



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① N.º de publicación: **ES 2 065 858**

② Número de solicitud: 9301748

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>: C12N 1/20

A23B 4/22

A23B 4/12

//(C12N 1/20

C12R 1:25)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **04.08.93**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.95**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**16.02.95**

⑦ Solicitante/es: **Institut de Recerca i  
Tecnología Agroalimentàries (IRTA)  
Pg. de Gràcia, 44  
08007 Barcelona, ES  
Laboratorios Miret, S.A. (LAMIRSA)**

⑧ Inventor/es: **Garriga Turón, Margarita y  
Arnau Arboix, Jacinto**

⑨ Agente: **Ferreguela Colón, Eduardo**

⑮ Título: **Nueva cepa de *Lactobacillus plantarum* con efecto preventivo contra la aparición de la mancha negra en los productos cárnicos crudos curados.**

⑯ Resumen:

Se describe una nueva cepa bacteriana de *Lactobacillus plantarum*, denominada CTC 305, depositada con el número CECT 4436.

La nueva cepa bacteriana resulta efectiva para prevenir y evitar la aparición y propagación del defecto conocido como mancha negra de los productos cárnicos crudos curados, consistente en la aparición de coloraciones negras en la superficie de los mismos.

Se aísla por primera vez la cepa bacteriana responsable del mencionado defecto de la mancha negra, resultando ser una bacteria gram-negativa perteneciente al subgrupo gamma de la clase Proteobacteria. Se describe la mencionada cepa a través de su depósito con el número CECT 4437.

## DESCRIPCION

**Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a una nueva cepa de *Lactobacillus plantarum* y a su utilización contra la aparición de coloraciones negras en las superficies de los productos cárnicos crudos curados, tales como jamones, salchichones, chorizos, pancetas, etc.

**Estado de la técnica**

En la superficie de los productos cárnicos crudos curados, tales como jamones, chorizos, salchichones, longanizas, etc. puede aparecer ocasionalmente una coloración marrón que gradualmente se transforma en negra y se extiende por la superficie de los productos de forma que, una vez contaminados, ya no son aptos para el consumo humano. Dicha coloración se conoce en la industria de los productos cárnicos crudos curados con el nombre de mancha negra, y una vez iniciada su aparición, es capaz de propagarse rápida e irreversiblemente contaminando a otros productos cárnicos, produciendo sensibles daños y pérdidas económicas.

Hasta el presente no se conocían las causas de este defecto, descrito por primera vez por Hugas, M. y Arnau, J. en "Jamón curado", pg 179-182, publicación editada por el Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (ISBN 84-404-1575-3).

Por otro lado, algunas solicitudes de patente publicadas describen el empleo de microorganismos del tipo de las bacterias lácticas, tales como las pertenecientes al género *Lactobacillus*, como agentes conservantes para los productos cárnicos, por ejemplo en la solicitud de patente japonesa publicada n° 02138953, en la solicitud de patente europea n° 0 333 056 y en la solicitud de patente japonesa publicada n° 62130680, entre otras. También se ha descrito dicho efecto conservante en algunas publicaciones de tipo científico, por ejemplo por Cantoni, C. et al. en *Industrie Alimentari*, 1982, 21 (2), pg 85-90.

No obstante, debido al desconocimiento sobre sus causas, no se ha descrito todavía ninguna solución efectiva específica contra la aparición de la mancha negra en los productos cárnicos crudos curados.

Los autores de la presente invención han resuelto el mencionado problema ya que, en primer lugar, han logrado aislar una cepa bacteriana responsable de la mencionada mancha negra y, posteriormente, han descubierto que la aparición y propagación de la misma puede ser prevenida y evitada mediante la utilización de una nueva cepa de bacterias de la especie *Lactobacillus plantarum*.

**Objeto de la invención**

El objeto principal de la presente invención es proporcionar una nueva cepa de bacterias de la especie *Lactobacillus plantarum*, cuya utilización es capaz de prevenir y evitar la aparición y propagación del defecto de la mancha negra en los productos cárnicos crudos curados.

Otro objeto de la presente invención consiste en la utilización de la mencionada cepa bacteriana en la prevención y evitación de la propagación del defecto de la mancha negra en los productos

cárnicos crudos curados.

