

⑲

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 182 674**

⑫ Número de solicitud: 200100127

⑬ Int. Cl.7: **A23B 7/10**  
A23L 1/218

⑫

## ADICIÓN A LA PATENTE DE INVENCION

B1

⑭ Fecha de presentación: **19.01.2001**⑮ Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2003**Fecha de la concesión: **19.05.2004**⑯ Fecha de anuncio de la concesión: **16.06.2004**⑰ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**16.06.2004**⑱ Número de solicitud de la patente principal:  
**009900740**⑲ Titular/es:  
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
c/ Serrano, 117  
28006 Madrid, ES**⑳ Inventor/es: **Jiménez Díaz, Rufino y  
Ruiz Barba, José Luis**㉑ Agente: **No consta**㉒ Título: **Mejoras introducidas en la patente principal nº. 9900740 por: "Procedimiento de obtención de productos vegetales mediante la adición de cultivos iniciadores mixtos de bacterias lácticas".**

㉓ Resumen:

Mejoras introducidas en la patente principal N° 9900740 por: "Procedimiento de obtención de productos vegetales mediante la adición de cultivos iniciadores mixtos de bacterias lácticas".

La presente invención se refiere a un procedimiento de fermentación de productos vegetales aplicable, entre otros, a aceitunas de todas las variedades posibles, pepinillos y zanahorias. El procedimiento incluye como paso adicional al proceso tradicional, la inoculación de la salmuera en la que se colocan los productos vegetales, con un cultivo mixto compuesto por dos microorganismos: *Lactobacillus plantarum* LP RJL2 (productor de plantaricina S con una alta eficiencia de excreción de la bacteriocina al medio) y *Lactobacillus plantarum* LP RJL3 (productor de polisacárido extracelular). Con el procedimiento de la invención se consigue una mayor homogeneidad en el sabor, aroma y calidad del producto fermentado y una importante reducción del deterioro, con lo cual se aumenta el rendimiento del proceso.

ES 2 182 674 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCION

Mejoras introducidas en la patente principal N° 9900740 por: "Procedimiento de obtención de productos vegetales mediante la adición de cultivos iniciadores mixtos de bacterias lácticas".

**Objeto de la invención**

El objeto de la presente invención es un perfeccionamiento del procedimiento para la obtención de productos vegetales mediante fermentación ácido láctica objeto de la solicitud de patente principal, ES-9900740, procedimiento que se puede aplicar a todas las variedades posibles de aceitunas, así como a pepinillos y zanahorias, entre otros vegetales con destino al consumo humano o animal.

El procedimiento se basa en el proceso tradicional, al que se le ha añadido una etapa más consistente en la inoculación de la salmuera en la que se colocan los productos vegetales con un cultivo mixto de los microorganismos *Lactobacillus plantarum* LP R.JL2 y *L. plantarum* LP R.JL3. Constituyen asimismo otros objetos de la presente invención los propios microorganismos utilizados en el procedimiento de fermentación, así como el uso de los microorganismos y los productos fermentados obtenidos mediante el procedimiento que se describe.

**Estado de la técnica**

La fermentación de aceitunas verdes estilo español o sevillano, así como la de pepinillos y otros muchos productos vegetales -tales como las zanahorias-, siguen un patrón de elaboración tradicional. En dichas fermentaciones, el producto de partida se manipula de manera tal que permita el desarrollo en las salmueras de una microbiota espontánea, no inoculada, cuya procedencia es diversa (los propios productos, los utensilios para la manipulación de éstos, los fermentadores donde se va a llevar a cabo el proceso, etc.). Entre los microorganismos que componen dicha microbiota conviene destacar la especie *Lactobacillus plantarum*, una bacteria láctica que se ha asociado históricamente a un desarrollo adecuado de las mencionadas fermentaciones (Cruess, W.V. 1930. Pickling green olives. Calif. Agric. Exp. Stn. Bull. 498; Anderson, R. 1984. Characteristics of the bacterial flora isolated during spontaneous lactic acid fermentation of carrots and red beets. Lebensm. Wiss. U. Technol. 17:282-286; Daeschel *et al.* 1987. Microbial ecology of fermenting plant materias. FEMS Microbiol. Rev. 46: 357-367). El desarrollo de esta especie bacteriana en las salmueras de fermentación se considera esencial para la conservación de dichos productos vegetales, ya que produce la cantidad de ácido láctico necesaria para que dicha conservación sea efectiva.

