(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 671 743**

(51) Int. CI.:

C12N 1/20 (2006.01)
A23C 9/123 (2006.01)
A23L 33/135 (2006.01)
A23L 2/00 (2006.01)
A23L 2/02 (2006.01)
A23L 2/38 (2006.01)
C12R 1/25 (2006.01)
A23L 2/52 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2011 PCT/JP2011/056065**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2011 WO11115114**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2011 E 11756299 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018 EP 2548948**

(54) Título: **Nuevo lactobacilo clasificado como Lactobacillus plantarum y uso del mismo**

(30) Prioridad:

19.03.2010 JP 2010064911

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.06.2018

(73) Titular/es:

KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA (100.0%)
1-19 Higashi Shimbashi 1-chome
Minato-ku, Tokyo 105-8660, JP

(72) Inventor/es:

IINO, TOHRU;
MASUOKA, NORIE;
ISHIKAWA, FUMIYASU;
YOSHIMURA, KOICHI y
HAYASHIDA, EIJI

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

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

Nuevo lactobacilo clasificado como *Lactobacillus plantarum* y uso del mismo

Campo técnico

La presente invención se refiere a una nueva bacteria de ácido láctico que se clasifica como *Lactobacillus plantarum* adecuada para fermentación de diversos zumos de fruta, así como a un alimento y bebida que la contiene.

Antecedentes en la técnica

Se considera que, con el paso de los años, en los seres humanos, se hacen dominantes organismos nocivos como *Escherichia coli* y que una serie de sustancias nocivas producidas por dichos organismos nocivos tienen una influencia adversa contra el organismo humano. Las bacterias de ácido láctico, ampliamente separadas del mundo natural, generan ácido láctico en los intestinos humanos para mantener el pH intestinal ácido y suprimir el crecimiento y la multiplicación de bacterias putrefactivas o bacterias patógenas, como *Escherichia coli,* en el intestino y tienen un efecto de mejorar el entorno del intestino. Además del efecto de mejorar el entorno del intestino, las bacterias de ácido láctico tienen uno o más efectos fisiológicos, como, por ejemplo, un efecto de mejora contra el estreñimiento, protección frente a infecciones, potenciación de la competencia inmunológica, un efecto anti-alérgico, un efecto de protección contra el cáncer y similares. En esta situación, para promover la salud proporcionando estas bacterias útiles al intestino, llamadas probióticos, se ha puesto en práctica el consumo de bebidas con bacterias de ácido láctico, leche fermentada o preparaciones farmacéuticas que contienen el organismo vivo de estas bacterias.

Las bacterias de ácido láctico utilizadas en estas bebidas de ácido láctico, leche fermentada o preparaciones de organismos vivos son adecuadas para fermentar materiales lácteos, entre los que se incluyen derivados de yogur o de queso, que incluyen concretamente la cepa de *Lactobacillus casei, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophiles, Lactococcus lactis,* y similares.

Por otra parte, dado que el gusto de los consumidores se ha diversificado en los últimos años, ha sido deseable desarrollar una cepa que se pueda utilizar en probióticos en los que se puedan utilizar otras materias primas distintas a los lácteos, p.ej., zumos de verduras o zumos de frutas, como sustratos fermentadores.

Sin embargo, hasta ahora, cuando se han utilizado las cepas citadas para la producción de bebidas con bacterias de ácido láctico para producir zumos de verduras o zumos de frutas como sustratos fermentadores, ha sido imposible conseguir un alto recuento de células viables para obtener el efecto como probióticos.

Hasta la fecha, se sabe que las bacterias de ácido láctico que pertenecen a *Lactobacillus plantarum* tienen una potente capacidad fermentadora para zumos de verduras o zumos de frutas. Por ejemplo, se sabe que *Lactobacillus plantarum* ATCC 14431 alcanza un recuento de células viables de hasta 10^7 UFC/ml o más cuando se utiliza un zumo de zanahoria concentrado (componente sólido soluble: 36 % en masa; en adelante abreviado como % simplemente), 6 veces diluido como sustrato fermentador (Documento de patente 1).

Por otra parte, se conoce *Lactobacillus plantarum 299v* (DSM 9843) como bacteria de ácido láctico adecuada para la fermentación de zumos de frutas en los que se ha reducido el contenido en ácido orgánico. Aunque dicho *Lactobacillus plantarum 299v* (DSM 9843) presenta inconvenientes como puedan ser la fuerte post-acidificación, un notable defecto funcional, y la generación de gas dióxido de carbono, se conoce también una tecnología para eliminar dichos inconvenientes reduciendo el contenido en ácido orgánico en el zumo de fruta. (Documento de patente 2).

Sin embargo, estas cepas que pertenecen a *Lactobacillus plantarum,* no siempre permiten conseguir una concentración con un alto recuento de células viables asequible en diversos zumos de verdura o zumos de fruta, en particular, no se han podido aplicar a zumos de fruta que incluyen uvas, que se consideran por lo general inapropiados como sustrato fermentador para la bacteria de ácido láctico.

Documentos de la técnica anterior

Documento de patente

Documento de patente 1: JP-A 2001/252012
Documento de patente 2: PCT JP-A 2008/541774

La patente europea EP1508282 divulga una bebida que contiene zumos de fruta fermentados lácticos.

La patente internacional WO2009/099139 divulga un agente para mejorar la función hepática que se produce por proliferación de una célula viva de cepa *Lactobacillus plantarum* SN13T en presencia de una materia prima de fermentación.

La patente europea EP 398957 divulga un método de inducción de descarboxilación de ácido málico en mosto o zumo de fruta (también conocida como fermentación maloláctica); una cepa maloláctica adecuada en dicho método es *Lactobacillus plantarum* DSM 4361.

Sumario de la invención

Problema que se resuelve con la invención

Por lo tanto, un propósito de la presente invención es proporcionar una nueva bacteria de ácido láctico que pertenece *Lactobacillus plantarum* que tiene una excelente capacidad de fermentación, consiguiendo recuentos de células viables altos, incluso aunque se utilicen diversos zumos de verduras o zumos de fruta como sustratos fermentadores, así como proporcionar alimentos y bebidas que la contienen.

Medios para resolver los problemas

Los autores de la presente invención han trabajado exhaustivamente para resolver estos problemas y han observado que una bacteria de ácido láctico que pertenece a *Lactobacillus plantarum,* que es *Lactobacillus plantarum YIT 0132 (FERM BP-11349)* o *Lactobacillus plantarum YIT 0148 (FERM BP-11350),* cuyo recuento de células viables asequible alcanzado fue 10^8 UFC/ml o más en cualquiera de los casos, cuando se utilizó un zumo de frutas determinado al 100 % como sustrato fermentador, proporcionó un recuento de células viables asequible superior incluso en los casos en los que se utilizaron como sustratos fermentadores varios zumos de verduras o zumos de frutas. Por tanto, han completado la presente invención.

