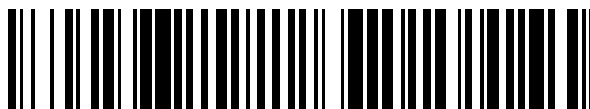


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 769**

51 Int. Cl.:

A23L 3/3463 (2006.01)

A23L 3/3472 (2006.01)

A23L 3/3571 (2006.01)

A23B 4/20 (2006.01)

A23B 4/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.02.2016 PCT/EP2016/052899**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.08.2016 WO16128508**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2016 E 16704594 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 3256009**

54 Título: **Reducción de la concentración de bacterias Gram-negativas en un producto alimentario fermentado mediante la combinación de extracto de vino tinto y un cultivo que comprende al menos una cepa bacteriana del ácido láctico productora de bacteriocina**

30 Prioridad:
11.02.2015 EP 15154620

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.03.2019

73 Titular/es:
CHR. HANSEN A/S (100.0%)
Boege Allé 10-12
2970 Hoersholm, DK

72 Inventor/es:
ERKES, MICHAEL y
SEIBERT, TIM MARTIN

74 Agente/Representante:
ARIAS SANZ, Juan

ES 2 702 769 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

Reducción de la concentración de bacterias Gram-negativas en un producto alimentario fermentado mediante la combinación de extracto de vino tinto y un cultivo que comprende al menos una cepa bacteriana del ácido láctico productora de bacteriocina

Campo de la invención

Se sabe que la contaminación bacteriana de los productos alimentarios es responsable de la transmisión de enfermedades transmitidas por los alimentos. Este problema es particularmente importante en la carne y los productos lácteos que no son recalentados por los consumidores antes de su ingestión y que se almacenan durante largos períodos de tiempo en refrigeradores a 2-10 °C. Las bacterias Gram-negativas patógenas tales como *Salmonella* y *E. coli* son de particular interés en los productos alimentarios.

En particular, la contaminación por *Salmonella* es un problema grave en los embutidos unttables, fermentados, como la típica salchicha alemana Teewurst. La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de los presentes inventores en un ensayo de exposición a *Salmonella* de que la combinación de extracto de vino tinto y un cultivo productor de bacteriocina es capaz de inhibir e incluso de eliminar la *Salmonella* ya presente a un nivel por debajo del límite de detección cualitativo, mientras que la aplicación del cultivo productor de bacteriocina solo, sin el extracto de vino tinto, no produjo el mismo efecto. Basándose en dicho sorprendente hallazgo, se contempla que la combinación de extracto de vino tinto con un cultivo que comprende al menos una cepa bacteriana del ácido láctico productora de bacteriocina también será útil contra otras bacterias Gram-negativas y en otros productos alimentarios fermentados, por ejemplo, productos lácteos fermentados.

Por consiguiente, la presente invención se refiere al uso de extracto de vino tinto producido a partir del vino tinto mediante desalcoholización, concentración y secado, y un cultivo que comprende al menos una cepa bacteriana del ácido láctico productora de bacteriocina de clase IIa para reducir la concentración de bacterias Gram-negativas en productos alimentarios mantenidos a una temperatura de 15 °C como máximo.

Antecedentes de la invención

El Teewurst es una salchicha tradicional alemana, normalmente hecha de carne de cerdo y carne de vaca, que se caracteriza por una textura suave y untuosa. El Teewurst se puede agrupar con los productos como el "frische Mettwurst", que muestran un pH relativamente alto en comparación con otros embutidos fermentados y que están menos curados, con un contenido de agua relativamente alto. La preparación y el procesamiento de este producto no incluyen el tratamiento térmico ni el uso de dificultades para la seguridad distintas del uso de la sal, sales de nitrato/nitrito y, según sea el caso, el ahumado.

Debido a la lenta acidificación, la alta actividad del agua y la falta de otras supuestas dificultades, el Teewurst es un producto con cierto riesgo de contaminación microbiológica. En especial, la *Salmonella* es un grave problema para los productos cárnicos unttables como el Teewurst, ya que la *Salmonella* es inhibida de manera más eficaz por una rápida caída del pH, algo no deseable para los embutidos unttables. Hasta la fecha, no se dispone en el mercado de una solución eficaz contra la *Salmonella* para las aplicaciones de alimentos fermentados crudos. El documento CN102188034 A (UNIV TIANJIN SCIENCE & TECH), 21-09-2011, WPI/Thomson AN 2011-N2883 (XP002703338) desvela un agente antirrancidez bioconservante compuesto útil para la conservación de productos alimentarios, que comprende nisina, natamicina, *B. subtilis* y resveratrol.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un método para reducir la concentración de bacterias Gram-negativas en un producto alimentario fermentado, comprendiendo el método la adición de un extracto de vino tinto producido a partir de vino tinto mediante desalcoholización, concentración y secado, y un cultivo que comprende al menos una cepa bacteriana del ácido láctico productora de bacteriocina de clase IIa a un producto alimentario, la maduración del producto alimentario y el almacenamiento del producto alimentario a una temperatura de como máximo 15 °C hasta una concentración inferior a 1×10^{-1} de bacterias Gram-negativas.

Una solución para la reducción de las bacterias Gram-negativas tales como *Salmonella* y *E. coli* es de gran interés en los productos alimentarios fermentados, en particular, en aplicaciones de carne cruda tales como los productos cárnicos unttables como el "Teewurst" y los productos cárnicos que se pueden cortar en lonchas tales como los embutidos, por ejemplo, el salami.

Divulgación detallada de la invención

Es bien conocido el uso de bacterias del ácido láctico para inducir la fermentación de productos alimentarios, normalmente productos cárnicos salados crudos, para proporcionar el cambio deseado en las características de la matriz alimentaria durante la fermentación (por ejemplo, una acidificación deseada y algunos otros parámetros

sensoriales y tecnológicos). Durante el proceso de fermentación, las bacterias del ácido láctico producen principalmente ácido láctico, por lo que el pH desciende al valor de pH deseado en función de la/s cepa/s y las condiciones de procesamiento (temperatura, tipo/contenido de azúcar, etc.) y, lo que es más importante, las propiedades sensoriales del producto se cambian claramente.

5 La expresión "producto alimentario", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier alimento que sea susceptible al crecimiento y a la proliferación de bacterias patógenas. Dichos productos alimentarios incluyen, pero no se limitan a, carne, productos lácteos, hortalizas, frutas y granos.

10 Como se usa en el presente documento, el término "carne" se refiere a cualquier producto cárnico o subproducto cárnico (incluyendo los procesados) de un animal que es consumido por seres humanos o animales, incluyendo, sin limitación, carne de bovino, ovino, porcino, ave de corral, pescado y mariscos crustáceos. Los ejemplos de productos cárnicos fermentados son los embutidos, por ejemplo, los embutidos untables y los embutidos curados, el jamón y pescado fermentado.

15 La expresión "producto lácteo" pretende incluir cualquier producto alimentario elaborado con leche o productos lácteos, incluyendo, pero sin limitación, leche, yogur, helado, queso, mantequilla y crema.

20 Como se usa en el presente documento, el término "fermentación" se refiere al proceso de cambios bioquímicos, por ejemplo, una acidificación en material animal y/o vegetal (es decir, una matriz alimentaria), que implica la actividad de células microbianas vivas en condiciones aeróbicas y/o anaeróbicas para obtenerse un producto alimentario de la calidad deseada.

25 El término "maduración" se refiere a la maduración, el secado, el desarrollo del sabor, la actividad enzimática como la lipólisis o la proteólisis que conduce al desarrollo del sabor complejo, en particular, para productos de maduración más larga como el salami.