Aunque se encuentra en pequeña proporción entre la población bacteriana que se desarrolla en los momentos iniciales de la fermentación, *L. plantarum* se convierte, generalmente, en la especie dominante sobre otras bacterias lácticas y bacterias Gram negativas al poco tiempo de que los productos vegetales hayan sido colocados en la salmuera, coexistiendo en algunos casos (como en la fermentación de aceitunas y pepinillos) con una población de levaduras hasta el final del proceso

fermentativo (de la Borbolla y Alcalá *et al.* 1958. Estudio sobre el aderezo de aceitunas verdes. XV. La primera fase de la fermentación. Grasas y Aceites 9:118-124; Fleming, H.P. 1984. Developments in cucumber fermentation. J. Chem. Tech. Biotechnol. 34B: 241-252). Para conseguir un producto estable con el aroma y el sabor típicos de los productos fermentados (aceitunas, pepinillos, zanahorias, etc.), es esencial que todos esos microorganismos se desarrollen en la salmuera siguiendo la secuencia correcta, tal como se ha descrito anteriormente (Fernández Diez, M.J. 1983. Food and feed production with microorganisms. In G. Reed (ed.), Olives, pp. 379-397. Verlag Chemie, Basel; Garrido-Fernández *et al.* 1995. Food fermentations. In H.-J. Rehm and G. Reed (eds.), Olive Fermentations, pp. 593-627. VCH Publishers Inc., New York, NY, USA; Fleming *et al.* 1995. Food fermentations. In H.-J. Rehm and G. Reed (eds.), Vegetable Fermentations, pp. 629-661. VCH Publishers Inc., New York, NY, USA).

Todas las fermentaciones naturales de productos vegetales dependen de los microorganismos presentes en los productos de partida (la denominada flora o microbiota natural), en los utensilios con que se manipulan y en los recipientes (fermentadores) en que se almacena el producto para proceder a su fermentación. Esto hace que aparezcan con frecuencia variaciones indeseables en el sabor, el aroma y la calidad y que, en muchos casos, se deterioren cantidades importantes de producto. Por ello se hace necesario establecer mecanismos para controlar dichas fermentaciones, entre los que se considera potencialmente interesante la utilización de cultivos iniciadores de *L. plantarum*.

Se han descrito procedimientos para controlar la microbiota natural durante la fermentación de los productos vegetales, bien mediante inoculación directa con cultivos puros de *L. plantarum* (Fleming *et al.* 1985. The lactobacilli, pediococci, and leuconostocs: vegetable products. In S.E. Gilliland (ed.), Bacterial Starter Cultures for Foods, pp. 97-118. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla, USA), bien utilizando una salmuera que contuviera una población de lactobacilos activos (de la Borbolla y Alcalá *et al.* 1964. Empleo de cultivos puros de lactobacilos en la preparación de aceitunas verdes. Grasas y Aceites 15:6-11). Sin embargo los resultados obtenidos no siempre han sido satisfactorios, debido principalmente a que los cultivos utilizados no habían sido optimizados previamente para estas fermentaciones.

Una característica importante que debe tener un cultivo de *L. plantarum* que se vaya a utilizar como iniciador es su capacidad para dominar la microbiota indígena. Esta dominancia puede conseguirse bien mediante un rápido crecimiento de dicha bacteria láctica en las condiciones de fermentación, bien por la capacidad que tienen algunas cepas para producir ciertas sustancias antagonistas denominadas bacteriocinas (Marugg, J.D. 1991. Bacteriocins, their role in developing natural products. Food Biotechnol. 5:305-312; Daeschel, M.A. 1992. Bacteriocins of lactic acid bacteria. In B. Ray and M.A. Daeschel (eds.), Food Preservatives of Microbial Origin, pp. 323-345.

CRC Press, Boca Raton, Fla., USA). El hecho de que el cultivo iniciador que se utilice sea capaz de producir bacteriocina le proporciona "a priori" una ventaja selectiva no sólo frente a la microbiota natural que puede desarrollarse durante la fermentación y que compite por los sustratos fermentables con *L. plantarum*, sino frente a la microbiota que puede deteriorar el producto, durante o después de la fermentación.

