

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 006**

51 Int. Cl.:

A23B 4/22 (2006.01)

A23L 1/318 (2006.01)

C12R 1/44 (2006.01)

C12P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2008 E 08875963 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015 EP 2373175**

54 Título: **Composiciones bacterianas de Staphylococcus vitulinus que tienen actividad nitrato reductasa y de bacterias acidolácticas y métodos que usan estas composiciones**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.12.2015

73 Titular/es:

**DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS
(100.0%)
Langebrogade 1, Postboks 17
1001 Copenhagen K., DK**

72 Inventor/es:

**GILET, LIONEL;
DE LAMARLIERE, CAROLINE;
PERRIN, MARTINE y
FOURCASSIE, PASCAL**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 555 006 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

Composiciones bacterianas de *Staphylococcus vitulinus* que tienen actividad nitrato reductasa y de bacterias acidolácticas y métodos que usan estas composiciones

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para convertir nitratos a nitritos y a composiciones específicas de bacterias y a su uso para desarrollar el color rojo de un producto alimentario que contiene mioglobina.

10 Antecedentes de la invención

Las bacterias acidolácticas se usan habitualmente como fermentos durante la fabricación de ciertos productos alimentarios, tales como productos a base de leche (yogures, quesos, etc.), productos de repostería, vino y productos cárnicos. En particular, estas bacterias se usan por su capacidad acidificante. De hecho, las bacterias acidolácticas son capaces de convertir azúcares (glucosa, lactosa, etc.) en ácido láctico u otros ácidos tales como acetato, provocando de esa forma un descenso del pH.

15 Otros tipos de bacterias también se usan habitualmente como fermentos; en particular, bacterias que muestran actividad nitrato reductasa (ANR), tales como ciertas bacterias del género *Staphylococcus*. Estas bacterias juegan un importante papel en la industria agroalimentaria. Además de su posible uso para sazonar los alimentos, estas bacterias pueden participar en los procesos de conversión de nitritos a nitratos y, más ampliamente, durante un proceso de fabricación de productos alimentarios que incluyan dicha etapa. De hecho, las bacterias que tienen ANR pueden participar en la coloración de productos alimentarios que comprenden mioglobina, independientemente de si dichos productos sufren una etapa de cocinado.

20 Gracias al uso de bacterias que tienen ANR, en combinación con nitratos que éstas convertirán a nitritos (producción *in situ* de nitritos), es posible reducir la cantidad de nitritos usados para la fabricación de productos alimentarios tales como productos curados, o incluso eliminar la introducción de nitritos químicos. De hecho, es deseable limitar la cantidad de nitritos añadidos, ya que pueden reaccionar con otros compuestos para formar nitrosaminas, que se sabe que son carcinogénicas.

25 Las combinaciones bacterianas que comprenden bacterias acidolácticas junto con bacterias que tienen ANR también se han desarrollado y se han utilizado como fermentos durante la fabricación de productos alimentarios.

35 En la publicación de Hugas y J.M. Monfort, titulada "Bacterial starter cultures for meat fermentation" ("Inóculos bacterianos para la fermentación de la carne"), publicada en Food Chemistry, volumen 59, 4, páginas 547-557, 1997, se menciona que, en la industria de los embutidos fermentados, el uso de fermentos que consisten en una mezcla de cepas de bacterias acidolácticas con bacterias que tienen actividad nitrato reductasa está bien establecido. Dichas mezclas bacterianas también se divulgan en un libro de J. Bacus, titulado "*Utilization of microorganisms in meat processing, a handbook for meat plant operators*" ("Utilización de microorganismos en el procesamiento de la carne, manual para los operarios de plantas cárnicas"), publicado en 1984 por la editorial Research Studies Press Ltd.

40 Sin embargo, dichas combinaciones no siempre son ventajosas. Por ejemplo, una publicación de LH Stanke, titulada "Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredient levels" ("Embutidos deshidratados fermentados con *Staphylococcus xylosus* a diferentes temperaturas y con diferentes niveles de ingredientes"), publicada en 1995, en Meat Science, volumen 41, nº 2, páginas 179-191, divulga embutidos que incorporan *Staphylococcus xylosus* con diversos elementos, como la bacteria acidificante *Pediococcus pentosaceus*. Se ensayan varias temperaturas. El estudio revela que la mejor temperatura es 30 °C y no se recomienda el uso de la bacteria acidoláctica con *Staphylococcus xylosus*, ya que las bacterias acidolácticas parecen jugar un papel inhibitorio.

45 En la técnica previa existente, que combina tanto *Staphylococcus* como bacterias acidolácticas, las bacterias acidolácticas se usan por su capacidad acidificante, y las cepas de *Staphylococcus* se usan por su ANR.

50 En la publicación de Drosinos y cols., titulada "Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in southern Greece" ("Diversidad fenotípica y tecnológica de las bacterias acidolácticas y estafilococos aislados de embutidos fermentados de forma tradicional en el sur de Grecia"), publicada en *Food Microbiology*, volumen 24, páginas 260-270, 2007, se menciona que en las salchichas fermentadas de forma tradicional están presentes varios cientos de bacterias acidolácticas y estafilococos, de las cuales *Staphylococcus vitulinus* representa sólo una minoría. Este documento no menciona la actividad reductora de nitrato a bajas temperaturas de *Staphylococcus vitulinus*

Sumario de la invención

En la presente invención, los inventores divulgan una sinergia sorprendente: las bacterias acidolácticas, o incluso un medio que ha estado en contacto con bacterias acidolácticas, pueden incrementar la actividad nitrato reductasa (ANR) de las bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus*. Este efecto presenta grandes ventajas para la industria agroalimentaria. Primero, mejora el rendimiento de los procesos de conversión de nitrito a nitrato. Después, acelera el desarrollo del color rojo de un producto alimentario que contiene hemoglobina.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere, por tanto, a un método para convertir nitratos a nitritos, donde las bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus*, que tienen actividad nitrato reductasa (ANR), convierten los nitratos a nitritos en presencia de bacterias acidolácticas, a un pH comprendido entre 5,2 y 9, como se define en las reivindicaciones.

La invención también se refiere al uso de bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus*, que tienen actividad nitrato reductasa (ANR) para convertir nitratos a nitritos en presencia de bacterias acidolácticas, a un pH comprendido entre 5,2 y 9, como se define en las reivindicaciones.

La presente invención se refiere, por tanto, a un método para convertir nitratos a nitritos, donde las bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus*, que tienen actividad nitrato reductasa (ANR), convierten los nitratos a nitritos, en presencia de un medio que ha estado en contacto con bacterias acidolácticas y está sustancialmente libre de bacterias, a un pH comprendido entre 5,2 y 9, como se define en las reivindicaciones.

La invención también se refiere al uso de bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus*, que tienen actividad nitrato reductasa (ANR) para convertir nitratos a nitritos en presencia de un medio que ha estado en contacto con bacterias acidolácticas y está sustancialmente libre de bacterias, a un pH comprendido entre 5,2 y 9, como se define en las reivindicaciones. Otro objeto de la invención es el uso de bacterias acidolácticas, o de un medio que ha estado en contacto con bacterias acidolácticas y está sustancialmente libre de bacterias, para incrementar la actividad nitrato reductasa (ANR) de las bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus*, en presencia de nitratos, a un pH comprendido entre 5,2 y 9, como se define en las reivindicaciones.

Tal como se usa en el presente documento, con el término "bacterias" se quiere decir una o varias bacterias, es decir, que puede referirse tanto a una como a varias células de una cepa bacteriana dada, como a bacterias de varias cepas bacterianas

La expresión "bacterias que tienen actividad nitrato reductasa (ANR)", tal como se usa en el presente documento, se refiere a bacterias que son capaces de convertir nitratos a nitritos

La ANR puede medirse de acuerdo con un ensayo A, que se lleva a cabo de la forma siguiente:

El ensayo A, realizado a una temperatura dada T, comprende las tres etapas siguientes:

- Etapa 1: Se hidratan 10 g de la bacteria del ensayo en forma liofilizada, en 90 g de medio líquido salino de triptona, que comprende 0,9% en peso de NaCl y 1% en peso de triptona de caseína, a temperatura ambiente durante 10 minutos, con agitación a 200 rpm.

