

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038009**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.06.22

(21) Номер заявки
201890716

(22) Дата подачи заявки
2016.11.04

(51) Int. Cl. *C12C 5/00* (2006.01)
C12C 11/00 (2006.01)
C12G 1/06 (2006.01)
A23C 19/00 (2006.01)
A23C 23/00 (2006.01)
C12J 1/00 (2006.01)
A21D 2/08 (2006.01)
A61K 38/56 (2006.01)

(54) СПОСОБ СОКРАЩЕНИЯ ЛАТЕНТНОГО ПЕРИОДА ПРИ ФЕРМЕНТАЦИИ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ

(31) 15193462.7

(32) 2015.11.06

(33) EP

(43) 2018.11.30

(86) PCT/NL2016/050771

(87) WO 2017/078530 2017.05.11

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КООПЕРАТИ АВЕБЕ Ю.А. (NL)

(72) Изобретатель:
**Джузеппин Марко Луиджи Федерико,
Мозй Катарина Мария Антуанетта,
Спелбринк Робин Эрик Якобус (NL)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) WO-A1-2009061186
EP-A1-2191731

ROBIN E.J. SPELBRINK ET AL.:
"Quantitative Determination of Trypsin Inhibitory Activity in Complex Matrices", THE OPEN FOOD SCIENCE JOURNAL, vol. 5, no. 1, 18 November 2011 (2011-11-18), pages 42-46, XP055264941, ISSN: 1874-2564, DOI: 10.2174/1874256401105010042, the whole document
WO-A1-2014007621

AMBROZIAK Z. K. ET AL.: "THE USE OF POTATO PRODUCTS AS BREAD QUALITY IMPROVERS", ACTA ALIMENTARIA POLONICA, WARSZAW, PL, vol. 12, no. 2, 1 January 1986 (1986-01-01), pages 83-90, XP009099820, ISSN: 0137-1495, the whole document
WO-A1-2008069649
WO-A1-2015112034
US-A1-2006204567

(57) Изобретение относится к способу сокращения латентного периода при ферментации культуральной среды для получения биоэтанола или этанолсодержащего напитка, выбранного из вина, игристого вина, пива, виски, сидра, медового напитка или sake, при этом указанный способ включает добавление ферментирующей стартовой культуры, содержащей микроорганизмы из рода *Saccharomyces*, *Candida*, *Zygosaccharomyces*, *Dekkera* или *Brettanomyces* в жидкую культуральную среду, содержащую материал растительного происхождения; добавление в указанную культуральную среду белкового ингибитора протеаз картофеля и культивирование указанных микроорганизмов.

B1**038009****038009****B1**

Настоящее изобретение также относится к способу сокращения латентного периода при ферментации культуральной среды для получения молочной кислоты или уксусной кислоты, или пищевого продукта, содержащего молочную или уксусную кислоту, при этом указанный способ включает добавление стартовой культуры микроорганизмов из рода *Acetobacter*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Kocuria*, *Pediococcus*, *Debaryomyces*, *Penicillium* или *Leuconostoc* в культуральную среду; добавление в указанную культуральную среду белкового ингибитора протеаз картофеля и культивирование указанных микроорганизмов.

Изобретение относится к области ферментации. Ферментация представляет собой хорошо известный метод получения веществ с помощью метаболической активности микроорганизмов. Ферментация используется с древних времен для увеличения срока годности продуктов питания. Указанное увеличение срока годности может достигаться путем выбора микроорганизмов, которые питаются такими продуктами и вызывают выделение химических соединений, делающих окружающую среду менее привлекательной для других микроорганизмов. Используемое для этой цели ферментационное сырье, как правило, содержит углерод- или азотсодержащие соединения, а также другие питательные вещества, достаточные для жизнедеятельности и размножения микроорганизмов. Через определенное время после добавления микроорганизма (микроорганизмов) ферментационное сырье становится обогащенным соединениями, выделение которых обеспечивают указанные микроорганизмы. С этого момента указанное ферментационное сырье становится пищевым продуктом, таким как йогурт, сыр, вино, пиво или колбасное изделие.

Микроорганизмы, которые вызывают выделение спирта, используют для отпугивания других микроорганизмов и сохранения качества продуктов питания и/или для получения алкогольных напитков. Таким образом, происходит преобразование путем ферментации растительного материала, такого как зерно, рис или ягоды (среди которых важное значение имеет виноград), например, в пиво, виски, саке или вино. Хорошо известно использование для этой цели различных типов дрожжей, таких как, например, дрожжи из рода *Saccharomyces* или *Candida*.

Кроме того, процессы ферментации используются не для получения пищевого продукта как такового, а для выделения произведенного микроорганизмом соединения. В этом случае целевым продуктом является не преобразованное ферментационное сырье целиком, например, в виде пива, сыра или колбасного изделия, а соединение, выделение которого вызывает указанный микроорганизм. Для этой цели после процесса ферментации соединение должно быть выделено из смеси, содержащей также углерод- и азотсодержащие соединения, микроорганизмы и многие другие компоненты. Указанный способ эффективно применяется при производстве, например, биоэтанола, где растительный материал используют в качестве источника питания этанол-продуцирующих микроорганизмов, после чего полученный этанол выделяют из сырья. Типичные микроорганизмы, которые используются в этом процессе, представляют собой дрожжи, такие как дрожжи из рода *Saccharomyces*. Кроме того, хорошо известно использование для этой цели видов рода *Zygomonas* и *Schizosaccharomyces*.

Также хорошо известно использование микроорганизмов, вызывающих выделение кислоты, в питательной культуральной среде, содержащей молоко, с получением, например, сыра, который имеет более длительный срок хранения по сравнению с молоком. Аналогично, микроорганизмы, вызывающие выделение кислоты, позволяют увеличить срок хранения мяса или овощей путем получения, например, колбасных изделий, квашеной капусты или маринадов. Примерами хорошо известных микроорганизмов, вызывающих выделение кислоты, для использования в производстве пищевых продуктов являются микроорганизмы из рода *Aspergillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* и *Acetobacter*.

В типичном процессе ферментации можно выделить три фазы. Первая фаза начинается при объединении микроорганизмов с ферментационным сырьем. Микроорганизмы адаптируются к новой окружающей их среде и начинают потреблять питательные вещества, такие как пептиды, аминокислоты, витамины и минералы. Во время этой фазы микроорганизмы производят ферменты, необходимые для деления и роста клеток, для расходования энергии и создания запасных веществ, структурных единиц или питательных веществ для адаптации к новому окружению. Однако во время этой фазы практически не наблюдается роста микроорганизмов или какого-либо другого визуального признака динамики процесса ферментации. По этой причине указанная фаза называется латентной фазой.

Несмотря на кажущееся отсутствие динамики, латентная фаза имеет большое значение для процесса ферментации, поскольку во время указанной фазы микроорганизмы приспосабливаются к окружающей среде, что имеет важное значение для их жизнеспособности. Жизнеспособность популяции микроорганизмов определяет качество полученного продукта.

После адаптации микроорганизмов к окружающей среде начинается вторая фаза. Эта фаза характеризуется неограниченным количеством субстрата ростом и называется экспоненциальной фазой. Во время экспоненциальной фазы начинается рост микроорганизмов путем клеточного деления и, следовательно, их количество увеличивается экспоненциально. Во время этой фазы микроорганизмы в результате их метаболической активности обычно производят верхние сливные продукты, включая, например, кислоты и/или спирт.

В конце экспоненциальной фазы количество соответствующих питательных веществ часто умень-

шается, так что ферментационная смесь больше не может поддерживать экспоненциальный рост. Таким образом, рост замедляется и процесс ферментации переходит в стационарную фазу. Во время этой фазы уже не наблюдается экспоненциального роста, несмотря на то что деление клеток все еще происходит, и в ферментационной смеси медленно достигается равновесие между всеми присутствующими соединениями. Если все условия являются подходящими, это приводит к получению продукта высокого качества с хорошо сбалансированным вкусом и запахом или к получению смеси, сильно обогащенной интересующим соединением.

Время, необходимое для прохождения описанных этапов, сильно варьируется и зависит от типа используемого микроорганизма (микроорганизмов), типа ферментационного сырья, температуры и многих других параметров. В связи с наличием указанных различных фаз получение целевых веществ, включая пищевые продукты (за исключением йогурта) и химические соединения, такие как этанол, обычно представляет собой периодический процесс. Как правило, для периодических процессов важным фактором, влияющим на его стоимость, является время, необходимое для получения готового продукта.

Важным фактором, влияющим на время производства, является латентная фаза. На этом этапе происходит подготовка к реальному процессу ферментации. Помимо создания подходящих условий окружающей среды для роста микроорганизмов указанный этап не вносит никакого вклада в создание интересующего продукта, и как таковое сокращение латентного периода оказало бы огромное влияние на стоимость процессов ферментации. Однако эта фаза очень важна для обеспечения жизнеспособности популяции микроорганизмов, которая, в свою очередь, является важной для качества предполагаемого продукта. Время, необходимое для прохождения латентной фазы и достижения экспоненциальной фазы процесса ферментации называют латентным периодом.

Попытки сокращения латентного периода предпринимались ранее. Один из вариантов заключается в использовании процесса полунепрерывной ферментации, в котором микроорганизмы адаптированы к стадии продукции и остаются в экспоненциальной фазе в течение длительного времени. Такой вариант, однако, не подходит для многих процессов, поскольку стационарная фаза, которая обходится в таком полунепрерывном процессе, важна для определения конечного вкуса и/или качества продукта.

