

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 801 978**

51 Int. Cl.:

A23L 2/38	(2006.01)
A23B 7/155	(2006.01)
A23L 19/00	(2006.01)
A23B 7/10	(2006.01)
A23L 2/42	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.12.2011 PCT/EP2011/072126**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.06.2012 WO12076621**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2011 E 11802325 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 2648530**

54 Título: **Fermentos de frutas que contienen propionato y uso de los mismos**

30 Prioridad:
07.12.2010 EP 10194044

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.01.2021

73 Titular/es:
**PURAC BIOCHEM B.V. (100.0%)
Arkelsedijk 46
4206 AC Gorinchem, NL**

72 Inventor/es:
**SLIEKERS, ARNE OLAV y
HEINTZ, EELCO ANTHONIUS JOHANNES**

74 Agente/Representante:
GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 801 978 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

Fermentos de frutas que contienen propionato y uso de los mismos

La presente invención se refiere a productos fermentados a base de frutas que contienen propionato y usos de los mismos.

5 Las levaduras y las bacterias del ácido acético son los microorganismos más comunes que participan en la fermentación espontánea de las frutas, convirtiendo los carbohidratos en alcohol y/o ácido acético. Además, estos organismos pueden actuar como organismos de deterioro de los productos basados en fruta, como los zumos. Por otro lado, las Propionibacterias están involucradas en la fermentación de productos lácteos, más comúnmente quesos, convirtiéndolos en carbohidratos y el ácido láctico en ácido propiónico principalmente, pero también algo de ácido acético, dióxido de carbono y ácido succínico. El ácido propiónico inhibe especialmente las levaduras y los mohos, pero también otras bacterias.

10 Babuchowski y otros (Lait (1999), 79, 113-124) revelan el uso de Propionibacterias para producir vegetales fermentados. El contenido de ácido propiónico del zumo de remolacha roja fermentado con *Propionibacterium freudenreichii* y *Propionibacterium thoenii*, respectivamente, alcanzó un valor de 1,56% y 2,18%, respectivamente, después de 14 días de fermentación. Ese período de fermentación es demasiado prolongado para aplicación industrial (altos costos y alto riesgo de contaminación). Cuando la fermentación se realizó con propionibacterias y bacterias de ácido láctico juntas, el contenido de ácido propiónico del zumo de remolacha roja fermentado alcanzó un valor máximo de sólo 0,12% después de 1 día de fermentación, mientras que la fermentación prolongada de 10 a 14 días dio lugar a un menor contenido de ácido propiónico (alrededor del 0,04%).

20 El documento EP 2 227 965 A1 (Purac Biochem B.V.) describe un procedimiento para mejorar las propiedades sensoriales y la resistencia de los productos alimenticios y bebidas - especialmente los productos cárnicos no curados - a diversos tipos de microorganismos y en particular al deterioro de los alimentos y a las bacterias de intoxicación alimentaria. En el procedimiento divulgado, un producto entra en contacto con una composición que comprende sales metálicas alcalinas que tienen: como aniones, propionato y un co-anión seleccionado de lactato, acetato y sus combinaciones; y, como cationes, potasio e hidrógeno, en el que la proporción en peso de lactato a propionato está en el intervalo de 0 a 20 y la proporción en peso de acetato a propionato está en el intervalo de 0,05 a 3,5.

30 La patente estadounidense N° 5.096.718 (Ayres et al.) describe un material metabolito obtenible a partir de propionibacterias cultivadas en un medio líquido, cuyo material incluye un metabolito de peso molecular superior a 300 y se añade a un producto alimenticio para inhibir el crecimiento de bacterias psicotrópicas gram negativas, levadura, moho, bacterias gram positivas o Listeria. El material del metabolito puede contener menos del 0,02% de ácido propiónico, de modo que no hay suficiente ácido propiónico *per se* para inhibir el crecimiento microbiano.

35 El documento WO 2004/001022 A1 (University of Newcastle Research Associates et al.) se refiere a cepas de *Propionibacterium* probiótico y su uso en la preparación de suplementos y alimentos probióticos. Específicamente, la cita se refiere al suministro de vitamina B12, ácido propiónico, folacina y bacteriocinas por parte de las cepas probióticas, que las propias bacterias probióticas pueden utilizar en los seres humanos o en otros animales. Al menos en algunas aplicaciones, las bacterias pueden utilizarse muertas y/o pueden utilizarse partes de células, en lugar de células enteras.

40 Ahora se ha comprobado sorprendentemente que cuando las preparaciones líquidas de frutas, como zumos, extractos, purés, se fermentan a propósito con miembros del género *Propionibacterium*, se puede obtener un fermento con un alto contenido de propionato, incluso sin la adición de nutrientes adicionales, cuando la fermentación se realiza durante un período de 1 a 4 días. El fermento inhibe las levaduras y los mohos cuando se aplica, por ejemplo, en productos a base de fruta, pero, ventajosamente, apenas influye en el sabor y el aroma del producto a base de fruta, incluso cuando se aplica en una alta concentración.

