



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 323 087**

51 Int. Cl.:
C12N 1/20 (2006.01)
A23C 9/123 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06290284 .6**
96 Fecha de presentación : **20.02.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1820850**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.08.2007**

54 Título: **Nuevas cepas de *Lactobacillus helveticus*.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.07.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.07.2009

73 Titular/es: **Compagnie Gervais Danone**
17, boulevard Haussmann
75009 Paris, FR

72 Inventor/es: **Degivry, Marie-Christine;**
Álvarez Fernández, Christina;
Queguiner, Claire;
Mignot, Isabelle y
Saint-Denis, Thierry

74 Agente: **Buceta Facorro, Luis**

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

Nuevas cepas de *Lactobacillus helveticus*.

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a nuevas cepas de *Lactobacillus helveticus*, así como a sus aplicaciones en el campo agroalimentario. Más particularmente, la presente invención propone cepas de *Lactobacillus helveticus* que presentan grandes capacidades de producción de péptidos antihipertensión.

10 **Estado de la técnica**

La hipertensión afecta a una parte importante de la población. El uso del péptido VPP (Val Pro Pro) y de péptidos que contienen la secuencia VPP como agentes que pueden reducir la tensión arterial mediante inhibición de la enzima de conversión de la angiotensina (ACE) se ha descrito en el documento EP 0 583 074. Se ha descrito igualmente en la bibliografía un efecto similar del tripéptido IPP (Ile Pro Pro). Estos péptidos inhiben la ACE bloqueando su sitio activo e impidiendo así activar la angiotensina.

Se sabe que las dos secuencias VPP e IPP están presentes en la caseína beta bovina y que la hidrólisis adecuada de esta caseína (o más generalmente de la leche que la contiene) permite obtener dichos tripéptidos. Numerosos estudios en animales y en el ser humano han demostrado que la ingestión diaria de algunos miligramos de estos tripéptidos permite reducir eficazmente la tensión arterial, en particular en los sujetos hipertensos, reduciendo también el riesgo de accidente cardiovascular.

Péptidos procedentes de una leche fermentada por *Lactobacillus helveticus* han mostrado *in vivo* su efecto inhibidor de la ACE (ACEI) y han podido encontrarse estos péptidos a nivel de la aorta de las ratas que participaron en el estudio (Masuda O. *et al.*, 1996. J. Nutr. 126, 3063-8). Otros estudios también han mostrado más específicamente una disminución de la tensión arterial en ratas hipertensas tras la ingestión de péptidos procedentes de una leche fermentada por *L. helveticus* (Yamamoto N. *et al.*, 1994. Biosci. Biotech. Biochem. 58, 776-8).

En el ser humano, la misma leche fermentada también permitió disminuir la tensión arterial sistólica (Hata. *et al.*; 1996. Am. J. Clin. Nutr., 64, 767-71). Un estudio más reciente confirma que los péptidos presentes en el producto AMEAL S comercializado por la sociedad CALPIS reducen de manera significativa la tensión arterial en sujetos que tienen una tensión arterial superior a la normal (Mizuno *et al.*, 2005. British Journal of Nutrition; vol 94, número 1, 84-91).

En otro estudio reciente (Jauhiainen *et al.*; 2005. Am. J. of Hypertension, 18: 1600-1605) se expone la hipótesis según la cual el mecanismo de acción mencionado anteriormente (inhibición de la ACE), para explicar el efecto antihipertensivo de una leche fermentada por *L. helveticus*, podría no obstante no ser el mecanismo de acción determinante en el ser humano.

Una gran mayoría de *Lactobacillus helveticus* puede producir los tripéptidos IPP Y VPP mediante fermentación de la leche, pero las cantidades producidas pueden ser variables. El documento EP 1 016 709 describe un medio para producir los tripéptidos VPP e IPP mediante fermentación de la leche con ayuda de cepas de bacterias lácticas específicas que pertenecen a la especie *Lactobacillus helveticus*.

No obstante, es útil poder disponer de cepas que presenten capacidades para producir cantidades de tripéptidos VPP y/o IPP lo más elevadas posible.