Кроме того, можно добавлять смесь микроорганизмов (называемую стартовой культурой), уже адаптированных к условиям среды ферментации. Такое добавление, однако, создает различные проблемы, поскольку на материале предварительно смешанных микроорганизмов в малом масштабе сложно повторить условия полномасштабного ферментера. Можно увеличивать объем предварительной культуры (инокулята), однако это оказывает большое влияние на производственный процесс и затраты на стадию предварительного культивирования. В связи с этим сокращение латентного времени, по возможности даже более существенное по сравнению с сокращением, достигаемым с помощью описанной технологии, с использованием надежного способа при ограниченном количестве стартовой культуры было бы предпочтительным.

Для сокращения латентного периода также можно добавлять в заранее приготовленную смесь дополнительные легко переносимые и энергетически выгодные питательные вещества, например, дополнительные пептиды. Однако это приводит к дополнительным затратам и проблемам, например, появлению постороннего привкуса и окраса.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к способу сокращения латентного периода при ферментации культуральной среды для получения целевого вещества, где указанное целевое вещество не является йогуртом и где указанная ферментация приводит к образованию кислоты или этанола, причем указанный способ включает этапы обеспечения подходящей культуральной среды стартовой культуры для ферментации, содержащей микроорганизм, который вызывает выделение кислоты или этанола; добавления в указанную культуральную среду белкового ингибитора протеаз картофеля; культивирования указанного микроорганизма и получения целевого вещества. Было обнаружено, что добавление белкового ингибитора протеаз картофеля к ферментационному сырью приводит к значительному снижению латентного периода процесса ферментации. Необходимое количество картофельного белка является достаточно низким для того, чтобы не влиять на вкус целевого вещества, а сокращение латентного периода происходит как в периодическом, так и в полунепрерывном процессе. Изобретение также относится к ферментированному пищевому продукту, не представляющему собой йогурт и содержащему белковый ингибитор протеаз картофеля.

Описание фигур

Фиг. 1: Сокращение времени достижения OD_{0,4} в ходе роста культуры *Saccharomyces cerevisiae* путем добавления 0,1% низкомолекулярных белков (LMW) в среду YPD20 и YPD100. Каждый столбик соответствует значениям, полученным по меньшей мере для 3 различных культур. Планки погрешности показывают стандартное отклонение.

Фиг. 2: Ингибирование трипсина белком PPI Solanic.

Фиг. 3а и 3б: Пример кривых роста *S. cerevisiae* при добавлении и без добавления 0,1% белкового ингибитора протеаз картофеля, показывающий сокращение латентного периода при добавлении белкового ингибитора протеаз картофеля. Латентный период определяли путем анализа графиков логарифмиче-

ских данных. Указанный анализ не показан на графиках. В ростовой среде с более высоким содержанием пептида эффект снижен.

Подробное описание

Настоящее изобретение относится к способу сокращения латентного периода при ферментации культуральной среды для получения целевого вещества, где указанное целевое вещество не представляет собой йогурт и где указанная ферментация приводит к образованию кислоты или этанола, при этом указанный способ включает стадии обеспечения к подходящей культуральной среде стартовой культуры для ферментации, содержащей микроорганизм, который вызывает выделение кислоты или этанола; добавления в культуральную среду белкового ингибитора протеаз картофеля; культивирования указанного микроорганизма и получения указанного целевого вещества. Было обнаружено, что добавление небольшого количества белкового ингибитора протеаз картофеля, такого как изолят протеазного ингибитора картофеля ("РПИ"), к ферментационному сырью значительно сокращает латентный период процесса ферментации, что обеспечивает экономические преимущества при производстве ферментированных продуктов. Необходимое количество белка картофеля является достаточно низким, чтобы не влиять на вкус целевого вещества, а сокращение латентного периода происходит как в периодических, так и в полунепрерывных процессах. Сокращение латентного периода в контексте настоящего изобретения можно также называть "стимулирующей активностью" (СА). Настоящее изобретение может применяться в широком диапазоне pH и температуры.

Способ согласно настоящему изобретению относится к способу сокращения латентного периода при ферментации культуральной среды для получения целевого вещества, где указанное целевое вещество не представляет собой йогурт. Необходимо понимать, что далее термин "пищевой продукт" или "целевое вещество" всегда исключает йогурт, независимо от того, указано это конкретно или нет.

Йогурт в контексте настоящего изобретения может быть определен как кислотный вязкий, но текучий молочный продукт белого цвета, полученный путем ферментации молока, такого как, например, коровье молоко, козье молоко, овечье молоко, молоко яка, кобылье молоко, оленьё молоко, лосяное молоко, молоко буйвола, молоко осла и/или молоко верблюда, предпочтительно, коровье молоко, которое было подвергнуто ферментации с использованием стартовой культуры, содержащей микроорганизмы, присутствующие в кефире, такие как молочнокислые бактерии и дрожжи, а также бактерии рода *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium breve*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, например, смеси *Lactococcus diacetylactis* и *Leuconostoc cremoris*. Вязкость йогурта в целом является результатом наличия экзополисахаридов, а не осаждения белков, как в случае других ферментированных молочных продуктов. Время и условия культивирования для получения йогурта из молока хорошо известны и зависят, в частности, от типа используемого микроорганизма и от типа йогурта. Существуют и другие виды ферментированных молочных продуктов, которые не представляют собой йогурт, такие как, например, сыр, сметана, крем-фреш, творог и ферментированная сыворожка.

Те компоненты в культуральной среде, которыми питаются микроорганизмы, представляют собой субстрат для ферментации. Они называются ферментационным сырьем, ферментационным бульоном или, в целом, культуральной средой. Культуральная среда в целом дополнительно содержит другие соединения, которые могут способствовать ферментации или переработке, включая соли. Культуральная среда в целом является водной. Культуральная среда может являться пищевым веществом, в этом случае субстрат содержится в указанной культуральной среде. Это относится, например, к ферментации пищевых продуктов, где культуральная среда может представлять собой, например, сливки или творог. Альтернативно, культуральная среда может представлять собой водную среду, в которую в качестве субстрата были добавлены различные компоненты. Такие компоненты могут включать источник азота, источник фосфора и источник углерода, используемые в качестве субстрата. Источник азота предпочтительно может содержать аммиак, нитратные соли, аминокислоты, пептиды и/или белок. Источником углерода предпочтительно является триглицерид или углевод, такой как сахар, сахарный спирт, крахмал и/или целлюлоза. Источником фосфора предпочтительно является неорганический моно-, пиро- или полифосфат, фосфоуглевод, фосфолипид или нуклеотид.

Согласно настоящему изобретению, целевое вещество может представлять собой общую полученную среду после ферментации культуральной среды. Это часто относится к случаям, когда целевое вещество представляет собой пищевой продукт. Альтернативно, целевое вещество может являться компонентом, который содержится в общей полученной среде после ферментации культуральной среды. В последнем случае целевое вещество предпочтительно затем выделяют из полученной среды. Это часто относится к тем случаям, когда целевое вещество представляет собой химическое соединение, такое как этанол или кислота.

Таким образом, настоящее изобретение относится к способу сокращения латентного периода при ферментации культуральной среды для получения целевого вещества, где указанное целевое вещество не представляет собой йогурт и где указанная ферментация приводит к образованию кислоты или этанола. Образование кислоты или этанола микроорганизмами известно в данной области техники, и способы

применения указанных процессов для получения целевого вещества путем ферментации хорошо известны.

Предпочтительно целевое вещество представляет собой пищевой продукт, более предпочтительно, пищевой продукт, полученный с помощью процесса ферментации, который приводит к образованию этанола. Альтернативно, изобретение относится к способам ферментации, которые приводят к образованию кислоты, предпочтительно молочной кислоты и/или уксусной кислоты. Согласно предпочтительным вариантам реализации изобретения такие способы ферментации приводят к получению пищевых продуктов, содержащих указанную кислоту. Согласно альтернативным вариантам реализации изобретения целевое вещество представляет собой кислоту, предпочтительно молочную кислоту или уксусную кислоту, в качестве целевого вещества.

Предпочтительно настоящее изобретение применяется в процессе ферментации, при котором рост микроорганизма ограничен количеством пептидов. Пептиды в рамках объема настоящего изобретения представляют собой небольшие фрагменты белка, состоящие из 5-30 аминокислот; такие фрагменты также называют "питательными пептидами". Такие пептиды встречаются в свободном виде в растворе, так что их можно также называть "свободными питательными пептидами".

Ограниченная количеством пептидов ферментация представляет собой ферментацию, при которой концентрация свободных питательных пептидов ограничена, при этом другие необходимые питательные вещества, такие как (следовые) минералы, углеводы и белки, свободно доступны. Таким образом, ферментация, ограниченная количеством пептидов, представляет собой ферментацию, в которой количество свободных питательных пептидов, присутствующих в ферментационном бульоне, ограничивает рост микроорганизма. Указанное ограничение количества пептидов происходит, когда скорость расщепления питательных пептидов протеазами/пептидазами до аминокислот превышает скорость образования питательных пептидов из белков. Можно проверить, является ли ферментация ограниченной количеством пептидов, путем наблюдения эффекта добавления небольших количеств пептидов на рост и латентный период. Когда добавление питательных пептидов не приводит к значительному ускорению ферментации, указанная ферментация не является ограниченной количеством пептидов. Когда добавление питательных пептидов приводит к ускорению ферментации, указанную ферментацию можно назвать ограниченной количеством пептидов.

Это означает, что скорость ферментации зависит от концентрации доступных питательных пептидов. В случае ферментации, ограниченной количеством пептидов, питательных пептидов недостаточно для поддержания или адаптации микроорганизма к экспоненциальному росту, что приводит к увеличению латентного периода.

