



22

Int. Cl.: e12K, A22C

415357

415357

P A T E N T E
D E
I N V E N C I Ó N

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

- . -

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 chorizo y similares.

La producción de chorizo 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.

El Código Alimentario reconoce entre los derivados cárnicos al chorizo como embutido crudo, curado y encarnado elaborado con carne de cerdo o cerdo y vacuno, metido en tripa

415357

22



natural o artificial de diámetro superior a 22 mm. Para diámetros inferiores se adopta el nombre de "longaniza".

Aún cuando el proceso de invención reivindicado tiene relación con el producto definido en el párrafo anterior,

5. puede aplicarse a las diferentes variedades de chorizo y similares existentes tanto en el mercado nacional, como también mundial. De forma particular, y dentro del mercado nacional, puede aplicarse a las variedades tipo Pamplona (picado fino), Extremeño (picado medio), Salamanca (picado grueso) u otros de los muchos existentes tanto en sus calidades puro, selecto o corriente (ver clasificación del Dr. E. Culebras en La Industria Tocinera).
- 10.

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.

15.

Uno de los aspectos fundamentales de esta tecnología en su producción industrial es la del control de 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.

20.

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

25.

415357



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.

5. Parece, pues, fuera de duda alguna que a una correcta 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.
10. 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.
15. 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.
20. El estudio de 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.
25. 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.

5. En las tablas nº I y II reproducen, a modo de ejemplo, las características de algunas cepas bacterianas aisladas de embutidos del tipo chorizo.

10. Los ensayos de selección permitieron concretar como más utilizables en los procesos de fermentación de embutidos curados tipo chorizo y similares los microorganismos designados como CP-26, CP-20, CP-9, CP-18 y DB-6. De ellos, los microorganismos CP-26, CP-20 y CP-9 son lactobacilos, CP-18 un pediococo y DB-6 un micrococo. Estas cepas responden a las siguientes especificaciones:

Cepa CP-26

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

Crecen bien a 30^o C, pero no a 45^o C.

20. El examen microscópico a las 24 h del crecimiento en Agar medio MRS muestra formas bacilares Gram positivas, esporógenas, normalmente en pares y con un característico pleomorfismo. Catalasa (-) bencidina (-)

25. 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.

Fermentación de azúcares y análogos: Xilosa (+), ramnosa (+), melibiosa (+), lactosa (+), maltosa (+), dextrosa (+), sor-

415357²²



bitol (+), rafinosa (+), arabinosa (+), sacarosa (+), fructosa (+), galactosa (+), celobiosa (+). En ningún caso producen gas.

5. De acuerdo con las características señaladas la cepa CP-26 pertenece al grupo homofermentativo. De acuerdo con la subdivisión de Orla-Jense (1945) pertenecen al grupo Strepto-bacterium. De acuerdo con los datos de Rogosa y Sharpe (1959) sería afín a Lactobacillus casei.

Cepa CP-20

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

15. El examen microscópico a las 45 h del crecimiento en Agar medio MRS muestra formas bacilares Gram positivas, esporógenas, normalmente en pares y con un característico pleomorfismo.

Catalasa (-) bencidina (-).

20. 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 : Xilosa (+), ramnosa (-), melibiosa (+), lactosa (+), maltosa (+), dextrosa (-), sorbitol (-), rafinosa (-), arabinosa (+), sacarosa (+), fructosa (+), galactosa (+), celobiosa (+). En ningún caso producen gas.

De acuerdo con las características señaladas la cepa CP-20 pertenece al grupo homofermentativo. De acuerdo

415357

22



con la subdivisión de Orla-Jense (1945) pertenece al grupo Strepto-bacterium. De acuerdo con los datos de Rogosa y Sharpe (1959) sería afín a *Lactobacillus plantarum*.

Cepa CP-9

5. 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.