La presente invención proporciona una bacteria de ácido láctico que pertenece a *Lactobacillus plantarum,* que es *Lactobacillus plantarum YIT 0132 (FERM BP-11349)* o *Lactobacillus plantarum YIT 0148 (FERM BP-11350)*, cuyo recuento de células viables asequible es 10^8 UFC/ml o más en ambos casos, cuando se utiliza zumo de uva o de naranja al 100 % como sustrato fermentador.

Por otra parte, la invención proporciona alimentos o bebidas que comprenden la bacteria de ácido láctico mencionada.

Asimismo, la invención proporciona un producto de fermentación que se produce por inoculación y fermentación de la bacteria de ácido láctico mencionada en materiales alimentarios, que son leche animal, leche de soja, zumo de fruta o zumo de verduras, cuyo producto de fermentación contiene la bacteria de ácido láctico en un estado viable.

Asimismo, la invención proporciona alimentos o bebidas que comprenden el producto de fermentación mencionado.

Por otra parte, la invención proporciona un proceso para producir un producto de fermentación que comprende la inoculación y fermentación de la bacteria de ácido láctico mencionada en los materiales alimentarios.

Efecto de la invención

Dado que la bacteria de ácido láctico que pertenece a *Lactobacillus plantarum* de la invención es capaz de alcanzar recuentos de células viables de 10^8 UFC/ml cuando se utilizan diversos zumos de verduras y zumos de fruta, en particular, zumos de fruta, como sustratos fermentadores, se puede utilizar para la producción de alimentos y bebidas como puedan ser las bebidas utilizadas en los probióticos basadas en diversos sustratos fermentadores.

En particular, las dos cepas depositadas entre bacterias de ácido láctico que pertenecen a *Lactobacillus plantarum* de la invención son capaces de proporcionar alimentos y bebidas, como por ejemplo bebidas de calidad estable, ya que no tienen plásmido.

Modo de realización de la invención

En la presente descripción, zumo de fruta al 100 % significa aquellos que satisfacen el criterio de zumo al 100 % de acuerdo con la norma de calidad de bebidas de zumo de fruta de la ley japonesa de normas para agricultura, ley JAS. Para producir el zumo de frutas, es posible utilizar cualquier proceso, es decir, un proceso para producir un “zumo de frutas directo”, que se produce por tratamiento térmico del zumo exprimido de frutas seguido de refrigeración y almacenamiento, o un proceso para producir un “zumo concentrado y de reconstitución” que se produce por evaporación de agua y concentración con calentamiento seguido de refrigeración y almacenamiento. En el “zumo concentrado y de reconstitución”, el índice de concentración del zumo es preferentemente de 2 a 10 veces más concentrado, más preferentemente de 3 a 8 veces más concentrado. Siempre y cuando se satisfaga el criterio de zumo al 100 % según la norma de calidad de bebidas de zumos de frutas en la ley JAS, es posible añadir azúcares, aromas, y/o anti-oxidantes.

En la presente descripción, recuento de células viables asequible significa el recuento de células viables que se puede conseguir incubando una cepa de siembra sobre un medio (caldo de cultivo MRS de lactobacilos (preparado

por Difco Co.) esterilizado a 121 ºC durante 15 minutos en un autoclave) como incubación preliminar hasta el estado estacionario, más específicamente, llevando a cabo la incubación preliminar a 30 – 37 °C durante 16 - 24 horas, inoculando después 0,4 % en volumen de la solución incubada previamente sobre un sustrato fermentador, como por ejemplo zumo al 100 %, seguido de incubación 37 °C durante 48 horas. En conexión con esto, se determina el recuento viable en una placa agar MRS. Asimismo, la unidad UFC/ml indica el recuento de células viable asequible y representa la capacidad de formación de colonia cuando se siembra 1 ml en una placa de cultivo.

En la presente descripción, la no existencia de plásmido significa que cuando se prepara un ADN plásmido de manera convencional a partir de 1 ml de medio de cultivo de lactobacilo fresco, no se detecta ADN plásmido con irradiación UV tras la electroforesis en gel de agarosa al 0,7 % y con el posterior teñido del gel con bromuro de etidio.

La bacteria de ácido láctico que pertenece *Lactobacillus plantarum* de la invención (en adelante denominada “bacteria de ácido láctico de la invención") incluye *Lactobacillus plantarum* YIT 0132 (FERM BP-11349) y *Lactobacillus plantarum* YIT 0148 (FERM BP-11350), cuyos recuentos de células viables asequibles son 10^8 UFC/ml o más, preferentemente 10^8 - 10^{10} UFC/ml en ambos casos cuando se utilizan zumos al 100 % de uva o naranja como sustratos fermentadores.

Se separan las bacterias de ácido láctico de verduras fermentadas, té fermentado o heces humanas de manera convencional por separación en placas de agar MRS y reconocimiento del *Lactobacillus plantarum* aislado basado en los recuentos de células viables asequibles en los sustratos fermentadores mencionados.

Se obtuvieron del *Lactobacillus plantarum* separado, tal como se ha mencionado, las siguientes cepas:

- Cepa *Lactobacillus plantarum* YIT 10015
- Cepa *Lactobacillus plantarum* YIT 0069
- Cepa *Lactobacillus plantarum* YIT 0148
- Cepa *Lactobacillus plantarum* YIT 0132

Entre estas 4 cepas, YIT 0069, YIT 0148 y YIT 0132 presentaron valores de tasa de proliferación de 25 o más que se obtuvieron dividiendo los correspondientes recuentos de células viables asequibles (UFC/ml) por 10^8 seguido de la adición, cuando se utilizaron como sustratos fermentadores zumos al 100 % de uva, pomelo, naranja, piña o manzana. El valor de la tasa de proliferación es un índice para juzgar si *Lactobacillus plantarum* es adecuado o no para la fermentación de zumos de fruta y es preferentemente 25 o más, más preferentemente 30 - 50; dado que YIT 0148 y YIT 0132 tienen los valores la tasa de proliferación de 30 - 41, son particularmente preferentes para el uso en la fermentación de zumos de fruta.

En conexión con esto, YIT 0132 y YIT 0148 no tienen plásmido. En general, algunos plásmidos tienen a veces resistencia a los antibióticos, que se transfiere a otros microorganismos, lo que lleva a la aparición de bacterias patógenas que tienen resistencia a los antibióticos. Por otra parte, hasta la fecha no se ha aclarado aún cómo el gen en el plásmido, cuya función está sin aclarar, puede influir en otro u otros microorganismos y, por tanto, es deseable que la cepa no tenga plásmido con miras a mantener la seguridad de la cepa. A veces, se suprime el plásmido durante el subcultivo o cultivo, con el resultado de inestabilidad en forma de microorganismos. Dado que YIT 0132 y YIT 0148 no tienen plásmido, es posible asegurar la estabilidad y calidad del producto.

