(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 536 219**

(21) Número de solicitud: 201301088

(51) Int. CI.:

C12N 1/20 (2006.01)
A23L 1/317 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)
C12R 1/44 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

20.11.2013

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

21.05.2015

(71) Solicitantes:

UNIVERSIDADE DE VIGO (100.0%)
Campus Universitario s/n
36310 Vigo (Pontevedra) ES

(72) Inventor/es:

CARBALLO GARCÍA, Francisco Javier;
FRANCO MATILLA, María Inmaculada y
FONSECA BALVÍS, Sonia

(54) Título: **Cultivo iniciador para elaboración de productos cárnicos procesados que comprende Lactobacillus sakei y Staphylococcus equorum**

(57) Resumen:

La invención describe un cultivo iniciador bacteriano formado por dos cepas autóctonas para la elaboración de embutidos crudo-curados, aplicable a la elaboración a nivel industrial de chorizo en general y de chorizo gallego en particular. Este cultivo iniciador comprende células viables de la cepa Lactobacillus sakei CECT 8335 y la cepa de Staphylococcus equorum CECT 8337, aisladas del chorizo gallego. Ambas especies bacterianas muestran habilidad para implantarse en el embutido y para dominar sobre la flora contaminante presente.

ES 2 536 219 A1

DESCRIPCIÓN

Cultivo iniciador para elaboración de productos cárnicos procesados que comprende *Lactobacillus sakei* y *Staphylococcus equorum*.

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a un cultivo iniciador bacteriano específicamente diseñado para la elaboración de productos cárnicos procesados, más en particular de embutidos crudo-curados, aplicable en la elaboración a nivel industrial de chorizo en general y de chorizo gallego en particular.

Estado del arte

Los embutidos crudo-curados son productos cárnicos tradicionales que tienen una gran importancia en los países del sur de Europa, donde su fabricación tiene una gran repercusión económica, alcanzando volúmenes de producción muy considerables que representan una parte significativa del total de la industria cárnica.

La elaboración de los embutidos crudo-curados abarca diferentes fases: selección y preparación de las materias primas, picado de la carne y grasa, mezcla y amasado de la carne y grasa con los demás ingredientes y aditivos, reposo de la masa, embutido, fermentación (opcionalmente ahumado) y secado/maduración.

Durante la fermentación y secado/maduración, los componentes de la masa de los embutidos (hidratos de carbono, lípidos y proteínas), bajo la acción de los microorganismos presentes en ella y de las enzimas autóctonas de la carne y grasa, sufren una serie de fenómenos degradativos que generan los compuestos responsables de las características sensoriales (sabor, aroma y textura) del producto final. Al mismo tiempo, bajo la acción de las enzimas presentes, tiene lugar una serie de transformaciones que garantizan la estabilidad del color del embutido.

Los embutidos tradicionales se elaboran generalmente sin la adición de ningún cultivo iniciador, con lo que la fermentación/maduración de los mismos se lleva a cabo por la microbiota espontánea presente de una manera natural y accidental en la masa (procedente de las materias primas, utensilios y equipos utilizados en la elaboración, medio ambiente, etc.). Al ser esta microbiota presente muy variable, tanto en la cantidad de células viables como en la naturaleza (identidad) de las mismas, así como en la intensidad de sus actividades metabólicas, los embutidos crudo-curados resultantes tienen unas características y atributos sensoriales muy heterogéneos y variables, lo que en muchos casos influye negativamente en su imagen y limita la comercialización de estos productos en los mercados. La no adición de cultivos iniciadores posibilita también el eventual crecimiento de microorganismos alterantes y/o patógenos, con lo que la estabilidad y salubridad de los productos no está garantizada.

El empleo de cultivos iniciadores en la elaboración de productos cárnicos fermentados/madurados es habitual en la industria cárnica con vistas a la obtención de productos homogéneos, de calidad elevada y constante, y sanitariamente seguros. Muchas han sido las especies microbianas propuestas para integrar cultivos iniciadores destinados a la fabricación de embutidos crudo-curados (Liepe, H. U. (1983). Starter cultures in meat production. Biotechnology, 5, 400-424); (Lücke, F.K. y Hechelman, H.

