



415555

P A T E N T E  
D E  
I N V E N C I O N

a favor de LABORATORIOS MIRET, S. A., entidad española, domiciliada en Les Fonts de Tarrasa (Barcelona), Polígono Industrial Can Parellada, por "PROCESO PARA LA PREPARACIÓN DE INOCULOS BACTERIANOS CONCENTRADOS DE USO EN LA FABRICACIÓN DE EMBUTIDOS CURADOS TIPO SALCHICHÓN Y SIMILARES".

Int. Cl.: C12K // A.3.3B

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención se refiere a un proceso de obtención de inóculos bacterianos concentrados de uso en la fabricación de embutidos curados tipo salchichón y similares, según se describirá más adelante.

5. La producción de salchichón y de embutidos curados en general disfruta de una tradición secular, a través de la cual se ha llegado a elaborar una extensa gama de productos con un buen definido bouquet de alta calidad.

10. El Código Alimentario reconoce entre los derivados cárnicos al salchichón como embutido duro, crudo y

413333



blanco, elaborado con carne de cerdo o de cerdo y vacuno, con la adición de cubitos de tocino o tocino finamente picado, metidos en tripas artificiales o naturales, cular o semicircular, porcina o vacuna, de 40 mm. de diámetro como mínimo. Para diámetros de tripas inferiores al señalado, el derivado cárnico se denomina fuet o longaniza imperial.

En general en todos los países, la elaboración de esta clase de embutidos ha evolucionado desde una etapa totalmente artesana hacia una producción plenamente industrial. Así puede hablarse hoy en día de una tecnología propia, específica de producción de embutidos curados.

Uno de los aspectos fundamentales de esta tecnología en su producción industrial es la del control del producto durante su elaboración, a fin de obtener un embutido de características organolépticas constantes y de la máxima calidad sanitaria y alimentaria. Este control debe permitir seguir la evolución del curado o fermentación del embutido.

No existe ninguna duda de que la etapa inicial del curado consiste en una fermentación homoláctica de la masa que produce su acidificación. Con ello tiene lugar una coagulación de las proteínas que permite una deshidratación rápida del embutido. Simultáneamente con la fermentación láctica se produce la presencia de gran cantidad de enzimas de origen bacteriano que también influyen en las modificaciones constantes que tienen lugar tanto en la carne como en el embutido curado.

Parece, pues, fuera de duda alguna que a una co-



rrecta fermentación están ligados tanto la calidad organoléptica final como la necesaria ausencia de microorganismos extraños, que no sólo pueden estropear el alimento, sino hacerlo peligroso para el consumo humano. Igualmente, parecen estar relacionados con una correcta fermentación, aspectos tan importantes de una producción industrial de embutidos como son el control de rendimientos absolutos, el tiempo de fabricación, un adecuado saneamiento, el control de los cambios de color y de los fenómenos oxidativos, etc.

Uno de los motivos de novedad de la presente invención, aunque no el único, es la investigación sistemática llevada a cabo con embutidos curados en diversas etapas de su proceso de fermentación. De acuerdo con las técnicas microbiológicas de los expertos en el oficio, esta investigación sistemática permitió aislar centenares de cepas bacterianas. El estudio de estas cepas y su uso como inóculos masivos para el curado, ya sea separadamente o bien empleando mezclas de varias de ellas, condujo a la selección de un cierto número de cepas bacterianas y a un cierto número de mezclas de dichas cepas. El aislamiento, caracterización, cultivo y mezcla de estas cepas constituyen por sí mismas y por su proceso de reproducción y el modo específico de conseguir su implantación en la masa a formar, un progreso tecnológico que se considera uno de los objetos de dicha patente.

En la tabla nº 1 se reproducen a modo de ejemplo las características de algunas cepas bacterianas ais-



ladas de embutidos del tipo salchichón.

- Los ensayos de selección permitieron concretar como más utilizables en los procesos de fermentación de embutidos curados tipo salchichón y similares los microorganismos designados como B-1, B-2 y B-3. De ellos, B-1, y B-3 son lactobacilos, mientras que B-2 es un pediococo. Estas cepas responden a las siguientes especificaciones:

Cepa B-1

10. Resultan adecuados para su cultivo los medios de Man, Rogosa, Sharpe y el medio selectivo de Lactobacilos de M-5413.

Crecen bien a 30°C, pero no a 45°C.