Mientras que las bacterias del ácido láctico son las principales responsables de la formación de ácido, *Micrococcaceae* sp. y *Staphylococcaceae* sp., que se suelen añadir, son las responsables de mejorar la formación del sabor produciendo compuestos no volátiles y volátiles a través de diversas etapas de reacción bioquímica. Además, *Micrococcaceae* sp. y *Streptococcaceae* sp. son las responsables de la velocidad e intensidad de la formación del color, en particular, en los tipos de embutidos fermentados.

35 La/s cepa/s bacteriana/s del ácido láctico añadida/s a los alimentos para inhibir los patógenos y/o prolongar la vida útil sin cambiar las propiedades sensoriales del producto se denominan "cultivos protectores". Los cultivos protectores no pretenden cambiar las propiedades sensoriales del producto. Su uso o el de sus productos metabólicos (ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, enzimas y bacteriocinas) a menudo se conoce como "bioconservación" o "bioprotección".

40 Un aspecto importante en la evaluación del uso de una cepa como un cultivo bioprotector es la capacidad de la cepa para funcionar en el producto alimentario para el que está destinada. En este sentido, no solo es importante que la cepa sea capaz de inhibir cualquier bacteria patógena no deseada transmitida por los alimentos en el producto en las condiciones de almacenamiento pertinentes, sino también que no produzca ningún efecto sensorial no deseado (mal sabor, mal olor o cambios de color no deseados).

45 En la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones, la expresión "extracto de vino tinto" se refiere a un polvo producido a partir del vino tinto esencialmente mediante la desalcoholización, la concentración y el secado. Opcionalmente, otras etapas adicionales son la filtración y la pasteurización. Como sabe el experto en la materia, la desalcoholización se puede realizar mediante técnicas de separación o una combinación de técnicas como la evaporación parcial al vacío, técnicas de membrana o destilación. El secado se realiza preferentemente mediante secado por pulverización, que es una técnica de secado que usa aire caliente para transferir el calor y eliminar el agua evaporada mediante un aparato que permite la formación de partículas a partir de la dispersión. Otros métodos de secado alternativos, pero más costosos, son el secado al vacío y el secado por congelación. La pasteurización es una técnica de esterilización comúnmente usada para diferentes alimentos, en la que la fuente del alimento se calienta a temperaturas de entre 60 °C y 90 °C durante un período de tiempo muy corto. El corto intervalo de tiempo durante el que se calienta el material alimentario garantiza que solo se produzcan cambios térmicos menores en relación con el sabor, la textura, etc.

60 Al final del proceso, se obtiene un polvo de vino tinto suelto, que comprende todos los componentes que se encuentran comúnmente en el vino tinto, excepto el agua y el alcohol.

65 Un gran número de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas producen durante su crecimiento sustancias proteicas que poseen actividades antimicrobianas. Cuando son producidas por bacterias Gram-positivas, estas sustancias se denominan bacteriocinas. Debido a su gran importancia en la industria alimentaria, las bacterias del ácido láctico son el grupo de bacterias Gram-positivas productoras de bacteriocina estudiado más exhaustivamente. Sin embargo, la mayoría de las bacteriocinas producidas por las bacterias del ácido láctico no son activas contra las

bacterias Gram-negativas. Este es también el caso de las bacteriocinas producidas por las cepas usadas en el cultivo de los ejemplos de la presente solicitud. Se contempla que la razón por la que las bacteriocinas no son activas contra las bacterias Gram-negativas es la capa adicional que rodea la pared celular de las bacterias Gram-negativas, la membrana externa (ME). El papel más importante de esta capa de membrana externa adicional es servir como una barrera de permeación selectiva para prevenir la entrada de agentes bactericidas, respectivamente tóxicos, permitiendo a la vez la entrada de componentes nutricionales. Debido a su carácter polianiónico, la mayoría de los agentes bactericidas, como los antibióticos, las bacteriocinas o las proteínas líticas (por ejemplo, la lisozima), no pueden atravesar la ME.

Sin embargo, cada vez existen más pruebas de que numerosos agentes, la mayoría de ellos catiónicos, tienen una notable actividad dañina para la ME. Algunos de estos agentes son solo bactericidas débiles, pero son notablemente eficaces para permeabilizar la ME a otros agentes. Estos agentes permeabilizantes son herramientas útiles en diversos estudios celulares en los que la impermeabilidad de la ME es fundamental. Sin quedar ligados a esta teoría, se contempla que la actividad inhibidora de la combinación de extracto de vino tinto producido a partir del vino tinto mediante desalcoholización, concentración y secado, y un cultivo que comprende al menos una cepa bacteriana del ácido láctico productora de bacteriocina de clase IIa puede basarse en un mecanismo en el que los componentes del extracto de vino tinto sirven como agentes permeabilizantes de la ME.

Basándose en lo anterior, se contempla que la concentración de otras bacterias Gram-negativas, tales como *E. coli*, puede reducirse de una manera similar a la demostrada con respecto a la *Salmonella*.

La presente invención proporciona un método para reducir la concentración de bacterias Gram-negativas en un producto alimentario fermentado. En el presente contexto, la expresión "reducir la concentración" se refiere a una reducción en la cantidad de bacterias patógenas. Se puede proporcionar una reducción matando, inactivando o inhibiendo el crecimiento de las bacterias patógenas. En una realización de la presente invención, la pérdida logarítmica de bacterias patógenas durante el almacenamiento es de al menos 1 tras 3 semanas de almacenamiento a 15 °C, preferentemente de al menos 2, más preferentemente de al menos 3, incluso más preferentemente de al menos 4, lo más preferentemente de al menos 5. Como se desprende de los resultados de la presente solicitud de patente, la pérdida logarítmica puede aumentar con el tiempo, y la pérdida logarítmica es preferentemente de al menos 2, más preferentemente de al menos 3, incluso más preferentemente de al menos 4, lo más preferentemente de al menos 5 tras 4 o 5 semanas de almacenamiento a 15 °C. La pérdida logarítmica depende, entre otros factores, de la cantidad de bacterias patógenas presentes originalmente en el producto, y cuanto mayor sea la cantidad, mayor será la posible pérdida logarítmica. Como se desprende de la Figura 2, la reducción puede conducir a que la cantidad se encuentre por debajo del límite de detección cualitativo. En una realización preferida, las bacterias Gram-negativas ya presentes se eliminan o se reducen a una cantidad que está por debajo del límite de detección cualitativo.

Una preocupación importante en la industria del procesamiento de los alimentos es controlar el crecimiento de bacterias Gram-negativas transmitidas por los alimentos que son capaces de causar enfermedades o dolencias en animales o seres humanos, ya sea por sí mismas o mediante toxinas causantes de enfermedades o dolencias. Los ejemplos de bacterias Gram-negativas transmitidas por los alimentos, cuya concentración debe reducirse mediante el método de la invención, son *Aeromonas caviae*; *Aeromonas hydrophila*; *Aeromonas sobria*; *Campylobacter jejuni*; *Citrobacter* sp.; *Enterobacter* sp.; cepas enteroinvasivas de *Escherichia coli*; cepas enteropatógenas de *Escherichia coli*; cepas enterotoxigénicas de *Escherichia coli*; *Escherichia coli* O157: H7; *Klebsiella* sp.; *Plesiomonas shigelloides*; *Salmonella* sp.; *Shigella* sp.; *Vibrio cholerae*; *Yersinia enterocolitica*.

Preferentemente, las bacterias patógenas que se deben reducir de acuerdo con la presente invención son *E. coli* y *Salmonella* sp.