*Lactobacillus plantarum* LPC010 es una bacteria láctica aislada de una fermentación de aceitunas verdes estilo español que produce dos bacteriocinas, llamadas plantaricinas S y T. Dichas bacteriocinas son activas frente a gran número de microorganismos competidores de dicha cepa bacteriana en las salmueras de fermentación (otras cepas de *L. plantarum*, y otras especies de lactobacilos, leuconostocs, pediococos y estreptococos), así como frente a bacterias que pueden causar deterioros del producto final en dichas fermentaciones, tal es el caso de propionibacterias y clostridios (Jiménez-Díaz *et al.* 1993. Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPC010 isolated from a green olive fermentation. Appl. Environ. Microbiol. 59:1416-1424). *L. plantarum* LPC010 se ha utilizado como cultivo iniciador de la fermentación de aceitunas verdes "estilo español" o "sevillano" a nivel de planta experimental (Ruiz-Barba *et al.* 1994. Use of *Lactobacillus plantarum* LPC010, a bacteriocin producer, as a starter culture in Spanish-style green olive fermentations. Appl. Environ. Microbiol. 60:2059-2064). Sin embargo, se ha comprobado que dicha cepa presenta ciertos problemas de retardo de crecimiento en las condiciones ambientales que se dan con frecuencia en las fermentaciones industriales de productos vegetales, tales como amplios rangos de temperatura de fermentación, condiciones extremas de pH y salinidad y escasez o ausencia de nutrientes específicos en el medio de cultivo.

Por otro lado, *L. plantarum* LP RJ1, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo con n° de registro 5102 (CECT 5102) es una cepa productora de plantaricina S. La utilización de dicho microorganismo como cultivo iniciador en las salmueras de fermentación de diferentes productos vegetales (aceitunas, pepinillos, alcaparrones y zanahorias, principalmente) constituye un paso esencial del denominado Procedimiento de fermentación de productos vegetales, objeto de la solicitud de patente principal española ES-9900740 presentada el 9 de Abril de 1 999 y de su correspondiente extensión internacional PCT/ES00/00125 depositada el 7 Abril de 2000. La aplicación de dicho microorganismo permite superar la mayoría de los problemas de falta de homogeneidad y de deterioro del producto final que suelen darse como consecuencia de aplicar el método tradicional en la elaboración de dichos productos vegetales fermentados. Sin embargo, si la carga microbiana inicial es muy elevada (bien provenga del producto de partida, de los utensilios de manipulación o de los contenedores del producto a fermentar), a pesar de producir plantaricina S, *Lactobacillus plantarum* LP RJ1 no es capaz de competir de forma eficaz contra esos microorganismos y, por tanto, su predominancia so-

bre los mismos en las salmueras de fermentación no se produce en el 100 % de los casos. Ello puede llegar a ocasionar, a veces, problemas tales como fermentaciones incompletas, deterioro parcial de las características organolépticas del producto final, etc. Con objeto de subsanar estos inconvenientes, se ha diseñado un nuevo procedimiento de fermentación que perfecciona el propuesto en dicha solicitud de patente principal y que se explica a continuación.

El objeto de la presente invención consiste en el desarrollo de un nuevo procedimiento de obtención de productos vegetales fermentados que, mediante la inoculación de las salmueras con un cultivo mixto de dos nuevos microorganismos (*L. plantarum* LP RJL2 y *L. plantarum* LP RJL3), elimina la posibilidad de cualquier tipo de deterioro y da lugar a un producto final homogéneo y organolépticamente muy aceptable para el consumidor. Ello es posible porque el desarrollo combinado de ambas cepas en las salmueras de fermentación provoca un efecto inhibitorio del desarrollo de cualquier otro microorganismo competidor de *L. plantarum*, incluso si la carga contaminante inicial debida a otras bacterias lácticas es muy alta. Esto supone una mejora sustancial del procedimiento descrito en la solicitud de patente principal citada anteriormente. Dicha mejora viene dada por una serie de características tecnológicas muy interesantes de estas cepas que suponen una ventaja frente a las de la cepa *L. plantarum* LP RJ1 descrita en la patente anteriormente citada. Entre otras, que *L. plantarum* LP RJL2 (productora de plantaricina S) es más eficiente que *L. plantarum* LP RJ1 en la producción de dicha bacteriocina, en tanto que *L. plantarum* LP RJL3 tiene una alta tasa de crecimiento en salmueras de fermentación (superior a la de *L. plantarum* LP RJ1) y produce, además, polisacárido extracelular.

