(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 585 056**

(51) Int. CI.:

***C12N 1/20*** (2006.01)
***A23B 4/22*** (2006.01)
***A23L 13/40*** (2006.01)
***A23L 13/60*** (2006.01)
***A23L 13/70*** (2006.01)
***A23L 3/3571*** (2006.01)
***A23L 5/41*** (2006.01)
***C12N 9/06*** (2006.01)
*C12R 1/44* (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2013 E 13728410 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 2861716**

(54) Título: **Fermentación en dos fases de Staphylococcus aumenta la actividad de nitrato reductasa**

(30) Prioridad:

**15.06.2012 EP 12172255**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**03.10.2016**

(73) Titular/es:

**CHR. HANSEN A/S (100.0%)**
**Boege Allé 10-12**
**2970 Hoersholm, DK**

(72) Inventor/es:

**NISSEN, CARINA y**
**SEIBERT, TIM MARTIN**

(74) Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Fermentación en dos fases de Staphylococcus aumenta la actividad de nitrato reductasa

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere al campo de la formación de color rojo de productos alimenticios.
En particular la presente invención se refiere a un método de fermentación en dos fases para el refuerzo de la actividad de nitrato-reductasa de cepas de *Staphylococcus* con actividad de nitrato-reductasa que comprende una primera fase aeróbica en ausencia de nitrato y una segunda fase anaeróbica o limitada de oxígeno con suministro continuo de nitrato y uso de las cepas de *Staphylococcus* para la formación de color rojo de productos cárnicos.

Estado de la técnica

[0002] Formación de color y estabilidad de color están entre los rasgos de calidad más críticos de los productos cárnicos procesados y por tanto son de gran importancia para la industria de la carne.
El color curado característico puede derivar de la concentración de hemopigmentos (mioglobina, hemoglobina), sus estados y aditivos químicos tales como óxidos de nitrógeno y agentes reductores.
En los productos cárnicos fermentados estándar, tal como el salami, el color curado característico es un resultado de la reacción química entre compuestos derivados de nitrito/nitrato adicionados y la mioglobina roja de origen natural conduciendo a la formación simultánea de la nitrosilmioglobina roja brillante, donde un ligando axial de óxido nítrico (NO) se coordina con el $Fe^{2+}$ central en hemo.
A pesar de todas sus propiedades deseadas (formación de color, inocuidad microbiológica), la inocuidad del nitrito para la salud humana ha sido cuestionada.
El nitrito puede provocar la formación de compuestos no deseados en la carne curada, como las N-nitrosaminas que son discutibles en cuanto a la salud se refiere.
Estos compuestos se pueden formar en principio debido a la reacción de nitrito con aminas secundarias y aminoácidos en proteínas musculares al igual que en el tracto gastrointestinal.

[0003] El uso de cepas de *Staphylococcus* para la formación de color se basa en su capacidad para reducir nitrato inorgánico a nitrito que es posteriormente degradado en el óxido nítrico descrito anteriormente (NO), el compuesto activo en el proceso de formación de color.
El nitrato podría ser proporcionado directamente como sal de nitrato o indirectamente con una fuente de nitrato natural (polvos vegetales).
Aunque una sal de nitrito sea añadida, se recomienda la adición de cepas de *Staphylococcus* porque el nitrito es parcialmente reconvertido en nitrato.

[0004] *Staphylococcus carnosus* y menos frecuentemente *Staphylococcus xylosus* son cepas estándar de *Staphylococcus* usadas para la reducción de nitrato y formación de color.
Estas cepas están funcionando debidamente a temperaturas de fermentación más altas pero son menos activas a temperaturas bajas, por debajo de 6°C.
Como temperaturas de producción bajas son preferidas por la industria por cuestiones de higiene una cepa de *Staphylococcus* con actividad de nitrato-reductasa a bajas temperaturas es deseada.

[0005] *Staphylococcus vitulinus* es una cepa conocida por tener actividad de nitrato-reductasa a bajas temperaturas y ha sido usada en combinación con bacterias del ácido láctico para la formación de color rojo de la carne (WO2010/067148).

[0006] Sin embargo, hay una necesidad de métodos que mejoren la reducción de nitrato y la formación de color en productos alimenticios y como resultado pueda llevar a una reducción en el tiempo de producción necesario para la formación de color rojo deseada de los productos alimenticios y así conducir a la reducción en el coste de producción de tales productos.

Resumen de la invención

[0007] Los inventores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que cuando la producción de una cepa de *Staphylococcus* con actividad de nitrato-reductasa por una fermentación en dos fases que implica una primera fase de la fermentación de la cepa bajo aireación alta en ausencia de nitrato y una segunda fase de la fermentación de la cepa bajo aireación baja mientras se suministra continuamente nitrato la cepa de *Staphylococcus* desarrolla una actividad de nitrato-reductasa aumentada conduciendo a una formación de color rojo aumentada cuando se usa para la coloración de productos alimenticios que contienen mioglobina.

[0008] Por lo tanto, en un primer aspecto la presente invención se refiere a un método para aumentar la actividad de nitrato-reductasa de una cepa de *Staphylococcus* con actividad de nitrato-reductasa que incluye las etapas de
a) fermentar la cepa en ausencia de nitrato bajo condiciones aeróbicas;
b) fermentar la cepa bajo condiciones anaeróbicas o de limitación de oxígeno mientras se alimenta continuamente

nitrato al medio de fermentación; y
c) opcionalmente granular y opcionalmente liofilizar la cepa.

[0009] Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para la formación de color rojo de un producto alimenticio que incluye las etapas de
a) tratamiento previo de una cepa de *Staphylococcus* con actividad de nitrato-reductasa según el método del primer aspecto de la invención;
b) adición de la cepa de *Staphylococcus* pretratada a un producto alimenticio; y
c) fermentación, maduración o curación del producto alimenticio con la cepa de *Staphylococcus* pretratada.

Breve descripción de los dibujos

[0010]
La Figura 1 representa el desarrollo de concentración de nitrato/nitrito al igual que la actividad de nitrato-reductasa (NRA) durante la fermentación estándar con la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus*.
La Figura 2 muestra el desarrollo de la concentración de nitrato/nitrito durante una fermentación en dos fases con cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus*.
En el punto temporal de 6.3 horas la aireación fue reducida significativamente y el suministro con nitrato comenzó. Ningún nitrato se añadió al medio de lotes.
La Figura 3 representa el desarrollo de concentración de nitrato/nitrito durante una fermentación en dos fases con la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus*.
En el punto temporal de 6.3 horas la aireación fue reducida significativamente y el suministro con nitrato comenzó. Se añadió nitrato al medio de mezcla.
La Figura 4 muestra las concentraciones de nitrato/nitrito en embutidos tipo mortadela fermentados a 4°C durante 21 horas antes de la cocción con la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación estándar (*S. Vitulinus*-, estándar) cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación en dos fases (*S. Vitulinus* – suministro de nitrato), o Bactoferm® CS-300 (CS-300).
La Figura 5 muestra las concentraciones de nitrato/nitrito en embutidos tipo mortadela fermentados a 12°C durante 21 horas antes de la cocción con la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación estándar (*S. Vitulinus*-, estándar), cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación en dos fases (*S. Vitulinus* – suministro de nitrato), o Bactoferm® CS-300 (CS-300).
La Figura 6 muestra las concentraciones de nitrato/nitrito en embutidos tipo mortadela fermentados a 18°C durante 21 horas antes de la cocción con la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación estándar (*S. Vitulinus*-, estándar), cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación en dos fases (*S. Vitulinus* – suministro de nitrato), o Bactoferm® CS-300 (CS-300).
La Figura 7 representa la intensidad de color rojo (valor a* según el sistema L*a*b*) de embutidos tipo mortadela fermentados durante 21 horas a 4°C, 12°C o 18°C antes de la cocción con la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación estándar (STAvi_standard), cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación en dos fases (STAvi_nitrate), o Bactoferm® CS-300 (CS-300).
La Figura 8 muestra la concentración de nitrato y de nitrito de carne picada para embutidos tipo mortadela antes de cocción después de diferentes intervalos de incubación (7, 12 y 24 horas) a 4°C con la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación en dos fases, nitrato desde el principio (1), cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación en dos fases, ningún nitrato desde el principio (2), Bactoferm® CS-300 (3) o TEXEL® NatuRed LT (4).
La Figura 9 representa la intensidad de color rojo (valor a* según el sistema L*a*b*) de embutidos tipo mortadela fermentados durante 7 horas a 4°C, 8°C o 12°C antes de la cocción con la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación en dos fases, nitrato desde el principio (1), cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación en dos fases, ningún nitrato desde el principio (2), Bactoferm® CS-300 (3) o TEXEL® NatuRed LT (4).
La Figura 10 representa la intensidad de color rojo (valor a* según el sistema L*a*b*) de embutidos tipo mortadela fermentados durante 12 horas a 4°C, 8°C o 12°C antes de la cocción con la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación en dos fases, nitrato desde el principio (1), cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación en dos fases, ningún nitrato desde el principio (2), Bactoferm® CS-300 (3) o TEXEL® NatuRed LT (4).
La Figura 11 representa la intensidad de color rojo (valor a* según el sistema L*a*b*) de embutidos tipo mortadela fermentados durante 24 horas a 4°C, 8°C o 12°C antes de la cocción con la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación en dos fases, nitrato desde el principio (1), cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación en dos fases, ningún nitrato desde el principio (2), Bactoferm® CS-300 (3) o TEXEL® NatuRed LT (4).
La Figura 12 representa la intensidad de color rojo (valor a* según el sistema L*a*b*) de jamón cocido fermentado durante 16 horas a 6°C con la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación en dos fases, ningún nitrato desde el principio (STAvi) o Bactoferm® CS-299 (CS-299).
La Figura 13 muestra placas de Petri con jamón cocido triturado fermentado con Bactoferm® CS-299 (CS-299) o la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación en dos fases, ningún nitrato desde el principio (*S. Vitulinus* CHCC10896).
La Figura 14 representa la intensidad de color rojo (a*-valor según el sistema L*a*b*) de embutidos tipo mortadela

fermentados durante 20 horas a 4°C antes de la cocción con la cepa CHCC111576 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación estándar (CHCC11576 – estándar), cepa CHCC11576 de *Staphvlococcus vitulinus* producida por fermentación en dos fases (CHCC11576 – suministro), o cepa A de *Staphylococcus carnosus* producida por fermentación estándar (*S. Carnosus*).

La Figura 15 representa la intensidad de color rojo (valor a* según el sistema L*a*b*) de embutidos tipo mortadela fermentados durante 18 horas a 8°C antes de cocción con la cepa CHCC111576 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación estándar (CHCC11576 – estándar), cepa CHCC11576 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación en dos fases (CHCC11576 – suministro), o cepa A de *Staphylococcus carnosus* producida por fermentación estándar (*S. Carnosus*).

La Figura 16 muestra embutidos tipo mortadela fermentados durante 20 horas a 4° antes de la cocción con la cepa CHCC11576 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación estándar (CHCC11576 – estándar), cepa CHCC11576 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación en dos fases (CHCC11576 – suministro), o cepa A de *Staphylococcus carnosus* producida por fermentación estándar (*S.carnosus* – estándar).

La Figura 17 muestra embutidos tipo mortadela fermentados durante 18 horas a 8°C antes de la cocción con la cepa CHCC11576 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación estándar (CHCC11576 – estándar), cepa CHCC11576 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación en dos fases (CHCC11576 – suministro), o cepa A de *Staphylococcus carnosus* producida por fermentación estándar (*S.carnosus* – estándar).

La Figura 18 representa las concentraciones de nitrato/nitrito en embutidos tipo mortadela fermentados a 4°C durante 20 horas (4°C) o a 8°C durante 18 horas (8°C) antes de la cocción con la cepa CHCC11576 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación estándar (1), cepa CHCC11576 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación en dos fases (2), o cepa A de *Staphylococcus carnosus* producida por fermentación estándar (3).

La Figura 19 representa la intensidad de color rojo (valor a* según el sistema L*a*b*) de embutidos tipo mortadela fermentados durante 20 horas a 4°C antes de la cocción con la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación en dos fases dando solo un pico de nitrato de alta concentración al principio de la segunda fase (CHCC10896 – pico), cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación en dos fases con suministro de nitrato continuo durante la segunda fase (CHCC10896 – suministro), o cepa A de *Staphylococcus carnosus* producida por fermentación estándar (*S. Carnosus*).

La Figura 20 representa la intensidad de color rojo (valor a* según el sistema L*a*b*) de embutidos tipo mortadela fermentados durante 18 horas a 8°C antes de la cocción con la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación en dos fases dando solo un pico de nitrato de alta concentración al principio de la segunda fase (CHCC10896 – pico), cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación en dos fases con suministro de nitrato continuo durante la segunda fase (CHCC10896 - suministro), o cepa A de *Staphylococcus carnosus* producida por fermentación estándar (*S. Carnosus*).

La Figura 21 muestra embutidos tipo mortadela fermentados durante 20 horas a 4°C antes de la cocción con la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación en dos fases dando solo un pico de nitrato de alta concentración al principio de la segunda fase (CHCC10896 - pico), cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación en dos fases con suministro de nitrato continuo durante la segunda fase (CHCC10896 - suministro), o cepa A de *Staphylococcus carnosus* producida por fermentación estándar (*S. Carnosus* - estándar).

La Figura 22 muestra embutidos tipo mortadela fermentados durante 18 horas a 8°C antes de la cocción con la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación en dos fases dando solo un pico de nitrato de alta concentración al principio de la segunda fase (CHCC10896 - pico), cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación en dos fases con suministro de nitrato continuo durante la segunda fase (CHCC10896 - suministro), o cepa A de *Staphylococcus carnosus* producida por fermentación estándar (*S. Carnosus* - estándar).

La Figura 23 representa las concentraciones de nitrato/nitrito en embutidos tipo mortadela fermentados a 4°C durante 20 horas (4°C) o a 8°C para 18 horas (8°C) antes de la cocción con la cepa CHCC110896 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación en dos fases dando solo un pico de nitrato de alta concentración al principio de la segunda fase (1), cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación en dos fases con suministro continuo de nitrato durante la segunda fase (2), o cepa A de *Staphylococcus carnosus* producida por fermentación estándar (3).

Descripción detallada de la invención

[0011] El uso de los términos "un" y "una" y "el" y referentes similares en el contexto de describir la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) se debe interpretar para cubrir el singular y el plural, a menos que se indique aquí lo contrario o se contradiga claramente por el contexto.

Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" se deben interpretar como términos abiertos (es decir, significando "que incluye, pero no se limita a,") a menos que se indique lo contrario.

La enumeración de rangos de valores aquí se destina únicamente a servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que entre dentro de la gama, a menos que se indique lo contrario aquí, y cada valor separado se incorpora en la especificación como si fuera enumerado individualmente aquí.

Todos los métodos descritos aquí se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario aquí o se contradiga claramente por el contexto.

El uso de uno y todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como") proporcionado aquí, se destina

únicamente a mejor iluminar la invención y no plantea una limitación en el ámbito de la invención a menos que se reivindique de otro modo.
Ningún lenguaje en la especificación debería ser interpretado como indicando cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

[0012] La presente invención se refiere a un método de fermentación de una cepa de *Staphylococcus* con actividad de nitrato-reductasa bajo ciertas condiciones para aumentar la actividad de nitrato-reductasa de la cepa de *Staphylococcus*.

[0013] El término "cepa de *Staphylococcus* con actividad de nitrato reductasa" como se utiliza en este caso se refiere a una cepa de *Staphylococcus* que es capaz de convertir el nitrato en nitrito.

[0014] La fermentación se realiza como una fermentación en dos fases donde la primera fase comprende la fermentación de la cepa en ausencia de nitrato bajo condiciones aeróbicas y donde la segunda fase comprende la fermentación de la cepa bajo condiciones anaeróbicas o de limitación de oxígeno mientras se suministra continuamente nitrato al medio de fermentación.
Finalmente, la cepa puede opcionalmente ser granulada y/o liofilizada.

[0015] El término "en ausencia de nitrato" como se utiliza en este caso se refiere a la fermentación realizada en el medio de fermentación donde ningún nitrato ha sido adicionado.

[0016] El término "medio de fermentación" se destina a significar un medio de fermentación que permite la producción de metabolitos bacterianos y/o el crecimiento de biomasa.