(1987). Starter cultures for dry sausages and raw ham, composition and effect. *Fleischwirtschaft*, 67(3), 307-314); (Leroy, F., Verluyten, J., y De Vuyst, L. (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 106(3), 270-285) u otros productos cárnicos (Jelle, Jørgensen, Christensen y Nilsson. Composición de cultivo iniciador y su uso en la fabricación de productos alimenticios. ES2093569). Sin embargo, los embutidos tradicionales tienen unas peculiaridades sensoriales que les confieren una personalidad que los diferencia e individualiza en relación con las demás variedades y/o tipos.

Un cultivo iniciador ha de tener una actividad metabólica en consonancia con los cambios bioquímicos (naturaleza e intensidad) que tienen lugar durante la fermentación/ maduración de cada variedad de embutido concreta y que le confiere sus atributos sensoriales característicos. De no ser así, lejos de ser beneficioso, su empleo puede dar lugar a un producto de características sensoriales notablemente modificadas, lo que le hace perder su personalidad y le convierte en un producto indiferenciado.

La utilización de cultivos iniciadores autóctonos en la elaboración de estos embutidos, permite la elaboración de productos de calidad elevada y constante, sanitariamente seguros y que conservan intacta su personalidad y sus características diferenciales frente a otras, variedades, de embutidos. Estos, cultivos están integrados por cepas microbianas aisladas de elaboraciones artesanales, debidamente caracterizadas en sus actividades metabólicas, y testadas en sus efectos en fabricaciones a escala de planta piloto.

Descripción de la invención

La principal realización de la invención es un cultivo iniciador formado por bacterias vivas que se añaden a la masa de los embutidos crudo-curados como un ingrediente más. En el ámbito de la presente solicitud se entiende por "cultivo iniciador" aquel cultivo constituido por una o varias cepas de bacterias que se inoculan en la masa cárnica al objeto de iniciar la fermentación. Este cultivo iniciador está integrado por las siguientes especies microbianas con las actividades y capacidades metabólicas que a continuación se refieren:

- *Lactobacillus sakei*, produce ácido láctico en cantidades elevadas que contribuye al sabor y aroma del producto y acidifica la masa del embutido, mejorando el color y la cohesión de la masa, e inhibiendo el potencial crecimiento de microbiota alterante y/o patógena.

- *Staphylococcus equorum*, tiene actividad catalasa (antioxidante), presenta una actividad proteolítica débil frente a las proteínas sarcoplasmáticas y miofibrilares, moderada pero significativa frente a la actina y la miosiona (proteínas miofibrilares) y también tienen una moderada actividad lipolítica (capacidad de degradar la grasa de cerdo).

Ambas especies microbianas son capaces de crecer a valores de pH en un rango de 4,5-6,5, a una temperatura en un rango de 5 a 25ºC y a concentraciones de cloruro sódico (sal) de hasta un 10%, es decir en las condiciones ambientales a las que pueden estar sometidos este tipo de embutidos a lo largo de los periodos de fermentación y maduración. Ambas especies son capaces de implantarse en el embutido y dominar

sobre la microbiota contaminante presente en la masa cárnica en el momento de la inoculación.

Se caracterizaron metabólicamente 50 cepas de *Lactobacillus sakei* y 50 cepas de *Staphylococcus equorum* aisladas de embutidos tradicionales. Se encontró que la cepa de *Lactobacillus sakei* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el código CECT 8335, posee las características metabólicas y capacidades anteriormente descritas exigibles a esta especie. Por otro lado, la cepa de *Staphylococcus equorum* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el código CECT 8337, posee también las características metabólicas y capacidades anteriormente descritas exigibles a esta especia. Una mezcla de las cepas *Lactobacillus sakei* CECT 8335 y *Staphylococcus equorum* CECT 8337 fue inoculada en la masa el proceso de elaboración de Chorizo Gallego o Chorizo Rosario, una variedad tradicional que se elabora en el noroeste de España, pudiéndose comprobar sus efectos beneficiosos.

