

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 819 126**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
A23K 20/00 (2006.01)
A23L 13/00 (2006.01)
C12R 1/25 (2006.01)
A23L 13/40 (2006.01)
A23K 10/18 (2006.01)
A23K 50/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.08.2016 PCT/JP2016/074747**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.03.2017 WO17038601**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2016 E 16841633 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020 EP 3345992**

54 Título: **Método para producir carne capaz de reducir el consumo de ácidos grasos saturados**

30 Prioridad:

31.08.2015 JP 2015170466

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

15.04.2021

73 Titular/es:

**BIOBALANCE CO., LTD. (100.0%)
Oji-biru 3rd Floor, 1-4-17 Ikeshita, Chikusa-ku
Nagoya-shi, Aichi 464-0067, JP**

72 Inventor/es:

NAITO, YOSHIO

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 819 126 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

Método para producir carne capaz de reducir el consumo de ácidos grasos saturados

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un campo para mejorar la calidad de la carne mediante alimentación con bacterias del ácido láctico. En especial, la presente invención se refiere a un método para proporcionar carne que contiene menos ácido graso saturado.

10

Antecedentes de la técnica

La grasa animal contiene de forma intrínseca más ácido graso saturado que la grasa vegetal. Por lo tanto, no ha primado el consumo de carne debido a que puede provocar obesidad o hiperlipidemia. Sin embargo, la carne es un ingrediente importante que contiene proteínas y aminoácidos de buena calidad y es un alimento esencial para los hábitos alimenticios.

15

El documento JP H08 298982 A se refiere a una preparación farmacéutica microbiana compleja para la reducción del mal olor de los excrementos del ganado y promoción del compostaje de los excrementos.

20

El documento KR 2012 0140118 A se refiere a una composición para aditivos alimentarios que comprenden *Artemisia princeps* fermentada por ácido láctico como principio activo, para promover el crecimiento de aves de corral.

25

El documento KR 2010 0078838 A se refiere a un aditivo para pienso que utiliza grano secado por destiladores producido por Jindo-Hongju, un método de fabricación del mismo y un método de cría de cerdos utilizando el mismo, para aportar de forma eficaz fuentes de aporte de nutrientes necesarias para animales domésticos sin degradación de la calidad.

30

El documento KR 2010 0078824 A se refiere a un aditivo para pienso que utiliza grano secado por destiladores de Jindo-Hongju, un método de fabricación del mismo y un método de cría de ganado bovino utilizando el mismo, para aportar de forma eficaz aporte de nutrientes sin degradación de la calidad aumentando al mismo tiempo la capacidad de uso de granos secados por destiladores.

35

El documento JP 2001 149023 A se refiere a un agente bioactivo, y pienso animal que lo comprende, para mejorar el apetito de ganado criado de forma densa, potenciar la tasa de digestión del forraje y promover la absorción digestiva de nutrientes.

40

El documento JP 2007 252346 A se refiere a pienso para ganado o pienso de criadero con una funcionalidad de aumento del ácido graso funcional contenido en grasa de ganado o peces y marisco de criadero y una funcionalidad de reducción del colesterol de la grasa.

El documento JP 2011 254789 A se refiere a un método para producir pienso fermentado orgánico capaz de mejorar la fermentación mediante levadura fermentativa suprimiendo al mismo tiempo la reproducción de diversos gérmenes.

45 Sumario de la invención

Por consiguiente, para proporcionar carne blanda que contiene una cantidad menor de ácido graso saturado, el presente inventor ha realizado estudios con bacterias del ácido láctico y, en consecuencia, ha descubierto que un animal de ganado alimentado con pienso que contiene *Lactobacillus plantarum* BB-PLT (cepa BB-PLT de bacterias del ácido láctico) (NITE BP-02097) produce carne que contiene menor cantidad de ácido graso saturado y mayor cantidad de ácido graso insaturado monovalente después cocinarse con calor.

50

La presente invención se basa en el hallazgo de *Lactobacillus plantarum* BB-PLT (cepa BB-PLT de bacteria del ácido láctico) (NITE BP-02097) y se refiere específicamente a las siguientes invenciones:

55

- (1) *Lactobacillus plantarum* BB-PLT (NITE BP-02097).
- (2) Pienso para ganado que comprende una bacteria del ácido láctico de (1).
- (3) Un método para criar un animal de ganadería para carne, que comprende alimentar al animal de ganadería con una bacteria del ácido láctico de (1).