В соответствии со способом согласно настоящему изобретению показано, что добавление относительно небольшого количества белкового ингибитора протеаз картофеля приводит к уменьшению латентного периода, в частности, в случае процессов ферментации, ограниченных количеством пептидов, и, в частности, при наличии достаточного количества белков.

Удивительно, что в способах, включающих, в частности, ферментацию, ограниченную количеством пептидов, наблюдается сокращение латентного периода. Хорошо известно, что важным фактором, определяющим латентный период ферментации, является расщепление белков в среде до малых питательных пептидов, состоящих из 5-30 аминокислот. Указанное расщепление осуществляется широким спектром протеаз. Хорошо известная функция протеазных ингибиторов заключается в ингибировании протеаз с эффективным ингибированием протеаз, отвечающих за расщепление белков до питательных пептидов. Таким образом, можно ожидать, что добавление ингибиторов протеазы из любого источника приведет к увеличению латентного периода из-за более медленного ферментативного расщепления белков и связанного с этим более медленного образования питательных пептидов. Однако согласно настоящему изобретению обнаружено, что на самом деле происходит обратное и добавление белковых ингибиторов протеаз картофеля приводит к уменьшению, а не увеличению латентного периода.

Латентный период в контексте настоящего изобретения определяется как продолжительность времени, необходимого для адаптации микроорганизма к новому окружению - культуральной среде. Это время представляет собой время, необходимое для латентной фазы.

За процессом ферментации можно следить с помощью различных способов с использованием показателей метаболической активности или показателей, позволяющих отслеживать образование биомассы. Например, продукция газа (такого как CO₂ или метан) может являться подходящим выходным параметром метаболизма в случае ферментации, связанной с образованием газа. Альтернативно, оптическая плотность (OD при длине волны 600 нм, OD₆₀₀) может обеспечивать подходящий выходной параметр для определения количества присутствующих микроорганизмов. Кроме того, плотность культуральной среды может быть подходящим показателем в тех случаях, когда плотность важного продукта ферментации, такого как, например, целевое вещество, отличается от плотности культуральной среды. Это относится, например, к процессам ферментации, которые приводят к образованию спирта. В случае ферментации, которая приводит к образованию кислоты, значение pH может обеспечивать подходящий выходной параметр. Опытный специалист в данной области техники может найти множество способов опреде-

ления прогрессирования процесса ферментации и определить время, необходимое для латентной фазы.

Выходные параметры процесса ферментации, такие как оптическая плотность, газообразование, плотность культуральной среды или pH, обычно имеют вид S-образной кривой, что хорошо известно в данной области техники. Согласно настоящему изобретению время достижения средней точки фазы экспоненциального роста определяют путем вычисления точки перегиба в сглаженной S-кривой из ее второй производной. Альтернативно, при использовании значения pH в качестве показателя динамики метаболической активности выводят значение pH для средней точки экспоненциальной кривой и регистрируют время до достижения этого значения pH. Сокращение латентного периода можно определить путем сравнения латентного периода ферментации без добавления белкового ингибитора протеаз картофеля с латентным периодом того же процесса ферментации с добавлением соответствующего количества белкового ингибитора протеаз картофеля. Абсолютное сокращение латентного периода в целом выражают как сокращение в часах, тогда как относительное сокращение латентного периода рассчитывают как "%".

Нативные картофельные белки можно условно разделить на три класса: (i) семейство пататина - высоко гомологичные кислые гликопротеины массой 43 кДа (40-50 мас.% картофельных белков), (ii) основные протеазные ингибиторы массой 5-25 кДа (белковые ингибиторы протеаз картофеля), которые после выделения называют изолятом ингибиторов протеаз картофеля или "РРП" (30-40 мас.% картофельных белков) и (iii) другие в основном высокомолекулярные белки (10-20 мас.% картофельных белков) (Pots et al., J. Sci. Food, Agric, 1999, 79, 1557, 1564).

РРП можно разделить на разные группы в зависимости от их молекулярной массы. Различные группы ингибиторов протеаз определяются как ингибиторы протеаз I (молекулярная масса около 39 кДа), ингибиторы карбоксипептидазы (молекулярная масса примерно 4100 Да), ингибиторы протеазы Па и Pb (молекулярная масса около 20,7 кДа) и ингибиторы протеаз А5 (молекулярная масса около 26 кДа). Соотношение этих различных групп протеазных ингибиторов в общем объеме картофельного белка зависит от сорта картофеля.

В рамках объема настоящего изобретения белковый ингибитор протеаз картофеля включает любой белковый ингибитор протеаз картофеля или любую смесь различных белков картофеля, которая содержит один или более белковых ингибиторов протеаз картофеля, или группу ингибиторов, как определено выше. Изолят ингибитора протеаз картофеля (РРП) представляет собой изолят, содержащий белковый ингибитор протеаз картофеля. Белковый ингибитор протеаз картофеля в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно является по существу нативным.

РРП можно получить с помощью любого известного способа, такого как, например, осаждение, абсорбция, тепловое разделение при температуре 60-80°C в течение не более получаса, мембранное разделение, осаждение сульфатом аммония или насыщенными жирными кислотами или другими компонентами, методы фильтрации, такие как ультрафильтрация или гель-фильтрация. Тепловое фракционирование приводит к получению нативного изолята ингибитора протеаз картофеля, поскольку тепловое воздействие приводит к денатурации большинства других белков, присутствующих в картофельном соке, при этом белковые ингибиторы протеаз картофеля относительно устойчивы к температуре, в связи с этим они выдерживают термическую обработку и могут быть выделены.

Предпочтительно РРП используется согласно настоящему изобретению. Указанный РРП можно предпочтительно получать, как описано в международной публикации WO 2008/069650, содержание которой включено в настоящую заявку посредством ссылки и которая приводит подробное описание способа выделения ингибиторов протеазы из фруктового сока картофеля (ФСК) или плодовой воды картофеля (ПВК).

За описанным процессом следует обработка фруктового сока картофеля посредством коагуляции катионами двухвалентного металла при pH 7-9 и центрифугирования коагулированного фруктового сока картофеля с получением, таким образом, супернатанта. Затем указанный супернатант подвергают адсорбционной хроматографии в расширяющемся слое, протекающей при значении pH менее 11 и температуре 5-35°C, с использованием адсорбента, способного связывать картофельные белки, с достижением, таким образом, адсорбции нативного картофельного белка к указанному адсорбенту. Материалы колонки, которые связывают определенное количество нативных картофельных белков, включают смешанные адсорбенты, такие как, например, Amersham Streamline™ Direct CST I (GE Healthcare), Fastline adorbentia (Upfront Chromatography A/S), макропористые адсорбенты и ионообменные адсорбенты. Альтернативно, для выделения РРП, подходящего для применения согласно настоящему изобретению, сильно предпочтительными являются адсорбенты, содержащие лиганды, такие как адсорбенты, описанные в заявке на Европейский патент 121759443.

Наконец, по меньшей мере один изолят нативного картофельного белка вымывают из адсорбента с помощью элюента. Указанный способ приводит, в частности, к получению выделенного РРП высокой степени чистоты, который является нативным с минимальным содержанием денатурированного белка и характеризуется стабильной растворимостью.

Количество белковых ингибиторов протеаз картофеля можно определить путем измерения ингибирования трипсина в соответствии со способом, описанным в источнике Spelbrink et al., The Open Food

Science Journal 2011 (5) p. 42-46 "Quantitative Determination Trypsin Ингибитору Активность in Complex Matrices" или ISO 14902: 2001E "Animal Feed Stuffs - Determination of soya products".

В качестве альтернативы использованию белкового ингибитора протеаз картофеля, такого как РРП, возможно использовать дополнительно очищенную фракцию белка, выделенную из РРП. Предпочтительная фракция белка растворима при pH 8, имеет $pK_a < 8$, обладает как трипсинингибирующей активностью (ТИА), так и химотрипсинингибирующей активностью (ХТИА), однако ни одно из указанных свойств не выдерживает термической обработки при 80°C в течение 30 мин. Тем не менее, способность сокращать латентный период сохраняется неизменной, по меньшей мере, до температуры 90°C, имеет молекулярную массу от 17,5 до 18,2 кДа.

ТИА определяют путем измерения ингибирующего действия белка в отношении трипсина в соответствии со способом, описанным в источнике Spelbrink et al., The Open Food Science Journal 2011 (5) p. 42-46 "Quantitative Determination Trypsin Ингибитору Активность in Complex Matrices" или ISO 14902: 2001E "Animal Feed Stuffs - Determination of soya products".

ХТИА определяют путем измерения ингибирующего действия белка в отношении химотрипсина. Используемый способ по существу совпадает со способом, описанным для измерения ТИА, однако требуются более высокие дозы фермента для компенсации более низкой специфичной активности химотрипсина.

Преимущество использования белковых ингибиторов протеаз картофеля состоит в том, что большинство из них очень устойчиво к высоким температурам. Активная фракция в изоляте белкового ингибитора протеаз картофеля, которая обеспечивает сокращение латентного периода, сохраняется в нативном состоянии до температуры 60°C, предпочтительно 70°C, более предпочтительно 80°C и наиболее предпочтительно 90°C, в течение периода времени, составляющего по меньшей мере 15 мин, предпочтительно по меньшей мере 90 мин. Указанное свойство позволяет добавлять белковый ингибитор протеаз картофеля в разные моменты процесса ферментации.