#### Explicación de la invención

El procedimiento de fermentación de productos vegetales que se propone incluye las etapas de:

- colocación de los productos vegetales en una salmuera que contiene cloruro sódico en un rango comprendido entre el 1 y el 15 % (peso/volumen).
- mantenimiento de dichos productos vegetales en la salmuera durante un periodo de tiempo comprendido entre 4 y 210 días,
- retirada del producto fermentado de la salmuera.

Se diferencia del procedimiento tradicional porque entre las 2 y las 144 horas de la colocación de los productos vegetales en la salmuera se efectúa una inoculación de dicha salmuera con un cultivo mixto formado por los microorganismos *L. plantarum* LP RJL2 y *L. plantarum* LP RJL3, depositados en la Colección Española de Cultivos Tipo con n° de registro 5358 y 5359 (CECT 5358 y CECT 5359), respectivamente. Los microorganismos se inoculan suspendidos en un caldo de cultivo a una concentración comprendida entre  $10^2$  y  $10^{12}$  unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) cada uno. El caldo de cul-

tivo que se utilice puede ser medio MRS, salmuera de fermentación, leche descremada o solución salina. Alternativamente, los microorganismos pueden introducirse también liofilizados.

Según el producto que se vaya a fermentar, por ejemplo diversas variedades de aceitunas, pepinillos, alcaparrones, zanahorias etc., se ajustan los diversos parámetros del procedimiento: concentración del inóculo, momento en que se realiza la inoculación, tiempo de permanencia en la salmuera, ajuste de la acidez del medio, etc.

Así, cuando se trata de fermentar aceitunas, el procedimiento incluye las siguientes etapas:

- a) tratamiento de los frutos con hidróxido sódico a una concentración comprendida entre el 1 y el 10 % (peso/volumen) durante un periodo de tiempo comprendido entre 2 y 15 horas.
- b) lavado con agua de las aceitunas tratadas en la etapa anterior durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 28 horas.
- c) colocación de las aceitunas tratadas y lavadas en una salmuera de cloruro sódico a una concentración comprendida entre el 1 y el 15 % (peso/volumen).
- d) inoculación de la salmuera entre las 12 y las 96 horas después de haberse colocado las aceitunas con un cultivo mixto de *L. plantarum* LP RJL2 y *L. plantarum* LP RJL3 a una concentración comprendida entre  $10^4$  y  $10^8$  UFC/ml.
- e) mantenimiento de las aceitunas en dicha salmuera con inóculo durante un periodo de tiempo comprendido entre 30 y 210 días.

Puede incluirse una etapa de regulación de la acidez, antes de la etapa d), mediante la adición de ácido clorhídrico, ácido acético o  $\text{CO}_2$  hasta conseguir que el pH alcance un valor comprendido entre 4,5 y 6,5 unidades.

Para pepinillos y zanahorias, la inoculación del microorganismo se efectúa en las primeras 24 horas después de haberlos colocado en la salmuera, manteniéndose los pepinillos o las zanahorias en la salmuera durante un periodo de tiempo comprendido entre 4 y 90 días. Son asimismo objetos de la presente invención el microorganismo *Lactobacillus plantarum* LPRJL2 y el *Lactobacillus plantarum* LPRJL3, depositados en la Colección Española de Cultivos Tipo el 18/X/2000 con los números 5358 y 5359, respectivamente.

La utilización de los mencionados microorganismos para la fermentación de productos vegetales, como por ejemplo aceitunas, pepinillos o zanahorias constituyen asimismo objetos de la presente invención, así como los productos vegetales obtenidos mediante el procedimiento, en su caso aceitunas, pepinillos o zanahorias.

#### Breve descripción de las figuras

Figura 1: Representación del desarrollo microbiano en una salmuera de fermentación de aceitunas verdes “estilo español” o “sevillano” variedad Hojiblanca, inoculada con un cultivo iniciador mixto compuesto de *L. plantarum* LP RJL2 (productor de la bacteriocina plantaricina S) y *L. plantarum* LP

RJL3 (no productor de plantaricina S), a lo largo de 187 días de fermentación. Ensayo a nivel industrial (fermentador de 10.000 Kg).

