

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 488**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 1/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.06.2012 PCT/EP2012/061296**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2012 WO12172000**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2012 E 12728479 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 2721142**

54 Título: **Células de *Lactobacillus plantarum* con resistencia mejorada a altas concentraciones de etanol**

30 Prioridad:

17.06.2011 EP 11170349

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

01.03.2019

73 Titular/es:

**CHR. HANSEN A/S (100.0%)
Boege Allé 10-12
2970 Hoersholm, DK**

72 Inventor/es:

**SOERENSEN, KIM IB;
KIBENICH, ANNETTE y
JOHANSEN, ERIC**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 702 488 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

Células de *Lactobacillus plantarum* con resistencia mejorada a altas concentraciones de etanol

Campo de la invención

5 La presente descripción se refiere a mutantes resistentes a cicloserina de bacterias del ácido láctico caracterizados por tener una resistencia mejorada al etanol. Los mutantes resistentes a cicloserina de bacterias del ácido láctico pueden usarse por ejemplo para fermentaciones malolácticas de vino (es decir, incluyendo vino espumoso tal como cava/champán) que tiene altos niveles de alcohol.

Técnica anterior

10 Se usan bacterias del ácido láctico tales como *Lactobacillus plantarum* y *Oenococcus oeni* en la industria vitivinícola para fermentación maloláctica. Su funcionalidad se basa en la capacidad para convertir ácido málico en el ácido láctico más suave que se usa para muchos tipos de vino.

15 A lo largo de las últimas décadas, las temperaturas promedio han aumentado perceptiblemente en los países productores de vino conduciendo a uvas maduras con un contenido de azúcares más alto produciendo de ese modo vinos con más alcohol. Actualmente muchos vinos tienen un contenido de alcohol del 14-15% y esto es un reto sustancial y una condición extrema para el microorganismo fermentador tal como levadura y bacterias del ácido láctico.

20 Según se comenta en el documento US7625745B2 (Danstar Ferment, CH), en la vinificación tradicional, la fermentación maloláctica (MLF) se produce por medio del crecimiento espontáneo de una flora autóctona de bacterias del ácido láctico. El proceso de MLF se inicia por sí sólo, cuando la flora maloláctica se desarrolla suficientemente, es decir de una manera aleatoria entre el final de la fermentación alcohólica y varias semanas, incluso varios meses, después de la fermentación alcohólica. Cuando las bacterias malolácticas alcanzan una concentración de aproximadamente 10^6 UFC/ml en el medio, entran en una fase metabólica activa e inician la fermentación del ácido málico. En estas condiciones, *Oenococcus oeni* es la especie más frecuentemente responsable de la MLF. De hecho, si al inicio de la fermentación alcohólica se observa una predominancia de las especies *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei* homofermentativas, estas desaparecen cuando aumenta el contenido de alcohol. Después de la fermentación alcohólica, son las especies *Pediococcus* y *Oenococcus*, dependiendo del pH, las que predominan y finalmente alcanzan la concentración crítica para iniciar la MLF.

25 En síntesis, puede decirse que las cepas de *Lactobacillus plantarum* naturales/silvestres tienen una resistencia inherente relativamente baja a las concentraciones de etanol/alcohol presentes en el zumo de uva durante la producción de vino.

30 El documento US7625745B2 (documento PCT presentado en 2004 y publicado en 2009) describe la selección de cepas bacterianas del ácido láctico de *Lactobacillus plantarum* resistentes a alcohol y se dice que los autores creían que era inesperado que fuese posible seleccionar tales cepas bacterianas del ácido láctico de *Lactobacillus plantarum* resistentes a alcohol, por ejemplo debido a que esta resistencia al alcohol se desconocida hasta la fecha para tales cepas de *Lactobacillus plantarum* (véanse por ejemplo C4, I. 20-30 y las figuras del documento US7625745B2).

35 En este caso es relevante indicar que en el documento US7625745B2 se hizo un examen de cepas de *Lactobacillus plantarum* naturales que surgen a partir de vinos fermentados (véase por ejemplo el ejemplo 1 del documento US7625745B2).

40 Los aislados de bacterias del ácido láctico naturales se sometieron a una presión de selección de resistencia a niveles de alcohol por encima del 10% y se encontró que dos cepas de *L. plantarum* particulares eran lo suficientemente resistentes a niveles de alcohol por encima del 10% (véase por ejemplo el ejemplo 7 del documento US7625745B2).

45 La D-cicloserina (D-4-amino-isoxazolidona) es un antibiótico que inhibe alanina racemasa, D-alanil-D-alanina ligasa, D-alanilalanina sintasa y D-alanina permeasa provocando lisis celular.

La D-alanina racemasa es esencial para la producción de D-alanina, una parte integral de la capa de peptidoglicano de la pared celular.

Las cepas de *Lactobacillus plantarum* en las que se ha insertado el gen de alanina racemasa (*alr*) de *Lactococcus lactis* en un plásmido tienen resistencia a D-cicloserina (Bron *et al.*, 2002 Appl Environ Microbiol. 68:5663-5670).

50 En este caso es relevante indicar que el artículo comentado anteriormente de Bron *et al.* no se refiere de ninguna manera a la identificación de cepas de *Lactobacillus plantarum* con resistencia mejorada a altas concentraciones de etanol.

Por lo que conocen los presentes inventores, no se describe ni sugiere en la técnica anterior ningún vínculo

relevante en el presente documento entre resistencia aumentada a D-cicloserina y resistencia mejorada a altas concentraciones de etanol.

Sumario de la invención

5 El problema que va a solucionarse mediante la presente invención es proporcionar una composición de *Lactobacillus plantarum* con resistencia mejorada a concentraciones relativamente altas en vino de etanol.

