULT2	40Hz, 10min, 70%EtOH-30%H ₂ O, relación p/v ~ 0.24. Lavado en Ultrasonidos 3min en 1L H ₂ O
Ultrasonidos	ULT 70N	40Hz, 10min, 70%EtOH-40%H ₂ O, relación p/v ~ 0.24. Lavado bajo grifo+3min en 1L H ₂ O

A diferencia de anualidad 2017 en 2018, se plantearon unos tiempos de estudio inferiores, realizando un mayor muestreo entre tiempo 0 y 6 meses, con el objetivo de comprobar si antes de los 6 meses también se observa una reducción microbiológica de las trufas tratadas por ultrasonidos y almacenadas en congelación.

Previo a la aplicación de los tratamientos las trufas se limpiaron, realizando el mismo procedimiento que en 2017. El mismo día de su recepción, se limpiaron frotando con cepillo bajo agua de grifo y se dejaron secar hasta su totalidad a T ambiente (máximo 1h30min, T^a ambiente: 15°C).



MEJORA Y VALORIZACIÓN DE LA TRUFA DE ALAVA

A continuación, las trufas se dividieron en varios grupos para ser sometidas a diferentes tratamientos de descontaminación utilizando las dos tecnologías ya mencionadas: ultrasonidos (ULT) y altas Presiones hidrostáticas (HHP).

Protocolo Ultrasonidos

El equipo de ultrasonidos TT-7050 (TierraTech) utilizado fue el cedido por la Asociación de Trufa de Álava. Tras el lavado correspondiente según el método establecido las trufas se dejaron secar a T ambiente (aprox. 15°C) hasta sequedad total (aprox. 1h).

Transcurrido este tiempo, las trufas se introdujeron en bolsas de plástico y tras sellarse a vacío, se almacenaron en condiciones de congelación (-20°C) hasta posterior análisis microbiológico.

Protocolo para Altas Presiones Hidrostáticas

El equipo de altas presiones hidrostáticas utilizado fue el modelo Hiperbaric 55L disponible en instalaciones de planta piloto de AZTI.

Las trufas se introdujeron en bolsas de plástico que se sellaron a vacío previo al tratamiento descrito, tras el cual se almacenaron en condiciones de congelación (-20°C) hasta posterior análisis microbiológico.

Los puntos de muestreo para el análisis microbiológico se realizaron a tiempo 0, 48 horas, 1 mes, 3 meses, 6 meses y 9 meses. En todos los puntos se analizaron 3 muestras de cada uno de los tratamientos. En la Figura 1 Figura 9 se muestran los resultados obtenidos del análisis de muestras control y muestras tratadas por diferentes métodos de descontaminación, y se representa el valor medio de las tres analíticas con su intervalo de confianza.

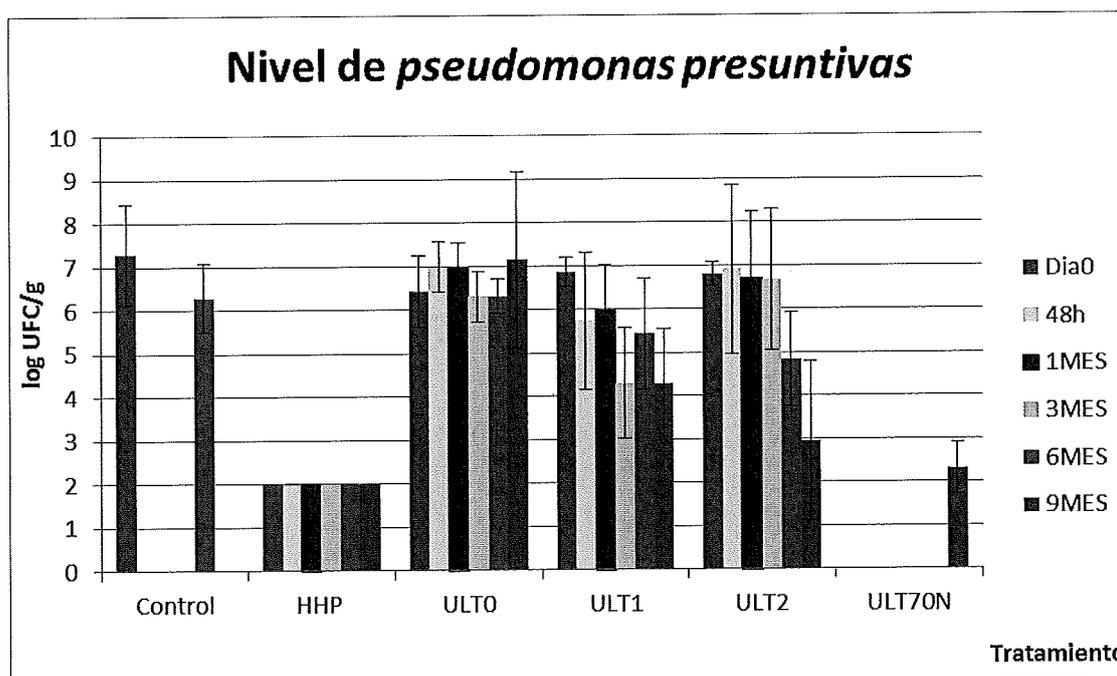


Figura 9. Nivel de contaminación por *Pseudomonas presuntivas* en trufas en función del tratamiento aplicado y tras congelación a lo largo del tiempo. Resultados expresados como media con intervalo de confianza (n=3).