Las cepas YIT 0132 y YIT 0148 se denominan respectivamente *Lactobacillus plantarum* YIT 0132 y *Lactobacillus plantarum* YIT 0148, depositadas internacionalmente como FERM BP-11349 y FERM BP-11350 a partir del 24 de febrero, 2010, en el Depositario del Organismo de Patente Internacional, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología industrial avanzada, Agencia administrativa independiente (domicilio: Código de distrito 305-8566: Higashi 1-chome 1-banchi 1, chu-o no.6, Tsukuba City, ibaragi Pref.). Estas cepas tienen las siguientes propiedades bacteriológicas.

<Propiedades bacteriológicas de *Lactobacilos:* YIT 0132 y YIT 0148 incubados en caldo de cultivo MRS de lactobacilos a 37 °C durante 24 horas>

(Propiedades diversas)

[Tabla 1]

	YIT 0132	YIT 0148
	Baciliforme	Baciliforme
Morfología de célula		
Tinción gram	+	+
Actividad catalasa	–	
Movilidad	-	-

	YIT 0132	YIT 0148
	Baciliforme	Baciliforme
Esporas	-	-
Crecimiento a 15 °C	+	+
Crecimiento a 45 °C	-	-
Crecimiento anaeróbico	+	+
Crecimiento aeróbico	+	+
Generación de gas	-	-

(Propiedades de fermentador de azúcares; medido por API 50CH)

[Tabla 2]

	YIT 0132	YIT 0148
Control	-	-
Glicerol	-	-
Eritritol	-	-
D-Arabinosa	-	-
L-Arabinosa	+	+
D-Ribosa	+	+
D-Xilosa	-	-
L-Xilosa	-	-
D-Adonitol	-	-
Metil-β D-xilopiranosida	-	-
D-Galactosa	+	+
D-Glucosa	+	+
D-Fructosa	+	+
D-Manosa	+	+
L-Sorbosa	-	-
L-Ramnosa	w	w
Dulcitol	-	-
Inositol	-	-
D-Manitol	+	+
D-Sorbitol	+	+
Metil-α D-manopiranosida	+	+
Metil-α D-glucopiranosida	-	-
N-Acetil glucosamina	+	+
Amigdalina	+	+
Arbutina	+	+
Esculina citrato férrico	+	+
Salicina	+	+
D-Celobiosa	+	+
D-Maltosa	+	+
D-Lactosa	+	+
D-Melibiosa	+	+
D-Sucrosa	+	+
D-Treharosa	+	+

[Tabla 2-2]

	YIT 0132	YIT 0148
inulina	-	-
D-Melezitosa	+	+
D-Rafinosa	+	+
Almidón	-	-
Glucogeno	-	-
Xilitol	-	-
Gentiobiosa	+	+
D-Turanosa	+	+
D-Lixosa	-	-
D-Tagatose	-	-
D-Fucose	-	-
L-Fucosa	-	-
D-Arabitol	-	-
L-Arabitol	-	-
Gluconato	w	w

	YIT 0132	YIT 0148
2 ceto-gluconato	-	-
5 ceto-gluconato	-	-
+: positivo; w: débil; -: negativo		

(ADNr 16S)

Utilizando la secuencia de bases ADNr 16S, se identificó la cepa del siguiente modo. Concretamente, se incubó el organismo en medio MRS a 37 ºC durante 24 horas, se lavó por centrifugado la solución incubada y se extrajo el ADN del aglomerado del organismo; se amplificó la longitud completa de ADNr 16S por PCR utilizando ADN extraído como matriz y se determinó la secuencia de bases del producto ampliado por método Dye Terminator; se investigó la secuencia de bases resultante en una base de datos para identificar la especie del organismo. Las secuencias de base de ADNr 16S de YIT 0132 y YIT 0148 (SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2) tuvieron respectivamente un 99,9 % y 99,8 % de homología con la de l*actobacillus plantarum* (No. de acceso D79210) y tuvieron respectivamente además un 99 % o más de homología superior con la de *Lactobacillus paraplantarum* (No. de acceso AJ306297) y *Lactobacillus pentosus* (No. de acceso D79211). Estas 3 especies están íntimamente emparentados y, por tanto, no es posible discriminar entre ellas utilizando la secuencia de ADNr 16S. Por consiguiente, se utilizó para la discriminación un método de PCR en el que se utilizó un cebador específico de especie dirigido a la secuencia de genes recA (Appl. Environ. Microbiol., 67, 3450-3454 (2001)) con las cepas patrón de estas tres especies como referencia. Como resultado, se confirmó que YIT 0132 y YIT 0148 eran *Lactobacillus plantarum.*

En conexión con esto, además de las cepas de ácido láctico mencionadas como bacterias de ácido láctico de la invención, también es posible utilizar cualquier variante de estas cepas para ejercer la misma capacidad de fermentación para los zumos de fruta.

Las bacterias de ácido láctico de la invención mencionadas se derivan de alimentos y se ha confirmado su seguridad. Por tanto, se puede utilizar en diversas aplicaciones de la misma forma en la que se ha utilizado hasta ahora la bacteria de ácido láctico en probióticos y es de esperar que su consumo presente un efecto fisiológico, como por ejemplo un efecto contra la diarrea.

No existe ninguna limitación estricta en la cantidad de la bacteria de ácido láctico de la invención para consumo humano o animal, y la dosis preferente es 10^5 UFC - 10^{13} UFC por día como recuento de células viable, en particular 10^8 UFC - 10^{12} UFC. La bacteria de ácido láctico de la invención se consume preferentemente de forma continua, aunque se puede tomar a determinados intervalos, como por ejemplo, cada mes, cada semana, cada día o se puede consumir durante un breve período de tiempo.

Para conseguir el efecto fisiológico de la bacteria de ácido láctico de la invención, por ejemplo, puede utilizarse como una preparación farmacéutica convencional, que se prepara mezclándola con un vehículo sólido o líquido inocuo farmacéuticamente aceptable. Dicha preparación farmacéutica incluye por ejemplo una preparación sólida, como comprimidos, granulados, polvos, cápsulas y similares, una preparación líquida como soluciones, suspensiones, emulsiones y similares y preparaciones liofilizadas. Dichas preparaciones se pueden formular según el modo farmacéuticamente convencional. Entre los vehículos farmacéuticamente inocuos se incluyen por ejemplo glucosa, lactosa, sacarosa, almidón, manitol, dextrina, glicérido de ácido graso, polietilen glicol, almidón de hidroxietilo, etilen glicol, éster de ácido graso de polioxietilen sorbitano, aminoácido, gelatina, albúmina, agua, solución salina fisiológica y similares. Además, si se requiere, se puede añadir de forma apropiada un aditivo convencional, como por ejemplo un estabilizante, un agente de humectación, un agente aglutinante, un agente para ajustar la tonicidad, un diluyente y similares.