La composición de *Lactobacillus plantarum* es particularmente útil para la producción de vino.

La solución se basa en que los presentes inventores han desarrollado un método de selección novedoso para la identificación de nuevas composiciones de *Lactobacillus plantarum* mejoradas.

10 Una etapa importante novedosa del nuevo método de selección descrito en el presente documento se refiere a que los presentes inventores han identificado un vínculo sorprendentemente relevante en el presente documento entre resistencia aumentada a D-cicloserina y resistencia mejorada a altas concentraciones de etanol.

Por consiguiente, el método de selección novedoso descrito en el presente documento puede observarse en general como que comprende las siguientes dos etapas:

15 (i): en primer lugar examinar/seleccionar cepas/células de *Lactobacillus plantarum* con resistencia aumentada a D-cicloserina (puede denominarse resistencia a D-cicloserina) que es significativamente más alta que la normalmente presente en cepas de *Lactobacillus plantarum* naturales/silvestres; y

(ii): a partir del conjunto de células resistentes a D-cicloserina identificadas en la etapa (i) se examina/selecciona entonces una cepa/célula de *Lactobacillus plantarum* que tiene resistencia mejorada a concentraciones relativamente altas en vino de etanol.

20 Tal como se muestra en el ejemplo de trabajo 3 en el presente documento, los presentes inventores identificaron que a partir de un conjunto de cepas/células de *Lactobacillus plantarum* seleccionadas resistentes a D-cicloserina (es decir, a partir de la etapa (i) anterior) era relativamente rápido examinar/seleccionar entonces una cepa/célula de *Lactobacillus plantarum* que tiene resistencia mejorada a concentraciones relativamente altas de etanol, esencialmente, el motivo de esto es que los presentes inventores identificaron sorprendentemente que un porcentaje
25 relativamente alto de las células resistentes a D-cicloserina seleccionadas en primer lugar eran también resistentes a concentraciones relativamente altas de etanol.

Por consiguiente, el primer examen/selección para resistencia a D-cicloserina aumentada puede observarse, tal como se comenta en el presente documento, como una clase de etapa previa para poder examinar/seleccionar/enriquecer rápida y eficazmente una cepa/célula de *Lactobacillus plantarum* que tiene
30 resistencia mejorada a etanol.

Tal como resulta evidente para el experto, una ventaja significativa del método de examen/selección descrito en el presente documento es que se puede examinar/seleccionar de manera relativamente rápida y eficaz una cepa/célula de *Lactobacillus plantarum* que tiene resistencia mejorada a etanol.

35 Por ejemplo, si ya se tiene una cepa de *Lactobacillus plantarum* con buenas propiedades relevantes comerciales en relación con por ejemplo fermentación maloláctica de zumo de uvas de vino, puede usarse entonces esta cepa como célula de partida para mutagénesis y luego seleccionar relativamente rápido y de ese modo conseguir/identificar una cepa de *Lactobacillus plantarum* novedosa que tiene resistencia mejorada a etanol y mantiene aún sus buenas propiedades anteriores con respecto a por ejemplo fermentación maloláctica de zumo de uvas de vino.

40 Tal como se muestra en el ejemplo de trabajo 3 en el presente documento, aproximadamente el 10% de las primeras célula resistentes a D-cicloserina seleccionadas eran también resistentes a concentraciones relativamente altas de etanol.

Por el contrario, tal como se muestra en el ejemplo de trabajo 4 en el presente documento, al intentar identificar una célula resistente a etanol directamente a partir de un conjunto de células mutantes de *Lactobacillus plantarum* individuales, donde no se había hecho la etapa previa de seleccionar resistencia a D-cicloserina, no fue posible
45 siquiera identificar una sola célula resistente a etanol.

Por consiguiente, sin usar el método de examen/selección novedoso tal como se describe en el presente documento, no sería posible (o llevaría un tiempo muy largo) identificar una cepa mutante resistente a etanol de la cepa de partida *Lactobacillus plantarum* CHCC14158 usada en el ejemplo de trabajo 3 en el presente documento.

50 Sin limitarse a la teoría, una explicación teórica para el vínculo sorprendentemente identificado y comentado en el presente documento entre resistencia a D-cicloserina aumentada y resistencia a etanol aumentada, podría ser que tales células de *Lactobacillus plantarum* con resistencia a D-cicloserina aumentada produzcan más de los denominados polisacáridos extracelulares (EPS). Podría entonces ser teóricamente que tales polisacáridos extracelulares (también denominados exopolisacáridos) pudieran proporcionar un tipo de protección alrededor de la

célula, es decir que podrían ser estos polisacáridos extracelulares los que protegen a las células contra la entrada de D-cicloserina dentro de las células y de ese modo proporcionan la resistencia a D-cicloserina aumentada.

De forma similar y sin limitarse a la teoría, podrían entonces ser estos exopolisacáridos los que protegerían a las células de *Lactobacillus plantarum* en un entorno con alto contenido de etanol y de ese modo proporcionan la resistencia a etanol aumentada.

Tal como se comentó anteriormente, las células de *Lactobacillus plantarum* identificadas en el presente documento se seleccionan en primer lugar para detectar una resistencia aumentada a D-cicloserina, puede denominarse resistencia a D-cicloserina que es significativamente más alta que la normalmente presente en cepas de *Lactobacillus plantarum* naturales/silvestres.

En el documento US7625745B2 de la técnica anterior tal como se comentó anteriormente, no se hizo ninguna selección relevante en el presente documento para detectar resistencia aumentada a D-cicloserina.