- Etapa 2: Se diluye un volumen de 1 ml de la mezcla obtenida en la etapa 1 en 50 ml de un medio de reacción que comprende:

45 ml de tampón fosfato a un pH de 6,9, a una concentración de 0,1 M;
entre 0,5 g y 3 g de NaCl;
entre 0,5 y 1,5 g de glucosa, sacarosa y/o lactosa;
0,15 g de KNO₃ o NaNO₃;
y triptona sal csp 50 ml

La mezcla completa se incuba después durante un periodo t (expresado en horas o minutos), a temperatura T (t depende de la temperatura T dada).

- Etapa 3: Los nitritos producidos se someten a ensayo mediante el método del reactivo de Griess-Llosvays (de acuerdo con "Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction", P.J. Gonzalez et al., 2006, J. of Inorganic Biochemistry, 100, 1015-1023) y se calcula la velocidad de reacción.

La velocidad de reacción se evalúa midiendo en el punto final la cantidad de nitrito NO₂⁻ producido. Se estima que la reacción es equimolar entre el nitrato NO₃⁻ convertido y el nitrito NO₂⁻ producido.

Se expresa en μg de NO_3^- convertido por minuto y por 10^{11} ufc (que significa “unidades formadoras de colonias”). Corresponde a la velocidad inicial de conversión de nitratos a nitritos. La persona experta determinará los valores del periodo t dependiendo de los valores de temperatura T que elija.

El periodo t será de 16 horas cuando T sea inferior a 20°C (por ejemplo, 4°C u 11°C).

5 El periodo t será de 1 hora y media cuando T sea 25°C . El periodo t será de 30 minutos cuando T sea 44°C .

Ventajosamente, el efecto sinérgico descubierto por los inventores se observa a lo largo de un amplio intervalo de temperaturas, incluyendo, sorprendentemente temperaturas bajas. La temperatura puede ser inferior a 16°C . Sorprendentemente, el efecto sinérgico también puede observarse cuando la temperatura está comprendida entre 4°C y 11°C .

10 La conversión de nitratos a nitritos por las bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus* y que tienen ANR en presencia de bacterias acidolácticas (respectivamente, un medio que ha estado en contacto con bacterias acidolácticas y está sustancialmente libre de bacterias) se lleva a cabo a temperatura baja, tal como 16°C , 11°C , o incluso 4°C

15 Por “temperatura baja” se quiere indicar una temperatura inferior o igual a la temperatura ambiente, preferentemente inferior o igual a 25°C , preferentemente inferior o igual a 20°C , aún más preferentemente inferior o igual a 16°C a 14°C , de 11°C a 8°C o 4°C .

20 De acuerdo con esto, las bacterias que tienen ANR y pertenecen a la especie *Staphylococcus vitulinus*, tienen una ANR significativa a baja temperatura.

25 La expresión “bacterias que tienen ANR significativa a baja temperatura” quiere decir una bacteria que tiene una ANR mayor o igual a $50 \mu\text{g}$ de NO_3^- convertido por minuto y por 10^{11} ufc, de acuerdo con el ensayo A realizado a $T=11^\circ\text{C}$.

30 Ventajosamente, las bacterias que tienen ANR y pertenecen a la especie *Staphylococcus vitulinus* pueden mostrar una ANR mayor o igual a $56 \mu\text{g}$ de NO_3^- convertido por minuto y por 10^{11} cfu, preferentemente mayor o igual a $70 \mu\text{g}$ de NO_3^- convertido por minuto y por 10^{11} cfu, o aún más preferentemente, mayor o igual a $80 \mu\text{g}$ de NO_3^- convertido por minuto y por 10^{11} cfu, de acuerdo con el ensayo A realizado a $T=11^\circ\text{C}$.

Ventajosamente, las bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus* pueden mostrar una ANR mayor o igual a $4 \mu\text{g}$ de NO_3^- convertido por minuto y por 10^{11} ufc, de acuerdo con el ensayo A realizado a $T=4^\circ\text{C}$.

35 Preferentemente, las bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus* pueden mostrar una ANR mayor o igual a $15 \mu\text{g}$ de NO_3^- convertido por minuto y por 10^{11} ufc, aún más preferentemente mayor o igual a $25 \mu\text{g}$ de NO_3^- convertido por minuto y por 10^{11} ufc de acuerdo con el ensayo A realizado a $T=4^\circ\text{C}$.

40 Esto presenta una ventaja sobre los métodos para convertir nitratos a nitritos divulgados en la técnica anterior, donde la reducción de nitrato a nitrito se realiza generalmente a temperatura ambiente o a temperaturas mayores. De hecho, la ANR de bacterias que tienen dicha actividad se observa generalmente a temperaturas comprendidas entre 35°C y 48°C en la técnica anterior.

Sin embargo, los métodos de fabricación que requieren una conversión de nitrato a nitrito a altas temperaturas son más costosos y más difíciles de ejecutar que los métodos que pueden llevarse a cabo a temperatura ambiente.

45 Además, el uso de temperatura ambiente o superiores durante los procesos de fabricación de productos alimentarios puede resultar inadecuado, ya que tales temperaturas pueden promover el desarrollo de ciertas bacterias patógenas tales como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Campylobacter jejunii*).

50 Las bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus* y que tienen actividad nitrato reductasa pueden estar en forma de estabilización industrial, de acuerdo con los métodos conocidos por los expertos en la técnica. De hecho, las bacterias pueden estar en forma deshidratada (deshidratadas mediante atomización, liofilización, calentamiento, etc.), en forma congelada, en forma concentrada líquida, etc. En una realización preferida, las bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus* están en forma liofilizada. Cuando este no sea el caso, la determinación de su ANR de acuerdo con el ensayo A será posible a través de una etapa previa que consiste en convertirlas en forma liofilizada, de acuerdo con los métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

60 En una realización preferida, las bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus* y que tienen actividad nitrato reductasa son la cepa de *Staphylococcus vitulinus* depositada según el Tratado de Budapest, en la *COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES* (CNCM) [Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, Francia] por Danisco Francia SAS, 20 rue de Brunel, 75017 Paris el 25 de abril de 2007 y que tiene el número CNCM I-3751.

65 El método de acuerdo con la invención puede usar, además de *Staphylococcus vitulinus*, otras bacterias que tengan actividad nitrato reductasa, tales como, por ejemplo, *Staphylococcus carnosus* y/o *Staphylococcus xylosum*.