MEJORA Y VALORIZACIÓN DE LA TRUFA DE ALAVA

En general, se obtienen resultados con intervalos de confianza amplios debido al escaso número de muestras analizadas. Como ya se vio en 2017 el grado de contaminación inicial en trufa fresca puede variar de 2 a 3 logaritmos decimales, lo que hace que el análisis de pocas muestras de unos valores de media con intervalos de confianza tan amplios.

A pesar de esto se puede observar que el proceso de congelación por sí sólo no produce una disminución de la carga microbiológica de forma significativa, al menos tras 6 meses de congelación (muestra control), así se demuestra que los resultados obtenidos en 2017 son debidos al efecto de la aplicación de un tratamiento de ultrasonidos previo a la congelación.

De la misma forma, el tratamiento de ultrasonidos sin la presencia de etanol (ULT0) tampoco es efectivo en la reducción microbiológica de pseudomonas presuntivas.

Al igual que en 2017, el tratamiento de altas presiones hidrostáticas es el que mayor descontaminación produce, manteniéndose a lo largo del tiempo (superior a 5 log decimales).

De los métodos de ultrasonidos empleados, parece que aunque a tiempo cero no hay una descontaminación evidente, su combinación con el almacenamiento en congelación a -20°C , a lo largo del tiempo sí produce una reducción microbiológica de pseudomonas presuntivas si el proceso se ha llevado a cabo con etanol en el medio, obteniéndose reducciones en torno a 3 log decimales tras 9 meses de congelación cuando el tratamiento se llevó a cabo en un 50% de Etanol y en torno a 4 logaritmos decimales cuando el tratamiento se llevó a cabo en un 70% de Etanol.

Comparados los tratamientos ULT2 y ULT70N, en el que ambos de utilizó un 70% de Etanol y que varían en la forma en la que se lavaron las trufas, no hay diferencias significativas en cuanto a reducción de carga microbiana.

Por último, se realizó una cata sensorial realizada (n=4 catadores) tras 9 meses de congelación en la que se valoró si los productos obtenidos presentaban olores extraños y si preservaban identidad a trufa. Se observó que tanto la muestra control como la muestra resultante del tratamiento ULT0 (ultrasonidos sin etanol) presentaban olores desagradables y lejanos a la identidad de la trufa. Sin embargo, el resto de las muestras, para las que si se había observado cierta reducción microbiológica preservaban en mayor o menor medida aroma identificativo de trufa, aunque diferente al de la trufa fresca recién recogida.

TAREA 2: Desarrollo de prototipos de Trufa

En la anualidad 2017, se realizaron reuniones entre AZTI y la Trufa de Alava para enfocar los desarrollos de prototipos de trufa en base a la vigilancia de mercado realizada, así como a las necesidades de la cooperativa. Se solicitó una prórroga del proyecto para poder ejecutar esta tarea a lo largo de 2018, utilizando trufa fresca recogida de la nueva temporada (diciembre 2017 – enero 2018). La prórroga fue aceptada, y por tanto el 2018 comenzó con el envío de la trufa por parte de la Trufa de Alava y posteriormente fue limpiada y almacenada en congelación en las instalaciones de AZTI, hasta su uso en el desarrollo de prototipos.

Todos los desarrollos fueron orientados a la revalorización de trufas de menor categoría comercial, con el fin de dar un valor añadido al producto de la CAPV.



MEJORA Y VALORIZACIÓN DE LA TRUFA DE ALAVA

Así se definieron las siguientes líneas de trabajo:

1. Desarrollo de nuevos productos a partir de trufa deshidratada (lío­filizada), para lo que se utilizó la trufa de segunda categoría (Figura 10). En la Trufa de Álava se incorporó a finales de 2017 un liofilizador, que permitirá el desarrollo de trufa deshidratada en láminas (escamas) o granos (polvo). Por parte de la Trufa de Alava nos proponen desarrollar ideas de producto a partir de trufa liofilizada que les permita amortizar el equipo y ampliar la gama de productos que tienen actualmente en el mercado (trufa fresca y aceite de trufa).



Figura 10. Aspecto de trufas de segunda categoría.

2. Desarrollo de nuevos productos a partir de trufa congelada, para lo que se utilizó trufa de categoría tercera (Figura 11). Se decidió junto con la Trufa de Álava desarrollar productos con trufa que a futuro pudieran ser fabricados por un tercero, siendo en este caso la Trufa de Álava un proveedor de trufa congelada.