La presente invención se basa en un experimento que demuestra la reducción de la concentración de bacterias Gram-negativas en un producto alimentario fermentado mediante la combinación de un extracto de vino tinto producido a partir del extracto de vino tinto mediante desalcoholización, concentración y secado con un cultivo que comprende al menos una cepa bacteriana del ácido láctico productora de bacteriocina de clase IIa. El efecto de la combinación mencionada anteriormente se ha demostrado mediante la preparación de carne picada convencional de un "grobe Teewurst" aplicando *Staphylococcus xylosus* (DSM 28308), *Lactobacillus curvatus* (DSM 18775) y *Pediococcus acidilactici* (DSM 28307). La carne picada fue inoculada por tres cepas diferentes de *S. typhimurium* en las instalaciones apropiadas. A un lote de carne picada se le añadió extracto de vino tinto, mientras que no se añadió extracto de vino tinto al lote de control. La carne picada preparada se rellenó en tripas convencionales y se maduró durante tres días, seguidos de un período de almacenamiento a una temperatura máxima de 15 °C. La temperatura debe ser apropiada para garantizar la producción de bacteriocina de clase IIa por la cepa o cepas productoras de bacteriocina. En algunas realizaciones, la temperatura está en el intervalo de 2 a 10 °C. El producto alimentario puede envasarse al vacío o en atmósfera modificada, si se desea.

Este período de almacenamiento se suele denominar la "período de caducidad". Como se usa en el presente documento, la expresión "período de caducidad" significa el período de tiempo durante el que un producto alimentario se puede vender a los clientes minoristas. En el procesamiento tradicional de la carne, el período de

caducidad de la carne y los subproductos cárnicos es de aproximadamente 30 a 40 días tras el sacrificio de un animal. Se espera que la refrigeración de la carne durante este período de tiempo detenga y/o retrase en gran medida el crecimiento de bacterias patógenas y, en menor medida, de bacterias que se descomponen. Sin embargo, después de unos 30 a 40 días, la refrigeración ya no puede controlar de manera eficaz la proliferación de bacterias que se descomponen por debajo de los niveles aceptables.

Los embutidos se analizaron con respecto al recuento de células de *S. typhim urium*. Como puede observarse a partir de la Figura 2, ambas líneas pasan el umbral de detección cuantitativa, 1×10^1 ufc/g, en el día 10, y la línea negra pasa el umbral de detección cualitativa $< 4 \times 10^{-2}$ ufc/g o negativo en 25 g en el día 24, siendo el resultado de 3×10^{-2} ufc/g. A partir del día 24 hasta el final del período de caducidad, ya no se pudo detectar *S. typhim urium* en los embutidos producidos mediante la combinación de extracto de vino tinto producido a partir de vino tinto mediante la desalcoholización, concentración y secado con un cultivo que comprende al menos una cepa bacteriana productora de bacteriocina de clase IIa, mientras que *Salmonella* todavía estaba presente en los embutidos producidos con el cultivo con al menos solo una cepa productora de bacteriocina de clase IIa.

A partir de estos resultados, se puede concluir que se logró una reducción de la concentración e incluso la eliminación de las bacterias Gram-negativas *Salmonella* al combinar el cultivo que comprende al menos una cepa productora de bacteriocina de clase IIa con extracto de vino tinto producido a partir del vino tinto mediante desalcoholización, concentración y secado. Cuando el cultivo con al menos una cepa productora de bacteriocina de clase IIa no se combinó con el extracto de vino tinto producido a partir del vino tinto mediante desalcoholización, concentración y secado, no se logró un efecto similar. Como se muestra en la figura, la adición de extracto de vino tinto conduce a una caída adicional en el pH de aproximadamente 0,3-0,4 unidades. Sin embargo, esto no tiene un efecto adverso sobre el sabor, sino todo lo contrario. Aunque la caída del pH puede contribuir al efecto del cultivo productor de bacteriocina de clase IIa sobre las bacterias Gram-negativas, no es de ninguna manera lo suficientemente sustancial como para explicar el efecto del extracto de vino tinto.

El efecto de la combinación descrita del extracto de vino tinto producido a partir de vino tinto mediante desalcoholización, concentración y secado, y el cultivo que comprende al menos una cepa productora de bacteriocina de clase IIa se basa más bien en la alteración de la integridad de la membrana externa de bacterias Gram-negativas, tales como *Salmonella*, mediante los componentes del extracto de vino tinto. La alteración de la integridad de la membrana externa permite que los péptidos antimicrobianos (bacteriocinas) producidos por la/s cepa/s productora/s de bacteriocina/s del cultivo entren en su diana.

Por "cepa bacteriana del ácido láctico productora de bacteriocina" se entiende una cepa que produce un compuesto proteico que muestra un efecto bactericida hacia otras cepas de la misma especie o especies estrechamente relacionadas. La cepa productora de bacteriocina no es inhibida por la bacteriocina que produce. Las diferentes bacteriocinas producidas por una amplia variedad de cepas son bastante heterogéneas y se clasifican principalmente en función de su peso molecular. El espectro inhibitor del cultivo productor de bacteriocina, respectivamente, puede ser limitado, pero también puede ser relativamente amplio, lo que significa que la bacteriocina producida también puede inhibir diferentes especies bacterianas.

En la presente invención, la cepa productora de bacteriocina produce una bacteriocina de clase IIa tal como la pediocina, bavaracina, sakacina, curvacina, leucosina, plantaricina. Las dos cepas bioprotectoras de *Lactobacillus curvatus* y *Pediococcus acidilactici* ensayadas en el presente documento producen una bacteriocina de clase IIa.

Si una determinada cepa produce una cantidad suficiente de bacteriocina podría ensayarse mediante un ensayo de la actividad de la bacteriocina. Para una actividad de la bacteriocina IIa, la cepa podría ensayarse como se describe en el Ejemplo 2.

Se contempla que para ser una cepa útil para su uso en un cultivo que comprenda al menos una cepa bacteriana del ácido láctico productora de bacteriocina de clase IIa de acuerdo con la presente invención, el sobrenadante libre de células de la cepa productora de bacteriocina debería causar al menos una inhibición del crecimiento del 50 % con respecto a la densidad óptica DO600 de una cepa indicadora adecuada con un factor de dilución no inferior a 0,5 igual a 40 UA/ml.

En el cultivo usado en el ejemplo de la presente solicitud de patente, estaban presentes dos cepas productoras de bacteriocina de clase IIa, la cepa *Lactobacillus curvatus* depositada como DSM 18775 y la cepa *Pediococcus acidilactici* depositada como DSM 28307. Se contempla, sin embargo, esa una cepa productora de bacteriocina de clase IIa será suficiente.

Se contempla que cualquier cepa bacteriana que produzca bacteriocina de clase IIa será capaz de reducir la concentración de bacterias Gram-negativas tales como la *Salmonella* cuando se combina con extracto de vino tinto. Son ejemplos de bacterias productoras de bacteriocina de clase IIa *Carnobacterium maltaromaticum*, *Carnobacterium piscicola*, *Carnobacterium divergens*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc gelidium*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*. Los ejemplos de dichas cepas se pueden encontrar en Eijsink *et al.*, 1998, Ennahar *et al.*, 2000, y

Vermeiren *et al.*, 2004.

Las cepas actualmente preferidas son la cepa de *Lactobacillus curvatus* depositada como DSM 18775 y la cepa de *Pediococcus acidilactici* depositada como DSM 28307. Dentro del alcance de la presente invención hay un cultivo que comprende al menos dos cepas productoras de bacteriocina de clase IIa. Si se usa más de una cepa, las cepas preferentemente producen bacteriocina/s de clase IIa diferentes y/o actúan en diferentes dianas. En una realización preferente actual, el cultivo comprende tanto la cepa de *Lactobacillus curvatus* depositada como DSM 18775 y la cepa de *Pediococcus acidil* depositada como la DSM 28307. En una realización adicional, el cultivo puede comprender al menos tres cepas productoras de bacteriocina de clase IIa. Preferentemente, una de ellas será la cepa de *Lactobacillus curvatus* depositada como DSM 18775 y la cepa de *Pediococcus acidil* depositada como la DSM 28307, o ambas. En una realización adicional más, el cultivo comprende cuatro o más cepas productoras de bacteriocina de clase IIa. Preferentemente, una de ellas será la cepa de *Lactobacillus curvatus* depositada como DSM 18775 y la cepa de *Pediococcus acidil* depositada como la DSM 28307, o ambas.