Figura 2: Representación del desarrollo microbiano en una salmuera de fermentación de aceitunas verdes “estilo español” o “sevillano” variedad Hojiblanca, inoculada con un cultivo iniciador mixto compuesto de *L. plantarum* LP RJL2 (productor de la bacteriocina plantaricina S) y *L. plantarum* LP RJL3 (no productor de plantaricina S), a lo largo de 120 días de fermentación. Ensayo a nivel semiindustrial o planta piloto (fermentador de 300 Kg).

#### Descripción detallada de la invención

El procedimiento de fermentación de productos vegetales objeto de la presente invención se diferencia del proceso tradicional porque incluye el paso adicional de la inoculación de la salmuera con un cultivo mixto de los microorganismos *L. plantarum* LP RJL2 y *L. plantarum* LP RJL3. Por un lado, la alta tasa de crecimiento en condiciones naturales mostrada por *L. plantarum* LP RJL3 hace que esta cepa se desarrolle con rapidez en las salmueras de fermentación de vegetales, provocando una bajada rápida del pH de las mismas y propiciando así las condiciones ambientales para que se desarrolle de forma eficaz la cepa *L. plantarum* LP RJL2. Además, la cepa LP RJL3 produce, en condiciones naturales de fermentación, un polisacárido extracelular que contribuye de manera eficaz a potenciar las características organolépticas del producto final. Por el otro, la capacidad de la cepa *L. plantarum* LP RJL2 de producir una bacteriocina, denominada plantaricina S, cepa que va a ser utilizada también como cultivo iniciador (en cultivo mixto junto con *L. plantarum* LP RJL3) en la fermentación de diversos vegetales, le confiere una gran ventaja ecológica para imponerse a la flora bacteriana natural contaminante de estos productos y sobre aquella que pudiera contaminar el producto fermentado posteriormente y causar alteraciones que lo hicieran no apto para su consumo y/o comercialización. La potenciación de la capacidad de competir de la cepa LP RJL2 con el resto de microflora contaminante, debida principalmente al hecho de producir la bacteriocina plantaricina S, radica en el amplio espectro de actividad de la misma y a la eficiencia de su excreción al medio de desarrollo de la cepa productora, siendo esta última propiedad más acusada que en la cepa *L. plantarum* LP RJ1, objeto de la solicitud de patente principal. Esta bacteriocina, que es una sustancia de naturaleza protéica y que la cepa LP RJL2 produce de forma natural, ha demostrado ser capaz de inhibir el desarrollo de distintas cepas de bacterias naturalmente presentes en productos vegetales en procesos de fermentación natural, incluyendo además aquellas que han sido descritas como alteradoras de la fermentación normal y/o del producto final, y también algunas bacterias patógenas para el hombre.

Dicha potenciación de la capacidad de la cepa LP RJL2 de competir con la flora microbiana contaminante natural redundará en una mayor rapidez a la hora de completar la fermentación de los vege-

tales en las condiciones descritas, con una mayor homogeneidad de los productos finales obtenidos. Asimismo, la acción inhibitoria de la bacteriocina producida por la cepa LP RJL2 a lo largo de la fermentación sobre posibles bacterias alteradoras, hace que el producto se conserve con mayores garantías y a más largo plazo. Al ser las bacteriocinas sustancias totalmente naturales e inocuas para otros organismos vivos que no sean aquellas bacterias a las que inhibe, su presencia en el producto final no puede calificarse como aditivo o conservante, puesto que forma parte del metabolismo natural de un microorganismo vivo usado tradicionalmente en la fermentación de productos vegetales.