**Descripción de la invención**

Los autores de la presente invención han descubierto que se puede prevenir y evitar con eficacia la aparición y propagación de la mancha negra en los productos cárnicos crudos curados mediante el tratamiento de los mismos con cualquier forma aplicable de cultivos de una nueva cepa bacteriana de la especie *Lactobacillus plantarum*, denominada por los autores de la presente invención CTC 305, de la cual ha sido depositado un cultivo, con el número de orden CECT 4436, conforme a las provisiones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines. del procedimiento en materia de patentes, en la autoridad internacional de depósito Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de la Universidad de Valencia, Campus de Burjasot, 46100 Burjasot (Valencia), España.

CTC 305 es el número de orden de la cepa bacteriana objeto de la presente invención correspondiente a la colección de cultivos del Centre de Tecnologia de la Carn, del Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries, domiciliado en la Granja Camps i Armet, s/n, 17121 Monells (Girona), España.

La cepa de *Lactobacillus plantarum* CTC 305, objeto de la presente invención, presenta las siguientes características fisiológicas:

Bacilo Gram +, catalasa no produce gas de fermentación de la glucosa.

Fermentación de carbohidratos: Celobiosa +, Glucosa +, Lactosa +, Maltosa +, Manitol +, Melibiosa +, Melezitosa +, Ramnosa +, Ribosa +, Sacarosa +, Trehalosa +.

Producción de amoníaco a partir de la arginina-. Producción de acetoina (Voges-Proskauer) +.

Presencia de ácido mesodlaminopimélico en la pared +.

Acido láctico producido en cultivo de 24 horas en caldo MRS: 5,2 g/l (L+) 7,5 g/l (D-).

Crece a 8°C, 15°C y 45°C.

Crece en presencia de 5% y 8% de NaCl.

Crece en agar acetato (Agar rogosa).

Crece en presencia de nitratos y nitritos.

Los autores de la presente invención han descubierto que la mancha negra de los productos cárnicos crudos curados se debe a una contaminación de la superficie de los mismos por una cepa bacteriana, cuya identificación completa no ha sido posible por el momento aunque, de acuerdo con las investigaciones realizadas hasta ahora, se trata de una bacteria gram-negativa que pertenece al subgrupo gamma de la clase Proteobacteriae.

Dicha cepa bacteriana ha sido aislada a partir de muestras de productos cárnicos contaminados y cultivada por los autores de la presente

invención y también se ha efectuado el correspondiente depósito de un cultivo de la misma ante la autoridad internacional de depósito anteriormente mencionada, que le ha asignado el número de orden CECT 4437. Por su parte, los autores de la presente invención le han asignado provisionalmente la referencia CTC BS1 de la colección de cultivos del mencionado Centre de Tecnologia de la Carn.

Se ha comprobado experimentalmente que inoculando con cultivos de la cepa CTC BS1 la superficie de productos cárnicos no defectuosos que contengan glucosa y una proporción de cloruro sódico inferior al 10% en peso se produce en los mismos, al cabo de cierto tiempo, la aparición de la mancha negra.

También se observa aparición de la mancha negra cuando se realizan ensayos "in vitro" utilizando papillas de carne a las que se añade glucosa, maltosa, jarabe de glucosa o maltodextrina y una proporción de cloruro sódico inferior al 10% en peso.

Con el fin de inhibir el crecimiento y propagación en los productos cárnicos de la cepa CTC BS1 se han ensayado numerosas cepas bacterianas del género *Lactobacillus* que, en general, se han mostrado poco efectivas para controlar la aparición y desarrollo de la mancha negra.

De manera sorprendente se ha encontrado que la cepa *Lactobacillus plantarum* CTC 305, anteriormente mencionada, inhibe con gran eficacia el crecimiento y desarrollo de la cepa CTC BS1 y, consecuentemente, su inoculación en los productos cárnicos previene y evita la aparición y propagación en los mismos de la mancha negra.