45 Así, en un primer aspecto la presente invención revela un procedimiento de preparación de un fermento de fruta que contiene ácido propiónico y/o una sal del mismo que comprende:

- i) obtener una preparación líquida de fruta con un nivel de azúcar de 1,5 a 10% (p/p) y un pH inicial de 4,5 a 7;
- ii) fermentar la preparación líquida de fruta con una cepa bacteriana productora de ácido propiónico, manteniendo el pH entre 4,5 y 7 mediante la adición de una base seleccionada de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de magnesio, hidróxido de calcio, hidróxido de amonio, carbonato de calcio y carbonato de amonio; y
- iii) opcionalmente, el procesamiento posterior del producto de la fermentación, para obtener el fermento de la fruta,

en el que la fruta que se utiliza en dicho procedimiento no incluye frutos secos ni granos de cereal y en el que la cepa bacteriana productora de ácido propiónico utilizada en dicha fermentación se complementa con una o más cepas de bacterias productoras de ácido láctico.

5 Una fruta para su uso en los procedimientos y fermentos de frutas descritos aquí es de estructura comestible, carnosa y asociada a la semilla de ciertas plantas. Dicha estructura carnosa tiene típicamente un contenido natural de agua de al menos 65 % (p/p), incluso de al menos 70 % (p/p) o al menos 75 % (p/p). Tales frutas incluyen frutas dulces como manzanas, peras, naranjas, pomelos, uvas, fresas, melones, plátanos, piñas, maracuyás, melocotones, mangos, guayabas, frutas no dulces como limones, aguacates y frutas similares a las verduras como tomates, pepinos, pimientos, calabazas. Una fruta preferida para su uso en el procedimiento de este aspecto es una fruta dulce y/o un
10 tomate. Una fruta especialmente preferida es la manzana, la pera, la naranja, la uva, la piña, el melón o el tomate, o cualquier mezcla de las mismas. Las frutas para su uso en los procedimientos y fermentos de fruta como se describen aquí no incluyen frutos secos ni granos de cereales.

La fruta elegida se procesa para obtener una preparación líquida de fruta. Las preparaciones líquidas de fruta adecuadas son, por ejemplo, un zumo, un extracto o un puré (fruta triturada). El procesamiento de la fruta se hace
15 usando técnicas comúnmente conocidas por los expertos en la materia. La preparación líquida de fruta puede obtenerse a partir de un concentrado. Se puede utilizar un solo tipo de fruta o una mezcla de dos o más tipos de fruta.

La preparación líquida de fruta puede complementarse opcionalmente con agua y/o con componentes adicionales necesarios para apoyar y/o mejorar la fermentación bacteriana. Este suplemento puede hacerse antes y/o durante la fermentación.

20 La dilución de la preparación líquida de fruta con agua puede hacerse adecuadamente para obtener un nivel de azúcar adecuado para la cepa bacteriana utilizada en la fermentación y para acelerar ventajosamente el proceso de fermentación. Un nivel de azúcar adecuado de la preparación líquida de fruta es de 1,5 a 10% (p/p).

La preparación líquida de fruta, opcionalmente diluida, puede además complementarse con componentes adicionales necesarios para apoyar y/o mejorar la fermentación bacteriana. Por ejemplo, los componentes adicionales pueden ser
25 una fuente adicional de carbono como glucosa o sacarosa, una fuente adicional de nitrógeno como extracto de levadura y/o minerales y/o vitaminas adicionales. Es ventajoso que la cantidad de componentes adicionales en general sea baja, de modo que las propiedades sensoriales del fermento resultante no se vean afectadas negativamente. Se prefiere no complementar en absoluto la preparación líquida de la fruta.

La fermentación se realiza utilizando una cepa bacteriana productora de ácido propiónico. Las cepas bacterianas productoras de ácido propiónico preferidas son las cepas del género *Propionibacterium*. Las especies adecuadas incluyen *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium shermanii*, *Propionibacterium acidi-propionici*, *Propionibacterium thoenii* y/o *Propionibacterium jensenii*. Ejemplos de otras especies de bacterias productoras de ácido propiónico son *Clostridium propionicum*, *Selenomonas ruminantum* y/o *Bacteroides ruminicola* y/o especies del género *Veillonella*. Las especies de *Propionibacterium* preferidas son *Propionibacterium freudenreichii*,
30 *Propionibacterium shermanii* y/o *Propionibacterium acidi-propionici*. Se puede utilizar una sola cepa o una mezcla de dos o más cepas o especies.

La fermentación con una cepa bacteriana productora de ácido propiónico se complementa con una o más cepas de bacterias productoras de ácido láctico. Las cepas bacterianas productoras de ácido láctico adecuadas se encuentran dentro de las bacterias de ácido láctico pertenecientes al orden *Lactobacillales* o dentro de las especies de *Bacillus* moderadamente termófilas. Ejemplos de bacterias productoras de ácido láctico son *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis* y/o *Lactococcus plantarum*. Ejemplos de especies de *Bacillus* moderadamente termófilas son el *Bacillus coagulans*, el *Bacillus smithii* y/o el *Bacillus thermoamylovorans*. Las especies de *Bacillus* moderadamente termófilas se definen como especies de *Bacillus* que son capaces de crecer a temperaturas entre 30-65 °C.
40