10. El examen microscópico a las 45 h del crecimiento en Agar medio MRS muestra formas bacilares Gram positivas, esporógenas sueltas y con un característico pleomorfismo.

Catalasa (-), bencidina (-).

15. 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*.

20. Fermentación de azúcares y análogos : Xilosa (+), ramnosa (+), melibiosa (+), lactosa (+), maltosa (+), dextrosa (+), sorbitol (+), rafinosa (+), arabinosa (+), sacarosa (+), fructosa (+), galactosa (+), celobiosa (+). En ningún caso producen gas.

25. De acuerdo con las características señaladas la cepa CP-9 pertenece al grupo homofermentativo. De acuerdo con la subdivisión de Orla-Jense (1945) pertenecen al grupo streptobacterium. De acuerdo con los datos de Rogosa y Sharpe (1959) sería afín a *Lactobacillus casei*.

Cepa CP-18

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

415357 22



Crecen bien a 15, 30 y 45°C.

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

5.

Sobre los medios antes señalados el crecimiento de 24 a 48 h es catalasa positivo. Los cultivos de 24 h dan una débil reacción a la bencidina, que, a diferencia de los 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.

10.

15.

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

20.

Fermentación de azúcares y análogos : Xilosa (-), ramnosa (-), melibiosa (-), lactosa (+), maltosa (+), dextrosa (-), sorbitol (-), rafinosa (-), arabinosa (+), sacarosa (+), fructosa (+), galactosa (-), celobiosa (-). En ningún caso producen gas.

25.

Crecen en el medio de Man, Rogosa, Sharpe al añadirle 5 y 10% de ClNa.

Cepa DB-6

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

415357



El examen microscópico a las 24 h en Agar medio MRS, muestra formas cocáceas de 2 micras de diámetro sueltas o agrupadas de forma más o menos irregular Gram positivas.

5. Sobre los medios antes señalados el crecimiento de 24 a 48 h es catalasa (+) y bencidina (+).

Reducen los nitratos a nitritos.

En las pruebas de oxidación-fermentación de Hugh-Leifson se produce crecimiento en el tubo aeróbico pero no en el anaeróbico.

10. Las características señaladas permiten atribuir la cepa DB- al género *Micrococcus*.

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, 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 chorizo y similares, son objetivos evidentes de esta patente.

20. 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 conteniendo los cinco microorganismos a concentración suficientemente elevada así como con viabilidad suficiente para poder ser objeto de uso industrial.

De acuerdo, pues, con la invención, el proceso con-



- siste esencialmente en el cultivo de las cepas bacterianas *Lactobacillus* sp. CP-26, *Lactobacillus* sp. CP-20, *Lactobacillus hispanicus* sp. CP-9, *Pediococcus cerevisiae* sp. CP-18 y *Micrococcus* sp. DB-6, en medios de cultivo de composición adecuada tal que dé concentraciones de células viables comprendidas entre los valores de 10^8 y 10^{10} cels/ml., tras de lo cual se pasa a la concentración de los cultivos obtenidos por centrifugación y a la mezcla de las suspensiones concentradas de los microorganismos en proporciones tales que la relación de concentraciones en células viables entre las cepas *Lactobacillus* sp. CP-26, *Lactobacillus* sp. CP-20 y *Lactobacillus hispanicus* sp. CP-9 sean siempre 1:1:1, que la relación de concentraciones en células viables entre las cepas *Pediococcus cerevisiae* sp. CP-18 y *Micrococcus* sp. DB-6 puedan oscilar entre 5:1 a 10:1 y que la suma de las concentraciones en células viables del primer grupo con respecto a la suma de las concentraciones en células viables del segundo grupo no sea inferior a 1:1 ni superior a 100:1.

- 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, principalmente del tipo chorizo y similares.

Se entiende que los datos citados en estos ejemplos

415357



no limitan el alcance del proceso de invención, sino que tan sólo son expuestos a título de ejemplo para una mejor comprensión de la finalidad de esta patente.