Si se desea, el cultivo puede comprender, además de la al menos una cepa bacteriana del ácido láctico productora de bacteriocina de clase IIa, al menos una cepa de maduración que ayude a la al menos una cepa bacteriana del ácido láctico productora de bacteriocina de clase IIa en el desarrollo de parámetros de calidad tales como la acidificación, reducción de la unión al agua y actividad del agua, aspecto general, color, textura, olor, aroma, sabor, aroma, y otros parámetros sensoriales y tecnológicos. Son ejemplos de dichas cepas de maduración *Staphylococcus carnosus* y *Staphylococcus xylosus*, es decir, la *Staphylococcus xylosus* depositada como DSM 28308. Para los productos cárnicos con una maduración corta, se considera que solo la/s cepa/s bacteriana/s del ácido láctico productora/s de bacteriocina de clase IIa son suficientes para producir un producto cárnico fermentado apropiado, así como que también las cepas productoras de bacteriocina de clase IIa contribuyen al sabor. Sin embargo, si se desea, se podría añadir al menos una cepa de *Staphylococcus* o *Micrococcaceae* por razones de sabor y color, ya que estas cepas son capaces de reducir el nitrato a nitrito que reacciona además con el NO, que al final reacciona con la mioglobina de la carne a una nitrosilmioglobina roja estable.

El producto alimentario fermentado se fabrica proporcionando una matriz alimentaria, añadiendo un extracto de vino tinto producido a partir de vino tinto mediante desalcoholización, concentración y secado, y un cultivo que comprende al menos una cepa bacteriana del ácido láctico productora de bacteriocina de clase IIa, madurando el producto, opcionalmente, secando el producto alimentario y almacenando el producto alimentario a una temperatura de como máximo 15 °C hasta una concentración inferior a 1×10^{-1} de bacterias Gram-negativas.

Se contempla que la presente invención será útil para todos los productos alimentarios fermentados, pero particularmente útil para los productos cárnicos que tienen un a_w en el intervalo de 0,92 a 0,96, tal como en el intervalo de 0,92 a 0,93, de 0,93 a 0,94, de 0,94 a 0,95 o de 0,95 a 0,96. Preferentemente, el producto alimentario tiene un contenido de sal (p/p) en el intervalo del 2,4 % al 4,0 %, tal como del 2,4 % al 3,0 %, del 3,0 % al 3,5 %, o del 3,5 % al 4,0 %, y una maduración corta en el intervalo de 2 a 16 días, tal como de 2 a 9 días, o de 10 a 16 días. El pH está preferentemente en el intervalo de 4,5 a 6,0. Los ejemplos de dichos productos son los productos untables, tales como embutidos untables que, en general, tienen un pH en el intervalo de 5,3 a 6,0, tal como de 5,3 a 5,7 o de 5,8 a 6,0, y productos cárnicos secos tales como los embutidos que se pueden cortar en lonchas que, en general, tienen un pH en el intervalo de 4,5 a menos de 5,3, tal como de 4,5 a 4,8 o de 4,9 a menos de 5,3. Desde un punto de vista de la seguridad, se prefieren un pH bajo, un bajo a_w y un alto contenido de sal, pero esto no siempre es viable para obtener los efectos sensoriales del producto que se desean.

Los embutidos untables se preparan triturando el tejido adiposo y la grasa originaria que se encuentra encerrada en las partículas de carne. Esto conduce a una untuosidad que es más distintiva en el caso de los productos triturados finamente. El embutido se madura según cada tipo diferente de embutido, se cura, se seca ligeramente y no está diseñado para un almacenamiento prolongado. Son ejemplos de embutidos untables: Teewurst, Teewurst Rugenwalder Art, grosse Teewurst, Mettwurst, Streichmettwurst, Hofer Rindfleischwurst, Braunschweiger Mettwurst, Braunschweiger Pfeffersackchen, Zwiebelmettwurst, Zwiebelwurst, Frische Mettwurst, Vesperwurst, Frühstückswurst, Schmierwurst y fette Mettwurst.

Los embutidos curados se hacen de una manera esencialmente similar, pero se someten a un período de maduración más largo, de 10 a 16 días, de modo que se alcanza un pH inferior a 5,3, y se secan más a un a_w en un intervalo de 0,92 a 0,94. Son ejemplos de productos de fiambre que se pueden cortar en lonchas el Salami, Katenrauchwurst, Mettwurst, Cervelatwurst, Luftgetrocknete Mettwurst, Plockwurst, Raucherenden, Kabanossi, Landjäger, salchichón y otros.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de bacterias del ácido láctico productoras de bacteriocina de clase IIa que dan lugar a una inhibición del crecimiento bacteriano o a una reducción del número de bacterias patógenas del producto alimentario.

En la mayoría de los casos, el cultivo que comprende al menos una cepa bacteriana del ácido láctico productora de bacteriocina se añade durante el proceso de corte con especias antes de la adición de sal. En una realización preferida de la presente invención, el cultivo se añade a una concentración en el intervalo de 1×10^4 - 1×10^{10} ufc/g

de producto, tal como en el intervalo de 1×10^5 - 1×10^9 ufc/g de producto, por ejemplo, en el intervalo de 1×10^6 - 1×10^8 ufc/g de producto. En una realización actualmente preferida de la invención, el cultivo se añade en un intervalo de 1×10^6 a 1×10^8 ufc/g de producto tal como 1×10^7 ufc/g de producto. Si el cultivo comprende más de una cepa productora de bacteriocina de clase IIa, estos números se refieren a cada cepa.

A efectos prácticos, la invención se puede proporcionar como un kit para reducir la concentración de bacterias Gram-negativas en un producto alimentario que comprende un extracto de vino tinto producido a partir de vino tinto mediante desalcoholización, concentración y secado, y un cultivo que comprende al menos una cepa bacteriana productora de bacteriocina de clase IIa.

En realizaciones específicas, el cultivo que comprende al menos una cepa bacteriana del ácido láctico productora de bacteriocina de clase IIa se proporciona en un envase adecuado. Dichos envases pueden ser, por ejemplo, una bolsa, un tetra-pak, una lata y cualquier otro medio adecuado descrito en la técnica para contener especies microbianas. Además, el cultivo que comprende al menos una cepa bacteriana del ácido láctico productora de bacteriocina de clase IIa puede proporcionarse en cualquier forma adecuada, por ejemplo, en forma congelada o liofilizada. Cuando esté presente en un kit, el kit también comprenderá un extracto de vino tinto producido a partir de vino tinto mediante desalcoholización, concentración y secado, ya sea como un envase separado o en una mezcla con el cultivo.

El kit puede comprender además instrucciones sobre cómo usar el kit para reducir la concentración de bacterias Gram-negativas en un producto alimentario.

A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones, el término "comprende" y las variaciones del término, tales como "que comprende", no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Objetos adicionales, ventajas y características de la invención resultarán obvias para los expertos en la materia tras examinar la descripción o pueden aprenderse mediante la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no pretenden ser limitantes de la presente invención.