- 5 En una realización, el método puede usar bacterias que tengan ANR y pertenezcan a la especie *Staphylococcus vitulinus* con la cepa de *Staphylococcus carnosus* depositada en el CNCM según el Tratado de Budapest por Danisco Francia SAS, el 12 de octubre de 2007 y que tienen el número CNCM I-3844 y/o la cepa de *Staphylococcus xylosus* depositada en el CNCM según el Tratado de Budapest por Danisco Francia SAS, el 12 de octubre de 2007 y que tiene el número CNCM I-3845.
- En una realización específica, la cepa CNCM I-3751 de *Staphylococcus vitulinus* y la cepa CNCM I-3844 de *Staphylococcus carnosus* se mezclan.
- 10 En otra realización específica, la cepa CNCM I-3751, de *Staphylococcus vitulinus* y la cepa CNCM I-3845 de *Staphylococcus xylosus* se mezclan.
- En otra realización específica, la cepa CNCM I-3751 de *Staphylococcus vitulinus* y la cepa CNCM I-3844 de *Staphylococcus xylosus* se mezclan.
- 15 Los nitratos útiles para los métodos de acuerdo con la invención pueden ser de origen natural o químico.
- Los nitratos pueden ser de origen químico. Pueden ser, por ejemplo, nitrato de potasio, nitrato de sodio, salitre, y mezclas de los mismos.
- 20 Sin embargo, los nitratos son preferentemente de origen natural. Preferentemente son proporcionados por al menos una planta y/o un extracto de al menos una planta. La planta se selecciona ventajosamente de plantas que, de manera natural, son ricas en nitratos. Cabe mencionar, por ejemplo puerro, apio, cebolla, espinaca, col, etc.
- Los nitratos pueden proporcionarse en forma líquida y/o sólida.
- 25 Los nitratos pueden estar contenidos en una preparación líquida, en la que se hayan recuperado, en la que se hayan introducido y/o en la que se hayan concentrado, en particular después de la extracción a partir de una fuente natural de nitratos. Puede ser, por ejemplo, un caldo de al menos una planta que, de manera natural, es rica en nitratos.
- 30 En una realización específica, la preparación líquida de nitratos es una preparación líquida tamponada, es decir, un medio neutro que contiene nitratos que se han recuperado, introducido y/o concentrado, en particular después de la extracción a partir de una fuente natural de nitratos, tales como, por ejemplo, a partir de al menos una planta que, de manera natural, es rica en nitratos.
- 35 Los nitratos también pueden proporcionarse en forma sólida, en particular, a partir de al menos una planta o una parte de una planta que, de manera natural, es rica en nitratos. Puede ser, por ejemplo, una hoja de puerro o de espinaca, un fragmento de apio, de cebolla o de col, etc.
- Los nitritos derivados de la conversión pueden, por ejemplo, jugar un papel como agentes conservantes.
- 40 La conversión de nitratos a nitritos por bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus* y que tienen ANR en presencia de bacterias acidolácticas (respectivamente, un medio que ha estado en contacto con bacterias acidolácticas y está sustancialmente libre de bacterias) se lleva a cabo a un pH comprendido entre 5,2 y 9, preferentemente a un pH comprendido entre 5,4 y 8, para que se produzca la conversión.
- 45 Por lo general, el pH es superior o igual a 5,2, preferentemente superior o igual a 5,4, aún más preferentemente superior o igual a 5,6.
- Por lo general, el pH de acuerdo con la invención es inferior o igual a 9, preferentemente inferior o igual a 8, aún más preferentemente inferior o igual a 7,4.
- En una realización preferida, el pH está en torno a 6,9.
- 50 Para mantener el pH en un valor entre 5,2 y 9 (o en cualquier valor preferido mencionado anteriormente), puede utilizarse un medio tamponado. El medio tamponado puede ser, por ejemplo, un tampón fosfato.
- 55 La expresión "bacterias acidolácticas" tiene su significado general en la técnica. Se refiere a bacterias que son capaces de convertir azúcares (glucosa, lactosa, etc.) en ácido láctico u otros ácidos, tales como acetato, provocando de esa forma un descenso en el pH, a menos que dicho pH se tampone por otros medios.
- 60 De acuerdo con una realización de la invención, la conversión de nitratos a nitritos se lleva a cabo en presencia de bacterias acidolácticas. El medio de cultivo y/o fermentación de dichas bacterias acidolácticas también puede estar presente.
- Las bacterias acidolácticas pueden utilizarse con su medio de cultivo y/o fermentación. El medio puede ser líquido o sólido. Las bacterias y los metabolitos producidos por estas bacterias durante la fermentación y/o el cultivo están presentes o dispersos en el medio de fermentación y/o cultivo en el que se colocaron inicialmente.
- 65 Las bacterias acidolácticas pueden ser bacterias vivas. También pueden haberse inactivado después de la fermentación y/o el cultivo mediante tratamiento con calor, mediante tratamiento químico y/o mediante tratamiento

mecánico, tales como los tratamientos conocidos y utilizados por los expertos en la técnica. Tales tratamientos pueden inducir o no la degradación de las bacterias acidolácticas.

5 Estas bacterias que también pueden haberse concentrado, es decir, después del cultivo y/o la fermentación, en un medio apropiado, se han recuperado en una etapa de "cosecha de biomasa", de acuerdo con las técnicas conocidas por los expertos en la técnica (tras centrifugación, filtración, destilación, etc). Después, pueden estar en forma concentrada líquida.

10 En una variante de la invención, estas bacterias pueden estar en forma de estabilización industrial, es decir, que han sufrido una etapa de conservación (independientemente de si se han concentrado o no) de acuerdo con las técnicas conocidas por los expertos en la materia. Pueden estar en forma deshidratada, es decir, que han sufrido una etapa de deshidratación (mediante atomización, liofilización, calentamiento, etc.). Las bacterias acidolácticas también pueden estar en forma congelada. En una realización preferida, las bacterias acidolácticas están ventajosamente en forma liofilizada.

15 Cuando las bacterias acidolácticas se concentran y/o estabilizan, parte del medio de fermentación y/o cultivo, con las bacterias y sus metabolitos producidos durante la fermentación y/o cultivo, aún permanecen.

20 La proporción de la cantidad de bacterias que tienen ANR y pertenecen a la especie

Staphylococcus vitulinus, y la cantidad de bacterias acidolácticas para el método de acuerdo con la invención puede estar entre 1:100 y 1:0,01, preferentemente entre 1:10 y 1:0,1. Puede estar entre 1:5 y 1:0,5, o, además, entre 1:1 y 1:0,7.

25 La conversión de nitratos a nitritos de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo en una solución que comprenda entre 10^9 y 8×10^{12} ufc/g de bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus*, y entre 10^9 y 8×10^{12} ufc/g de bacterias acidolácticas.

30 En una realización preferida, las bacterias acidolácticas se seleccionan de un grupo que consiste en bacterias del género *Lactococcus*, bacterias del género *Pediococcus*, y mezclas de los mismos. Pueden seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en las especies *Lactococcus Lactis*, *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus pentasaceus*, solas o en combinación.

35 Otras bacterias acidolácticas pueden combinarse con *Pediococcus* y/o *Lactococcus* a fin de formar la preparación bacteriana. Pueden ser *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Vagococcus*, *Bifidobacterium*, etc.

En una realización, las bacterias acidolácticas no pertenecen a la subespecie *Streptococcus lactis subsp. diacetylactis*, también conocida como *Lactococcus lactis subsp diacetylactis*,

40 En una realización preferida, las bacterias acidolácticas pertenecen a la especie *Pediococcus acidilactici*.

En una realización preferida, las bacterias acidolácticas son la cepa de *Pediococcus acidilactici* depositada en el CNCM según el Tratado de Budapest por Danisco Francia SAS, 20 rue Brunel 75017 PARIS, el 9 de diciembre de 2008, y que tiene el número CNCM I-4098.

45 En una realización preferida, las bacterias acidolácticas muestran una baja capacidad acidificante a baja temperatura

50 Para medir la capacidad acidificante de una bacteria puede usarse el ensayo B, y puede usarse, por ejemplo, el programa CINAC (cinética de acidificación). El ensayo B es el siguiente:

1) Preparación de un medio a base de extracto de carne. Los siguientes ingredientes se mezclan en un vaso de precipitado: 200 g de extracto de carne en polvo (extracto usado para la preparación de medios de cultivo para control bacteriológico, y que puede obtenerse de las compañías Difco LTD, Organo Technie, Solabia, etc.), 6 g de glucosa anhidra, 10,52 g de monohidrato de lactosa, 4 o 5 gotas de un antiespumante, y se añaden aproximadamente 700 ml de agua destilada. Se mezcla todo y, después, se lleva el volumen a 1000 ml con agua destilada.

2) Inoculación de la bacteria acidoláctica e incubación
60 Cuando la bacteria acidoláctica está presente en forma liofilizada, se hidratan 5 g en 45 g de medio líquido de triptona sal que comprende 0,9% en peso de NaCl y 1% en peso de triptona de caseína, a temperatura ambiente durante 15 minutos, con agitación a 200 rpm.

El nivel de inoculación del medio a base de extracto de carne se ajusta para obtener una concentración inicial de bacterias acidolácticas de 6×10^6 ufc/ml de medio a base de extracto de carne.

65 La actividad acidificante se refleja registrando continuamente el pH durante un cierto periodo, a una temperatura de incubación dada.

5 Con la expresión “bacteria acidoláctica que tiene una baja capacidad acidificante a baja temperatura” se quiere indicar una bacteria acidoláctica que tiene una capacidad acidificante inferior a 0,25 U pH (unidades de pH) después de 4 días de incubación a 11 °C. La bacteria acidoláctica también puede mostrar una capacidad acidificante inferior a 0,20 U pH después de 4 días de incubación a 11 °C, preferentemente una capacidad acidificante inferior a 0,15 U pH después de 4 días de incubación a 11 °C.