60

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención se refiere a *Lactobacillus plantarum* BB-PLT (cepa BB-PLT de bacteria del ácido láctico) (NITE BP-02097) y pienso para ganado que la contiene. La *Lactobacillus plantarum* BB-PLT (cepa BB-PLT de bacteria del ácido láctico) (NITE BP-02097) es una bacteria del ácido láctico aislada del ensilado de la ciudad de Obihiro, Hokkaido, Japón, y se depositó con el n.º de depósito NITE BP-02097 en el depositario de microorganismos de patentes del Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación (NITE) (2-5-8, Kazusakamatari, Kisarazu, Chiba, Japón) el 10 de agosto de 2015.

65

El ganado o el animal de ganadería descritos en el presente documento significa normalmente un animal criado con el fin de aprovechar sus productos (leche, carne, huevos, pelo, piel, pelaje, trabajo, etc.). El animal de ganadería para carne descrito en el presente documento significa un animal criado con el fin de aprovechar su producto cárnico. Los ejemplos del animal de ganadería o el animal de ganadería para carne incluyen ganado bovino, caballos, búfalos acuáticos, ciervos, ovejas, cabras, alpacas, cerdos, ganado porcino, conejos, pollos, codornices, avestruces, pavos, gansos, patos, faisanes y gallinas de guinea.

La "carne comestible" descrita en el presente documento significa carne del animal de ganadería destinada a ser consumida por seres humanos y es preferentemente carne para comer cocinada. El "producto procesado de la carne comestible" es cualquier producto procesado de la carne del animal de ganadería destinada a ser consumida por seres humanos sin limitaciones particulares e incluye productos procesados que sirven normalmente como materiales de preparación procedentes de carne mediante producción, tales como jamón, salchicha, panceta, cecina, salami y ternera en conserva, así como también productos procesados preparados tales como hamburguesa, albóndiga, curri, salsa de carne y sopa.

Al ingerir la cepa BB-PLT de bacterias del ácido láctico descrita en el presente documento, el contenido de ácido graso saturado en la carne del ganado para carne disminuye al calentarse. Los ejemplos del ácido graso saturado pueden incluir ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico y ácido esteárico. Además, al ingerir la cepa BB-PLT de bacterias del ácido láctico descrita en el presente documento, el contenido de ácido graso insaturado monovalente en la carne del ganado para carne aumenta al calentarse. Los ejemplos del ácido graso insaturado monovalente pueden incluir ácido α -linolénico, ácido eicosapentaenoico, ácido docosahexaenoico, ácido linoleico, ácido γ -linolénico, ácido araquidónico, ácido palmitoleico, ácido oleico y ácido vaccénico.

Efectos ventajosos de la invención

Al alimentar un animal de ganadería con pienso que contiene la cepa BB-PLT de bacterias del ácido láctico de la presente invención, el ácido graso saturado contenido en la carne comestible disminuye y el ácido graso insaturado monovalente contenido en la carne comestible aumenta al cocinar con calor. Se sabe que los ácidos grasos saturados aumentan los niveles de colesterol, mientras que los ácidos grasos insaturados disminuyen los niveles de colesterol. Por lo tanto, la alimentación con la cepa BB-PLT de bacterias del ácido láctico descrita en el presente documento o el pienso que la contiene puede proporcionar carne más sana.

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La figura 1 es un gráfico del resultado del análisis de ácidos grasos saturados. Se alimentaron machos de engorde de raza bovina Limousin (12 animales por grupo) con 20 g/día/animal de una formulación de bacterias del ácido láctico cada día y su músculo dorsal largo torácico en la 7^a vértebra torácica se trató con calor a 95 °C. La ordenada muestra la cantidad de cambio (%) de ácidos grasos saturados después de calentar en comparación con antes del calentamiento. La barra negra (izquierda) muestra un grupo de control (sin administración de grupo de formulación de bacterias del ácido láctico). La cantidad de ácidos grasos saturados aumentó en 0,14 %. La barra gris (derecha) muestra un grupo con administración de formulación de bacterias del ácido láctico. La cantidad de ácidos grasos saturados disminuyó en 2,72 %.

[Figura 2] La figura 2 es un gráfico de los resultados del análisis de ácidos grasos insaturados monovalentes, que se realizó simultáneamente con la figura 1. La ordenada muestra la cantidad de cambio (%) de ácidos grasos insaturados monovalentes. La barra negra (izquierda) muestra el grupo de control (grupo sin administración de formulación de bacterias del ácido láctico). La cantidad de ácidos grasos insaturados monovalentes aumentó en 0,74 %. La barra gris (derecha) muestra un grupo con administración de formulación de bacterias del ácido láctico. La cantidad de ácidos grasos insaturados monovalentes aumentó en 3,32 %.