50 **Objeto de la invención**

La presente invención propone cepas que presentan 1 tales capacidades. En particular, la presente invención propone cepas de *Lactobacillus helveticus* que permiten la preparación de productos alimenticios que presentan contenidos muy grandes en IPP y/o VPP.

Por cepa se entiende, en el sentido de la presente invención, cualquier cultivo, generalmente puro, de un microorganismo, obtenido a partir de una única célula o de una colonia aislada.

Por variante o mutante de una cepa X se entiende, en el sentido de la presente invención, cualquier cepa obtenida a partir de una cepa de referencia X. En el presente contexto, se utilizarán más particularmente los términos “variante” para designar una cepa obtenida principalmente mediante mutación y selección a partir de una cepa de referencia X, y “mutante” para designar más específicamente una cepa obtenida mediante técnicas de mutagénesis al azar o dirigida (por ejemplo transformación genética con ayuda de vectores), aplicadas a la cepa X.

Los mutantes o las variantes de las cepas según la presente invención se verán afectados evidentemente por la protección conferida por esta patente siempre que conserven los aspectos esenciales de la invención, especialmente la capacidad para producir grandes cantidades de IPP y/o VPP.

Por cepa con “fenotipo negativo para fructosa”, se entiende cualquier cepa que no tenga la capacidad de metabolizar la fructosa.

Por medio lácteo se entiende cualquier medio que contiene proteínas de la leche, por ejemplo una leche bovina normalizada al 4% en proteínas con leche bovina en polvo (descremada o no) o con leche concentrada.

Por producto lácteo, en el sentido de la presente invención, se entiende, además de la leche, cualquier producto derivado de la leche, tal como nata, helado, mantequilla, queso, yogur, leche fermentada; los productos secundarios, tales como lactosuero, caseína, así como diversos alimentos preparados que contienen como ingrediente principal leche o constituyentes de la leche. Entre los productos lácteos, los productos lácteos fermentados comprenden entre otros yogures, leches fermentadas, quesos blancos, kéfires, quesos, productos lácteos probióticos y más generalmente cualquier producto lácteo que se ha sometido a al menos una etapa de fermentación. Dicha leche es generalmente leche de vaca, pero puede ser igualmente leche de otros mamíferos, tales como cabra, oveja, yegua, camella, búfala.

Por producto alimenticio, en el sentido de la presente invención, se entiende cualquier producto destinado a la nutrición humana o animal. En particular, los productos alimenticios comprenden productos destinados a la alimentación de lactantes, niños, adolescentes y adultos. Los productos alimenticios según la invención pueden contener total o parcialmente al menos un producto lácteo fermentado según la invención. Los productos alimenticios según la invención pueden contener igualmente otros ingredientes habitualmente utilizados en la industria agroalimentaria, tales como aditivos, conservantes, frutas o extractos de frutas, aromas, colorantes, agentes de textura, cereales, trozos de chocolate, etc.

Por fermento se entiende, en el sentido de la presente invención, cualquier composición que contiene al menos una cepa viva de microorganismo susceptible de fermentar un medio dado. Entre los fermentos, los fermentos lácticos son composiciones que contienen al menos una cepa viva de microorganismo susceptible de fermentar un medio lácteo.

Según un modo de realización, la invención se refiere a la cepa de *Lactobacillus helveticus* I-3435 depositada el 25/05/05 en la CNCM (Colección nacional de cultivos de microorganismos), 28 rue du Docteur Roux, 75724 París, Francia, según las disposiciones del tratado de Budapest.

Según un modo de realización, la presente invención se refiere a las variantes y los mutantes de la cepa de *Lactobacillus helveticus* I-3435 depositada el 25/05/05 en la CNCM (Colección nacional de cultivos de microorganismos), 28 rue du Docteur Roux, 75724 París, Francia, según las disposiciones del Tratado de Budapest, que pueden, mediante fermentación a una temperatura de entre 30 y 45°C, más preferentemente entre 32 y 40°C e incluso más preferentemente a 37°C de un medio lácteo con un contenido total en proteínas superior o igual al 2% (p/p), preferentemente entre el 2 y el 10% (p/p), más preferentemente entre el 2,5 y el 6% e incluso más preferentemente igual al 4%, producir los tripéptidos de secuencia IPP y/o VPP en grandes concentraciones.