10 También puede tener una capacidad acidificante inferior a 0,1 U pH después de 4 días de incubación cuando la temperatura es igual a 4°C, preferentemente inferior a 0,1 U pH después de 6 días de incubación cuando la temperatura es igual a 4 °C, preferentemente inferior a 0,1 U pH después de 8 días de incubación cuando la temperatura es igual a 4 °C, más preferentemente inferior a 0,1 U pH después de 10 días de incubación cuando la temperatura es igual a 4 °C.

15 De acuerdo con otra realización de la invención, la composición usada para convertir nitratos a nitritos comprende un medio que ha estado en contacto con bacterias acidolácticas y está sustancialmente libre de bacterias, en lugar de las propias bacterias acidolácticas (donde también puede estar presente su medio de fermentación y/o cultivo). Las bacterias acidolácticas preferidas útiles para preparar dicho medio son las que se definen anteriormente para las realizaciones que usan las propias bacterias acidolácticas.

20 En una realización preferida, el medio que ha estado en contacto con bacterias acidolácticas y está sustancialmente libre de bacterias es un medio líquido.

25 El medio que ha estado en contacto con bacterias acidolácticas y está sustancialmente libre de bacterias también puede ser un medio en polvo o un medio deshidratado. Dicho medio podría obtenerse a partir de un medio líquido, después de una etapa de deshidratación, por ejemplo. Finalmente, podría rehidratarse después para proporcionar otra vez un medio líquido.

30 La expresión “sustancialmente libre de bacterias”, cuando se aplica a un medio líquido se refiere a cualquier medio líquido que contiene no más 100 ufc/ml, preferentemente no más de 50 ufc/ml, preferentemente no más de 10 ufc/ml preferentemente no más de 1 ufc/ml, preferentemente no más de 1 ufc/10ml. Alternativamente, cuando se aplica a un medio en polvo o deshidratado, se refiere a un medio que contiene no más de 100 ufc/mg, preferentemente no más de 50 ufc/mg, preferentemente no más de 10 ufc/mg, preferentemente no más de 1 ufc/mg, aún más preferentemente no más de 1 ufc/10mg.

35 El término “medio” quiere decir medio de cultivo y/o medio de fermentación.

40 Con la expresión “medio de cultivo” se quiere indicar un medio que permite el desarrollo de la biomasa. Contiene una fuente de hidratos de carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de fósforo, una fuente de vitaminas y una fuente de minerales.

45 Con la expresión “medio de fermentación” se quiere indicar un medio de fermentación que permite la producción de metabolitos bacterianos y/o el crecimiento de la biomasa. Contiene una fuente de hidratos de carbono y/o una fuente de nitrógeno, y/o una fuente de fósforo, y una fuente de vitaminas y una fuente de minerales.

Un medio dado puede ser tanto un medio de cultivo como un medio de fermentación.

La composición del medio de fermentación y/o del medio de cultivo, y también las condiciones para llevar a cabo la fermentación/ cultivo, pueden ser las siguientes:

50 - Cantidad de bacterias acidolácticas añadidas al medio de fermentación y/o medio de cultivo:

Entre 10^6 ufc/ml and 10^{12} ufc/ml cuando el medio de cultivo es líquido
Entre 10^8 ufc/ml and 10^{14} ufc/cm² cuando el medio de cultivo es sólido

55 - Composición del medio de fermentación y/o cultivo en el estado líquido:
El medio de fermentación y/o cultivo comprende al menos:

60 Entre 1 mg/l y 100 g/l de hidratos de carbono (polioles , polisacáridos, pentosas, hexosas y derivados, ácidos grasos, etc.);
Entre 1 mg/l y 100 g/l de sustancias nitrogenadas (peptonas, extracto de levadura, proteínas hidrolizadas, proteínas, péptidos, aminoácidos, bases nitrogenadas y derivados, etc.);
Entre 1 µg/l y 10 g/l de sustancias que contienen fósforo (fosfato diamónico, fosfato mineral inorgánico, fosfato natural, etc.);
65 Entre 1 µg/l y 10 g/l de minerales (Mn, Mg, Cu, Zn, Mo, Ca, Na, Cl, Fe, Co, S, K, Li, Se, Cr, Ni, Pt, Ag, Cd, Al, etc.);

ES 2 555 006 T3

Entre 1 µg/l y 1 g/l of vitaminas (B12, biotina, nicotinamida, ácido pantoténico, vitaminas del grupo B, vitaminas del grupo D, vitamina E, vitamina A, etc.)

- 5 - Composición del medio de fermentación y/o cultivo en el estado sólido:

El medio de fermentación y/o medio de cultivo comprende al menos los elementos presentes en el medio en el estado líquido, al que se añade un agente gelificante, cuya cantidad depende de la fuerza de gelificación deseada (entre 1% y 15% (m/v)). Puede ser agar, agarosa, gomas, alginatos, etc.

- 10 - Condiciones de funcionamiento:

El tiempo de fermentación oscila entre 2 h y 5 días.

La fermentación se lleva a cabo entre 4 °C y 45 °C.

- 15 El pH está comprendido entre 1,5 y 9,5

Cuando el medio de fermentación es líquido, es posible agitarlo mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica (uso de palas, un agitador vorticial, mediante burbujeo, etc).

- 20 Dado que las bacterias acidolácticas son bacterias facultativas y anaerobias, estas pueden usarse preferentemente en condiciones anaerobias o en condiciones microanaerobias.

El medio líquido puede ser, por ejemplo, un sobrenadante, un filtrado o un destilado que puede obtenerse:

- 25 α) a partir de un medio de fermentación y/o cultivo, en el cual se colocaron inicialmente las bacterias acidolácticas

β o después de haber devuelto a la solución las bacterias acidolácticas que pueden haberse concentrado o no, como se describe anteriormente, se hayan sometido o no a un proceso de estabilización

- 30 En este caso, contiene sólo las sustancias secretadas por las bacterias acidolácticas durante la fermentación y/o el cultivo, y elementos del medio de fermentación sólido o líquido, y está sustancialmente libre de bacterias.

En el caso α), después de un tiempo de fermentación de al menos 2 h a una temperatura de entre 4 °C y 65 °C, las bacterias acidolácticas se retiran físicamente.

- 35 Cuando el medio de fermentación sea un medio en estado sólido, las bacterias acidolácticas pueden rasparse de la superficie del medio usando cualquier tipo de espátula adecuada.

- 40 Cuando el medio de fermentación sea un medio en estado líquido, las bacterias acidolácticas pueden retirarse mediante métodos conocidos por los expertos en la materia, tales como centrifugación, filtración, destilación, etc. Es posible utilizar estos métodos solos o en combinación.

El sobrenadante es el medio líquido del cual se han retirado las bacterias por centrifugación. Puede usarse, por ejemplo, una centrífuga con fuerza gravitacional de entre 400 y 65.000 g, preferentemente entre 4000 y 10.000 g.

- 45 El filtrado, también denominado "licor de cultivo" es el líquido recuperado después de que el medio líquido se ha filtrado a través de un filtro de porosidad adecuada.

- 50 El destilado es el líquido obtenido después de que el medio de cultivo y/o de fermentación se haya hervido y, después, de que el vapor obtenido (que comprende en particular, agua y compuestos volátiles), se haya condensado mediante un condensador.

- 55 También es posible obtener un medio líquido que esté sustancialmente libre de bacterias y que haya estado en contacto con bacterias acidolácticas, después de haber devuelto a la solución las bacterias acidolácticas: éste es el caso β). Estas bacterias pueden haberse concentrado o no, como se describe anteriormente, y haberse sometido o no a un proceso de estabilización. Como se describe anteriormente, después de haber cultivado y/o fermentado las bacterias acidolácticas en su medio de fermentación y/o cultivo, dichas bacterias pueden haberse concentrado. Es, por tanto, posible devolverlas a la solución de acuerdo con las técnicas conocidas por los expertos en la técnica (dilución, etc.), a fin de recrear, en cierto modo, un nuevo medio de fermentación y/o cultivo en el que finalmente se dispersan las bacterias acidolácticas. Después, de la misma manera que en el caso α), puede obtenerse un sobrenadante, un filtrado o un destilado.