Leyendas para las Figuras

Fig. 1: Desarrollo del pH durante la maduración (3 días) y el almacenamiento al vacío a 15 °C (35 días) hasta el final del período de caducidad (38 días). La línea gris es "Grobe Teewurst" preparada mediante la aplicación de *Staphylococcus xylosus* (DSM 28308), *Lactobacillus curvatus* (DSM 18775) y *Pediococcus acidilactici* (DSM 28307), y la línea negra es "Grobe Teewurst" preparada mediante el mismo cultivo al que se ha añadido extracto de vino tinto al 0,5 %.

Fig. 2: Desarrollo del recuento de células de *Salmonella* durante la maduración (3 días) y el almacenamiento al vacío a 15 °C (35 días) hasta el final del período de caducidad (38 días). La línea gris es "Grobe Teewurst" preparada mediante la aplicación de *Staphylococcus xylosus* (DSM 28308), *Lactobacillus curvatus* (DSM 18775) y *Pediococcus acidilactici* (DSM 28307), y la línea negra es "Grobe Teewurst" preparada mediante el mismo cultivo al que se ha añadido extracto de vino tinto al 0,5 %.

Fig. 3: Desarrollo del pH en los lotes preparados como se describe en el Ejemplo 3.

Fig. 4: Desarrollo del recuento de células de *Salmonella* sp para los lotes preparados como se describe en el Ejemplo 3.

CEPAS DEPOSITADAS

La cepa de *Lactobacillus curvatus* CHCC9720 ha sido depositada en DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) con el número de acceso DSM 1 8775, con una fecha de depósito del 9 de noviembre de 2006 por Chr. Hansen A/S, Dinamarca. El depósito se ha realizado en virtud de las condiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los fines de Procedimiento de Patentes.

La cepa de *Pediococcus acidilactici* CHCC4073 ha sido depositada en DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) con el número de acceso DSM 28307, con una fecha de depósito del 30 de enero de 2014 por Chr. Hansen A/S, Dinamarca. El depósito se ha realizado en virtud de las condiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los fines de Procedimiento de Patentes.

La cepa de *Staphylococcus xylosus* CHCC5680 ha sido depositada en DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig) con el número de acceso DSM 28308, con una fecha de depósito del 30 de enero de 2014 por Chr. Hansen A/S, Dinamarca. El depósito se ha realizado en virtud de las condiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los fines de Procedimiento de Patentes.

Para los microorganismos depositados anteriormente identificados, se aplican las siguientes indicaciones adicionales:

En cuanto a las respectivas oficinas de patentes de los respectivos estados designados, los solicitantes solicitan que una muestra de los microorganismos depositados mencionados anteriormente solo se ponga a disposición de un experto designado por el solicitante hasta la fecha en que se otorgue la patente o la fecha en que la solicitud se haya rechazado o retirado o se considere retirada.

A continuación, se describen realizaciones de la presente invención, a modo de ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Ensayo de exposición a *Salmonella*

Se mostró el efecto de una combinación de un cultivo productor de bacteriocina y extracto de vino tinto hacia la *Salmonella* en un ensayo de exposición que se realizó de acuerdo con la siguiente descripción en las instalaciones apropiadas.

Materiales y métodos:

Se complementó una carne picada convencional para el "Grobe Teewurst" (véase la receta convencional mostrada como ejemplo) con *Staphylococcus xylosus* (DSM 28308), *Lactobacillus curvatus* (DSM 18775) y *Pediococcus acidilactici* (DSM 28307) con una concentración de recuento de células en un intervalo de 1×10^6 ufc/g a 1×10^7 ufc/g de carne para cada cepa.

Tabla 1

Ingrediente	Adición [%]	Total [kg]
Pieza de jamón o contratapa de cerdo	50	12.500
Tocino del cuello	50	12.500
Base de carne	100	25.000
Dextrosa	0,35	0,088
Pimienta blanca	0,20	0,050
Pimentón	0,10	0,025
Ascorbato sódico	0,04	0,010
Macis	0,04	0,010
Cardamomo	0,02	0,005
Extracto de pimentón	0,01	0,003
Sal de curado de nitrito (0,5 %)	2,40	0,600

Seguidamente, se inoculó la carne picada con $5,0 \times 10^1$ ufc/g de tres cepas diferentes de *typhimurium* de la subespecie *S. enterica* (DSM554), un aislado silvestre de embutido fermentado crudo y un aislado silvestre de carne de cerdo fresca (cepas TZL-038 y TZL-039 de la colección de cepas de TZL-MiTec GmbH) (Technologietransfer Zentrum Lippe). Además, se complementó la carne picada con 24 g/kg de sal de curado de nitrito (NPS).

Se dividió la carne picada preparada en 2 lotes. En uno de los lotes, se añadieron 5 g/kg de extracto de vino tinto (Extracto de vino tinto en polvo 697808) disponible en el mercado de Chr. Hansen A/S. Al lote de control, no se añadió extracto de vino tinto. Se usaron ambos lotes de carne picada para rellenar tripas convencionales con un diámetro de 50 mm y una longitud de 230 mm con un peso diana de llenado de aproximadamente 285 g.

Para la maduración, los embutidos untados preparados fueron transportados al laboratorio de tecnología de la carne de la "Hochschule Ostwestfalen-Lippe". El peso diana para el final de la maduración fue de 250 g. La maduración se realizó de acuerdo con la tabla 2.

Tabla 2: Programa de maduración

Duración	Temperatura	Humedad	Aireación	Pérdida de peso
24 h	25 °C	80 %	Media	4-5 %
12 h	22 °C	80 %	Media	
14 h	Ahumado	75 %	Media	9-10 %
12 h	18 °C	75 %	Alta	Diana: 12 %

A continuación, se analizaron los embutidos con respecto al recuento de células de *Salmonella* (día 0 = materia prima, día 3 = final de la maduración, día 10, día 17, día 24 = mitad del período de caducidad, día 31, día 38 = final del período de caducidad) mediante el procedimiento descrito en BVL L 00.00-20 Salmonellen (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit - Untersuchung von Lebensmitteln - Horizontales Verfahren zum Nachweis von *Salmonella* spp. in Lebensmitteln (Übernahme der gleichnamigen Norm DIN EN ISO 6579, Ausgabe Oktober 2007)).

Resultados:

pH:

El pH de los diferentes lotes se determinó durante todo el proceso en diferentes puntos de tiempo (días 0, 3, 5, 10, 17, 24, 31 y 38). La Figura 1 muestra el curso del pH de ambos lotes, el lote de control, en el que solo se añadió el cultivo productor de bacteriocina, y el lote de muestra, en el que se añadió además el extracto de vino tinto.

Recuento de células de *Salmonella*:

La Figura 2 muestra el desarrollo del recuento de células de *Salmonella* para el lote de control en el que solo se añadió el cultivo productor de bacteriocina y el lote de muestra en el que se añadió además el extracto de vino tinto. Como se desprende de la figura, hay una clara reducción del recuento de células de *Salmonella* cuando se añade extracto de vino tinto además del cultivo productor de bacteriocina en comparación con el lote de control sin la adición de extracto de vino tinto. A partir del día 24, todas las muestras (25 g) resultaron negativas para *Salmonella* al usar la combinación de cultivo productor de bacteriocina y extracto de vino tinto.

Conclusión:

La Figura 2 ilustra que desde el día 24 hasta el final del período de caducidad no se pudo detectar *S. typhimurium* en los embutidos producidos mediante la combinación de extracto de vino tinto con el cultivo que comprende *Staphylococcus xylosus* (DSM 28308), *Lactobacillus curvatus* (DSM 18775) y *Pediococcus acidilactici* (DSM 28307) mientras que *Salmonella* seguía estando presente en los embutidos producidos solo con el cultivo.