Un modo para expresar la concentración en tripéptidos de manera sencilla es expresarla en concentración equivalente de VPP [VPPEq].

Se expresa en mg/kg: $[VPPEq] = [VPP] + (9/5 \times [IPP])$

Así, según un modo de realización, las cepas de *Lactobacillus helveticus* según la invención pueden ventajosamente, mediante fermentación, producir los tripéptidos de secuencia IPP y/o VPP en una cantidad de al menos 65 mg, preferentemente al menos 70 mg, preferentemente al menos 75 mg, preferentemente al menos 80 mg, preferentemente al menos 85 mg, preferentemente al menos 90 mg de VPPEq por kg de producto fermentado.

Tales cantidades de VPP y/o IPP se obtienen generalmente mediante fermentación por una cepa según la invención a una temperatura de entre 30 y 45°C, preferentemente entre 31 y 44°C, preferentemente entre 32 y 43°C, preferentemente entre 33 y 42°C, preferentemente entre 34 y 41°C, preferentemente entre 35 y 40°C y más preferentemente a 37°C, de un medio lácteo con un contenido total en proteínas superior o igual al 2% (p/p), preferentemente entre el 2 y el 10% (p/p), más preferentemente entre el 2,5 y el 6% (p/p) e incluso más preferentemente igual al 4% (p/p).

Según un modo de realización, las cepas de *Lactobacillus helveticus* según la invención presentan además un fenotipo negativo para fructosa. En efecto, la fructosa tiene un gran poder edulcorante y es un ingrediente útil en los productos alimenticios. Por tanto, si no puede degradarse la fructosa por la cepa de *Lactobacillus helveticus*, el producto alimenticio conserva excelentes propiedades organolépticas y ventajosamente se controlará mejor el pH final en el caso en el que el producto alimenticio contenga una preparación de fruta(s), especialmente trozos y/o zumo de fruta(s).

Según un modo de realización, la presente invención se refiere a un producto alimenticio, especialmente un producto lácteo fermentado, que comprende al menos una cepa de *Lactobacillus helveticus* según la invención.

De manera ventajosa, según un modo de realización, dicho producto alimenticio contiene al menos 10^6 , preferentemente al menos 10^7 , preferentemente al menos 10^8 UFC/ml de bacterias *Lactobacillus helveticus* vivas. Por tanto, el producto alimenticio según la invención contiene una biomasa importante.

Alternativamente, el producto alimenticio según la invención puede someterse a termización, de manera que se estabiliza su pH. Igualmente, puede utilizarse posteriormente un producto alimenticio de este tipo como ingrediente en otro producto alimenticio.

Además, el producto alimenticio según la invención puede contener preparaciones de fruta(s), especialmente trozos y/o zumo de fruta(s).

Según un modo de realización, dicho producto alimenticio contiene al menos 25 mg, preferentemente al menos 30 mg, preferentemente al menos 35 mg, preferentemente al menos 40 mg, preferentemente al menos 45 mg, preferentemente al menos 50 mg, preferentemente al menos 55 mg, preferentemente al menos 60 mg, preferentemente al menos 65 mg, preferentemente al menos 70 mg, preferentemente al menos 75 mg, preferentemente al menos 80 mg, preferentemente al menos 85 mg, preferentemente al menos 90 mg de VPPEq por kg de producto alimenticio.

Según un modo de realización, el producto alimenticio según la invención comprende además preparaciones de fruta(s), especialmente trozos y/o zumo de fruta(s).

Ventajosamente según un modo de realización, el producto alimenticio según la invención presenta propiedades antihipertensivas.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de un producto alimenticio.

Según un modo de realización, dicho procedimiento comprende las etapas siguientes:

- seleccionar una materia prima que contiene proteínas de la leche, especialmente proteínas que contienen las secuencias peptídicas IPP y/o VPP;
- seleccionar al menos una cepa de *Lactobacillus helveticus* según la invención,
- sembrar dicha materia prima con dicha cepa,
- fermentar dicha materia prima durante 12-30 horas a 30-45°C,
- opcionalmente, someter a termización el producto fermentado obtenido.