Las bacterias productoras de ácido láctico se utilizan ventajosamente para convertir los azúcares de la preparación líquida de fruta en ácido láctico, ácido propiónico que es particularmente adecuado como fuente de carbono para la cepa bacteriana productora de ácido propiónico. Complementar la fermentación con una o más cepas de bacterias productoras de ácido láctico puede hacerse de varias maneras. Puede hacerse primero fermentando la preparación líquida de alimentos con una o más cepas de bacterias productoras de ácido láctico y luego fermentando el ácido láctico resultante que contiene caldo o líquido de fermentación (es decir, con o sin bacterias productoras de ácido láctico) con una cepa bacteriana productora de ácido propiónico. También puede hacerse fermentando simultáneamente la preparación líquida de alimentos con una o más cepas de bacterias productoras de ácido láctico y de bacterias productoras de ácido propiónico. En esta última opción, las bacterias productoras de ácido láctico pueden constituir, al final del proceso de fermentación, entre el 10% y el 90% del peso total de las bacterias utilizadas en el proceso de fermentación.
45
50
55

El proceso de fermentación, además, preferentemente, está sustancialmente desprovisto de microorganismos contaminantes, es decir, de otros microorganismos que los descritos anteriormente. Por ejemplo, al final de la

fermentación el porcentaje de microorganismos contaminantes es como máximo el 5% (p/p) de la cantidad total de biomasa producida.

Las condiciones de fermentación se eligen típicamente conforme a los requisitos de crecimiento de la(s) cepa(s) microbiana(s) que se utilizará(n) en el proceso de fermentación.

- 5 Es importante mantener el pH de la preparación líquida de fruta, inicialmente y durante la fermentación, en un valor entre 4,5 y 7, preferiblemente entre 5 y 7. Para ello se añade una base adecuada, por ejemplo, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, hidróxido de magnesio, carbonato de calcio, hidróxido de amonio, carbonato de amonio.

- 10 El proceso de fermentación se realiza típicamente durante un período de tiempo adecuado para consumir la mayoría de los azúcares disponibles, preferentemente todos los azúcares, y preferentemente también la mayoría o todo el lactato, si está presente. Sin embargo, también es posible fermentar sólo una parte de los azúcares disponibles. Los azúcares disponibles suelen ser los azúcares presentes de forma natural en la fruta y cualquier azúcar añadido como fuente adicional de carbono. Al final de la fermentación, el nivel de propionato del fluido de fermentación (es decir, medido después de la separación de la biomasa microbiana) puede variar entre 0,25 y 10% (p/p).

- 15 Típicamente, la fermentación se lleva a cabo durante un período de tiempo de 20 a 120 horas, preferentemente de 20 a 100 horas, más preferentemente de 30 a 90 horas.

El proceso de fermentación se lleva a cabo generalmente a una temperatura en el intervalo de 10 a 70°C, en particular en el intervalo de 25 a 55°C, más en particular en el intervalo de 25 a 35°C.

- 20 Una vez finalizada la fermentación, el producto de la fermentación puede, opcionalmente, seguir procesándose como se desee, por ejemplo, dependiendo de su uso previsto. Ventajosamente, en general no es necesario aplicar etapas adicionales de procesamiento para mejorar las propiedades sensoriales.

- 25 Por ejemplo, los sólidos, incluida la biomasa, pueden separarse del producto de la fermentación para obtener un fluido de fermentación. Puede utilizarse cualquier procedimiento conocido por la persona capacitada para esta eliminación de sólidos, por ejemplo, ultrafiltración, microfiltración, decantación estática o centrifugación. También es posible eliminar sólo una parte de los sólidos del producto de la fermentación.

- 30 El producto de la fermentación, incluyendo los sólidos o el fluido de fermentación del que se separan los sólidos, también puede ser concentrado. La concentración puede llevarse a cabo por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Puede llevarse a cabo para formar una solución concentrada, por ejemplo, concentrando hasta unas 20 veces, por ejemplo de 8 a 16 veces. Entre los procedimientos adecuados figuran, por ejemplo, la evaporación (al vacío) y los procedimientos basados en la tecnología de membranas, como la ósmosis inversa. También es posible preparar un producto granular sólido, por ejemplo mediante extrusión o secado por pulverización.

El producto de la fermentación, incluidos los sólidos, el fluido de fermentación del que se separan los sólidos o el producto concentrado también puede ser pasteurizado o esterilizado.

La normalización puede ser necesaria para lograr un fermento de fruta con una composición consistente.

- 35 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un fermento de fruta que contiene propionato.

El fermento de fruta de este aspecto se puede obtener sometiendo una preparación líquida de fruta como la descrita en el primer aspecto a una fermentación con una cepa bacteriana productora de ácido propiónico, junto con una cepa bacteriana productora de ácido láctico, como también se describe en el primer aspecto.

- 40 El fermento de la fruta comprende propionato en una concentración que varía de 0,25 a 80% (p/p), preferentemente de 0,5 a 70% (p/p), más preferentemente de 1 a 60% (p/p). El contenido de propionato depende, por tanto, del contenido de agua del fermento de la fruta y de la presencia o ausencia de biomasa bacteriana. Típicamente, el fermento de la fruta puede tener un contenido de agua de 0 a 99,5% (p/p), dependiendo del procesamiento posterior (concentración y/o secado) del producto de la fermentación después de la misma.

- 45 Preferiblemente, el fermento de la fruta contiene además acetato en una concentración que varía entre el 0,1 y el 60% (p/p). La proporción en peso de propionato a acetato en tal fermento varía así de 0,5 a 10, preferentemente de 1,5 a 5.