Mediante estudios y técnicas de biología molecular se ha observado que ambas especies bacterianas tienen capacidad para implantarse en el embutido y para dominar sobre la flora contaminante preexistente en la masa del embutido en el momento de la inoculación, con lo que las características organolépticas y sensoriales del embutido elaborado obtenido tras la inoculación son mayoritariamente atribuibles a las actividades metabólicas particulares de estas especies añadidas.

El cultivo iniciador congelado o liofilizado pueden añadirse a la masa del embutido y, para que ejerza adecuadamente su actividad y manifieste sus efectos beneficiosos, las cepas deben ser añadidas en una proporción de 106 unidades formadoras de colonias por cada gramo de masa en el caso de *Lactobacillus sakei*, y en una proporción de 107 unidades formadoras de colonias por cada gramo de masa en el caso de *Staphylococcus equorum*.

La invención también comprende el procedimiento de obtención del embutido. Así que una realización más es un procedimiento de elaboración de un chorizo que comprende inocular en la masa cárnica una cantidad efectiva de las cepas *Lactobacillus sakei* CECT 8335 y *Staphylococcus equorum* CECT 8337 antes de la fase de reposo previa al embutido.

Una realización muy preferible de la invención es el chorizo obtenido por un procedimiento que comprende la inoculación en la masa cárnica antes de la fase de reposo previa al embutido de las cepas *Lactobacillus sakei* CECT 8335 y *Staphylococcus equorum* CECT 8337.

La propia, cepa de *Staphylococcus equorum* CECT 8337rforma parte de la invención, depositada en la colección española de cultivos tipo con el código CECT 8337.

Analizando los parámetros microbiológicos y físico-químicos de los chorizos elaborados, se ha comprobado que los embutidos fabricados haciendo uso de este cultivo presentan una mayor homogeneidad entre las diferentes partidas (lotes) en relación con los embutidos elaborados por fermentación espontánea.

En ensayos sensoriales comparativos se ha observado que los embutidos elaborados adicionando esta composición presentan una calidad sensorial global superior a la de los embutidos elaborados sin adicionar tal composición.

Dada la adecuación del cultivo de la invención, las ventajas descritas se manifiestan en el producto conservando intactos todos los atributos organolépticos y sensoriales característicos, particulares y privativos de esta variedad de embutido tradicional, con lo que la personalidad del embutido resultante no se ve comprometida, resultando incluso acrecentada y reforzada.

La invención permite, en definitiva, la elaboración de chorizo gallego a nivel industrial, obteniendo un producto homogéneo, de calidad elevada y constante y sanitariamente seguro, manteniendo su tipicidad y su personalidad (elementos diferenciales frente a otras variedades de embutidos crudo-curados). Ello supone un instrumento de indudable valor para los elaboradores industriales, de cara a mejorar la calidad y uniformidad del chorizo fabricado, lo que permitiría a este producto una mayor penetración en mercados nacionales e internacionales.

Ejemplos

Ejemplo de elaboración de chorizo gallego

Materia primas e ingredientes: magro de paleta de cerdo, grasa dorsal de cerdo, sal, pimentón dulce, pimentón picante, ajo, y cultivo iniciador.

Se parte de magro de paleta y grasa dorsal de cerdo, en una proporción 80:20, que se pican en una picadora industrial a refrigeración (temperatura < 4ºC) utilizando un disco de 10 mm. (la grasa se pica previa congelación). Seguidamente en el bol de una amasadora (que permita trabajar a vacío) se introducen el magro y la grasa picados, conjuntamente con la sal (15-20 g/kg de magro/grasa), pimentón dulce (20-25 g/kg de magro/grasa), pimentón picante (1-2 g/kg de magro/grasa), ajo (3-5 g/kg de magro/grasa), agua (40 mL/kg de magro/grasa) y el cultivo iniciador liofilizado o congelado (106 unidades formadoras de colonia de *Lactobacillus sakei* por cada gramo de magro/grasa y 107 unidades formadoras de colonia de *Staphylococcus equorum* por cada gramo de magro/grasa).