E J E M P L O 1.

5. El proceso que se describirá a continuación es aplicable a las cepas CP-26, CP-20 y CP-9. 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:

| | | |
|--|-------|----|
| 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 | g |
| Agua | 1.000 | ml |
| pH : aprox. 6,2. | | |

10. 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 35°C. Se obtiene

15. después de este período de incubación un cultivo con una concentración bacteriana viable de 10⁹ céls/ml. Este cultivo

415357

22



- 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 CP-26, CP-20 y CP-9 con dicha concentración viable son sometidos a un
5. proceso de centrifugación a 4.000 rpm. durante unos 20 minutos con lo que se obtienen concentrados con 10^{10} céls. viables /ml. Estos concentrados de cepas CP-26, CP-20 y CP-9 se mezclan con el concentrado de las cepas CP-18 y DB-6 (ver
10. ejemplo 2) y se someten, previa standarización, a los procesos que se describirán en los ejemplos, 3, 4 y 5.

Como particularidades objeto de invención en la obtención de cultivos concentrados de las cepas CP-26, CP-20 y CP-9 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 contacto con el
25. aire a volumen de cultivo que oscile entre 0,035 y 0,040.

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.

- 5. 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> |
|------------|--------------------------------|
| 0,035 | 2 x 10 ⁹ céls/ml. |
| 0,040 | 1,7 x 10 ⁹ céls/ml. |
| 0,072 | 7 x 10 ⁸ céls/ml. |
| 0,302 | 5,1 x 10 ⁸ céls/ml. |

E J E M P L O 2.

El proceso que se describirá a continuación es aplicable a las cepas CP-18 y DB-6.

- 15. A partir de un crecimiento de las cepas CP-18 y DB-6 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 composición:

| | |
|------------------------------|-------|
| Tripticase-peptona | 17 g |
| Phitona-peptona | 3 g |
| ClNa | 5 g |
| Fosfato dipotásico | 2,5 g |

415357²²



Glucosa 2,5 g

5. contenidos en un frasco de Roux. El crecimiento superficial obtenido después de 48h 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 conteniendo 10⁹ céls. viables /ml.

E J E M P L O 3.

10. Los concentrados obtenidos en los ejemplos 1 y 2, una vez comprobado en cámara de Thomas el número de células viables /ml, se mezclan en una proporción volumétrica respectiva para las cepas CP-26, CP-20, CP-9, CP-18 y DB-6 de 3:3:3:1:0,2. A continuación se diluyen en la proporción 10:1 con solución de glutamato monosódico 0,1 M. El líquido obtenido se distribuye en cubetas de plástico conteniendo 15. 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 20. nunca superior a -5°C.

25. Determinaciones de células viables efectuadas después de descongelar el cubito obtenido muestran concentraciones de las cepas CP-26, CP-20 y CP-9 no inferiores a 10⁸ céls/cubito, de la cepa CP-18 no inferiores a 10⁷ céls/cubito y de la cepa DB-6 no inferiores a 10⁶ céls/cubito.

La elección del glutamato monosódico como compuesto crioprotector ha sido realizado después de un estudio comparativo de viabilidad del descongelado en presencia de varios

415357²²



protectores. Pueden emplearse, sin embargo otros agentes protectores tales como glicerol y alginato de propilenglicol.

E J E M P L O 4.

5. Los cultivos concentrados de las cepas CP-26, CP-20 y CP-9 obtenidos en el ejemplo 1 y los cultivos concentrados de las cepas CP-18 y DB-6 obtenidos 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 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 formado por una suspensión bacteriana en glutamato monosódico con una enumeración viable total superior a 10^9 céls/g.
- 10.
- 15.

E J E M P L O 5.