La bacteria de ácido láctico de la invención no solamente se puede formular como las preparaciones farmacéuticas mencionadas, sino que es posible añadirla también a un alimento sólido o líquido y una bebida. Cuando se añade a un alimento y bebida, se puede añadir en solitario o junto con otros ingredientes nutritivos diversos. En la práctica, cuando se añade la bacteria de ácido láctico de la invención al alimento y la bebida, es posible utilizar preferentemente un aditivo que se utilice como alimento y bebida, y se formula según el modo convencional en una forma comestible, es decir, una forma granulada, una forma de grano, comprimidos, cápsulas, pasta y similares. Las clases de alimentos y bebidas son por ejemplo, productos cárnicos procesados como jamón, salchichas, etc., productos marinos procesados, como por ejemplo pasta de pescado hervido, torta de pasta de pescado embutida, etc. un alimento como pan, torta, mantequilla, leche en polvo y similares, así como agua, bebidas como por ejemplo zumos de fruta, leche, refrescos y bebidas de té. En conexión con esto, el alimento y bebida incluyen forraje para ganado.

Por otra parte, el alimento y bebida adecuados para su uso para la bacteria de ácido láctico de la invención incluyen leche fermentada, leche de soja fermentada, zumo de fruta fermentado, zumo de verduras fermentado y similares, que se obtienen inoculando la bacteria de ácido láctico en varios materiales de alimento, como por ejemplo leche animal, leche de soja, zumo de fruta, zumo de verduras y similares, seguido de fermentación. Se prefiere sobre todo, en particular, una bebida que contiene zumo de frutas fermentado. Dicho tipo de alimento y bebida es preferente ya que contiene la bacteria de ácido láctico en estado viable.

El alimento y bebida que contiene el producto fermentado mencionado, como por ejemplo leche fermentada, leche de soja fermentada, zumo de fruta fermentada y zumo de verdura fermentado, puede producirse según el modo convencional. Concretamente, al producir una bebida de zumo de fruta fermentado con una bacteria de ácido láctico de la invención, se inocula primero una bacteria de ácido láctico de la invención en solitario o combinada con otro microorganismo en un zumo de fruta que está esterilizado en condiciones adecuadas para el zumo de que se utilice, seguido de incubación; se homogeneiza el producto para dar una base de zumo fermentado. A continuación, se mezcla la base de zumo fermentado con una bebida que contiene zumo de fruta al 100 %, jarabe u otro zumo sin fermentar al que se añade después un aroma, entre otros, para producir un producto final.

Los zumos de fruta utilizados como materias primas para las bebidas de zumo de fruta fermentada mencionadas incluyen, sin limitarse a ellas, zumos de uva, pomelo, naranja, piña, manzana y similares, son preferentes en particular zumos de fruta de naranja y manzana.

Pueden producirse también bebidas de zumo de verduras fermentadas del mismo modo que las bebidas de zumo de fruta fermentadas mencionadas. Los zumos de verduras utilizados como materias primas para dichas bebidas de zumo de verduras fermentadas incluyen, sin limitarse a ellos, zumos de zanahoria, p.ej., zanahoria, Murasaki ninjin (zanahoria); boniato, p.ej., ayamurasaki, J-Red; kale; y tomate; son preferentes en particular zumos de verduras de zanahoria, Ayamurasaki y J-Red.

Las bebidas de zumo de fruta y las bebidas de zumo de verduras fermentadas pueden combinarse con un ingrediente opcional, como por ejemplo, un agente edulcorante como jarabe, agente emulsionante, espesante (estabilizador), diversas vitaminas y similares. El jarabe incluye azúcares, p.ej., glucosa, sacarosa, fructosa, solución de fructosa-glucosa, solución de glucosa-fructosa, palatinosa, trehalosa, lactosa, xilosa, maltosa, miel, jarabe; alcoholes de azúcar, p.ej., sorbitol, xilitol, eritritol, lactitol, palatinita, jarabe de almidón glutinoso reducido; jarabe de almidón glutinoso de malta reducido; y agentes edulcorantes con alto contenido en azúcar, por ejemplo, aspartamo, taumatina, sucralosa, acesulfama K, estevia y similares. Por otra parte, se pueden añadir vitaminas, p.ej., vitamina A, vitamina B, vitamina C, vitamina E; se pueden combinar con minerales, p.ej., calcio, magnesio, zinc, hierro, manganeso, un agente de sabor., p.ej., ácido cítrico, ácido láctico, ácido acético, ácido málico, ácido tartárico, ácido glucónico, grasa láctea, p.ej., nata, mantequilla, nata agria, aroma, p.ej., de tipo yogur, de tipo baya, de tipo naranja, de tipo membrillo chino, de tipo perilla, de tipo cítrico, de tipo manzana, de tipo menta, de tipo uva, de tipo albaricoque, de tipo pera, de crema pastelera, melocotón, melón, plátano, tropical, de tipo hierba, té negro, café; extracto de hierba, extracto de azúcar morena y similares,.

Para producir una bebida de zumo de fruta o verduras fermentado, se puede utilizar un microorganismo o microorganismos distintos a la bacteria de ácido láctico de la invención al mismo tiempo. Entre dichos microorganismos se incluyen por ejemplo *Bifidobacterium b*acterium como *Bifidobacterium breve, Bifidobacterium longum, Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium animalis, Bifidobacterium suis, Bifidobacterium infantis, Bifidobacterium adolescentis, Bifidobacterium catenulatum, Bifidobacterium pseudocatenulatum, Bifidobacterium lactis, Bifidobacterium globosum*, etc.; *Lactobacillus* bacterium como *Lactobacillus casei, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus buchneri, Lactobacillus gallinarum, Lactobacillus amylovorus, Lactobacillus brevis, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus kefir, Lactobacillus paracasei, Lactobacillus crispatus, Lactobacillus zeae, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus salivalius, Lactobacillus gasseri, Lactobacillus fermentum, lactobacillus reuteri, Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus, Lactobacillus delbrueckii subsp. Delbrueckii, lactobacillus johnsonii, Lactobacillus pentosus, Lactobacillus paraplantarum,* etc.; *Streptococcus* bacterium como *Streptococcus thermophiles,* etc.; *Lactococcus* bacterium como *Lactococcus lactis subsp. Lactis, Lactococcus lactis subsp. Cremoris.,* etc.; *Enterococcus* bacterium como *Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium,* etc.; *Bacillus* bacterium como *Bacillus subtilis;* levaduras que pertenecen a *Saccharomyses o Torulaspora o* Candida como *Saccharomyses cerevisiae, Torulaspora delbrueckii, Candida kefyr,* etc.