15. El examen microscópico a las 24 h. del crecimiento en Agar medio MRS muestra formas bacilares Gram positivas, esporógenas, ocasionalmente formando cadenas, inmóviles y con un característico pleomorfismo.

20. Sobre los medios antes señalados, el crecimiento de 24 y 48 h. es catalasa negativo y bencidina negativo.

Las características referidas son suficientes para identificar la cepa bacteriana referida como un miembro del grupo de las bacterias del ácido láctico y también para asignarla unívocamente al género Lactobacillus.

25. Fermentación de azúcares y análogos: Arabinosa (-), fermentación de la lactosa débil, melibiosa (-), rafinosa (-), ramnosa (-), sacarosa (+), xilosa (-), inulina (+), sorbitol (-), manitol (-), maltosa (-), fructosa (+), glucosa (+)

415355

22



galactosa (-), celobiosa (-), amigdalina (-).

En ningún caso se produce gas.

Acidifica la leche con una acidez valorable final referida a ac. láctico del 0,75%.

5. No crece en Man, Rogosa, Sharpe al añadir 0,4% de alquil-sulfato de sodio secundario.

De acuerdo con las características señaladas la cepa B-1 de Lactobacillus pertenece al grupo homofermentativo. De acuerdo con la subdivisión del género Lactobacillus de Orla-Jensen (1945), pertenecería al grupo Streptobacterium. De acuerdo con los datos de Rogosa y Sharpe (1959), sería afín a Lactobacillus casei, variedad alactosus y a Lactobacillus plantarum, difiriendo de este último por la sensibilidad al ~~Teepol~~ <sup>alquil sulfato de sodio secundario</sup> y por la no fermentación

10. de la melibiosa y de la rafinosa. Difiere de Lactobacillus casei, variedad alactosus por producir ácido láctico en la leche y fermentar lactosa. Sin embargo, la acidificación de la leche y la fermentación de la lactosa es relativamente débil, por lo que podría considerarse una variedad de Lactobacillus casei, no descrita hasta ahora.
- 15.
- 20.

Cepa B-2

Resultan adecuados para su cultivo los medios de Man, Rogosa, Sharpe y Agar tripticásico de soja.

Crecen bien a 15, 30 y 45°C.

25. El examen microscópico a las 24 horas en Agar medio MRS, muestra formas cocáceas de unas 2 micras de  $\emptyset$ , sueltas o agrupadas de forma más o menos irregular, ocasionalmente en tetradas Gram positivas.



Sobre los medios antes señalados el crecimiento de 24 a 48 horas es catalasa positivo. Los cultivos de 24 horas dan una débil reacción de la bencidina, que a diferencia de los microorganismos bencidina positivos, en lugar de incrementarse el color, se va desvaneciendo con el tiempo, en unos 20 minutos. Estas características son las propias de la pseudocatalasa del género *Pediococcus*, si bien en alguna cepa de *Pediococcus cerevisiae* la reacción de la bencidina y de la catalasa pueden ser totalmente negativas.

En la prueba de oxidación-fermentación de Hugh-Leifson se produce un débil crecimiento en ambos tubos, indiferente a la tensión del oxígeno, con acidificación también igual.

Las características señaladas permiten atribuir la cepa B-2a1 género *Pediococcus*, separándose del género *Micrococcus*, por sus exigencias nutritivas y su peculiar reacción de la catalasa y de la hencidina.

En conjunto el género *Pediococcus* incluye una serie de cepas dentro de las cuales las que dan la reacción de catalasa positiva se asignan a *Pediococcus cerivisiae*.

Fermentación de azúcares: Glucosa (+), arabinosa (+), lactosa (-), melibiosa (+), rafinosa (+), ramnosa (+), sacarosa (+), xilosa (+), esculina (+), sorbitol (+), manitol (+), maltosa (+), fructosa (+), galactosa (+), celobiosa (-), y amigdalina (-). No se produce gas en ningún caso.

No crece en la leche.

415355



- Las características señaladas lo separan de la descripción de *Pediococcus cerevisiae* de Sharpe, Fryer y Smith en la fermentación de sacarosa, rafinosa y sorbitol. Se considera característico de la cepa la falta de la fermentación de la lactosa.
- 5.