También preferiblemente, el fermento de la fruta comprende además el succinato en una concentración que varía de 0,002 a 1% (p/p). La proporción en peso del propionato al succinato en tal fermento varía por tanto de 200 a 15, preferentemente de 150 a 25.

- 50 Los términos propionato, acetato y succinato, tal y como se usan aquí, pretenden abarcar tanto el ácido como la forma salina. A este respecto, las sales típicas son las sales de sodio, potasio, amonio, calcio y magnesio, o combinaciones de ellas.

El fermento de la fruta además puede comprender parte o todas las células bacterianas productoras de ácido propiónico y las células bacterianas productoras de ácido láctico, del proceso de fermentación.

5 Como consecuencia de la fermentación, el fermento de la fruta tiene un contenido de azúcar reducido en comparación con la preparación líquida de la fruta de partida. Al menos el 5% de la cantidad de azúcar presente en la preparación líquida de la fruta de partida, preferiblemente al menos el 10%, más preferiblemente al menos el 20%, se convierte por fermentación. El azúcar en este contexto se refiere a mono y/o disacáridos de hexosa, incluyendo la fructosa, la glucosa y/o la sacarosa.

El fermento de fruta de este aspecto se puede obtener por los procedimientos descritos en el primer aspecto.

10 El fermento de fruta de este aspecto puede ser un alimento o bebida como tal y/o puede ser usado como un aditivo o un ingrediente de un alimento y/o bebida.

Otro aspecto se refiere a una composición que comprende el fermento de fruta del aspecto anterior.

15 Tal composición puede ser una composición aditiva para alimentos y/o bebidas que contenga ingredientes adicionales junto al fermento de la fruta. Ejemplos de tales ingredientes adicionales son ácido láctico y/o sus sales, ácido acético y/o sus sales, vinagre, ácido cinámico y/o sus sales, vainillina, nisina, ácido sórbico y/o sus sales y productos de fermentación que contienen ácido láctico y/o sus sales, ácido acético y/o sus sales, ácido propiónico y/o sus sales, ácido benzoico y/o sus sales, y/o uno o más de los siguientes componentes: nisina, natamicina, polilisina, bacteriocinas.

20 El fermento de la fruta o la composición aditiva que comprende el fermento de la fruta, tal como se describe aquí, puede utilizarse ventajosamente en alimentos y/o bebidas, por ejemplo para inhibir el crecimiento de levadura y/o moho en el alimento o la bebida. Debido al sabor neutro o delicado y al aroma del fermento de la fruta, no proporciona ningún sabor o aroma desagradables sustancial al alimento o la bebida, incluso cuando se aplica en una concentración elevada. Típicamente, el fermento de fruta puede añadirse a un alimento o bebida para proporcionar un nivel de propionato en el alimento o bebida en un intervalo de 0,005 a 1% (p/p), preferentemente en un intervalo de 0,02 a 0,5% (p/p), más preferentemente en un intervalo de 0,05 a 0,2% (p/p).

25 En una realización, el fermento de fruta se añade ventajosamente a un alimento y/o bebida a base de fruta, en particular a un alimento y/o bebida a base de fruta que contiene el mismo tipo de fruta que la que se utiliza para preparar el fermento de fruta. De esta manera, el alimento o bebida a base de frutas obtiene nuevas propiedades, por ejemplo, en lo que respecta al sabor, el aroma, el color y la estabilidad de almacenamiento. Propiedades como el sabor, el aroma y el color del fermento de la fruta de este modo están ventajosamente en línea con los del alimento o
30 bebida a base de fruta. Un alimento y/o bebida a base de fruta puede tener típicamente un contenido de fruta que varía desde aproximadamente el 3 % (p/p), como en los refrescos, hasta el 100 % (p/p), como en los zumos de fruta sin diluir, los purés de fruta o los concentrados de fruta.

35 Así pues, en un aspecto adicional se proporciona un procedimiento para mejorar las propiedades sensoriales y la estabilidad de almacenamiento de un alimento y/o bebida a base de fruta, complementando el alimento y/o la bebida con un fermento de fruta como se describe aquí. De este modo, el fermento de fruta tiene preferentemente un perfil de sabor, aroma y/o color que no se desvía sustancialmente del perfil del alimento y/o bebida a base de fruta. Por ejemplo, se puede añadir un fermento de melón a un alimento y/o bebida a base de manzana, mientras que un fermento de tomate no. Más preferentemente, el fermento de fruta se prepara a partir de la misma fruta o frutas que la fruta o frutas incluidas en el alimento y/o bebida a base de fruta.

40 El fermento de la fruta, cuando aún contiene células microbianas, puede utilizarse además ventajosamente como probiótico.

Ejemplo 1

Preparación de varios fermentos de frutas

45 Se pre-cultivó *P. freudenreichii* a un pH inicial de 6,5, en un medio que contenía 15 g/l de extracto de levadura certificada Difco y 30 ml/l de una solución de lactato de sodio al 50%. El cultivo se incubó a 30 °C hasta que creció completamente. Se pre-cultivó *Lactobacillus paracasei* en un medio de MRS (de Man et al. 1960, J Appl Bact 23 (130-135), "Un medio para el cultivo de lactobacilos"), adquirido en Oxoid, a un pH inicial de 5,8.