[Figura 3] La figura 3 es un gráfico de resultados del análisis de la cantidad de cambio de cada ácido graso en el experimento de la figura 1. Desde la parte superior hasta la parte inferior, se muestran los resultados para metil cis-11-eicosanoato (C20: 1n9), ácido vaccénico (C18: 1n7), ácido oleico (C18: 1n9), ácido palmitoleico (C16: 1n7), ácido esteárico (C18), ácido palmítico (C16), ácido pentadecílico (C15) y ácido mirístico (C14). La barra negra (superior) muestra el grupo con administración de formulación de bacterias del ácido láctico y la barra gris (inferior) muestra el grupo de control (grupo sin administración de formulación de bacterias del ácido láctico).

Descripción detallada

1. Cultivo de cepa BB-PLT de bacterias del ácido láctico

La bacteria se puede cultivar a una temperatura de cultivo de 15 a 40 °C (preferentemente 25 a 35 °C) y a un pH de cultivo de pH 3,5 a 9,0 (preferentemente pH 4,5 a 7,0) durante un tiempo de cultivo de 6 a 30 horas usando un medio adecuado para bacteria del ácido láctico. Como ejemplo específico, la bacteria se puede inocular en un medio líquido MRS y cultivarse a 25 a 35 °C durante 24 horas. Para cultivo secundario, la solución de cultivo puede pulverizarse además sobre salvado esterilizado y cultivarse a 25 a 35 °C durante 3 días. La cepa BB-PLT de bacterias del ácido láctico puede utilizarse para producir pienso para criar ganado para carne, en donde un ácido graso saturado contenido

en la carne del ganado criado disminuye por calentamiento y/o en donde un ácido graso insaturado monovalente contenido en la carne del ganado criado aumenta por calentamiento. Como alternativa, la cepa BB-PLT de bacterias del ácido láctico puede utilizarse para criar ganado para carne cuyo ácido graso saturado disminuye por calentamiento y/o cuyo ácido graso insaturado monovalente aumenta por calentamiento.

5

2. Alimentación de animales de ganadería con la cepa BB-PLT de bacterias del ácido láctico

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para criar un animal de ganadería, que comprende alimentar al animal de ganadería con la cepa BB-PLT de bacterias del ácido láctico (o pienso para ganado que contiene la cepa BB-PLT de bacterias del ácido láctico). En este método, se proporciona al animal de ganadería la cepa BB-PLT de bacterias del ácido láctico con pienso. La cepa BB-PLT de bacterias del ácido láctico puede proporcionarse de manera adecuada, por ejemplo, en una forma sólida (p. ej., comprimido, gránulo o cápsula), de gel o líquida según un método de alimentación. Preferentemente, la cepa BB-PLT de bacterias del ácido láctico se proporciona al mismo como una bacteria viable. La cantidad proporcionada puede determinarse dependiendo del peso corporal del animal de ganadería. Por ejemplo, para ganado bovino, pueden proporcionarse de 10 a 100 g (preferentemente 40 g) al día. El periodo de alimentación del animal de ganadería con el pienso de la presente invención no está particularmente limitado y puede cambiarse según el tipo de animal de ganadería, y preferentemente es el periodo de cría completo. Sin embargo, el animal de ganadería puede alimentarse con el pienso de la presente invención durante solo una parte (1 año, medio año, 3 meses, 1 mes, etc.) del periodo de cría. Excepto para la alimentación con el pienso de la presente invención, el animal de ganadería puede criarse de una manera convencional.

Puede obtenerse carne comestible de un animal de ganadería para carne alimentado con el pienso de la presente invención y un producto procesado de la misma de la misma manera que se ha usado en animales de ganadería para carne alimentados con pienso ordinario.

25

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos. Sin embargo, la presente invención no está limitada por los mismos.

(Ejemplo 1) *Lactobacillus plantarum* BB-PLT (cepa BB-PLT de bacterias del ácido láctico)

30

Lactobacillus plantarum BB-PLT (cepa BB-PLT de bacterias del ácido láctico) se aisló del ensilado de la ciudad de Obihiro, Hokkaido, Japón. La cepa BB-PLT de bacterias del ácido láctico se depositó con el n.º de depósito NITE BP-02097 (fecha de depósito: 10 de agosto de 2015) en el depositario de microorganismos de patentes del Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación (NITE) (NPMD) (2-5-8, Kazusakamatari, Kisarazu, Chiba, Japón).