Cepa B-3

- Resultan adecuados para su cultivo los mismos medios que para la cepa B-1. Crece bien a 15 y a 30°C, pero no a 45°C.
10. El examen microscópico de crecimiento en Agar Man, Rogosa, Sharpe, muestra formas bacilares Gram positivas, esporógenas, sueltas o en cadenas de 2-3 individuos, inmóviles. Es más rechoncho que el B-1 y presenta pleomorfismo característico.
15. Sobre los medios antes señalados los crecimientos de 24-48 horas son catalasa negativo y bencidina negativo.
- Las características referidas son suficientes para incluir la cepa bacteriana referida en el grupo de las bacterias del ácido láctico y también para asignarle unívocamente el género *Lactobacillus*.
- 20.

No existe hasta el momento una taxonomía correcta de los lactobacilos de la carne y por tanto, no puede buscarse una caracterización específica.

- Sin embargo, se han determinado una serie de características adicionales con el fin de facilitar la identificación ulterior de esta cepa.
- 25.

Fermentación de azúcares : Arabinosa débil, lactosa (+), melibiosa (+), rafinosa (+), ramnosa (+), sacarosa (+),



xilosa (+), esculina (+), sorbitol (+), manitol (+), maltosa (+), fructosa (+), glucosa (+), galactosa (+), cellobiosa (-), y amigdalina (-). En ningún caso se produce gas.

5. Acidifica la leche lentamente, produciendo una acidez valorable final referida al ácido láctico final de 1,2%.

No crece en el medio Man, Rogosa, Sharpe al añadir 0,4% de alquil-sulfato de sodio secundario.

10. De acuerdo con las características señaladas la cepa B-3 pertenece al grupo homofermentativo y al subgénero *Streptobacterium*. De acuerdo con Rogosa y Sharpe (1954), presenta cierta analogía con *L. plantarum* del cual podría constituir una variedad, difiriendo de la misma por su falta de crecimiento en alquil-sulfato de sodio secundario.

15. Resulta evidente de la clasificación taxonómica que acabamos de describir que se ha llegado al aislamiento de unas cepas microbianas perfectamente determinadas. Las condiciones operativas y medios originales empleados

20. tanto para su multiplicación como para conseguir una alta viabilidad y concentración máxima de microorganismos que permita la aplicación industrial que se persigue, así como las condiciones para lograr su implantación en el proceso de fermentación de los embutidos curados tipo salchichón y similares, son objetivos evidentes de esta patente.

25. Como se indica en el párrafo anterior los problemas que se plantearon a los investigadores, en aquel momento, fueron los de obtener un inóculo bacteriano con-



teniendo los tres microorganismos a concentración suficientemente elevada así como con viabilidad suficiente para poder ser objeto de uso industrial.

- El procedimiento objeto de la invención consiste en esencia en realizar un cultivo de las cepas bacterianas B-1, B-2 y B-3, llevando a cabo su crecimiento en medio de cultivo de composición adecuada tal que dé concentraciones de células viables comprendidas entre valores de  $10^8$  y  $10^{10}$  cels/ml.
5.                   Tras ello, el proceso comprende la concentración de los cultivos obtenidos por centrifugación a 3.500-4.500 r.p.m., en un periodo comprendido entre 20 y 40 minutos y la mezcla de las suspensiones concentradas de microorganismos B-1, B-2 y B-3 en proporciones respectivas tales que la relación de concentraciones en células viables entre las cepas B-1 y B-3 sea de 1:1 y la relación en células viables entre la suma de las de B-1 y B-3 (Lactobacillus) y B-2 (Pediococcus) no sea inferior a 1:1 ni superior en ningún caso a 100:1.
10.                   En los ejemplos que se exponen a continuación se indican las características más importantes del proceso descubierto que permite la obtención de un cultivo con un elevado contenido de gérmenes viables por unidad de volumen, así como el uso de diferentes agentes protectores y bioactivadores, que forman parte del proceso de invención, y de los medios físicos que dan origen a inóculos bacterianos concentrados aptos para su uso en derivados cárnicos curados,
- 15.
- 20.
- 25.



415355

principalmente del tipo salchichón y similares.

Se entiende que los datos citados en estos ejemplos no limitan el alcance del proceso de la invención, sino que tan sólo son expuestos a título de ejemplo para una mejor comprensión de la finalidad de esta patente.

5.

E J E M P L O 1.

El proceso que se describirá a continuación es aplicable a las cepas B-1 y B-3. A partir de un crecimiento en Agar MRS en un tubo inclinado, mediante un asa de platino estéril, se hace una siembra en un tubo con 10 ml del medio de cultivo siguiente:

10.