Se probaron varios casos, con diferentes composiciones de medios. Cada caso se enumera a continuación en la Tabla 1, donde se indica la cantidad de puré o zumo por litro de medio de fermentación:

Caso	Ingredientes por litro de medio de fermentación (ajustado a 1 litro con agua)
1	210 g Pasta de tomate (que proporciona 35,7 g/l de azúcar)

ES 2 801 978 T3

Caso	Ingredientes por litro de medio de fermentación (ajustado a 1 litro con agua)
2	0,5 l de zumo de sandía (recién preparado)
3	0,5 l de zumo de sandía (recién preparado) 10 g de extracto de levadura difco
4	0,75 l de zumo de sandía (recién preparado)
5	0,25 l de zumo de manzana (recién preparado)
6	0,33 l de zumo de naranja (recién preparado)
7	0,25 l de zumo de uva blanca (recién preparado)
8	0,33 l de zumo de piña (recién preparado)

Los zumos de la Tabla 1 fueron preparados por un extractor de zumos estándar, en este caso un exprimidor Philips HR1858. Después de obtener el zumo, fue inmediatamente puesto en un reactor de fermentación sin más filtración.

5 Los reactores de fermentación fueron esterilizados a 121°C durante 20 minutos. El pH en el reactor se mantuvo a un pH de 6,5 con NaOH 2,5 M (100 g/l). La agitación del medio se hizo a 250 rpm.

Al comienzo de la fermentación, se añadió al zumo diluido un 10% v/v de un cultivo de bacterias de ácido láctico y un 10% v/v de un cultivo de bacterias de ácido propiónico.

Después de la fermentación (48-96 horas), los sólidos, incluyendo la biomasa, se eliminaron mediante centrifugación a 7000x g durante 20 minutos.

10 Tabla 1: Ácidos presentes en el zumo después de la fermentación y la eliminación de sólidos (caso 4 no determinado)

componente	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5	Caso 6	Caso 7	Caso 8
ácido fórmico	0,12	0,12	0,19	n.d.	0,04	0,12	0,03	0,07
ácido acético	0,86	0,6	0,8	n.d.	0,52	0,7	0,60	0,71
ácido propiónico	1,5	1,5	1,4	n.d.	1,2	1,1	1,4	1,4
etanol	<0,02	0,02	0,04	n.d.	<0,01	0,03	<0,01	<0,01
ácido butírico	<0,01	<0,01	<0,01	n.d.	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
ácido pirúvico	<0,02	<0,02	<0,02	n.d.	<0,02	<0,02	<0,02	0,02
ácido láctico	<0,05	<0,05	<0,05	n.d.	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Ácido 2-hidroxi-butírico	<0,01	<0,01	<0,01	n.d.	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
ácido oxálico	<0,02	<0,01	<0,01	n.d.	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
ácido sórbico	<0,01	<0,01	<0,01	n.d.	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

ES 2 801 978 T3

componente	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5	Caso 6	Caso 7	Caso 8
ácido fumárico	<0,02	<0,01	<0,01	n.d.	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
ácido succínico	0,10	0,02	0,01	n.d.	0,03	0,02	0,04	0,05
ácido benzoico	<0,03	<0,03	<0,03	n.d.	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
ácido maleico	<0,02	<0,01	<0,01	n.d.	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

Tras la eliminación de los sólidos, los fermentos se concentraron de 8 a 16 veces por evaporación rotativa al vacío, operando a 80 mbar. Se determinó la composición de ácidos orgánicos de los fermentos concentrados (Tabla 2):

Tabla 2: Concentración de los ácidos después de la evaporación al vacío (caso 1 no determinado)

componente	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5	Caso 6	Caso 7	Caso 8
ácido fórmico	n.d.	0,51	1,0	1,4	0,24	1,0	0,13	0,37
ácido acético	8,6	3,0	4,1	9,9	5,4	6,5	4,7	4,3
ácido propiónico	15	6,8	7,9	22	14	11	12	8,8
etanol	n.d.	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
ácido butírico	n.d.	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
ácido pirúvico	n.d.	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,02	<0,01
ácido láctico	n.d.	<0,05	<0,05	0,07	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Ácido 2-hidroxi-butírico	n.d.	<0,01	<0,01	0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
ácido oxálico	n.d.	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,01	<0,01	0,01
ácido sórbico	n.d.	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,02	<0,01	0,02
ácido fumárico	n.d.	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
ácido succínico	n.d.	0,09	0,04	1,2	<0,01	0,9	1,0	0,6
ácido benzoico	n.d.	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
ácido maleico	n.d.	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

5

De la misma manera que se ha descrito anteriormente, se prepararon cuatro fermentos (casos 9, 10, 11 y 12), pero ahora utilizando un medio de fermentación que contiene por cada litro de agua: 25 g/l de extracto de levadura Difco y 70 g/l de sacarosa. Tras la eliminación de la biomasa y concentración, el caso 9 contenía un 22% (p/p) de ácido propiónico y el caso 10 contenía un 20,4% (p/p) de ácido propiónico (no se determinaron otros ácidos). En el caso 11, el fermento se evaporó hasta la sequedad mediante un evaporador rotativo a presión reducida (60-100 mbar). En el caso 12, se tomó el fermento del caso 9 y se añadió ácido láctico de sodio hasta que el fermento contenía un 25% (p/p) de ácido láctico. Tras la adición de ácido láctico, el fermento contenía un 13,7% (p/p) de ácido propiónico.