La cepa objeto de la invención se puede obtener mediante su cultivo por técnicas conocidas en cualquier medio apropiado, tal como por ejemplo el caldo para lactobacilos según DeMan, Rogosa y Sharpe, Bacto Lactobacillic MRS Broth comercializado por la empresa DIFCO. Una vez desarrollado el cultivo se puede proceder a un grado de dilución apropiado para su aplicación directa, o bien se pueden obtener a partir del mismo dispersiones acuosas concentradas estables, que admitan el almacenamiento y transporte, por medio de técnicas convencionales como por ejemplo la congelación o la liofilización, con el fin proceder a su aplicación directa o bien, si se desea, previa dilución de los mismos.

Como resulta obvio, la cepa objeto de la invención se puede presentar en forma de composiciones de materia que contengan otro tipo de productos químicos, naturales o no, o biológicos que resulten apropiados.

La mencionada cepa objeto de la invención se puede aplicar a los productos cárnicos crudos curados por cualquier método convencional, tal como añadida en la formulación, por inmersión, pulverización, espolvoreado, etc, antes del proceso de curado del embutido o durante una etapa intermedia del mismo.

Si se trata de embutidos, la aplicación se puede realizar en el momento de la trituración y mezcla de los componentes cárnicos. Por contra, en el caso de productos de una sola pieza, por ejemplo en jamones, la aplicación se realiza sobre la superficie de los mismos.

La cepa objeto de la invención es absolutamente inocua y aceptable para su empleo en el tratamiento de productos alimenticios y permite obtener excelentes resultados de conservación para todo tipo de productos cárnicos crudos curados sin necesidad de emplear otro tipo de conservantes químicos artificiales.

Para una mejor comprensión de la presente invención, sin que deban ser interpretadas con un sentido limitativo a la misma, a continuación se exponen los siguientes

Ejemplos

Ejemplo 1.

*Aislamiento de la cepa CTC BS1.*

Se homogenizan en un triturador apropiado 20 g de una pieza de embutido afectado de mancha negra junto con 180 ml de un diluyente consistente en una disolución acuosa de peptona al 0,1% y cloruro sódico al 0,85%. Después de realizar un banco de diluciones decimales con el mismo diluyente, se siembra en profundidad en placas de agar, utilizando como caldo de cultivo soja tríptica Bacto Tryptic Soy Broth, suministrado por la empresa DIFCO, incubándose durante tres días a 30°C.

Se observa la aparición de dos tipos de colonias: unas pequeñas amarillas y otras carentes de pigmentación. Las colonias sin pigmentación, que corresponden a la cepa CTC BS1, se colectan y se vuelven a cultivar en las mismas condiciones hasta obtener un cultivo suficientemente purificado de las mismas en soja tríptica.

Ejemplo 2.

*Cultivo de la cepa CTC 305.*

Se siembran en profundidad muestras de la cepa *Lactobacillus plantarum* CTC 305 en placas de agar con un caldo de cultivo para lactobacilos según DeMan, Rogosa y Sharpe, Bacto Lactobacillic MRS Broth, comercializado por la empresa DIFCO, y se incuban durante tres días a 30°C.

Ejemplo 3 a 10.

*Efecto inhibidor de la mancha negra.*

Unas muestras consistentes en masa de carne picada de cerdo, a las que se ha añadido un 2% en peso de glucosa y un 4% de cloruro sódico, se inoculan con mezclas de los cultivos preparados en los ejemplos 1 y 2, en las siguientes proporciones:

Ejemplo	CTC 305 log u.f.c.	CTC BS1 log u.f.c.
3	—	5,24
4	8,22	5,24
5	—	4,24
6	8,22	4,24
7	—	3,24
8	8,22	3,24
9	—	1,24
10	4,22	1,24

Las unidades log u.f.c. significan el logaritmo del número de unidades formadoras de colonia correspondiente a las respectivas proporciones añadidas de cada una de las cepas.

Los ejemplos 3, 5, 7 y 9, a los que no se les añade la cepa inhibidora CTC 305, sirven de control.

Los diferentes cultivos se incuban durante un período de cinco días, en condiciones aerobias, a 30°C y una humedad relativa del 95% al 100%.

Al cabo de 48 horas se observa que todos los cultivos en los que no se ha añadido la cepa inhibidora CTC 305, ejemplos 3, 5, 7 y 9, han desarrollado una coloración negra correspondiente al defecto de mancha negra.