20. Los cultivos concentrados de las cepas CP-26, CP-20 y CP-9 obtenidos en el ejemplo 1 y los cultivos concentrados de las cepas CP-18 y DB-6 obtenidos en el ejemplo 2 se emulsionan con un monoglicérido acetilado de punto de fusión comprendido entre 35 y 45°C. El medio emulsionado se mezcla entonces con un soporte a base de ingredientes alimentarios conteniendo glucosa, almidones modificados o celulosa.
25. El conjunto se seca a temperatura inferior a 43° y se enfría para encapsular las células bacterianas. Se obtiene así un cultivo concentrado seco de concentrado viable semejante al indi-



415357

cado 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 atribuidas 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.
- E) Ausencia de fagos :
Se realiza de acuerdo con la técnica siguiente:
Para ello se utiliza una unidad Millipore-XX11-047-00.
Se preparan placas de 12 cm³ de agar MRS; sobre éstas, una vez controladas, se añaden 2-3 ml de agar MRS a una
- 25.



- temperatura de 45°C, a los que previamente se habían añadido 0,1-0,2 ml de un cultivo en fase logaritmica de Lactobacillus sp. CP-26 cultivado en caldo MRS. Una vez solidificadas, se añaden con una pipeta estéril 2-3 gotas de microfiltrado obtenido a partir de 3 cubitos descongela-
5. dos 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.
10. Lo mismo se hará con las restantes cepas. 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. Los productos obtenidos en los ejemplos, 3, 4 y 5
15. han sido ensayados en la elaboración de embutidos curados tipo chorizo y similares. Se han llevado a cabo ensayos comparativos con piezas obtenidas sin la introducción del inóculo bacteriano concentrado y manteniendo constantes todas las demás condiciones de fabricación y curado. Para un producto
20. congelado del tipo citado en el ejemplo 3 se han utilizado dosis de 1 g de congelado/kg de carne. En las tablas que siguen se presentan las poblaciones de organismos contaminantes indeseables, obtenidos en nueve ensayos con y sin inóculo bacteriano. En todos los casos,
25. el chorizo con inóculo bacteriano inicial ha dado una elevada y rápida población láctica.

T A B L A 3.

Población de bacterias Gram negativas en chorizo con y sin



inóculo inicial:

(x 10³ céls/g)

| <u>Muestra</u> | <u>Con inóculo</u> | <u>Sin inóculo</u> |
|----------------|--------------------|--------------------|
| 1 | 0 | 10 |
| 2 | 0 | 35 |
| 3 | 0 | 200 |
| 4 | 0 | 2 |
| 5 | 0 | 8 |
| 6 | 0 | 20 |
| 7 | 0 | 7.000 |
| 8 | 0 | 3 |
| 9 | 0 | 40 |

T A B L A 4.

Población de cocos toxicogénicos en chorizo con y sin inóculo inicial:

| <u>Muestra</u> | <u>Con inóculo</u> | <u>Sin inóculo</u> |
|----------------|--------------------|--------------------|
| 1 | 0 | 1.000 |
| 2 | 0 | 30.000 |
| 3 | 10 | 700.000 |
| 4 | 30 | 40.000 |
| 5 | 60 | 60.000 |
| 6 | 0 | 2.400.000 |
| 7 | 0 | 900.000 |
| 8 | 0 | 0 |
| 9 | 0 | 600.000 |

T A B L A 5.

Población de hongos y levaduras:

| <u>Muestra</u> | <u>Con inóculo</u> | <u>Sin inóculo</u> |
|----------------|--------------------|--------------------|
| 1 | 100 | 3.000.000 |

415357²²



| | | |
|---|-------|------------|
| 2 | 100 | 200.000 |
| 3 | 70 | 60.000 |
| 4 | 130 | 400.000 |
| 5 | 110 | 1.000.000 |
| 6 | 3.000 | 70.000.000 |
| 7 | 2.000 | 4.000.000 |
| 8 | 100 | 30.000 |
| 9 | 100 | 5.000.000 |

De los resultados que muestran las tablas anteriores puede deducirse que del uso de inóculos bacterianos concentrados se deducen los siguientes efectos:

5. a) Que la fermentación láctica se desarrolle exclusivamente por los fermentos añadidos y no por una colonización espontánea e incontrolada.
- 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.
10. d) Que después de alcanzado el punto de mayor acidez, asciende el pH hasta 5,2-5,4 y no más, haciendo el producto convenientemente comestible e imputrescible.
15. e) Que no se desarrolle flora extraña (Estafilococos, enterobacterias y anaeróbicos gasogénicos), que disminuya la calidad del producto e incluso llegue a estropearlo.
- f) Que la deshidratación del embutido pueda controlarse estrictamente con la humedad y temperatura del medio ambiente.
20. g) Que las características de aroma y sabor sean uniformes y reproducibles.

415357²²



- h) Que se mejore la textura y el color de forma constante para cada composición de la masa y condiciones de trabajo.
- i) Que sea totalmente innecesario el uso de antifermentos o conservadores.

- . -

N O T A

- 5. 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 chorizo y similares, que consiste esencialmente
- 10. en el cultivo de las cepas bacterianas *Lactobacillus* sp. CP-26, *Lactobacillus* sp. CP-20 y *Lactobacillus hispanicus* sp. CP-9 y de las cepas *Pediococcus cerevisiae* sp. CP-18 y *Micrococcus* sp DB-6, de las que el *Lactobacillus* sp. CP-26 es una variedad del *Lactobacillus casei* no formadores de gas,
- 15. catalasa negativo y bencidina negativo, del grupo de las homofermentativas; el *Lactobacillus* sp. CP-20 es una variedad del *Lactobacillus plantarum*, no formadora de gas, catalasa negativo y bencidina negativo, del grupo de las homofermentativas; y el *Lactobacillus hispanicus* sp. CP-9 es una variedad
- 20. del *Lactobacillus casei*, no formadora de gas, catalasa negativo y bencidina negativo, del grupo de las homofermentativas, el *Pediococcus cerevisiae* sp. CP-18 puede definirse como una bacteria con características propias de la pseudocatalasa del género *Pediococcus*, diferenciándose del *Pediococcus cerevisiae* por ser ésta catalasa negativa y bencidina

415357

22



- negativa, mientras que la variedad reivindicada es catalasa positiva y da una reacción débil con bencidina que va desvaneciéndose con el tiempo; y el *Micrococcus* sp. DB-6 puede definirse como variedad del género *Micrococcus*, catalasa positivo y bencidina positivo; 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 los 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 chorizo y similares, según la reivindicación anterior, caracterizado por el empleo en la multiplicación de las cepas *Lactobacillus* sp. CP-26, *Lactobacillus* sp. CP-20 y *Lactobacillus hispanicus* sp. CP-9 de concentraciones
10. de 30 a 50 ppm. de ácido fólico y por el uso de unas condiciones críticas microaerófilas tales como las que se obtienen cuando la relación entre la superficie libre del medio de cultivo en contacto con el aire y el volumen de dicho medio de cultivo está comprendido entre valores de 0,035 y 0,040,
15. comprendiendo también el cultivo de las cepas *Pediococcus cerevisiae* sp. CP-18 y *Micrococcus* sp. DB-6 en medios adecuados aeróbios tales que permitan obtener concentraciones de células viables del orden de 10^8 - 10^9 céls/ml, y efectuando a continuación la concentración de los cultivos obtenidos por
20. centrifugación a 3.500 - 4.500 rpm. en un período comprendido entre 20 y 40 minutos y la mezcla de las suspensiones concentradas de los microorganismos *Lactobacillus* sp. CP-26, *Lactobacillus* sp. CP-20, *Lactobacillus hispanicus* sp. CP-9
- 25.

kg

415357

22



- Pediococcus cerevisiae sp. CP-18 y Micrococcus sp. DB-6 en proporciones respectivas tales que la relación de concentraciones en células viables entre las cepas Lactobacillus sp. CP-26, Lactobacillus sp. CP-20 y Lactobacillus hispanicus sp, CP-9 sean siempre 1:1:1, que la relación de concentraciones en células viables entre las cepas Pediococcus cerevisiae sp. CP-18 y Micrococcus sp. DB-6 puedan oscilar entre 5:1 a 10:1 y que la suma de las concentraciones en células viables del primer grupo con respecto a la suma de las concentraciones en células viables del segundo grupo no sea inferior a 1:1, ni superior a 100:1.