Ejemplo 2: Ensayo de actividad de bacteriocina

El objetivo de este ensayo es determinar cuantitativamente la actividad de las bacteriocinas del grupo IIa producidas por un cultivo que comprende al menos una cepa bacteriana del ácido láctico productora de bacteriocina usando un ensayo rápido de microtitulación que es una modificación y combinación de los ensayos descritos por Budde *et al.*, 2003.

En general, se reconoce que las bacteriocinas del grupo IIa inhiben a *Lactobacillus sakei* NCFB 2714, por consiguiente, esta cepa se suele usar como organismo indicador en los ensayos para la detección de las bacteriocinas de clase IIa. El presente ensayo de microtitulación proporciona una medida cuantitativa de la actividad de bacteriocina de las bacteriocinas de clase IIa expresadas como Unidades Arbitrarias (UA/ml) basándose en el número de diluciones con factor de dilución de dos de un sobrenadante de cultivo causante de una inhibición del crecimiento del 50 % del organismo indicador *Lactobacillus sakei* NCFB 2714.

El fermento de un cultivo que comprende al menos una cepa bacteriana del ácido láctico que produce supuestamente una bacteriocina se prepara inoculando el caldo MRS con la cepa o el cultivo productor de bacteriocina que se vaya a analizar hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,01-0,02 (DO₆₀₀ tras restar el valor en blanco, es decir, MRS no inoculado) que corresponde a una concentración celular de aproximadamente 1×10^7 ufc/ml. El cultivo se inocula durante una noche (aproximadamente 18 h) a 30 °C. Se centrifuga la suspensión celular a 4.500 g durante 15 min a 5 °C. Se retira el sobrenadante y se ajusta a pH 6,0 ± 0,1 mediante el uso de NaOH o HCl 0,2 N seguido de esterilización por filtración (0,2 µm).

El ensayo de microtitulación se prepara preparando primero la cepa de la solución indicadora mediante la dilución de 0,2 ml de la cepa de *Lactobacillus sakei* NCFB 2714 en 18 ml de caldo MRS. A cada pocillo, se añadieron 50 µl de caldo MRS, excepto al primer pocillo de cada fila y a los pocillos de las filas G y H, y se añadieron 50 µl de sobrenadante al primer y segundo pocillos de las dos primeras filas. Desde el pocillo de la segunda fila, se transfieren 50 µl al siguiente pocillo y se repite esta etapa. El contenido de cada pocillo debe mezclarse completamente con la pipeta antes de transferir el líquido al siguiente pocillo. Luego, se añaden 150 µl de la cepa indicadora a cada pocillo, excepto a la fila H (el blanco). Se añaden 10 µl de proteinasa K a cada pocillo de la fila G. Se lee la placa de microtitulación en el microlector midiendo la DO_{600} cada 30 min durante 20 horas a 30 °C.

10 Cálculo de la actividad de bacteriocina

Se resta la DO_{600} (0 h) de la DO_{600} (20 h). La actividad de las bacteriocinas de clase IIa se presenta en Unidades Arbitrarias (UA/ml) definidas como el recíproco de la dilución con factor de dilución de dos más alta que muestra una inhibición del crecimiento del 50 %, calculada como el 50 % de la turbidez obtenida para el organismo indicador en ausencia de solución de bacteriocina.

Ejemplo 3. Ensayo de exposición a *Salmonella* en un sistema de modelo de carne de Teewurst

Se ensayó el efecto de una combinación de dos cultivos productores de bacteriocina de clase IIa B-LC-20 (*Pediococcus acidilactici*) y F-LC (*Staphylococcus xylosus*, *Pediococcus acidilactici*, y *Lactobacillus curvatus*) y un extracto de vino tinto (EVT) hacia *Salmonella* sp en particular hacia *S. enterica* serovar *Typhimurium* DSM11320 en un ensayo de exposición realizado en un sistema de modelo de carne basado en una formulación tradicional de "Teewurst". DSM1 1 320 es una cepa de *S. enterica* no patógena que está clasificada como de clase de riesgo I de acuerdo con TRBA 466 ("Technische Regeln für biologische Arbeitsstoffe" - „Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen"). El ensayo de exposición se realizó de acuerdo con la siguiente descripción en las instalaciones apropiadas.

Materiales y métodos:

De acuerdo con el proceso de producción descrito (véase la tabla 4), se produjo una carne picada convencional para "feine Teewurst" (véase tabla 3) y se complementó con dextrosa (C*PharmDex 02010, Cargill Deutschland GmbH, Cerestarstrasse 2, D-47809 Krefeld) y EVT (Extracto de Vino Tinto en polvo 697808) y los cultivos T-D-66 (*Lactobacillus plantarum*, y *Staphylococcus carnosus*) o B-LC-20 (*Pediococcus acidilactici*) y F-LC (*Staphylococcus xylosus*, *Pediococcus acidilactici*, y *Lactobacillus curvatus*) de acuerdo con la descripción de los lotes (véase la tabla 5). Los cultivos aplicados se encuentran disponibles en el mercado en Chr. Hansen A/S, y se dosificaron de acuerdo con la recomendación convencional de Chr. Hansen. Los lotes 1-6 se inocularon posteriormente con *S. enterica* serovar *Typhimurium* DSM1 1 320 con un recuento de células diana de $1,0 \times 10^5$ ufc/g de carne.

Tabla 3: Receta convencional del "Teewurst"

Ingrediente		
Contratapa de cerdo (0 °C)	6,0 kg	60 %
Tocino dorsal de cerdo (0 °C)	4,0 kg	40 %
Tripa		
Sal de nitrito (0,5 %)	26 g/kg	2,6 %
Dextrosa	De acuerdo con la descripción del lote	
Pimienta blanca	2 g/kg	0,2 %
Pimentón dulce en polvo	2 g/kg	
Ascorbato sódico	0,5 g/kg	0,05 %
Macis	0,5 g/kg	0,05 %
Cardamomo	0,2 g/kg	0,02 %
Total	10 kg	100 %

Tabla 4: Proceso de preparación y producción de carne

Preparación de la materia prima	Troceado de PI y PVII en una placa caliente de 3 mm
Proceso de picado y de relleno	Almacenamiento en un refrigerador (0 °C) hasta la producción Adición de la carne y del tocino Adición de las especias, cultivo inicial - y cultivo protector Tras 10 series, adición de la sal de nitrito Picado a 4.000 U/min hasta 9 °C Embuchado en un vaso de precipitados de 200 g

Tabla 5: Descripción de los lotes

Número de lote	Descripción	EVT (5 g/kg)	Dextrosa (4 g/kg)	Dextrosa (1 g/kg)
1	T-D-66 + DSM1 1320		X	
2	T-D-66 + DSM1 1320	X	X	
3	T-D-66 + DSM1 1320	X		X
4	B-LC-20 + F-LC+ DSM11320		X	
5	B-LC-20 + F-LC+ DSM11320	X	X	
6	B-LC-20 + F-LC+ DSM11320	X		X

Se fermentaron y se maduraron los vasos de precipitados preparados de acuerdo con el perfil de temperatura que se muestra en la figura 3, imitando un proceso convencional para la producción de "Teewurst". El sistema de modelo de carne no fue sometido a un procedimiento de secado.

Resultados:

pH:

El desarrollo del pH se muestra en la figura 3. El pH de los diferentes lotes se determinó durante las primeras 100 horas del proceso mediante medición continua. A continuación, el pH solo se midió después de 124 h, 268 h, 436 h y 916 h en 3 vasos de precipitados por lote por 3 mediciones individuales para cada uno.