[0017] En una forma de realización preferida las condiciones aeróbicas de la primera fase comprende fermentación de la cepa bajo aireación alta de al menos 0.5 vvm (volumen por volumen por minuto), tal como al menos 0.6 vvm, tal como al menos 0.7 vvm, tal como al menos 0.8 vvm.

[0018] En una forma de realización preferida la primera fase es continuada durante 5 a 12 horas, tal como de 6 a 10 horas.
En otra forma de realización preferida la primera fase es continuada hasta que la presión parcial de oxígeno ($pO_2$) del medio de fermentación alcanza 0.

[0019] El $pO_2$ del medio de fermentación se puede medir con sensores de oxígeno disuelto óptico como se describe en el ejemplo 2 aquí.
El término "alimentando continuamente nitrato" como se utiliza en este caso se refiere bien a una adición estable de nitrato al medio de fermentación o una adición de nitrato al medio de fermentación en impulsos de no más de 15 min. entre cada adición de una cantidad constante de nitrato.

[0020] En una forma de realización preferida el nitrato se adiciona en impulsos de no más de 10 min. tal como en impulsos de no más de 8 min., tal como en impulsos de no más de 6 min., tal como en impulsos de no más de 5 min.

[0021] Los nitratos útiles para el método según la presente invención pueden ser de origen químico.
Ellos pueden, por ejemplo, ser nitrato de potasio, nitrato sódico, salitre, y sus mezclas derivadas.

[0022] Los nitratos también pueden ser de origen natural.
Ellos pueden, por ejemplo, ser provistos por plantas y/o extractos de plantas que son ventajosamente elegidos de plantas naturalmente ricas en nitratos, tal como por ejemplo puerro, apio, cebolla, espinaca y repollo.

[0023] Los nitratos se pueden proporcionar en forma líquida y sólida.

[0024] En una forma de realización preferida el suministro de nitrato en la segunda fase se hace a un índice de 0,5 a 2,0 g/(l*h), tal como de 0,8 a 1,8 g/(l*h).

[0025] El término "condiciones que limitan el oxígeno" como se utiliza en este caso se destina a abarcar cualquier condición que restringe el oxígeno accesible, típicamente por aireación controlada, incluyendo tal aireación baja que la cepa está experimentando eficazmente un crecimiento casi anaeróbico.

[0026] En una forma de realización preferida la segunda fase anaeróbica o limitada de oxígeno comprende fermentación de la cepa bajo aireación de como mucho 0.08 vvm, tal como como mucho 0.07 vvm, tal como como mucho 0.06 vvm, tal como como mucho 0.05 vvm, tal como como mucho 0.04 vvm, tal como como mucho 0.03 vvm.

[0027] Sin querer ceñirse a la teoría se cree que la falta de oxígeno en la segunda fase obliga a la cepa a aumentar la expresión desde el operón nar responsable de la actividad de nitrato-reductasa que se facilita por una concentración continua alta de nitrato.
Durante la respiración aeróbica, los electrones provistos por un donante de electrones como NADH se transfieren

por la cadena de transporte electrónico al terminal reductasa para ser transferido al aceptor de electrones 02 final.
Durante este proceso una fuerza motriz de proteínas se forma por la separación de electrones y protones por la membrana.
Por un flujo de protones en la célula por medio de la ATP-sintasa ligada a la membrana ATP es formado.
Bajo condición anaeróbica, durante la falta de oxígeno, un aceptor de electrones alternativo se necesita para mantener este proceso en funcionamiento, por ejemplo nitrato.
El nitrato es así reducido en nitrato por la nitrato-reductasa.

[0028] La cepa de *Staphylococcus* puede ser cualquier cepa de *Staphylococcus* con actividad de nitrato-reductasa tal como por ejemplo una cepa de *Staphylococcus vitulinus*, *Staphylococcus carnosus* o *Staphylococcus xylosus*.

[0029] En una forma de realización preferida de la presente invención la cepa de *Staphylococcus* con actividad de nitrato-reductasa es una cepa de *Staphylococcus vitulinus* o una cepa de *Staphylococcus carnosus* con actividad de nitrato-reductasa.

[0030] En una forma de realización más preferida la cepa de *Staphylococcus* con actividad de nitrato-reductasa es una cepa de *Staphylococcus vitulinus*.

[0031] En una forma de realización muy preferida de la presente invención la cepa de *Staphylococcus vitulinus* es seleccionada del grupo consistente en la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* que fue depositada con el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bajo el número de acceso.
DSM 25789, la cepa de Staphylococcus vitulinus CHCC11576 que fue depositada con el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bajo el número de acceso DSM 27311 y sus mutantes derivados.

[0032] En el presente contexto, el término "mutante" debería entenderse como una cepa derivada de una cepa de la invención mediante por ejemplo ingeniería genética, radiación y/o tratamiento químico.
Se prefiere que el mutante sea un mutante funcionalmente equivalente, por ejemplo un mutante que tiene sustancialmente las mismas propiedades, o, mejoradas (por ejemplo con relación a la actividad de nitrato-reductasa) como la cepa madre.
Tal mutante es una parte de la presente invención.
Especialmente, el término "mutante" se refiere a una cepa obtenida sometiendo una cepa de la invención en cualquier tratamiento de mutagenización usado de forma convencional lo que incluye un tratamiento con un mutágeno químico tal como etano metano sulfonato (EMS) o N-metil-N'-nitro-N-nitroguanidina (NTG), luz UV o a un mutante de origen espontáneo.
Un mutante se puede someter a diferentes tratamientos de mutagenización (un tratamiento único debería ser entendido un paso de mutagenización seguido de una etapa de filtrado/selección), pero es actualmente preferido que no más de 20, o no más de 10, o no más de 5, tratamientos (o fases de filtrado/selección) sean realizados.
En un mutante actualmente preferido menos del 1%, menos del 0,1, menos del 0,01, menos del 0,001% o incluso menos del 0,0001% de los nucleótidos en el genoma bacteriano se han sustituido por otro nucleótido, o eliminado, en comparación con la cepa madre.

[0033] La actividad de nitrato-reductasa de la cepa de *Staphylococcus* que ha sido sometida al método de fermentación en dos fases anteriormente descrito no se puede mejorar a la misma extensión como la actividad de nitrato-reductasa de la cepa de *Staphylococcus* que no ha sido sometida a la fermentación en dos fases de la invención.
Así, someter la cepa de *Staphylococcus*, que ha sido sometida una vez al método de fermentación en dos fases, a por ejemplo una segunda vuelta del método de fermentación en dos fases en las horas siguientes no mejorará la actividad de nitrato-reductasa de la cepa a la misma extensión como cuando la cepa es antes sometida al método de fermentación en dos fases.
El periodo exacto entre los puntos temporales donde la cepa se somete a la primera y segunda vuelta del método de fermentación en dos fases y todavía mantiene una alta actividad de nitrato-reductasa depende de las distintas condiciones como la presencia de oxígeno y la temperatura a la que las muestras están mantenidas.
Preferiblemente, el porcentaje por el cual la actividad de nitrato-reductasa se puede mejorar es determinado sometiendo la cepa al método de fermentación en dos fases no más de 3 horas después de la producción de la cepa y teniendo la cepa a una temperatura por debajo de 5°C y bajo condiciones anaeróbicas.
Sin querer ceñirse a la teoría, se cree que otros métodos - distintos del método de fermentación en dos fases de la invención - para aumentar la actividad de nitrato-reductasa a niveles por encima de aquellos conseguidos por fermentación estándar en una cepa de *Staphylococcus* pueden existir.
Puede por ejemplo ser posible inducir el operón nar responsable de la actividad de nitrato-reductasa sometiendo las cepas a otros factores de tensión.
En una forma de realización preferida la actividad de nitrato-reductasa de la cepa no se puede mejorar más del 50%, tal como más del 40%, tal como más del 30%, tal como más del 20%, tal como más del 10%.
La mejora del porcentaje de la actividad de nitrato-reductasa de una cepa de *Staphylococcus* en cuestión puede ser fácilmente determinada usando el método para determinación de la actividad de nitrato-reductasa como se describe en los ejemplos aquí: la actividad de nitrato-reductasa se determina para la cepa en cuestión antes y después de someter la cepa al método de fermentación en dos fases según la invención y la mejora en la actividad de nitrato-

reductasa se puede calcular por la determinación del aumento en la actividad de nitrato-reductasa.

[0034] La cepa de *Staphylococcus* cuando se añade en una cantidad de $3,6x10^{10}$ CFU/kg de carne y se usa para la preparación de embutidos tipo mortadela fermentados a 12°C durante 21 horas es capaz de formar el color rojo de la carne a una intensidad de color rojo (valor a*) según el sistema L*a*b* de al menos 14.

[0035] Los embutidos tipo mortadela se pueden preparar según los ejemplos 3 y 4 aquí.

[0036] La cepa de *Staphylococcus* cuando se añade en una cantidad de $1,5x10^{10}$ CFU/kg de carne y se usa para la preparación de jamón cocido fermentado a 6°C durante 16 horas es capaz de formar el color rojo de la carne a una intensidad de color rojo (valor a*) según el sistema L*a*b* de al menos 10, tal como al menos 11, tal como al menos 12.
El jamón cocido se puede preparar según el Ejemplo 5 aquí.

[0037] En el presente contexto, el término "mutante" debería entenderse como una cepa derivada de una cepa de la invención mediante por ejemplo ingeniería genética, radiación y/o tratamiento químico.
Se prefiere que el mutante sea un mutante funcionalmente equivalente, por ejemplo un mutante que tenga sustancialmente las mismas propiedades, o mejoradas (por ejemplo con relación a la actividad de nitrato-reductasa) como la cepa madre.
Tal mutante es una parte de la presente invención.
Especialmente, el término "mutante" se refiere a una cepa obtenida sometiendo una cepa de la invención en cualquier tratamiento de mutagenización usado de forma convencional lo que incluye un tratamiento con un mutágeno químico tal como etano metano sulfonato (EMS) o N-metil-N'-nitro-N-nitroguanidina (NTG), luz UV o a un mutante de origen espontáneo.
Un mutante se puede someter a diferentes tratamientos de mutagenización (un tratamiento único debería ser entendido una fase de mutagenización seguido de una etapa de filtrado/selección), pero es actualmente preferido que no más de 20, o no más de 10, o no más de 5, tratamientos (o fases de filtrado/selección) sean realizados.
En un mutante actualmente preferido menos del 1%, menos del 0,1, menos del 0,01, menos del 0,001% o incluso menos del 0,0001% de los nucleótidos en el genoma bacteriano se han sustituido por otro nucleótido, o eliminado, en comparación con la cepa madre.

[0038] La presente invención además se refiere a un método para la formación de color rojo de un producto alimenticio que incluye las etapas del tratamiento previo de una cepa de *Staphylococcus* con actividad de nitrato-reductasa según el método de fermentación de una cepa de *Staphylococcus* con actividad de nitrato-reductasa anteriormente descrita, añadir la *Staphylococcus* pretratada a un producto alimenticio, y fermentar, madurar o curar el producto alimenticio con la cepa de *Staphylococcus* pretratada.

[0039] El producto alimenticio puede ser cualquier producto basado en una fuente alimenticia que contiene mioglobina.
En una forma de realización preferida el producto alimenticio es un producto cárnico.

[0040] El producto cárnico puede ser cualquier producto con un contenido de carne.
La carne puede ser carne bovina, carne de cerdo, carne de ave, carne de caza o cualquier otra categoría de carne.

[0041] El producto alimenticio también puede ser un producto basado en pescado y/o basado en crustáceos.
En una forma de realización preferida la cepa de *Staphylococcus* se añade en una cantidad de $1.0x10^{8}$ a $1.0x10^{12}$ CFU/kg, tal como de $1.0x10^{9}$ a $1.0x10^{11}$ CFU/kg.
Preferiblemente la cepa de *Staphylococcus* se añade en una cantidad de $2.0x10^{9}$ a $5.0x10^{10}$ CFU/kg.

[0042] En una forma de realización preferida la fermentación, maduración o curación del producto alimenticio con la cepa de *Staphylococcus* pretratada tiene lugar a una temperatura de 4°C a 45°C, tal como a una temperatura de 4°C a 30°C, tal como a una temperatura de 4°C a 25°C.

[0043] La fermentación, maduración o curación del producto alimenticio puede durar desde 8 horas hasta varios días/semanas.

[0044] En una forma de realización preferida la cepa de *Staphylococcus* es una cepa de *Staphylococcus vitulinus* o una cepa de *Staphylococcus carnosus*.

[0045] En una forma de realización más preferida la cepa de *Staphylococcus* es una cepa de *Staphylococcus vitulinus*.

[0046] En una forma de realización muy preferida la cepa de *Staphylococcus vitulinus* es seleccionada del grupo consistente en la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* que fue depositada en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bajo número de acceso DSM 25789, la cepa de *Staphylococcus vitulinus* CHCC11576 que fue depositada con el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bajo el

número de acceso DSM 27311 y sus mutantes derivados.

[0047] En el presente contexto, el término "mutante" debería entenderse como una cepa derivada de una cepa de la invención mediante por ejemplo ingeniería genética, radiación y/o tratamiento químico.
Se prefiere que el mutante sea un mutante funcionalmente equivalente, por ejemplo un mutante que tenga sustancialmente las mismas propiedades, o mejoradas (por ejemplo con relación a la actividad de nitrato-reductasa) que la cepa madre.
Tal mutante es una parte de la presente invención.
Especialmente, el término "mutante" se refiere a una cepa obtenida sometiendo una cepa de la invención a cualquier tratamiento de mutagenización usado de forma convencional lo que incluye un tratamiento con un mutágeno químico tal como etano metano sulfonato (EMS) o N-metil-N'-nitro-N-nitroguanidina (NTG), luz UV o a un mutante de origen espontáneo.
Un mutante se puede someter a diferentes tratamientos de mutagenización (un tratamiento único debería ser entendido una fase de mutagenización seguida de una fase de filtrado/selección), pero es actualmente preferido que no más de 20, o no más de 10, o no más de 5, tratamientos (o fases de filtrado/selección) sean realizados.
En un mutante actualmente preferido menos del 1%, menos del 0,1, menos del 0,01, menos del 0,001% o incluso menos del 0,0001% de los nucleótidos en el genoma bacteriano se han sustituido por otro nucleótido, o eliminado, en comparación con la cepa madre.

[0048] Formas de realización de la presente invención son descritas abajo, por medio de ejemplos no limitativos.

EJEMPLOS

*Método para determinación de la actividad de nitrato-reductasa*

[0049] El método siguiente se puede usar para determinar la actividad de nitrato-reductasa (NRA):
En una primera fase, aproximadamente 5 x $10^8$ UFC/mL se incuban estáticamente en un tampón de inducción (10 g/l triptona, 1 g cisteína, 1 g $KNO_3$ pH 7.0) a 30°C en las tazas de reacción de Eppendorf.
La temperatura y período de incubación se adaptan al problema particular que debería ser evaluado.
Es importante reducir el suministro de oxígeno de las células en el tampón de inducción a un mínimo minimizando la fase de aire sobre la suspensión, por ejemplo usando un aceite mineral para el cubrimiento.
Usando el mismo recuento de células, período de incubación y temperatura cada vez, los resultados son comparables de un ensayo a otro pero es también adecuado dosificar las células por medición de $OD_{600}$ si se necesita un análisis rápido y ningún recuento de células está disponible.
Por ejemplo cuando los aislados almacenados en placas de agar tengan que ser evaluados para actividad de nitrato-reductasa la inoculación del tampón de inducción deberían ser realizados según la medición de $OD_{600}$.
Aquí es importante incubar una colonia de placas de agar al día en un medio adecuado e inocular un volumen adecuado de medio fresco por la noche que es luego incubado durante toda la noche.
Las muestras que deberían ser comparadas entre sí deberían tener una densidad óptica comparable que se podría actuar en la suposición de que todas las muestras muestren más o menos la misma proporción de células vivas y muertas, lo que hace la dosificación por medición de $OD_{600}$ realizable.
De estos cultivos mantenidos durante toda la noche se podría inocular el tampón de inducción a la misma $OD_{600}$ de todas muestras.
La $OD_{600}$ debería no exceder 0,6 ya que una densidad óptica superior a 0,6 está moderando los resultados.

[0050] La etapa de inducción es importante ya que de alguna manera imita las condiciones que también ocurrirían en el producto final cuando se aplican cultivos para estabilidad del color en la carne.
El sistema de nitrato-reductasa de *Staphylococcus* se induce por condiciones anaeróbicas en presencia de nitrato como es el caso en el producto de carne.
El proceso regulador de la inducción del sistema de reducción de nitrato (transcripción, biosíntesis de proteína) necesita algún tiempo en el producto cárnico, por lo tanto se consideró usar una fase de inducción para dar a las células el tiempo para "reactivar" el sistema de reducción de nitrato cuando éste ocurriera en el producto cárnico.