15.

20.

- Peptona de caseína ..... 10 g
  - Extracto de carne..... 8 "
  - Extracto de levadura..... 4 "
  - Dextrosa..... 20 "
  - Monoleato de sorbitan (20) polioxietileno..... 1 ml
  - Fosfato di-potásico..... 2 g
  - Acetato sódico..... 5 "
  - Citrato tri-amónico..... 2 "
  - Sulfato magnésico hepta-hidratado.....0,2 "
  - Sulfato de manganeso tetra-hidratado,.....0,05"
  - Agua..... 1.000 ml
- pH : aprox. 6,2.

25.

Este cultivo se incuba durante 24 horas a la temperatura comprendida entre 25 y 35°C. A continuación el inóculo obtenido se añade a un erlenmeyer conteniendo 1000 ml del anterior medio de cultivo, el cual se incuba durante un mínimo de 48 horas a una temperatura entre 25 y

415355



- 35°C. Se obtiene después de este período de incubación un cultivo con una concentración bacteriana viable de  $10^9$  céls/ml. Este cultivo puede multiplicarse en un tiempo semejante al indicado y a continuación añadirse en proporción del 1% a un fermentador, ampliando así sucesivamente la escala de producción hasta el tamaño que se desee. Los cultivos de las cepas B-1 y B-3 con dicha concentración viable son sometidos a un proceso de centrifugación a 4.000 r.p.m., durante unos 20 minutos con lo que se obtienen concentrados con  $10^{10}$  céls. viables/ml. Estos concentrados de cepas B-1 y B-3 se mezclan con el concentrado de la cepa B-2 (ver ejemplo 2) y se someten, previa standarización, a los procesos que se describirán en los ejemplos 3, 4 y 5.
- 5.
- 10.

- Como particularidades objeto de invención en la obtención de cultivos concentrados en las cepas B-1 y B-3 deben destacarse las siguientes:
- 15.

- a) La incorporación de pequeñas cantidades de ácido fólico del orden de 50 ppm. al medio de cultivo permite obtener diferencias de crecimiento muy apreciables, tanto que sin su adición es prácticamente imposible llegar a concentraciones de  $10^9$  células viables/ml. en los procesos de fermentación.
- 20.
- b) Asimismo es objeto de hallazgo el establecer unas condiciones de fermentación microaerófilas que permiten la obtención del máximo rendimiento en el proceso de fermentación. Dichas condiciones se consiguen en el ejemplo de referencia mediante el uso de un fermentador que presente una relación de superficie libre de cultivo en
- 25.



446735

contacto con el aire a volumen de cultivo que oscile entre 0,035 y 0,040.

5. Se ha comprobado que la citada relación es crítica para obtener el máximo crecimiento y que con condiciones que dan valores S/V mayores a los indicados el rendimiento es inferior aún cuando se utilice agitación mecánica auxiliar para favorecer la incorporación de aire.

10. La tabla que se expone a continuación muestra las concentraciones en células viables/ml. obtenidas a las 48 horas de incubación en sistemas en los que se ha variado la relación S/V. Como se observará los valores más elevados se obtienen para relaciones S/V comprendidas entre 0,035 y 0,040.

	<u>S/V</u>	<u>Céls/ml</u>	
15.	0,035	2 x 10 <sup>9</sup>	céls/ml
	0,040	1,7 x 10 <sup>9</sup>	"
	0,072	7 x 10 <sup>8</sup>	"
	0,302	5,1 x 10 <sup>8</sup>	"

E J E M P L O 2.

20. A partir de un crecimiento de la cepa B-2 en Agar MRS en un tubo inclinado y por medio de un asa de platino estéril se efectúa una siembra en 10 ml del medio de cultivo del ejemplo 1, que se incuban durante 24 horas a temperaturas comprendidas entre 25 y 35°C. Este inóculo se añade a 200 ml. de agar tripticásico de soja de  
25. composición:

- Tripticase-peptona..... 17 g
- Phitona-peptona..... 3 "



22 M

415355

- ClNa..... 5 g.
- Fosfato dipotásico,..... 2,5 "
- Glucosa..... 2,5 "

5. contenidos en un frasco de Roux. El crecimiento superficial obtenido después de 48 horas de fermentación a las temperaturas comprendidas entre 25 y 35°C se recoge con Ringer 1/4 obteniéndose un total de 200 ml de cultivo con teniendo 10<sup>9</sup> céls. viables/ml.