Ejemplos

A continuación, se explicará la presente invención con mayor detalle mediante los siguientes ejemplos pero no se pretende que limiten el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Prueba de fermentación para zumo de fruta con varias cepas de bacterias de ácido láctico (1)

Para encontrar una cepa que tuviera una capacidad fermentadora superior para zumo de fruta, se seleccionaron las 43 cepas de lactobacilos que se muestran en la Tabla 3 para realizar un ensayo, habiéndose aislado dichas cepas principalmente de árboles frutales.

(2) Siembra de organismos e incubación

Se esterilizó caldo de cultivo MRS de lactobacilos (Difco Co.) en un autoclave a 121 ºC durante 16 minutos, sobre el que se inocularon las cepas a continuación. Dado que había que incubar las especies de *Sporolactobacillus* en

condiciones anaeróbicas, se cargó el recipiente con una atmosfera de N_2 y se cerró herméticamente con un tampón de caucho de butilo. Dado que otras especies son aerobias, se cerró el recipiente con un tapón de aluminio y se incubó a 30 ºC durante 16 horas hasta que se alcanzó un estado estacionario.

(3) Propiedades de proliferación con zumo de frutas

Se distribuyeron asépticamente en tubos de ensayo zumos reducidos concentrados comerciales al 100 % (zumo de uva (Dole Ltd.) y zumo de naranja (Yakult Honsha), respectivamente, en los que se inoculó un volumen de 0,4 % de solución de células y se incubó a 37 ºC durante 48 horas.

(4) Medición de recuentos de células viables

Se diluyó apropiadamente la solución incubada con un diluyente esterilizado (solución de extracto de levadura al 0,1 %) y se aplicó a una placa agar MRS con un sistema de siembra en espiral y se midió el recuento de células viables. Se investigaron las propiedades de proliferación de las 43 cepas analizadas en los zumos de fruta. En la Tabla 3 se muestran los resultados.

(5) Investigación de propiedades de proliferación de zumos de fruta

La mayoría de los organismos no presentaron proliferación en zumo de uva, sino que únicamente las 2 cepas de *Lactobacillus plantarum* crecieron bien, donde los recuentos de células viables aumentaron a 1 x 10^8 UFC/ml. En el caso del zumo de naranja, creció la mayoría de los organismos, salvo unas pocas cepas y el recuento de células viable alcanzó 1 x 10^7 UFC/ml o más. No se observó crecimiento en ninguna de las cepas de s*porolactobacillus* incubadas anaeróbicamente tanto en zumo de uva como en zumo de naranja. Se puede deducir de estos resultados, que cuando se utilizaron los zumos de uva y de naranja como sustratos fermentadores, la única bacteria de ácido láctico que presentó los recuentos de células viables asequibles de hasta 1 x 10^8 UFC/ml fue *Lactobacillus plantarum.*

[Tabla 3-1]

				Zumo de uva	Zumo de naranja
	Especie	Cepa	Método de cultivo	Recuento de células viables (UFC/ml)	Recuento de células viables (UFC/ml)
1	*Lactococcus lactis*	YIT 10176	Aeróbico	-	3,86 x 10^7
2	*Lactococcus lactis*	YIT 10177	Aeróbico	-	3,86 x 10^7
3	*Lactococcus lactis*	YIT 10178	Aeróbico	-	6,71 x 10^7
4	*Lactococcus lactis*	YIT 10179	Aeróbico	6,10 x 10^7	6,10 x 10^7
5	*Lactococcus lactis*	YIT 10180	Aeróbico	7,93 x 10^7	7,93 x 10^7
6	*Lactococcus lactis*	YIT 10183	Aeróbico	-	4,67 x 10^7
7	*Lactobacillus brevis*	YIT 10184	Aeróbico	-	-
8	*Lactococcus lactis*	YIT 10185	Aeróbico	-	9,15 x 10^7
9	*Lactococcus lactis*	YIT 10186	Aeróbico	-	2,64 x 10^7
10	*Leuconostoc fallax*	YIT 10187	Aeróbico	-	4,10 x 10^6
11	*Lactococcus lactis*	YIT 10188	Aeróbico	3,86 x 10^7	3,86 x 10^7
12	w*eissella paramesenteroides*	YIT 10189	Aeróbico	-	-
13	*Lactobacillus plantarum*	YIT 0132	Aeróbico	1,57 x 10^8	7,71 x 10^8
14	*Lactobacillus plantarum*	YIT 0148	Aeróbico	1,42 x 10^8	16,06 x 10^8
15	l*euconostoc mesenteroides*	YIT 10192	Aeróbico	-	3,76 x 10^8
16	l*euconostoc mesenteroides*	YIT 10193	Aeróbico	-	3,85 x 10^8
17	*Lactobacillus casei*	YIT 10194	Aeróbico	1,02 x 10^7	1,46 x 10^8
18	*Lactobacillus casei*	YIT 10195	Aeróbico	2,03 x 10^7	1,25 x 10^8
19	l*euconostoc mesenteroides*	YIT 10196	Aeróbico	2,24 x 10^7	-
20	*Lactobacillus animalis*	YIT 10197	Aeróbico	-	-
21	l*euconostoc mesenteroides*	YIT 10198	Aeróbico	-	-

[Tabla 3-2]

22	*Lactococcus lactis*	YIT 10199	Aeróbico	-	4,47 x 10^7
23	*Lactococcus lactis*	YIT 10200	Aeróbico	-	5,18 x 10^7
24	*Lactococcus lactis*	YIT 10201	Aeróbico	-	5,08 x 10^7

25	*Lactococcus lactis*	YIT 10202	Aeróbico	4,06 x 10^6	-
26	*Lactococcus lactis*	YIT 10203	Aeróbico	-	1,52 x 10^8
27	*Lactococcus lactis*	YIT 10204	Aeróbico	-	-
28	*Lactococcus lactis*	YIT 10205	Aeróbico	4,06 x 10^6	3,86 x 10^7
29	Lactococcus *lactis*	YIT 10206	Aeróbico	-	-
30	*Sporolactobacillus kofuensis*	YIT 10214	Aeróbico	6,09 x 10^6	8,94 x 10^7
31	*Lactococcus lactis*	YIT 10219	Aeróbico	-	1,63 x 10^7
32	*Lactococcus lactis*	YIT 10220	Aeróbico	-	7,93 x 10^7
33	*Lactococcus lactis*	YIT 10221	Aeróbico	-	5,69 x 10^7
34	*Sporolactobacillus inulinus*	YIT 10207	Anaeróbico	-	-
35	*Sporolactobacillus nakayamae*	YIT 10208	Anaeróbico	-	-
36	*Sporolactobacillus nakayamae*	YIT 10210	Anaeróbico	-	-
37	*Sporolactobacillus nakayamae*	YIT 10211	Anaeróbico	-	-
38	*Sporolactobacillus nakayamae*	YIT 10212	Anaeróbico	-	-
39	*Sporolactobacillus kofuensis*	YIT 10215	Anaeróbico	-	-
40	*Sporolactobacillus kofuensis*	YIT 10216	Anaeróbico	-	-
41	*Sporolactobacillus kofuensis*	YIT 10217	Anaeróbico	-	-
42	*Sporolactobacillus kofuensis*	YIT 10218	Anaeróbico	-	-
43	*Sporolactobacillus inulinus*	YIT 10222	Anaeróbico	-	-
*El símbolo (-) indica que los recuentos de células viables está por debajo del límite de detección (2 x 10^6 UFC/ml).					