[0051] El ensayo mismo se basa en un método desarrollado por Lowe y Evans (Lowe y Evans (1964). Biochimica et biophysica acta 85; 377-389) donde la velocidad de reacción se determina por la medición de la producción de nitrito a partir de nitrato en un sistema de ditionito/bencil viológeno.
Una mezcla reactiva se usa, consistente en tampón de fosfato potásico (100 mM; pH 7.0), bencil viológeno (30 mM) como donante de electrones artificial, nitrato de potasio (12 mM) y el agente reductor ditionito (141 mM).
La adición de ditionito en exceso facilita la manipulación bajo condiciones de laboratorio sin cámara anóxica.
La reacción comienza por la adición de las células bacterianas.

| | Mezcla reactiva: | |
|---|---|---|
| 0.2 Ml | Suspensión de célula preinducida | |
| 10. 8 ml | Tampón de fosfato potásico | (100 MM; pH 7.0) |
| 0.4 Ml | Solución de $KNO_3$ | (12 MM) |
| 0.4 Ml | Solución de bencil viológeno | (30 MM) |

[0052] Precalentar la probeta al baño maría a 30°C durante 2 min por agitación lenta.
0.4 Ml Solución de ditionito (141 MM)
• incubar la probeta al baño maría y transferir 0.4 ml de esta solución a tazas de Eppendorf a varios intervalos de tiempo (por ejemplo 0, 5, 10, 20,30 y 60 minutos)
• las muestras deberían ser aireadas por la agitación inmediatamente después del muestreo hasta decoloración del bencil viológeno reducido
• la taza es luego centrifugada a 10.000 x g durante 3 minutos
• 50 µl del sobrenadante se transfiere a un pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos (al menos 5 pocillos)
• 250 µl del reactivo Griess se añade a cada pocillo
• Almacenar la placa a oscuras durante 10 min
• Leer la absorbancia a 540 nm con lector de microplacas
• la absorbancia debería no exceder 0,8 de lo contrario es necesaria dilución

Observaciones

[0053] Como control es adecuado no añadir células o nitrato.
Se podría crear un gráfico estándar donde se usan muestras de concentración de nitrito conocidas y calcular el coeficiente de extinción molar que corresponde a la pendiente de la línea.
Con la ayuda del coeficiente de extinción molar y la absorbancia medida es posible calcular las concentraciones de nitrito en el tiempo particular.
Por la implementación del factor temporal se podría calcular la actividad enzimática pero es también adecuado solo coger la absorbancia a 540 nm como una indicación directa de la actividad de nitrato-reductasa.

[0054] Método para determinación de nitrato y nitrito en la carne y productos cárnicos.
El método siguiente se puede usar para determinar las concentraciones de nitrato y de nitrito:

Principio de determinación

[0055] La muestra es extraída con agua caliente y el extracto es filtrado después de la desnaturalización del contenido de proteína.
El filtrado contiene el nitrato y nitrito extraídos.
El nitrito se puede determinar directamente por la reacción de Griess añadiendo sulfanilamida (reactivo de color I) y N-(1-Naftil-)-etilendiamoniodicloruro (reactivo de color II).
El producto de esta reacción, un cromóforo con un máximo de absorción a 546 nm, muestra un color rosa y se puede determinar fotométricamente.
El nitrato no se puede determinar directamente, tiene que ser reducido primero a nitrito.
La reducción se hace por flujo pasante del filtrado vía una columna de reducción que contiene cadmio metálico como agente reductor.
La diferencia entre la cantidad de nitrito determinada después de la reducción por medio de la columna de cadmio (nitrito total) menos la cantidad determinada en el filtrado directamente después de la extracción (nitrito) da la cantidad de nitrato en la muestra.

Experimental

[0056] El lodo de cadmio se prepara disolviendo 60-70 g de cadmiosulfato (3CdSO4 x 8 H2O) en 600 ml de agua desionizada.
Para precipitación de cadmio 3-5 bastones de zinc se sumergen en la solución.
El cadmio precipitado se cosecha por decantación después de 6-8 h. El precipitado es lavado en 2x 1000 ml de agua desionizada.
El precipitado lavado se mezcla con 400 ml 0.1 M HCl y se incuba durante toda la noche en HCl.
La columna de reducción se prepara poniendo lana de vidrio en la reducción gradual de la columna de vidrio para la retención del lodo de cadmio.
Después de la decantación del HCl el lodo de cadmio se lava en la columna con agua desionizada hasta alcanzar una altura de aproximadamente 170 mm.
Inclusiones y burbujas de aire deberían ser evitadas y necesitan quitarse si aparecen.
La columna debería permitir un flujo a través de 6-9 ml/min.

[0057] Las muestras de carne se homogenizan por trituración.
Aproximadamente 10 g de muestra (el peso exacto se anota para el cálculo) se pesa en un matraz de Erlenmeyer de 100 ml. 10 ml de una solución de borato sódico saturado (50 g/l de disodiotetraborato-decahidrato disuelto en agua caliente desionizada) y 50 ml de agua desionizada son agregados.
La suspensión se mezcla íntegramente y se calienta a 95°C durante 15 min. Después la suspensión es transferida de forma cuantitativa a un matraz aforado de 200 ml y se calienta otra vez a 95°C durante 15 min. La suspensión es mezclada periódicamente.

Posteriormente 5 ml de solución de Carrez I (106 g/l potasiohexacianoferrato(II)-trihidrato disuelto en agua desionizada; la solución debe ser almacenada en una botella marrón y debe ser preparada semanalmente) y de Carrez II (220 g acetato de zinc en 30 ml ácido acético puro y rellenado hasta 1000 ml con agua desionizada) se añaden para desnaturalizar la proteína residual.
La suspensión es mezclada íntegramente.
Si se necesita, dependiendo de la naturaleza de la muestra (por ejemplo contenido alto en grasa) la cantidad de soluciones de Carrez puede ser aumentada.
Tras el enfriamiento a temperatura ambiente el matraz aforado se rellena con agua desionizada hasta la marca y se mezcla.
La solución de muestra se filtra por un filtro para precipitados medio-finos.
La primera parte del filtrado es descartada; el filtrado tiene que ser claro e incoloro.

[0058] Para la determinación de nitrito, 10 ml de filtrado se transfieren a un matraz de 100 ml añadiendo 5 ml de reactivo de color I (6g sulfanilamida disuelta en 500 ml de agua desionizada calentando, adicionado 250 ml HCl (37%) por agitación permanente tras el enfriamiento y rellenado hasta 1000 ml con agua desionizada) y reactivo de color II (0,25 g N-(1-Naftil)etilendiamoniodicloruro disuelto en 250 ml de agua desionizada; la solución tiene que ser almacenada en una botella marrón y tiene que ser preparada semanalmente).
La solución se incuba a oscuras durante 30 min a temperatura ambiente.
En seguida la extinción de la solución se determina fotométricamente a 546 nm contra un ciego (reactivo de Color I y II + agua desionizada en una relación de 1:2).

[0059] Para la determinación de nitrato, 20 ml del filtrado se transfire en un matraz de 100 ml añadiendo 5 ml de tampón de amoníaco (20 ml HCl (37%) diluido en 500 ml de agua desionizada, adicionado 10 g Titriplex III (EDTA) y 55 ml de solución de amoníaco (25%) y rellenado hasta 1000 ml con agua desionizada; pH 9,6-9,7).
La solución mezclada se transfiere a la columna de reducción.
La columna tiene que ser preparada antes por flujo a través de 25 ml de HCl (0,1M), 50 ml de agua desionizada y 25 ml de solución de tampón de amoníaco diluido (1:10 dilución en agua desionizada).
La columna nunca debería ejecutarse en seco.
El eluato para la determinación de nitrato se recoge en un matraz aforado de 100 ml.
Después de que el filtrado entero sea añadido la columna es lavada 3-4 veces con aproximadamente 15 ml de agua desionizada.
El flujo a través es también recogido en el matraz aforado.
El matraz aforado que ahora está conteniendo la solución de muestra reducida es rellenado hasta la marca con agua desionizada y mezclado íntegramente.
Para la determinación de nitrito/nirato reducido, 10 ml de filtrado se transfieren a un matraz de 100 ml añadiendo 5 ml de reactivo de color I y II.
La solución se incuba a oscuras durante 30 min a temperatura ambiente.
A continuación la extinción de la solución se determina fotométricamente a 546 nm contra un ciego (reactivo de Color I y II + agua desionizada en una relación de 1:2).

Cálculos

[0060] La concentración de nitrito, indicada como $NaNO_2$ en ppm [mg/kg], es calculada de la siguiente manera:

$$\text{Concentración de nitrito [ppm]} = a * V / E_w$$

donde

a: µg $NaNO_2$ (este valor puede ser leído directamente de una línea de calibración después de la determinación de la extinción de la muestra a 546 nm.
La línea de calibración se genera por la determinación de la extinción a 546 nm de soluciones con la concentración de nitrito conocida) en la muestra directamente después de la extracción.
V: factor de dilución.
$E_w$: peso de muestra en g.

[0061] La concentración de nitrito total, indicada como $NaNO_2$ en ppm [mg/kg], es calculada de la siguiente manera:

$$\text{Concentración de nitrito total [ppm]} = b * V / E_w$$

donde
b: µg $NaNO_2$ (este valor puede ser leído directamente de una línea de calibración después de la determinación de la extinción de la muestra a 546 nm.
La línea de calibración se genera por la determinación de la extinción a 546 nm de soluciones con concentración de nitrito conocida) originalmente en la muestra más el nitrito que es derivado de nitrato por reducción a través de la columna de cadmio.
V: factor de dilución.
$E_w$: peso de muestra en g.

[0062] La concentración de nitrato, indicada como $KNO_3$ en ppm [mg/kg], es calculada de la siguiente manera:

Nitrito de la concentración de nitrato [ppm] = concentración de nitrito total [ppm] – concentración de nitrito [ppm]

Concentración de nitrato [ppm] = nitrito de la concentración de nitrato [ppm] x 1,465 (factor de conversión de nitrito a nitrato)

[0063] Ejemplo 1: procedimiento de fermentación estándar para especies de *Staphylococcus*.

*Experimental*:

[0064] Las fermentaciones fueron efectuadas en una versión modificada del medio de glicerol estándar que se usa para *Staphylococcus carnosus* MIII.
El contenido de glicerol se reduce en comparación con el medio estándar usado para *Staphylococcus carnosus* MIII para asegurar un suministro suficiente con oxígeno.

Medio de fermentación:

| Descripción del objeto | % | Peso (g) |
|---|---|---|
| Agua | 91.20 | 10944.00 |
| Aceite antiespumante Erol DF 204 K | 0.20 | 24.00 |
| Nitrato de potasio | 0.10 | 12.00 |
| Extracto de levadura - HyYest 412 (Sheffield Bioscience) | 5.00 | 600.00 |
| Glicerol 99.5% | 3.50 | 420.00 |
| **Suma** | **100.00** | **12000.00** |

[0065] Medio de fermentación fue preparado y el pH fue ajustado a 7.2 antes de esterilización por la autoclave a 121°C durante 20 min. El pH fue ajustado a 7.2 y la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* fue inoculada a 0,1% (aprox. $2,6x10^7$ UFC/mL).
La fermentación se efectuó a 37°C con agitación de 500 r.p.m. y una corriente de aire de 0,5 vvm (6 L/min) durante 15,5 horas.

[0066] Se tomaron muestras durante el proceso de fermentación entero en los mismos puntos temporales mostrados en la figura 1.
Las muestras fueron analizadas con respecto a la concentración de nitrato/nitrito.

Resultados

[0067] Los resultados muestran que la cepa (CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus*) está reduciendo nitrato a nitrito después de aproximadamente 6-8 horas de fermentación.
Esto indica una caída en el suministro de oxígeno en ese momento muy probablemente provocada por un aumento en la densidad celular.
La transcripción del operón nar (reducción de nitrato) es inducida bajo condiciones anóxicas en presencia de nitrato e inhibida por la presencia de oxígeno.
La Figura 1 muestra que el NRA está aumentando entre 8 y 9 horas a cierto nivel, donde muy probablemente ocurre una caída en el suministro de oxígeno.
El NRA es máximo alrededor de 9 horas de fermentación y luego disminuye otra vez muy probablemente debido a la falta de nitrato que es rápidamente reducida cuando ya no se suministra suficiente oxígeno a la cepa.
Sin embargo, el nivel alto de nitrito que ya no es reducido a amoníaco por *Staphylococcus vitulinus* es también conocido por inducir el operón nar.
Esto podría explicar que hay solo una ligera reducción en NRA al final de la fermentación.
De los datos mostrados se puede ver claramente que la cepa está agotando rápidamente los nitratos y esto puede explicar el NRA reducido de la cepa cuando se produce por el procedimiento de fermentación monofásico estándar.
Para mejorar el NRA de *Staphylococcus vitulinus* se sugirió ejecutar un procedimiento de fermentación dividido en dos fases.
En la primera fase la cepa tiene que ser suministrada con oxígeno suficiente para generar biomasa eficazmente.
En la segunda fase el proceso debería ser accionado por condiciones aeróbicas a anaeróbicas o de limitación de oxígeno acompañadas por un suministro continuo de nitrato.
Se debe evitar que la cepa esté agotando el nitrato durante el crecimiento anaeróbico o limitado al oxígeno hasta el final de la fermentación.

Ejemplo 2: adaptación del procedimiento de fermentación estándar a un proceso bifásico.

[0068] El procedimiento de fermentación adaptado para optimizar el NRA de la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* se puede dividir en dos fases.
El fin de la primera fase es el desarrollo de la biomasa mientras la cepa se airea suficientemente mientras que la

segunda fase es para la preparación para optimizar/aumentar el NRA al reducir la aireación y suministrar impulsos continuos de nitrato hasta que el final de la fermentación.
En total dos fermentaciones fueron efectuadas aplicando el proceso descrito de forma aproximada anteriormente.
Las fermentaciones fueron efectuadas en una versión modificada del medio de glicerol estándar que se usa para *Staphylococcus carnosus* MIII.
El contenido de glicerol se reduce en comparación con el medio estándar usado para *Staphylococcus carnosus* MIII para asegurar un suministro suficiente con oxígeno durante la primera fase de fermentación aireada.
En total 4 fermentaciones fueron efectuadas, 2 dejando de lado el nitrato que se usa por defecto en el medio de glicerol estándar.
Sin embargo, el suministro de nitrato se aplicó en ambos casos después de reducir la aireación.

*Experimental*

[0069] Un lote de medio de fermentación se preparó según la receta en el ejemplo 1 y un lote de medio de fermentación sin nitrato fue preparado.
El pH de ambos medios fue ajustado a 7.2 antes de esterilización por autoclave a 121°C durante 20 min. El pH fue ajustado a 7.2 nuevamente y la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* fue inoculada a 0,1% (aprox. $2,6x10^7$ UFC/mL) en cada medio de fermentación.

[0070] El contenido de oxígeno disuelto ($pO_2$) en el medio de fermentación fue medido con sensores ópticos de oxígeno disuelto (Mettler Toledo InPro6870i/120).
La fermentación se efectuó a 37°C con agitación a 500 r.p.m. y una corriente de aire de 0.5 vvm (6 L/min) hasta que $pO_2$ alcanzó 0 (aproximadamente 6,3 horas).
Luego la corriente de aire fue reducida a 0,08 vvm (1 L/min) y el suministro de nitrato (0,17 g/L nitrato de potasio con 10 min de impulsos=1,02 g/(l*h)) comenzó.
La fermentación se efectuó durante aproximadamente 19 horas en total.
Luego la fermentación fue enfriada hasta 15°C y las células fueron cosechadas.

[0071] Muestras de las fermentaciones anteriormente descritas se tomaron en momentos diferentes y se analizaron con respecto a la concentración de nitrato y de nitrito.
Los resultados de los análisis se muestran en las Figuras 2 (ningún nitrato añadido al medio de fermentación inicial) y 3 (nitrato añadido al medio de fermentación inicial).

Resultados

[0072] Los resultados (figuras 2 y 3) claramente muestran que la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* está convirtiendo/reduciendo suficientemente nitrato en nitrito en el momento que ya no se suministra oxígeno suficiente.
Como ningún nitrato se está acumulando durante la fase de suministro, el NRA parece ser más bien alto.
Sin embargo, la actividad máxima de CHCC10896 puede no ser alcanzada aún cuando la concentración de nitrito sigue aumentando mientras el nitrato es completamente reducido.
Si la actividad máxima hubiera sido alcanzada, el nitrato debería haberse acumulado y la concentración de nitrito ya no aceleraría con la misma pendiente o incluso alcanzaría una fase de meseta/estacionaria.