- 60 Aún en el caso β), el medio líquido también puede obtenerse a partir de bacterias que se han sometido a una etapa de conservación (se hayan concentrado o no). De hecho, también es posible devolver las bacterias concentradas a la solución mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica (por descongelación cuando las bacterias se han congelado, por rehidratación cuando se han deshidratado, etc.)

65

En un ejemplo específico es posible obtener un medio líquido, y en particular un sobrenadante, un filtrado o un destilado, a partir de bacterias liofilizadas. Pueden, por ejemplo, rehidratarse en un medio adecuado, tal como, por ejemplo, medio líquido de tripton sal, que comprende 0,9% en peso de NaCl, 1% en peso de tripton de caseína y, después, pueden aplicarse métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como centrifugación, filtración, destilación, etc., los cuales pueden ser acumulativos a fin de obtener un sobrenadante, un filtrado o un destilado.

En particular, el método divulgado en el Ejemplo 2)b) puede usarse para obtener un medio líquido que haya estado en contacto con bacterias acidolácticas, pero esté sustancialmente libre de bacterias.

Como ya se ha mencionado, el medio utilizado en la presente invención también puede ser un medio en polvo o un medio deshidratado que podría obtenerse a partir de cualquier medio líquido mencionado anteriormente (por ejemplo, obtenido después de una etapa de deshidratación).

En una realización de la invención, las bacterias acidolácticas (respectivamente, el medio que ha estado en contacto con bacterias acidolácticas y está sustancialmente libre de bacterias) pueden estar presentes junto con las bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus* que tienen ANR en la forma de una composición.

En otra realización, el método comprende la etapa de adición de bacterias acidolácticas (respectivamente, el medio que ha estado en contacto con bacterias acidolácticas y está sustancialmente libre de bacterias) a las bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus* que tienen ANR, antes del paso de conversión de nitratos a nitritos, que se lleva a cabo a un pH entre 5,2 y 9.

En una realización de la invención, los nitratos se añaden a las bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus* que tienen ANR (las bacterias acidolácticas o el medio que ha estado en contacto con las bacterias acidolácticas y está sustancialmente libre de bacterias, estén ya presentes o no) antes de regular el pH a un valor comprendido entre 5,2 y 9.

En otra realización de la invención, los nitratos se añaden a las bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus* que tienen ANR (las bacterias acidolácticas o el medio que ha estado en contacto con las bacterias acidolácticas y está sustancialmente libre de bacterias, estén ya presentes o no) a un pH ya comprendido entre 5,2 y 9.

De acuerdo con la invención, la conversión de nitratos a nitritos tiene lugar al menos cuando las bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus* que tienen ANR están en presencia de las bacterias acidolácticas o el medio que ha estado en contacto con bacterias acidolácticas y está sustancialmente libre de bacterias, nitratos, y a un pH comprendido entre 5,2 y 9).

La invención también se refiere a un método para desarrollar el color rojo y/o aumentar la estabilidad y/o la intensidad del color rojo o de un producto alimentario que contiene mioglobina, donde dicho método comprende la conversión de nitratos a nitritos como se describe anteriormente.

De hecho, la conversión de nitratos a nitritos será más rápida usando el método de la presente invención. Los nitritos obtenidos se convierten en óxidos nítricos, que serán capaces de reaccionar con la mioglobina contenida en el producto alimentario y dar color rojo al producto. Si el proceso para la fabricación del producto alimentario comprende una etapa de calentamiento (después de la etapa de conversión de nitrito a nitrato), el desarrollo del color se promueve después. Si el proceso para la fabricación del producto alimentario comprende una etapa de cocinado (después de la etapa de conversión de nitrito a nitrato), el desarrollo del color se promueve después y el color obtenido es más estable, debido a la desnaturalización de la nitrosomioglobina (NO + mioglobina).

El producto alimentario que contiene mioglobina puede elegirse de productos de origen animal. Puede ser, en particular, cualquier producto a base de carne. Dicha carne puede ser o no picada, con o sin nitratos, con o sin nitritos. Cabe mencionar los productos a base de carne de vacuno (novillo, vaca, ternera, etc.), de carne de cerdo, de carne de ave (pava, pavo, gallina, pollo, pata, pato, etc.), carne de caza (jabalí, cérvidos, etc.) o de cualquier otra categoría de carne (carnero, carne de cordero, carne de conejo, carne de caballo, carne de avestruz, carne de canguro, etc.).

También puede ser cualquier producto a base de pescado, tanto si es pescado de agua dulce, como pescado de agua salada (mares, océanos, etc.), y/o a base de crustáceos. Cabe mencionar, por ejemplo, productos a base de salmón, trucha, atún, tiburón, bacalao, cangrejo, gamba, gambas mediterráneas, langostino, etc.).

De acuerdo con otro objeto de la invención es un método para la fabricación de un producto alimentario, que comprende la conversión de nitratos a nitritos de acuerdo con el método descrito anteriormente.

El producto alimentario puede ser un producto animal como se describe anteriormente, que contiene mioglobina, como se describe anteriormente. También puede ser cualquier producto a base de leche, como quesos, preferentemente quesos madurados.

También puede ser un producto alimentario de origen vegetal, tal como un producto a base de productos vegetales fermentados, tales como el miso. También puede ser a base de soja fermentada, por ejemplo tofu.

El producto alimentario puede ser mezclas de los productos enumerados anteriormente.

En una realización preferida, la invención se refiere a un método para fabricar un producto cárnico.

En una realización preferida, la invención se refiere a un método para fabricar un producto curado, tal como embutidos, carnes para embutidos, jamones, etc.

En otra realización preferida, la invención se refiere a un método para fabricar un producto cárnico cocinado, tal como el jamón cocido.

En una realización, la invención se refiere a un método para fabricar un jamón cocido, que comprende las siguientes etapas:

- Etapa 0= Etapa previa (conversión previa de nitritos a nitratos):

Preparación de la solución

Se mezcla una fuente de nitratos (entre 0,10 % (m/v) y 0,20 % (m/v) de la salmuera) con agua (a una temperatura de 15 °C y que representa entre 9% (m/v) y 14% (m/v) de la salmuera), hasta obtener una mezcla homogénea. Se añade la mezcla de bacterias (entre 0,01% (m/v) y 0,25% (m/v) de la salmuera), como se describe y ejemplifica anteriormente, y la mezcla resultante se mezcla hasta que se obtiene una mezcla homogénea.

La mezcla puede dejarse reposar toda la noche, preferentemente a baja temperatura, es decir, a una temperatura inferior a 16 °C, preferentemente de entre 4 °C y 11 °C.

- Etapa 1: Preparación de la carne

Ésta es la etapa de trinchado, que consiste en retirar la grasa y los tejidos conectivos de una cantidad dada de carne.

- Etapa 2: Triturado

La carne se tritura después como se desee

- Etapa 3: Preparación de la salmuera

Se pesa una cantidad dada de agua (que representa entre un 60 % y un 70 % de la salmuera) y se le añade sal (que representa entre un 12 % y un 24 % de la salmuera). Se mezcla todo hasta que la sal se haya disuelto completamente.

La solución obtenida en la etapa 0, que contiene la fuente de nitratos parcialmente reducidos y las bacterias, y también dextrosa (que representa entre un 3 % y un 9 % de la salmuera) y tripolifosfato de sodio (que representa entre un 0,15 % y un 0,7 % de la salmuera) se añaden y se mezcla todo durante 5 minutos. La temperatura está, generalmente, entre 4 y 11 °C.

- Etapa 4: Inyección

Se inyecta una cantidad definida de salmuera dentro de la carne triturada obtenida en la etapa 2

- Etapa 5: Mezclado (amasado)

Se mezcla todo durante 4 horas a 8 rpm continuamente (vacío al 80 %). La temperatura está generalmente entre 8 y 12 °C.

- Etapa 6: Moldeado y modelado

- Etapa 7: Cocinado

El jamón se cocina a una temperatura circundante de 78 °C hasta alcanzar 72 °C en el centro del producto.

El producto se enfría después mediante aspersion.

En otra realización, la invención se refiere a un método para fabricar un jamón cocinado, sin una etapa de conversión previa de nitratos a nitritos, que comprende las siguientes etapas:

- Etapa 1: Preparación de la carne

Ésta es la etapa de trinchado, que consiste en retirar la grasa y los tejidos conectivos de una cantidad dada de carne.