35

Las propiedades micológicas del *Lactobacillus plantarum* BB-PLT (cepa BB-PLT de bacterias del ácido láctico) cultivado usando un caldo de cultivo MRS (fabricado por Oxoid SA) son como se describe a continuación. Con respecto a la utilización de azúcares, el cultivo se realizó utilizando un medio basal para pruebas de fermentación de hidratos de carbono (se añadió agua destilada a 10,0 g de triptona, 5,0 g de extractos de levadura y 0,06 g de púrpura de bromocresol para ajustar la cantidad total a 1000 ml, seguido de ajuste del pH a 6,8 y posterior esterilización a alta presión a 121 °C durante 15 minutos).

40

Morfología celular: bacilo

Formación de esporas: ninguna

45

Motilidad: ninguna

Tinción de Gram: +

Sensibilidad al oxígeno: anaerobio facultativo

Crecimiento a 15 °C: +

Crecimiento a 45 °C: -

50

Fermentación de ácido láctico: homo

Producción de gas a partir de glucosa: -

Producción de amoníaco a partir de arginina: -

Capacidad de hidrólisis de hipurato de sodio: -

Resistencia a cloruro de sodio al 4 %: -

55

Utilización de azúcares: arabinosa (-), xilosa (-), ramnosa (-), ribosa (+), glucosa (+), manosa (+), fructosa (+), galactosa (+), sacarosa (+), maltosa (+), celobiosa (+), lactosa (+), trehalosa (+), melibiosa (+), rafinosa (+), melecitosa (+), manitol (+), sorbitol (+), esculina (+), salicina (+), amigdalina (+), gluconato de sodio (+)

Ácido láctico producido: ácido DL-láctico

(Ejemplo 2) Preparación de probiótico de la cepa BB-PLT de bacterias del ácido láctico

60

La bacteria se inoculó en un medio líquido MRS y se cultivó principalmente a 25 a 35 °C durante 24 horas. La solución de cultivo se pulverizó sobre salvado esterilizado y se cultivó de manera secundaria a 25 a 35 °C durante 3 días para obtener un probiótico de bacterias del ácido láctico. El número de bacterias contenidas en el probiótico de bacterias del ácido láctico fue de $3,0 \times 10^9$ UFC/g.

65

(Ejemplo 3) Cambio en la composición de ácidos grasos del ganado bovino por alimentación con probiótico de bacterias del ácido láctico

(1) Alimentación de ganado bovino con probiótico de bacterias del ácido láctico y muestreo

5 Se utilizaron machos de engorde de raza bovina Limousin (12 animales por grupo). Se alimentó a un grupo de administración de bacterias del ácido láctico cada día con 20 g/día/animal de la formulación de bacterias del ácido láctico como una mezcla con pienso ordinario. Inmediatamente después del sacrificio, se recogió el músculo dorsal largo torácico en la 7^a vértebra torácica. La carne cruda recogida se envasó al vacío y se transportó refrigerada a 5 °C
10 o menos. Para análisis de composición de ácidos grasos, se retiraron partes innecesarias y el resultante se cortó tan fino como fuera posible perpendicularmente a la orientación de fibra muscular. Los cortes se crioconservaron a -30 °C hasta el análisis. El análisis de composición de ácidos grasos se realizó en un periodo de 10 días después del inicio de la crioconservación.

15 (2) Tratamiento térmico

Se cortaron aproximadamente 50 g de la muestra en un cubo para exponer la fibra muscular. El trozo cortado se situó en una bolsa de vinilo manteniendo su forma, que se situó en agua caliente a 95 °C hasta que la temperatura central alcanzó 75 °C y se sacó del agua caliente, seguido de refrigeración a temperatura ambiente.

20 (3) Análisis de composición de ácidos grasos

Se extrajeron ácidos grasos con solución de cloroformo:metanol (V:V = 2:1) y después se analizaron mediante cromatografía de gases (Agilent Technologies 6890N).

25 Los resultados se muestran en las figuras 1 a 3. Como resultado, un análisis de composición de ácidos grasos después de cocinar por calor carne cruda obtenida del ganado bovino de engorde con el pienso que contiene *Lactobacillus plantarum* BB-PLT ha revelado que el ácido graso saturado y el ácido graso insaturado monovalente aumentó en el grupo alimentado. Cada análisis de componentes de ácidos grasos mostró que las cantidades de ácido palmítico (C16) y ácido esteárico (C18), que son los ácidos grasos saturados, se redujeron, mientras que las cantidades de ácido palmitoleico (C16: 1n7), ácido oleico (C18: 1n9) y ácido vaccénico (C18: 1n7), que son ácidos grasos insaturados monovalentes, aumentaron. Según el cambio composicional anterior, también aumentó la proporción de ácido graso insaturado/ácido graso saturado.