Figura 11. Aspecto de trufas de tercera categoría.

Tanto en una línea como en otra fue importante disponer de una trufa de calidad, con una baja carga microbiológica especialmente de microorganismos responsables de una alteración sensorial del producto. Por ello los resultados obtenidos en la tarea de descontaminación fueron de especial interés para aplicar en las trufas destinadas al desarrollo de nuevos productos.

DESARROLLOS DE NUEVOS PRODUCTOS A PARTIR DE TRUFA LIOFILIZADA



MEJORA Y VALORIZACIÓN DE LA TRUFA DE ALAVA

En primer lugar, se realizó una liofilización de las trufas de segunda categoría, siguiendo los protocolos recomendados por la Trufa de Alava (Tabla 3) y realizando diferentes ajustes en cuanto al grosor de la lámina.

Tabla 3. Procedimiento de liofilización de trufa en láminas.

LAMINAS DE TRUFA LIOFILIZADA									
1.-	Descongelar parcialmente las trufas para facilitar el laminado.								
2.-	Realizar láminas del grosor deseado con mandolina.								
3.-	Colocar las láminas sobre papel absorbente para evitar que la superficie en contacto con la bandeja de liofilización blanquee durante el tratamiento.								
4.-	Una vez el papel haya absorbido la humedad superficial, colocar las láminas sobre la bandeja metálica de liofilización.								
5.-	Llevar las bandejas (cubiertas con film para proteger el producto) a la cámara de congelación y dejar hasta que se pueda realizar el proceso de liofilización.								
6.-	Introducir las bandejas en el liofilizador y poner en marcha la receta programada: <table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>FASE 1</td> <td>-5°C – 30 minutos</td> </tr> <tr> <td>FASE 2</td> <td>-1°C – 10 horas</td> </tr> <tr> <td>FASE 3</td> <td>0°C – 10 horas</td> </tr> <tr> <td>FASE 4</td> <td>10°C – 2 horas</td> </tr> </table>	FASE 1	-5°C – 30 minutos	FASE 2	-1°C – 10 horas	FASE 3	0°C – 10 horas	FASE 4	10°C – 2 horas
FASE 1	-5°C – 30 minutos								
FASE 2	-1°C – 10 horas								
FASE 3	0°C – 10 horas								
FASE 4	10°C – 2 horas								
7.-	Preparar bolsas de plástico para envasar lo más rápidamente posible el producto y evitar su rehidratación con la humedad ambiental durante el envasado final en tarros.								
8.-	Una vez finalizado el tratamiento, sacar las bandejas del equipo e introducir el producto en las bolsas de plástico, eliminar el aire manualmente (si se hace vacío se podrían romper las láminas) y sellar.								
9.-	Abrir las bolsas e introducir las láminas en los tarros de vidrio. En caso de que se quiera inyectar nitrógeno en el envase, introducir un tubo fino conectado a la fuente de nitrógeno e inyectar el gas hasta que se desplace el aire del interior del envase. El tiempo de inyección dependerá de las dimensiones del tarro y la cantidad de producto.								

Para el laminado de las trufas se utilizó una mandolina, y los grosores de lámina fueron de 2 y 3mm (Figura 12).

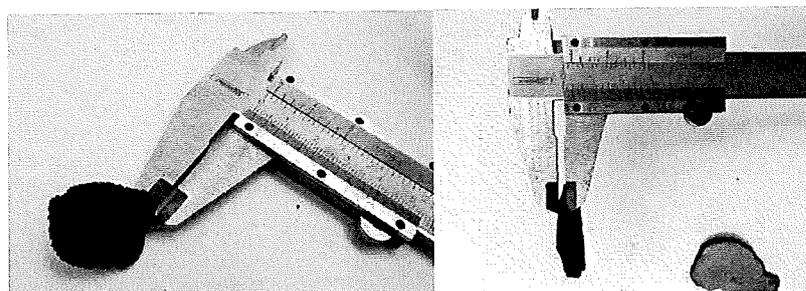


Figura 12. Grosor de lámina de trufa fresca 2mm (izda) y 3mm (dcha)

Aunque todas las trufas presentaron un aspecto muy semejante exteriormente, se observaron colores muy variados en su interior, siempre dentro de la gama del marrón al negro (Figura 13) y



MEJORA Y VALORIZACIÓN DE LA TRUFA DE ALAVA

por tanto en la trufa liofilizada, donde unas láminas fueron más blancas y otras más negras (Figura 14).