- Etapa 2: Triturado

La carne se tritura después como se desee

- Etapa 3: Preparación de la salmuera

Se pesa una cantidad dada de agua (que representa entre un 60 % y un 70 % de la salmuera) y se le añade sal (que representa entre un 12 % y un 24 % de la salmuera). Se mezcla todo hasta que la sal se haya disuelto completamente.

La fuente de nitratos (que representa entre un 0,10 % y un 0,20 % de la salmuera), con la mezcla de bacterias (que representa entre un 0,01% y un 0,25% de la salmuera), y también dextrosa (que representa entre un 3 % y un 9 % de la salmuera) y tripolifosfato de sodio (que representa entre un 0,15 % y un 0,7 % de la salmuera) se añaden y se mezcla todo durante 5 minutos. La temperatura está, generalmente, entre 4 y 11 °C.

- Etapa 4: Inyección

Se inyecta una cantidad definida de salmuera dentro de la carne triturada obtenida en la etapa 2

- Etapa 5: Mezclado (amasado)

Se mezcla todo durante 16 horas a 4 rpm de forma discontinua (30 minutos de reposo y 30 minutos en funcionamiento) (vacío al 80 %). La temperatura está, generalmente, entre 8 y 12 °C.

- Etapa 5': Reposo durante 24 h

La temperatura está, generalmente, por debajo de 16 °C, preferentemente entre 4 y 11 °C.

- Etapa 6: Moldeado y modelado

- Etapa 7: Cocinado

El jamón se cocina a una temperatura circundante de 73 °C hasta alcanzar 70 °C en el centro del producto. El producto se enfría después mediante aspersión.

Otro aspecto de la invención tiene que ver con composiciones apropiadas para llevar a cabo el método como se describe anteriormente.

La invención se refiere a una composición que comprende:

- a) bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus* que tienen ANR y
- b) bacterias acidolácticas

La invención se refiere a una composición que comprende:

- a) bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus* que tienen ANR y
- b) bacterias acidolácticas seleccionadas del grupo que consiste en bacterias del género *Lactococcus*, bacterias del género *Pediococcus* y mezclas de las mismas.

Con las expresiones "comprende" o "que comprende" utilizadas en el presente documento, se quiere decir que una composición dada comprende al menos los componentes que se enumeren a continuación. Dicha composición también puede comprender, por tanto, otros componentes adicionales.

A modo de ejemplo, la composición puede comprender:

- a) la cepa de *Staphylococcus vitulinus* depositada con el número CNCM I-3751 y
- b) bacterias acidolácticas seleccionadas del grupo que consiste en bacterias del género *Lactococcus*, bacterias del género *Pediococcus* y mezclas de las mismas

A modo de ejemplo, la composición puede comprender:

- 5 a) bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus* y
b) bacterias pertenecientes a la especie *Pediococcus acidilactici*.

A modo de ejemplo, la composición puede comprender:

- 10 a) la cepa de *Staphylococcus vitulinus* depositada con el número CNCM I-3751 y
b) bacterias pertenecientes a la especie *Pediococcus acidilactici*.

A modo de ejemplo, la composición puede comprender:

- 15 a) bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus*
b) la cepa de *Pediococcus acidilactici* depositada con el número CNCM I-4098.

A modo de ejemplo, la composición puede comprender:

- 20 a) la cepa de *Staphylococcus vitulinus* depositada con el número CNCM I-3751 y
b) la cepa de *Pediococcus acidilactici* depositada con el número CNCM I-4098.

Las bacterias pueden estar en cualquier forma de estabilización industrial, como se describe anteriormente.

La invención también se refiere a una composición que comprende:

- 25 a) bacterias pertenecientes a las especie *Staphylococcus vitulinus* que tienen ANR y
b) un medio que ha estado en contacto con bacterias acidolácticas y está sustancialmente libre de bacterias.

A modo de ejemplo, la composición puede comprender:

- 30 a) bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus* y
b) un medio que ha estado en contacto con bacterias seleccionadas del grupo que consiste en bacterias del género *Pediococcus*, bacterias del género *Lactococcus* y mezclas de las mismas, y está sustancialmente libre de bacterias.

- 35 A modo de ejemplo, la composición puede comprender:
a) la cepa de *Staphylococcus vitulinus* depositada con el número CNCM I-3751 y
b) un medio que ha estado en contacto con bacterias seleccionadas del grupo que consiste en bacterias del género *Pediococcus*, bacterias del género *Lactococcus* y mezclas de las mismas, y está sustancialmente libre de bacterias.

A modo de ejemplo, la composición puede comprender:

- 45 a) la cepa de *Staphylococcus vitulinus* depositada con el número CNCM I-3751 y
b) un medio que ha estado en contacto con bacterias pertenecientes a la especie *Pediococcus acidilactici*, y está sustancialmente libre de bacterias.

A modo de ejemplo, la composición puede comprender:

- 50 a) a) bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus* y
b) b) un medio que ha estado en contacto con la cepa de *Pediococcus acidilactici* depositada con el número CNCM I-4098, y está sustancialmente libre de bacterias.

55 A modo de ejemplo, la composición puede comprender:

- 60 a) la cepa de *Staphylococcus vitulinus* depositada con el número CNCM I-3751 y
b) un medio que ha estado en contacto con la cepa de *Pediococcus acidilactici* depositada con el número CNCM I-4098, y está sustancialmente libre de bacterias.

Preferentemente, el medio que ha estado en contacto con las bacterias acidolácticas es un medio líquido.

Otro objeto de la invención se refiere a bacterias que tienen ANR adecuada para llevar a cabo el método de la invención. En consecuencia, un aspecto de la invención se refiere a la cepa de *Staphylococcus vitulinus* depositada con el número CNCM I-3751. Otro aspecto de la invención se refiere a la cepa de *Staphylococcus carnosus*

65

depositada con el número CNCM I-3844. Otro aspecto de la invención se refiere a la cepa de *Staphylococcus xylosus* depositada con el número CNCM I-3845.

Otro objeto de la invención se refiere a la cepa de *Staphylococcus vitulinus* depositada con el número CNCM I-3751, sola o en combinación con la cepa de *Staphylococcus carnosus* depositada con el número CNCM I-3844 y/o la cepa de *Staphylococcus xylosus* depositada con el número CNCM I-3845.

La invención también se refiere a un *kit* para llevar a cabo el método de la invención. Dicho *kit* comprende una composición como la que se describe anteriormente y nitratos. Estos nitratos pueden ser de todos los tipos descritos anteriormente.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención pero no son limitantes en modo alguno.

Ejemplo 1: Determinación de la ANR de *Staphylococcus vitulinus* CNCM I-3751, *Staphylococcus carnosus* CNCM I-3844 y *Staphylococcus xylosus* CNCM I-3845.

Se determinó la ANR de tres cepas de *Staphylococcus*: *Staphylococcus vitulinus* CNCM I-3751, *Staphylococcus carnosus* CNCM I-3844 y *Staphylococcus xylosus* CNCM I-3845 a diferentes temperaturas: 4 °C, 11 °C, 25 °C y 44 °C.

Método:

La ANR de las cepas de *Staphylococcus* (en forma liofilizada) se midió de acuerdo con el ensayo A, como se describe anteriormente. El periodo t fue de 16 horas cuando T era 4 °C u 11 °C. El periodo t fue de 1 hora y media cuando T era 25 °C. El periodo t fue de 30 minutos cuando T era 44 °C.

Resultados:

Tabla 1: ANR de las cepas de *Staphylococcus* a diferentes temperaturas, en μg de NO_3^- convertidos por minuto y por 10^{11} ufc

| | <i>Staphylococcus vitulinus</i> CNCM I-3751 | <i>Staphylococcus carnosus</i> CNCM I-3844 | <i>Staphylococcus xylosus</i> CNCM I-3845 |
|-------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------|
| 4 °C | 30 +/-3 | 5 +/-1 | 6 +/-1 |
| 11 °C | 84 +/-8 | 56 +/-5 | 35 +/-4 |
| 25 °C | 435 +/-21 | 507 +/-25 | 122 +/-6 |
| 44 °C | 2058 +/-100 | 2029 +/-100 | 377 +/-19 |

A 4 °C, la ANR de las tres cepas de *Staphylococcus* fue superior a 4 μg of NO_3^- convertido por minuto y por 10^{11} ufc. La ANR de la cepa CNCM I-3751 de *Staphylococcus vitulinus* fue incluso superior 25 μg de NO_3^- convertido por minuto y por 10^{11} ufc. Esta cepa posee, por tanto, una ANR muy alta a baja temperatura.