Por consiguiente, tal como entiende el experto, no hay absolutamente ninguna razón para creer que alguna de las cepas de *Lactobacillus plantarum* descritas en el documento US7625745B2 tuviera una resistencia a D-cicloserina tal como se comenta en el presente documento (véase por ejemplo el ejemplo de trabajo 1 en el presente documento, donde se describe el ensayo de resistencia a D-cicloserina relevante en el presente documento).

De manera similar, en otro artículo de Bron *et al.*, 2002 comentado anteriormente, no se hizo ninguna selección relevante en el presente documento para detectar resistencia a etanol aumentada.

Por consiguiente, tal como entiende el experto, no hay absolutamente ninguna razón para creer que alguna de las cepas de *Lactobacillus plantarum* descritas en el artículo de Bron *et al.*, 2002 tuviera una resistencia a etanol tal como se comenta en el presente documento (véase por ejemplo el ejemplo de trabajo 2 en el presente documento, donde se describe el ensayo de resistencia a etanol relevante en el presente documento).

En resumen, se presenta que las cepas de *Lactobacillus plantarum* comentadas relevantes en el presente documento son como tales cepas novedosas con respecto a la técnica anterior.

Por consiguiente, un primer aspecto de la descripción se refiere a una composición de *Lactobacillus plantarum* que comprende desde 10^4 hasta 10^{14} UFC/g de células de *Lactobacillus plantarum*, en la que la composición de *Lactobacillus plantarum* se caracteriza porque:

(i): las células de *Lactobacillus plantarum* tienen una resistencia aumentada a D-cicloserina, definida porque las células son células de *Lactobacillus plantarum*, en las que la cantidad de D-cicloserina que reduce el crecimiento medido a D.O.₆₀₀, después de 24 horas de crecimiento a 18°C, al 50% en el medio GJ-5 de zumo de uva conocido (el medio GJ-5 tiene la siguiente composición: concentrado de zumo de uva 70,0 g, pasta de levadura 30,0 g, Tween 80 0,5 g, MnSO₄H₂O 0,1 g y agua del grifo 900,0 g) en comparación con el crecimiento en el medio GJ-5 sin D-cicloserina (es decir, con 0 µg/ml de D-cicloserina) es mayor de 70 µg/ml de D-cicloserina;

y

(ii): células de *Lactobacillus plantarum* tienen una resistencia mejorada a etanol, definida porque las células son células de *Lactobacillus plantarum*, en las que las células pueden crecer a una D.O.₆₀₀ de al menos 0,8 después de 3 días de incubación a 25°C en el medio GJ-5 con etanol al 11%.

Tal como entiende el experto en el presente contexto, la composición de *Lactobacillus plantarum* del primer aspecto en el presente documento es una composición, en la que

(i): las células (en el punto (i) del primer aspecto) son positivamente resistentes a D-cicloserina en el ensayo de resistencia a D-cicloserina del ejemplo 1; y

(ii): las células (en el punto (ii) del primer aspecto) son positivamente resistentes a etanol en el ensayo de resistencia a etanol del ejemplo 2.

Tanto el ensayo de resistencia a D-cicloserina [del punto (i)] como el ensayo de resistencia a etanol [del punto (ii)] se basan en elementos convencionales disponibles comercialmente, conocidos (tales como por ejemplo medios convencionales, etc.).

Por consiguiente, basándose en la descripción detallada del ensayo en el presente documento (véase por ejemplo el ejemplo 1 en el presente documento para el ensayo de resistencia a D-cicloserina y el ejemplo 2 en el presente documento el ensayo de resistencia a etanol) el experto puede repetir rutinariamente estos ensayos para determinar objetivamente si una célula de interés de *Lactobacillus plantarum* específica cumple con los niveles de resistencia a D-cicloserina [del punto (i)] y resistencia a etanol [del punto (ii)] del primer aspecto de la descripción.

La composición de *Lactobacillus plantarum* novedosa tal como se describe en el presente documento puede usarse preferiblemente para la producción de vino. La dosis y administración pueden realizarse según la técnica.

Además, todas las demás etapas relevantes en el presente documento para elaborar un vino pueden realizarse según la técnica. Tales otras etapas relevantes de producción de vino (por ejemplo uso de células de levadura) son etapas de rutina bien conocidas por el experto y por tanto no es necesario comentarlas en detalle en el presente documento.

- 5 Por consiguiente, un segundo aspecto de la invención se refiere a un método para producir un vino que comprende administrar la composición de *Lactobacillus plantarum* del primer aspecto y realizaciones relacionadas descritas en el presente documento a un zumo de uva o vino y realizar etapas adecuadas adicionales para elaborar el vino.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a un método para examinar y aislar una célula de *Lactobacillus plantarum* novedosa que comprende las siguientes etapas:

- 10 (a): seleccionar y aislar a partir de un conjunto de células de *Lactobacillus plantarum* individuales, un nuevo conjunto seleccionado de células de *Lactobacillus plantarum* que tienen resistencia aumentada a D-cicloserina en las condiciones del punto (i) del primer aspecto;

- 15 (b): seleccionar y aislar, a partir del conjunto seleccionado de células resistentes a D-cicloserina de *Lactobacillus plantarum* de la etapa (a), una nueva célula de *Lactobacillus plantarum* aislada que tiene resistencia mejorada a etanol en las condiciones del punto (ii) del primer aspecto.

Es evidente para el experto que una vez que los inventores en el presente documento han dado a conocer los ensayos de prueba relevantes (es decir, los ensayos de los ejemplos 1 y 2 en el presente documento) será trabajo habitual para el experto seleccionar otras células de *Lactobacillus plantarum* nuevas que cumplan con los criterios del primer aspecto en el presente documento.