Los ingredientes se mezclan (amasan) a vacío, y a temperatura de refrigeración, durante 3 minutos. Tras la formación de la mezcla, esta se deja reposar durante 24 horas a 4ºC. A continuación la mezcla se embute a vacío en tripa natural de cerdo de 36-38 mm. de diámetro.

El embutido resultante se ata con hilo natural o cáñamo en unidades de 15-20 cm. de longitud, dejando entre unidad y unidad la típica bolita característica de esta variedad de embutido.

Tras el atado, el embutido se deja inicialmente fermentar durante 9 días en cámaras de maduración a 6ºC y 80% de humedad relativa. A continuación se someten a un secado-maduración, para lo cual los embutidos se transfieren a cámaras con unas condiciones de 12ºC de temperatura y 75% de humedad relativa, donde permanecen 21 días.

REIVINDICACIONES

1. Cultivo iniciador para la elaboración de productos cárnicos procesados, que comprende la cepa de *Lactobacillus sakei* depositada en la colección española de cultivos tipo con el código CECT 8335, la cepa de *Staphylococcus equorum* depositada en la Colección española de cultivos tipo con el código CECT 8337.

2. Cultivo liofilizado que comprende la cepa de *Lactobacillus sakei* depositada en la Colección española de cultivos tipo con el código CECT 8335 y la cepa *Staphylococcus equorum* depositada en la Colección española de cultivos tipo con el código CECT 8337.

3. Cultivo congelado que comprende la cepa de *Lactobacillus sakei* depositada en la Colección española de cultivos tipo con el código CECT 8335 y la cepa *Staphylococcus equorum* depositada en la colección española de cultivos tipo con el código CECT 8337.

4. Procedimiento para la elaboración de productos cárnicos procesados que comprende inocular en la masa cárnica una cantidad efectiva de las cepas *Lactobacillus sakei* CECT 8335 y *Staphylococcus equorum* CECT 8337 antes de la fase de reposo previa al embutido.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que la inoculación de *Lactobacillus sakei* CECT 8335 se realiza en una proporción de 10^6 unidades formadoras de colonias por cada gramo de masa y la de *Staphylococcus equorum* CECT 8337 en una proporción de 10^7 unidades formadoras de colonias por cada gramo de masa cárnica.

6. Chorizo obtenido por un procedimiento que comprende la inoculación en la masa antes de la fase de reposo previa al embutido de las cepas *Lactobacillus sakei* CECT 8335 y *Staphylococcus equorum* CECT 8337.

7. Cepa de *Lactobacillus sakei* depositada en la colección española de cultivos tipo con el código CECT 8335.

8. Cepa de la especie de *Staphylococcus equorum* depositada en la Colección española de cultivos tipo con el código CECT 8337.

9. Uso de cultivo iniciador, según reivindicación 1, en la preparación de embutidos crudo-curados.

10. Uso de cultivo iniciador, según reivindicación 1, en la preparación de chorizo.

11. Uso de cultivo iniciador, según reivindicación 1, en la preparación de chorizo gallego.

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201301088

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 20.11.2013

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) **Documentos citados**	**Reivindicaciones afectadas**
X	FONSECA et.al. Effect of different autochthonous starter cultures on the volatile compounds Profile and sensory properties o Galician chorizo, a tradicional Spanish dry fermented sausage. Food Control, Septiembre 2013, vol. 33, nº 1, pp. 6-14. Pág.7, apartado 2.2; pág.13, apartado 4.	1-11
X	FONSECA et.al. Use of molecular methods to characterize the bacterial community and monitor different native starter cultures throughout the ripening of Galician chorizo. Food Microbiology, Mayo 2013, vol. 34, nº 1, pp. 215-226. Pág.216, apartado 2.1.	1-11

Categoría de los documentos citados
X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	**Examinador**	**Página**
21.02.2014	J. López Nieto	1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N1/20 (2006.01)
A23L1/317 (2006.01)
C12R1/225 (2006.01)
C12R1/44 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A23L, C12N, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.02.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-11	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones		**SI**
	Reivindicaciones	1-11	**NO**