Se exponen a continuación dos ejemplos del procedimiento de fermentación objeto de la presente invención aplicado a aceitunas:

#### *Fermentación a escala industrial*

Se tomaron 10.000 Kg de aceitunas verdes (*Olea europaea* L.) variedad Hojiblanca y se trataron con una solución de NaOH al 2,2% (peso/volumen) en agua durante 8 horas en un fermentador de fibra de vidrio. A este proceso se le denomina "cocido". La temperatura ambiente varió entre 17,7 y 21,3°C durante dicho proceso, mientras que la temperatura en el interior del fermentador para el mismo periodo de tiempo estuvo comprendida entre 20,2 y 22,6°C. A continuación se tiró la solución de NaOH y se lavaron las aceitunas con agua corriente (denominado primer lavado). Una vez lavados, los frutos se dejaron en agua en el fermentador durante 3 horas (denominado segundo lavado). La temperatura en el interior del fermentador osciló entre los 19,7 y los 2,3°C. Al cabo de las 3 horas de estar las aceitunas en agua, ésta se retiró y entonces los frutos se cubrieron con 6.000 litros de salmuera de cloruro sódico al 7,3% (peso/volumen). A los tres días de estar colocadas las aceitunas en salmuera, se procedió a inocular éstas con un cultivo mixto de las cepas *L. plantarum* LP RJL2 y *L. plantarum* LP RJL3 en fase estacionaria de crecimiento, crecidas en medio de cultivo MRS con 4% de NaCl (peso/volumen), a una concentración final de aproximadamente  $10^6$  UFC/ml cada una de ellas. Durante aproximadamente 200 días se siguió el desarrollo microbiológico en el fermentador tanto de las cepas inoculadas como las de otros microorganismos que pudieran desarrollarse en las salmueras. Los resultados se presentan en la Figura 1.

Como se puede observar en dicha figura, los microorganismos *L. plantarum* LP RJL2 (curva 2) y *L. plantarum* LP RJL3 (curva 1), una vez inoculados en las salmueras de fermentación a una concentración de  $10^6$  UFC/ml, comienzan a desarrollarse hasta alcanzar un nivel máximo de  $10^8$  UFC/ml (en el caso de *L. plantarum* LP RJL2) o más de  $10^8$  UFC/ml (como es el caso de *L. plantarum* LP RJL3) a los 40 días de fermentación. Posteriormente, ambas poblaciones de lactobacilos van descendiendo paulatinamente y casi en paralelo hasta el final del proceso fermentativo, donde *L. plantarum* LP RJL2 se sitúa en  $10^4$  UFC/ml (curva 2) y *L. plantarum* LP RJL3 en  $10^6$  UFC/ml. Es importante reseñar la au-

sencia de tiempo de adaptación de *L. plantarum* LP RJL2 a las salmueras de fermentación. Aunque el cultivo procede de un medio de laboratorio, la cepa LP RJL2 no presenta fase de latencia (o retardo del crecimiento) lo que le confiere una considerable ventaja ecológica frente a otros microorganismos para una colonización adecuada del medio. Por otro lado, aunque la cepa LP RJL3 presenta una corta fase de latencia al ser inoculada en las salmueras, su mayor velocidad de crecimiento hace que alcance muy rápidamente una alta densidad celular, lo que favorece sin duda el desarrollo de la cepa LP RJL2, al bajar el pH de las salmueras. La curva 3 representa el desarrollo de las poblaciones de levaduras (levaduras totales) en la misma salmuera de fermentación donde se inoculó el cultivo mixto de las cepas *L. plantarum* LP RJL2 y *L. plantarum* LP RJL3. Estas levaduras son microorganismos que aparecen espontáneamente en todo el proceso de fermentación de aceitunas verdes estilo "español" o "sevillano", ya que forman parte de la microbiota contaminante de los frutos, utensilios y fermentadores. Supuestamente son responsables de algunas de las características organolépticas propias de este tipo de elaboración. Estas poblaciones alcanzan los niveles normales y no son inhibidos en su desarrollo por ninguna de las dos cepas de lactobacilos inoculadas. Finalmente, llama la atención la ausencia de desarrollo de otras bacterias diferentes de las inoculadas en todo el proceso fermentativo, debido fundamentalmente a la actividad metabólica de las cepas *L. plantarum* LP RJL2 y *L. plantarum* LP RJL3 en las salmueras de fermentación, pues compiten de forma efectiva por los sustratos fermentables bien sea mediante una alta velocidad de crecimiento (caso de la cepa LP RJL3), bien sea por la producción de plantaricina S (caso de la cepa LP RJL2). En resumen, lo que muestra esta figura es la capacidad de las cepas que constituyen el cultivo iniciador mixto para imponerse a la flora microbiana espontánea en las salmueras de fermentación de aceitunas verdes aderezadas al estilo "español" o "sevillano" y de completar satisfactoriamente el proceso.