- 20 Tal como se comenta en el presente documento, usando el método de examen/selección novedoso tal como se describe en el presente documento los inventores han seleccionado y aislado varias nuevas células de *Lactobacillus plantarum* mejoradas.

La realización de la presente invención se describe a continuación, sólo a modo de ejemplos.

Definiciones

- 25 Todas las definiciones de términos relevantes en el presente documento están de acuerdo con lo que entendería el experto en relación con el contexto técnico relevante en el presente documento.

El término "*Lactobacillus plantarum*" es un término bien conocido para el experto y el experto sabe si una célula de bacteria del ácido láctico particular de interés es una célula de *Lactobacillus plantarum* o no.

Dibujos

- 30 Figura 1: En esta figura se muestra la resistencia a D-cicloserina de diferentes cepas de *Lactobacillus plantarum*: para detalles adicionales, véanse los ejemplos de trabajo en el presente documento.

Descripción detallada de la invención

Composición de *Lactobacillus plantarum*:

- 35 El término "composición *Lactobacillus plantarum*" se entenderá según la técnica. Se entiende en el presente documento como una composición de *Lactobacillus plantarum* que comprende varias células de *Lactobacillus plantarum* con una característica de interés.

- 40 La composición de *Lactobacillus plantarum* puede comprender diferentes tipos o cepas de células de *Lactobacillus plantarum* (por ejemplo las dos cepas de *Lactobacillus plantarum* CHCC14254 y CHCC14255 diferentes comentadas en el presente documento). En esencia la composición comprenderá simplemente la cantidad de células de *Lactobacillus plantarum* proporcionada en el primer aspecto en el presente documento, en el que las células de *Lactobacillus plantarum* cumplen con los criterios proporcionados en el primer aspecto.

- 45 Tal como conoce el experto, en el presente documento las composiciones de células de *Lactobacillus plantarum* comercialmente relevantes se elaboran generalmente mediante fermentación. Las células de *Lactobacillus plantarum* obtenidas generalmente se concentran, se secan, se mezclan con un portador y se envasan en un recipiente adecuado.

Las por ejemplo de 10^4 a 10^{14} UFC/g de células de *Lactobacillus plantarum* relevantes de la composición pueden estar presentes en una forma comercialmente relevante conocida por el experto.

Por consiguiente, están presentes de 10^4 a 10^{14} UFC/g de células de *Lactobacillus plantarum* de la composición como células secadas (por ejemplo, secadas por pulverización) o como células congeladas.

- 50 Se da a conocer en el presente documento una composición de *Lactobacillus plantarum* que comprende desde 10^6

hasta 10^{14} UFC/g de células de *Lactobacillus plantarum*, más preferiblemente desde 10^8 hasta 10^{14} UFC/g de células de *Lactobacillus plantarum*.

5 El término "UFC/g" se refiere al peso en gramos de la composición como tal, incluyendo aditivos relevantes adecuados presentes en la composición. No incluye el peso de un recipiente adecuado usado para envasar la composición de *Lactobacillus plantarum*.

Tal como se da a conocer en el presente documento la composición de *Lactobacillus plantarum* se envasa en un recipiente adecuado.

Tal como conoce el experto, una composición bacteriana comercialmente relevante comprende generalmente también otros aditivos adecuados relevantes.

10 Además de las células de *Lactobacillus plantarum* relevantes en el presente documento, la composición puede comprender también otros microorganismos relevantes de interés tales como por ejemplo otras bacterias del ácido láctico de interés o células de levadura de interés (tal como por ejemplo células de levadura del vino de interés).

Ensayo para seleccionar una resistencia aumentada a D-cicloserina

15 Tal como se comentó anteriormente el ensayo de resistencia de D-cicloserina del punto (i) del primer aspecto se basa en elementos convencionales comercialmente disponibles conocidos (tales como por ejemplo medios convencionales, etc.).

20 Por consiguiente, basándose en la descripción detallada del ensayo en el presente documento (véase por ejemplo el ejemplo 1 en el presente documento) el experto puede repetir rutinariamente este ensayo para determinar objetivamente si una célula específica de interés cumple con los criterios de resistencia a D-cicloserina tal como se describe en el punto (i).

Tal como se comentó anteriormente, puede decirse que el nivel de resistencia tal como se requiere en el ensayo del ejemplo 1 es una resistencia a D-cicloserina que es significativamente más alta que la normalmente presente en cepas de *Lactobacillus plantarum* naturales/silvestres.

25 Las condiciones detalladas del ejemplo 1 en el presente documento son un ensayo preferido en el presente documento para determinar si una célula de *Lactobacillus plantarum* de interés cumple con los criterios del punto (i) del primer aspecto.

Resistencia aumentada a D-cicloserina, punto (i) del primer aspecto

Puede preferirse que la resistencia aumentada a D-cicloserina sea mayor que la proporcionada en el punto (i) del primer aspecto en el presente documento.

30 Por consiguiente, puede preferirse que las células de *Lactobacillus plantarum* tengan una resistencia aumentada a D-cicloserina, definida porque las células son células de *Lactobacillus plantarum*, en las que la cantidad de D-cicloserina que reduce el crecimiento medido a D.O.₆₀₀, después de 24 horas de crecimiento a 18°C, al 50% en el medio GJ-5 de zumo de uva conocido en comparación con el crecimiento en el medio GJ-5 sin D-cicloserina (es decir, con 0 µg/ml de D-cicloserina) es mayor de 80 µg/ml de D-cicloserina o es mayor de 90 µg/ml de D-cicloserina.

Ensayo para seleccionar una resistencia mejorada a etanol

Tal como se comentó anteriormente, el ensayo de resistencia a etanol del punto (ii) del primer aspecto se basa en elementos convencionales comercialmente disponibles conocidos (tales como por ejemplo medios convencionales, etc.).