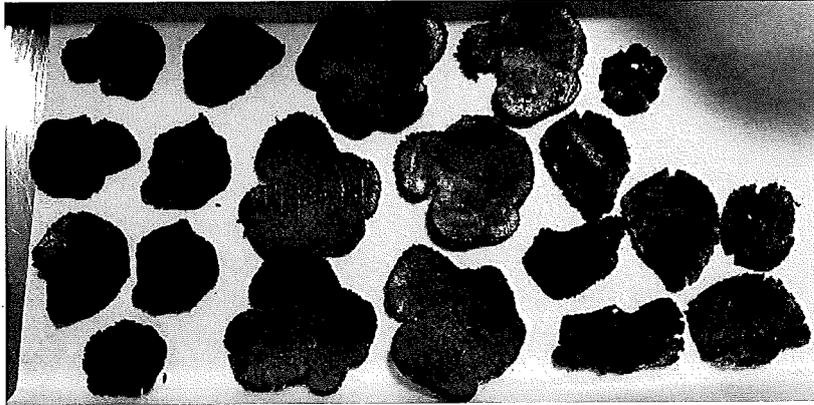


Figura 13. Aspecto de la trufa fresca laminada, previo al proceso de liofilización.

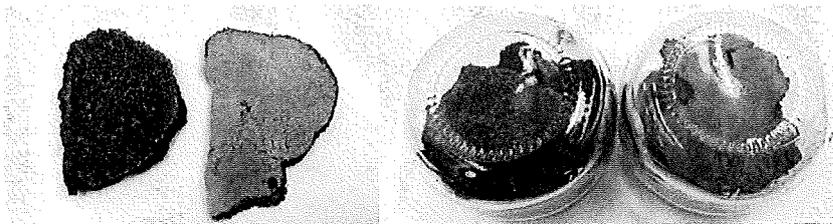


Figura 14. Aspecto de la trufa liofilizada laminada, tras el proceso de liofilización (izda) y envasado (dcha). Tras la liofilización todas las muestras fueron envasadas en tarros de cristal con atmósfera de nitrógeno y almacenadas a temperatura ambiente.

Se realizó una propuesta de recetarios para la aplicación de las trufas, con el objetivo de poder ser repartidos por la Trufa de Álava en las diferentes actividades de difusión, principalmente en ferias.

A nivel de cocina se elaboraron diferentes platos, tapas, o pinchos con trufa liofilizada. En la mayoría de los casos se utilizaron las láminas rehidratadas directamente, y en otros casos, se hizo un triturado tipo polvo para su incorporación.

Las recetas, fueron incluidas junto con las imágenes de los platos en un informe a partir del cual, la Trufá realizó el diseño de los recetarios, para su posterior impresión.

La trufa fue utilizada para las siguientes elaboraciones:

- Tosta de jamón, tumaca y trufa (polvo)
- Sandwich de salmonete con jamón, calabacín y trufa (láminas)
- Hamburguesa de carne de vaca con huevo de codorniz, canónigos y trufa (picada)
- Puré de patata con trufa (picada) para acompañamiento de una carne o de un caldo con huevo
- Tartaleta de crema de queso, coliflor y trufa (picada)
- Risotto de setas con trufa (laminada)

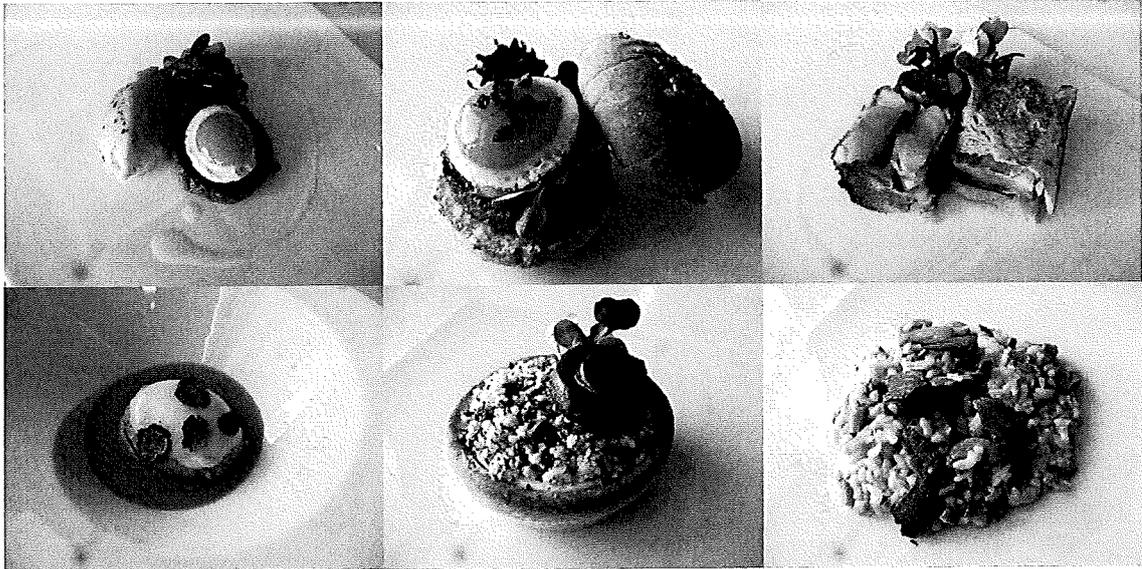


Figura 15. Platos elaborados con trufa liofilizada laminada y granulada

Además de la aplicación de trufa sobre diferentes productos para la elaboración de los recetarios, se realizó un nuevo prototipo orientado a poder ser desarrollado directamente por la Trufa de Álava. Actualmente la Trufa está comercializando trufa fresca y aceite trufado y se pensó en un sazonador de Trufa con sal para diferentes platos.