[0073] Cuando el nitrato se añade en el medio desde el principio (figura 3) la pendiente de acumulación de nitrito es ligeramente más pronunciada en comparación con la fermentación donde el nitrato no estaba adicionado desde el principio (figura 2).
Por lo tanto, se decidió usar un medio por lotes donde ningún nitrato se añade desde el principio ya que de todos modos no es reducido por *Staphylococcus vitulinus* hasta que la aireación es reducida.

Ejemplo 3: ensayo de aplicación en embutido tipo mortadela.

[0074] Para probar el efecto del procedimiento de fermentación en dos fases recién desarrollado en una prueba de aplicación, 2 fermentaciones diferentes fueron efectuadas; una fermentación de la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* después de la fermentación estándar y una fermentación después de un procedimiento en dos fases como se ha descrito anteriormente.

[0075] Las células de ambas fermentaciones fueron cosechadas y liofilizadas añadiendo un crioaditivo.
Ambos lotes fueron usados en un contexto de aplicación por la producción de 3 lotes de embutidos emulsionadas, 1 lote con *Staphylococcus vitulinus* fermentado por el procedimiento estándar, 1 lote con *Staphylococcus vitulinus* fermentado por una fermentación en dos fases con suministro de nitrato en la segunda fase y 1 lote con el cultivo comercial Bactoferm® CS-300 (Chr. Hansen, Dinamarca) compuesta por 2 cepas de *Staphylococcus carnosus* que sirve como un control.

Experimental

Determinación de recuento de células de granulado liofilizado.

[0076] La determinación de recuento de células se efectuó por citometría de flujo:

| Cepa | ID Muestra | Activo/g | CV | Total/g | CV | Activo / total | SD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| S. vitulinus | Std | 5.97E+11 | 3.9% | 9.97E+11 | 2.0% | 60% | 1.1% |
| S. vitulinus | Suministro de nitrato | 4.95E+11 | 0.2% | 5.54E+11 | 0.5% | 89% | 0.3% |
| CV: coeficiente de variación. SD: desviación estándar. | | | | | | | |

Embutidos emulsionados

[0077] Embutidos tipo Mortadela - receta (10 kg lote):

| | | |
|---|---|---|
| 20% | RII (carne magra) | 2 Kg |
| 40% | SII (paleta de cerdo) | 4 Kg |
| 20% | Grasa (manteca de cerdo) | 2 Kg |
| 20% | Hielo | 2 Kg |
| 20 g/kg | Sal común | 200 g |
| 2 g/kg | Pimienta blanca | 20 g |
| 0.5 g/kg | Cardamomo | 5 g |
| 2 g/kg | Dextrosa | 20 g |
| 3 g/kg | Di-fosfato | 30 g |
| 0.1 g/kg | Nitrato de Na | 1 g |

• toda la carne y grasa fueron trituradas a través de una placa de 2 mm
• todos los ingredientes incluyendo cultivos bacterianos fueron puestos en un bol (Mado Supra 35), desmenuzados y cortados a 4000 r.p.m. y velocidad de bol 2
• 10 vueltas seguido de limpieza y adición de 500 g $CO_2$ (temperatura de troceado inferior)
• 20 vueltas (30 en total) seguido de limpieza
• 20 vueltas (50 en total) para acabar el corte
• la mezcla fue rellenada en envolturas de 75 mm Nalo TOP (+ 8 tazas para análisis)
• el tratamiento de curación se efectuó a 4°C, 12°C y 18°C durante 21 horas
• tratamiento térmico a 80°C en la cámara hasta 72°C en el centro
• 20 minutos de ducha de fría
• se dejó en la cámara de enfriamiento a 4°C durante 24 hrs

Nivel de concentración/inoculación de células meta

[0078] Como CS-300 fue usado como control, ambas muestras de *Staphylococcus vitulinus* fueron dosificadas según el recuento de células meta de CS-300 para 100 kg de carne.
Originalmente, ambas cepas en CS-300 fueron dosificadas al mismo nivel pero debido al cambio al medio de fermentación MIII, esta cepa fue sobredosificada en un 20% como margen de seguridad:
Recuento de células meta de CS-300 = $3{,}2x10^{12}$ CFU/100 lg

[0079] Un margen de seguridad del 20% fue añadido en cada producto sobre el recuento de células meta.

[0080] El recuento de células meta de muestras de *Staphylococcus vitulinus* = $3.0x10^{12}$ CFU/100 kg de carne + 20% margen de seguridad
*Staphylococcus vitulinus* – estándar (1) = 6,03g/100 kg
*Staphylococcus vitulinus* – suministro de nitrato (2*)* = *7,*7 g/100 kg

Denominación de lotes

[0081]
1) Staphylococcus vitulinus - estándar
2) Staphylococcus vitulinus - suministro de nitrato
3) Bactoferm® CS-300

Incubación/fermentación

[0082] En cada caso 3 embutidos de cada uno de los tres lotes fueron fermentados a las temperaturas siguientes durante 21 horas antes de cocción para imitar el proceso de volteo:
• 4°C
• 12°C
• 188°C

Resultados

Análisis químico

[0083] Las concentraciones de nitrato/nitrito en la materia prima antes del relleno, en la materia prima después de 21 horas de fermentación y en el producto final después de la cocción fueron determinadas por el método anteriormente descrito (figuras 4-6).

Análisis microbiológico

[0084] Materia prima extraída después de la fermentación y antes de la cocción.
1) - 4°C $5,0x10^6$ CFU/g
2) - 4°C $3,9x10^7$ CFU/g
3) - 4°C $4,4x10^7$ CFU/g

1) - 12°C $8,2x10^6$ CFU/g
2) - 12°C $4,7x10^7$ CFU/g
3) - 12°C $4,2x10^7$ CFU/g

1) - 18°C $7,6x10^6$ CFU/g
2) - 18°C $5,9x10^7$ CFU/g
3) - 18°C $5,1x10^7$ CFU/g

Determinación de intensidad de color de rojo

[0085] Muestras fueron medidas en un colorímetro Konica Minolta y los valores a* fueron determinados según el sistema de color L*a*b* (figura 7).

*Discusión*

[0086] Podría ser claramente mostrado que la modificación del procedimiento de fermentación de la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* lleva a una mejora significativa de actividad de nitrato-reductasa en la aplicación de carne.
La cepa producida por un suministro de nitrato durante la fase de crecimiento de oxígeno limitado lleva a una formación de color rojo agradable incluso a temperaturas bajas que se refleja por los resultados de la determinación de nitrato/nitrito y la determinación de intensidad de color rojo.
Hay una ventaja clara de un suministro de nitrato durante la fase de oxígeno limitada en comparación con el proceso de fermentación estándar.
Una diferencia significativa puede verse en la intensidad de color rojo especialmente a temperaturas bajas (4°C y 12°C).
Además, se muestra que la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* producida por suministro de nitrato muestra un rendimiento de formación de color rojo significativamente mejor que CS-300 a 4°C y 12°C.

Ejemplo 4: *segunda prueba de aplicación en embutidos tipo mortadela*.

[0087] Para confirmar los resultados de la primera y segunda prueba de aplicación, otra prueba de aplicación con materia liofilizada recién producida fue realizada para asegurar la robustez del procedimiento de fermentación en dos fases.

[0088] 4 lotes diferentes de embutidos emulsionados fueron producidos aplicando *Staphylococcus vitulinus* producida por un procedimiento de fermentación en dos fases bien con o sin nitrato adicionado desde el principio, CS-300 y NatuRed LT. Los embutidos fueron incubados a temperaturas diferentes (4°C, 8°C, y 12°C) y la fermentación a estas temperaturas fueron realizadas durante 7 horas, 12 horas y 24 horas para seguir el desarrollo de reducción de nitrato y proceso de formación de color rojo.

Experimental

[0089] Determinación de recuento de células de granulado liofilizado producido como se describe en el ejemplo 2

[0090] La determinación de recuento de células se efectuó por citometría de flujo:

| Cepa | Muestra ID | Activo/g | CV | Total/g | CV | Activo / total |
|---|---|---|---|---|---|---|
| S. vitulinus | Suministro de nitrato, nitrato desde el principio | 4.17E+11 | 9.8% | 5.54E+11 | 2.3% | 75% |
| S. vitulinus | Suministro de nitrato, ningún nitrato desde el principio | 4.23E+11 | 3.1% | 5.18E+11 | 1.1% | 82% |
| CV: coeficiente de variación. SD: desviación típica. | | | | | | |

Embutidos emulsionados

[0091]

Embutidos tipo Mortadela - receta (15 kg lote):

| | | |
|---|---|---|
| 20% | RII (carne magra) | 3 Kg |
| 40% | SII (paleta de cerdo) | 6 Kg |
| 20% | Grasa (manteca de cerdo) | 3 Kg |
| 20% | Hielo | 3 Kg |
| 20 g/kg | Sal común | 300 g |
| 2 g/kg | Pimienta blanca | 30 g |
| 0.5 g/kg | Cardamomo | 7.5 g |
| 2 g/kg | Dextrosa | 30 g |
| 3 g/kg | Di-fosfato | 45 g |
| 0.1 g/kg | Nitrato de Na | 1.5 g |

- toda la carne y grasa fueron trituradas a través de una placa de 2 mm
- todos los ingredientes incluyendo cultivos bacterianos fueron puestos en un bol (Mado Supra 35), desmenuzado y cortado a 4000 r.p.m. y velocidad de bol 2
- 10 ciclos seguidos de limpieza y adición de 500 g $CO_2$ (temperatura de troceado inferior)
- 20 ciclos (30 en total) seguido de limpieza
- 30 ciclos (60 en total) para acabar el corte
- la mezcla fue dividida en 3 lotes de 5 kg
- corte otras 15 vueltas a 2000 r.p.m. y velocidad de bol 1
- la mezcla fue rellenada en envolturas de 75 mm Nalo TOP (+ tazas para análisis)
- el tratamiento de curación se efectuó a 4°C, 8°C y 12°C durante 24 horas
- tratamiento térmico a 80°C en la cámara hasta 72°C en el centro
- 20 minutos ducha fría
- se dejó en la cámara de enfriamiento a 4°C durante 24 hrs.

Nivel de recuento/inoculación de células meta

[0092] El recuento de células meta para cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* tal como se ha mencionado anteriormente es $3.0x10^{12}$ CFU/100 kg de carne.
Bactoferm® CS-300 y TEXEL® NaturRed LT fueron aplicados como se recomienda por la información de producto.

Denominación de lotes

[0093]
1) *Staphylococcus vitulinus* - suministro de nitrato; nitrato desde el principio
2) *Staphylococcus vitulinus* - Suministro de nitrato; ningún nitrato desde el principio
3) Bactoferm® CS-300
4) TEXEL® NatuRed LT

Incubación/fermentación

[0094] En cada caso 4 embutidos de cada uno de los cuatro lotes fueron fermentados a las temperaturas siguientes para imitar el proceso de volteo:
- 4°C
- 12°C
- 18°C

Período de incubación antes de cocción

[0095]
- 7 horas
- 12 horas
- 24 horas

Resultados

Análisis químico

[0096] Para cada cultivo, período de incubación y temperatura antes de la cocción
- un total de 36 muestras (vasos de precipitación de tapa roja) fueron analizados

[0097] Para cada cultivo, período de incubación y temperatura después de la cocción
• un total de 36 muestras (embutidos finales) fueron analizadas figura 8.

Determinación de intensidad de color rojo

[0098] Muestras fueron medidas en un colorímetro Konica Minolta y los valores a* fueron determinados según el sistema de color L*a*b* (figuras 9-11)

*Discusión*

[0099] Los datos confirman los resultados de los ensayos precedentes (Ejemplo 3 y 4).
Cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* muestra un nitrato más eficaz para conversión de nitrito en todas las temperaturas evaluadas comparado con Bactoferm@ CS-300 y es al menos comparable a TEXEL® NatuRed.
El mejor nitrato para conversión de nitrito es también documentado por el color rojo más intensivo de embutidos producidos por la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus*.
Sin embargo, la presencia de nitrato en el medio de lote desde el principio de la fermentación parece tener una influencia negativa en la conversión de nitrato y formación de color rojo porque este lote parece ser menos eficaz en comparación con el lote donde ningún nitrato estuvo presente hasta que comenzó el suministro.
La prueba muestra una ventaja clara de la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* producida por un proceso de fermentación en dos fases, una primera fase aeróbica sin la presencia de nitrato en el medio de lote y una segunda fase anaeróbica o limitada al oxigeno con un suministro continuo de nitrato.

Ejemplo 5: prueba de aplicación en jamón cocido.

[0100] Cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* fue evaluada en un modelo de jamón cocido en comparación con Bactoferm® CS-299 (Chr. Hansen, Dinamarca), el cultivo que es más frecuentemente usado para esta área de aplicación además de Bactoferm® CS-300.
Bactoferm® CS-299 está compuesto de solo una cepa de *Staphylococcus carnosus* mientras que Bactoferm® CS-300 está compuesto de dos cepas de *Staphylococcus carnosus* diferentes.
El recuento de células de Bactoferm® CS-300 es dos veces el recuento de células de Bactoferm® CS-299.

Experimental

[0101] Producción de jamón cocido aplicando la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* producida por un procedimiento de fermentación en dos fases en comparación con Bactoferm® CS-299.
El nivel de inoculación de cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* fue alineada con el recuento de células meta de Bactoferm® CS-299 ($1.5x10^{12}$ CFU/kg).

Jamón cocido

[0102]
1. Corte de músculo redondo de pierna de cerdo (nuez) para obtener carne magra.
2. "Trituración" de la carne por triturador (Mado MEW 718) ejecutada con taladro solo.
3. Cultivo bacteriano y solución salina se añadió a la carne. Volteo por la máquina de volteo (Rühle MKR 150) durante 16 horas a 6°C. Vueltas Totales 5220. 15 Minutos ejecutándose por 10 r.p.m. y 15 minutos de reposo.
4. Vacío de embalaje en bolsas PE/PA .
5. Moldeo.
6. Tratamiento térmico en cámara Autotherm por vapor a 80°C hasta 75°C en el centro, seguido de 10 minutos de ducha fría.
7. Enfriamiento final a 3-4°C en la cámara de enfriamiento.
8. Desmoldeo y corte.

[0103] 100 kg carne más 15 kg solución salina (15%)

[0104] Cálculo de solución salina para conseguir: 2% sal común en el producto final (115 kg, ninguna pérdida de peso)
0.2% Dextrosa
0.3% Di-fosfato
0.01% Nitrato de potasio

| | |
|---|---|
| Carne | 8000 g |
| Sal común | 184 g |
| Dextrosa | 18 g |
| Di-fosfato | 28 g |
| Nitrato de potasio | 1 g |
| Agua del grifo | 969 g |
| Cultivo | Ver arriba |

Total 9200 g

*Resultados*

Determinación de intensidad de color de rojo

[0105] Debido al hecho de que un jamón cocido normalmente no tiene una superficie homogénea una loncha de 0,5 cm de cada lote fue homogeneizada por la trituración.
El material triturado de cada lote fue estratificado en una placa de Petri que da una superficie homogénea para determinar el color rojo.

[0106] Las muestras fueron medidas en un colorímetro de Konica Minolta CR-400 y los valores a* fueron determinados según el sistema de color L*a*b* (figura 12).
Además, la intensidad de color rojo fue examinada visualmente (figura 13).

Discusión

[0107] De la observación visual y determinación de intensidad de color rojo se puede concluir que la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* producida usando un procedimiento de fermentación en dos fases da un mejor color que Bactoferm® CS-299 cuando se voltea a temperaturas bajas (6°C): el jamón cocido preparado con la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* pretratada con el método de fermentación en dos fases tiene un color rojo más intenso y más luminoso que el jamón cocido preparado con Bactoferm® CS-299 (figura 13).
Este podría también ser medido como un valor a* más alto (intensidad de color rojo) según el sistema L*a*b* del jamón cocido preparado con la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* pretratada con el método de fermentación en dos fases (figura 12).
El color rojo más intenso es más probablemente debido a una conversión/reducción más eficaz de nitrato a nitrito.