Ejemplo 2

Prueba de fermentación para zumo de fruta con cepa *Lactobacillus plantarum* (1)

Se tomaron como diana 12 cepas de *Lactobacillus plantarum.* Estas cepas derivaron de: cepa YIT 0220 de ATCC 14431, y cepa 50097 de leche fermentada disponible en el mercado, cepa YIT 0102 de cepa normal (ATCC 14917) y cepa 99005, cepa 299v aislada de un producto lácteo. Los demás se aislaron de alimentos fermentados, té fermentado y heces humanas.

(2) Siembra de organismos e incubación

Se distribuyó caldo de cultivo MRS de lactobacilos (Difco Co.) en tubos de ensayo pequeños y se esterilizaron en un autoclave a 121 ºC durante 15 minutos, sobre los que se inocularon los organismos. Se taparon los tubos de ensayos con tapones de aluminio y se incubaron a 37 ºC durante 16 horas hasta que alcanzaron un estado estacionario.

(3) Propiedades de proliferación con zumo de frutas

Se distribuyeron asépticamente zumos reducidos concentrados disponibles en el mercado al 100 % (zumo de uva (Dole Ltd.), zumo de pomelo, (Yakuit Honsha), zumo de naranja (Yakult Honsa), zumo de piña (Yakult Honsa) y zumo de manzana (Yakult Honsa) respectivamente en tubos de ensayo, en los que se inoculó un volumen de 0,4 % de solución del organismo y se incubó a 37 º C durante 48 horas.

(4) Medición del recuento de células viables.

Se diluyó apropiadamente la solución de cultivo con diluyente esterilizado (solución de extracto de levadura al 0,1 %) y se aplicó sobre una placa de agar MRS con un sistema en espiral y se hizo el recuento de células viables. En la Tabla 4 se muestran los resultados. Se calcularon los valores de las tasa de proliferación en los zumos de fruta dividiendo los correspondientes recuentos de células viables asequibles (UFC/ml) por 10^8 seguido de adición, cuando se utilizaron como sustratos fermentadores zumos al 100 % de uva, pomelo, naranja, piña y manzana. En la Tabla 4 se muestran los resultados.

(5) Investigación de propiedades de proliferación en zumos de fruta

Cuando se utilizaron los zumos de uva y piña al 100 % como sustratos fermentadores, las siguientes 4 cepas

presentaron recuentos de células viables asequibles de 10^8 UFC/ml o más en ambos casos: YIT 10015, YIT 0069, YIT 0148 y YIT 0132. Como resultado, las 3 cepas, YIT 0069 (tasa de proliferación: 27), YIT 0148 (tasa de proliferación: 30) y YIT 0132 (tasa de proliferación: 41), presentaron tasas de proliferación notablemente más altas que la cepa patrón YIT 0102 de *Lactobacillus plantarum* (tasa de proliferación: 14), las cepas YIT 0220 (tasa de proliferación: 10) y Y99005 (tasa de proliferación: 18) cuya capacidad de fermentación con zumos de verduras y de frutas es conocida.

[Tabla 4]

	Uva	Zumo de uva	Naranja	Piña	Manzana	Tasa prolif.
YIT 0012	2,03 x 10^6	<2,03 x 10^6	<2,03 310^6	<2,03310^6	<2,03310^6	<1
YIT 10023	2,03 x 10^6	4,07 x 10^6	6,10 x 10^6	6,50 x 10^7	7,11 310^7	1
YIT 0032	2,44 x 10^7	1,02 x 10^7	3,62 x 10^8	4,47 x 10^7	2,03 x 10^7	5
YIT 0220	8,13 x 10^6	8,13 x 10^6	2,49 x 10^8	3,43 x 10^8	3,69 x 10^8	10
y 50097	1,42 x 10^7	2,44 x 10^7	3,56 x 10^8	5,92 x 10^8	2,45 x 10^8	12
YIT 10015	1,09 x 10^8	3,25 x 10^7	4,35 x 10^8	3,54 x 10^8	3,31 x 10^8	13
YIT 0102	2,03 x 10^7	9,30 x 10^7	4,04 x 10^8	5,58 x 10^8	2,82 x 10^8	14
y 99005	8,89 x 10^7	1,80 x 10^8	4,28 x 10^8	7,51 x 10^8	3,56 x 10^8	18
YIT 10021	9,35 x 10^7	3,25 x 10^7	4,92 x 10^8	8,57 x 10^8	4,11 x 10^8	19
YIT 0069	2,02 x 10^8	8,33 x 10^7	8,55 x 10^8	1,07 x 10^9	4,44 x 10^8	27
YIT 0148	4,07 x 10^8	1,68 x 10^8	8,23 x 10^8	1,20 x 10^9	3,90 x 10^8	30
YIT 0132	3,17 x 10^8	2,04 x 10^8	1,25 x 10^9	1,85 x 10^9	4,42 x 10^8	41
Unidad: UFC/ml						

Ejemplo 3

Confirmación de la existencia de plásmido en cepa de *Lactobacillus plantarum*

(1) Cepas e incubación

Se incubó la cepa en medio MRS a 37 ºC durante 20 horas.

(2) Preparación de ADN plásmido

Se recogió el organismo de 1 ml de solución incubada fresca por centrifugación a 3.000 x g y se suspendió en 200 µl de solución de lisis (50 µg/ml de N-acetilmuramidasa SG, 3 mg/ml de lisocima de huevo, 100 mg/ml de ARNasa A, 50 mM de tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA). Se mantuvo a 37 °C durante 30 minutes para formar un protoplasto. Se recogió el organismo formado por protoplasto a 3.000 x g y se trató con un kit disponible en el mercado (BioRad Miniprep.) para preparar un plásmido por método con álcali para producir un ADN plásmido.

(3) Detección de plásmido

Se sometió el ADN plásmido a electroforesis sobre gel de agarosa al 0,7 %, que se tiñó después con bromuro de etidio y se fotografió con irradiación UV para evaluar la existencia de plásmido. En la Tabla 5 se muestran los resultados.