40 Por consiguiente, basándose en la descripción detallada del ensayo en el presente documento (véase por ejemplo el ejemplo 2 en el presente documento) el experto puede repetir rutinariamente este ensayo para determinar objetivamente si una célula específica de interés cumple con los criterios de resistencia a etanol tal como se describe en el punto (ii).

45 Las condiciones detalladas del ejemplo 2 en el presente documento son un ensayo preferido en el presente documento para determinar si una célula de interés de *Lactobacillus plantarum* cumple con los criterios del punto (ii) del primer aspecto.

Resistencia mejorada a etanol, punto (ii) del primer aspecto

Puede preferirse que la resistencia mejorada a etanol sea mayor que la proporcionada en el punto (ii) del primer aspecto en el presente documento.

50 Por consiguiente, puede preferirse que las células de *Lactobacillus plantarum* tengan una resistencia mejorada a etanol, definida porque las células son células de *Lactobacillus plantarum*, en las que las células puede crecer hasta

una D.O.⁶⁰⁰ de al menos 0,8 después de 3 días de incubación a 25°C en el medio GJ-5 con etanol al 11,5% o con etanol al 12% etanol o con etanol al 13%.

Método para producir un vino

5 Tal como se dijo anteriormente un segundo aspecto de la invención se refiere a un método para producir un vino que comprende administrar la composición de *Lactobacillus plantarum* del primer aspecto y realizaciones relacionadas descritas en el presente documento a un zumo de uva o vino y llevar a cabo etapas adecuadas adicionales para elaborar el vino.

El vino puede ser un vino de interés tal como vino tinto, vino blanco o vino espumoso tal como cava/champán.

10 Tal como conoce el experto, para la producción de vino relevante comercial se administran generalmente alrededor de 10⁶ UFC de células de *Lactobacillus plantarum* por ml de zumo de uva o vino.

Por consiguiente, en una realización preferida del método del segundo aspecto de la invención, se administran desde 10⁴ UFC hasta 10⁸ UFC de células de *Lactobacillus plantarum* por ml de zumo de uva o vino, más preferiblemente se administran desde 10⁵ UFC hasta 10⁷ UFC de células de *Lactobacillus plantarum* por ml zumo de uva o vino.

15 Método para la fermentación de granos de cacao

Tal como se conoce en la técnica, se han usado células de *Lactobacillus plantarum* para la fermentación de granos de cacao.

20 En este sentido, un uso relevante en el presente documento de las células de *Lactobacillus plantarum* tal como se describe en el presente documento es el uso para la fermentación de granos de cacao, es decir un método para la fermentación de granos de cacao, en el que una composición de *Lactobacillus plantarum* tal como se describe en el presente documento se inocula en el grano de cacao y entonces se fermenta.

Método para la producción de ensilaje

Tal como se conoce en la técnica, se han usado células de *Lactobacillus plantarum* para la producción de ensilaje.

25 En este sentido, un uso relevante en el presente documento de las células de *Lactobacillus plantarum* tal como se describe en el presente documento es el uso para la producción de ensilaje, es decir un método para la producción de ensilaje, en el que una composición de *Lactobacillus plantarum* tal como se describe en el presente documento se inocula en el ensilaje y entonces se fermenta.

Método para examinar y aislar una célula de *Lactobacillus plantarum* novedosa

30 Tal como se dijo anteriormente, el tercer aspecto se refiere a un método para examinar y aislar una célula de *Lactobacillus plantarum* novedosa.

En el método del tercer aspecto, se selecciona una célula de *Lactobacillus plantarum* que puede satisfacer las condiciones de los puntos (i) y (ii) del primer aspecto.

35 Tal como entiende el experto, los parámetros de ensayos de resistencia a D-cicloserina y resistencia a etanol descritos en detalle en el presente documento específicos (véase por ejemplo el ejemplo 1 en el presente documento para el ensayo de resistencia a D-cicloserina y el ejemplo 2 en el presente documento para el ensayo de resistencia a etanol) pueden cambiarse para elaborar un método de examen alternativo que aún obtiene las metas principales tal como se describe en el presente documento, es decir una célula de *Lactobacillus plantarum* que puede satisfacer las condiciones del punto (i) y (ii) del primer aspecto.

40 Sin limitarse a la teoría, podría quizá ser posible usar un antibiótico funcionalmente equivalente a D-cicloserina como agente selectivo para conseguir la resistencia aumentada a D-cicloserina del punto (i) del primer aspecto.

En el presente contexto, el término “antibiótico funcionalmente equivalente” debe entenderse como un antibiótico con el mismo modo de acción o la misma diana que la D-cicloserina, tal como por ejemplo otros inhibidores de D-alanil-D-alanina ligasas, tales como por ejemplo vancomicina y otros inhibidores de D-alanina racemasa, tales como por ejemplo O-carbamoil-D-serina, alafosfina y las haloalaninas.

45 Por ejemplo, sin limitarse a la teoría, podría quizá ser posible usar el antibiótico funcionalmente equivalente vancomicina como agente de presión selectiva y de ese modo conseguir cepas seleccionadas que son resistentes a vancomicina y entonces quizás también resistentes a D-cicloserina tal como se comenta en el presente documento (es decir, una célula de *Lactobacillus plantarum* que es capaz de satisfacer las condiciones del punto (i) del primer aspecto).

50 Tal como resulta evidente para el experto, el resultado final de la etapa (b) es el aislamiento de una *Lactobacillus*

plantarum novedosa que puede satisfacer las condiciones del punto (i) y (ii) del primer aspecto.