Ejemplo 6: Cepa CHCC11576 de *Staphylococcus vitulinus* fermentada según el procedimiento de fermentación estándar en comparación con el procedimiento de fermentación en dos fases en una aplicación de embutidos emulsionados

[0108] Para probar si el procedimiento de fermentación en dos fases está también mejorando la capacidad de una cepa de *Staphylococcus vitulinus* diferente para convertir metamioglobina en la nitrosilmioglobina para producir un color rojo estable a bajas temperaturas, la cepa CHCC11576 de *Staphylococcus vitulinus* fue fermentada según el procedimiento de fermentación estándar y según el procedimiento de fermentación en dos fases como se ha descrito antes.
Las células de ambas fermentaciones fueron cosechadas y liofilizadas.
Ambos lotes fueron usados en una prueba de aplicación por la producción de 3 lotes de embutidos emulsionadas; 1 lote con la cepa CHCC11576 de *Staphylococcus vitulinus* fermentada por el procedimiento estándar, 1 lote con la cepa CHCC11576 de *Staphylococcus vitulinus* fermentada por una fermentación en dos fases con suministro de nitrato en la segunda fase, y 1 lote con una cepa A de Staphylococcus carnosus fermentada por el procedimiento estándar.

Experimental

Determinación de recuento de células de granulado liofilizado.

[0109] La determinación de recuento de células se efectuó por citometría de flujo:

| Cepa | Lote | Activo/g | CV | Total/g | CV | Activo/total | SD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | |
| CHCC11576 de *S. vitulinus* | Fermentación estándar | 8.65E+11 | 0.7% | 1.18E+12 | 1.5% | 74% | 0.5% |
| CHCC11576 de *S. vitulinus* | Fermentación en dos fases | 3.47E+11 | 1.8% | 4.52E+11 | 1.2% | 77% | 0.4% |
| CV: coeficiente de variación. SD: desviación típica. | | | | | | | |

Embutidos emulsionados:

Embutidos tipo Mortadela - receta (5 kg lote):

[0110]

| | Tipo Mortadela: | |
|---|---|---|
| 20% | RII (carne magra) | 1 Kg |
| 40% | SII (paleta de cerdo) | 2 Kg |
| 20% | Grasa (manteca de cerdo) | 1 Kg |

| | | |
|---|---|---|
| 20% | Hielo | 1 Kg |
| 2 g/kg | Dextrosa | 10 g |
| 3 g/kg | Di-fosfato | 15 g |
| 0,1 g/kg | Nitrato de Na | 0.5 g |

[0111] El embutido tipo mortadela fue preparado según el procedimiento descrito antes.
Nivel de recuento/inoculación de células meta

Recuento de células meta = 3.2E12 CFU/100 kg (incluyendo 20% margen de seguridad)

[0112] Cada lote fue inoculado según el mismo recuento de células meta.

Denominación de lotes

[0113]
1) CHCC11576 - estándar
2) CHCC11576 - suministro de nitrato
3) *S.carnosus*

Incubación/fermentación

[0114] En cada caso 3 embutidos de cada uno de los tres lotes fueron fermentados en las temperaturas siguientes durante 20, respectivamente 18, horas antes de la cocción para imitar el proceso de volteo de jamón cocido:
• 4°C
• 8°C

Resultados

Determinación de intensidad de color de rojo

[0115] Muestras fueron medidas en un colorímetro Konica Minolta y los valores a* fueron determinados según el sistema de color L*a*b* (figuras 14 y 15).
Además, la intensidad de color rojo fue examinada visualmente (figuras 16 y 17).

Determinación de concentración de nitrato/nitrito:

[0116] Muestras de cada lote fueron rellenadas en los vasos de precipitación de tapa roja e incubadas a 4°C y 8°C con los embutidos durante la misma duración.
Las muestras fueron almacenadas a -20°C directamente tras la incubación (4°C = 20h; 8°C = 18h).
Las muestras fueron analizadas con respecto a la concentración de nitrato/nitrito enzimáticamente como se describe en Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren §64 Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB; German Food and Feed Act) (L 07.00-60) y los resultados se representan en la figura 18.
1) CHCC11576 de *S. vitulinus* - estándar
2) CHCC11576 de *S. vitulinus* - suministro de nitrato
3) *S. carnosus*

Conclusión:

[0117] Se podría mostrar claramente que la modificación del procedimiento de fermentación de la cepa CHCC11576 de *Stapylococcus vitulinus* lleva a una mejora significativa de actividad de nitrato-reductasa en la aplicación a la carne.
La cepa producida por un suministro de nitrato durante la fase de crecimiento limitado al oxígeno lleva a una formación de color rojo agradable a temperaturas relativamente bajas de 4°C y 8°C que se refleja por la determinación de intensidad de color rojo que muestra un valor a* (intensidad de color rojo) según el sistema L*a*b* significativamente superior al valor a* medido para los embutidos preparados utilizando bien CHCC11576 de *Staphylococcus vitulinus* producida por fermentación estándar o cepa A de *Staphylococcus* producida por fermentación estándar (figura 14 y 15) y la documentación fotográfica mostrando una coloración más roja de los embutidos preparados con CHCC11576 de *Staphylococcus vitulinus* producida por el método de fermentación en dos fases de la invención (figura 16 y 17).
Además, podría ser mostrado, que se reduce más nitrato y se desarrolla más nitrito por CHCC11576 de *Staphylococccus vitulinus* cuando se fermenta según el procedimiento de fermentación en dos fases por el nitrato de suministro durante la fase anaeróbica (figura 18).
En el caso de CHCC111576 de *Staphylococcus vitulinus* cuando se somete a fermentación estándar ningún nitrito

pudo ser detectado en las muestras de carne y la concentración de nitrato es significativamente más alta.
Hay una ventaja clara de un suministro de nitrato durante la fase de oxígeno limitada en comparación con el proceso de fermentación estándar.
La mejora de CHCC11576 de *Staphylococcus vitulinus* es comparable a la mejora ya mostrada para CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus*, de modo que puede ser concluido, que la optimización de la actividad de nitrato-reductasa por una fermentación en dos fases como se describe antes no es exclusiva para CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* sino también para una cepa diferente, en este caso la cepa CHCC11576 de *Staphylococcus vitulinus*.
Es muy probable, que se pueda también alcanzar una mejora de actividad de nitrato-reductasa para otras especies del género *Staphylococccus*, tal como *Staphylococcus carnosus*.

Ejemplo 7: comparación de fermentación de suministro y fermentación de picos.

[0118] Dos fermentaciones fueron realizadas, evaluando si un suministro continuo durante la segunda fase poco aireada de la fermentación es necesitado, o si dar solo un pico de nitrato de alta concentración al principio de la segunda fase es tan eficaz en la mejora de la actividad de nitrato-reductasa como en la capacidad para convertir metamioglobina eficazmente en la nitrosilmioglobina.

[0119] La fermentación en dos fases se ejecutó aeróbicamente hasta que el nivel de oxígeno disuelto alcanzó 0% (pO2=0).
En este punto la aireación fue bajada de 6 a 1 L/min y el suministro de nitrato comenzó (aprox. 1 G/L*h - dado en suministros pulsados cada 10 min).
El suministro fue continuado hasta que todo el glicerol de la fuente de carbono en el medio había sido consumido (parada de base).

[0120] La fermentación de picos fue completamente aireada hasta la parada de base.
En la parada de base (EFT: 10h), la aireación fue bajada a 1L/min y el pico (que contiene aprox. 72 g/L glicerol y 216 g/L nitrato de potasio, que equivale 3 g/L glicerol y 9 g/L nitrato en el fermentador) se añadió al medio (volumen de pico fue 500 mL).
Glicerol fue dado con el pico de nitrato, ya que el nitrato no se reduce en el nitrito si ninguna fuente de carbono está disponible.

Experimental

[0121] Determinación de recuento de células de granulado liofilizado.

[0122] La determinación de recuento de células se efectuó por citometría de flujo:

| Cepa | Lote | Activo/g | CV | Total/g | CV | Activo/total | SD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | |
| CHCC10896 de *S. vitulinus* | Fermentación de picos | 1.03E+12 | 3.2% | 1.13E+12 | 3.0% | 91% | 0.2% |
| CHCC10896 de *S. vitulinus* | Fermentación en dos fases | 3.47E+11 | 1.8% | 4.52E+11 | 1.2% | 77% | 0.4% |
| CV: coeficiente de variación. SD: desviación típica. | | | | | | | |

Embutidos emulsionados:

Embutidos tipo mortadela - receta (5 kg lote):

[0123]
Tipo mortadela:

| | | |
|---|---|---|
| 20% | RII (carne magra) | 1 Kg |
| 40% | SII (paleta de cerdo) | 2 Kg |
| 20% | Grasa (manteca de cerdo) | 1 Kg |
| 20% | Hielo | 1 Kg |
| 2 g/kg | Dextrosa | 10 g |
| 3 g/kg | Di-fosfato | 15 g |
| 0.1 g/kg | Nitrato de Na | 0.5 g |

[0124] Los embutidos tipo mortadela fueron preparados según el procedimiento descrito antes.
Nivel de concentración/inoculación de células meta

Recuento de células meta = 3.2E12 CFU/100 kg (incluyendo 20% margen de seguridad)

[0125] Cada lote fue inoculado según el mismo recuento de células meta.

Denominación de lotes

[0126]
1) CHCC10896 - pico
2) CHCC10896 - suministro
3) S. carnosus

Incubación/fermentación

[0127] En cada caso 3 embutidos de cada uno de los tres lotes fueron fermentados en las temperaturas siguientes durante 20, respectivamente 18 horas antes de la cocción para imitar el proceso de volteo de jamón cocido:
• 4°C
• 8°C

Resultados

Determinación de intensidad de color rojo

[0128] Muestras fueron medidas en un colorímetro Konica Minolta y los valores a* fueron determinados según el sistema de color L*a*b* (figuras 19 y 20).
Además, la intensidad de color rojo fue examinada visualmente (figuras 21 y 22).

[0129] Determinación de concentración de nitrato/nitrito:
Muestras de cada lote fueron rellenadas en los vasos de precipitación de tapa roja e incubadas a 4°C y 8°C con los embutidos durante la misma duración.
Las muestras fueron almacenadas a -20°C directamente tras la incubación (4°C = 20h; 8°C = 18h).
Las muestras fueron analizadas con respecto a la concentración de nitrato/nitrito enzimáticamente como se describe en Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren §64 Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB; German Food and Feed Act) (L 07.00-60) y los resultados se representan en la figura 23.
1) CHCC10896 de *S. vitulinus* - pico
2) CHCC10896 de *S. vitulinus* - suministro
3) *S. carnosus*

Conclusión:

[0130] Podría ser claramente mostrado, que la fermentación en dos fases con suministro de nitrato continuo durante la segunda fase poco aireada del proceso está conduciendo a una mejora significativa de actividad de nitrato-reductasa, respectivamente, de la capacidad para convertir metamioglobina de color marrón en su derivado rojo nitrosilmioglobina en comparación con la fermentación estándar de la cepa A de *Staphylococcus carnosus*.
Cuando solo un pico de nitrato de alta concentración fue dado al principio de la segunda fase (fermentación de picos) la intensidad del color rojo, como se determina por el valor a* según el sistema L*a*b* de los embutidos resultantes es superior que la de los embutidos preparados con *Staphylococcus carnosus* producida por fermentación estándar pero significativamente inferior a la intensidad de color rojo de los embutidos preparados con la cepa sometida al método de fermentación en dos fases según la presente invención (con suministro de nitrato continua durante la segunda fase del método de fermentación en dos fases).
La documentación fotográfica refleja estas determinaciones mostrando que unos embutidos preparados con la fermentación suministrada produjeron *Staphylococcus vitulinus*.
En comparación la fermentación en dos fases con un pico de nitrato al principio de la fase de crecimiento anaeróbico, no lleva a ninguna mejora de actividad de nitrato-reductasa puesto que la intensidad de color rojo es comparable a la intensidad de color rojo de los embutidos preparados con la cepa A de *Staphylococcus carnosus* fermentada por fermentación estándar.
Esto es también reflejado por la concentración de nitrato y de nitrito en las muestras de carne tras la incubación antes de la cocción.
La cepa fermentada según el procedimiento de fermentación en dos fases es capaz de reducir nitrato en nitrito en la temperatura y período de tiempo de fermentación dados mientras que CHCC10896 fermentada por fermentación de picos no reduce nitrato en nitrito de forma significativa.
Sin querer ceñirse a la teoría, se contempla que un suministro de nitrato continuo se necesita para mantener un nivel alto de expresión del operón nar responsable de la reducción de nitrato.

Depósitos y solución de experto

[0131] El solicitante pide que una muestra de los microorganismos depositados declarados a continuación pueda

solo estar disponible para un experto, hasta la fecha en la que la patente sea concedida.

[0132] La cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* fue depositada en 2012-03-15 en DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig y se le dio el número de acceso: DSM 25789.

[0133] La cepa CHCC11576 de *Staphylococcus vitulinus* fue depositada en 2013-06-11 en DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig y se le dio el número de acceso: DSM 27311.

[0134] Los depósitos fueron hechos según el tratado de Budapest en el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para los fines de procedimiento de patentes.

REFERENCIAS

[0135] WO2010/067148

**REIVINDICACIONES**

1. Método para aumentar la actividad de nitrato-reductasa de una cepa de *Staphylococcus* con actividad de nitrato-reductasa que incluye las etapas de
a) fermentar la cepa en ausencia de nitrato bajo condiciones aeróbicas;
b) fermentar la cepa bajo condiciones anaeróbicas o de limitación de oxígeno mientras se suministra continuamente nitrato al medio de fermentación; y
c) opcionalmente granular y opcionalmente liofilizar la cepa.

2. Método según la reivindicación 1, donde la cepa de *Staphylococcus* con actividad de nitrato-reductasa es una cepa de *Staphylococcus vitulinus* o una cepa de *Staphylococcus carnosus*.

3. Método según la reivindicación 2, donde la cepa de *Staphylococcus vitulinus* es seleccionada del grupo consistente en la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* que fue depositada con el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bajo el número de acceso DSM 25789, la cepa CHCC11576 de *Staphylococcus vitulinus* que fue depositada con el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bajo el número de acceso DSM 27311 y sus mutantes derivados.

4. Método para la formación de color rojo de un producto alimenticio que incluye las etapas de
a) tratamiento previo de una cepa de *Staphylococcus* con actividad de nitrato-reductasa según el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3;
b) adición de la cepa de *Staphylococcus* pretratada a un producto cárnico; y
c) fermentación, maduración o curación del producto de carne con la cepa de *Staphylococcus* pretratada.

5. Método según la reivindicación 4, donde el producto alimenticio es un producto cárnico.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, donde la cepa de *Staphylococcus* es una cepa de *Staphyloccoccus vitulinus* o una cepa de *Staphylococcus carnosus*.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, donde la cepa de *Staphylococcus vitulinus* es seleccionada del grupo consistente en la cepa CHCC10896 de *Staphylococcus vitulinus* que fue depositada con el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bajo el número de acceso DSM 25789, la cepa CHCC11576 de *Staphylococcus vitulinus* que fue depositada con el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zelikulturen (DSMZ) bajo el número de acceso DSM 27311 y sus mutantes derivados.