Recuento celular de *Salmonella* sp.:

La Figura 4 muestra el desarrollo del recuento de células de *Salmonella* sp. para los lotes pertinentes. Como se desprende de la figura, hay una clara reducción del recuento de células de *Salmonella* sp. al añadir extracto de vino tinto (EVT), además de los cultivos productores de las bacteriocinas de clase IIa B-LC-20 (*Pediococcus acidilactici*) y F-LC (*Staphylococcus xylosus*, *Pediococcus acidilactici*, y *Lactobacillus curvatus*) (lotes 5 y 6) en comparación con el lote de control 4, en el que solo se añadieron cultivos de bacteriocinas de clase IIa y no se añadió EVT. La reducción más significativa de *Salmonella* sp. puede verse para el lote 5. También es evidente a partir de la figura 4 que la combinación de un cultivo convencional no productor de bacteriocina (T-D-66) con el EVT no conduce a una reducción significativa del recuento de células de *Salmonella* sp., y que no se puede observar ninguna diferencia en comparación con el lote de control 1 en el que no se añadió EVT, sino solo el cultivo no productor de bacteriocina.

Conclusión:

Los resultados del experimento descrito anteriormente confirman los hallazgos previos de que la combinación de un cultivo productor de bacteriocina de clase IIa y un EVT es capaz de reducir la *Salmonella* sp. significativamente. Como se desprende de la figura 4, la aplicación de cualquier componente único del concepto ni el EVT solo respectivamente en combinación con un cultivo convencional no productor de bacteriocina (lote 2 y 3) ni los cultivos productores de bacteriocina de clase IIa sin la adición del EVT (lote 4) conduce a una reducción similar de DSM11320. También es evidente que la adición de EVT a un cultivo convencional productor de bacteriocina (lotes 2 y 3) no tiene ningún valor añadido con respecto a la reducción de *Salmonella* en comparación con el lote de control 1, en el que solo se añade el cultivo productor de bacteriocina.

Sin embargo, también es evidente que la caída más significativa del pH por la adición de EVT está influyendo en la reducción de *Salmonella* sp., pero se puede ver claramente al comparar el lote 6 y el lote 2/3 que muestran un pH final similar, que la caída del pH por sí sola no puede explicar la reducción más pronunciada de *Salmonella* en el lote

6. A partir de esta comparación, es evidente que solo la combinación de un cultivo productor de bacteriocina de clase IIa con el EVT conduce a una reducción significativa de *Salmonella* sp. en el sistema de modelo de "Teewurst".

Referencias

- 5 Budde *et al.*, "*Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments", International Journal of Food Microbiology, Vol. 83, número 2, 15 de junio de 2003, 171-184
- 10 BVL L 00.00-20 Salmonellen (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit - Untersuchung von Lebensmitteln - Horizontales Verfahren zum Nachweis von *Salmonella* spp. in Lebensmitteln (Übernahme der gleichnamigen Norm DIN EN ISO 6579, Ausgabe Oktober 2007))
- 15 Eijsink *et al.*, "*Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria*", Applied and Environmental Microbiology, 1998, 3275-3281
- Ennahar *et al.*, "*Class IIa bacteriocins: Biosynthesis, structure and activity*", FEMS Microbiology Reviews, 24, 2000, 85-106
- 20 Papagianni *et al.*, "*Determination of bacteriocin activity with bioassays carried out on solid and liquid substrates: assessing the factor "indicator microorganism"*", Microbial Cell Factories, 2006, 5:30
- Vermeiren *et al.*, "*Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products*", International Journal of Food Microbiology, 96, 2004, 149-164
- 25

REIVINDICACIONES

1. Un método para reducir la concentración de bacterias Gram-negativas en un producto alimentario, comprendiendo el método la adición de un extracto de vino tinto producido a partir de vino tinto mediante desalcoholización, concentración y secado, y un cultivo que comprende al menos una cepa bacteriana del ácido láctico productora de bacteriocina de clase IIa a un producto alimentario, la maduración del producto alimentario y el almacenamiento del producto alimentario a una temperatura de como máximo 15 °C hasta una concentración inferior a 1×10^{-1} de bacterias Gram-negativas.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se eliminan las bacterias Gram-negativas presentes.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que las bacterias Gram-negativas se seleccionan entre *Aeromonas caviae*; *Aeromonas hydrophila*; *Aeromonas sobria*; *Campylobacter jejuni*; *Citrobacter* sp.; *Enterobacter* sp.; cepas enteroinvasivas de *Escherichia coli*; cepas enteropatógenas de *Escherichia coli*; cepas enterotoxigénicas de *Escherichia coli*; *Escherichia coli* 0157:H7; *Klebsiella* sp.; *Plesiomonas shigelloides*; *Salmonella* sp.; *Shigella* sp.; *Vibrio cholerae*; *Yersinia enterocolitica*.
4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las bacterias Gram-negativas son *Salmonella* sp.
5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el cultivo comprende al menos una cepa productora de bacteriocina de clase IIa seleccionada entre *Carnobacterium maltaromaticum*, *Carnobacterium piscicola*, *Carnobacterium divergens*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc gelidium*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*.
6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el cultivo comprende al menos una de *Lactobacillus curvatus* DSM 18775 y *Pediococcus acidilactici* DSM 28307.
7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el producto alimentario fermentado es un producto lácteo, un producto cárnico, un producto vegetal, fruta o grano.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el producto alimentario fermentado es un embutido untable.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el producto alimentario fermentado es un embutido que se puede cortar en lonchas.
10. Un kit para reducir la concentración de bacterias Gram-negativas en un producto alimentario que comprende un extracto de vino tinto producido a partir de vino tinto mediante desalcoholización, concentración y secado, y un cultivo que comprende al menos una cepa bacteriana del ácido láctico productora de bacteriocina de clase IIa.
11. Uso de un extracto de vino tinto producido a partir de vino tinto mediante desalcoholización, concentración y secado, y un cultivo que comprende al menos una cepa bacteriana del ácido láctico productora de bacteriocina de clase IIa para reducir la concentración de bacterias Gram-negativas en un producto alimentario mantenido a una temperatura de 15 °C como máximo.