Белковый ингибитор протеаз картофеля можно добавлять в культуральную среду до, после или во время добавления стартовой культуры, также его можно добавлять не непосредственно в культуральную среду, а например, путем добавления к стартовой культуре или к другому компоненту, подлежащему добавлению в культуральную среду. Кроме того, указанный ингибитор можно добавлять к ферментационному сырью, которое позже станет культуральной средой или частью культуральной среды в процессах, где указанное ферментационное сырье нагревают до начала ферментации. Это относится, например, к способам, требующим пастеризации или стерилизации перед процессом ферментации, что характерно для многих процессов ферментации пищевых продуктов, как определено выше.

Еще одним преимуществом согласно настоящему изобретению является то, что белковый ингибитор протеаз картофеля обладает функциональной активностью в описанных процессах ферментации в очень низких концентрациях. В частности, для сокращения латентного периода достаточно добавления менее чем 1 г/л, предпочтительно менее чем 0,5 г/л, более предпочтительно менее чем 0,1 г/л, еще более предпочтительно менее чем 0,05 г/л, белкового ингибитора протеаз картофеля в процессах ферментации в соответствии с настоящим изобретением. Минимальное количество, которое требуется для сокращения латентного периода процессов ферментации в соответствии с настоящим изобретением, составляет по меньшей мере 0,01 г/л, предпочтительно 0,005 г/л, более предпочтительно 0,001 г/л белкового ингибитора протеаз картофеля.

Предпочтительная концентрация белкового ингибитора протеаз картофеля составляет, например, между 5 и 0,001 г/л, предпочтительно между 5 и 0,05 г/л, более предпочтительно между 5 и 0,01 г/л, например между 1 и 0,01 г/л. Концентрация белкового ингибитора протеаз картофеля в данном контексте выражается как граммы белкового ингибитора протеаз картофеля на литр культуральной среды.

В указанных концентрациях белковый ингибитор протеаз картофеля не придает привкус целевому веществу, что является дополнительным преимуществом, в частности, в тех случаях, когда целевое вещество является пищевым продуктом. Кроме того, такие низкие концентрации белкового ингибитора протеаз картофеля не оказывают заметного влияния на органолептические показатели целевого вещества.

Также преимуществом согласно настоящему изобретению является то, что белковый ингибитор протеаз картофеля является функционально активным в процессах ферментации в широком диапазоне pH. В частности, pH в культуральной среде может составлять до 6,7, предпочтительно 8,0, более предпочтительно до 10,0. Кроме того, значение pH может составлять не более 4, предпочтительно не более 3, более предпочтительно не более 2. Стабильность белкового ингибитора протеаз картофеля в широком диапазоне pH является предпочтительной, поскольку позволяет обрабатывать путем ферментации культуральные среды с различными pH. Кроме того, в случае процессов ферментации, при которых происходит выделение кислоты, указанная стабильность дает возможность извлекать пользу из добавления белкового ингибитора протеаз картофеля на протяжении всего процесса ферментации.

Кроме того, важным преимуществом настоящего изобретения является то, что белковый ингибитор протеаз картофеля не является аллергенным. Это означает, что его можно использовать в процессах

ферментации, которые осуществляют люди, страдающие аллергией на другие белки. Кроме того, это означает, что указанный ингибитор можно использовать в процессах ферментации, целевым веществом которых является пищевой продукт, где указанный пищевой продукт может потребляться людьми, страдающими аллергией, без риска аллергического шока.

Кроме того, преимущество белкового ингибитора протеаз картофеля заключается в том, что раствор этого белка, предпочтительно водный раствор, является прозрачным или, по меньшей мере, по существу не мутным, до концентрации, составляющей по меньшей мере 10 г/л, предпочтительно 50 г/л, более предпочтительно 250 г/л. Указанные концентрации предпочтительно достигаются при pH раствора, составляющем от 2 до 5, предпочтительно 2-4, более предпочтительно 2,5-3,5. Прозрачные или практически не мутные растворы белкового ингибитора протеаз картофеля делают удобной стерилизацию посредством фильтрования и обеспечивают привлекательный внешний вид целевого вещества, в частности, когда целевое вещество является пищевым продуктом.

Стартовая культура для ферментации в контексте настоящего изобретения представляет собой культуру, содержащую один или более микроорганизмов, как определено выше, и имеющую состав, подходящий для обеспечения определенного типа ферментации. Стартовая культура может содержать микроорганизм одного типа или два или более типов микроорганизмов.

Микроорганизмы, присутствующие в стартовой культуре для ферментации для получения целевого вещества путем ферментации, представляют собой микроорганизмы, которые вызывают выделение кислоты или этанола. Такие микроорганизмы хорошо известны. Как правило, микроорганизм выбирают из группы бактерий, дрожжей, грибов и водорослей, предпочтительно бактерий, дрожжей или грибов.

Например, подходящие бактерии могут принадлежать классу бактерий *Lactobacillales*, которые представляют собой грамположительные бактерии, включающие молочнокислые бактерии, включая род *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc* и *Pediococcus*, или классу бактерий *Bifidobacteriales*. Однако бактерии согласно настоящему изобретению не ограничиваются указанными примерами.

Подходящие грибы, например, которые относятся к группе дрожжей, представляют собой, например, дрожжи из класса *Saccharomycetales* и включают виды из родов *Saccharomyces*, *Brettanomyces*, *Kloeckera* и *Candida*. Однако дрожжи согласно настоящему изобретению не ограничиваются указанными примерами.

Предпочтительно дрожжи включают дрожжи из рода *Saccharomyces*, такие как *Saccharomyces cerevisiae*.

Другие грибы включают, например, виды из рода *Penicillium*, *Mortierella*, *Aspergillus*, *Fusarium* (например, *Fusarium venenatum*), *Rhizopus* и *Agaricus*. Однако грибы согласно настоящему изобретению не ограничиваются указанными примерами.

Как правило, подходящие микроорганизмы для применения в способе согласно настоящему изобретению выбирают из класса *Bacilli*, *Actinobacteria* или *Saccharomycetes*. Предпочтительно подходящие микроорганизмы выбирают из порядка *Lactobacillales*, *Bifidobacteriales* и класса *Saccharomycetales*, более предпочтительно, из рода *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium* и *Saccharomyces*.

Предпочтительными являются роды *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Amylomyces*, *Endomycopsis*, *Saccharomyces*, *Hansenula anomala*, *Lactobacillus* и *Acetobacter*.

Культуральная среда должна быть подходящей для интересующего типа ферментации, целевого вещества и типа микроорганизма. Таким образом, культуральная среда может быть жидкой или твердой, полутвердой, дисперсной или вязкой и должна содержать в качестве субстрата подходящие питательные вещества, такие как, например, белки и/или углеводы. Подходящие питательные вещества хорошо известны в данной области и могут представлять собой любой необходимый компонент для роста микроорганизмов, такой как белок, пептид, липиды, следовые соединения, следовые элементы, минералы и углеводы, такие как крахмал, полисахариды и сахара.

Культивирование микроорганизмов осуществляют при подходящих условиях культивирования. Условия культивирования в процессе ферментации могут быть такими, как условия, известные для ферментационных культур, подходящих для получения интересующего целевого вещества. Условия культивирования могут быть аэробными или анаэробными. В случае аэробных условий указанные условия могут включать слабую, регулярную или сильную аэрацию. Культивирование может быть твердофазным или жидкофазным и может осуществляться в любом масштабе с помощью периодических или полунепрерывных способов обработки.

Температура во время ферментации может изменяться от -10 до + 60°C, предпочтительно от 13 до 45°C. Предпочтительно температура остается постоянной. Значение pH может изменяться от 2 до 10, предпочтительно от 4 до 6,7. Время культивирования сильно варьирует и зависит от типа культуры и, в частности, от целевого вещества. Опытному специалисту в данной области техники хорошо известно подходящие время культивирования для получения конкретных целевых веществ. Таким образом, время культивирования может варьировать от 0,5 ч до 10 лет или более.

Содержание кислорода может варьировать от его отсутствия (анаэробная ферментация) до его при-

сутствия (аэробная ферментация). Обработка может как сопровождаться перемешиванием, так и быть статичной.

Добавление белкового ингибитора протеаз картофеля можно осуществлять в любое время до начала ферментации. Указанный ингибитор можно добавлять путем объединения белкового ингибитора протеаз картофеля с культуральной средой в виде отфильтрованного или пастеризованного концентрированного белкового раствора и последующего добавления стартовой культуры или, альтернативно, путем объединения стартовой культуры с нативным картофельным белком и объединения полученной смеси с культуральной средой. Альтернативно, все компоненты можно добавлять по отдельности или в комбинации с другими компонентами культуральной среды в зависимости от условий. Такие дополнительные компоненты культуральной среды могут включать, например, углеводы, следовые элементы, объемные минералы, белки или пептиды.

Согласно гораздо более предпочтительному варианту реализации изобретения белковый ингибитор протеаз картофеля можно добавлять в культуральную среду до стадии нагревания. Такой вариант является выгодным, когда культуральная среда поддается нагреванию, например, для пастеризации или стерилизации, до добавления стартовой культуры. Благодаря выгодной термостабильности белкового ингибитора протеаз картофеля он сохраняется в нативном состоянии даже после такого нагревания, таким образом, что сохраняется его естественная биохимическая функция, а латентный период ферментации сокращается даже после нагревания.

Добавление белкового ингибитора протеаз картофеля, предпочтительно в нативном виде приводит к сокращению латентного периода ферментации. Латентный период значительно сокращается в зависимости от культуры и среды, например, по меньшей мере на 10%, предпочтительно по меньшей мере на 25%, более предпочтительно по меньшей мере на 50%, более предпочтительно по меньшей мере на 60%, и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 90%, по сравнению с тем же способом ферментации без добавления белкового ингибитора протеаз картофеля.