En cambio, los cultivos correspondientes a los ejemplos 4, 6, 8 y 10, que contienen la cepa inhibidora, no desarrollan la coloración negra aunque se prolongue la incubación hasta 5 días.

*Información sobre el depósito de los microorganismos*

Los depósitos de microorganismos se han efectuado conforme a las provisiones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes, en

la autoridad internacional de depósito Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) de la Universidad de Valencia, Campus de Burjasot, 46100 Burjasot (Valencia), España.

5

Identificación del solicitante	Número CECT	Fecha del depósito
Lactobacillus plantarum CTC 305	CECT 4436	06/04/93
CTC BS1	CECT 4437	06/04/93

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Los cultivos depositados están a disposición del público sin restricciones, bajo las condiciones previstas en el Tratado de Budapest, si bien dicha disponibilidad no se puede interpretar como una licencia para practicar el objeto de la presente invención infringiendo los derechos del solicitante de la presente patente.

**REIVINDICACIONES**

1. La cepa bacteriana *Lactobacillus plantarum* CTC 305, obtenible de CECT 4436.

2. La cepa bacteriana de la reivindicación 1, **caracterizada** por presentarse en forma de suspensión acuosa, congelada o no.

3. La cepa bacteriana de la reivindicación 1, **caracterizada** por presentarse en forma liofilizada.

4. Composiciones de materia **caracterizadas**

por contener, además de la cepa bacteriana de la reivindicación 1, cualquier otro tipo de productos químicos, naturales ó no, o biológicos.

5. La utilización de la cepa bacteriana de la reivindicación 1 para prevenir y evitar la aparición y propagación del defecto de la mancha negra en los productos cárnicos crudos curados.

6. La utilización de la cepa bacteriana de la reivindicación 1, de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizada** por inocular con dicha cepa los productos cárnicos crudos curados.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.<sup>5</sup>: C12N 1/20, A23B 4/22, A23B 4/12 // (C12N 1/20, C12R 1:25)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US-A-3814817 (EVERSON et al.) * Columna 1, línea 36-columna 2, línea 48; reivs. 1 y 2 *	1-4,6
Y		5
X	DE-A-4035836 (LABORATORIUM WIESBY GMBH) * Pág. 2, líneas 43-48; pág. 3, líneas 17-50; pág. 4, líneas 1-7; reivindicaciones 1,2,3,12,15-20 *	1-4,6
Y	US-A-4728518 (GONZALEZ et al.) * Columna 1-columna 2, línea 47 *	5
Y	US-A-4886673 (HAMMES) * Columna 1-columna 2, línea 58 *	5
Y	WO-A-9309676 (MONFORT INC.) * Pág. 10, línea 17-pág. 11, línea 16; pág. 15, línea 19-pág. 16, línea 8; pág. 20, línea 22-pág.21, línea 17 *	1-6
Y	EP-A-484991 (JOHMA NEDERLAND B.V.) * Pág. 2, líneas 13-32; pág. 3, líneas 9-11; reivindicaciones 1 y 7 *	1-6
A	US-A-4842871 (HILL) * Columna 3, líneas 49-68; columna 5, líneas 16-60; reivindicaciones 1,4,11,13,14 *	1-4,6
A	EP-A-333056 (MICROLIFE TECHNICS, INC) * Pág. 2-pág.3, línea 31 *	

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

**Fecha de realización del informe**  
27.10.94

**Examinador**  
A. Polo Díez

**Página**  
1/2



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>: C12N 1/20, A23B 4/22, A23B 4/12 // (C12N 1/20, C12R 1:25)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	PATENT ABSTRACT OF JAPAN, Vol. 11, n° 357 (C-458)[2804] 20.11.87 & JP-A-62130679 (KARUPISU SHOKUJIN KOGYO K.K.) 12.06.87 * Resumen *	
A	PATENT ABSTRACT OF JAPAN, Vol. 11, n° 357 (C-458)[2804] 20.11.87 & JP-A-62130680 (KARUPISU SHOKUJIN KOGYO K.K.) 12.06.87 * Resumen *	

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

**Fecha de realización del informe**

27.10.94

**Examinador**

A. Polo Díez

**Página**

2/2