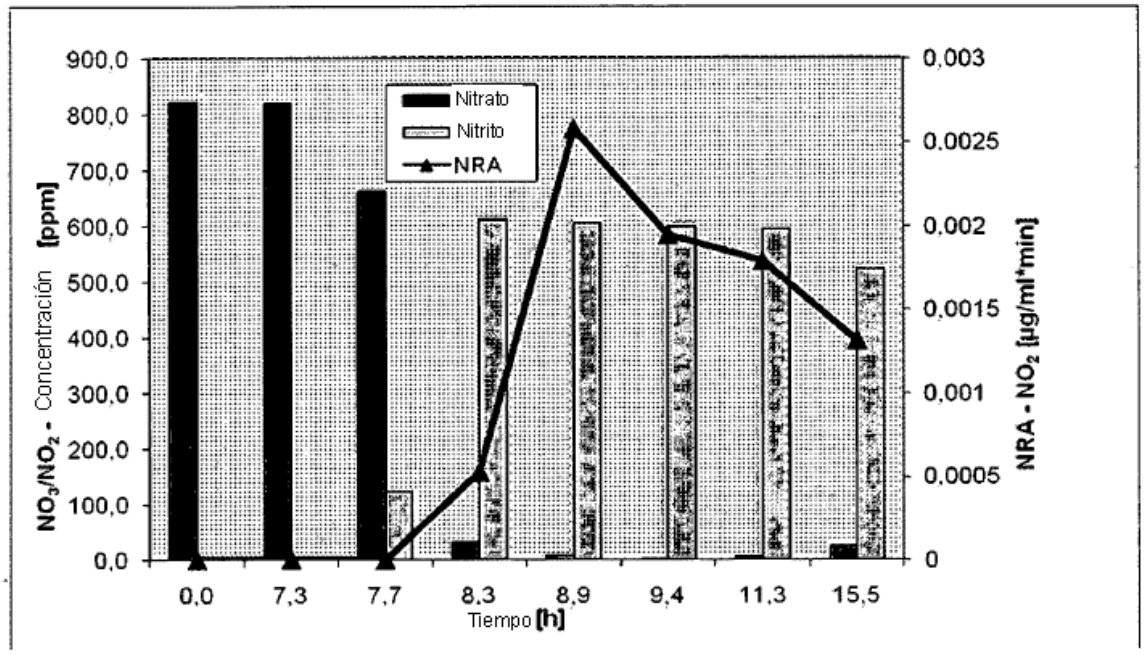


Figura 1

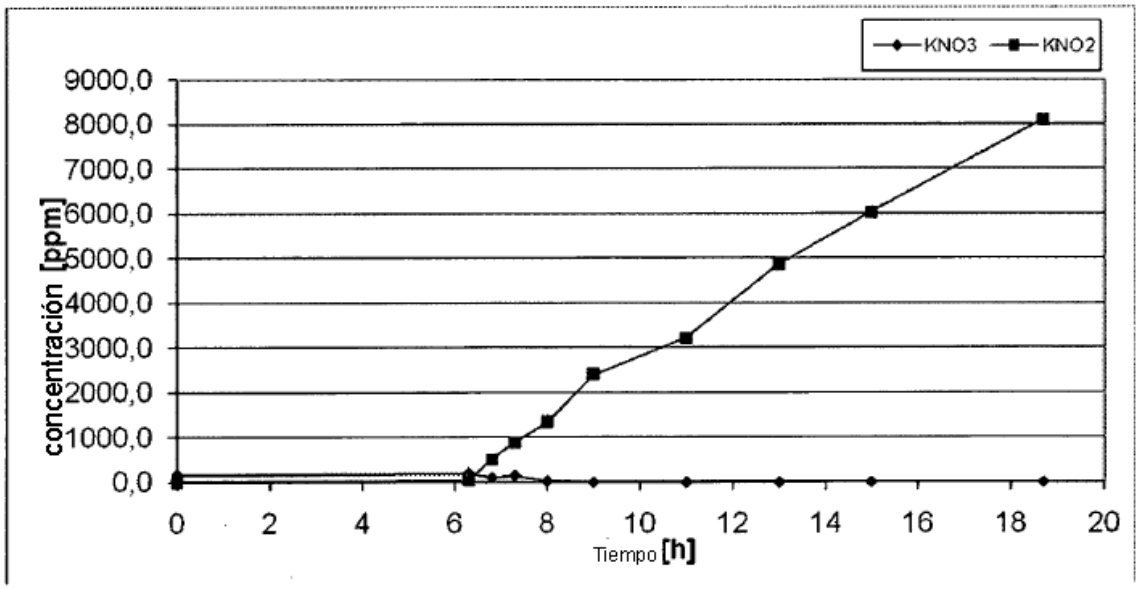


Figura 2

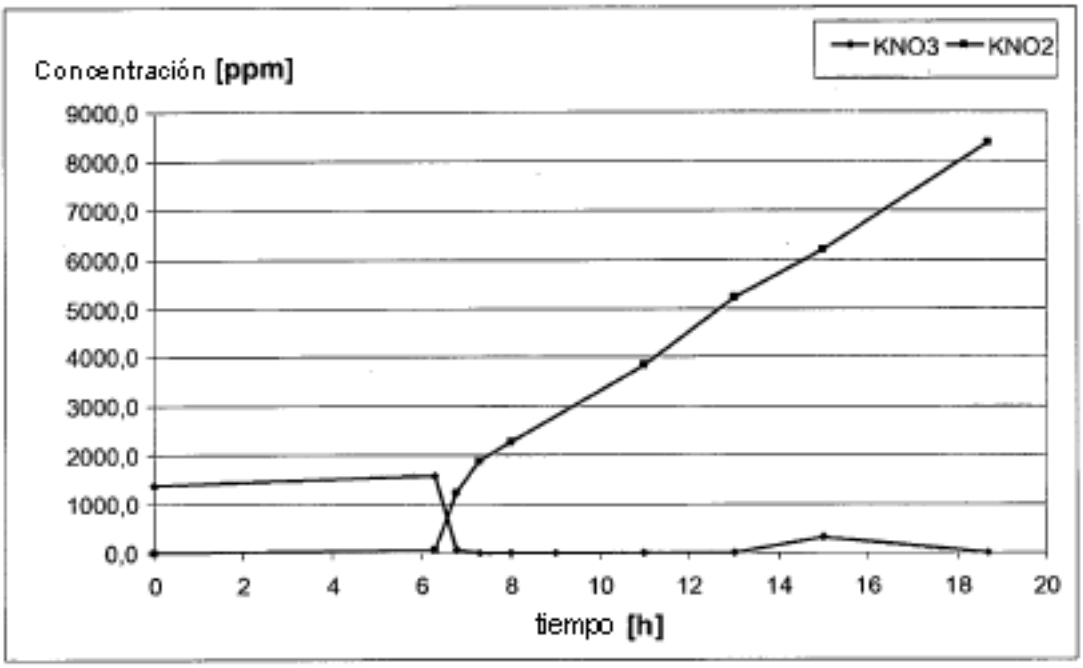


Figura 3

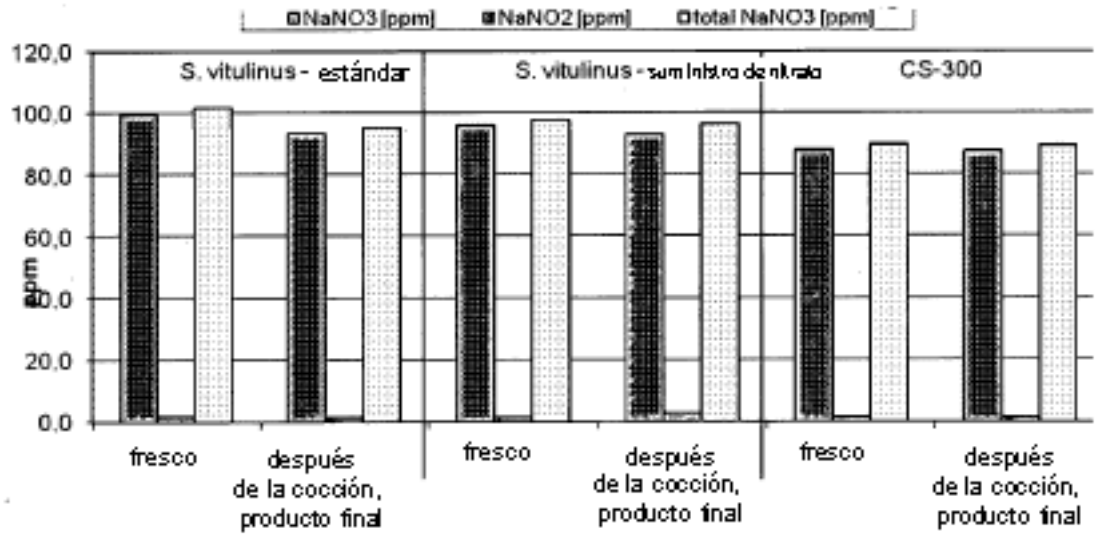


Figura 4

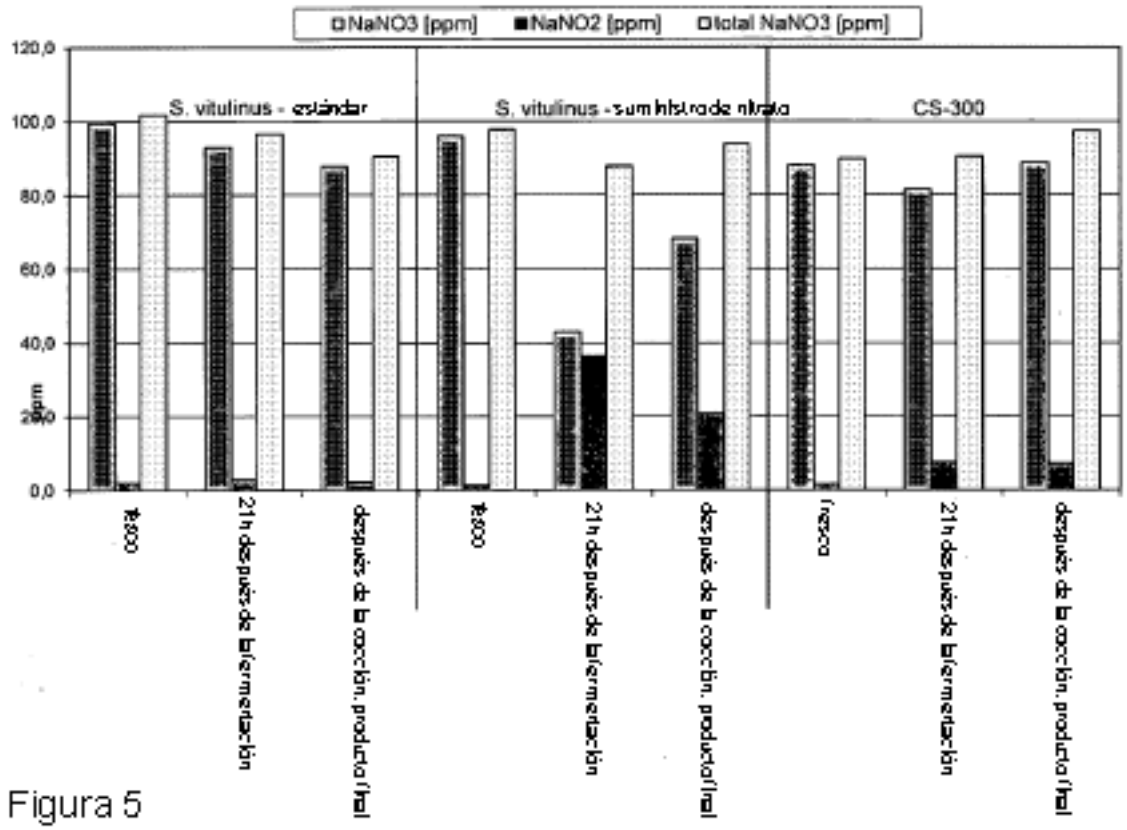
NaNO3 [ppm]
NaNO2 [ppm]
total NaNO3 [ppm]
120,0
100,0
80,0
60,0
40,0
0,0
ppm
S. vitulinus - estándar
S. vitulinus - suministrado nitrato
CS-300
t=0 h
21 h después de la fermentación
después de la cocción, producto final
t=0 h
21 h después de la fermentación
después de la cocción, producto final
fresco
21 h después de la fermentación
después de la cocción, producto final

Figura 5

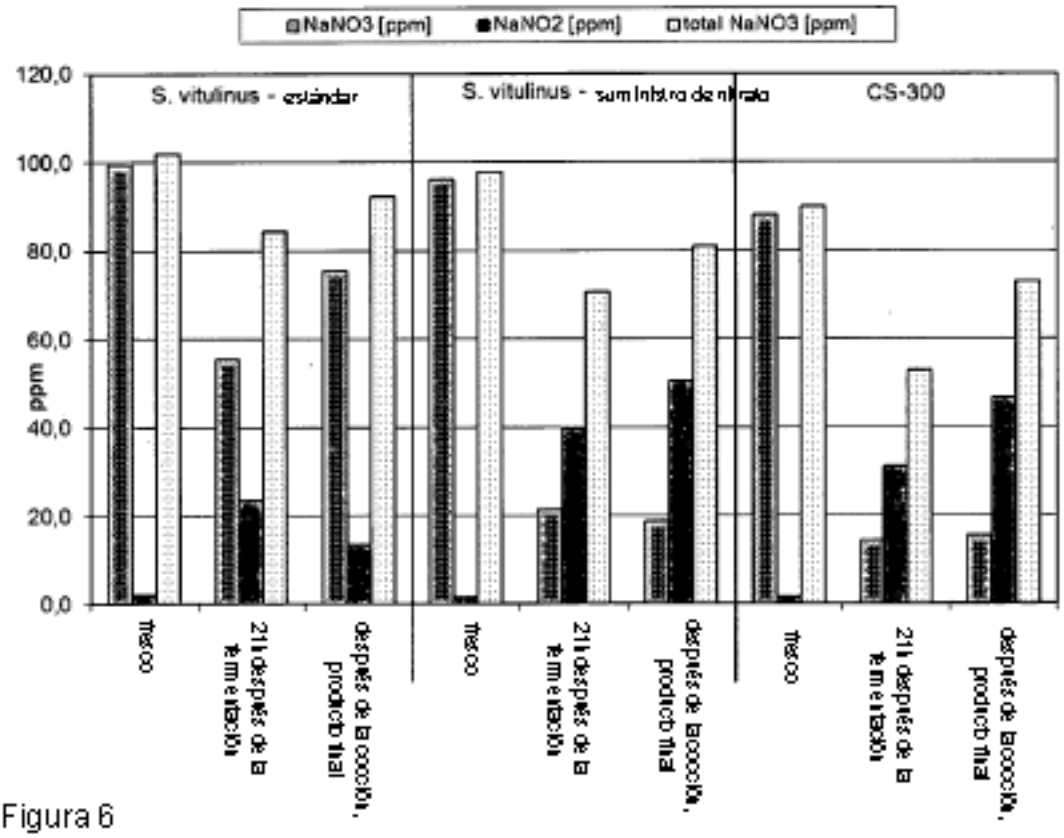
NaNO3 [ppm]
NaNO2 [ppm]
total NaNO3 [ppm]
S. vitulinus - estándar
S. vitulinus - suministro de nitrato
CS-300
ppm
120,0
100,0
80,0
60,0
40,0
20,0
0,0
inicio
21 después de la fermentación
después de la cocción, producto final