5 Por consiguiente, un aspecto independiente de la descripción se refiere a una célula de *Lactobacillus plantarum* que puede satisfacer las condiciones del punto (i) y (ii) del primer aspecto y puede obtenerse por el método de examen del tercer aspecto el presente documento. Es evidente que esta célula de *Lactobacillus plantarum* novedosa de este aspecto independiente puede usarse para elaborar una composición de *Lactobacillus plantarum* del primer aspecto.

La etapa (a) del método para examinar y aislar una célula de *Lactobacillus plantarum* novedosa del tercer aspecto se interpreta como "seleccionar y examinar a partir de un conjunto de células de *Lactobacillus plantarum* individuales".

Tal como se conoce, es trabajo de rutina para el experto elaborar/crear un conjunto de este tipo de células de *Lactobacillus plantarum* individuales.

10 Puede por ejemplo elaborarse a partir de una célula de partida preferida adecuada, que puede someterse a mutagénesis adecuada (por ejemplo usando un mutágeno químico o mutagénesis por UV) para elaborar un conjunto de mutantes de dicha célula de partida, es decir, crear un conjunto de células de *Lactobacillus plantarum* individuales.

15 Tal como se comenta en el ejemplo de trabajo 3 en el presente documento, la célula de *Lactobacillus plantarum* CHCC14158 de partida se sometió a mutagénesis (usando D-cicloserina como agente selectivo) y a partir del conjunto creado de células de *Lactobacillus plantarum* individuales se seleccionaron posteriormente las células CHCC14254 y CHCC14255 resistentes a etanol novedosas según el método de selección tal como se describe en el presente documento.

20 Alternativamente, podría comenzarse por ejemplo a partir de células que ya se ha hecho que tengan en el presente documento resistencia relevante a D-cicloserina, tales como por ejemplo células de *Lactobacillus plantarum* descritas en el artículo de Bron *et al.* (2002) tal como se comentó anteriormente.

Las células de *Lactobacillus plantarum* relevantes del artículo de Bron *et al.* (2002) podrían entonces someterse a una mutagénesis adecuada y entonces seleccionarse para resistencia mejorada a etanol tal como se comenta en el presente documento.

25 Ejemplos

EJEMPLO 1: Ensayo de selección de resistencia a cicloserina

Medio: El medio es el medio GJ-5 de zumo de uva conocido descrito en la columna 20, líneas 10 a 20 del documento US7112346 (Chr. Hansen A/S). Tal como se describe en las líneas 10 a 20 del documento US7112346, el medio GJ-5 tiene la siguiente composición:

30 concentrado de zumo de uva 70,0 g

pasta de levadura 30,0 g

Tween 80 0,5 g

MnSO₄H₂O 0,1 g

Agua del grifo 900,0 g

35 Tal como conoce el experto, este medio GJ-5 es un medio que se considera que es representativo para un zumo de uva usado para la producción de vino.

Además, tal como entiende el experto en el presente contexto, un concentrado de zumo de uva es un componente bien conocido convencional de un medio de este tipo.

40 En el presente contexto y tal como entiende el experto, el concentrado de zumo de uva específico puede suministrarse a partir de diferentes proveedores e independientemente del proveedor específico (dentro de la incertidumbre de medición convencional) se conseguirá el mismo resultado relevante en el presente documento de resistencia a cicloserina para una célula de interés relevante en el presente documento.

45 Se inocula una cepa de *Lactobacillus plantarum* de interés en 10 ml de medio GJ-5 que contiene una de las siguientes cantidades de D-cicloserina: 0 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 50 µg/ml, 70 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml o 200 µg/ml de D-cicloserina.

La cepa se hace crecer 24 horas a 18°C en el medio GJ-5 con las diferentes concentraciones de D-cicloserina.

Después de las 24 horas de crecimiento se mide la D.O.₆₀₀ para todas las muestras.

Una célula de *Lactobacillus plantarum* que tiene una resistencia aumentada a D-cicloserina tal como se comenta en

el presente documento se define en el presente documento como una célula de *Lactobacillus plantarum*, en la que la cantidad de D-cicloserina que reduce el crecimiento medido a D.O.₆₀₀, después de 24 horas de crecimiento a 18°C, al 50% en medio GJ-5 en comparación en el crecimiento en medio GJ-5 sin D-cicloserina (es decir con 0 µg/ml de D-cicloserina) es mayor de 70 µg/ml de D-cicloserina.

- 5 Las células que pueden cumplir con estos criterios de resistencia mejorada a D-cicloserina se definen en el presente documento como células que son positivamente resistentes a D-cicloserina en el ensayo de resistencia a D-cicloserina de este ejemplo 1.

Conclusión:

- 10 Basándose en el ensayo de selección de resistencia a cicloserina de este ejemplo 1, para una cepa específica de interés (por ejemplo de un producto comercial relevante), el experto puede someter a prueba rutinariamente si esta cepa específica de interés tiene la resistencia a cicloserina relevante en el presente documento.

EJEMPLO 2: Ensayo de resistencia de examen a etanol

Medio: El medio es el medio CJ-5 convencional tal como se usa en el ejemplo 1 anterior.

- 15 Una célula de *Lactobacillus plantarum* que tiene una resistencia mejorada a etanol tal como se comenta en el presente documento se define en el presente documento como una célula de *Lactobacillus plantarum* que puede crecer hasta una D.O.₆₀₀ de al menos 0,8 después de 3 días de incubación a 25°C en el medio GJ-5 con etanol al 11%. Las células que pueden cumplir con estos criterios de resistencia mejorada a etanol se definen en el presente documento como células que son positivamente resistentes a etanol en el ensayo de resistencia a etanol de este ejemplo 2.