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	FONSECA et.al. Effect of different autochthonous starter cultures on the volatile compounds profile and sensory properties o Galician chorizo, a tradicional Spanish dry fermented sausage. Food Control, Septiembre 2013, vol. 33, nº 1, pp. 6-14. Pág.7, apartado 2.2; pág.13, apartado 4.	
D02	FONSECA et.al. Use of molecular methods to characteze the bacterial community and monitor different native starter cultures throughout the ripening of Galician chorizo. Food Microbiology, Mayo 2013, vol. 34, nº 1, pp. 215-226. Pág.216, apartado 2.1.	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

Las reivindicaciones 1-3 tienen por objeto un cultivo iniciador de productos cárnicos procesados, que comprende la cepa de Lactobacillus sakei y Staphylococcus equorum depositada en la colección española de cultivos tipo con los códigos CECT 8335 y CECT 8337 respectivamente.
Las reivindicaciones 4 y 5 tienen por objeto un procedimiento para la elaboración de productos cárnicos procesados que comprende inocular en la masa cárnica una cantidad efectiva de las cepas Lactobacillus sakei CECT 8335 y Staphylococcus equorum CECT 8337, antes de la fase de reposo previa al embutido.
La reivndicación 6 se refiere a un chorizo obtenido con el procedimiento anterior.
Las reivindicaciones 6 y 7 se refieren a las cepas de Lactobacillus sakei CECT 8335 y Staphylococcus equorum CECT 8337 por separado.
Las reivindicaciones 9-11 se refieren al uso del cultivo iniciador anterior para la preparación de embutidos crudo-curados.
Los documento D01 y D02 dan a conocer cultivos iniciadores para la elaboración de chorizo gallego que están formados por las cepas Lactobacillus sakei LS131 y Staphylococcus equorum SA25. L. sakei LS31 fue añadido al cultivo en una cantidad de 106 CFU/g y S. equorum SA25 en una cantidad de 107 CFU/g. El cultivo se inocula en la masa cárnica antes de la fase de reposo previa al embutido (D01, pág.7, apartado 2.2; pág.13, apartado 4) (D02, pág.216, apartado 2.1)
Ninguno de los documentos citados en el informe sobre el estado de la técnica menciona los mismos códigos de depósito que los que aparecen en la primera reivindicación de la solicitud. Dado que no se puede afirmar que las cepas de la solicitud sean las mismas que las ya conocidas, se considera que las reivindicaciones 1-11 cumplen el requisito de novedad según el Art. 6.1 de la Ley de Patentes 11/86.
Por otro lado, del estado de la técnica divulgado por D01 y D02 se conocen los cultivos iniciadores para la elaboración de chorizo gallego formados por cepas de Lactobacillus sakei LS131 y Staphylococcus equorum SA25. L.sakei LS31. Para que las cepas de Lactobacillus sakei CECT 8335 y Staphylococcus equorum CECT 8337 por separado o el cultivo iniciador formado por ambas tengan actividad inventiva debe señalarse algún efecto técnico inesperado que se haya detectado en la elaboración de productos cárnicos procesados utilizando el cultivo iniciador o las cepas en estudio, comparándolos con los dados a conocer por D01 y D02. En ausencia de este efecto técnico, se considera que las reivindicaciones 1 y 7-8 no cumplen el requisito de actividad inventiva según el Art. 8.1 de la Ley de Patentes 11/86.
En cuanto a las reivindicaciones 2 y 3 no hay ningún argumento que indique que los cultivos y cepas divulgados en D01 y D02 no puedan ser congelados o liofilizados. Por lo tanto no cumplen el requisito de actividad inventiva según el Art. 8.1 de la Ley de Patentes 11/86.
Las reivindicaciones 4-6 y 9-11 no cumplen el requisito de actividad inventiva según el Art. 8.1 de la Ley de Patentes 11/86 ya que se consideran obvias para un experto en la materia a la vista del estado de la técnica dado a conocer por D01 y D02.