3. Proceso para la preparación de inóculos bacterianos concentrados de uso en la fabricación de embutidos curados tipo chorizo y similares, según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por el hecho de que comprende la obtención de un concentrado congelado, formado por las cepas Lactobacillus sp. CP-26, Lactobacillus sp. CP-20, Lactobacillus hispanicus sp CP-9, Pediococcus cerevisiae sp. CP-18 y Micrococcus sp DB-6 en las proporciones establecidas en la reivindicación segunda y diluídas con una solución 0,1 M de glutamato monosódico a razón de 10 partes de solución de glutamato monosódico por 1 parte de suspensión bacteriana (ambas en volumen) o proporciones distintas a las señaladas de acuerdo con la concentración en células viables/g que se desee obtener en el congelado final, introduciendo la dilución obtenida en cubitos de plástico de unos 10 ml de capacidad, en ambiente estéril, que se protegen de la contaminación exterior por medio de una lámina de aluminio termosoldable y

kg

415357



se congelan de -15 a -20°C durante 3 a 4 horas, manteniéndose luego en frigorífico a temperaturas nunca superiores a -5°C hasta el momento de su aplicación.

5. Proceso para la preparación de inóculos bacterianos concentrados de uso en la fabricación de embutidos curados tipo chorizo y similares, según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por el hecho de que comprende la obtención de un concentrado liofilizado, formado por las cepas *Lactobacillus* sp. CP-26, *Lactobacillus* sp. CP-20, *Lactobacillus hispanicus* sp. CP-9, *Pediococcus cerevisiae* sp. CP-18 y *Micrococcus* sp. DB-6 en las proporciones establecidas en la reivindicación segunda y diluidas con una solución de leche liofilizada descremada estéril y glutamato monosódico al 10%; tras de lo cual se someten 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. Proceso para la preparación de inóculos bacterianos concentrados de uso en la fabricación de embutidos curados tipo chorizo y similares, según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por el hecho de que comprende la obtención de un concentrado microencapsulado, formado por las cepas *Lactobacillus* sp. CP-26, *Lactobacillus* sp. CP-20, *Lactobacillus hispanicus* sp. CP-9, *Pediococcus cerevisiae* sp. CP-18 y *Micrococcus* sp. DB-6, mezcladas en las proporciones indicadas en la reivindicación segunda y emulsionadas con mono-

pey

415357²²



glicéridos acetilados de punto de fusión comprendido entre 35 y 45°C, pasando posteriormente a la dilución con una solución de un soporte de tipo alimentario conteniendo glucosa y/o celulosa modificada y finalmente al secado a temperatura inferior a 43°C, al mismo tiempo que se enfría el sistema para lograr la microencapsulación de las células bacterianas.

6. Proceso para la preparación de inóculos bacterianos concentrados de uso en la fabricación de embutidos curados tipo chorizo y similares.

La presente memoria descriptiva consta de veintitres hojas foliadas escritas a máquina por una sola cara.

Barcelona, 22 de mayo de 1.973

LABORATORIOS MIRET, S.A.

P.a.