Получение (или "сбор") целевого вещества можно осуществлять любым способом, известным в данной области техники для выделения целевых веществ после ферментации. В частности, целый пищевой продукт можно получать путем сбора культуральной среды. Указанный целый пищевой продукт можно соответствующим образом подвергать одной или нескольким последующим обработкам. Альтернативно, целевое вещество можно выделять из ферментационной культуры, например, путем перегонки, фильтрации, экстракции или других способов, известных в данной области техники, и необязательно дополнительно очищать с помощью любых известных способов. Таким образом, можно получать целевое вещество с достаточной степенью чистоты.

Способы ферментации, приводящие к образованию этанола

Согласно одному варианту реализации изобретения ферментация приводит к образованию этанола (спирта). Если способ ферментации приводит к образованию этанола, целевым веществом предпочтительно является вино или игристое вино, пиво, виски, сидр, медовый напиток, sake или биоэтанол. Предпочтительными целевыми веществами являются вино, пиво и биоэтанол, наиболее предпочтительно пиво. Согласно другим предпочтительным вариантам реализации изобретения предпочтительным целевым веществом является пищевой продукт.

Согласно указанному варианту реализации изобретения, предпочтительный микроорганизм относится к роду *Saccharomyce*, *Candida*, *Zygosaccharomyces*, *Dekkera* или *Brettanomyces*, предпочтительно *Saccharomyces*. Используемые типы ферментации и микроорганизмы, приводящие к образованию этанола, общеизвестны.

Согласно указанному варианту реализации изобретения предпочтительная культуральная среда содержит в качестве субстрата растительный материал, такой как зерно пищевого качества, рис, бобовые, мед или фрукты (предпочтительно ягоды, более предпочтительно, виноград), предпочтительно зерно или ягоды для процессов ферментации, которые приводят к образованию продуктов питания на основе этанола. Согласно многим предпочтительным вариантам реализации изобретения культуральная среда, содержащая растительный материал, представляет собой жидкую среду.

Ферментация, приводящая к образованию этанола, в целом достигается следующим образом. Ферментация включает в себя обеспечение стартовой культуры для ферментации, содержащей один или более микроорганизмов из рода *Saccharomyce*, *Candida*, *Zygosaccharomyces*, *Dekkera* или *Brettanomyces* в культуральной среде, содержащей растительный материал, предпочтительно зерно пищевого качества, рис, фасоль, мед или фрукты, где указанный растительный материал содержит углеводы. Культуральную среду объединяют с ингибитором протеаз картофельных белков для сокращения латентного периода и указанные микроорганизмы культивируют в культуральной среде для получения пищевого продукта.

Согласно варианту реализации изобретения, в котором ферментация в основном направлена на получение этанола, указанная ферментация предпочтительно является анаэробной. Это относится, например, к ферментации зерна, риса, бобов, меда или фруктов с получением пива, виски, sake, медового напитка, вина или биоэтанола.

Если целевым веществом является вино или игристое вино (включая шампанское), подходящие стартовые культуры включают *Saccharomyces*. В этом случае подходящая питательная среда содержит в

качестве субстрата ягоды или сок ягод, предпочтительно виноградный сок или другие фруктовые соки. Плоды можно измельчать, прессовать или вымачивать для получения сока, который служит в качестве культуральной среды. Необязательно сок можно подвергать ферментативной обработке для повышения содержания свободного сахара или удаления нежелательных материалов.

Если целевое вещество представляет собой пиво, подходящие стартовые культуры включают дрожжи рода *Saccharomyces*, такие как *Saccharomyces carlsbergensis* или *Saccharomyces pastorianus*. В этом случае подходящая культуральная среда в качестве субстрата содержит сусло или другие обогащенные углеводами зерновые экстракты. Сусло готовят из зерен путем затирания для превращения сложных углеводов в сахара. Предпочтительно зерна содержат ячмень в качестве источника ферментов. Необязательно можно добавлять экзогенные углеводпревращающие ферменты. В сусло можно добавлять хмель и/или другие травы и специи.

Если целевое вещество представляет собой виски, подходящие стартовые культуры содержат дрожжи *Saccharomyces*. В этом случае подходящая культуральная среда содержит в качестве субстрата сусло или другие обогащенные углеводами зерновые экстракты. Подходящая обработка после ферментации включает, например, дистилляцию.

Если целевое вещество представляет собой сидр, подходящие стартовые культуры содержат дрожжи *Saccharomyces*. В этом случае подходящая питательная среда содержит в качестве субстрата яблоки или яблочный сок.

Если целевое вещество представляет собой медовый напиток, подходящие стартовые культуры содержат дрожжи *Saccharomyces*. В этом случае подходящая питательная среда содержит в качестве субстрата мед.

Если целевое вещество представляет собой саке, подходящие стартовые культуры содержат грибы рода *Aspergillus*, предпочтительно *Aspergillus oryzae* и *Saccharomyces*. В этом случае подходящая питательная среда содержит в качестве субстрата рис.

Если целевое вещество представляет собой биоэтанол, культуральная среда предпочтительно содержит в качестве субстрата источник азота, источник фосфора и источник углерода. Источник азота предпочтительно может включать аммиак, нитратные соли, аминокислоты, пептиды и/или белок. Источником углерода предпочтительно является триглицерид или углевод, такой как сахар, сахарный спирт, крахмал и/или целлюлоза. Источником фосфора предпочтительно является неорганический моно-, пиро- или полифосфат, фосфоуглевод, фосфолипид или нуклеотид.

В случае этанола, который, например, может использоваться в качестве биотоплива (биоэтанол), подходящими микроорганизмами являются *Saccharomyces*, *Zymomonas* и *Schizosaccharomyces*. Культуральная среда в этом случае предпочтительно содержит в качестве субстрата растительный материал любого типа, такой как, например, кукурузные стебли, пшеничная солома, сахарный тростник, картофель, маниока и кукуруза.

Этанол можно выделять после ферментации культуральной среды из общей полученной среды путем дистилляции или обратного осмоса, мембранной фильтрации или концентрирования вымораживанием, предпочтительно путем дистилляции. Предпочтительно этанол дополнительно очищают с помощью известных способов для получения по возможности максимально чистого этанола.

Процессы ферментации, приводящие к образованию кислоты

Согласно другому варианту реализации изобретения ферментация приводит к образованию кислоты. Предпочтительные кислоты включают молочную кислоту и уксусную кислоту. Если способ ферментации приводит к образованию кислоты, целевым веществом предпочтительно является сыр, крем-фреш, сметана, колбасное изделие, квашеная капуста, маринады или уксус. Согласно предпочтительным вариантам реализации изобретения целевое вещество процесса ферментации, приводящего к образованию кислоты, представляет собой пищевой продукт. Согласно альтернативным непищевым вариантам реализации целевое вещество представляет собой кислоту, предпочтительно молочную кислоту или уксусную кислоту, в качестве химических соединений. Согласно указанному варианту реализации кислоту предпочтительно выделяют после ферментации.

Если целевое вещество представляет собой сыр, подходящие стартовые культуры содержат различные смеси молочнокислых бактерий, которые являются коммерчески доступными. Примером может служить смесь бактерий *Lactococcus lactis* и *Lactococcus cremoris*. Другими примерами являются бактерии из рода *Lactobacillus*, *Streptococcus* или *Propionibacter*.

В указанном случае подходящая культуральная среда содержит в качестве субстрата различные типы молочных продуктов, таких как сливки, творог или молочная сыворотка, например молочные продукты, полученные из коровьего молока, козьего молока, овечьего молока, молока яка, кобыльего молока, оленьего молока, молока лося, молока буйвола, молока осла и/или молока верблюда, предпочтительно, коровьего молока, или, альтернативно, соевого молока и/или миндального молока, и/или другие богатые белками растительные экстракты.

Если целевое вещество представляет собой крем-фреш, культура предпочтительно содержит бактерии *Lactococcus* и/или *Lactobacillus*, предпочтительно *Lactococcus lactis* подвида *lactis*, *Lactococcus lactis* подвида *cremoris* и/или *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*. Альтернативно, можно использовать эндо-

генные ферменты сливок. Подходящая культуральная среда содержит сливки и предпочтительно состоит из сливок. Сливки в этом случае представляют собой молочный продукт, как определено выше, предпочтительно полученный из коровьего молока.

Если целевое вещество представляет собой сметану, культура содержит виды *Lactococcus* или *Lactobacillus*, в то время как культуральная среда содержит сливки в качестве субстрата и, предпочтительно, состоит из сливок. Сливки в этом случае представляют собой молочный продукт, как определено выше, предпочтительно, полученный из коровьего молока.

Если целевое вещество представляет собой колбасное изделие, подходящие стартовые культуры содержат бактерии рода *Lactobacillus* (например, *Lb plantarum*, *Lb sakei*, *Lb farmicis*, *Lbcurvatus*), *Micrococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* (*S. xylosus* и *S. carnosus*), *Kocuria*, *Leuconostoc* и *Pediococcus* (например, *P. acidilacti* и *P. pentosaceus*) или дрожжи, такие как, например, виды рода *Debaryomyces*. Виды плесени, вовлеченные в созревание и используемые для инокуляции, включают *Penicillium camembertii*, *P. roquefortii* и *P. nalgiovense* и могут быть получены, например, из компании Chr. Hansen (*Bactoferm*TM). В этом случае подходящая питательная среда содержит в качестве субстрата (измельченное) мясо, предпочтительно (измельченную) говядину, оленину, конину, мясо буйвола, свинину, мясо птицы или рыбу, соль и необязательно сахар, ГДЛ (глюконо-дельта-лактон), лимонную кислоту, чеснок и травы и специи.