E J E M P L O 3.

10. Los concentrados obtenidos en los ejemplos 1 y 2, una vez comprobados en cámara de Thomas el número de células viables/ml se mezclan en una proporción volumétrica respectiva para las cepas B-1, B-3 y B-2 de 5:5:1 y a continuación se diluyen en la proporción 10:1 con solución de glutamato monosódico 0,1M. El líquido obtenido se distribuye en cubetas de plástico conteniendo 10 ml de solución. Las bandejas que contienen los cubitos se protegen de la contaminación exterior por medio de una lámina de aluminio termosoldable procediéndose a la congelación a una temperatura de -15 a -20°C durante 3 a 4 horas. Las bandejas con el producto congelado se almacenan en frigorífico procurando que la temperatura de almacenaje no sea nunca superior a -5°C.

25. Determinaciones de células viables efectuadas después de descongelar el cubito obtenido muestran concentraciones de las cepas B-1 y B-3 no inferiores a 5 x 10<sup>8</sup> céls/cubito y de la cepa B-2 no inferior a 10<sup>8</sup> céls/cubito.

La elección del glutamato monosódico como com-



puesto crioprotector ha sido realizado después de un estudio comparativo de viabilidad del descongelado en presencia de varios protectores. Pueden emplearse, sin embargo otros agentes protectores tales como glicerol y alginato de propilenglicol.

5.

E J E M P L O 4.

Los cultivos concentrados de las cepas B-1 y B-3 obtenidos en el ejemplo 1 y el cultivo concentrado de la cepa B-2 obtenido en el ejemplo 2 se mezclan con soluciones de glutamato monosódico y leche descremada estéril y liofilizada. La solución resultante se somete a un proceso de liofilización obteniéndose un producto en polvo que contiene como mínimo  $2,5 \times 10^8$  céls. viables/g. Alternativamente también puede llevarse a cabo la obtención de un producto con propiedades semejantes, mezclando las proporciones adecuadas de leche descremada estéril liofilizada y un liofilizado formando por una suspensión bacteriana en glutamato monosódico con una enumeración viable total superior a  $10^9$  céls/g.

10.

15.

20.

E J E M P L O 5.

Los cultivos concentrados de las cepas B-1 y B-3 obtenidos en el ejemplo 1 y el cultivo concentrado de la cepa B-2 obtenido en el ejemplo 2 se emulsionan con un monoglicérido acetilado de punto de fusión comprendido entre  $35$  y  $45^{\circ}\text{C}$ . El medio emulsionado se mezcla entonces con un soporte a base de ingredientes alimentarios conteniendo glucosa, almidones modificados o celulosa. El conjunto se seca a temperatura inferior a  $43^{\circ}$  y se enfría para

25.



encapsular las células bacterianas. Se obtiene así un cultivo concentrado seco de concentrado viable semejante al indicado en el ejemplo 4.

- Se ha cuidado especialmente el control bacteriológico de los productos obtenidos en los ejemplos 3, 4 y 5 para asegurar la ausencia de microorganismos contaminantes y bacteriófagos. Para ello, los productos son sometidos a los siguientes controles, según conocidas técnicas microbiológicas de los expertos en el oficio:
5. A) Ausencia de organismos del tipo Coli aerogenes :  
0,1 ml de un cubito descongelado no deben dar crecimiento sobre medio McConkey incubado 24-48 horas a 37°C.
10. B) Ausencia de Staphilococcus :  
0,1 ml de cubito descongelado incubados en medio Baird-Parker durante 48 horas a 17°C no deben dar presencia de colonias negras y brillantes atribuibles a Staphilococcus aureus.
15. C) Ausencia de anaerobios esporulados :  
Después de 5 días de incubación en medio Robertson de carne cocida, 1 ml de cubito descongelado sometido previamente a 80°C durante 30 minutos no debe dar crecimiento.
20. D) Ausencia de hongos y levaduras :  
En 0,1 ml de cubito descongelado en medio de agar de Saboureaud Maltosa incubados a 22°C durante 5 días no debe dar crecimiento de hongos y levaduras.
25. E) Ausencia de fagos :  
Se realiza de acuerdo con la técnica siguiente:

415355<sup>22</sup>



- Para ello se utiliza una unidad Millipore-XX11-047-00. Se preparan placas de 12 c.c. de agar MRS; sobre éstas, una vez controladas, se añaden 2-3 ml de agar MRS a una temperatura de 45°C, a los que previamente se habían añadido 0,1-02 ml de un cultivo en fase logarítmica de Lactobacillus sp. B-1 cultivado en caldo MRS. Una vez solidificadas se añade con una pipeta estéril 2-3 gotas de microfiltrado obtenido a partir de 3 cubitos descongelados y filtrados a través de un filtro de poro de 0,22 micras. Se incuban las placas a 30°C durante 8-10 horas. La presencia de fagos se denota observando en placa la presencia de calvas.
- 5.
- 10.