Figura 6

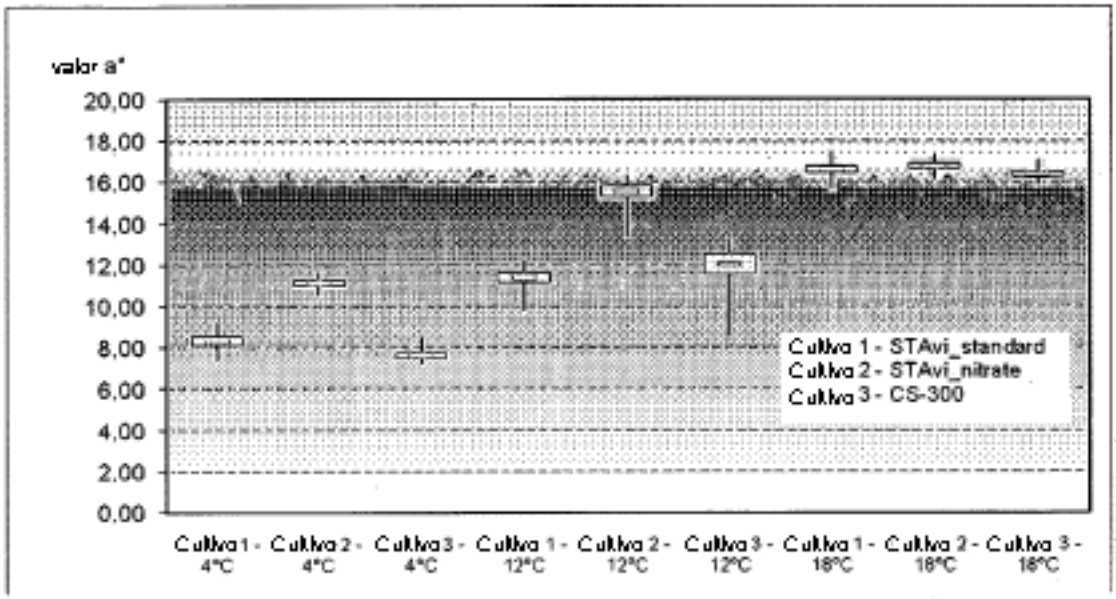


Figura 7

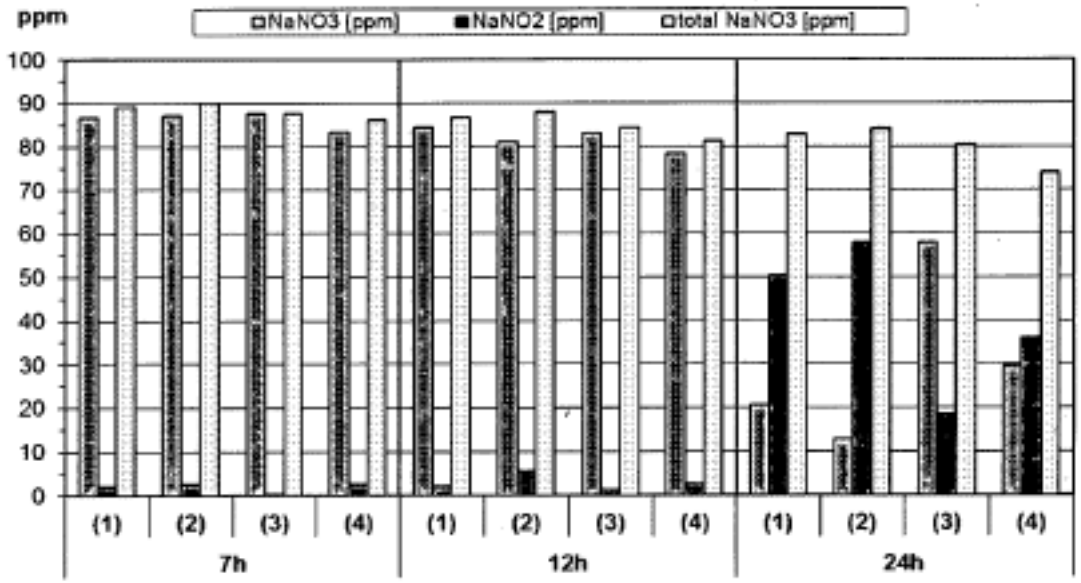


Figura 8

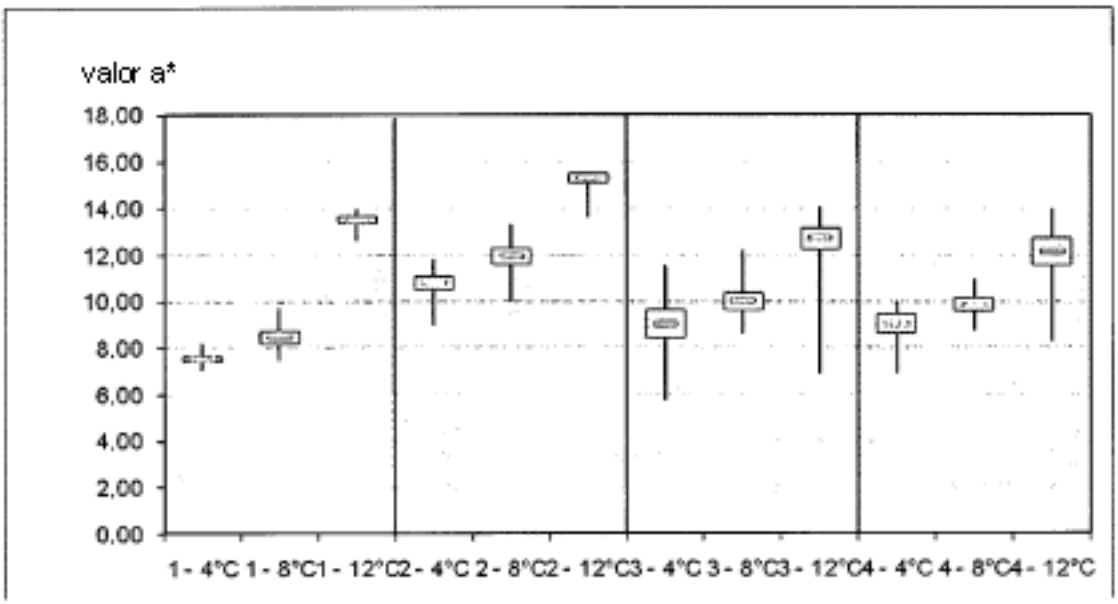


Figura 9

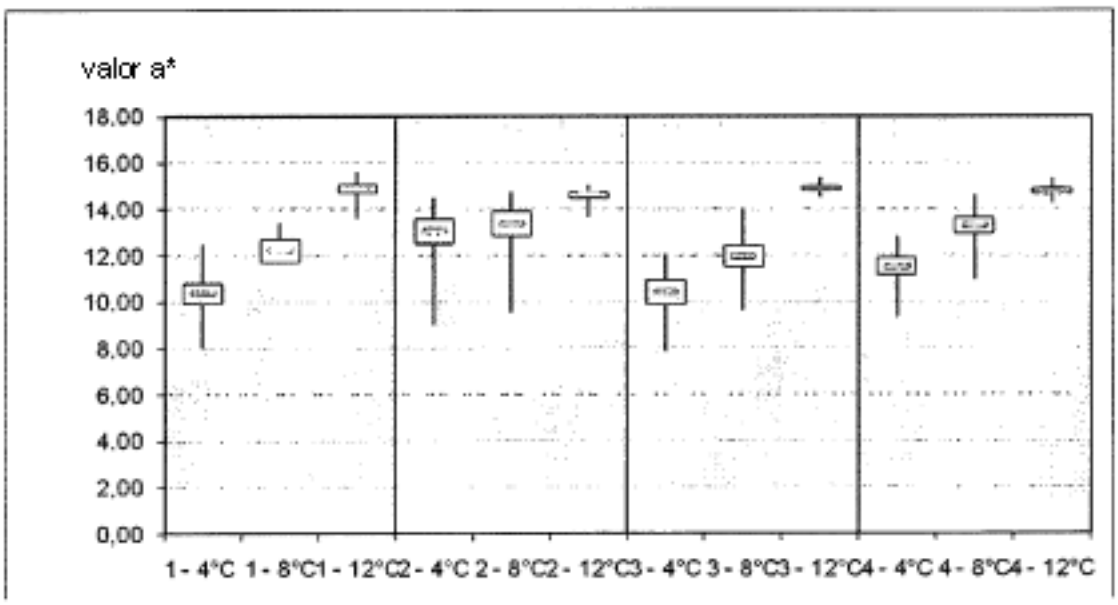


Figura 10

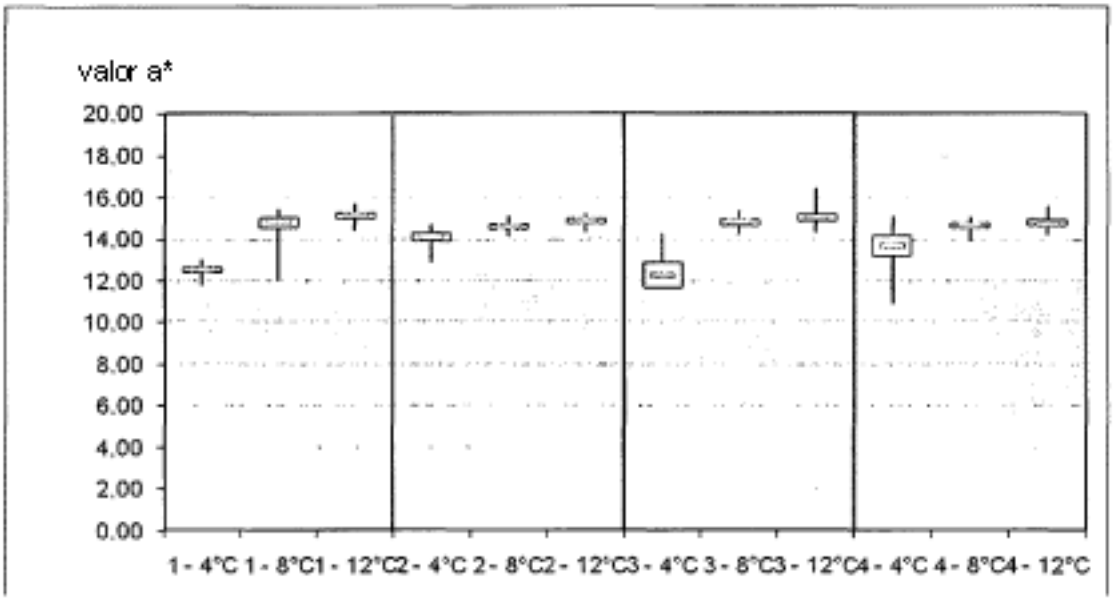


Figura 11

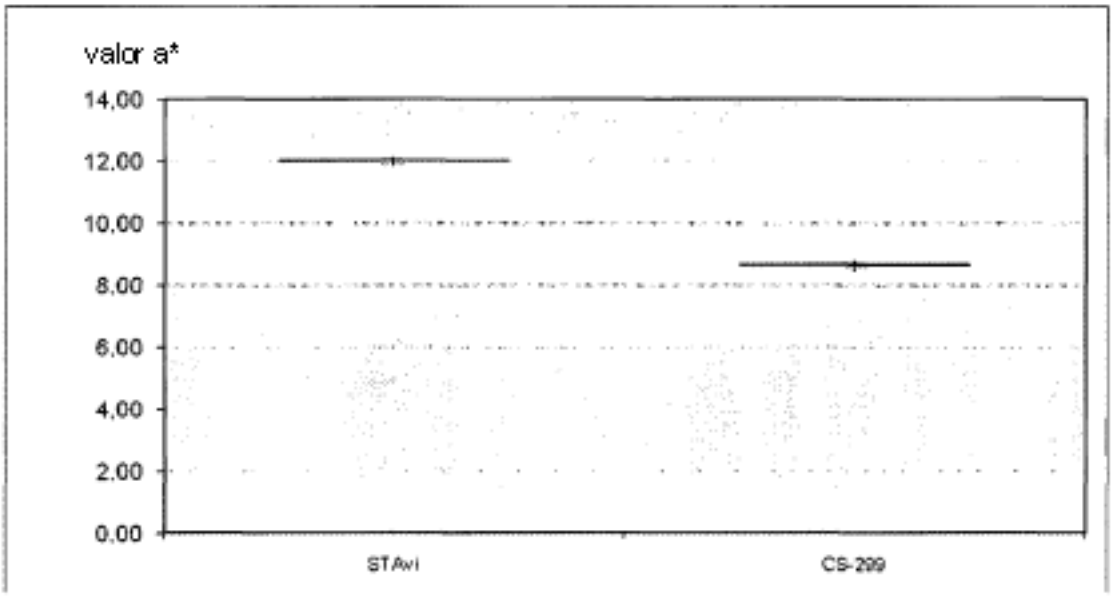


Figura 12

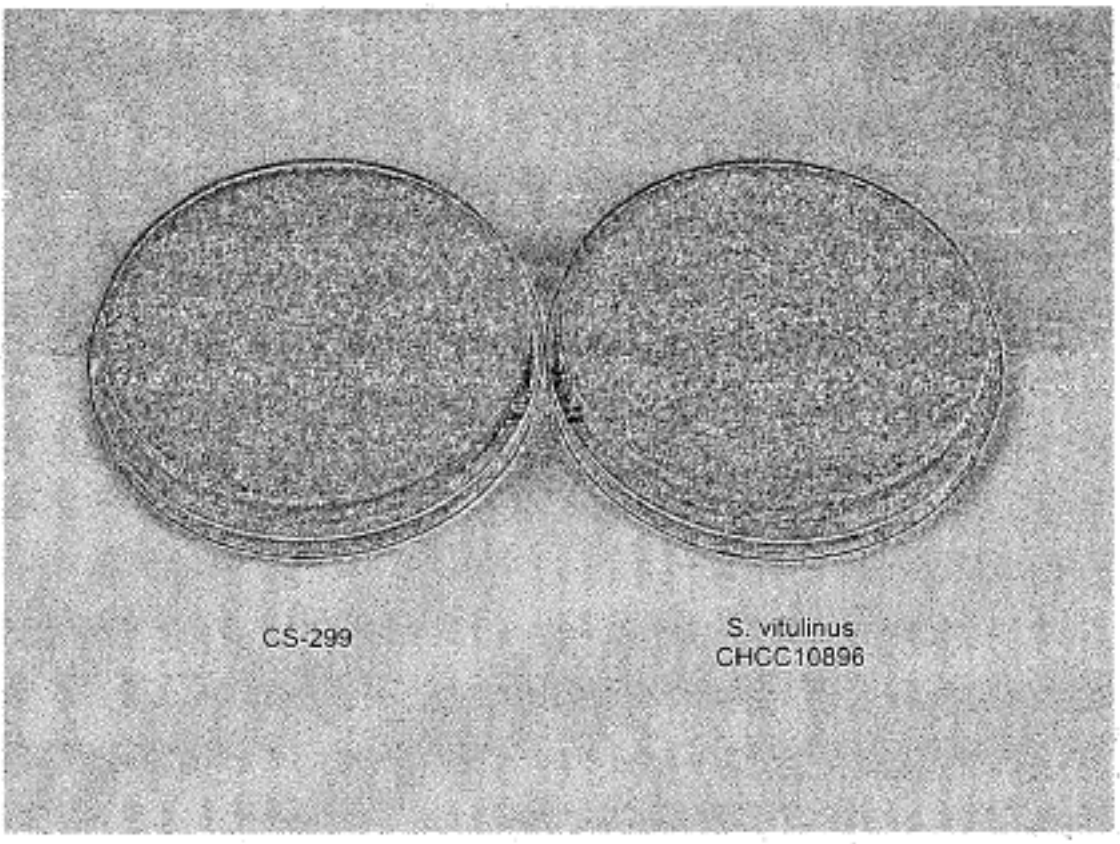


Figura 13

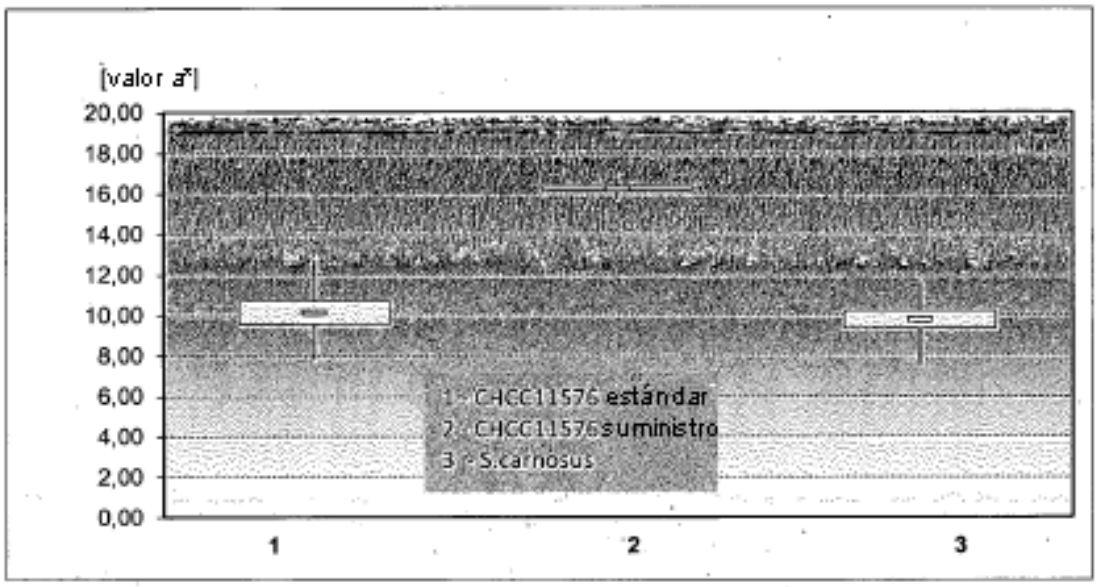


Figura 14

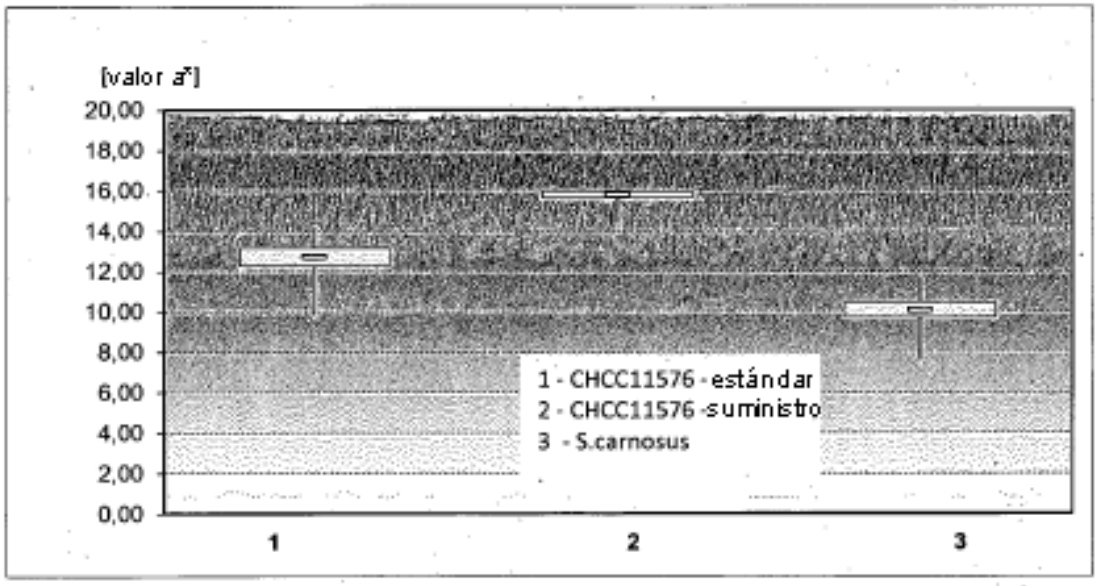