Если целевое вещество представляет собой квашеную капусту, подходящие стартовые культуры содержат *Leuconostoc*, *Lactobacillus* и *Pediococcus*. В этом случае подходящая питательная среда содержит измельченную капусту, соль и необязательно тмин, семена сельдерея и укропа или другие травы и специи.

Если целевое вещество представляет собой маринады, подходящие стартовые культуры содержат *Lactobacillus* и/или *Lactococcus*. В этом случае подходящая питательная среда содержит куски овощей, а также их ломтики или овощи целиком. Подходящие виды овощей включают капусту, свеклу, огурцы, оливки и бобы.

Если целевое вещество представляет собой уксус, подходящие стартовые культуры содержат виды рода *Acetobacter*. В этом случае подходящая питательная среда содержит вино, сидр или медовый напиток.

Пищевые продукты в качестве целевого вещества

В способах ферментации согласно изобретению ферментация приводит к образованию кислоты или этанола. В случае, если целевое вещество является пищевым продуктом, культуральная среда предпочтительно содержит только компоненты пищевого качества. Кроме того, если целевое вещество является пищевым продуктом, культуральная среда предпочтительно содержит в качестве субстрата источник азота, источник фосфора и источник углерода, где указанные источники предпочтительно предоставляются молочными продуктами, мясом, овощами и/или алкогольным напитком пищевого качества.

В случае, если целевое вещество является пищевым продуктом, пищевой продукт обычно получают в виде общей смеси после ферментации. Однако нельзя исключать пищевые продукты, которые подлежат выделению из ферментационной смеси, включая квашеную капусту, маринады, уксус, виски, коньяк и другие дистиллированные алкогольные напитки.

В случае, если целевое вещество является пищевым продуктом, стартовая культура может содержать один микроорганизм или два или более различных микроорганизмов, использование которых известно для получения конкретного пищевого продукта. Специалисту в данной области техники хорошо известны стартовые культуры, содержащие различные микроорганизмы, которые при добавлении к культуральной среде соответствующего состава приводят к получению заранее определенного пищевого продукта.

Необязательно пищевой продукт может подвергаться последующей обработке после ферментации, такой как добавление вспомогательных веществ, красителей, усилителей вкуса или других ингредиентов или такой как дополнительная термическая обработка, например выпечка, дистилляция, стерилизация или пастеризация, или подходящая подгонка по размеру, включая резку и/или формование, и соответствующая оптимизация вязкости.

Изобретение в равной степени относится к ферментированному пищевому продукту, как определено выше, где указанный пищевой продукт не представляет собой йогурт и содержит белковый ингибитор протеаз картофеля. Белковый ингибитор протеаз картофеля согласно указанному варианту может быть нативным или денатурированным. Особо предпочтительными пищевыми продуктами являются вино, пиво, тесто, хлеб, сидр, медовый напиток, сыр, сметана, крем-фреш, колбасное изделие, квашеная капуста или маринады, предпочтительно вино, пиво, тесто, сидр, медовый напиток, сыр, сметана, колбасное изделие, квашеная капуста или маринады, более предпочтительно, сыр, тесто, сметана, крем-фреш, колбасное изделие или квашеная капуста.

Для ясности и краткости описания в настоящей заявке признаки описаны как часть одного или отдельных вариантов реализации. Однако следует понимать, что объем изобретения может включать варианты реализации, включающие комбинации всех или некоторых из описанных признаков.

Изобретение далее проиллюстрировано следующими неограничивающими примерами.

Пример 1. Сокращение латентного периода в общей модели ферментации

Была создана общая модель ферментации, на которой был проведен анализ сокращения латентного периода путем добавления РПП для различных микроорганизмов. Эта модель включала две разные среды: MRS-Bouillon (MRSB - коммерчески доступная стандартная среда) и так называемую среду MRSC, которая представляет собой среду практически с такими же ингредиентами, как MRSB, но вместо пептидов казеина в указанную среду добавляют казеинат (С). Пептиды в среде MRSB в целом состоят из 5-30 аминокислот. В зависимости от потребностей микроорганизмов среда MRSB может представлять собой ограниченную или не ограниченную количеством пептидов систему. Исследуемые стартовые культуры включали культуры, содержащие один штамм микроорганизмов (культуры ATCC), или культуры, содержащие более чем один тип микроорганизмов.

Среду MRSB получали путем растворения следующих компонентов в 850 мл деминерализованной воды и доведения pH до 6,5: 10 г казеинового пептона ("CP") в виде триптического гидролизата (Fluka 70172), 10 г мясного экстракта (Fluka 70164), 5 г дрожжевого экстракта ("YE", Fluka 92144), 20 г глюкозы (Merck 1,08342), 1 г Tween-80 (Merck 822187), 2 г K_2HPO_4 (Merck 1,05104), 5 г ацетата натрия (Merck 1,06267), 2 г $(NH_4)_2$ -цитрата (SigmaAldrich 09833), 0,2 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (SigmaAldrich M5921), 0,05 г $MnSO_4 \cdot H_2O$ (SigmaAldrich M7634).

В среде MRSC казеиновый пептон заменяли на 10 г казеината (Fonterra 385). После растворения компонентов общий объем доводили до 1000 мл, подводили pH и полученную жидкость стерилизовали путем автоклавирования.

В среде MRSC часть (питательных) пептидов заменяли на полноразмерный белок в виде казеината, чтобы продемонстрировать, что ингибирующая протеазы активность РПП не приводит к ингибированию протеаз, необходимых микроорганизмам для способности расщеплять казеинат с получением питательных пептидов. При ингибировании ингибитором РПП протеаз микроорганизмов можно ожидать удлинения латентного периода. Протеазы микроорганизмов в основном связаны с мембраной, и пептиды, полученные на этой стадии, переносятся непосредственно в клетку микроорганизмов. В связи с этим ожидалось, что пептидазы в указанной среде не имеют такого большого значения, как в среде MRSB. Ожидалось, что среда MRSC является менее ограниченной количеством пептида системой, чем среда MRSB.

Для некоторых культур в качестве альтернативы MRSB использовали среду YPD. YPD получали путем растворения 20 г казеинового пептона ("CP") в виде триптического гидролизата (Fluka 70172), 10 г дрожжевого экстракта ("YE", Fluka 92144), 20 г глюкозы (Merck 1,08342) в общем объеме 1 л и полученную жидкость стерилизовали путем автоклавирования.

Культуры, содержащие один штамм (культуры ATCC) исследовали в среде MRSB и MRSC или YPD. См. табл.1 для обзора всех исследуемых культур ATCC. В табл. 2 представлен обзор исследованных культур в среде MRSB, MRSC и YPD и наблюдаемое сокращение времени.

Культуры выращивали из разбавленных стационарных культур, культивированных в течение ночи, в общем объеме 100 мкл при температуре 30°C в запечатанном пленкой титрационном микропланшете, который помещали в считыватель для планшетов ThermoScientific MultiSkan Go при периодическом перемешивании в течение 10 с каждую минуту. За ростом следили путем регистрации поглощения при 600 нм, а сокращение латентного периода определяли путем сравнения роста в культуральной среде с добавлением или без добавления белкового ингибитора протеаз картофеля.

Таблица 1. Различные стартовые культуры для ферментации

Описание культуры	Код ATCC ®	Продукт
<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

Во всех исследуемых культурах наблюдалось сокращение латентного периода при добавлении РПП в среду MRSB или YPD. Оптимальная дозировка в большинстве случаев составляла 0,50 мас.% белка РПП в конечной концентрации, однако явный эффект проявлялся уже при очень низких дозах, составляющих 0,05 или даже 0,01% белка РПП в конечной композиции. В указанных экспериментах в среде MRSC не наблюдалось удлинения времени ферментации. Эти данные подтверждает гипотезу о том, что РПП не ингибирует протеазы микроорганизмов. Предполагается, однако, что сокращение латентного периода может также происходить в системах, не ограниченных количеством пептидов. В среде MRSB во

всех культурах наблюдалось сокращение латентного периода при добавлении РРП.

В табл. 2 также показано достигнутое сокращение времени в часах (ч) и в процентах (%).

Таблица 2. Сокращение латентного периода при добавлении белкового ингибитора протеаз картофеля к различным стартовым культурам для ферментации