A 11 °C, la ANR de *Staphylococcus carnosus* CNCM I-3844 fue superior a 50 μg de NO_3^- convertido por minuto y por 10^{11} ufc. La ANR de *Staphylococcus vitulinus* CNCM I-3751 fue también muy alta, superior a 70 μg de NO_3^- convertido por minuto y por 10^{11} ufc.

Estas dos cepas muestran una ANR significativa a baja temperatura. Otras cepas convencionales ensayadas a baja temperatura no mostraron dicha ANR, lo que demuestra, por tanto, que estas cepas muestran propiedades excepcionales a baja temperatura.

A 25 °C, la ANR de *Staphylococcus xylosus* CNCM I-3845 fue superior a 100 μg de NO_3^- convertido por minuto y por 10^{11} ufc; la de *Staphylococcus vitulinus* CNCM I-3751 superior a 400 μg de NO_3^- convertido por minuto y por 10^{11} ufc; y la de *Staphylococcus carnosus* CNCM I-3844 superior a 450 μg de NO_3^- convertido por minuto y por 10^{11} ufc.

A 44 °C, la ANR de *Staphylococcus xylosus* CNCM I-3845 fue superior a 300 μg de NO_3^- convertido por minuto y por 10^{11} ufc, y las otras dos cepas mostraron una actividad nitrato reductasa superior a 1700 μg de NO_3^- convertido por minuto y por 10^{11} ufc.

Ejemplo 2: Demostración del incremento de la ANR de *Staphylococcus vitulinus* CNCM I-3751 por bacterias acidolácticas o líquido que ha estado en contacto con bacterias acidolácticas.

Ejemplo 2a): Efecto de las propias bacterias acidolácticas

La cepa de *Staphylococcus vitulinus* depositada con el número CNCM I-3751 se utilizó en forma liofilizada, en una cantidad de 1,44 mg/ml (10^9 ufc/ml). Como se ha demostrado previamente, esta bacteria muestra una ANR significativa a baja temperatura.

La cepa de la bacteria acidoláctica *Pediococcus acidilactici* depositada con el número CNCM I-4098 también se usó en forma liofilizada, en una cantidad de 1,7 mg/ml (6×10^8 ufc/ml). Esta bacteria tiene una baja capacidad acidificante a baja temperatura.

5 Se ensayaron diferentes temperaturas: 4 °C, 11 °C, 25 °C y 44 °C. La ANR de la mezcla se midió de acuerdo con el mismo método descrito anteriormente (ensayo A). El incremento de la ANR debido a la adición de las bacterias acidolácticas de la cepa CNCM I-4098 de *Pediococcus acidilactici* se calcula de la siguiente manera:

$$10 \quad \frac{[(\text{ANR de la mezcla (Staphylococcus vitulinus + Pediococcus acidilactici)} - \text{ANR de Staphylococcus vitulinus}) / \text{ANR de Staphylococcus vitulinus}] \times 100}{}$$

La tabla 2 presenta el porcentaje del incremento de ANR observado a diferentes temperaturas

15 Tabla 2: Incremento de la ANR de *Staphylococcus vitulinus* CNCM I-3751 debido a la adición de las bacterias acidolácticas *Pediococcus acidilactici* CNCM I-4098, expresado en porcentajes

| Temperatura | <i>Staphylococcus vitulinus</i> CNCM I-3751 + <i>Pediococcus acidilactici</i> CNCM I-4098 |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| 4 °C | 31 |
| 11 °C | 52 |
| 25 °C | 37 |
| 44 °C | 27 |

20 Estos ensayos demuestran que la ANR de una cepa de *Staphylococcus vitulinus* puede incrementarse significativamente mediante la adición de una biomasa de bacterias acidolácticas liofilizadas *Pediococcus acidilactici*. El efecto sinérgico se observa y es significativo a todas las temperaturas ensayadas. Los resultados también son excelentes a baja temperatura (muy bueno a 4 °C y aún mejor a 11 °C).

25 Ejemplo 2b): Efecto de los sobrenadantes de bacterias acidolácticas

Se determinó la ANR de la cepa CNCM I-3751 de *Staphylococcus vitulinus* a 11 °C. Al igual que anteriormente, la cantidad de *Staphylococcus vitulinus* CNCM I-3751 ensayado fue de 1,44 mg/ml (10^9 ufc/ml).

Los sobrenadantes de diversas cepas de bacterias acidolácticas se prepararon de la siguiente forma:

30 Etapa 1: Rehidratación de la biomasa liofilizada

Se resuspendieron 10 g de biomasa liofilizada de bacterias acidolácticas en 90 g de medio líquido de triptona sal que comprendía 0,9% en peso de NaCl y 1% en peso de triptona de caseína. La rehidratación se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 10 minutos, con agitación a 200 rpm.

Etapa 2: Centrifugación

40 La suspensión bacteriana se centrifugó después a 6500 rpm durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante. Éste último se centrifugó otra vez durante 10 minutos a 6500 rpm.

Etapa 3: Filtración

45 El nuevo sobrenadante así cultivado se filtró finalmente a través de un filtro estéril con una porosidad de 0,22 µm.

El incremento de la ANR de la cepa CNCM I-3751 a 11 °C se calculó mediante la adición de un sobrenadante de varias cepas de bacterias acidolácticas pertenecientes a los géneros *Pediococcus* y/o *Lactococcus* en una cantidad de 16,8 µl/ml o 20 µl/ml.

50 Se ensayaron las siguientes cepas de bacterias acidolácticas

- *Pediococcus acidilactici* CNCM I-4098 (16,8 µl/ml o 20µl/ml);
- otro *Pediococcus acidilactici* (20 µl/ml);
- una cepa de *Pediococcus pentosaceus* (20 µl/ml) y
- 55 - una cepa de *Lactococcus lactis* (20 µl/ml)

Los valores obtenidos con la materia liofilizada de bacterias acidolácticas (ejemplo 2a) se indican también para comparar.

Tabla 3: Incremento de la ANR de *Staphylococcus vitulinus* CNCM I-3751 debido a la adición de bacterias acidolácticas o sobrenadantes, expresado en porcentaje

| Bacterias acidolácticas o sobrenadante | | Incremento de ANR (%) |
|------------------------------------------------------------------|--------------|-----------------------|
| <i>Pediococcus acidilactici</i> CNCM I-4098: Biomasa (1,7 mg/ml) | | 52 |
| Sobrenadante de <i>Pediococcus acidilactici</i> CNCM I-9098 | (16,8 µl/ml) | 55 |
| | (20 µl/ml) | 62 |
| <i>P. acidilactici</i> (20 µl/ml) | | 74 |
| <i>P. pentosaceus</i> (20 µl/ml) | | 61 |
| <i>L. lactis</i> (20 µl/ml) | | 43 |

5 La tabla 3 muestra que los sobrenadantes de bacterias acidolácticas liofilizadas de *Pediococcus acidilactici* CNCM I-4098 son igual de eficaces que las bacterias liofilizadas solas en cuanto a estimulación de la actividad nitrato reductasa de *Staphylococcus vitulinus* CNCM I-3751.

10 Además, la estimulación observada de la ANR aumenta con la cantidad de sobrenadante de bacterias acidolácticas añadida.

Los resultados también demuestran que la adición de sobrenadantes obtenidos de los diferentes tipos de bacterias acidolácticas hace posible la estimulación significativa de la ANR de *Staphylococcus vitulinus*.

15 Ejemplo 3: Ejemplo de fabricación de un jamón cocido usando la composición de acuerdo con la invención

Se preparó un jamón cocido de acuerdo con el método siguiente:

20 - Etapa 0= Etapa previa (conversión previa de nitritos a nitratos):

Se mezcló una fuente de nitratos (que representaba un 0,15% en peso de la salmuera) con agua (a una temperatura de 15 °C y que representaba un 11,85% de la salmuera), hasta que se obtuvo una mezcla homogénea.