#### *Fermentación a escala semiindustrial (planta piloto).*

Se tomaron 300 Kg de aceitunas verdes (*Olea europaea* L.) variedad Hojiblanca y se trataron con una solución de NaOH al 2,1% (peso/volumen) en agua durante 7 horas y 30 minutos en un fermentador de fibra de vidrio. Durante el cocido, la temperatura en el interior del fermentador estuvo comprendida entre 21,3 y 23,5°C. Al cabo de ese tiempo, la solución de NaOH se tiró y las aceitunas se sometieron a continuación a un primer lavado con agua corriente, efectuándose un segundo lavado con agua en el fermentador durante 3 horas. Después de ese tiempo, se retiró el agua y los frutos se cubrieron con unos 200 litros de salmuera de cloruro sódico al 6,6% (peso/volumen). Inmediatamente después de colocar las aceitunas en salmuera, se procedió a inocularlas con un cultivo mixto de las cepas *L. plantarum* LP RJL2 y *L. plantarum* LP RJL3 en fase estacionada de crecimiento, crecidas en medio de cultivo MRS con 4% de NaCl (peso/volumen), a una concentración final de aproximadamente  $10^7$  UFC/ml cada una

de ellas. Se siguió el desarrollo microbiológico en el fermentador tanto de las cepas inoculadas como las de otros microorganismos que pudieran desarrollarse en las salmueras durante unos 120 días. Los resultados se presentan en la Figura 2.

A diferencia del caso anterior, la viabilidad de ambas cepas descendió en los primeros días entre 2 y 3 unidades logarítmicas (curva 1, *L. plantarum* LP R JL3; curva 2, *L. plantarum* LP R JL2) aunque casi inmediatamente después alcanzaron

niveles superiores a  $10^8$  UFC/ml y se mantuvieron en niveles altos hasta el final del proceso fermentativo. De la misma forma que en el caso anterior, se pudo detectar la presencia de poblaciones de levaduras (curva 3), cuyos niveles se mantuvieron dentro de los márgenes adecuados a lo largo de la fermentación. De nuevo, no se detectaron otras poblaciones bacterianas en todo el proceso, lo que demuestra la eficacia de ambas cepas para colonizar las salmueras de fermentación.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de fermentación de productos vegetales que incluye las siguientes etapas:

- a) colocación de dichos productos vegetales en una salmuera que contiene cloruro sódico en un rango comprendido entre el 1 y el 15 % (peso/volumen).
- b) inoculación de la salmuera entre las 2 y las 144 horas desde la colocación de los productos vegetales en la misma.
- c) mantenimiento de dichos productos vegetales en la salmuera durante un periodo de tiempo comprendido entre 4 y 210 días.
- d) retirada del producto fermentado de la salmuera,

**caracterizado** porque la inoculación de la salmuera se efectúa con un cultivo mixto formado por los microorganismos *L. plantarum* LP RJL2 y *L. plantarum* LP RJL3, depositados en la Colección Española de Cultivos Tipo con n° de registro 5358 y 5359 (CECT 5358 y CECT 5359), respectivamente.

2. Procedimiento de fermentación de productos vegetales según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el inóculo de los microorganismos se hace a una concentración comprendida entre  $10^2$  y  $10^{12}$  UFC/ml cada uno, suspendidos en un caldo de cultivo.

3. Procedimiento de fermentación de productos vegetales según la reivindicación 2 **caracterizado** porque la concentración de los inóculos está comprendida entre  $10^3$  y  $10^8$  UFC/ml y el caldo de cultivo es medio MRS, salmuera de fermentación, leche descremada o una solución salina.

4. Procedimiento de fermentación de productos vegetales según la reivindicación 2, **caracterizado** porque la concentración de los inóculos está comprendida entre  $10^6$  y  $10^8$  UFC/ml y los microorganismos se introducen liofilizados.