35

REIVINDICACIONES

1. *Lactobacillus plantarum* BB-PLT (NITE BP-02097).

5 2. Pienso para ganado que comprende una bacteria del ácido láctico de la reivindicación 1.

3. Un método para criar un animal de ganadería para carne, que comprende alimentar al animal de ganadería con una bacteria del ácido láctico de la reivindicación 1.

10

FIG. 1

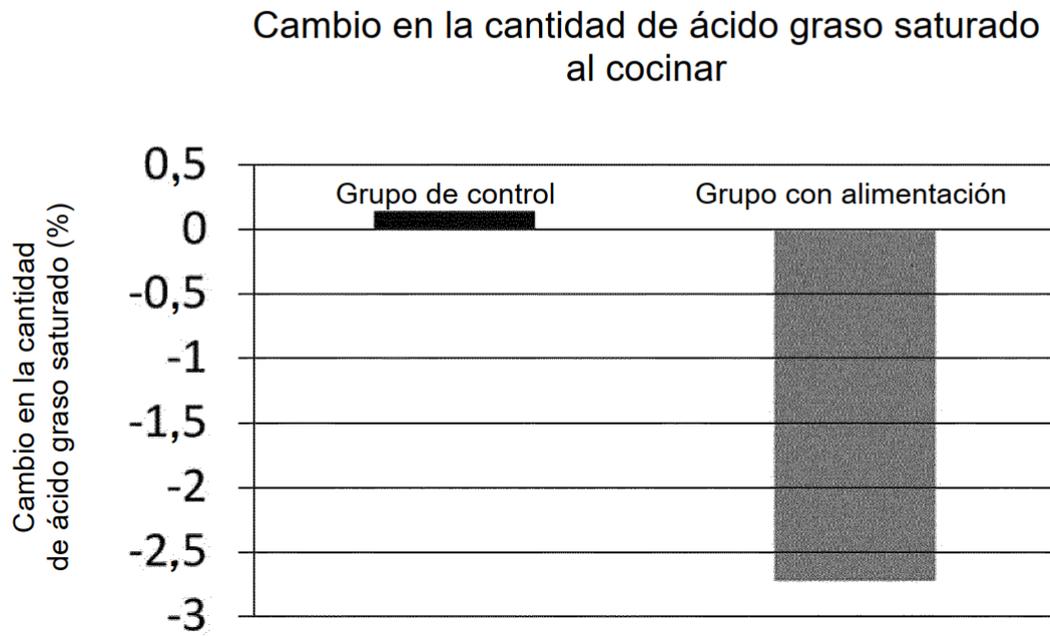


FIG. 2

Cambio en la cantidad de ácido graso insaturado monovalente al cocinar

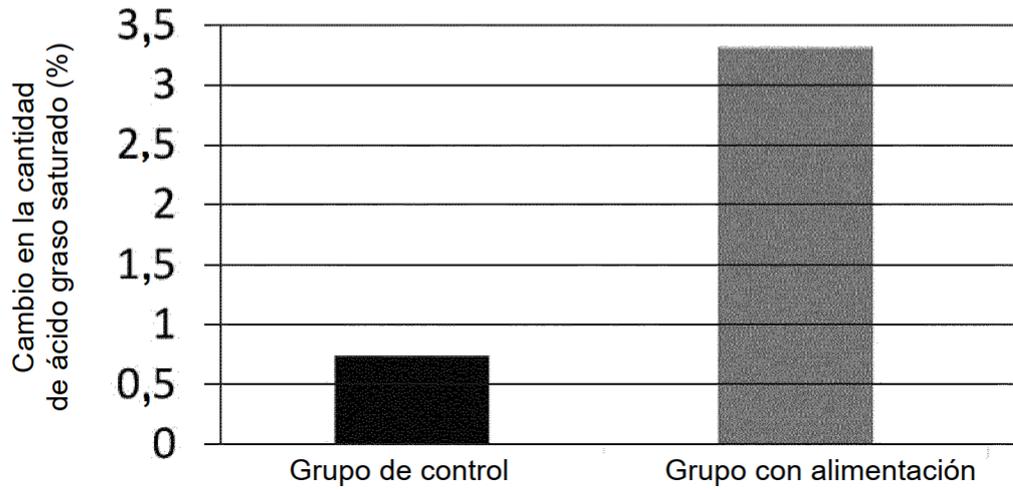


FIG. 3