- 20 Conclusión:

Basándose en el ensayo de resistencia a etanol de este ejemplo 2, para una cepa específica de interés (por ejemplo una de un producto comercial relevante), el experto puede someter a prueba rutinariamente si esta cepa específica de interés tiene la resistencia a etanol relevante en el presente documento.

- 25 EJEMPLO 3: Uso de D-cicloserina para aislar mutantes de *Lactobacillus plantarum* con resistencia mejorada a altas concentraciones de etanol

Cepas

Lactobacillus plantarum CHCC14158

Lactobacillus plantarum CHCC14255 (mutante de D-cicloserina de CHCC14158 aislado a 18°C en GJ-5)

Lactobacillus plantarum CHCC14254 (mutante de D-cicloserina de CHCC14158 aislado a 18°C en GJ-5)

- 30 *Aislamiento de mutantes*

- Medida según el ejemplo 1 anterior, *Lactobacillus plantarum* CHCC14158 es una célula en la que la cantidad de D-cicloserina que reduce el crecimiento medido a D.O.₆₀₀ al 50% en medio GJ-5 en comparación con el crecimiento en medio GJ-5 sin D-cicloserina (es decir, con 0 µg/ml de D-cicloserina) es menor de 70 µg/ml de D-cicloserina, dado que la cantidad de D-cicloserina que reducía el crecimiento al 50% estaba alrededor de 60 a 65 µg/ml de D-cicloserina, véase por ejemplo la figura 1 en el presente documento.

- 35 Por consiguiente, *Lactobacillus plantarum* CHCC14158 no está teniendo positivamente una resistencia aumentada a D-cicloserina tal como se definió en el ejemplo 1 anterior.

- 40 Se sometió la cepa de *Lactobacillus plantarum* CHCC14158 a presión de D-cicloserina tal como se describe más adelante. La D-cicloserina funcionó en este caso como agente selectivo para crear un conjunto de células mutantes con resistencia aumentada a D-cicloserina.

Con el fin de aislar mutantes de la cepa de *Lactobacillus plantarum* CHCC14158, se inocularon células derivadas del crecimiento de una única colonia en medio GJ-5 del ejemplo 1 que contenía diversas concentraciones de D-cicloserina en el intervalo de 25-100 µg/ml de D-cicloserina y se hicieron crecer hasta saturación a 18°C o a 25°C.

- 45 Las células supervivientes se diluyeron y se sembraron en placas de GJ-5 (sin D-cicloserina) y se examinaron las colonias en placas de microtitulación para determinar su capacidad para crecer en presencia de diversas concentraciones de D-cicloserina en el intervalo de 25-100 µg/ml de D-cicloserina en medio GJ-5. El 25% de las colonias resultantes se identificaron como que tenían un crecimiento rápido en presencia de D-cicloserina, es decir eran positivamente resistentes a D-cicloserina en el ensayo de resistencia a D-cicloserina del ejemplo 1.

Estos mutantes se eligieron para un estudio adicional. Los mutantes resistentes a D-cicloserina seleccionados se

purificaron adicionalmente y se sometieron a prueba para determinar su capacidad para crecer en GJ-5 al que se añadieron diversas concentraciones de etanol en el intervalo de vino o etanol al 5-14% a 18°C y 25°C. Durante este examen se observó que aproximadamente el 10% de los mutantes eran más resistentes a altas concentraciones de etanol.

- 5 Dos mutantes derivados de CHCC14158, designados CHCC14255 y CHCC14254, eran significativamente más resistentes a altas concentraciones de etanol que la cepa madre cuando se comparó el crecimiento en GJ-5 a 25°C en presencia de etanol al 11, 12 y 13% de la cepa original CHCC14158 y dos mutantes resistentes a cicloserina CHCC14255 y CHCC14254.

- 10 Los dos mutantes resistentes a cicloserina CHCC14255 y CHCC14254 podían crecer ambos hasta una D.O.₆₀₀ de al menos 0,8 después de 3 días de incubación a 25°C en el medio GJ-5 con etanol al 11%, para CHCC14255 la D.O.₆₀₀ era de más de 1, es decir ambas cepas eran positivamente resistentes a etanol en el ensayo de resistencia a etanol de este ejemplo 2. La cepa CHCC14158 de partida podía crecer sólo hasta una D.O.₆₀₀ de alrededor de 0,65, es decir la cepa CHCC14158 de partida no era positivamente resistente a etanol en el ensayo de resistencia a etanol de este ejemplo 2.

- 15 La resistencia a cicloserina de ambos mutantes CHCC14255 y CHCC14254 se sometió a prueba según el ejemplo 1 anterior y ambos tuvieron positivamente la resistencia aumentada requerida a D-cicloserina tal como se requiere en el ejemplo 1.

- 20 Para CHCC14255, la cantidad de D-cicloserina que reduce el crecimiento medido a D.O.₆₀₀ al 50% en medio GJ-5 en comparación con la velocidad de crecimiento en medio GJ-5 sin D-cicloserina (es decir, con 0 µg/ml de D-cicloserina) era de alrededor de 100 µg/ml de D-cicloserina (véase la figura 1 en el presente documento).

Para CHCC14254, la cantidad de D-cicloserina que reduce el crecimiento medido a D.O.₆₀₀ al 50% en medio GJ-5 en comparación con el crecimiento en el medio GJ-5 sin D-cicloserina (es decir, con 0 µg/ml de D-cicloserina) era de alrededor de 100 µg/ml de D-cicloserina (véase la figura 1 en el presente documento).

EJEMPLO 4: Experimento de referencia/control

- 25 Se realizó mutagénesis por UV en una cepa de *Lactobacillus plantarum* CHCC12396. Es una cepa con propiedades similares a la cepa de *Lactobacillus plantarum* CHCC14158 que se usó como célula de partida en el ejemplo 3 anterior.