10

Ejemplo 2

Efecto del fermento de tomate en las levaduras de la salsa de tomate

Se probó la eficacia de un fermento de tomate en la salsa de tomate. La salsa de tomate se preparó teniendo una composición según la Tabla 3:

5

Tabla 3. Composición de la salsa de tomate

Ingrediente	Dosis (%)	Descripción	Proveedor
Puré de tomate	30,0	Doble concentrado 28/30%; ingredientes: tomates y sal	Perfekt
Sal	3,2	Sal de mesa	Jozo
Azúcar	20,0	Azúcar cristalino	CSM
Agua	45,54		
Vinagre (28,5%)	1,26	(=0,36% 100%)	
TOTAL	100		
pH = 3,8 (ajustado con HCl o NaOH), aW = aproximadamente 0,94			

Se preparó un fermento de sacarosa que contenía propionato a base de sacarosa y extracto de levadura, que contenía un 22% de ácido propiónico (caso 9 del ejemplo 1). Además, se preparó un fermento concentrado de tomate que contenía un 15% de ácido propiónico (caso 1 del ejemplo 1). Estos fermentos se añadieron a lotes de salsa de tomate según la Tabla 4.

10

Las siguientes cepas de levadura fueron cultivadas en caldo GPY (5 g/l de extracto de levadura, 4 g/l de glucosa, 5 g/l de peptona, a un pH de 5-5,5), y añadidas a la salsa de tomate, según la tabla 4, a una concentración final de aproximadamente 1000 células por gramo: *Pichia membranaefaciens* MUCL 27794, *Candida tropicalis* MUCL 28180, *Zygosaccharomyces rouxii* MUCL 30008. La salsa de tomate se incubó a 20 °C con la cepa de levadura indicada y el fermento indicado (Tabla 4). Regularmente, las unidades formadoras de colonias (ufc) se determinaron utilizando placas de MEA (20 g/l de extracto de malta, 20 g/l de glucosa, 1 g/l de peptona, 20 g/l de agar), incubadas a 20 °C.

15

Tabla 4. Configuración de prueba de un experimento microbiológico con fermento de sacarosa (caso 9) y fermento de tomate (caso 1) en salsa de tomate

Muestra	Nombre	Fermento de tomate añadido (%p/p)	Fermento de sacarosa añadido (%p/p)	Microorganismo	Log ufc en el día 7	Log ufc en el día 80
1	control	0	0	<i>Pichia membranaefaciens</i>	3	9,5
1	control	0	0	<i>Candida tropicalis</i>	1,5	< 1
1	control	0	0	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	4	8,5
2	Tom bajo	1	0	<i>Pichia membranaefaciens</i>	< 1	< 1

Muestra	Nombre	Fermento de tomate añadido (%p/p)	Fermento de sacarosa añadido (%p/p)	Microorganismo	Log ufc en el día 7	Log ufc en el día 80
2	Tom bajo	1	0	<i>Candida tropicalis</i>	< 1	< 1
3	Tom alto	3	0	<i>Pichia membranaefaciens</i>	< 1	< 1
3	Tom bajo	3	0	<i>Candida tropicalis</i>	< 1	< 1
4	Prop bajo	0	0,6	<i>Pichia membranaefaciens</i>	< 1	< 1
4	Prop bajo	0	0,6	<i>Candida tropicalis</i>	1,5	< 1
5	Prop alto	0	1,8	<i>Pichia membranaefaciens</i>	< 1	< 1
5	Prop alto	0	1,8	<i>Candida tropicalis</i>	< 1	< 1
6	Tom med	1,7	0	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	1,5	< 1
7	Prop med	0	1	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	1	< 1

El fermento a base de zumo de tomate fue tan efectivo como el fermento a base de sacarosa durante al menos 80 días. Los resultados mostraron claramente que la *Candida tropicalis* no podía crecer en la salsa de tomate, ya que las unidades formadoras de colonias se redujeron en el experimento de control en los primeros 7 días.

5 **Ejemplo 3**

El sabor de los fermentos de melón comparado con otros fermentos de propionato

Este experimento proporciona una descripción del sabor de estos fermentos en aplicación y una comparación sobre el sabor con otros fermentos de propionato. La comparación se basa en la prueba de clasificación del análisis sensorial ISO 8587:2006. El sabor de los fermentos se evaluó en una bebida modelo. La receta de esta bebida modelo se presenta en la Tabla 5.

10

Tabla 5: receta de la bebida modelo

Ingrediente	Proveedor	Cantidad [g]
Agua		949,85
Sacarosa	Azúcar granulado - Van Gilse	40,0
Zumo de manzana concentrado	Cargill	8,30
Sabor a manzana	Givaudan 55078-DO	0,35

Ingrediente	Proveedor	Cantidad [g]
Ácido cítrico	A través de, M&A-021	1,50

En este modelo de bebida los siguientes fermentos se comparan entre sí:

- PSP9 Líquido (véase el caso 10 del ejemplo 1): Fermento líquido concentrado de ácido propiónico a base de sacarosa y extracto de levadura con un contenido de ácido propiónico del 20,4 % (p/p).
- 5 • PSP9 Polvo (véase el caso 11 del ejemplo 1): Polvo del fermento descrito anteriormente con un contenido de ácido propiónico del 41% (p/p) .
- Fermento de melón con extracto de levadura: Fermento de ácido propiónico a base de zumo de sandía + 10 g/l de extracto de levadura, concentrado.
- Fermento de melón sin extracto de levadura: Fermento de ácido propiónico a base de zumo de sandía, concentrado.
- 10 • PQ (véase el caso 12 del ejemplo 1): Fermento de ácido propiónico a base de sacarosa y extracto de levadura, mezclado con ácido láctico hasta un total de 25%.