(4) Existencia de plásmido

Se seleccionaron las 7 cepas que presentaron una buena capacidad de fermentación en el zumo del Ejemplo 2 para investigación. En 5 de las 7 cepas, se observaron plásmidos. Entre estas cepas, YIT 0132 y YIT 0148 no tuvieron ninguna plásmido, presentando dichas cepas recuentos de células viables asequibles de 10^8 UFC/ml o más con zumo de uva y zumo de pomelo del Ejemplo 2.

[Tabla 5]

Cepa	Existencia de plásmido
YIT 10023	+
YIT 0102	+
YIT 10021	+
YIT 10015	+
y 99005 (299v)	+
YIT 0132	-
YIT 0148	-
+: existencia de plásmido -: sin existencia de plásmido	

Ejemplo 4

Bebidas con bacteria de ácido láctico (1):

Se esterilizaron zumo de fruta o zumo de verduras a Brix (Bx) 10, tal como se muestra en la Tabla 6, en las condiciones descritas en la Tabla 6. Después de la refrigeración, se inoculó *Lactobacillus plantarum* YIT 0132 pre-incubado en caldo de cultivo MRS en ellos a 0,4% y se incubó a 37 °C durante 48 horas. Para los zumos de fruta o zumos de verdura fermentados resultantes, se midieron los recuentos de células viables en el momento de la producción en una placa de agar MRS (Tabla 6). Por otra parte, se evaluó libremente el sabor de estas bebidas con bacterias de ácido láctico, lo que indicó que todas eran apropiadas para su consumo. En particular, los de naranja, manzana, zanahoria, Ayamurasaki y J-Red tenían un buen sabor.

[Tabla 6]

Material alimentario	Condiciones de esterilización	pH tras esterilización	Recuento de células viable en el momento de la producción*
Naranja	110 °C 3 s.	3,77	$8,9 \times 10^8$
Manzana		3,80	$3,5 \times 10^8$
Piña		3,61	$1,0 \times 10^9$
Melocotón		3,94	$5,1 \times 10^8$
Zanahoria	135 °C 1 min	6,08	$1,6 \times 10^9$
Murasaki ninjin	123 °C 1 min	4,26	$1,7 \times 10^9$
Ayamurasaki	135 °C 1 min	6,08	$9,0 \times 10^8$
J-Red		5,68	$1,8 \times 10^9$
Kale		5,87	$3,7 \times 10^9$
Zumo de tomate**	130 °C 3 s.	4,30	$1,9 \times 10^9$
Salsa de tomate	123 °C 1 min	4,30	$1,9 \times 10^9$
*Unidad: UFC/ml **Preparado exprimiendo el tomate, separando la pulpa por centrifugación y concentración			

Ejemplo 5

Bebidas con bacteria de ácido láctico (2)

Se disolvieron leche desnatada (10 %) y extracto de lavadura (0,03 %) en agua templada y se esterilizaron a 135 ºC durante 3 segundos. Tras la refrigeración, se inoculó *Lactobacillus plantarum* YIT 0132 pre-incubado en un caldo de cultivo MRS en ellos a 0,4% y se incubó a 37°C durante 48 horas. Las bebidas con bacterias de ácido láctico resultante tuvieron los recuentos de células viables de $5,2 \times 10^8$ UFC/ml en el momento de la producción sobre una placa de agar MRS. El sabor fue moderadamente ácido, lo cual la hizo agradable para su consumo.

Ejemplo 6

Bebidas con bacteria de ácido láctico (3)

Se esterilizó zumo de frutas o zumo de verduras ajustado a Brix (Bx) 10, como se muestra en la Tabla 7 en las condiciones descritas en la Tabla 7 Se inoculó *Lactobacillus plantarum* YIT 0148 pre-incubado en un caldo MRS en ellos a 0,4% y se incubó a 37 ºC durante 48 horas. Se midió el recuento de células viables para el zumo de frutas o el zumo de verduras fermentado resultante en una placa agar MRS (Tabla 6). Por otra parte, se evaluó libremente el sabor de estas bebidas de bacteria de ácido láctico lo cual indicó que todos eran apropiados para su consumo. En particular, los de naranja, manzana, zanahoria, Ayamurasaki y J-Red presentaron un buen sabor.

[Tabla 7]

Material de alimento	Condiciones de esterilización	pH tras esterilización	Recuento de células viable en el momento de la producción*
Naranja	110 °C 3 s.	3,77	$7,9 \times 10^8$
Manzana		3,80	$2,4 \times 10^8$
Piña		3,61	$1,0 \times 10^9$
Melocotón		3,94	$6,1 \times 10^8$
Zanahoria	135 °C 1 min	6,08	$1,9 \times 10^9$
Murasaki ninjin	123 °C 1 min	4,26	$1,6 \times 10^9$
Ayamurasaki	135 °C 1 min	6,08	$3,5 \times 10^8$
J-Red		5,68	$1,1 \times 10^9$
Kale		5,87	$1,3 \times 10^9$
Zumo de tomate**	130 °C 3 s.	4,30	$1,7 \times 10^9$

Material de alimento	Condiciones de esterilización	pH tras esterilización	Recuento de células viable en el momento de la producción*
Salsa de tomate	123 °C 1 min	4,30	$1,6 \times 10^9$
*Unidad: UFC/ml **Preparado exprimiendo el tomate, separando la pulpa por centrifugación y concentración			

Ejemplo 7

Bebidas con bacteria de ácido láctico (4):

Se disolvieron leche desnatada (10 %) y extracto de levadura (0,03 %) en agua templada y se esterilizó a 135 ºC durante 3 segundos. Tras la refrigeración se inoculó *Lactobacillus plantarum* YIT 0148 pre-incubado en un caldo de cultivo MRS en ellos a 0,4% y se incubó a 37 °C durante 48 horas. La bebida con bacteria de ácido láctico resultante tuvo recuentos de células viables de $3,2 \times 10^8$ UFC/ml en el momento de la producción en una placa agar MRS. El sabor fue moderadamente ácido, lo que hizo que su consumo fuera agradable.