25 Se añadió una mezcla de bacterias liofilizadas (*Pediococcus acidilactici* CNCM I-4098, que representa un 0,01 % en peso de la salmuera y *Staphylococcus vitulinus* CNCM I-3751, que representa un 0,02 % en peso de la salmuera), y se mezcló todo hasta que se obtuvo una mezcla homogénea.
La mezcla se dejó reposar a 11 °C

30 - Etapa 1: Preparación de la carne

Se proporcionó una cantidad de 12 kg de carne. La grasa y el tejido conectivo se retiraron.

35 - Etapa 2: Triturado

Después se trituró la carne finamente

- Etapa 3: Preparación de la salmuera

40 Se pesó una cantidad dada de agua (que representaba un 65,08 % de la salmuera) y se añadió sal (que representaba un 17,5 % de la salmuera). Se mezcló todo hasta que la sal se disolvió completamente.
Se añadió la solución obtenida en la etapa 0, que contenía la fuente de nitratos parcialmente reducidos y las bacterias, y también dextrosa (que representaban un 5 % de la salmuera), y tripolifosfato sódico (que representaba un 0,3% de la salmuera) y la mezcla resultante se mezcló durante 5 minutos a una temperatura de 7,5 °C.

45 - Etapa 4: Inyección

La salmuera se inyectó dentro de la carne triturada obtenida en la etapa 2

50 - Etapa 5: Mezclado (amasado)

Se mezcló todo durante 4 horas a 8 rpm continuamente (vacío al 80 %), a una temperatura de 10 °C

- Etapa 6: Moldeado y modelado

55 - Etapa 7: Cocinado

El jamón se cocinó a una temperatura circundante de 78 °C hasta alcanzar 72 °C en el centro del producto. El jamón se enfrió después mediante aspersión

Los ingredientes y las proporciones de los mismos se recuerdan en la siguiente tabla:

5

Tabla 4: Ingredientes usados para fabricar el jamón cocinado, en % de peso

| Receta (150 ppm de KNO ₃ en el producto final) | % en el producto final | % en la salmuera |
|------------------------------------------------------------|------------------------|------------------|
| Agua | | 65,08 |
| Sal | 1,75 | 17,50 |
| Dextrosa | 0,50 | 5,00 |
| Agua (usada en la etapa 0 para la preactivación del color) | | 11,85 |
| Tripolifosfato sódico | 0,03 | 0,30 |
| <i>Pediococcus acidilactici</i> CNCM 1-4098 | 0,01 | 0,1 |
| <i>Staphylococcus vitulinus</i> CNCM 1-3751 | 0,002 | 0,02 |
| Nitrato (KNO ₃) | 0,015 | 0,15 |
| | | 100,00 |

El jamón desarrolló rápidamente un color rojo intenso y estable.

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para convertir nitratos a nitritos a una temperatura inferior o igual a 16 °C, donde las bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus*, que tienen actividad nitrato reductasa (ANR), convierten los nitratos a nitritos en presencia de:
 - 10 a. bacterias acidolácticas seleccionadas del grupo que consiste en bacterias del género *Lactococcus*, bacterias del género *Pediococcus* y mezclas de las mismas, a un pH comprendido entre 5,2 y 9, o
 - 15 b. un medio que ha estado en contacto con bacterias acidolácticas seleccionadas del grupo que consiste en bacterias del género *Lactococcus*, bacterias del género *Pediococcus* y mezclas de las mismas y que está sustancialmente libre de bacterias, a un pH comprendido entre 5,2 y 9, donde dichas bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus*, que tienen actividad ANR poseen una ANR mayor o igual a 50 µg de NO₃⁻ convertido por minuto y por 10¹¹ ufc de acuerdo con un ensayo A realizado a 11 °C y/o donde dichas bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus*, que tienen actividad ANR poseen una ANR mayor o igual a 4 µg de NO₃⁻ convertido por minuto y por 10¹¹ ufc de acuerdo con un ensayo A realizado a 11 °C
- 20 2. El uso de bacterias acidolácticas, o de un medio que ha estado en contacto con bacterias acidolácticas y está sustancialmente libre de bacterias, para incrementar, a una temperatura inferior o igual a 16 °C, la actividad nitrato reductasa (ANR) de bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus*, en presencia de nitratos, a un pH comprendido entre 5,2 y 9, donde dichas bacterias acidolácticas se seleccionan del grupo que consiste en bacterias del género *Lactococcus*, bacterias del género *Pediococcus* y mezclas de las mismas, y donde dichas bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus* que tienen ANR, poseen una ANR mayor o igual a 50 µg de NO₃⁻ convertido por minuto y por 10¹¹ ufc de acuerdo con un ensayo A realizado a 11 °C y/o donde dichas bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus* que tienen ANR, poseen una ANR mayor o igual a 4 µg de NO₃⁻ convertido por minuto y por 10¹¹ ufc de acuerdo con un ensayo A realizado a 4 °C.
- 35 3. Un método o uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde las bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus* poseen una ANR mayor o igual a 15 µg de NO₃⁻ convertido por minuto y por 10¹¹ ufc de acuerdo con un ensayo A realizado a 4 °C.
- 40 4. Un método o uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la temperatura está comprendida entre 4 °C y 11 °C.
- 45 5. Un método o uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dichas bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus* que tienen ANR, son la cepa de *Staphylococcus vitulinus* depositada con el número CNCM I-3751.
- 50 6. Un método o uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde las bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus* se combinan con la cepa de *Staphylococcus carnosus* depositada con el número CNCM I-3844, y/o la cepa de *Staphylococcus xylosus* depositada con el número CNCM I-3845.
- 55 7. Un método o uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dichas bacterias acidolácticas seleccionadas del grupo que consiste en bacterias del género *Lactococcus*, bacterias del género *Pediococcus* y mezclas de las mismas, son bacterias seleccionadas del grupo que consiste en las especies *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentasaceus* y mezcla de las mismas, preferentemente, la cepa de *Pediococcus acidilactici* depositada con el número CNCM I-4098.
- 60 8. Un método para la fabricación de un producto alimentario, que comprende la conversión de nitratos a nitritos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 7.
- 65 9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, donde dicho producto alimentario es un producto cárnico, preferentemente un jamón cocido.
10. La composición que comprende:
 - i. bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus* que tienen ANR, teniendo dichas bacterias una ANR superior o igual 50 µg de NO₃⁻ convertido por minuto y por 10¹¹ ufc de acuerdo con un ensayo A realizado a 11 °C y/o donde dichas bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus* que tienen ANR, poseen una ANR mayor o igual a 4 µg de NO₃⁻ convertido por minuto y por 10¹¹ ufc de acuerdo con el ensayo A realizado a 4°C, y

ii. bacterias acidolácticas o un medio que ha estado en contacto con bacterias acidolácticas y está sustancialmente libre de bacterias, seleccionándose dichas bacterias acidolácticas del grupo que consiste en bacterias del género *Lactococcus*, bacterias del género *Pediococcus* y mezclas de las mismas.

- 5 11. Una composición de acuerdo con la reivindicación 10, donde las bacterias pertenecientes a la especie *Staphylococcus vitulinus* poseen una ANR mayor o igual a $15 \mu\text{g}$ de NO_3^- convertido por minuto y por 10^{11} ufc de acuerdo con un ensayo A realizado a 4°C .
- 10 12. Una composición de acuerdo con las reivindicaciones 10 u 11, donde *Staphylococcus vitulinus* es la cepa de *Staphylococcus vitulinus* depositada con el número CNCM I-3751 y/o las bacterias acidolácticas pertenecen a la especie *Pediococcus acidilactici*.
- 15 13. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, donde *Staphylococcus vitulinus* es la cepa de *Staphylococcus vitulinus* depositada con el número CNCM I-3751 y/o las bacterias acidolácticas son la cepa de *Pediococcus acidilactici* depositada con el número CNCM I-4098.
14. El uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 para convertir nitratos a nitritos a una temperatura inferior o igual a 16°C .
- 20 15. Un *kit* para convertir nitratos a nitritos que comprende una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 y nitratos.