Lo mismo se hará para las cepas B-2 de Pediococcus sp. y B-3 de Lactobacillus sp.

- 15.
- Para los productos de los ejemplos 4 y 5 se aplican los mismos métodos de control, efectuando los mismos sobre soluciones de los productos liofilizado o microencapsulado.

- 20.
- Los productos obtenidos en los ejemplos 3, 4 y 5 han sido ensayados en la elaboración de embutidos curados tipo salchichón y similares. Se han llevado a cabo los ensayos de forma comparativa con piezas obtenidas sin la introducción del inóculo bacteriano concentrado y manteniendo constantes todas las demás condiciones de fabricación y almacenaje. Para un producto congelado del tipo citado en el ejemplo 4 se han utilizado dosis de 1 g de congelado/kg de carne.
- 25.

En el gráfico adjunto se presentan los resultados



medios expresados en porcentajes relativos de los recuentos totales de las poblaciones en las distintas fases del curado, distribuidos por tipos:

Lácticos

5. Gram negativos (comprende coliformes, pseudomonas y otros tipos).

Cocos (comprende cocos patogénicos, entre ellos Staphylococcus presuntivamente coagulasa positivos).

Hongos y levaduras.

10. Con el uso de los inóculos bacterianos concentrados se han podido comprobar los siguientes efectos:
- a) Que la fermentación láctica se desarrolle exclusivamente por los fermentos añadidos y no por una colonización espontánea e incontrolada.
15. b) Que la fermentación homoláctica de la carne a embutir se inicie inmediatamente y de forma vigorosa.
- c) Que la acidificación de la masa se consiga en el menor tiempo posible y siempre en el mismo tiempo, para unas condiciones homogéneas de trabajo.
20. d) Que después de alcanzado el punto de mayor acidez, asciendo el pH hasta 5,2-5,4 y no más, haciendo el producto convenientemente comestible e imputrescible.
- e) Que no se desarrolle flora extraña (Estafilococos, enterobacterias y anaeróbicos gasogénicos), que disminuya la calidad del producto o incluso llegue a estropearlo.
25. f) Que la deshidratación del embutido pueda controlarse estrictamente con la humedad y temperatura del medio ambiente.



- g) Que las características de aroma y sabor sean uniformes y reproducibles.
- b) Que se mejore la textura y el color de forma constante para cada composición de la masa y condiciones de trabajo.
- 5. i) Que sea totalmente innecesario el uso de antifermentos o conservadores.

- . -

N O T A

Se reivindica como objeto de la presente patente de invención:

- 1. Proceso para la preparación de inóculos bacterianos concentrados de uso en la fabricación de embutidos curados tipo salchichón y similares, que consiste esencialmente en realizar un cultivo de las cepas bacterianas B-1 y B-3, del tipo *Lactobacillus* sp. y de la cepa B-2 del tipo *Pediococcus* sp., de las que la cepa B-1 es una nueva
- 10. variedad, no descrita hasta ahora, del *Lactobacillus casei*,
- 15. muy próxima a la variedad *alactosus*, de la que se diferencia por una débil acidificación de la leche y una débil fermentación de la lactosa, diferenciándose asimismo del *Lactobacillus plantarum* por su sensibilidad al alquil-sulfato de sodio secundario, y la no fermentación de la melibiosa y de la rafinosa;
- 20. la cepa B-2 es una variedad del *Pediococcus cerevisiae*, que se caracteriza por no crecer en la leche, fermentar la sacarosa, ser catalasa positiva y reaccionar con la benci-