Según un modo de realización, el procedimiento según la invención puede carecer de cualquier etapa de termización tras la fermentación. Esto permite conservar bacterias vivas en el producto alimenticio (probiótico).

Según otro modo de realización, dicho procedimiento puede comprender una etapa de termización.

Descripción detallada de la invención

La invención se describirá adicionalmente con ayuda de los ejemplos siguientes, que no son limitativos.

Ejemplos de realización

Ejemplo 1

Caracterización de una cepa según la invención

La cepa I-3435 ha sido objeto de depósitos en la CNCM (Colección nacional de cultivos de microorganismos), 28 rue du Docteur Roux, 75724 París, Francia, según las disposiciones del Tratado de Budapest el 25/05/05.

Ejemplo 2

Medición de las propiedades de acidificación

Se evalúan las propiedades de acidificación tal como sigue:

Se somete a pasteurización un medio que contiene 120 g de leche descremada en polvo (PLE) en 930 ml de agua durante 10 min. a 95°C. Se siembra este medio al 0,5%, después se somete a fermentación a 37°C. Después se realiza un seguimiento del pH en función del tiempo.

Se utilizará una extracción de muestras del medio fermentado realizada a las 30 h de fermentación para las mediciones de la producción de los tripéptidos IPP y VPP así como para las mediciones de la actividad ACEI cuyos resultados se facilitarán a continuación.

Los resultados presentados en la figura 1 muestran las propiedades de acidificación de una cepa según la invención.

ES 2 323 087 T3

Ejemplo 3

Medición de la producción de los tripéptidos IPP y VPP

5 Material y método

Se utiliza una muestra de medio lácteo (extracción de muestra a las 30 horas de fermentación), tal como se describió anteriormente en el ejemplo 2, para hacer esta medición.

10 Se realiza el análisis del contenido en péptidos, especialmente el contenido en tripéptidos IPP y VPP, con un método de cromatografía de líquidos HPLC acoplada a un detector de tipo EM/EM tal como se describe a continuación:

15 - Debido a interferencias inherentes al análisis de muestras complejas, es muy aconsejable el uso de patrones internos deuteriados añadidos en una cantidad conocida y controlada en el momento de la preparación de la muestra.

- Se realiza la preparación de la muestra mediante dilución del medio fermentado en una mezcla de agua, de metanol y de ácido trifluoroacético (50/50/0,1%), que contiene 25 ppm de patrón interno de VPP deuteriado (denominado a continuación VPPd, de fórmula H-Val[D8]-Pro-Pro-OH, MM = 319,45 g/mol, disponible de la sociedad Bachem Chemicals, Francia) y 10 ppm de patrón interno de IPP deuteriado (denominado a continuación IPPd, de fórmula H-Ile[D10 N15]-Pro-Pro-OH, MM = 336,2 g/mol, disponible de la sociedad NEOMPS, Grupo SNPE, 7 rue de Boulogne, 67100 Estrasburgo, Francia) en una razón de 1 con respecto a 3 (por ejemplo, pesada con precisión en un tubo Eppendorf de 600 mg de muestra en 1200 mg de mezcla agua-metanol-TFA que contiene los patrones internos).

25 - A continuación se centrifuga esta muestra diluida a 14.000 g durante 15 minutos. A continuación se diluye con precisión el sobrenadante transparente obtenido, que contiene los péptidos generados durante la fermentación, a 1/50 en una mezcla de agua-metanol. (50/50, v/v) que contiene el 0,1% de ácido trifluoroacético.