- 30 Se realizó un examen para etanol como en el ejemplo 3 anterior, sin embargo, después del análisis de más de 100 mutantes/colonias diferentes, no fue posible seleccionar un mutante con resistencia mejorada a etanol tal como se definió en el ejemplo 2 anterior.

Bibliografía

1: Documento US7625745B2 (Danstar Ferment, CH)

2: Bron *et al.*, 2002 Appl Environ Microbiol. 68:5663-5670

3: Documento US7112346 (Chr. Hansen A/S)

REIVINDICACIONES

1. Método para producir vino que comprende administrar a zumo de uva o vino una composición de *Lactobacillus plantarum* que comprende desde 10^4 hasta 10^{14} UFC/g de células de *Lactobacillus plantarum*, en el que la composición de *Lactobacillus plantarum* se caracteriza porque:
 - 5 (i): las células de *Lactobacillus plantarum* tienen una resistencia aumentada a D-cicloserina, en las que la cantidad de D-cicloserina que reduce el crecimiento medido a D.O._{.600} al 50% después de 24 horas a 18°C en medio GJ-5 que tiene la composición de

70,0 g de concentrado de zumo de uva, 30,0 g de pasta de levadura, 0,5 g de Tween 80, 0,1 g de MnSO₄H₂O y 900,0 g de agua del grifo,

10 en comparación con el crecimiento en medio GJ-5 sin D-cicloserina, es mayor de 70 µg/ml de D-cicloserina; y en el que

(ii): las células de *Lactobacillus plantarum* pueden crecer hasta una D.O._{.600} de al menos 0,8 después de 3 días de incubación a 25°C en el medio GJ-5 con etanol al 11%.
- 15 2. Método para producir vino según la reivindicación 1, en el que la cantidad de D-cicloserina que reduce el crecimiento medido al 50% es mayor de 80 µg/ml de D-cicloserina.
3. Método para producir vino según la reivindicación 2, en el que la cantidad de D-cicloserina que reduce el crecimiento medido al 50% es mayor de 90 µg/ml de D-cicloserina.
4. Método para producir vino según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células pueden crecer hasta una D.O._{.600} de al menos 0,8 en el medio GJ-5 con etanol al 12% en las condiciones del punto
 - 20 (ii) según la reivindicación 1.
5. Método para producir vino según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el vino es vino tinto, vino blanco o vino espumoso tal como cava/champán.
6. Método para producir vino según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se administran desde 10^4 UFC hasta 10^8 UFC de células de *Lactobacillus plantarum* por ml de zumo de uva o vino.
- 25 7. Método para la fermentación de granos de cacao que comprende inocular en los granos de cacao una composición de *Lactobacillus plantarum* que comprende desde 10^4 hasta 10^{14} UFC/g de células de *Lactobacillus plantarum*, en el que la composición de *Lactobacillus plantarum* se caracteriza porque:
 - 30 (i): las células de *Lactobacillus plantarum* tienen una resistencia aumentada a D-cicloserina, en las que la cantidad de D-cicloserina que reduce el crecimiento medido a D.O._{.600} al 50% después de 24 horas a 18°C, en medio GJ-5 que tiene la composición de 70,0 g de concentrado de zumo de uva, 30,0 g de pasta de levadura, 0,5 g de Tween 80, 0,1 g de MnSO₄H₂O y 900,0 g de agua del grifo,

en comparación con el crecimiento en el medio GJ-5 sin D-cicloserina, es mayor de 70 µg/ml de D-cicloserina;

y en el que

35 (ii): las células de *Lactobacillus plantarum* pueden crecer hasta una D.O._{.600} de al menos 0,8 después de 3 días de incubación a 25°C en el medio GJ-5 con etanol al 11%.
8. Método para producción de ensilaje que comprende inocular en un ensilaje una composición de *Lactobacillus plantarum* que comprende desde 10^4 hasta 10^{14} UFC/g de células de *Lactobacillus plantarum*, en el que la composición de *Lactobacillus plantarum* se caracteriza porque:
 - 40 (i): las células de *Lactobacillus plantarum* tienen una resistencia aumentada a D-cicloserina, en las que la cantidad de D-cicloserina que reduce el crecimiento medido a D.O._{.600} al 50% después de 24 horas a 18°C, en medio GJ-5 que tiene la composición de 70,0 g de concentrado de zumo de uva, 30,0 g de pasta de levadura, 0,5 g de Tween 80, 0,1 g de MnSO₄H₂O y 900,0 g de agua del grifo,

45 en comparación con el crecimiento en el medio GJ-5 sin D-cicloserina, es mayor de 70 µg/ml de D-cicloserina

y en el que

(ii): las células de *Lactobacillus plantarum* pueden crecer hasta una D.O._{.600} de al menos 0,8 después de 3 días de incubación a 25°C en el medio GJ-5 con etanol al 11%.

9. Método para examinar y aislar una célula de *Lactobacillus plantarum* que comprende las siguientes etapas:

(a): seleccionar y aislar a partir de un conjunto de células de *Lactobacillus plantarum* individuales un conjunto de células de *Lactobacillus plantarum* que tienen resistencia aumentada a D-cicloserina en las condiciones del punto (i) según la reivindicación 1; y

5 (b): seleccionar y aislar a partir del conjunto seleccionado de células resistentes a D-cicloserina de *Lactobacillus plantarum* de la etapa (a), una célula de *Lactobacillus plantarum* que tiene resistencia mejorada a etanol en las condiciones del punto (ii) según la reivindicación 1.

Figura 1:

