

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 912**

51 Int. Cl.:

A23L 19/20	(2006.01)	C12C 11/00	(2006.01)
A23L 13/40	(2006.01)	C12G 1/06	(2009.01)
A23C 19/032	(2006.01)	C12J 1/00	(2006.01)
A21D 8/04	(2006.01)	A21D 2/08	(2006.01)
A23B 7/10	(2006.01)	A23C 13/16	(2006.01)
C12G 1/02	(2006.01)		
C12P 7/54	(2006.01)		
C12P 7/06	(2006.01)		
C12P 7/56	(2006.01)		
C12C 5/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2016 PCT/NL2016/050771**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.05.2017 WO17078530**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2016 E 16805225 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 3371293**

54 Título: **Fermentación**

30 Prioridad:

06.11.2015 EP 15193462

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

12.03.2020

73 Titular/es:

**COÖPERATIE AVEBE U.A. (100.0%)
Prins Hendrikplein 20
9641 GK Veendam, NL**

72 Inventor/es:

**GIUSEPPIN, MARCO LUIGI FEDERICO;
MOOIJ, CATHARINA MARIA ANTOINETTE y
SPELBRINK, ROBIN ERIC JACOBUS**

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 747 912 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

Fermentación

5 La presente invención está en el campo de la fermentación. La fermentación es una técnica bien conocida para la producción de sustancias, que utiliza la actividad metabólica de los microorganismos. La fermentación se ha utilizado desde la antigüedad para aumentar la vida útil de los alimentos. Esto puede conseguirse seleccionando microorganismos que se alimentan de dichos productos y que liberan compuestos químicos que hacen que el medio sea menos atractivo para otros microorganismos. Para este propósito, una alimentación de fermentación comprende normalmente compuestos de carbono y nitrógeno, así como otros nutrientes suficientes para que los microorganismos vivan y procreen. Después de añadir el/los microorganismo(s) y de darles algo de tiempo, la alimentación de fermentación se ha enriquecido con los compuestos liberados por el microorganismo, momento en el que se ha convertido en un alimento, tal como yogurt, queso, vino, cerveza o embutido.

15 Los microorganismos que liberan alcohol se han utilizado para repeler otros microorganismos y retener la calidad de los alimentos, y/o para preparar bebidas alcohólicas. De este modo, el material vegetal, tal como los cereales, el arroz o las bayas (entre las que destaca la uva) se ha convertido mediante un proceso de fermentación en, por ejemplo, cerveza, whisky, sake o vino. Diversos tipos de levaduras, tales como, por ejemplo, levaduras del género *Saccharomyces* o *Candida*, se conocen bien para este propósito. La Patente WO 2009/061186 da a conocer un procedimiento para preparar un alimento fermentado a base de masa. La Patente EP2191731 enseña un proceso para preparar una cerveza con propiedades espumantes mejoradas.

25 Además, se han utilizado los procesos de fermentación con el fin de aislar el compuesto producido por el microorganismo, en lugar de obtener un alimento como tal. En ese caso, el producto objetivo no es la alimentación de fermentación transformada completa en forma de, por ejemplo, cerveza, queso o embutido, sino el compuesto que libera el microorganismo. Para este propósito, el compuesto debe aislarse de la mezcla después de la fermentación, que comprende además los compuestos de carbono y nitrógeno, microorganismos y muchos otros componentes. Este proceso se ha aplicado eficientemente en la producción de, por ejemplo, bioetanol, en la que se utiliza material vegetal para alimentar microorganismos productores de etanol, tras lo cual el etanol producido se aísla de la alimentación. Los microorganismos típicos para utilizar en este proceso son las levaduras del género tal como *Saccharomyces*, pero también las especies *Zymomonas* y *Schizosaccharomyces* se conocen bien para este propósito.

35 Los microorganismos que liberan ácido también se conocen bien para su utilización en un cultivo de alimentación que comprende leche, dando como resultado, por ejemplo, queso, que tiene una vida útil más larga que la leche. Del mismo modo, los microorganismos que liberan ácido permiten aumentar la vida útil de la carne o las verduras mediante la formación de por ejemplo embutidos, chucrut o encurtidos. Entre los ejemplos de microorganismos liberadores de ácido bien conocidos para su utilización en la producción de alimentos están los microorganismos del género: *Aspergillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Acetobacter*.

40 En un proceso de fermentación típico, pueden distinguirse tres fases. La primera fase comienza cuando los microorganismos se combinan con una alimentación de fermentación. Los microorganismos se adaptan a su nuevo entorno y comienzan a absorber nutrientes, tales como péptidos, aminoácidos, vitaminas y minerales. En esta fase, los microorganismos producen enzimas necesarias para la división y el crecimiento celular, para consumir energía y para fabricar materiales de almacenamiento, materiales constitutivos o nutrientes, para adaptarse a su nuevo entorno. En esta fase, sin embargo, apenas hay crecimiento, o cualquier otra indicación visual de que algo esté sucediendo en la fermentación. Por esta razón, esta fase se llama fase de latencia.

50 Aunque parece que no está sucediendo nada, la fase de latencia es muy importante para el proceso de fermentación porque los microorganismos en esta fase se adaptan a su entorno, lo que es importante para su salud. La salud de la población de microorganismos determina la calidad del producto resultante.

55 Cuando los microorganismos se han adaptado a su entorno, se inicia la segunda fase. Esta fase, caracterizada por un crecimiento sin limitación de sustrato, se llama fase exponencial. Durante la fase exponencial, los microorganismos comienzan a crecer por división celular y, de este modo, se multiplican exponencialmente. En esta fase, los microorganismos, como consecuencia de su carácter metabólico, producen normalmente productos en exceso, entre los cuales, por ejemplo, ácidos y/o alcohol.

60 Al final de la fase exponencial, frecuentemente, la cantidad de nutrientes adecuados ha disminuido de tal manera que la mezcla de fermentación ya no puede mantener el crecimiento exponencial. De este modo, el crecimiento se ralentiza y la fermentación entra en la fase estacionaria. En esta fase, el crecimiento ya no es exponencial, aunque todavía se produce la división celular, y la mezcla de fermentación alcanza lentamente un equilibrio entre todos los compuestos presentes. Si todas las circunstancias son apropiadas, esto da como resultado un alimento de alta calidad, con un sabor y olor bien equilibrados, o en una mezcla altamente enriquecida en el compuesto de interés.

65 El tiempo que necesitan estas etapas es muy variable y depende del tipo de microorganismos utilizado, el tipo de

alimentación de fermentación, la temperatura y muchos otros parámetros. Dadas estas diferentes fases, la producción de sustancias objetivo, entre las cuales los alimentos (excluyendo el yogur) y los compuestos químicos, tales como el etanol, es comúnmente un proceso discontinuo. Tal como es común en los procesos discontinuos, un factor importante en el coste es el tiempo requerido para que el producto esté listo.

Un factor importante en el tiempo de producción es la fase de latencia. Durante esta fase, se prepara el proceso de fermentación real. Además de crear las condiciones del medio adecuadas para el crecimiento de microorganismos, no hay ninguna contribución en absoluto a la fabricación del producto de interés y, como tal, una latencia más corta tendría un gran impacto en la economía de los procesos de fermentación. Sin embargo, la fase de latencia es muy importante para determinar la salud de la población de microorganismos, que a su vez es importante para la calidad del producto previsto. El tiempo necesario para que pase la fase de latencia y el proceso de fermentación alcance la fase exponencial se conoce como el tiempo de latencia.

Se han realizado anteriormente intentos para reducir el tiempo de latencia. Una opción es utilizar un proceso de fermentación semicontinua, en el que los microorganismos se adaptan a la etapa de producción y permanecen en la fase exponencial durante un tiempo prolongado. Sin embargo, esto no es adecuado para muchos procesos, porque la fase estacionaria es importante para determinar el sabor final y/o la calidad del producto, y esta fase se omite en un proceso semicontinuo.

Además, es posible añadir una mezcla de microorganismos, denominada cultivo iniciador, que ya se han adaptado a las condiciones del medio de fermentación. Esto, sin embargo, crea diferentes problemas, porque en una alimentación de microorganismos premezclados a pequeña escala, es difícil de copiar el ambiente del fermentador a gran escala. Es posible utilizar un volumen mayor de precultivo (inóculo), pero esto tiene un gran impacto en el proceso de producción y los costes de la etapa de precultivo. Por lo tanto, sería preferente reducir el tiempo de latencia, posiblemente incluso más de lo posible con esta técnica, de manera segura, con una cantidad limitada de cultivo iniciador.

Para reducir el tiempo de latencia, también es posible añadir nutrientes extra fácilmente transportables y energéticamente beneficiosos a la premezcla, tales como, por ejemplo, péptidos extra. Sin embargo, esto crea costes y problemas adicionales con, por ejemplo, mal gusto y coloración.

Características de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para disminuir el tiempo de latencia en una fermentación de un medio de cultivo para preparar una sustancia objetivo, en el que la sustancia objetivo no es yogurt y en el que la fermentación da como resultado la formación de ácido o etanol, procedimiento que comprende las etapas de proporcionar, a un medio de cultivo adecuado, un cultivo iniciador de fermentación que comprende un microorganismo que libera ácido o etanol, añadir un inhibidor de la proteasa proteico de patata al medio de cultivo, cultivar el microorganismo y obtener la sustancia objetivo. Se ha hallado que la adición del inhibidor de la proteasa proteico de patata a una alimentación de fermentación reduce significativamente el tiempo de latencia de la fermentación. La cantidad necesaria de proteína de patata es lo suficientemente baja como para no afectar el sabor de la sustancia objetivo, y la reducción del tiempo de latencia tiene lugar tanto en procesos discontinuos como semicontinuos.

Descripción de las figuras

Figura 1: Reducción del tiempo para alcanzar OD_{0,4} mediante la adición de LMW (Low Molecular Weight [proteins], [proteínas de] Bajo Peso Molecular) al 0,1 % de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en YPD20 e YPD100. Cada barra representa, como mínimo, 3 cultivos diferentes. Las barras de error son la desviación estándar.

Figura 2: Inhibición de la tripsina por la proteína PPII (Potato Protease Inhibitor Isolate, Aislado de Inhibidor de la Proteasa de Patata) Solanic.

Figuras 3a y b: Ejemplo de curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* con y sin inhibidor de la proteasa proteico de patata al 0,1 %, que muestra un tiempo de latencia disminuido tras la adición del inhibidor de la proteasa proteico de patata. El tiempo de latencia se determinó analizando los gráficos logarítmicos de los datos. Este análisis no se muestra en el gráfico. En medios de crecimiento ricos en péptidos, el efecto se reduce.

Descripción detallada

La presente invención se refiere a un procedimiento para disminuir el tiempo de latencia en una fermentación de un medio de cultivo para preparar una sustancia objetivo, en el que la sustancia objetivo no es yogurt y en el que la fermentación da como resultado la formación de ácido o etanol, procedimiento que comprende las etapas de proporcionar, a un medio de cultivo adecuado, un cultivo iniciador de fermentación que comprende un microorganismo que libera ácido o etanol, añadir un inhibidor de la proteasa proteico de patata al medio de cultivo, cultivar el microorganismo y obtener la sustancia objetivo. Se ha hallado que la adición de pequeñas cantidades de inhibidor de la proteasa proteico de patata, como un aislado de inhibidor de la proteasa de patata ("PPII"), a una alimentación de fermentación reduce significativamente el tiempo de latencia de la fermentación, lo que tiene

beneficios económicos en la producción de productos de fermentación. La cantidad necesaria de proteína de patata es lo suficientemente baja como para no afectar el sabor de la sustancia objetivo, y la reducción del tiempo de latencia tiene lugar tanto en procesos discontinuos como semicontinuos. La reducción del tiempo de latencia, en el contexto de la presente invención, también puede denominarse “actividad estimulante” (SA (Stimulating Activity, Actividad Estimulante)). La presente invención puede aplicarse en un amplio intervalo de pH y temperatura.

El presente procedimiento se refiere a un procedimiento para disminuir el tiempo de latencia en una fermentación de un medio de cultivo para preparar una sustancia objetivo, en el que la sustancia objetivo no es yogur. A continuación, el término “alimento” o “sustancia objetivo” siempre se entiende que excluye el yogur, ya se mencione explícitamente o no.

En este contexto, el yogur puede definirse como un producto lácteo blanco ácido, viscoso pero fluido obtenido mediante fermentación de la leche, tal como, por ejemplo, leche de vaca, leche de cabra, leche de oveja, leche de yaka, leche de yegua, leche de rena, leche de alcesa, leche de búfala, leche de burra y/o leche de camella, preferentemente leche de vaca, que se ha fermentado utilizando un cultivo de partida que comprende los organismos presentes en el kéfir, tales como bacterias y levaduras de ácido láctico, así como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium breve*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, por ejemplo, mezclas de *Lactococcus diacetylactis* y *Leuconostoc cremoris*. En el yogur, la viscosidad generalmente surge de la presencia de exopolisacáridos y no, como en otros productos lácteos fermentados, de la proteína precipitante. Los tiempos y condiciones de cultivo para obtener yogurt a partir de la leche se conocen bien y dependen, entre otros, del tipo de microorganismo utilizado y del tipo de yogurt. Existen otros tipos de productos lácteos fermentados que no son yogur, tales como, por ejemplo, queso, crema agria, crema fresca, queso quark y suero fermentado.

Los componentes en el medio de cultivo de los que se alimentan los microorganismos son el sustrato para la fermentación. Esto se denomina alimentación de fermentación, caldo de fermentación o, en su conjunto, medio de cultivo. El medio de cultivo generalmente comprende además otros compuestos, que pueden ayudar en la fermentación o el procesamiento, entre los cuales se encuentran las sales. El medio de cultivo es generalmente acuoso. El medio de cultivo puede ser una sustancia alimenticia, en cuyo caso el sustrato está comprendido en el medio de cultivo. Este es el caso, por ejemplo, de la fermentación de alimentos, en la que el medio de cultivo puede ser, por ejemplo, crema o cuajada. Alternativamente, el medio de cultivo puede ser un medio acuoso al que se han añadido diversos componentes como sustrato. Dichos componentes pueden incluir una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo y una fuente de carbono como sustrato. La fuente de nitrógeno puede comprender preferentemente amoníaco, sales de nitrato, aminoácidos, péptidos y/o proteínas. La fuente de carbono es preferentemente un triglicérido o un carbohidrato, tal como un azúcar, un alcohol de azúcar, un almidón y/o celulosa. La fuente de fósforo es preferentemente un monofosfato, pirofosfato o polifosfato inorgánico, un fosfocarbhidrato, un fosfolípido o un nucleótido.

En la presente invención, la sustancia objetivo puede ser el medio resultante total después de la fermentación del medio de cultivo. Esto suele ser cierto para los casos en los que la sustancia objetivo es un alimento. Alternativamente, la sustancia objetivo puede ser un componente comprendido en el medio resultante total después de la fermentación del medio de cultivo. En el último caso, es preferente que la sustancia objetivo se aisle posteriormente del medio resultante. Esto suele ser cierto en los casos en que la sustancia objetivo es un compuesto químico, tal como el etanol o un ácido.

Es decir, la presente invención se refiere a un procedimiento para disminuir el tiempo de latencia en una fermentación de un medio de cultivo para preparar una sustancia objetivo, en el que la sustancia objetivo no es yogurt y en el que la fermentación da como resultado la formación de ácido o etanol. La formación de ácido o etanol mediante microorganismos se conoce en la técnica, y se conoce bien cómo aplicar dicha formación para obtener una sustancia objetivo por fermentación.

Preferentemente, la sustancia objetivo es un alimento, más preferentemente un alimento producido utilizando una fermentación que da como resultado la formación de etanol. Alternativamente, la presente invención se refiere a fermentaciones que dan como resultado la formación de ácido, preferentemente ácido láctico y/o ácido acético. En realizaciones preferentes, dichas fermentaciones dan como resultado alimentos que comprenden el citado ácido. En realizaciones alternativas, la sustancia objetivo es el ácido, preferentemente ácido láctico o ácido acético, como la sustancia objetivo.

Preferentemente, la presente invención se aplica en un proceso de fermentación en el que el crecimiento del microorganismo está limitado por péptidos. Los péptidos, para el alcance de la presente invención, son pequeños fragmentos de proteínas, que comprenden 5-30 aminoácidos; dichos fragmentos también se denominan “péptidos nutritivos”. Dichos péptidos se encuentran libres en solución, por lo que también pueden denominarse “péptidos nutritivos libres”.

Una fermentación limitada por péptidos es una fermentación en la que la concentración de péptidos nutritivos libres está limitada, pero en la que otros nutrientes necesarios, tales como minerales (trazas), carbohidratos y proteínas,

están disponibles libremente. De este modo, una fermentación limitada por péptidos es una fermentación en la que la cantidad de péptidos nutritivos libres presentes en el caldo de fermentación limita el crecimiento del microorganismo. Esta limitación por péptidos tiene lugar cuando la velocidad de degradación de los péptidos nutritivos por las proteasas/peptidasas hacia aminoácidos es mayor que la velocidad de formación de péptidos nutritivos a partir de proteínas. Puede someterse a prueba si una fermentación está limitada por péptidos observando el efecto de la adición de pequeñas cantidades de péptidos sobre el crecimiento y el tiempo de latencia. Cuando la adición de péptidos nutritivos no da como resultado una fermentación sustancialmente más rápida, entonces la fermentación no está limitada por péptidos. Cuando la adición de péptidos nutritivos da como resultado una fermentación más rápida, entonces la fermentación puede denominarse limitada por péptidos.

Esto significa que la velocidad de fermentación depende de la concentración de péptidos nutritivos disponibles. En caso de una fermentación limitada por péptidos, no hay péptidos nutritivos suficientes para sostener o adaptarse al crecimiento exponencial del microorganismo. Esto conduce a un aumento en el tiempo de latencia.

En el procedimiento de la presente invención, se halla que la adición de una cantidad relativamente pequeña de inhibidor de la proteasa de patata reduce el tiempo de latencia, en particular para fermentaciones limitadas por péptidos y, en particular, cuando hay suficientes proteínas disponibles.

Es inesperado que, en particular, en procedimientos que implican una fermentación limitada por péptidos, se reduzca el tiempo de latencia. Se conoce bien que un factor importante para determinar el tiempo de latencia de una fermentación es la degradación de las proteínas en el medio en péptidos nutritivos pequeños de 5-30 aminoácidos. Esta conversión se efectúa mediante una amplia variedad de proteasas. Una función bien conocida de los inhibidores de proteasas es inhibir las proteasas, inhibiendo eficazmente a las proteasas que son responsables de la degradación de las proteínas en péptidos nutritivos. Como tal, se esperaría que la adición de inhibidores de proteasa, de cualquier fuente, daría como resultado un mayor tiempo de latencia debido a una degradación enzimática más lenta de las proteínas y una formación asociada más lenta de péptidos nutritivos. Sin embargo, se ha hallado ahora que, de hecho, ocurre lo contrario, y la adición de inhibidores de la proteasa proteicos de patata da como resultado un tiempo de latencia reducido, en lugar de aumentado.

El tiempo de latencia, en el presente contexto, se define como la duración de tiempo necesaria para que el microorganismo se adapte al nuevo entorno, el medio de cultivo. Es la duración de tiempo necesaria para la fase de latencia.

Un proceso de fermentación puede controlarse mediante diversos procedimientos, utilizando indicadores metabólicos o indicadores en los que se controla la formación de biomasa. Por ejemplo, la producción de gas (tal como CO₂ o metano) podría ser un parámetro de salida metabólico adecuado en caso de una fermentación asociada con la formación de gas. Alternativamente, la densidad óptica (OD (Optical Density, Densidad Óptica) a 600 nm, OD600) podría proporcionar un parámetro de salida adecuado, para proporcionar una cuantificación de la cantidad de microorganismos presentes. Además, la densidad del medio de cultivo puede ser adecuada, en los casos en los que un producto significativo de la fermentación, tal como, por ejemplo, la sustancia objetivo, tiene una densidad diferente que el medio de cultivo. Esto es cierto, por ejemplo, en fermentaciones que dan como resultado la formación de alcohol. En el caso de una fermentación que da como resultado la formación de ácido, el pH puede proporcionar un parámetro de salida adecuado. La persona experta puede idear numerosas formas de determinar la progresión de una fermentación y determinar el tiempo requerido para la fase de latencia.

La fermentación progresa generalmente a lo largo de una curva en forma de S, en parámetros de salida tales como densidad óptica, formación de gas, densidad del medio de cultivo o pH, tal como se conoce bien en la técnica. En la presente invención, se halla el tiempo para alcanzar el punto medio en la fase de crecimiento exponencial calculando el punto de inflexión en la curva en S suavizada a partir de su segunda derivada. Alternativamente, cuando se utilice el pH como indicador del progreso metabólico, se toma un valor de pH a la mitad de la curva exponencial y se registra el tiempo hasta que se alcance este pH. La reducción en el tiempo de latencia puede determinarse comparando el tiempo de latencia de una fermentación sin inhibidor de la proteasa proteico de patata añadido con la misma fermentación en la que se añade una cantidad apropiada de inhibidor de la proteasa proteico de patata. La reducción absoluta del tiempo de latencia se cuantifica, generalmente, como horas de reducción, mientras que la reducción relativa del tiempo de latencia se cuantifica como "%".

Las proteínas de patata nativas pueden dividirse tentativamente en tres clases (i) la familia de la patatina, glicoproteínas ácidas altamente homólogas de 43 kDa (el 40-50 % en peso de las proteínas de patata), (ii) inhibidores de proteasa básicos de 5-25 kDa (inhibidores de proteasa proteicos de patata), que, cuando se aíslan, se denominan aislado inhibidor de la proteasa de patata o "PPII"; el 30-40 % en peso de las proteínas de patata) y (iii) otras proteínas, en su mayoría, proteínas de alto peso molecular (el 10-20 % en peso de las proteínas de patata) (Pots et al., J. Sci. Food. Agric. 1999, 79, 1557-1564).

El PPII puede dividirse en diferentes grupos en función de su peso molecular. Los diferentes grupos de inhibidores de proteasa se identifican como inhibidor de la proteasa I (peso molecular de, aproximadamente, 39 kDa), inhibidor de carboxipeptidasa (peso molecular de, aproximadamente, 4.100 Da), inhibidores de proteasa IIa y IIb (peso

molecular de, aproximadamente, 20,7 kDa) e inhibidor de la proteasa A5 (peso molecular de, aproximadamente, 26 kDa). La proporción de estos diferentes grupos de inhibidores de la proteasa en la proteína total de patata depende de la variedad de patata.

5 Para el alcance de la presente invención, un inhibidor de la proteasa proteico de patata comprende cualquier inhibidor de la proteasa proteico de patata, o cualquier mezcla de diferentes proteínas de patata, que incluye uno o más inhibidores de proteasa proteicos de patata, o grupos de inhibidores, tal como se ha definido anteriormente. Un aislado de inhibidor de la proteasa de patata (PPII) es un aislado que comprende un inhibidor de la proteasa de patata. Un inhibidor de la proteasa proteico de patata, según la presente invención, es preferentemente esencialmente nativo.

10 El PPII puede obtenerse de cualquier manera conocida, tal como, por ejemplo, mediante precipitación, absorción, fraccionamiento por calor a 60-80 °C durante, como mínimo, media hora, separación de membrana, precipitación con sulfato de amonio o ácidos grasos saturados u otros componentes, técnicas de filtración tales como ultrafiltración o filtración en gel. El fraccionamiento por calor da como resultado un aislado de inhibidor de la proteasa de patata nativo, dado que el calor desnatura la mayoría de las otras proteínas presentes en el zumo de patata, pero los inhibidores de proteasa de patata son relativamente estables al calor, de modo que sobreviven al tratamiento térmico y pueden aislarse.

15 Preferentemente, en la presente invención se utiliza el PPII. Este puede obtenerse preferentemente tal como se describe en la Patente WO2008/069650, cuyo contenido se incorpora en la presente memoria descriptiva como referencia, en la que se da una descripción detallada del aislamiento de inhibidores de proteasa del zumo del fruto de patata (PFJ (Potato Fruit Juice, Zumo del Fruto de Patata)) o agua del fruto de patata (PFW (Potato Fruit Water, Agua del Fruto de Patata)).

20 Ese proceso implica someter el zumo de fruta de patata a una floculación mediante un catión metálico divalente a un pH de 7-9, y centrifugar el zumo de fruta de patata floculado, formando de este modo un sobrenadante. Posteriormente, el sobrenadante se somete a cromatografía de adsorción de lecho expandido operada a un pH de menos de 11, y una temperatura de 5-35 °C utilizando un adsorbente capaz de unir proteínas de patata, adsorbiendo de este modo la proteína de patata nativa al adsorbente. Entre los materiales de la columna que se unen a ciertas cantidades de proteínas de patata nativas se incluyen adsorbentes de modo mixto, tales como, por ejemplo, Amersham Streamline® Direct CST I (GE Healthcare), adsorbentes Fastline (Upfront Chromatography A/S), adsorbentes macroporosos y adsorbentes de intercambio iónico. Alternativamente, los adsorbentes que comprenden ligandos, tales como los descritos en la solicitud de Patente europea 12175944.3 son altamente preferentes para aislar PPII adecuado para su utilización en la presente invención.

25 Finalmente, como mínimo, un aislado de proteína de patata nativa se eluye del adsorbente con un eluyente. Este procedimiento da como resultado, entre otros, PPII aislado de alta pureza, que es nativo con un mínimo de proteína desnaturada presente y que se caracteriza por una solubilidad estable.

30 La cantidad de inhibidores de la proteasa proteicos de patata puede determinarse midiendo el inhibidor contra la tripsina, según el procedimiento descrito en Spelbrink et al., The Open Food Science Journal 2011 (5) pág. 42-46 "Quantitative Determination Trypsin Inhibitory Activity in Complex Matrices" o en la norma ISO 14902:2001E "Animal Feed Stuffs - Determination of soya products".

35 Como alternativa a la utilización del inhibidor de la proteasa proteico de patata, tal como PPII, es posible utilizar una fracción de proteína purificada adicional aislada de PPII. Una fracción de proteína preferente

40

- es soluble a pH 8,
- tiene un pKa < 8,
- tiene actividad TIA (Trypsin Inhibitory Activity, Actividad Inhibidora de Tripsina) y CTIA (Chymotrypsin Inhibitory Activity, Actividad inhibidora de Quimotripsina), pero ninguna actividad sobrevive al tratamiento térmico a 80 °C durante 30 minutos. Sin embargo, la capacidad de reducción del tiempo de latencia permanece intacta hasta, como mínimo, 90 °C y tiene un peso molecular de entre 17,5 y 18,2 kDa.

45 La actividad de TIA se determina midiendo el efecto inhibidor de la proteína contra la tripsina, según el procedimiento descrito en Spelbrink et al., The Open Food Science Journal 2011 (5) pág. 42-46 "Quantitative Determination Trypsin Inhibitory Activity in Complex Matrices" o en la norma ISO 14902: 2001E "Animal Feed Stuffs - Determination of soya products".

50 La actividad de CTIA se determina midiendo el efecto inhibidor de la proteína contra la quimotripsina. El procedimiento que se va a utilizar es esencialmente el mismo que el descrito para la TIA, pero se requieren dosis de enzimas más elevadas para compensar la menor actividad específica de la quimotripsina.

55 Una ventaja de utilizar un inhibidor de la proteasa de patata es que la mayoría es muy estable al calor. La fracción

5 activa en el aislado de inhibidor de la proteasa proteico de patata, que explica la reducción en el tiempo de latencia, conserva su estado nativo hasta temperaturas de 60 °C, preferentemente 70 °C, más preferentemente 80 °C y, de la manera más preferente, 90 °C durante un período de, como mínimo, 15 min, preferentemente, como mínimo, 90 min. Esto permite la adición del inhibidor de la proteasa proteico de patata en diferentes puntos del proceso de fermentación.

10 El inhibidor de la proteasa proteico de patata puede añadirse al medio de cultivo antes, después o durante la adición del cultivo iniciador, o puede añadirse al medio de cultivo indirectamente, por ejemplo, mediante la adición al cultivo iniciador, o a otro componente que vaya a ser añadido al medio de cultivo. Además, puede añadirse a una alimentación de fermentación que posteriormente se convertirá o formará parte del medio de cultivo en procesos en los que la alimentación de fermentación se calienta antes de la fermentación. Este es el caso, por ejemplo, en procesos que requieren pasteurización o esterilización antes de la fermentación, que es común en muchos procesos para la fermentación de alimentos, tal como se ha definido anteriormente.

15 Una ventaja adicional de la presente invención es que el inhibidor de la proteasa proteico de patata es funcional en los procesos de fermentación, tal como se ha descrito, en concentraciones muy bajas. En particular, la adición de menos de 1 g/l, preferentemente menos de 0,5 g/l, más preferentemente, menos de 0,1 g/l, incluso más preferentemente, menos de 0,05 g/l de inhibidor de la proteasa proteico de patata es suficiente para reducir el tiempo de latencia en procesos de fermentación, según la presente invención. Se requiere una cantidad mínima de, como mínimo, 0,01 g/l, preferentemente, de 0,005 g/l, más preferentemente, de 0,001 g/l de inhibidor de la proteasa de patata para reducir el tiempo de latencia de las fermentaciones, según la presente invención.

20 Las concentraciones preferentes de inhibidor de la proteasa proteico de patata están entre, por ejemplo, 5 g/l y 0,001 g/l, preferentemente entre 5 g/l y 0,05 g/l, más preferentemente, entre 5 g/l y 0,01 g/l, tal como entre 1 g/l y 0,01 g/l. La concentración de inhibidor de la proteasa proteico de patata en este contexto se expresa como g de inhibidor de la proteasa proteico de patata por litro de medio de cultivo.

25 A estas concentraciones, el inhibidor de la proteasa proteico de patata no proporciona sabor a la sustancia objetivo, lo cual es una ventaja adicional, en particular cuando la sustancia objetivo es un alimento. Además, estas bajas concentraciones de inhibidor de la proteasa proteico de patata no tienen un impacto detectable en las características sensoriales de la sustancia objetivo.

30 También es una ventaja de la presente invención que el inhibidor de la proteasa de patata sea funcional en procesos de fermentación en un amplio intervalo de pH. En particular, el pH en el medio de cultivo puede ser de hasta 6,7, preferentemente, de 8,0, más preferentemente, de hasta 10,0. Además, el pH puede ser tan bajo como 4, preferentemente, tan bajo como 3, más preferentemente, tan bajo como 2. La estabilidad del inhibidor de la proteasa proteico de patata en un amplio intervalo de pH es ventajosa porque permite que los medios de cultivo de diversos pH sean procesados por fermentación. Además, permite fermentaciones en las que se libera ácido para beneficiarse de la adición del inhibidor de la proteasa proteico de patata durante toda la fermentación.

35 Además, es una clara ventaja de la presente invención que el inhibidor de la proteasa proteico de patata no sea alergénico. Esto significa que puede utilizarse en procesos de fermentación operados por personas alérgicas a otras proteínas. Además, esto significa que puede utilizarse en procesos de fermentación en los que la sustancia objetivo es un alimento, en el que el alimento puede ser consumido por personas con alergias sin riesgo de choque alérgico.

40 Además, es una ventaja del inhibidor de la proteasa proteico de patata que una solución de esta proteína, preferentemente una solución acuosa, es transparente o, como mínimo, sustancialmente no turbia, hasta concentraciones de, como mínimo, 10 g/l, preferentemente 50 g/l, más preferentemente 250 g/l. Estas concentraciones se alcanzan preferentemente en una solución de pH de 2 a 5, preferentemente 2-4, más preferentemente, de 2,5-3,5. Las soluciones transparentes o sustancialmente no turbias del inhibidor de la proteasa proteico de patata permiten una esterilización por filtración conveniente y una apariencia atractiva de la sustancia objetivo, en particular cuando la sustancia objetivo es un alimento.

45 Un cultivo iniciador de fermentación, en el contexto de la presente invención, es un cultivo que comprende uno o más microorganismos tal como se ha definido anteriormente, de una composición apropiada para obtener un cierto tipo de fermentación. Un cultivo iniciador puede comprender un solo tipo de microorganismo, o puede comprender dos o más microorganismos.

50 Los microorganismos presentes en el cultivo iniciador de fermentación para preparar una sustancia objetivo por fermentación son aquellos que liberan ácido o etanol. Dichos microorganismos se conocen bien. Generalmente, el microorganismo se elige entre el grupo de bacterias, levaduras, hongos y algas, preferentemente bacterias, levaduras u hongos.

55 Por ejemplo, las bacterias adecuadas pueden ser del orden de Lactobacillales, que son bacterias gram positivas que comprenden las bacterias del ácido láctico que comprenden el género *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, o del orden de Bifidobacteriales. Sin embargo, una bacteria de la

presente invención no queda limitada por estos ejemplos.

5 Los hongos adecuados, por ejemplo, los clasificados como levaduras, son, por ejemplo, del orden de Saccharomycetales e incluyen especies de los géneros *Saccharomyces*, *Brettanomyces*, *Kloeckera* y *Candida*. Sin embargo, la levadura de la presente invención no queda limitada por estos ejemplos.

Las levaduras preferentes incluyen levaduras de los géneros *Saccharomyces*, tales como *Saccharomyces cerevisiae*.

10 Otros hongos incluyen, por ejemplo, especies de los géneros *Penicillium*, *Mortierella*, *Aspergillus*, *Fusarium* (por ejemplo, *Fusarium venenatum*), *Rhizopus* y *Agaricus*. Sin embargo, los hongos de la presente invención no quedan limitados por estos ejemplos.

15 En general, los microorganismos adecuados para su utilización en el procedimiento de la presente invención se eligen de la clase de *Bacili*, *Actinobacterias* o *Saccharomycetes*. Preferentemente, los microorganismos adecuados se eligen del orden de *Lactobacillales*, *Bifidobacteriales* y *Saccharomycetales*, más preferentemente de los géneros de *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium* y *Saccharomyces*.

20 Son preferentes *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Amylomyces*, *Endomycopsis*, *Saccharomyces*, *Hansenula anomala*, *Lactobacillus* y *Acetobacter*.

25 El medio de cultivo debe ser apropiado para el tipo de fermentación, la sustancia objetivo y el tipo de microorganismo en cuestión. De este modo, el medio de cultivo puede ser líquido o sólido, semisólido, particulado o viscoso, y debe incluir nutrientes adecuados como sustrato, entre los cuales, por ejemplo, proteínas y/o carbohidratos. Los nutrientes adecuados se conocen bien en la técnica y pueden ser cualquier componente necesario para que crezca un microorganismo, tal como proteína, péptido, lípidos, compuestos traza, oligoelementos, minerales y carbohidratos tales como almidón, polisacáridos y azúcares.

30 El cultivo de los microorganismos se realiza en condiciones de cultivo adecuadas. Las condiciones de cultivo durante la fermentación pueden ser las conocidas para cultivos de fermentación, adecuadas para la sustancia objetivo de interés. Las condiciones de cultivo pueden ser aeróbicas o anaeróbicas, y si son aeróbicas, pueden implicar una aireación baja, regular o elevada. El cultivo puede ser en estado sólido o en estado líquido, y puede hacerse a cualquier escala, en procedimientos de procesamiento discontinuo o semicontinuo.

35 La temperatura durante la fermentación puede variar desde -10 °C hasta +60 °C, preferentemente, desde 13-45 °C. Preferentemente, la temperatura permanece constante. El pH puede variar desde pH 2-10, preferentemente 4-6,7. El tiempo de cultivo es muy variable y depende del tipo de cultivo y, en particular, de la sustancia objetivo. El experto en la técnica conoce bien los tiempos de cultivo adecuados para las sustancias objetivo específicas. Por consiguiente, los tiempos de cultivo pueden variar desde 0,5 horas hasta 10 años o más.

40 Los niveles de oxígeno pueden variar desde ausentes (fermentación anaeróbica) a presentes (fermentación aeróbica). El procesamiento puede ser tanto agitado como estático.

45 La adición del inhibidor de la proteasa proteico de patata puede tener lugar en cualquier momento antes de la fermentación. Dicha adición puede hacerse combinando el inhibidor de la proteasa proteico de patata con el medio de cultivo como una solución concentrada de proteína filtrada o pasteurizada, y posteriormente añadiendo el cultivo iniciador, o alternativamente, combinando el cultivo iniciador con la proteína de patata nativa y combinando esta mezcla con el medio de cultivo. Alternativamente, todos los componentes pueden añadirse por separado, o en combinación con constituyentes adicionales del medio de cultivo, según sea el caso. Estos constituyentes adicionales del medio de cultivo pueden incluir, por ejemplo, carbohidratos, minerales traza, minerales mayoritarios, proteínas o péptidos.

50 En una realización muy preferente, el inhibidor de la proteasa de patata puede añadirse al medio de cultivo antes de una etapa de calentamiento. Esto es ventajoso cuando se debe calentar el medio de cultivo, tal como para pasteurización o esterilización, antes de la adición del cultivo iniciador. Debido a la ventajosa estabilidad térmica del inhibidor de la proteasa proteico de patata, el inhibidor de la proteasa proteico de patata conserva su estado nativo incluso después de dicho calentamiento, de modo que su función bioquímica natural permanece y el tiempo de latencia de la fermentación se reduce incluso después del calentamiento.

60 La adición del inhibidor de la proteasa proteico de patata, preferentemente en estado nativo, tiene el efecto de reducir el tiempo de latencia de la fermentación. El tiempo de latencia se reduce significativamente, dependiendo del cultivo y el medio, tal como en, como mínimo, el 10 %, preferentemente, como mínimo, el 25 %, más preferentemente, como mínimo, el 50 %, más preferentemente, como mínimo, 60 % y, de la manera más preferente, como mínimo, el 90 %, en relación con el mismo procedimiento de fermentación en el que no se añade inhibidor de la proteasa proteico de patata.

65

La obtención (o “recolección”) de la sustancia objetivo puede tomar cualquier forma conocida en la técnica para el aislamiento de sustancias objetivo después de la fermentación. En particular, puede obtenerse un alimento completo cosechando el medio de cultivo. El citado alimento entero puede someterse adecuadamente a uno o más tratamientos posteriores. Alternativamente, una sustancia objetivo puede aislarse del cultivo de fermentación, tal como por destilación, filtración, extracción u otros medios conocidos en la técnica, y opcionalmente purificarse además por cualquier medio conocido. De esta manera, puede obtenerse una sustancia objetivo con suficiente pureza.

Fermentaciones que dan como resultado la formación de etanol

En una realización de la presente invención, la fermentación da como resultado la formación de etanol (alcohol). Preferentemente, si el procedimiento de fermentación da como resultado la formación de etanol, la sustancia objetivo es vino o vino espumoso, cerveza, whisky, sidra, hidromiel, sake o bioetanol. Las sustancias objetivo preferentes son vino, cerveza y bioetanol, lo más preferentemente, cerveza. En otras realizaciones preferentes, la sustancia objetivo preferente es un alimento.

Un microorganismo preferente en esta realización es del género de *Saccharomyces*, *Candida*, *Zygosaccharomyces*, *Dekkera* o *Brettanomyces*, preferentemente *Saccharomyces*. Es de conocimiento general qué tipo de fermentación, utilizando qué microorganismos, da como resultado la formación de etanol.

Un medio de cultivo preferente en esta realización comprende material vegetal como sustrato, tal como cereales, arroz, judías, miel o fruta (preferentemente bayas, más preferentemente, uvas) de calidad alimentaria, preferentemente, cereales o bayas en fermentaciones que dan como resultado alimentos a base de etanol. En realizaciones muy preferentes, el medio de cultivo que comprende material vegetal es un medio líquido.

La fermentación que da como resultado la formación de etanol generalmente puede conseguirse de la siguiente manera. La fermentación comprende proporcionar un cultivo iniciador de fermentación que comprende uno o más microorganismos del género *Saccharomyces*, *Candida*, *Zygosaccharomyces*, *Dekkera* o *Brettanomyces* en un medio de cultivo que comprende material vegetal, preferentemente cereales, arroz, judías, miel o fruta de calidad alimentaria, material vegetal que comprende carbohidratos. El medio de cultivo se combina con un inhibidor de la proteasa proteico de patata para reducir el tiempo de latencia, y los microorganismos se cultivan en el medio de cultivo para obtener el alimento.

Preferentemente, en una realización en la que la fermentación se dirige principalmente hacia la producción de etanol, la fermentación es anaeróbica. Este es el caso, por ejemplo, de la fermentación de cereales, arroz, judías, miel o fruta para producir cerveza, whisky, sake, hidromiel, vino o bioetanol.

Si la sustancia objetivo es vino o vino espumoso (incluido champán), los cultivos iniciadores adecuados comprenden *Saccharomyces*. En este caso, un medio de cultivo adecuado comprende como sustrato bayas o zumo de bayas, preferentemente zumo de uvas u otros zumos de frutas. Las frutas pueden triturarse, prensarse o macerarse para obtener un zumo que sirva como medio de cultivo. Opcionalmente, el zumo puede tratarse enzimáticamente para aumentar el contenido de azúcar libre o eliminar materiales no deseados.

Si la sustancia objetivo es la cerveza, los cultivos iniciadores adecuados comprenden *Saccharomyces*, tal como *Saccharomyces carlsbergensis* o *Saccharomyces pastorianus*. En este caso, un medio de cultivo adecuado comprende como sustrato mosto u otros extractos de cereales ricos en carbohidratos. El mosto se prepara a partir de granos mediante maceración para convertir los carbohidratos complejos en azúcares. Preferentemente, los granos comprenden cebada como fuente de enzimas. Opcionalmente, las enzimas convertidoras de carbohidratos pueden añadirse de manera exógena. El lúpulo y/u otras hierbas y especias pueden añadirse al mosto.

Si la sustancia objetivo es whisky, los cultivos iniciadores adecuados comprenden *Saccharomyces*. En este caso, un medio de cultivo adecuado comprende como sustrato mosto u otros extractos de cereales ricos en carbohidratos. Un tratamiento posterior a la fermentación adecuado comprende, por ejemplo, la destilación.

Si la sustancia objetivo es sidra, los cultivos iniciadores adecuados comprenden *Saccharomyces*. En este caso, un medio de cultivo adecuado comprende manzanas o zumo de manzana como sustrato.

Si la sustancia objetivo es hidromiel, los cultivos iniciadores adecuados comprenden *Saccharomyces*. En este caso, un medio de cultivo adecuado comprende miel como sustrato.

Si la sustancia objetivo es el sake, los cultivos iniciadores adecuados comprenden *Aspergillus*, preferentemente *Aspergillus oryzae*, y *Saccharomyces*. En este caso, un medio de cultivo adecuado comprende como sustrato arroz.

Si la sustancia objetivo es bioetanol, el medio de cultivo comprende como sustrato, preferentemente, una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo y una fuente de carbono. La fuente de nitrógeno puede comprender preferentemente amoníaco, sales de nitrato, aminoácidos, péptidos y/o proteínas. La fuente de carbono es,

preferentemente, un triglicérido o un carbohidrato, tal como un azúcar, un alcohol de azúcar, un almidón y/o celulosa. La fuente de fósforo es preferentemente un monofosfato, pirofosfato o polifosfato inorgánico, un fosfocarbhidrato, un fosfolípido o un nucleótido.

5 En el caso del etanol, que por ejemplo puede utilizarse como biocombustible (bioetanol), entre los microorganismos adecuados se incluyen *Saccharomyces*, *Zymomonas* y *Schizosaccharomyces*. El medio de cultivo en este caso comprende preferentemente material vegetal como sustrato, que puede ser de cualquier tipo, tal como, por ejemplo, tallos de maíz, paja de trigo, caña de azúcar, patata, mandioca y maíz.

10 El etanol puede aislarse del medio resultante total después de la fermentación del medio de cultivo mediante destilación u ósmosis inversa, filtración por membrana o concentración de congelación, preferentemente, mediante destilación. Posteriormente, el etanol se purifica, preferentemente, mediante procedimientos conocidos, para obtener etanol lo más puro posible.

15 Fermentaciones que dan como resultado la formación de ácido

En otra realización de la presente invención, la fermentación da como resultado la formación de ácido. Entre los ácidos preferentes se incluyen ácido láctico y ácido acético. Preferentemente, si el procedimiento de fermentación da como resultado la formación de ácido, la sustancia objetivo es queso, crema fresca, crema agria, embutidos, chucrut, encurtidos o vinagre. En realizaciones preferentes, la sustancia objetivo de una fermentación que da como resultado la formación de ácido es un alimento. En realizaciones alternativas no alimentarias, la sustancia objetivo es el ácido, preferentemente ácido láctico o ácido acético, como compuestos químicos. En esta realización, el ácido se aísla preferentemente después de la fermentación.

25 Si la sustancia objetivo es queso, los cultivos iniciadores adecuados comprenden diversas mezclas de bacterias de ácido láctico, que están disponibles comercialmente. Un ejemplo es una mezcla de *Lactococcus lactis* y *Lactococcus cremoris*. Otros ejemplos son las bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* o *Propionibacter*.

30 En este caso, un medio de cultivo adecuado comprende como sustrato diversos tipos de productos lácteos, tales como crema, cuajada o suero, tales como, por ejemplo, productos lácteos derivados de la leche de vaca, leche de cabra, leche de oveja, leche de yaka, leche de yegua, leche de rena, leche de alcesa, leche de búfala, leche de burra y/o leche de camella, preferentemente leche de vaca, o alternativamente leche de soja y/o leche de almendras y/u otros extractos vegetales ricos en proteínas.

35 Si la sustancia objetivo es crema fresca, el cultivo comprende preferentemente *Lactococcus* y/o *Lactobacillus*, preferentemente, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y/o *Lactococcus lactis* biovar. *Diacetylactis*. Alternativamente, pueden utilizarse enzimas endógenas de la crema. Un medio de cultivo adecuado comprende crema y, preferentemente, el medio de cultivo consiste en crema. En este caso, la crema es un producto lácteo tal como se ha definido anteriormente, preferentemente derivado de la leche de vaca.

40 Si la sustancia objetivo es crema agria, el cultivo comprende especies de *Lactococcus* o *Lactobacillus* mientras que el medio de cultivo comprende crema como sustrato y, preferentemente, consiste en crema. En este caso, la crema es un producto lácteo tal como se ha definido anteriormente, preferentemente derivado de la leche de vaca.

45 Si la sustancia objetivo es embutido, los cultivos iniciadores adecuados comprenden *Lactobacillus* (por ejemplo, *Lb plantarum*, *Lb sakei*, *Lb farmicis*, *Lb curvatus*), *Micrococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* (*S. xylosus* y *S. carnosus*), *Kocuria*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* (por ejemplo, *P. acidilacti* y *P. pentosaceus*) o levaduras, tales como, por ejemplo, *Debaryomyces* spp. Entre las especies de moho involucradas en la maduración y utilizadas para la inoculación se incluyen *Penicillium camembertii*, *P. roquefortii* y *P. nalgiovense* y se obtienen de, por ejemplo, Chr. Hansen (Bactoferm®). En este caso, un medio de cultivo adecuado comprende como sustrato carne (picada), preferentemente carne de vacuno (picada), carne de venado, caballo, búfalo, cerdo, aves de corral o pescado, sal y opcionalmente azúcar, GDL (Glucono-delta-Lactone, Glucono-delta-Lactona), ácido cítrico, ajo y hierbas y especias.

55 Si la sustancia objetivo es chucrut, los cultivos iniciadores adecuados comprenden *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Pediococcus*. En este caso, un medio de cultivo adecuado comprende repollo picado, sal y opcionalmente semillas de alcaravea, apio y eneldo u otras hierbas y especias.

60 Si la sustancia objetivo son encurtidos, los cultivos iniciadores adecuados incluyen *Lactobacillus* y/o *Lactococcus*. En este caso, un medio de cultivo adecuado comprende trozos de vegetales, así como rodajas o vegetales intactos. Entre los tipos adecuados de vegetales se incluyen coles, remolachas, pepinos, aceitunas y judías.

Si la sustancia objetivo es vinagre, los cultivos iniciadores adecuados comprenden especies de *Acetobacter*. En este caso, un medio de cultivo adecuado comprende vino, sidra o hidromiel.

65

Alimentos como sustancia objetivo

- 5 En los procedimientos de fermentación, según la presente invención, la fermentación da como resultado la formación de ácido o etanol. En caso de que la sustancia objetivo sea un alimento, el medio de cultivo comprende, preferentemente, solo componentes de calidad alimentaria. Más preferentemente, si la sustancia objetivo es un alimento, el medio de cultivo comprende, como sustrato, una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo y una fuente de carbono, fuentes que son proporcionadas, preferentemente, por lácteos, carne, vegetales y/o líquidos alcohólicos de calidad alimentaria.
- 10 En el caso de que la sustancia objetivo sea un alimento, el alimento generalmente se obtiene como la mezcla completa después de la fermentación. Sin embargo, no se deben excluir los alimentos que se deben aislar de la mezcla de fermentación, entre los que se incluyen chucrut, encurtidos, vinagre, whisky, brandy, coñac y otras bebidas alcohólicas destiladas.
- 15 En el caso de que la sustancia objetivo sea un alimento, el cultivo iniciador puede comprender un solo microorganismo, o puede comprender dos o más microorganismos diferentes, tal como se conoce para un alimento particular. El experto en la materia conoce bien los cultivos iniciadores que comprenden diversos microorganismos, que tras la adición a un medio de cultivo de composición apropiada dan como resultado un alimento predeterminado.
- 20 Opcionalmente, el alimento puede someterse a un tratamiento posterior después de la fermentación, tal como la adición de aditivos, colorantes, potenciadores del sabor o ingredientes adicionales, o tal como tratamiento térmico adicional, tal como horneado, destilación, esterilización o pasteurización, o dimensionamiento apropiado, entre los cuales el corte y/o la conformación y la adaptación apropiada de la viscosidad.
- 25 A efectos de claridad y una descripción concisa, las características se describen en el presente documento como parte de las mismas realizaciones o de realizaciones separadas, sin embargo, se apreciará que el alcance de la presente invención puede incluir realizaciones que tienen combinaciones de todas o algunas de las características descritas.
- 30 La presente invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos, que no constituyen limitación.

Ejemplo 1: reducción del tiempo de latencia en un modelo de fermentación general

- 35 Se creó un modelo de fermentación general en el que se sometieron a prueba diferentes microorganismos para determinar la reducción del tiempo de latencia mediante la adición de PPII. Este modelo comprende dos medios diferentes, MRS (Man Rogose Sharpe)-Bouillon (MRSB (Man Rogose Sharpe-Bouillon), medio estándar disponible en el mercado) y el denominado MRSC (Man, Rogose, Sharpe-Caseinate, Man, Rogose, Sharpe-Caseinato), que es un medio con prácticamente los mismos ingredientes que MRSB, pero en lugar de péptidos de caseína, se añade caseinato (C) al medio. Generalmente, los péptidos en MRSB comprenden 5-30 aminoácidos. Dependiendo de las
- 40 necesidades de los microorganismos, el medio MRSB puede ser un sistema limitado por péptidos o no limitado por péptidos. Los cultivos iniciales sometidos a prueba comprendían cultivos de microorganismos de cepa única (cultivos ATCC (American Type Culture Collection, Colección de Cultivos Tipo de los Estados Unidos) o cultivos con más de un tipo de microorganismo.
- 45 Se preparó medio MRSB disolviendo los siguientes componentes en 850 ml de agua desmineralizada y ajustando el pH a 6,5. 10 g de peptona de caseína ("CP (Caseine Peptone, Peptona de caseína)"), digestión trípica (Fluka 70172) 10 g de extracto de carne (Fluka 70164) 5 g de extracto de levadura ("YE (Yeast Extract, Extracto de Levadura)", Fluka 92144) 20 g de glucosa (Merck 1.08342) 1 g de Tween-80 (Merck 822187) 2 g de K₂HPO₄ (Merck 1.05104) 5 g de acetato Na (Merck 1.06267) 2 g de citrato (NH₄)₂ (SigmaAldrich 09833) 0,2 g de MgSO₄-7H₂O (SigmaAldrich M5921) 0,05 g de MnSO₄-H₂O (SigmaAldrich M7634).
- 50 En el medio MRSC, la peptona de caseína se sustituyó con 10 g de caseinato (Fonterra 385). Después de disolver los componentes, el volumen total se llevó a 1000 ml, se ajustó el pH y el líquido resultante se esterilizó en autoclave.
- 55 En el medio MRSC, parte de los péptidos (nutritivos) se sustituyen con proteínas enteras en forma de caseinato. Esto se hace para demostrar que la actividad de inhibición de la proteasa del PPII no inhibe las proteasas que los microorganismos necesitan para poder degradar el caseinato a péptidos nutritivos. Si el PPII inhibiera las proteasas de los microorganismos, se esperaría una latencia prolongada. Principalmente, las proteasas de los
- 60 microorganismos están unidas a la membrana y los péptidos producidos en esta etapa son transportados directamente a la célula del microorganismo. Por lo tanto, se espera que las peptidasas en el medio no tengan un impacto tan grande como en el medio MRSB. Se espera que el medio MRSC esté menos limitado por péptidos que el medio MRSB.
- 65 Para algunos cultivos, se utilizó medio YPD (Yeast extract Peptone Dextrose, extracto de Levadura, Peptona y Dextrosa) como alternativa para MRSB. Se preparó YPD disolviendo 20 g de peptona de caseína ("CP"), extracto de

levadura de digestión triptica (Fluka 70172) (“YE”, Fluka 92144) 20 g de glucosa (Merck 1.08342) en un volumen total de 1 l, y el líquido resultante se esterilizó mediante autoclave.

5 Se sometieron a prueba cultivos de cepa única (cultivos ATCC) en medio MRSB y MRSC o medio YPD. Ver la tabla 1 para obtener una visión general de todos los cultivos ATCC sometidos a prueba. La tabla 2 proporciona una visión general de los cultivos sometidos a prueba en MRSB, MRSC y medio YPD y la reducción de tiempo observada.

10 Los cultivos se hicieron crecer a partir de cultivos estacionarios diluidos durante la noche a 30 °C en una placa de microtitulación sellada con película en 100 μ l de volumen total que se colocó en un lector de placas ThermoScientific MultiSkan Go mientras se agitaba periódicamente durante 10 segundos cada minuto. El crecimiento se controló registrando la absorbancia a 600 nm, y la reducción del tiempo de latencia se estableció mediante la comparación del crecimiento en un medio de cultivo con y sin inhibidor de la proteasa proteico de patata.

Tabla 1: diversos cultivos iniciadores de fermentación

Descripción del cultivo	Código ATCC ®	Producto
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC ® 334 TM	MBL0546P
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC ® 393 TM	MBL0176P
<i>Lactobacillus fermentum</i>	ATCC ® 9338 TM	MBL0813P
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ATCC ® 7469 TM	MBL0233P
<i>Lactobacillus sakei</i>	ATCC ® 15521 TM	MBL0128P
<i>Lactococcus lactis</i>	ATCC ® 11454 TM	MBL0205P
<i>Lactococcus lactis</i>	ATCC ® 19435 TM	MBL0149P
<i>Acetobacter aceti</i>	ATCC ® 15973 TM	MBL0511P
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC ® 9763 TM	MBL0699P

15 Todos los cultivos sometidos a prueba mostraron una reducción del tiempo de latencia tras la adición de PPII en medio MRSB o YPD. En la mayoría de los casos, la dosis óptima fue una concentración final del 0,50 % en peso de proteína PPII, pero ya se muestra un efecto claro a dosis muy bajas, del 0,05 % o incluso al 0,01 % de proteína PPII en la formulación final. En el medio MRSC, no se ha observado alargamiento del tiempo de fermentación en estos experimentos. Esto confirma la hipótesis de que el PPII no inhibe las proteasas de los microorganismos. Sin embargo, se anticipa que la reducción del tiempo de latencia también puede tener lugar en sistemas no limitados por péptidos. En el medio MRSB, todos los cultivos mostraron una reducción del tiempo de latencia tras la adición de PPII.

25 La tabla 2 también muestra la reducción obtenida de tiempo en horas (horas), así como en porcentajes (* %).

Tabla 2: reducción del tiempo de latencia después de la adición de inhibidor de proteasa proteica de patata a diferentes cultivos iniciadores de fermentación.

Tipo de cultivo	Nombre	Medio	Acido formado	Productos potenciales	OD600	Tiempo de blanco (h:min)	Conc. PPII óptima (%)	Tiempo de PPII (h:min)	Horas de tiempo de reducción (* en %)
Cultivos ATCC	Lactibacillus casei	MRSB	Acido láctico	Queso, aceitunas	OD600 máxima	8:00	0,50 %	3:45	4:15 (* 53 %)
Cultivos ATCC	Lactibacillus fermentum	MRSB	Acido láctico	Pan de masa fermentada	OD600nm 0,5	16:55 máximo	0,50 %	8:15 máximo	8:40 (* =50 % máximo)
Cultivos ATCC	Lactibacillus rhamnosus	MRSB	Acido láctico	Queso	OD600 máxima	2:45	0,50 %	0:15	2:30 (* 91 %)
Cultivos ATCC	Lactibacillus sakei	MRSB	Acido láctico	Carne, embutidos	OD600nm 0,5	19:45	0,50 %	0:45	19:00 (* 96 %)
Cultivos ATCC	Lactococcus lactis	MRSB	Acido láctico	Queso	OD600nm 2,00	19:45	0,05 %	7:45	12:00 (* 61 %)
Cultivos ATCC	Acetobacter aceti	MRSB	Acido acético	Vinagre	Pendiente creciente máxima	11:15	0,50 %	1:15	10:00 (* 89 %)
Cultivos ATCC	Lactibacillus casei	MRSC	Acido láctico	Queso, aceitunas	OD600nm 1,00	17:45	0,50 %	6:38	11:07 (* 62 %)
Cultivos ATCC	Lactibacillus fermentum	MRSC	Acido láctico	Pan de masa fermentada	OD600nm 1,20	13:54	0,50 %	8:49	5:04 (* 36 %)
Cultivos ATCC	Lactibacillus rhamnosus	MRSC	Acido láctico	Queso	OD600nm 1,50	7:23	0,50 %	5:49	1:34 (* 20 %)
Cultivos ATCC	Lactibacillus sakei	MRSC	Acido láctico	Carne, embutidos	NA	>19:45	NA	>19:45	NA
Cultivos ATCC	Lactococcus lactis	MRSC	Acido láctico	Queso	OD600nm 1,40	12:55	0,50 %	11:48	1:08 (* 8 %)
Cultivos ATCC	Acetobacter aceti	MRSC	Acido acético	Vinagre	Pendiente creciente máxima	8:26	0,50 %	1:38	7:48 (* 90 %)
Levadura de panadería comercial	Saccharomyces cerevisiae	MRSB	Etanol	Vino, cerveza	OD600 máxima	4:00	0,50 %	2:00	2 (* 50 %)
	Saccharomyces cerevisiae	MRSC	Etanol	Vino, cerveza	OD600 máxima	4:00	0,50 %	2:00	2 (* 50 %)

NA = no analizable por precipitación

Estos datos apoyan la idea de que el PPII tiene una actividad estimulante sobre el crecimiento microbiano, al reducir el tiempo de latencia, mediante inhibición de las actividades de peptidasa de los microorganismos. Todos los sistemas con limitación por péptidos (medio MRSB e YPD) muestran una reducción de tiempo considerable. El medio MRSC más rico mostró un efecto estimulante más bajo. Todos los experimentos MRSB y MRSC descritos se ejecutaron en múltiples repeticiones ($n \geq 4$).

Ejemplo 2: determinación de si un sistema de fermentación está limitado por péptidos

Se analizó crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763) en medios con dos concentraciones de péptidos diferentes (YPD100 (que contenía 10 g de extracto de levadura (YE), 20 g de peptona de caseína) (CP) y 20 g de glucosa por litro) y YPD20 (que contenía 2 g YE, 4 g de CP y 20 g de glucosa por litro)) para ver si la actividad estimulante de LMW es más fuerte cuando hay menos péptidos presentes. Esto indica que el crecimiento está limitado por péptidos. Los cultivos se hicieron crecer a partir de cultivos estacionarios diluidos durante la noche a 30 °C en una placa de microtitulación sellada con película en 100 μ l de volumen total que se colocó en un lector de placas ThermoScientific MultiSkan Go mientras se agitaba periódicamente durante 10 segundos cada minuto. El crecimiento se analizó midiendo OD600, y la reducción de tiempo para alcanzar OD 0,4 es una medida de la actividad estimulante de LMW. De hecho, se observa un efecto estimulante de la adición de LMW al 0,1 % al medio para el crecimiento de *S. cerevisiae*, y este efecto es mayor en el medio con menos péptidos.

En la figura 1 se traza la reducción de tiempo para alcanzar OD 0,4, en comparación con cultivos sin LMW. Se observa una reducción de ~2 h en el tiempo (de, aproximadamente, 9 h a 7 h) cuando se añade LMW al 0,1 % al medio con bajo contenido de péptidos, mientras que con más péptidos presentes (YPD100) el efecto es menor (aproximadamente 1 h, de 5 a 4 horas). Las reducciones de tiempo medidas son significativas, según lo determinado por una prueba t de Student ($p < 0,05$). En el apéndice se muestra un ejemplo de curva de crecimiento para cada condición. De este modo, LMW tiene un efecto estimulante sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* en YPD, y el efecto es más fuerte en condiciones limitadas por péptidos.

Ejemplo 3: purificación y caracterización del agente estimulante

Para descubrir qué subfracción de la proteína de patata LMW es responsable de la reducción del tiempo de latencia, se fraccionó un concentrado de proteína de patata, esencialmente según el procedimiento de Pouvreau (L. Pouvreau, H. Gruppen, SR Piersma, LAM van den Broek, GA van Koningsveld, AGJ Voragen J. Agric. Food Chem 2001, 49, págs 2864-2874 "Relative Abundance and Inhibitory Distribution of Protease Inhibitors in Potato Juice from cv. Elkana").

El concentrado de PPII (AVEBE) se diluyó con agua desmineralizada a una solución de proteína al 1 % y el pH se ajustó a 8,0. Los insolubles se eliminaron por centrifugación a 5000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se cargó en una columna de 15 por 2,6 cm que contenía resina Source 30Q (GE Healthcare) y se eluyó utilizando un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0,6 M. Esto dio como resultado 8 fracciones discretas de proteínas que se marcaron como F1 a F8.

Se puso a prueba la actividad estimulante de todas las fracciones según el procedimiento del ejemplo 1. Esto reveló que las fracciones F1 y F6 muestran una fuerte reducción del tiempo de latencia, lo que indica que el ingrediente activo está en estas fracciones. Las fracciones F2, F3, F4, F7 y F8 muestran menos reducción del tiempo de latencia según estos experimentos y F5 no muestra ninguna reducción del tiempo de latencia. De este modo, el ingrediente activo no está presente en F5. El hecho de que el agente estimulante se una a la columna en las condiciones experimentales revela que es soluble en agua a pH 8,0 y tiene un punto isoeléctrico de 8,0 o inferior.

Los pesos moleculares de las fracciones se determinaron en un sistema de electroforesis automatizado Experion (BioRad), según las instrucciones del fabricante en condiciones desnaturizantes y reductoras. Las fracciones F1 y F6 que contenían una fuerte actividad estimulante compartían varias bandas de MW, pero solo una de ellas está ausente en la fracción F5 que no contenía actividad estimulante alguna: una banda que se produce entre 17,5 y 18,2 kDa (tabla 4). De este modo, se deduce que la presencia de esta banda es indicativa de una fuerte actividad estimulante.

Tabla 3: inhibidor de la proteasa proteico de patata fraccionado en 8 fracciones F1-F8, y el efecto de reducción del tiempo de latencia de cada fracción.

Fracción	Actividad estimulante a dosis de 0,01 % (minutos)	Banda de proteína presente		
		9,5 KDa	17,5-18,2 KDa	30 KDa
F1	60	x	x	x
F2	5			
F3	20			
F4	5			
F5	0	x		x
F6	35	x	x	x
F7	5			
F8	15			

La determinación de la actividad inhibidora de la proteasa se realizó mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 4. Esto reveló que las fracciones proteicas F1 y F6 contenían actividad inhibidora de tripsina y quimotripsina (tanto TIA como CTIA), pero ninguna actividad sobrevivió a un tratamiento térmico a 80 °C durante 30 minutos.

Ejemplo 4: los inhibidores de la proteasa proteicos de patata para su utilización en la presente invención pueden ser nativos

Se preparó una solución madre de azocaseína (SigmaAldrich, A2765) de 30 g/l disolviendo la proteína en un tampón de citrato 100 mM a pH 5,0 que contenía 5 mM de CaCl₂ (SigmaAldrich, C3881) a 50 °C y enfriamiento de nuevo a 37 °C. Lisados fúngicos liofilizados, que contenían actividad de proteasa, se disolvieron en solución de HCl 1 mM. El PPII se disolvió en una solución de acetato de pH 3,0.

A partir de una solución PPII se preparó una serie de diluciones de tal manera que provocara un ~50 % de pérdida de señal tras la incubación para la concentración de muestra más elevada. De cada dilución, se mezclaron 125 μ l con 25 μ l de solución de proteasa fúngica en un recipiente eppendorf, o con 25 μ l de agua desmineralizada como control. Los controles positivos y negativos para la reacción proteolítica utilizaron 125 μ l de agua desmineralizada en lugar de material de muestra. A estas mezclas se añadieron 225 μ l de azocaseína caliente, seguido de una incubación de 30 minutos a 37,0 °C. La reacción se interrumpió posteriormente mediante la adición de 150 μ l de solución de ácido tricloroacético ("TCA (Trichloroacetic Acid, Acido Tricloroacético)") al 15 % p:v. El orden de adición de azocaseína fue el mismo que el orden de adición de TCA para garantizar tiempos de incubación iguales para todas las muestras.

La azocaseína no hidrolizada y otros insolubles se eliminaron por centrifugación a 15.000 g a 40 °C durante 10 minutos en un Heraeus Multifuge 1S-R utilizando un rotor Thermo Scientific. Se transfirieron 100 μ l de los sobrenadantes a una placa de microtitulación mediante pipeteo cuidadoso y se suplementaron con 100 μ l de solución de NaOH 1,5 M. Posteriormente, se analizó la absorbancia de la placa a 450 nm en un lector de microplacas BioRad Modelo 680.

Las absorbancias se representaron gráficamente frente a la cantidad de material de muestra en la placa. La pendiente de la línea resultante se obtuvo mediante regresión lineal utilizando el procedimiento de mínimos cuadrados e indica la cantidad de absorbancia perdida por cantidad de material de muestra. El control positivo, en ausencia de muestra, indica la absorbancia máxima causada por la cantidad conocida de solución de proteasa. De este modo, al dividir la pendiente por la absorbancia de los controles positivos, se obtuvo la actividad inhibidora de la tripsina expresada como la cantidad de proteasa inhibida por cantidad de material de muestra (ver la figura 2).

Se deduce que el PPII utilizado en los presentes experimentos puede ser nativo.

Ejemplo 5: fermentación de malta por *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de inhibidores de proteasa de patata

Se prepararon dos lotes de cerveza a partir de extracto de malta y levadura de panadería. Se eligió un extracto de malta extra claro para facilitar el análisis espectroscópico. Se añadieron 150 g/l de extracto de malta Arsegan Premium Quality (5010012, Munton (Reino Unido)) al agua corriente y se agitó hasta que se disolvió para formar un mosto.

Se añadieron 10 ml de cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763) durante toda la noche a 4 l de mosto precalentado a 30 °C. El mosto se dividió en dos fracciones de dos litros. Una se mantuvo como control, mientras que la otra se complementó con el 0,1 % en peso de inhibidores de la proteasa de patata (Solanic 306P, Avebe). La fermentación se controló para determinar la densidad celular (expresada como densidad óptica a 620 nm), la densidad del líquido medida por un hidrómetro y la producción de dióxido de carbono expresado como burbujas por minuto. Dado que la densidad del alcohol es menor que la del agua, la densidad de la solución es una medida del progreso de la reacción de fermentación. El volumen de CO₂ que se produce está directamente relacionado con la velocidad de producción de alcohol y, por lo tanto, proporciona una indicación de la velocidad de la reacción. Cuando las densidades celulares excedieron una OD₆₂₀ de 2, se diluyeron alícuotas con agua desmineralizada para permitir una medición adecuada. Los valores informados fueron corregidos para esta dilución.

Tabla 4: densidades celulares, densidades de solución y velocidades de producción de CO₂ para la fermentación del mosto por *S. cerevisiae* en ausencia y presencia del 0,1 % en peso de inhibidores de la proteasa de patata.

Horas de tiempo	Referencia			0,1 % de inhibidores de proteasa		
	Densidad de celda OD620	Densidad (g/l)	Producción de CO ₂ ml/minuto	Densidad de celda OD620	Densidad de referencia (g/l)	Producción de CO ₂ ml/minuto
0	1,502	1054	0,0	1,561	1054	0,0
8	1,801	1052	0,0	2,060	1052	0,0
24	13,96	1034	1,4	15,51	1030	1,7
32	16,33	1022	0,9	18,04	1020	2,0

5 La presencia de inhibidores de proteasa de patata dio como resultado densidades de celda más elevadas, una disminución más rápida en la densidad de la solución, y un aumento en la velocidad de producción de CO₂. El aroma de la cerveza que se preparó con inhibidores de la proteasa de patata se caracterizó por una clara nota afrutada, en contraste con la cerveza de referencia que carecía de este atributo.

10 A partir de estos resultados, puede verse que el proceso general de fermentación es más rápido, lo que está provocado por una disminución en el tiempo de latencia. La disminución del tiempo de latencia en estas condiciones es de, aproximadamente, 2 horas.

Ejemplo 6: fermentación de chucrut con inhibidores de la proteasa de patata

15 Una col blanca (comprada localmente) se ralló en rodajas finas utilizando un procesador de alimentos de cocina equipado con un disco rallador. Las rodajas de col obtenidas de este modo se trataron con 15 gramos de sal de mesa por kg de col. Este tratamiento hace que el líquido salga de las hojas mediante un aumento de la presión osmótica, formando de este modo un medio de fermentación. Este líquido se complementó con una cantidad igual de agua para facilitar la medición del pH. El medio de fermentación, que todavía contenía rodajas de col, se dividió en dos partes iguales, una se mantuvo tal cual, mientras que la otra se complementó con 1 g por litro de inhibidores de proteasa de patata (Solanic 206P, Avebe). Los dos lotes se incubaron uno al lado del otro, mientras que el pH se midió cada 15 minutos mediante registradores de pH calibrados. El tiempo requerido para alcanzar un pH de 4,0 desde un pH inicial de 6,0 se muestra en la tabla 5.

25 Tabla 5: tiempo requerido para reducir el pH de 6,0 a 4,0 por microorganismos endógenos con inhibidores de la proteasa de patata.

Lote	pH	Alcanzado después de (horas:minutos)
Referencia	6,0	0:00
Referencia	5,5	6:15
Referencia	5,0	12:00
Referencia	4,5	16:15
Referencia	4,0	34:30
PPI	6,0	0:00
PPI	5,5	6:45
PPI	5,0	12:00
PPI	4,5	15:45
PPI	4,0	27:30

30 La fermentación de chucrut es una serie compleja de reacciones, en la que crece un conjunto de microorganismos en secuencia, cada uno de los cuales prepara de ese modo el medio para la próxima especie. Dado que múltiples especies están involucradas en diferentes momentos, esta serie es difícil de describir en términos de tiempo de latencia. Sin embargo, la presencia de inhibidores de la proteasa de patata reduce el tiempo requerido para alcanzar un pH de 4,0 en 7 horas, o el 20 % del total.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para disminuir el tiempo de latencia en una fermentación de un medio de cultivo para preparar una sustancia objetivo, en la que la sustancia objetivo no es yogurt y en la que la fermentación da como resultado la formación de ácido o etanol, procedimiento que comprende las etapas de proporcionar, a un medio de cultivo adecuado, un cultivo iniciador de fermentación que comprende un microorganismo que libera ácido o etanol, añadir un inhibidor de la proteasa proteico de patata al medio de cultivo, cultivar el microorganismo y obtener la sustancia objetivo.
- 10 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la fermentación da como resultado la formación de etanol.
3. Procedimiento, según la reivindicación 2, en el que el cultivo iniciador de fermentación comprende un microorganismo del género de *Saccharomyces*, *Candida*, *Zygosaccharomyces*, *Dekkera* o *Brettanomyces*.
- 15 4. Procedimiento, según las reivindicaciones 2 o 3, en el que el medio de cultivo es un medio líquido que comprende material vegetal.
5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que la sustancia objetivo se selecciona entre el grupo que comprende cerveza, vino, champán, vino espumoso, sidra, hidromiel, whisky, sake o bioetanol.
- 20 6. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la fermentación da como resultado la formación de ácido.
7. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que el cultivo iniciador de fermentación comprende un microorganismo del género de *Acetobacter*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Kocuria*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Debaryomyces*, *Penicillium* o *Leuconostoc*.
- 25 8. Procedimiento, según la reivindicación 7, en el que la sustancia objetivo es un producto alimenticio seleccionado entre el grupo que comprende queso, crema fresca, crema agria, embutidos, chucrut, encurtidos o vinagre.
- 30 9. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que la sustancia objetivo es ácido láctico o ácido acético.
10. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cantidad de péptidos nutritivos libres limita el crecimiento del microorganismo.
- 35 11. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración de inhibidor de la proteasa proteico de patata está entre 5 g/l y 0,001 g/l.