Тип культуры	Название	Среда	Образованная кислота	Потенциальные продукты	OD600	Время отсчета (ч:мин)	Оптимальная концентрация РРП (%)	Время добавления РРП (ч:мин)	Сокращение времени, ч (% %)
Культуры ATCC	<i>Lactibacillus casei</i>	MRSB	Молочная кислота	Сыр, оливки	OD600max	8:00	0,50%	3:45	4:15 (*53%)
Культуры ATCC	<i>Lactibacillus fermentum</i>	MRSB	Молочная кислота	Хлеб из теста на закваске	OD600nm 0,5	max16:55	0,50%	max8:15	max8:40 (*~50%)
Культуры ATCC	<i>Lactibacillus rhamnosus</i>	MRSB	Молочная кислота	Сыр	OD600max	2:45	0,50%	0:15	2:30 (*91%)
Культуры ATCC	<i>Lactibacillus sakei</i>	MRSB	Молочная кислота	Мясо, сосиски	OD600nm 0,5	19:45	0,50%	0:45	19:00 (*96%)
Культуры ATCC	<i>Lactococcus lactis</i>	MRSB	Молочная кислота	Сыр	OD600nm 2,00	19:45	0,05%	7:45	12:00 (*61%)
Культуры ATCC	<i>Acetobacter aceti</i>	MRSB	Уксусная кислота	Уксус	Максимальное увеличение наклона кривой	11:15	0,50%	1:15	10:00 (*89%)
Культуры ATCC	<i>Lactibacillus casei</i>	MRSC	Молочная кислота	Сыр, оливки	OD600nm 1,00	17:45	0,50%	6:38	11:07 (*62%)
Культуры ATCC	<i>Lactibacillus fermentum</i>	MRSC	Молочная кислота	Хлеб из теста на закваске	OD600nm 1,20	13:54	0,50%	8:49	5:04 (*36%)
Культуры ATCC	<i>Lactibacillus rhamnosus</i>	MRSC	Молочная кислота	Сыр	OD600nm 1,50	7:23	0,50%	5:49	1:34 (*20%)
Культуры ATCC	<i>Lactibacillus sakei</i>	MRSC	Молочная кислота	Мясо, колбасные изделия	NA	>19:45	NA	>19:45	NA
Культуры ATCC	<i>Lactococcus lactis</i>	MRSC	Молочная кислота	Сыр	OD600nm 1,40	12:55	0,50%	11:48	1:08 (*8%)
Культуры ATCC	<i>Acetobacter aceti</i>	MRSC	Уксусная кислота	Уксус	Максимальное увеличение наклона кривой	8:26	0,50%	1:38	7:48 (*90%)
Обычные пекарские дрожжи	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MRSB	Этанол	Вино, пиво	OD600max	4:00	0,50%	2:00	2 (*50%)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MRSC	Этанол	Вино, пиво	OD600max	4:00	0,50%	2:00	2 (*50%)

NA = не поддается анализу путем преципитации

Приведенные данные подтверждают идею о том, что РРП оказывает стимулирующее действие на рост микроорганизмов, сокращая латентное время путем ингибирования пептидазной активности микроорганизмов. Для всех ограниченных количеством пептида систем (среда MRSB и YPD) было показано значительное сокращение времени. Для более обогащенной среды MRSC был показан более слабый стимулирующий эффект. Все описанные эксперименты на средах MRSB и MRSC выполнялись в нескольких повторностях (n>4).

Пример 2. Определение того, является ли ферментационная система ограниченной количеством пептидов

Рост *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763) анализировали в средах с двумя различными концентрациями пептидов (YPD100, содержащей 10 г дрожжевого экстракта (YE), 20 г казеинового пептона (CP) и 20 г глюкозы на литр, и YPD20, содержащей 2 г YE, 4 г CP и 20 г глюкозы на литр) для оценки того, является ли стимулирующая активность низкомолекулярных белков (LMW) более сильной при наличии меньшего количества пептидов, указывая на то, что рост ограничен количеством пептидов. Культуры выращивали из разбавленных стационарных культур, культивированных в течение ночи, при температуре 30°C в общем объеме 100 мкл в запечатанном пленкой титрационном микропланшете, который помещали в считыватель для планшетов ThermoScientific MultiSkan Go при периодическом перемешивании в течение 10 с каждую минуту. Рост оценивали путем измерения OD600, а сокращение времени до достижения OD 0,4 являлось показателем стимулирующей активности LMW. Действительно, стимулирующий эффект добавления 0,1% LMW к среде наблюдался для роста *S. cerevisiae*, и этот эффект проявлялся больше в среде с меньшим количеством пептидов.

На фиг. 1 представлен график сокращения времени до достижения OD0,4 по сравнению с культурами без LMW. Сокращение времени на ~2 ч (приблизительно с 9 до 7 ч) наблюдалось при добавлении 0,1% LMW к среде с низким содержанием пептидов, тогда как в присутствии большего количества пептидов (YPD100) указанный эффект проявляется в меньшей степени (сокращение приблизительно на 1 ч, с 5 до 4 ч). Измеренные значения сокращения времени являются значимыми, как определено с помощью t-критерия Стьюдента (p<0,05). В приложении показан пример кривой роста для каждого условия. Таким образом, LMW оказывают стимулирующее влияние на рост *S. cerevisiae* в среде YPD, и этот эффект яв-

ляется наиболее сильным в ограниченных количеством пептидов условиях.

Пример 3. Очистка и характеристика стимулирующего агента

Чтобы выяснить, какая субфракция низкомолекулярных (LMW) картофельных белков отвечает за сокращение латентного периода, концентрат белка картофеля фракционировали по существу в соответствии с методом Поуво (L. Pouvreau, H. Gruppen, SR Piersma, LAM van den Broek, GA van Koningsveld, AGJ Voragen J. Agric. Food Chem 2001, 49, стр. 2864-2874 "Relative Abundance and Inhibitory Distribution of Protease Inhibitors in Potato Juice from cv. Elkana").

Концентрат РПИ (AVEBE) разбавляли деминерализованной водой до получения 1%-ного белкового раствора и устанавливали pH 8,0. Нерастворимые вещества удаляли посредством центрифугирования при 5000 g в течение 10 мин при температуре окружающей среды. Супернатант наносили на колонку размером 15×2,6 см, содержащую смолу Source 30Q (GE Healthcare), и элюировали с использованием линейного градиента NaCl (0-0,6 M). В результате было получено 8 отдельных белковых фракций, которые были обозначены как F1-F8.

Исследовали стимулирующую активность всех фракций в соответствии со способом, описанным в примере 1. Результаты показали, что фракции F1 и F6 вызывают сильное сокращение латентного периода, указывая на то, что активный ингредиент находится в этих фракциях. Для фракций F2, F3, F4, F7 и F8 наблюдалось менее выраженное сокращение латентного периода в соответствии с указанными экспериментами, а для фракции F5 не было показано сокращения латентного периода. Следовательно, активный ингредиент отсутствует в F5. Тот факт, что стимулирующий агент связывается с колонкой в условиях эксперимента, указывает на то, что указанный агент является водорастворимым при pH 8,0 и имеет изоэлектрическую точку 8,0 или ниже.

Молекулярные массы фракций определяли с помощью автоматизированной системы для электрофореза Experion (BioRad) в соответствии с инструкциями производителя в денатурирующих восстанавливающих условиях. Фракции F1 и F6, обладающие сильной стимулирующей активностью, имеют несколько общих MW-полос, но только одна из них отсутствует во фракции F5, совсем не обладающей стимулирующей активностью: полоса, находящаяся между 17,5 до 18,2 кДа (табл. 4). Таким образом, наличие этой полосы является показателем сильной стимулирующей активности.

Таблица 3. Белковый ингибитор протеаз картофеля, фракционированный на 8 фракций F1-F8, и эффект, приводящий к сокращению латентного периода, для каждой фракции

Фракция	Стимулирующая активность при дозе 0,01% (минуты)	Присутствие белковой полосы		
		9,5 кДа	17,5-18,2 кДа	30 кДа
F1	60	x	x	x
F2	5			
F3	20			
F4	5			
F5	0	x		x
F6	35	x	x	x
F7	5			
F8	15			

Определение ингибирующей протеазы активности проводили в соответствии с методом, описанным в примере 4. В результате было показано, что белковые фракции F1 и F6 обладают ингибирующей активностью в отношении как трипсина, так и химотрипсина (как ТИА, так и ХТИА), однако ни одно из этих свойств не сохраняется при термической обработке при 80°C в течение 30 мин.

Пример 4. Белковые ингибиторы протеаз картофеля для использования согласно настоящему изобретению могут быть нативными

Стоковый раствор азоказеина (SigmaAldrich, A2765) в концентрации 30 г/л получали путем растворения белка в 100 mM цитратном буфере, pH 5,0, содержащем 5 mM CaCl₂ (SigmaAldrich, C3881), при температуре 50°C и обратного охлаждения до 37°C. Лиофилизированные грибковые лизаты, обладающие протеолитической активностью, растворяли в 1 mM растворе HCl. РПИ растворяли в растворе ацетата 3,0.

Из раствора РПИ готовили серию разведений таким образом, чтобы при максимальной концентрации образца происходила потеря сигнала на 50% при инкубации. 125 мкл из каждого разведения смешивали с 25 мкл раствора грибковой протеазы или с 25 мкл деминерализованной воды (в качестве контроля) в эппендорфе. В качестве положительного и отрицательного контроля в протеолитической реакции использовали 125 мкл деминерализованной воды вместо материала образца. К полученным смесям добавляли 225 мкл теплого азоказеина с последующей инкубацией в течение 30 мин при 37,0°C. Реакцию затем гасили путем добавления 150 мкл 15%-ного (масса/объем) раствора трихлоруксусной кислоты ("ТХУ"). Порядок добавления азоказеина совпадал с порядком добавления ТХУ для обеспечения одинакового времени инкубации для всех образцов.

Негидролизированный азоказеин и другие нерастворимые вещества удаляли посредством центрифугирования при 15000 g при температуре 40°C в течение 10 мин на центрифуге Heraeus Multifuge 1S-R с использованием ротора Thermo Scientific. По 100 мкл супернатантов переносили в титрационный микро-

планшет при тщательном пипетировании и добавляли по 100 мкл 1,5 М раствора NaOH. Затем поглощение при 450 нм в планшете анализировали на считывателе для микропланшетов BioRad Model 680.

Значения поглощения наносили на график в зависимости от количества материала образца в планшете. Наклон результирующей линии был определен с помощью линейной регрессии с использованием метода наименьших квадратов и показывал количественное снижение поглощения на количество материала образца. Положительный контроль в отсутствие образца показывал максимальное поглощение, вызванное известным количеством раствора протеазы. Следовательно, путем деления значения наклона на поглощение для положительного контроля получали ингибирующую трипсин активность, выраженную в виде количества ингибированной протеазы на количество материала образца (см. фиг. 2).

Из указанных данных следует, что РПИ, используемый в экспериментах согласно настоящему изобретению, может являться нативным.