Los fermentos se compararon a un nivel de propionato del 0,05%. La tabla 6 muestra el nivel de propionato de cada fermento y la cantidad que debe ser añadida a la bebida modelo para alcanzar un nivel de 0,05%.

Tabla 6: niveles de propionato y niveles de dosis de los fermentos

Fermentada	Nivel de propionato [%]	Nivel de dosis [%]
PSP9 Líquido	20,4	0,245
PSP9 Polvo	41,0	0,122
Fermento de melón con extracto de levadura	7,9	0,633
Fermento de melón sin extracto de levadura	6,8	0,735
PQ	13,7	0,365

15 Todas las muestras fueron probadas por 8 panelistas entrenados. Se pidió a los panelistas que clasificaran las muestras de menos a más diferentes de la muestra de referencia. La muestra de referencia es una bebida modelo pura. La tabla 7 muestra el pH de las muestras y la descripción del sabor.

20 Tabla 7: pH y descripción del sabor de las muestras con diferente fermento de propionato

Muestra	pH	Descripción
X (referencia = bebida modelo)	3,18	Fresco, manzana
PSP9 Líquido	4,21	Menos fresco y sabor a manzana, sabor a fermento fuerte
PSP9 Polvo	4,23	Menos fresco y sabor a manzana, poco sabor a fermento
Fermento de melón con extracto de levadura	4,30	Menos fresco y sabor a manzana, dulce

Muestra	pH	Descripción
Fermento de melón sin extracto de levadura	4,24	Menos fresco y sabor a manzana, dulce, poco amargo
PQ	3,92	Menos fresco y sabor a manzana, agrio

Clasificación

Las muestras se clasificaron de menos a más diferente de la referencia. La tabla 8 muestra los resultados de la clasificación.

Tabla 8: clasificación de 5 fermentos de propionato por 8 panelistas

Panelista	PSP9 L	PSP9 P	Melón + Y	Melón - Y	PQ	
1	5	3	1	2	4	n = 8
2	5	3	2	1	4	k = 5
3	5	4	1	2	3	
4	5	4	2	1	3	
5	5	2	1	3	4	
6	4	1	3	2	5	
7	5	3	1	2	4	
8	5	1	4	2	3	
Suma	39	21	15	15	30	
SD	0,35	1,19	1,13	0,64	0,71	
1 = menos diferente de la referencia x, 5 = más diferente de x						

5

Para que un panel de 8 panelistas y 5 productos se clasifique, la puntuación total debe ser inferior a 17 y o superior a 31 para indicar una diferencia significativa (prueba de una cola). Se puede observar que tanto las muestras con fermento de melón con y sin extracto de levadura tienen una influencia significativamente menor en el sabor en comparación con las otras muestras. La muestra con PSP9 Líquido tiene una influencia significativamente mayor en el sabor que las otras muestras. La conclusión es que los fermentos de melón tienen menos influencia en el sabor de la bebida modelo de zumo de manzana que otros fermentos de propionato. Los fermentos de melón también tienen un perfil de sabor diferente; son más dulces que los otros fermentos.

10

Ejemplo 4

Fermentación de melón de miel y zumo de manzana con *Propionibacterium*

15 Preparación del pre-cultivo

Se inoculó un vial (1 ml) con una reserva de glicerol a -80 °C de *Propionibacterium freudenreichii* ss. *shermanii* en un matraz de 100 ml que contenía un medio con 20 g/l de glucosa y 15 g/l de extracto de levadura y se incubó a 30 °C durante 2 días. Los 100 ml de cultivo se transfirieron a un frasco de 1 l que contenía 900 ml del mismo medio (20 g/l de glucosa y 15 g/l de extracto de levadura). Este frasco se incubó durante 1 día a 30 °C.

20 Fermentación de zumo de frutas

5 Se preparó un fermentador de 1L con un concentrado de zumo de melón comercial diluido. El concentrado se diluyó hasta una concentración de azúcar de aproximadamente 45 g/l, y se añadió un 1% de pasta de extracto de levadura (50% de pasta de Biospringer) y posteriormente se esterilizó en autoclave el reactor incluyendo el medio. La fermentación se inició añadiendo 100 ml del pre-cultivo de *Propionibacterium*. Se llenó un reactor similar con un concentrado de zumo de manzana comercial diluido. La concentración final de azúcar fue también de 45 g/l. Ambos reactores se mantuvieron a 30 °C, se agitaron a 150 rpm y se controlaron a un pH de 6,5 utilizando un controlador ADI1020 y NaOH 5M como base para la corrección del pH. Se tomaron muestras de los dos reactores con regularidad y se midió la concentración de azúcar y la concentración de ácido propiónico. Los resultados de estas fermentaciones se presentan en las tablas 8 y 9. Aunque la formación de ácido propiónico fue relativamente lenta, la glucosa se convirtió rápidamente (< 48h) en ácido propiónico. Esto sugiere que las frutas con alto contenido de glucosa son óptimas en este tipo de fermentaciones.