30 - A continuación se analiza la disolución así obtenida en un sistema cromatográfico HPLC de tipo Agilent 1100 (sociedad Agilent Technologies France, 1 rue Galvani 91745 Massy cedex, Francia), equipado con una columna adaptada para el análisis de los péptidos, de tipo Waters Biosuite® (3 mm 2,1 x 150 mm, C18 PA-A, WAT186002427, Waters France, 5, Rue Jacques Monod, 78280 Guyancourt) a la temperatura de 50°C, caudal de 0,25 ml/min. Se eluyen los péptidos de manera clásica con un gradiente cruzado de disolvente B (acetonitrilo + 0,100% de ácido fórmico) en el disolvente A (agua + 0,106% de ácido fórmico), a lo largo de una duración de 35 min. a 2 horas en función de la resolución cromatográfica deseada.

35 El método adaptado para la dosificación de los péptidos IPP y VPP utiliza el siguiente gradiente:

Tiempo	% de tampón A	% de tampón B
0	100	0
3	96	4
45 6	89	11
15	60	40
18	0	100
50 21	100	0
24	0	100
55 27,5	100	0
35	100	0

60 - Se realiza la detección con ayuda de un detector específico de tipo EM/EM, por ejemplo con un aparato con trampa de iones tal como el Esquire3000+ (Bruker Daltonique, rue de l'Industrie, 67166 Wissembourg Cedex), parametrado en ionización por electropulverización en modo positivo, o bien mediante el análisis global del contenido peptídico (modo EM-EM), o bien para la cuantificación con precisión y específica de un péptido a partir de sus fragmentos característicos (modo MRM). En el caso de la dosificación de los péptidos IPP y VPP, pero también de los patrones internos IPPd y VPPd, se aíslan estos péptidos a partir de su masa específica (iones monocargados 312,2 Da para VPP; 326,2 Da para IPP; 320,2 Da para VPPd; 337,3 Da para IPPd) y se cuantifican a partir de la intensidad de sus iones específicos tras la fragmentación (fragmentos ≥ 85 Da).

ES 2 323 087 T3

La integración de los picos cromatográficos de cada uno de los péptidos IPP, VPP y la comparación con las superficies de pico de los patrones internos de concentraciones conocidas IPPd y VPPd permiten calcular a continuación, mediante regresión lineal simple, el contenido inicial de la muestra en VPP e IPP (generalmente expresado en mg/kg o ppm).

Resultados

	VPPeq (mg/kg de medio fermentado)
Calpis CM4	51
CNRZ 244	57
I-3435	90

La figura 2 muestra una comparación de la producción de tripéptidos IPP y VPP de la cepa I-3435 con respecto a dos cepas de la técnica anterior.

La cepa CM4 de la sociedad CALPIS se describe en la patente EP 1 016 709 mientras que la cepa CRNZ 244 se describe en la solicitud de patente WO 2004/060073.

En esta figura queda claro que la cepa I-3435 (cepa según la invención) tiene una producción de tripéptidos IPP y VPP muy superior a la de estas dos cepas anteriores en las mismas condiciones.

Ejemplo 4

Medición de la actividad ACEI (inhibición de la enzima de conversión de la angiotensina)

Material y método

Para hacer esta medición se utiliza una muestra de medio lácteo (extracción de muestra a las 30 horas de fermentación), tal como se describió anteriormente en el ejemplo 2.

El presente método se basa en el método de Cushman y Cheng (Cushman *et al.* Biochem. Pharmacol. 1971. 20: 1637), adaptado para hacerlo compatible con muestras de tipo de productos lácteos fermentados.

1. Preparación de los reactivos y las disoluciones

1.1 Tampón borato de sodio 0,1 M pH 8,3, con adición de 0,3 M de NaCl

Pesar 6,1843 g de H3BO3 (Carlo Erba ref: 402 766). Disolver en aproximadamente 800 ml de agua desmineralizada, ajustar a pH 8,3 con una disolución de NaOH y después añadir 12,0 g de NaCl (concentración final de 0,3 M) y completar a 1 litro con el agua desmineralizada.

1.2 Preparación del sustrato HHL: disolución de Hip-His-Leu a 5 mM en tampón borato de sodio 0,1 M pH 8,3 con 0,3 M de NaCl

Pesar exactamente 42,95 mg de péptido HHL anhidro (tetrahidrato de N-Hipuril-Histidil-Leucina PM: 501,5 g, Sigma-Aldrich ref: 53285-250 mg) y disolver en aproximadamente 15 ml de tampón borato de sodio 0,1 M pH 8,3 con 0,3 M de NaCl y después completar a 20 ml con este mismo tampón.