A nivel de formulación se realizó una mezcla sencilla entre trufa y sal, en la que se valoraron diferentes proporciones de cada ingrediente, siendo la elegida el 80% sal y 20% trufa liofilizada.

En la Figura 16 se muestra el aspecto del polvo de trufa y sal con el porcentaje de 80-20 indicado anteriormente. Está bastante potenciado el color de la trufa y sensorialmente tiene un toque bastante salado, pero se percibe bien el sabor de la trufa.

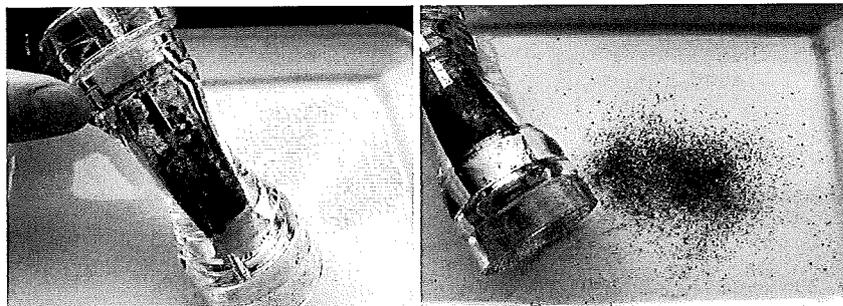


Figura 16. Sazonador de sal con trufa

Se ha estudiado la evolución de la humedad del producto dentro del envase a lo largo de 10 días y ha pasado de una humedad a tiempo 0 de 2,6% a una humedad a día 10 de 1,8%. Teniendo una buena evolución sensorial a lo largo de este tiempo.

DESARROLLOS DE NUEVOS PRODUCTOS A PARTIR DE TRUFA CONGELADA



MEJORA Y VALORIZACIÓN DE LA TRUFA DE ALAVA

A partir de las pautas marcadas por la Trufa de Alava y de la vigilancia realizada durante la anualidad 2017, se realizó inicialmente un brainstorming para la generación de ideas de productos, teniendo en cuenta las diferentes empresas de la zona de alrededor de Alava, a las que les pudiera interesar el desarrollo de nuevos productos con Trufa, con la oportunidad de trabajar con un producto local y de cercanía.

Se seleccionaron algunos productos comerciales para realizar una cata interna en AZTI. Los elegidos fueron una crema de leche, perlas de trufa y jugo de trufa (Figura 17. Productos comerciales seleccionados para la cata, crema de leche, **perlas de trufa y jugo de trufa (izda a dcha)**). Las dos primeras tienen un olor muy potente a aroma de trufa, no se reconoce el aroma de trufa fresca. No son productos agradables ni fáciles de consumir. El jugo de leche tiene un aroma y sabor más natural, donde se reconocen los aromas característicos de la trufa fresca, siendo el mejor de los tres productos catados.

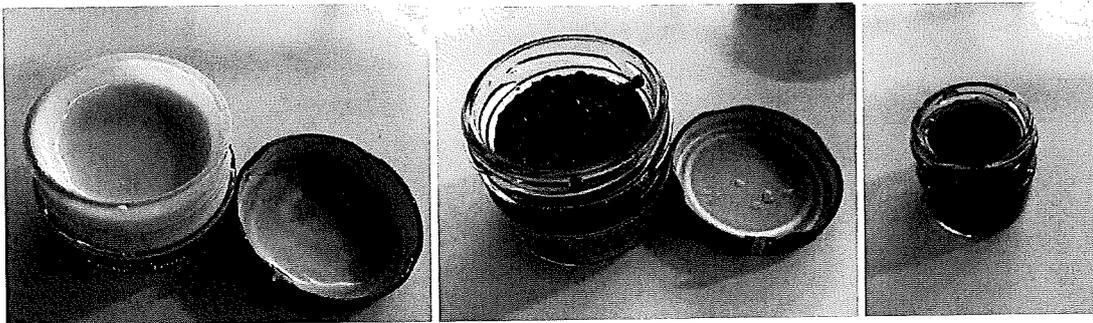


Figura 17. Productos comerciales seleccionados para la cata, crema de leche, perlas de trufa y jugo de trufa (izda a dcha).

Se trabajó a nivel de TRL 1-2 en los siguientes conceptos de producto a escala de cocina: Croquetas, Mayonesa, Mazapan, Toffe, Crema de chocolate y preparado de patata troceada en cubos y pasteurizado para elaboración de tortilla de patata. En todos ellos se realizaron pruebas de formulación para la incorporación de trufa en diferentes porcentajes, valorando el impacto final en el precio del producto, teniendo en cuenta un posible escalado industrial. Todos los prototipos fueron presentados a la Trufa de Alava, y las conclusiones se tomaron conjuntamente. A partir de la presentación el objetivo fue seleccionar el producto de mayor interés para ser presentado a posibles empresas interesadas en su desarrollo a nivel industrial.

A continuación se presenta un pequeño resumen de los resultados obtenidos.

CROQUETA

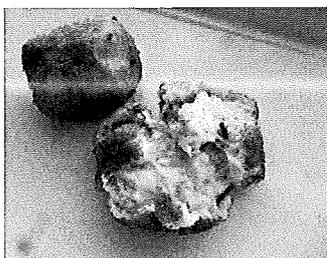
Ingredientes: Leche entera, cebolla, harina de trigo, mantequilla, aceite de oliva, trufa congelada, sal y ajo.

Porcentaje óptimo de trufa: 2,8%

Nivel de TRL: 1



MEJORA Y VALORIZACIÓN DE LA TRUFA DE ALAVA



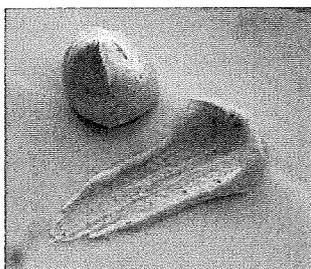
Conclusion: La cebolla aportó jugosidad y sabor al producto pero enmascaraba el sabor de la trufa, por lo que habría que valorar en un desarrollo industrial si es necesario añadirla en menor porcentaje o debe ser sustituida por otro ingrediente. El producto tuvo una valoración positiva en la cata realizada.

MAYONESA

Ingredientes: Aceite de girasol, huevo entero, trufa congelada, sal, vinagre de manzana y ajo.

Porcentaje óptimo de trufa: 3,8 %

Nivel de TRL: 1



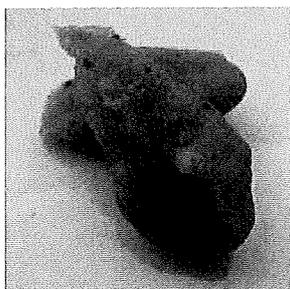
Conclusión: No se observó una diferenciación del producto por el sabor de trufa, que aparecía tapado por el aceite de girasol. Es un producto en el que debería añadirse aroma o aceite trufado para aumentar la intensidad de trufa. El producto no fue valorado positivamente.

MAZAPAN

Ingredientes: Almendra, azúcar, agua, glucosa, trufa congelada y sal.

Porcentaje óptimo de trufa: 2,8%

Nivel de TRL: 1



Conclusión: Fue el producto peor valorado en la cata, por la mezcla de sabor trufa junto con almendra. Se comentó el poder combinar el sabor de la trufa con otros frutos secos distintos a la almendra, como por ejemplo las avellanas. No fue elegido para el proceso de industrialización.

TOFFE

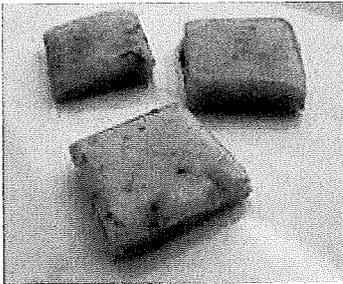


MEJORA Y VALORIZACIÓN DE LA TRUFA DE ALAVA

Ingredientes: Nata, azúcar, jarabe de glucosa, trufa congelada y sal.

Porcentaje óptimo de trufa: 2%

Nivel de TRL: 1



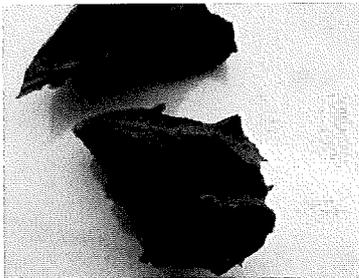
Conclusión: Se consideró un producto muy dulce, por lo que el sabor de trufa se vio enmascarado por el azúcar. Es un producto interesante pero más difícil de transferir a la empresa, por lo que no se seleccionó como producto de interés para una posterior industrialización.

CREMA DE CHOCOLATE CON TRUFA

Ingredientes: Chocolate con leche 35%, nata, leche

Porcentaje óptimo de trufa: 4,3 %

Nivel de TRL: 1



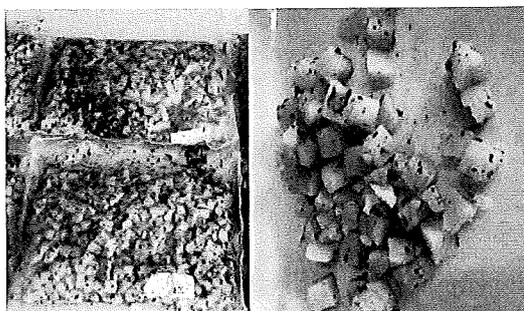
Conclusión: La combinación de ingredientes fue positiva, la textura del producto, el color y el aroma de trufa se valoraron como buenos. El producto fue valorado positivamente.