Tabla 9: concentraciones de ácidos y azúcares en la fermentación del zumo de melón rocío de miel (g/l)

Hora	Ácido propiónico	Ácido acético	Ácido succínico	Glucosa	Fructosa	Sacarosa
0	0	0,2	0	13,5	18,1	15,4
24	2,4	1,4	0,4	10,8	16,4	14,5
48	6,2	3,2	0,8	< 1	14,7	14,5
72	7,4	4,1	1,5	< 1	11,8	14,1
100	7,9	4,4	2,0	< 1	9,7	14,1
118	8,2	4,6	2,4	< 1	8,0	13,1

Tabla 10: concentraciones de ácidos y azúcares en la fermentación del zumo de manzana (g/l)

Hora	Ácido propiónico	Ácido acético	Ácido succínico	Glucosa	Fructosa	Sacarosa
0	0	0,1	0	15,3	27,5	2,5
24	1,3	1,0	0,6	12,4	27,5	2,4
48	5,4	3,1	1,5	< 1	24,5	2,4
72	6,3	3,7	2,4	< 1	21,0	2,4
100	7,1	4,2	2,8	< 1	18,1	2,4
118	7,9	4,6	3,3	< 1	15,7	2,5

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de un fermento de fruta que contenga ácido propiónico y/o una sal del mismo que comprende:
- 5 i) obtener una preparación líquida de fruta con un nivel de azúcar de 1,5 a 10% (p/p) y un pH inicial de 4,5 a 7;
- ii) fermentar la preparación líquida de fruta con una cepa bacteriana productora de ácido propiónico, manteniendo el pH entre 4,5 y 7 mediante la adición de una base seleccionada de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de magnesio, hidróxido de calcio, hidróxido de amonio, carbonato de calcio y carbonato de amonio; y
- 10 iii) opcionalmente, el procesamiento posterior del producto de la fermentación, para obtener el fermento de la fruta,
- en el que la fruta que se utiliza en dicho procedimiento no incluye frutos secos ni granos de cereal y en el que la cepa bacteriana productora de ácido propiónico utilizada en dicha fermentación se complementa con una o más cepas de bacterias productoras de ácido láctico.
- 15 2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la preparación líquida de fruta es un zumo de fruta, un extracto de fruta o un puré de fruta.
3. El procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la preparación líquida de fruta se complementa con agua y/o con los componentes adicionales necesarios para apoyar y/o mejorar la fermentación bacteriana.
- 20 4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la cepa bacteriana productora de ácido propiónico es del género *Propionibacterium* y/o de las especies *Clostridium propionicum*, *Selenomonas ruminantium* y/o *Bacteroides ruminicola* y/o del género *Veillonella*.
5. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que la cepa bacteriana productora de ácido propiónico procede de las especies *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium shermanii* y/o *Propionibacterium acidi-propionici*.
- 25 6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 comprende la fermentación simultánea de la preparación líquida de fruta con dicha cepa bacteriana productora de ácido propiónico y con una o más cepas de bacterias productoras de ácido láctico.
7. El procedimiento según la alegación 6, en el que las bacterias productoras de ácido láctico son una o más de las siguientes: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus smithii* y *Bacillus thermoamylovorans*.
- 30 8. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la fermentación de la preparación líquida de fruta se hace a un pH entre 5 y 7.
9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el proceso de fermentación está substancialmente desprovisto de microorganismos distintos de dicha cepa bacteriana productora de ácido propiónico y dichas una o más cepas de bacterias productoras de ácido láctico.
- 35 10. Un fermento de fruta obtenible por fermentación de una preparación líquida de fruta con una cepa bacteriana productora de ácido propiónico de acuerdo con el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, comprendiendo dicho fermento de fruta:
- propionato en una concentración que varía entre el 0,25 y el 80% (p/p); y
- 40 succinato en una concentración que varía entre 0,002 y el 1% (p/p), en el que la relación en peso del propionato a succinato está en el intervalo de 200 a 15.
11. El fermento de fruta de la reivindicación 10 que comprende además acetato en una concentración que varía entre el 0,1 y el 60% (p/p), y la proporción en peso de propionato a acetato que varía entre 0,5 y 10.
- 45 12. El fermento de fruta de la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en el que la proporción en peso de propionato a succinato está en el intervalo de 150 a 25.
13. El fermento de fruta de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 que contiene parte o todas las células bacterianas productoras de ácido propiónico de la fermentación, y parte o todas las células bacterianas productoras de ácido láctico, de la fermentación.

14. Un fermento de fruta obtenido por fermentación de una preparación líquida de fruta con una cepa bacteriana productora de ácido propiónico de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 9, comprendiendo dicho fermento de fruta:

propionato en una concentración que varía de 0,25 a 80% (p/p);

5 parte o todas las células bacterianas productoras de ácido propiónico de la fermentación, y

parte o todas las células bacterianas productoras de ácido láctico, de la fermentación.

15. Uso del fermento de fruta de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14 en alimentos y/o bebidas o como alimento o bebida como tal.

10 **16.** Un procedimiento para mejorar la estabilidad de almacenamiento de un alimento y/o bebida a base de frutas, complementando el alimento y/o la bebida con el fermento de fruta de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14.