Пример 5. Ферментация солода с помощью *Saccharomyces cerevisiae* в присутствии протеазных ингибиторов картофеля

Две порции пива готовили на основе солодового экстракта и пекарских дрожжей. Для облегчения спектроскопического анализа был выбран экстракт солода с максимально светлой окраской. 150 г/л экстракта солода высшего сорта Arsepan (5010012, Munton, Великобритания) добавляли в водопроводную воду и перемешивали до растворения с получением сусла.

10 мл культуры *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763), культивированной в течение ночи, добавляли к 4 л сусла, предварительно нагретого до 30°C. Сусло разделяли на две фракции по два литра. Одну фракцию сохраняли в качестве контроля, в то время как к другой добавляли 0,1 мас.% протеазных ингибиторов картофеля (Solanic 306P, Avebe). В процессе ферментации следили за плотностью клеток (выраженной как оптическая плотность при 620 нм), плотностью жидкости, измеряемой с помощью гидрометра, и продукцией диоксида углерода, измеряемой как образование пузырьков в минуту. Поскольку плотность спирта меньше плотности воды, плотность раствора является показателем прогрессирования реакции ферментации. Объем произведенного CO₂ напрямую зависит от скорости продукции спирта и, следовательно, указывает на скорость реакции. Когда плотность клеток превышала OD620, равную 2, аликвоты разбавляли деминерализованной водой для обеспечения надлежащего измерения. Зарегистрированные значения были скорректированы для указанного разведения.

Таблица 4. Плотность клеток, плотность растворов и скорость образования CO₂ для процесса ферментации сусла с помощью *S. cerevisiae* в отсутствие и в присутствии 0,1 мас.% протеазных ингибиторов картофеля

Время, ч	Референсный образец			0,1 масс.% ингибиторов протеаз		
	Плотность клеток, OD620	Плотность раствора, г/л	Продукция CO ₂ , мл/мин	Плотность клеток, OD620	Плотность раствора, г/л	Продукция CO ₂ , мл/мин
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

Присутствие протеазных ингибиторов картофеля приводило к более высокой плотности клеток, более быстрому снижению плотности раствора и увеличению скорости образования CO₂. Запах пива, полученного в присутствии протеазных ингибиторов картофеля, характеризовался четкой фруктовой ноткой, в отличие от референсного образца пива, который был лишен этого качества.

Из полученных результатов видно, что общий процесс ферментации происходил быстрее, что обусловлено сокращением латентного периода. Сокращение латентного периода в этих условиях составляло приблизительно 2 ч.

Пример 6. Ферментация квашеной капусты с протеазными ингибиторами картофеля

Белокачанную капусту (приобретенную локально) измельчали на тонкие ломтики с помощью кухонного комбайна, снабженного теркой. Полученные таким образом ломтики обрабатывали 15 г поваренной соли на кг капусты. Такая обработка вызывает вытяжку жидкости из листьев за счет повышения осмотического давления, с образованием, таким образом, ферментационной среды. К полученной жидкости добавляли такое же количество воды для облегчения измерения pH. Ферментационную среду, все еще содержащую ломтики капусты, разделяли на две равные части, одну из которых хранили в исходном виде, в то время как к другой добавляли ингибиторы картофельных протеаз в концентрации 1 г на литр (Solanic 206P, Avebe). Две порции инкубировали параллельно, при этом значение pH измеряли каждые 15 мин с помощью откалиброванных pH-регистраторов. Время, необходимое для достижения pH 4,0, от исходного значения pH, составляющего 6,0, приведено в табл. 5.

Таблица 5. Время, необходимое для снижения pH с 6,0 до 4,0 с помощью эндогенных микроорганизмов в присутствии протеазных ингибиторов картофеля

Порция	pH	Время достижения
		(часы: минуты)
Референсный образец	6,0	0:00
Референсный образец	5,5	6:15
Референсный образец	5,0	12:00
Референсный образец	4,5	16:15
Референсный образец	4,0	34:30
РР1	6,0	0:00
РР1	5,5	6:45
РР1	5,0	12:00
РР1	4,5	15:45
РР1	4,0	27:30

Процесс ферментации квашеной капусты представляет собой сложную серию реакций, которые сопровождаются последовательным ростом нескольких видов микроорганизмов, каждый из которых, таким образом, подготавливает среду для следующего вида. Поскольку несколько видов задействовано в разное время, такую серию реакций трудно описать в контексте латентного периода. Тем не менее, присутствие протеазных ингибиторов картофеля сокращает время, необходимое для достижения pH, равного 4,0, на 7 ч, или 20% от общего времени.

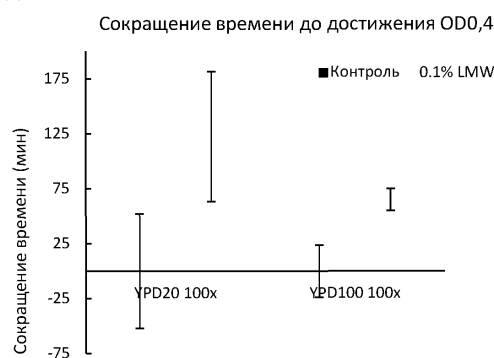
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ сокращения латентного периода при ферментации культуральной среды для получения биоэтанола или этанолсодержащего напитка, выбранного из вина, игристого вина, пива, виски, сидра, медового напитка или саке, при этом указанный способ включает добавление ферментирующей стартовой культуры, содержащей микроорганизмы из рода *Saccharomyces*, *Candida*, *Zygosaccharomyces*, *Dekkera* или *Brettanomyces* в жидкую культуральную среду, содержащую материал растительного происхождения; добавление в указанную культуральную среду белкового ингибитора протеаз картофеля и культивирование указанных микроорганизмов с получением биоэтанола или этанолсодержащего напитка, выбранного из вина, игристого вина, пива, виски, сидра, медового напитка или саке.

2. Способ сокращения латентного периода при ферментации культуральной среды для получения молочной кислоты или уксусной кислоты, или пищевого продукта, содержащего молочную или уксусную кислоту, при этом указанный способ включает добавление стартовой культуры микроорганизмов из рода *Acetobacter*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Kocuria*, *Pediococcus*, *Debaryomyces*, *Penicillium* или *Leuconostoc* в культуральную среду; добавление в указанную культуральную среду белкового ингибитора протеаз картофеля и культивирование указанных микроорганизмов с получением молочной кислоты или уксусной кислоты, или пищевого продукта, содержащего молочную или уксусную кислоту.

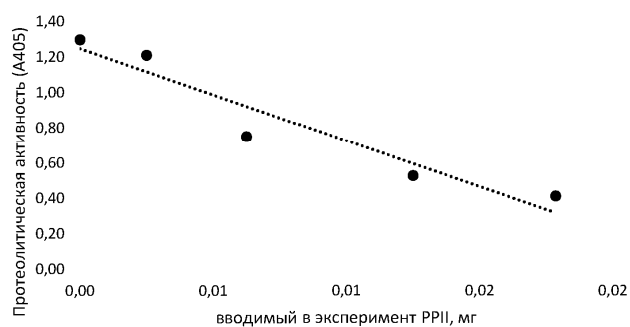
3. Способ по п.2, отличающийся тем, что пищевой продукт выбран из группы, состоящей из сыра, крем-фреша, сметаны, колбасного изделия, квашеной капусты, маринадов или уксуса.

4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что концентрация белкового ингибитора протеаз картофеля составляет от 0,001 до 5 г/л.

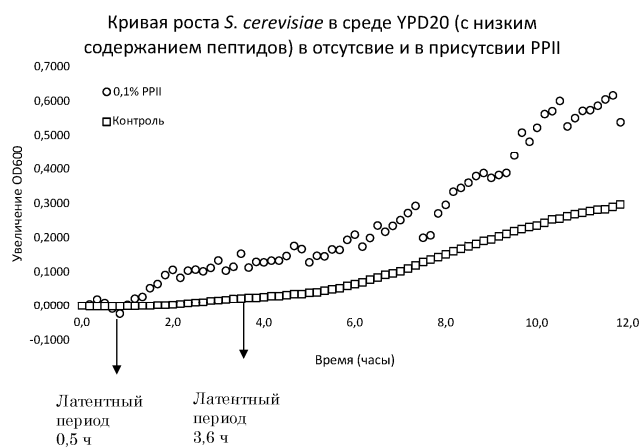


Фиг. 1

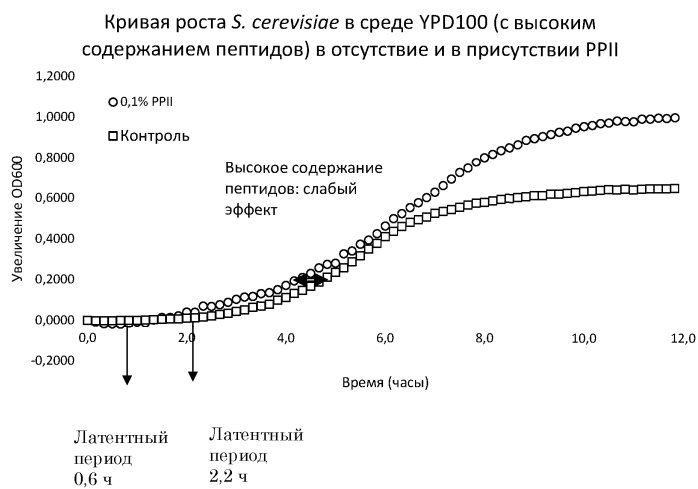
Ингибирование протеолитической активности



Фиг. 2



Фиг. 3а



Фиг. 3б