PREPARADO DE PATATA (para elaboración de tortillas de patata)

Ingredientes preparado de tortilla: Patata, trufa congelada, líquido de gobierno.

Porcentaje óptimo de trufa: 4%

Nivel de TRL: 2-3





MEJORA Y VALORIZACIÓN DE LA TRUFA DE ALAVA

Conclusión: El preparado de patata fue valorado muy positivamente y seleccionado como producto de interés para ser transferido a empresa. La patata y la trufa son productos locales de la zona de Alava por lo que desde un punto de vista comercial resulta interesante su combinación, para sacar nuevos productos al mercado.

Tras la cata sensorial de los productos y una vez seleccionado el prototipo de preparado de patata, se procedió a la optimización del proceso de elaboración y pasteurización para conseguir un producto con vida útil en refrigeración entre 30-60 días, en el que se mantuviesen los aromas característicos de la trufa.

El procedimiento utilizado para la elaboración del preparado a la escala piloto fue el siguiente

1. Lavado, pelado y cortado de la patata
2. Escaldado de la patata
3. Enfriado
4. Envasado en bolsa junto con el líquido de gobierno
5. Pasteurización en autoclave (superior a los 80°C)
6. Enfriamiento
7. Almacenamiento a 4°C.

Tras los ajustes en los tiempos y temperaturas de escaldado y pasteurización, los preparados de patata fueron valorados sensorialmente. Se observó que el prototipo seleccionado previamente con un 4% de trufa, tenía intensidad de trufa suficiente, tras el tratamiento de pasteurización.

Se realizó una aplicación del preparado de patata, en tortilla (Figura 18). Para ello se adicionaron otros ingredientes como huevo pasteurizado, sal y en algunos casos cebolla y aceite.

La adición de aceite mejoró la percepción sensorial, incrementando la intensidad de aroma de trufa.



Figura 18. Tortilla de patata con trufa, elaborada a partir de preparado de patata y trufa (4%) pasteurizado.

Aunque se eligió la tortilla de patata como posible aplicación para el preparado de tortilla, se vio que el corte de la patata no era el adecuado para esta aplicación, debido al tamaño de los trozos de patata, quizá demasiado grandes. El huevo no quedó ligado correctamente con la patata, por lo que se formó una capa superficial, tipo tortilla francesa, rellena internamente por patatas y huevo líquido. Podría trabajarse otro formato de corte tipo lamina o cubo más pequeño, para



MEJORA Y VALORIZACIÓN DE LA TRUFA DE ALAVA

mejorar esta aplicación. Por otro lado, el preparado de tortilla nos da una textura de patata cocida en vez de frita, por lo que igualmente la textura de la patata en la tortilla no es la esperada. En cambio, esta aplicación fue válida para valorar la sensorialidad de la trufa. No se perdieron los aromas de trufa tras la elaboración de la tortilla.

No se realizaron estudios microbiológicos de evolución del producto en almacenamiento de refrigeración.

Fase IV: Comunicación y divulgación

Tarea 1: Comunicación y divulgación

Durante el desarrollo del proyecto y en base a los prototipos de producto desarrollados, AZTI ha fomentado la creación de alianzas entre diferentes industrias transformadoras y la Trufa de Álava.

Desde la Trufa de Alava se realizó en este sentido, un estudio de viabilidad, analizando volúmenes de producción, precios, márgenes, capacidad productiva, etc., para llevar a las diferentes empresas interesadas en utilizar trufa congelada y/o liofilizada como nuevo ingrediente en sus producciones.

En este sentido se produjo un interés de una empresa láctea, interesada en el desarrollo de una nueva gama de productos con Trufa de Alava. Durante el periodo de ejecución del proyecto, se realizaron valoraciones a nivel de la trufa en el proceso industrial de la empresa, en relación a su formato (liofilizado o congelado), corte (láminas, granos, polvo), porcentaje de trufa en fórmula, adición de la trufa en las etapas de procesado, etc, pero no se realizaron pruebas industriales. Los trabajos continúan abiertos, tras la finalización del proyecto, por lo que se podría establecer una nueva línea de comercialización futura.

Por otro lado, AZTI realizó una comunicación del proyecto, en la página web (Figura 19).

MEJORA Y VALORIZACIÓN DE LA TRUFA DE ALAVA



Figura 19. Noticia proyecto Gehilur en página web de AZTI (<https://www.azti.tus/es/ficha/trufaberrri/#.XD87VVVKjcs>)

La Trufa de Álava ha elaborado unos recetarios (Figura 20) a partir de las recetas que se realizaron en el proyecto, con trufa liofilizada y que utilizó como publicidad de la Trufa en las diferentes ferias y eventos que se organizaron.