pe



- dina con desvanecimiento rápido del color; y la cepa B-3 es una variedad del *Lactobacillus plantarum*, del grupo de las homofermentativas, caracterizada por su falta de crecimiento en alquil sulfato de sodio secundario y una lenta acidificación de la leche, llevando a cabo el crecimiento de tales cepas bacterianas en medios de cultivo de composición adecuada tal que dé concentraciones de células viables comprendidas entre valores de  $10^8$  y  $10^{10}$  céls/ml.
- 5.
2. Proceso para la preparación de inóculos bacterianos concentrados de uso en la fabricación de embutidos curados tipo salchichón y similares, según la reivindicación anterior, que se caracteriza por el hecho de que la multiplicación de las cepas B-1 y B-3 se realiza ya sea mediante el uso de concentraciones de 30 a 50 ppm. de ácido fólico, y por la introducción de unas condiciones críticas microaerófilas tales como las que se obtienen cuando la relación entre la superficie libre del caldo de cultivo en contacto con el aire y el volumen de dicho medio de cultivo oscila entre 0,035 y 0,040, comprendiendo también dicho proceso de obtención el cultivo de la cepa B-2 en un medio adecuado tal que permite obtener una concentración de células viables de  $10^9$  céls/ml, tras de lo cual el proceso comprende la concentración de los cultivos obtenidos por centrifugación a 3.500-4.500 rpm. en un periodo comprendido entre 20 y 40 minutos y la mezcla de las suspensiones concentradas de los microorganismos B-1 y B-2 y B-3 en proporciones respectivas tales como la relación de concentraciones en células viables entre las cepas B-1
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.

pe



415353



- zado formado por las cepas B-1, B-2 y B-3 en las proporciones descritas en la reivindicación segunda y diluídas con una solución de leche liofilizada descremada estéril y glutamato monosódico al 10%, tras de lo cual se someten
5. a un proceso de liofilización en condiciones tales que se asegure una viabilidad del 80 al 90% de los microorganismos existentes, a cuyo fin se utilizan productos crioprotectores tales como glutamato monosódico, alginato de propilenglicol y leche descremada estéril.
10. 5. Proceso para la preparación de inóculos bacterianos concentrados de uso en la fabricación de embutidos curados tipo salchichón y similares, según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por el hecho de que comprende la obtención de un concentrado bacteriano microencapsulado por el cual la suspensión de las cepas B-1, B-2
15. y B-3 mezcladas en las proporciones descritas en la reivindicación segunda se emulsiona con monoglicéridos acetilados de punto de fusión comprendido entre 35 y 45°C; pasando posteriormente a la dilución del medio emulsionado con una
20. solución de un soporte de tipo alimentario conteniendo glucosa y/o celulosa modificada, que se seca a temperatura inferior a 43°, a la vez que se enfría para lograr la microencapsulación de las células bacterianas.
25. 6. Proceso para la preparación de inóculos bacterianos concentrados de uso en la fabricación de embutidos curados tipo salchichón y similares.

Todo ello según queda descrito y reivindicado en

22



la presente memoria descriptiva que consta de veintidos ho-  
jas foliadas escritas a máquina por una sola cara.

Barcelona, 22 de mayo de 1.973

LABORATORIOS MIRET, S.A.

p.a.

A large, stylized handwritten signature or scribble that overlaps the 'p.a.' text and extends across the page.