Figura 1

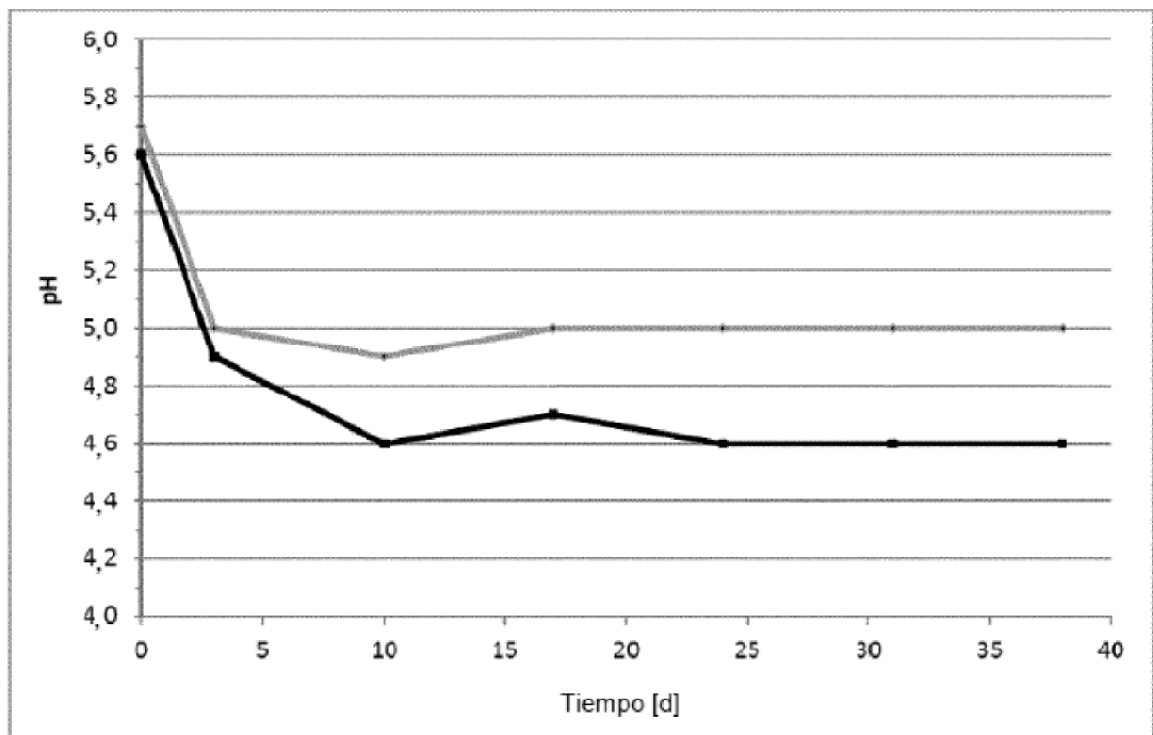
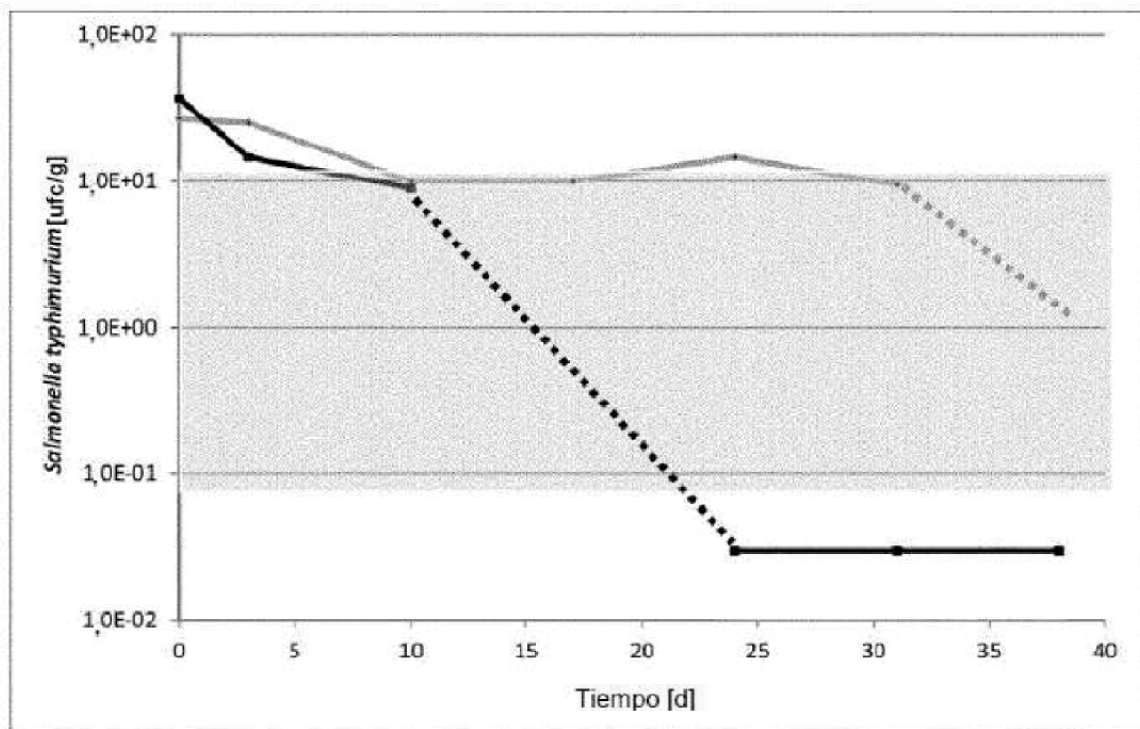


Figura 2



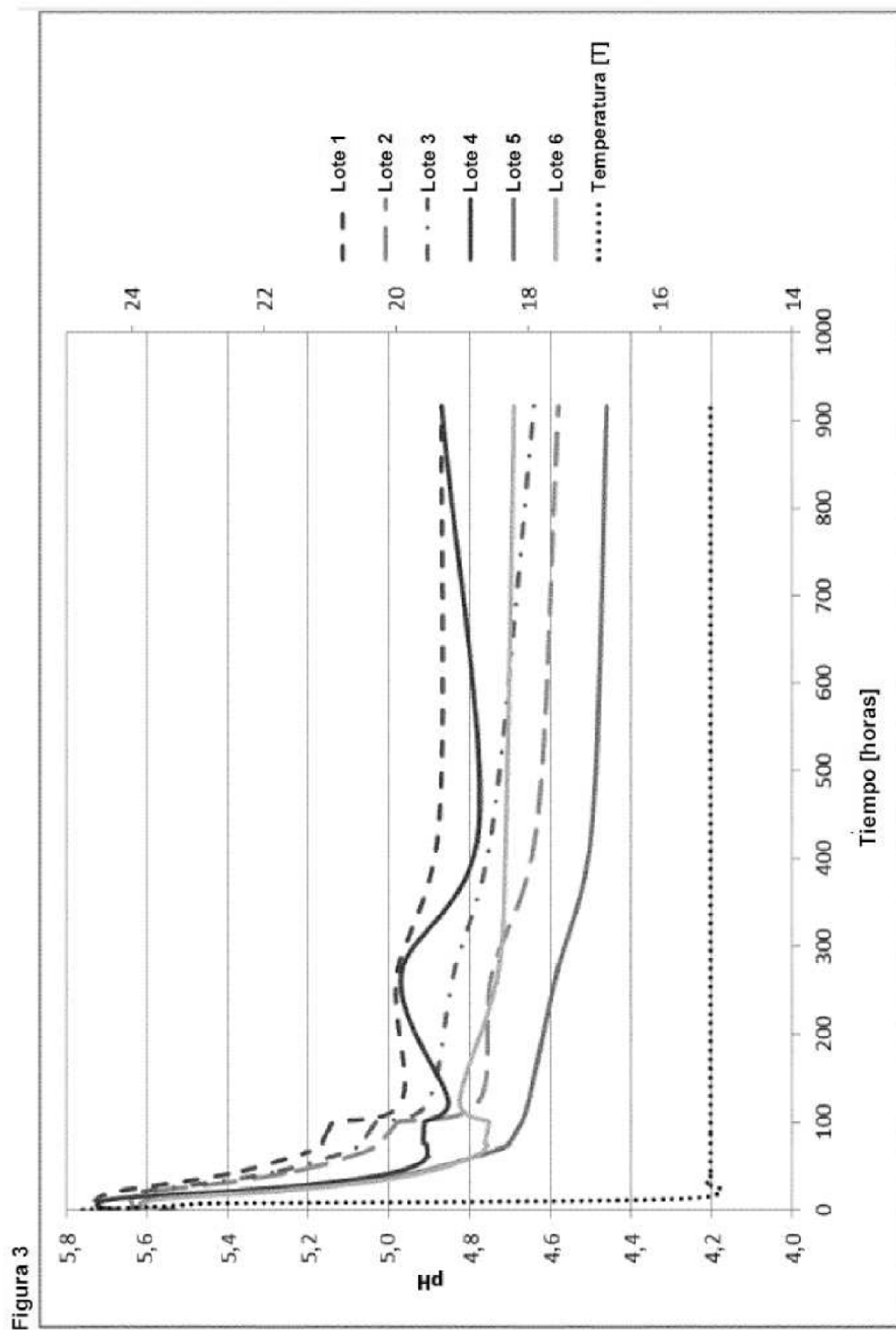


Figura 4