Figura 20. Recetario elaborado por la Trufa de Alava

A continuación, se describen algunas de las jornadas a las que se acudió por parte de la Trufa de Álava:

- III Feria Internacional de la trufa negra (Rivabellosa, enero 2018).
- FERIA DE GUSTOKO EN EL BEC (Barakaldo, marzo 2018).
- Charla informativa organizada por la Trufa de Alava e impartida por **Don Gregori Gian Luigi**, "Responsable del Centro Experimental de la Trufa Vadese (Italia) sobre la Trufa Negra *Melanosporum*, del "Manejo de plantaciones truferas".
- Mercado de Navidad de Álava (diciembre 2018).



4 RESULTADOS OBTENIDOS

- Se realizó una vigilancia de mercado que ha permitido conocer los nuevos lanzamientos de los últimos años de productos trufados, así como nuevos formatos para la venta de la trufa fresca.
- Se ha editado un mapa de aptitud para la producción de trufa negra (*Tuber melanosporum*) de la Comunidad Autónoma del País Vasco, geoposicionando los caracteres más adecuados para la producción trufera de alta calidad.
- Se ha puesto apunto la detección e identificación mediante técnicas moleculares (PCR) de *T. melanosporum* y especies estrechamente relacionadas y morfológicamente similares a esta trufa negra: *T. indicum* grupo A, *T. indicum* grupo B, *T. brumale* en muestras de trufa y de raíz de árboles de encina y roble inoculados. Esta técnica permite el análisis de la adecuación de planta inoculada en vivero a la producción de calidad. Así mismo, permite la detección en campo de especies de *Tuber* de menor calidad y consideradas como contaminantes en plantaciones de *T. melanosporum* de alta calidad.
- Se ha puesto a punto la técnica qPCR que permite cuantificar la cantidad de *T. melanosporum* y *T. brumale* en raíz de encina en producción. Sin embargo, sólo en un 3,3% de muestras de árboles productivos se ha conseguido detectar los hongos en cantidad suficiente para su cuantificación. Esto ha impedido avanzar en el análisis de parámetros críticos relacionados con el aumento de producción.
- Durante el proceso de caracterización de trufas se observa un alto grado de contaminación por *Pseudomonas presuntivas*, que no fue eliminado o reducido tras los procesos de limpieza habitualmente utilizados por la Trufa de Álava.
- Se observó que las altas presiones hidrostáticas son una alternativa para la descontaminación de trufa fresca en referencia a *Pseudomonas presuntivas*, con una reducción del orden de 4-6 logaritmos. El proceso de descontaminación por altas presiones mejora la calidad microbiológica del producto, permitiendo así el desarrollo de nuevos productos a base de trufa.
- Los ultrasonidos no se presentan como una alternativa de descontaminación de trufa fresca a tiempo 0. En cambio, se han observado reducciones significativas de pseudomonas presuntivas a partir de los 6 meses de almacenamiento en congelación siempre que se haya realizado un proceso de tratamiento por ultrasonidos. Teniendo una reducción del orden de 4 logaritmos frente a la trufa no tratada.
- A partir de la trufa liofilizada, se ha realizado un recetario con ideas de aplicación para ser repartido por la Trufa de Álava en diferentes eventos y ferias
- A partir de la trufa de congelada, se han propuesto diferentes ideas de prototipos, y se ha seleccionado la que mayor interés tiene por parte de la Trufa de ser presentada a empresas del sector que puedan industrializarla.



MEJORA Y VALORIZACIÓN DE LA TRUFA DE ALAVA

- Se ha fomentado la creación de alianzas, entre diferentes industrias alimentarias y la Trufa de Álava.
- En condicionantes de la producción, NEIKER-Tecnalia ha tomado contacto con tres principales grupos de investigación de trufa en España y se ha establecido la colaboración para este trabajo y posteriores con la Universidad de Jena (Alemania) para análisis computacional multiparamétrico de factores determinantes de producción de trufa.
- Se ha realizado difusión del proyecto y los resultados en diferentes jornadas, ferias, así como en la página web de AZTI.

5 INCIDENCIAS

Debido a los cambios de personal producidos en la Trufa de Alava con la marcha de Asún Quintana, se han visto retrasadas algunas de las tareas previstas para la anualidad 2017, en las que era necesaria la participación del personal de la cooperativa.

Para que estos retrasos no tuvieran una repercusión en los resultados del proyecto se decidió solicitar prórroga de ampliación del proyecto de 12 meses. La resolución positiva de ampliación del proyecto hasta diciembre de 2018, permitió ejecutar las tareas planificadas en la memoria del proyecto.

Aún así, ha habido tareas especialmente afectadas que corresponden a la toma de muestras de campo y análisis estadístico posterior para la consecución de las tareas de la FASE II: Aumento de la producción de trufa. El grado de avance y las acciones correctivas tomadas para la consecución de los objetivos fijados, han sido descritos para cada una de ellas en esta memoria.