Res

T A B L A I

CANACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS BACTERIANAS AISLADAS DE EMBUTIDOS DE TIPO CHORIZO



22

| Denominación de las cepas aisladas | Arabinosa | Lactosa | Melibiosa | Rafinosa | Ramosa | Sacarosa | Xilosa | Esculina | Sorbitol | Manitol | Maltosa | Fructosa | Galactosa | Celobiosa | Amigdalina | % Ac. Lactico a partir de leche | Aspecto microscopico |
|------------------------------------|-----------|---------|-----------|----------|--------|----------|--------|----------|----------|---------|---------|----------|-----------|-----------|------------|---------------------------------|-----------------------|
| CR1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | B G+ corto y grueso |
| CR2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | B G+ corto curvado |
| CR3 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | B G+ corto y recto |
| CR4 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | B G+ corto y recto |
| CR5 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | B G+ corto y recto |
| CR6 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | B G+ corto y curvado |
| CR7 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | B G+ corto y fino |
| CR8 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | B G+ corto y grueso |
| CR9 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | B G+ corto y grueso |
| CR10 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | B G+ corto y fino |
| CR11 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | B G+ largos y gruesos |
| CR12 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | B G+ cortos y gruesos |
| CR13 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | Cocos G+ |
| CA1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,07 | B G+ corto y curvado |
| CA2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,01 | B G+ largo |
| CA3 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,01 | B G+ largo |
| CA4 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,03 | B G+ largo y grueso |
| CA5 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,03 | B G+ corto y curvado |
| CA6 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,03 | B G+ corto y curvado |
| CA7 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,01 | B G+ corto y curvado |
| CA8 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,23 | B G+ corto y curvado |
| CA9 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,07 | B G+ pequeños |
| CA10 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,17 | B G+ largo y curvado |
| CA11 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,17 | B G+ corto y grueso |
| CA12 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,01 | Cocos G+ |

415357

T A B L A II

CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS BACTERIANAS AISLADAS DE EMBUTIDOS DE TIPO CHORIZO

| Denominación de las cepas aisladas | Arabinosa | Lactosa | Melibiososa | Rafinosa | Ramnosa | Sacarosa | Xilosa | Esculina | Sorbitol | Manitol | Maltosa | Fructosa | Galactosa | Celobiosa | Amigdalina | % Ac. Láctico a partir de leche | Aspecto microscopico |
|------------------------------------|-----------|---------|-------------|----------|---------|----------|--------|----------|----------|---------|---------|----------|-----------|-----------|------------|---------------------------------|----------------------|
|------------------------------------|-----------|---------|-------------|----------|---------|----------|--------|----------|----------|---------|---------|----------|-----------|-----------|------------|---------------------------------|----------------------|



| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|------|------------------------|
| CB1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,01 | B G+ corto y curvado |
| CB2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,02 | B G+ corto y curvado |
| CB3 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,05 | B G+ largo y fino |
| CB4 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,05 | B G+ corto y fino |
| CB5 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,07 | B G+ corto y suelto |
| CB6 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,07 | B G+ corto y suelto |
| CB7 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,03 | B G+ corto y curvado |
| CB8 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,11 | B G+ corto y curvado |
| CB9 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,11 | B G+ corto y recto |
| CB10 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,09 | B G+ corto y recto |
| CC1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,05 | B G+ pequeño y suelto |
| CC2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,11 | B G+ corto y recto |
| CC3 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,07 | B G+ corto y grueso |
| CC4 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,09 | B G+ corto y curvado |
| CC5 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,05 | B G+ pequeño y curvado |
| CC6 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,11 | B G+ corto y recto |
| CC7 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,11 | B G+ largo y fino |
| CM1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,07 | B G+ cortos y gruesos |
| CM2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,01 | B G+ corto y curvado |
| CM3 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,05 | B G+ corto y curvado |
| CM4 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,09 | B G+ pequeño y recto |
| CM5 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,07 | B G+ corto y curvado |
| CM6 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,09 | B G+ corto y curvado |
| CM7 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,03 | B G+ largos y finos |
| CM8 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,03 | Cocos G+ |
| CM9 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 0,03 | B G+ corto y curvado |

415357