Figura 1

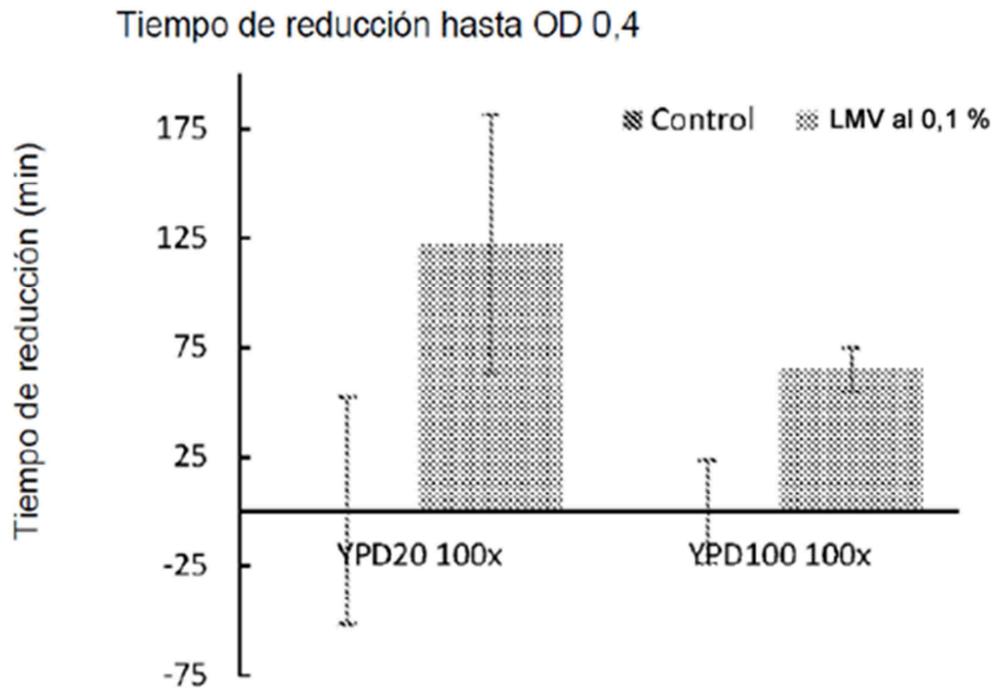


Figura 2

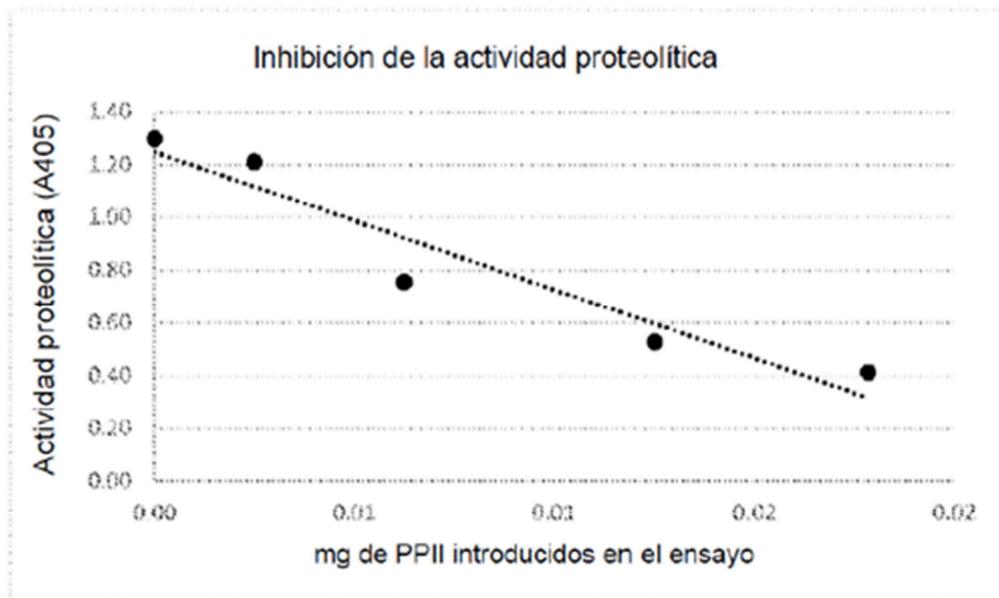
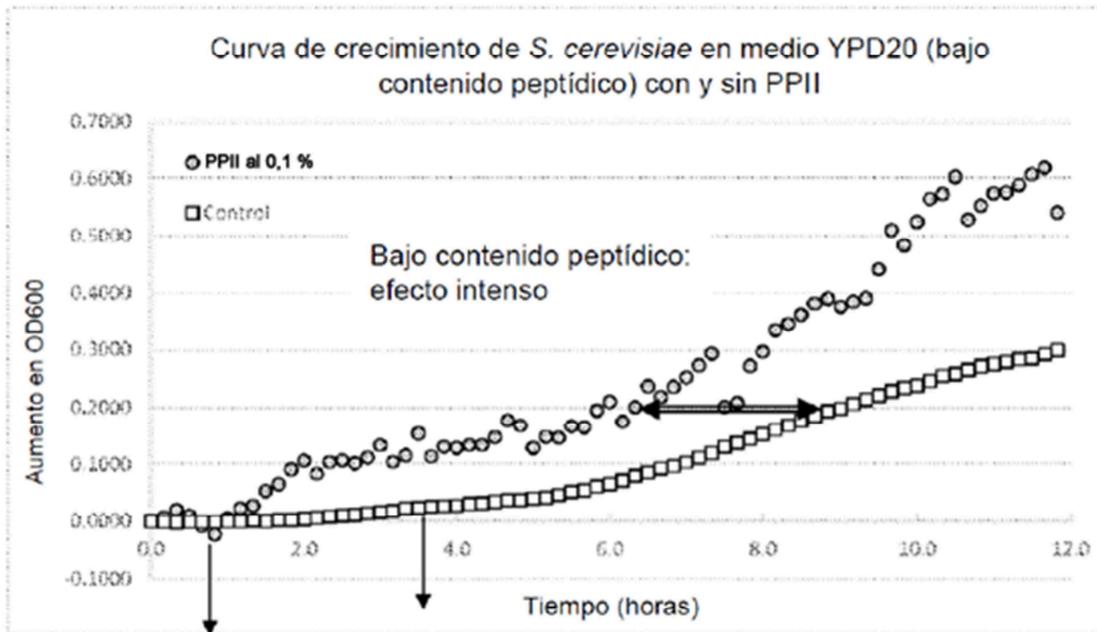
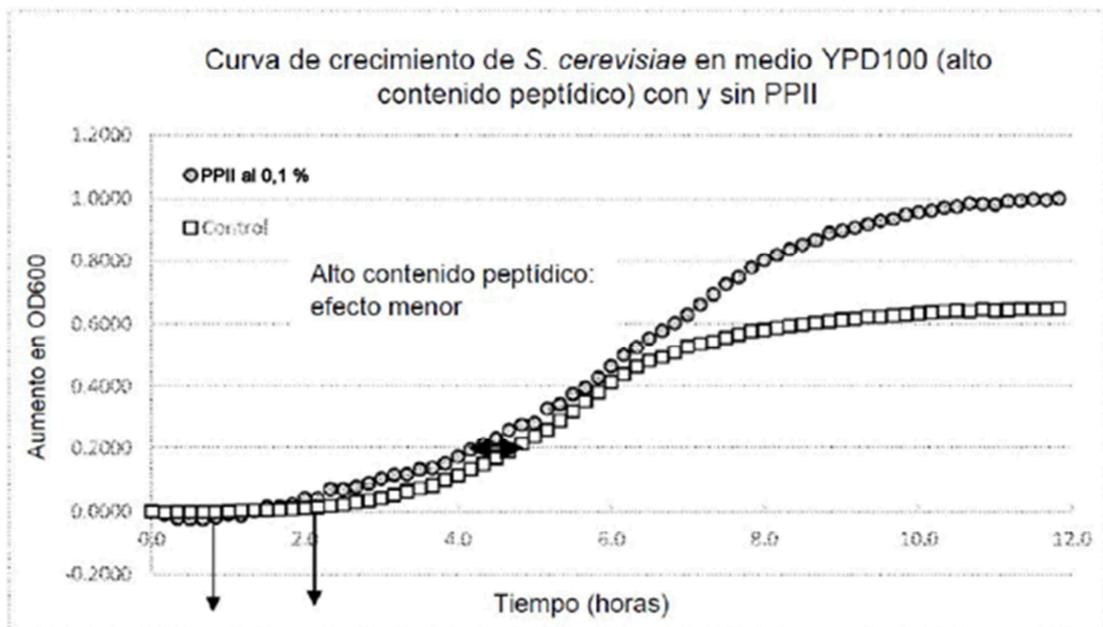


Figura 3a



Tiempo de latencia 0,5 h Tiempo de latencia 3,6 h

Figura 3b



Tiempo de latencia 0,6 h Tiempo de latencia 2,2 h

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 *Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.*

Documentos de patentes citados en la descripción

10

- WO 2009061186 A
- EP 2191731 A

- WO 2008069650 A
- EP 12175944 A

Literatura no patente citada en la descripción

- **POTS et al.** J. Sci. Food. Agric., 1999, vol. 79, 1557-1564
- **SPELBRINK et al.** Quantitative Determination Trypsin Inhibitory Activity in Complex Matrices. The Open Food Science Journal, 2011, vol. 5, 42-46

15

- **L. POUVREAU; H. GRUPPEN; SR PIERSMA; LAM VAN DEN BROEK; GA VAN KONINGSVELD; AGJ VORAGEN.** Relative Abundance and Inhibitory Distribution of Protease Inhibitors in Potato Juice from cv. Elkana. J. Agric. Food Chem, 2001, vol. 49, 2864-2874