Figura 15

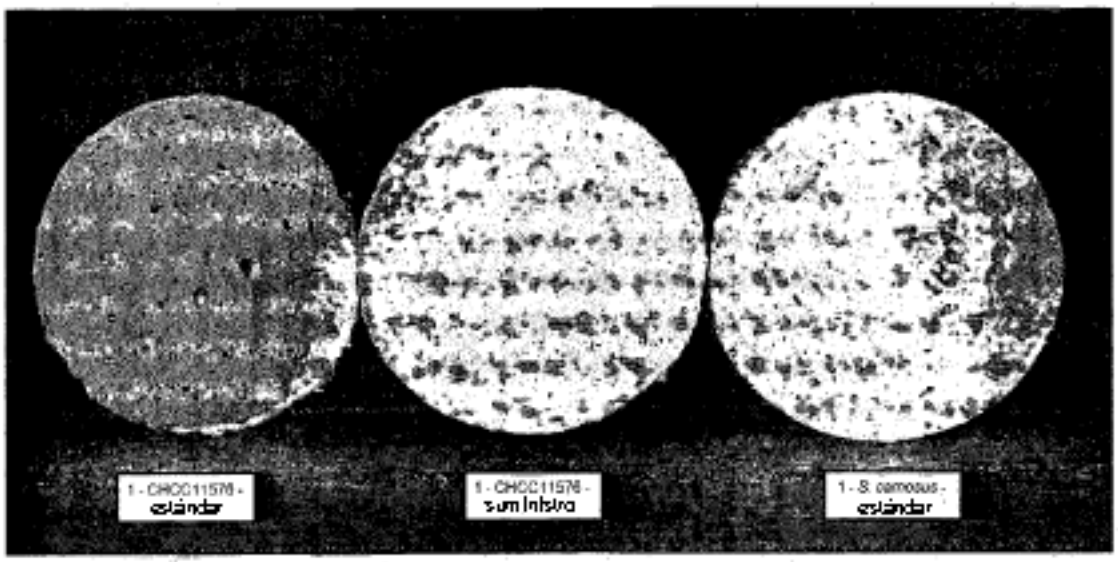


Figura 16

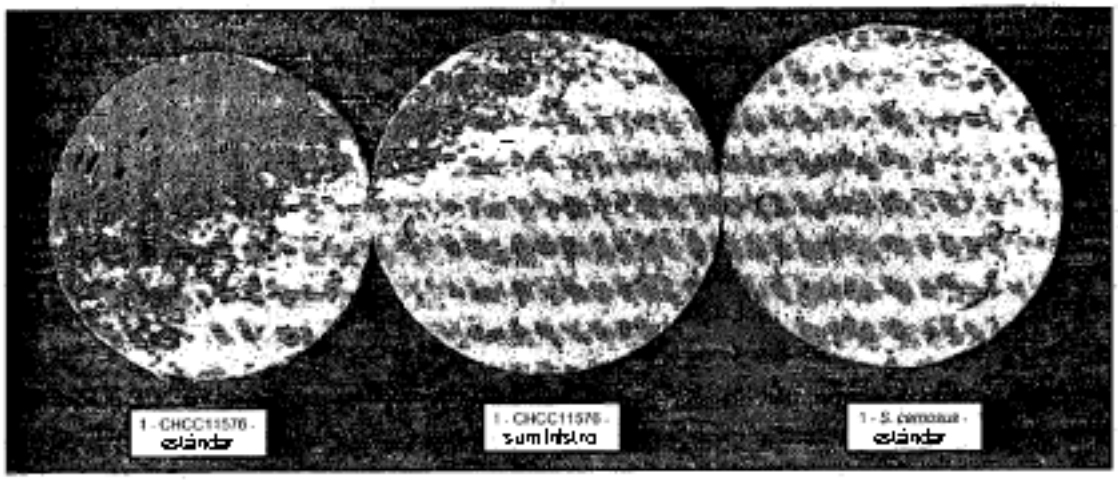


Figura 17

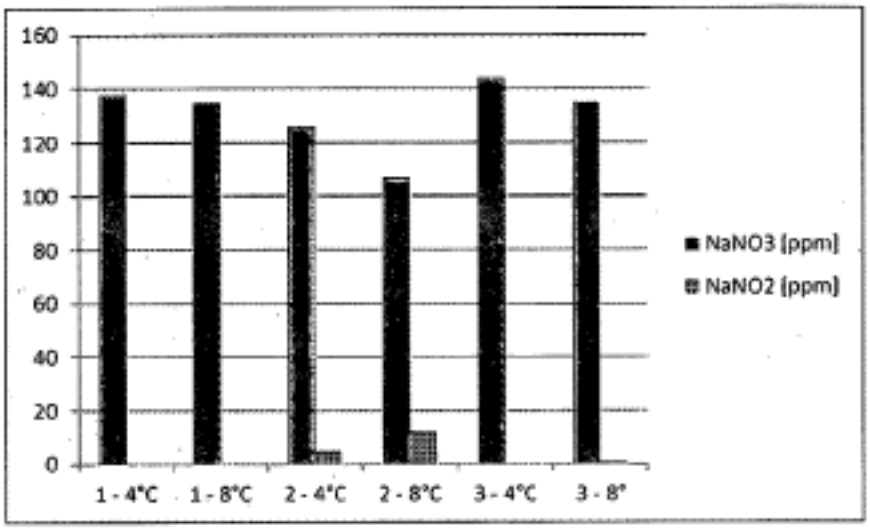


Figura 18

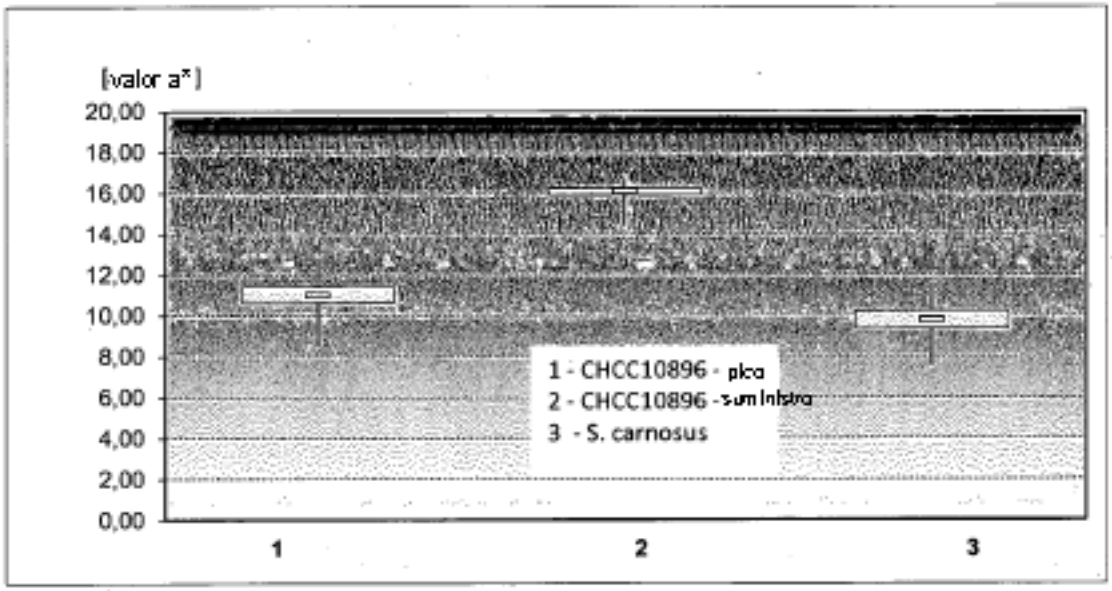


Figura 19

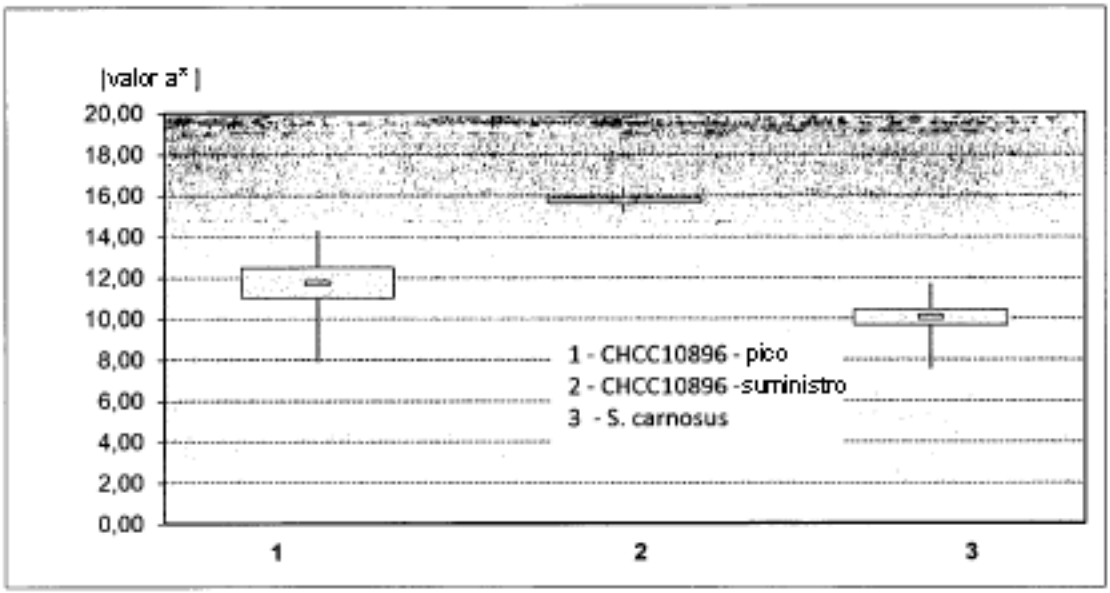


Figura 20

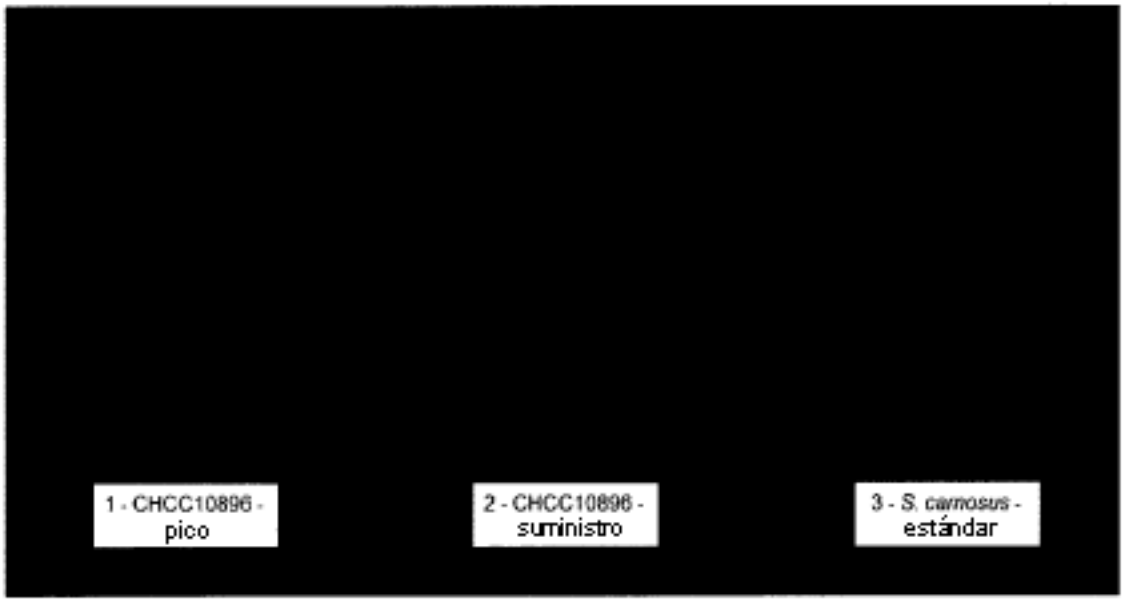


Figura 21

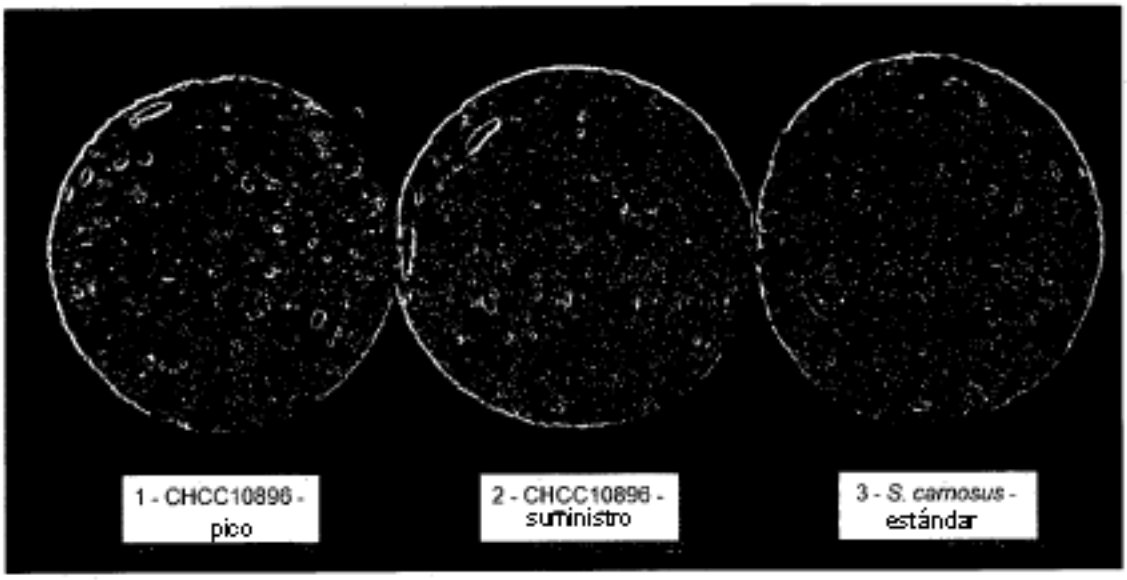


Figura 22

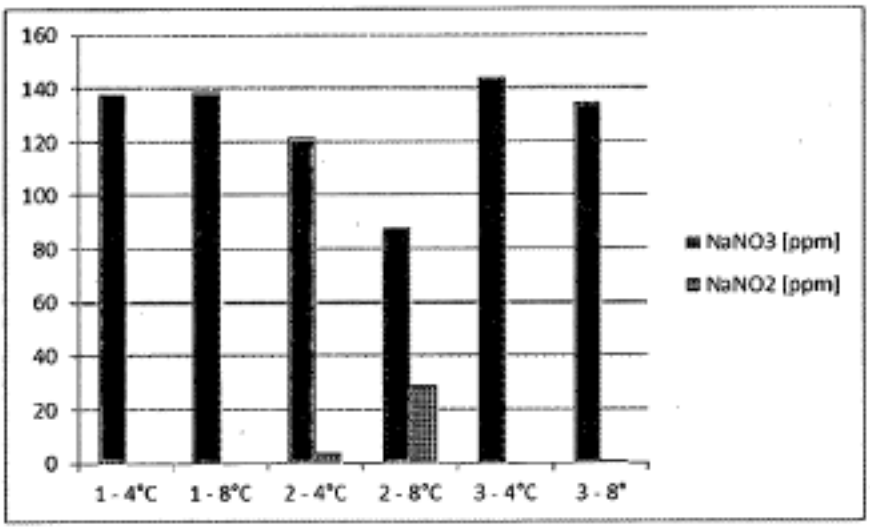


Figura 23