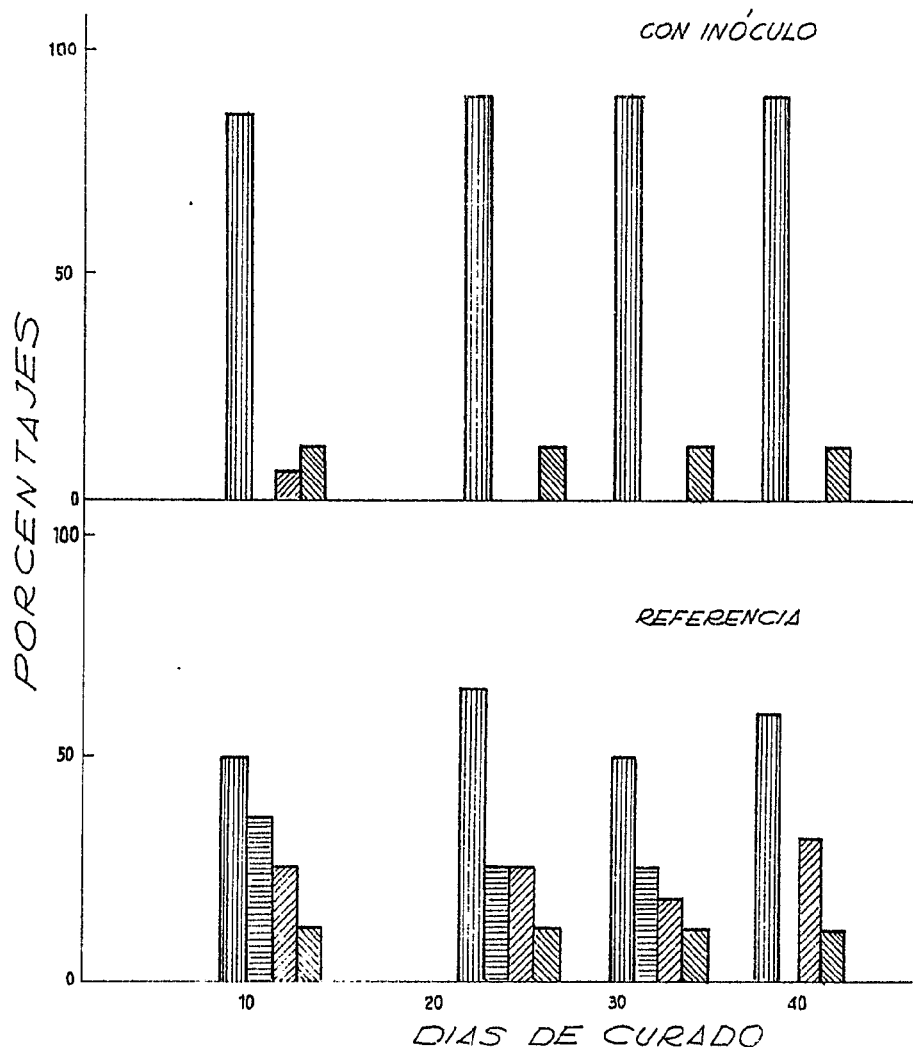
A handwritten signature or mark located at the bottom left of the page.

CAACTERISTICAS DE LAS CEPAS BACTERIANAS AISLADAS DE EMBUTIDOS DE TIPO SALCHICHON







Denominación de las cepas aisladas	Arabínosa	Lactosa	Melibíosa	Rafínosa	Ramnosa	Sacarosa	Xilosa	Esculina	Sorbitol	Manitol	Maltosa	Fructosa	Galactosa	Celobiosa	Amigdalina	% A. Lactifl.	Co a partit.	De leche	Aspecto microscópico
Cepa 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,72	-	-	B G+ pequeños
Cepa 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1,29	-	-	Cocos irregulares
Cepa 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,99	-	-	B G+ cortos y gruesos
Cepa 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2,88	-	-	B G+ cortos y gruesos
Cepa 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,82	-	-	B G+ cortos y gruesos
Cepa 6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2,17	-	-	B G+ cortos y gruesos
Cepa 7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1,23	-	-	B G+ cortos
Cepa 8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,99	-	-	B G+ finos y largos
Cepa 9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,17	-	-	B G+ corto y grueso
Cepa 10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1,70	-	-	B G+ corto y grueso
Cepa 11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,94	-	-	B G+ cortos
Cepa 14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3,11	-	-	Cocos
Cepa 15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1,64	-	-	B G+ cortos
Cepa 16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2,23	-	-	B G+ cortos
Cepa 17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1,58	-	-	B G+ muy cortos
Cepa 18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1,47	-	-	B G+ muy cortos
Cepa 19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1,83	-	-	B G+ largos y finos
Cepa 22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,76	-	-	B G+ largos y finos
Cepa 23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2,23	-	-	B G+ cortos
Cepa 24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1,35	-	-	B G+ cortos
Cepa 26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1,82	-	-	B G+ largos y finos
Cepa 28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3, 11	-	-	B G+ largos y finos
Cepa 31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2,46	-	-	B G+ largos y finos
Cepa 32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2,29	-	-	B G+ cortos y gruesos
Cepa 33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2,17	-	-	B G+ cortos y gruesos
Cepa 34	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,85	-	-	B G+ cortos y gruesos
Cepa 35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		-	-	B G+ cortos y gruesos
Cepa 36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		-	-	B G+ cortos y gruesos
Cepa 37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		-	-	B G+ cortos y gruesos

22



23501/1

- LÁCTICOS 
- GRAM NEGATIVAS 
- COCOS 
- HONGOS Y LEVADURAS 

Barcelona, 22 de mayo de 1973  
p.a.