Susceptibilidad de aplicación industrial

Las bacterias de ácido láctico de la invención presentan altos recuentos de células viables asequibles incuso aunque se utilicen zumos de verduras o zumos de fruta como sustratos fermentadores. Por lo tanto, las bacterias de ácido láctico de la invención se pueden utilizar convenientemente en probióticos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Kabushiki Kaisha Yakult Honsha

<120> *Lactobacillus plantarum* nuevo y uso del mismo

<130> PF-110005-WO

<150> JP2010-64911
<151> 19-03-2010

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 1501
<212> ADN
<213> *Lactobacillus plantarum* YIT 0132

<220>
<221> misc_feature
<223> Inventor: Tohru Iino; Norie Masuoka; Fumiyasu Ishikawa; Koichi Yoshimura; Eiji Hayashida

<400> 1

ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgaac gaactctggt attgattggt gcttgcatca 60

tgatttacat ttgagtgagt ggcgaactgg tgagtaacac gtgggaaacc tgcccagaag 120

cgggggataa cacctggaaa cagatgctaa taccgcataa caacttggac cgcatggtcc 180

aagtttgaaa gatggcttcg gctatcactt ttggatggtc ccgcggcgta ttagctagat 240

ggtggggtaa cggctcacca tggcaatgat acgtagccga cctgagaggg taatcggcca 300

cattgggact gagacacggc ccaaactcct acgggaggca gcagtaggga atcttccaca 360

atggacgaaa gtctgatgga gcaacgccgc gtgagtgaag aagggtttcg gctcgtaaaa 420

ctctgttgtt aaagaagaac atatctgaga gtaactgttc aggtattgac ggtatttaac 480

cagaaagcca cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtaggtg gcaagcgttg 540

tccggattta ttgggcgtaa agcgagcgca ggcggttttt taagtctgat gtgaaagcct 600

tcggctcaac cgaagaagtg catcggaaac tgggaaactt gagtgcagaa gaggacagtg 660

gaactccatg tgtagcggtg aaatgcgtag atatatggaa gaacaccagt ggcgaaggcg 720

gctgtctggt ctgtaactga cgctgaggct cgaaagtatg ggtagcaaac aggattagat 780

accctggtag tccataccgt aaacgatgaa tgctaagtgt tggagggttt ccgcccttca 840

gtgctgcagc taacgcatta agcattccgc ctggggagta cggccgcaag gctgaaactc 900

aaaggaattg acgggggccc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gaagctacgc 960

gaagaacctt accaggtctt gacatactat gcaaatctaa gagattagac gttcccttcg 1020

gggacatgga tacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta 1080

agtcccgcaa cgagcgcaac ccttattatc agttgccagc attaagttgg gcactctggt 1140

gagactgccg gtgacaaacc ggaggaaggt ggggatgacg tcaaatcatc atgcccctta 1200

tgacctgggc tacacacgtg ctacaatgga tggtacaacg agttgcgaac tcgcgagagt 1260

aagctaatct cttaaagcca ttctcagttc ggattgtagg ctgcaactcg cctacatgaa 1320

gtcggaatcg ctagtaatcg cggatcagca tgccgcggtg aatacgttcc cgggccttgt 1380

acacaccgcc cgtcacacca tgagagtttg taacacccaa agtcggtggg gtaacctttt 1440

aggaaccagc cgcctaaggt gggacagatg attagggtga agtcgtaaca aggtagccgt 1500

a 1501

<210> 2

<211> 1559

<212> ADN

<213> *Lactobacillus plantarum* YIT 0148

<400> 2

agagtttgat catggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgaac 60

gaactctggt attgattggt gcttgcatca tgatttacat ttgagtgagt ggcgaactgg 120

tgagtaacac gtgggaaacc tgcccagaag cgggggataa cacctggaaa cagatgctaa 180

taccgcataa caacttggac cgcatggtcc aagtttgaaa gatggcttcg gctatcactt 240

ttggatggtc ccgcggcgta ttagctagat ggtggggtaa cggctcacca tggcaatgat 300

acgtagccga cctgagaggg taatcggcca cattgggact gagacacggc ccaaactcct 360

acgggaggca gcagtaggga atcttccaca atggacgaaa gtctgatgga gcaacgccgc 420

gtgagtgaag aagggtttcg gctcgtaaaa ctctgttgtt aaagaagaac atatctgaga 480

gtaactgttc aggtattgac ggtatttaac cagaaagcca cggctaacta cgtgccagca 540

gccgcggtaa tacgtaggtg gcaagcgttg tccggattta ttgggcgtaa agcgagcgca 600

ggcggttttt taagtctgat gtgaaagcct tcggctcaac cgaagaagtg catcggaaac 660

tgggaaactt gagtgcagaa gaggacagtg gaactccatg tgtagcggtg aaatgcgtag 720

atatatggaa gaacaccagt ggcgaaggcg gctgtctggt ctgtaactga cgctgaggct 780

cgaaagtatg ggtagcaaac aggattagat accctggtag tccataccgt aaacgatgaa 840

tgctaagtgt tggagggttt ccgcccttca gtgctgcagc taacgcatta agcattccgc 900

ctggggagta cggccgcaag gctgaaactc caaggaattg acgggggccc gcacaagcgg 960

tggagcatgt ggtttaattc gaagctacgc gaagaacctt accaggtctt gacatactat 1020

gcaaatctaa gagattagac gttcccttcg gggacatgga tacaggtggt gcatggttgt 1080

cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta agtcccgcaa cgagcgcaac ccttattatc 1140

agttgccagc attaagttgg gcactctggt gagactgccg gtgacaaacc ggaggaaggt 1200

ggggatgacg tcaaatcatc atgcccctta tgacctgggc tacacacgtg ctacaatgga 1260

tggtacaacg agttgcgaac tcgcgagagt aagctaatct cttaaagcca ttctcagttc 1320

ggattgtagg ctgcaactcg cctacatgaa gtcggaatcg ctagtaatcg cggatcagca 1380

tgccgcggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca tgagagtttg 1440

taacacccaa agtcggtggg gtaacctttt aggaaccagc cgcctaaggt gggacagatg 1500

attagggtga agtcgtaaca aggtagccgt aggagaacct gcggctggat cacctcctа 1559

REIVINDICACIONES

1. Una bacteria de ácido láctico que pertenece a *Lactobacillus plantarum,* que es *Lactobacillus plantarum* YIT 0132 (FERM BP-11349) o *Lactobacillus plantarum* YIT 0148 (FERM BP-11350), de la cual los recuentos de células viables asequibles son 10^8 UFC/ml o más, en ambos casos, cuando se inocula una solución de la bacteria pre-incubada en caldo de cultivo MRS de lactobacilo a 37 ºC durante 16 horas hasta el estado estacionario a 0,4 % de volumen sobre zumo al 100 % de uva o de naranja como sustrato fermentador y se incuba a 37 ºC durante 48 horas.

2. Alimento y bebida que comprende una bacteria de ácido láctico que pertenece a *Lactobacillus plantarum* tal como se reivindica en la reivindicación 1.

3. Un producto de fermentación que se puede obtener inoculando y fermentando sobre un material alimentario, que es leche animal, leche de soja, zumo de fruta o zumo de verduras, una bacteria de ácido láctico que pertenece a *Lactobacillus plantarum,* tal como se reivindica en la reivindicación 1, conteniendo dicho producto de fermentación la bacteria de ácido láctico en un estado viable.

4. Alimento y bebida que comprende el producto de fermentación tal como se reivindica en la reivindicación 3.

5. Un proceso para producir un producto de fermentación que comprende la inoculación y fermentación sobre un material alimentario de una bacteria de ácido láctico que pertenece a *Lactobacillus plantarum,* tal como se reivindica en la reivindicación 1.