5. Procedimiento de fermentación de productos vegetales según las reivindicaciones 1-4, **caracterizado** porque cuando el producto vegetal que se fermenta son aceitunas dicho procedimiento incluye las etapas siguientes:

- a) tratamiento con hidróxido sódico a una concentración comprendida entre el 1 y el 10 % (peso/volumen) durante un periodo de tiempo comprendido entre 2 y 15 horas.
- b) lavado de las aceitunas tratadas en la etapa anterior con agua durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 28 horas.
- c) colocación de las aceitunas tratadas y lavadas en una salmuera de cloruro sódico a una concentración comprendida entre el 1 y el 15 % (peso/volumen).
- d) inoculación de la salmuera entre las 12 y las 96 horas después de haberse colocado las aceitunas con un cultivo mixto de las cepas *L. plantarum* LP RJL2 y *L. plantarum* LP RJL3 a una concentración comprendida entre  $10^6$  y  $10^8$  UFC/ml.

e) mantenimiento de las aceitunas en dicha salmuera con el inóculo mixto durante un periodo de tiempo comprendido entre 30 y 210 días.

6. Procedimiento de fermentación de productos vegetales según la reivindicación 5, **caracterizado** porque como paso previo a la inoculación de la salmuera se efectúa una regulación de la acidez mediante la adición de ácido clorhídrico, ácido acético o  $\text{CO}_2$  hasta conseguir un pH comprendido entre 4,5 y 6,5 unidades.

7. Procedimiento de fermentación de productos vegetales según las reivindicaciones 1-4, **caracterizado** porque cuando el producto que se fermenta son pepinillos la inoculación de los microorganismos se realiza en las primeras 24 horas después su colocación en la salmuera, manteniéndose los pepinillos en la salmuera durante un periodo de tiempo comprendido entre 4 y 90 días.

8. Procedimiento de fermentación de productos vegetales según las reivindicaciones 1-4, **caracterizado** porque cuando el producto que se fermenta son zanahorias la inoculación de los microorganismos se realiza en las primeras 24 horas después su colocación en la salmuera, manteniéndose las zanahorias en la salmuera durante un periodo de tiempo comprendido entre 4 y 90 días.

9. *Lactobacillus plantarum* LP RJL2 depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo el 18/X/2000 con el n° 5358.

10. *Lactobacillus plantarum* LP RJL3, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo el 18/X/2000 con el n° 5359.

11. Utilización de los microorganismos *Lactobacillus plantarum* LP RJL2 y *Lactobacillus plantarum* LP RJL3, depositados en la Colección Española de Cultivos Tipo el 18/X/2000 con los n° 5358 y 5359, respectivamente, para la fermentación de productos vegetales mediante un procedimiento según las reivindicaciones 1-4.

12. Utilización de los microorganismos *Lactobacillus plantarum* LP RJL2 y *Lactobacillus plantarum* LP RJL3, depositados en la Colección Española de Cultivos Tipo el 18/X/2000 con los n° 5358 y 5359, respectivamente, para la fermentación de aceitunas mediante un procedimiento según las reivindicaciones 5 y 6.

13. Utilización de los microorganismos *Lactobacillus plantarum* LP RJL2 y *Lactobacillus plantarum* LP RJL3, depositados en la Colección Española de Cultivos Tipo el 18/X/2000 con los n° 5358 y 5359, respectivamente, para la fermentación de pepinillos mediante un procedimiento según la reivindicación 7.

14. Utilización de los microorganismos *Lactobacillus plantarum* LP RJL2 y *Lactobacillus plantarum* LP RJL3, depositados en la Colección Española de Cultivos Tipo el 18/X/2000 con los n° 5358 y 5359, respectivamente, para la fermentación de zanahorias mediante un procedimiento según la reivindicación 8.

15. Productos vegetales fermentados obtenidos mediante un procedimiento según las reivindicaciones 1-4.

16. Aceitunas fermentadas obtenidas median-

te un procedimiento según las reivindicaciones 5 y 6.

17. Pepinillos fermentados obtenidos median-

te un procedimiento según la reivindicación 7.

18. Zanahorias fermentadas obtenidas mediante un procedimiento según la reivindicación 8.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65





OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 182 674

② Nº de solicitud: 200100127

③ Fecha de presentación de la solicitud: 19.01.2001

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: A23B 7/10, A23L 1/218

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	RUIZ-BARBA J.L. et al. "Use of Lactobacillus plantarum LP010, a Bacteriocin Producer, as a starter culture in Spanish-Style Green Olive Fermentation". Appl. Environ Microbiol., Junio 1994, Vol. 60, nº 6, páginas 2059-2064.	

#### 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 nº:

Fecha de realización del informe

30.01.2003

Examinador

J. López Nieto

Página

1/1