1.3 Preparación de la disolución de ACE a 0,1 U/ml

Se solubiliza la enzima de conversión de la angiotensina en forma de polvo liofilizado (origen: pulmones de conejo, Sigma-Aldrich ref A6778, 0,25 unidades) en 2,5 ml de tampón borato de sodio 0,1 M pH 8,3 para obtener una disolución a 0,1 U/ml. Debe utilizarse la disolución así preparada, almacenada a 4°C, como máximo 2 semanas para conservar una actividad enzimática suficiente.

2. Preparación de las muestras de leche fermentada

Es necesario acondicionar la muestra a un pH comprendido entre 8,0 y 8,5 de manera que esté próximo al pH óptimo de la ACE. En primer lugar se centrifuga la leche fermentada, a continuación se ajusta el pH del sobrenadante a entre 8,0 y 8,5 (de manera ideal pH 8,3) y después se somete a ultrafiltración con ayuda de una unidad de filtración Vivaspín con un umbral de corte de 10.000 Daltons (Vivascience, Francia) con el fin de eliminar los elementos de interferencia (proteínas enteras, sales de calcio).

El protocolo completo es el siguiente:

- Depositar aproximadamente 6 ml de leche fermentada en un tubo Falcon de 15 ml tras haber pesado previamente el tubo vacío. Pesar la cantidad de leche fermentada depositada en el tubo.

- Centrifugar a 14.000 g durante 10 min. a 10°C.

- Recuperar el sobrenadante.

- Cuantificar la proporción sedimento/sobrenadante lo que permite si es necesario determinar la CI50 equivalente al producto de origen y no sólo a su sobrenadante.

- Extraer 2,0 ml de sobrenadante en un tubo de ensayo y medir el pH.

- Añadir el volumen necesario de NaOH 2 M con el fin de obtener un pH comprendido entre 8,0 y 8,5 (objetivo: 8,3) tras la adición del tampón borato, después agitar.

- Añadir el volumen necesario de tampón borato para diluir el sobrenadante de partida a teniendo en cuenta el volumen exacto de NaOH añadido (por ejemplo: toma de ensayo de sobrenadante = 2 ml + 250 µl de NaOH + 1,75 ml de tampón borato).

- Verificar que el pH final está comprendido entre 8,0 y 8,5. Más allá, volver a comenzar añadiendo más o menos NaOH. Se forma un precipitado: se debe a las sales de calcio.

- Someter a ultracentrifugación la muestra a 12.000 g durante 15 min. a 10°C con ayuda de unidades de filtración Vivaspín de 10.000 Daltons (capacidad de 4-6 ml) con el fin de obtener una muestra limpia.

3. Medición de la inhibición de la ACE por las muestras de leches fermentadas

Durante cada serie de análisis, deben prepararse referencias testigos control (el 0 y el 100% de actividad ACE). Para cada muestra, se realizan dos ensayos independientes y una muestra en blanco para cada dilución. En efecto, debe ajustarse lo más posible (mediante dilución) la cantidad de muestra necesaria para disminuir en un 50% la actividad de la ACE.

Para ello:

- Depositar 80 µl de la muestra acondicionada pH 8,3 en el tubo de blanco y en los tubos de ensayo.

- Depositar 80 µl de agua desmineralizada en los tubos control al 0 y al 100%.

- Añadir 200 µl de la disolución de sustrato HHL a 5 mM en todos los tubos. Agitar.

- Colocar los tubos en un baño de agua termostataado a 37°C, dejar que se equilibre la temperatura.

- Desencadenar la reacción enzimática mediante adición en cada tubo de 20 µl de la disolución de ACE a 0,1 U/ml, salvo para las muestras en blanco y el control al 0% para los cuales deben depositarse 20 µl de tampón borato pH 8,3.

- Dejar hidrolizar durante 1 h exactamente a 37°C.

- Detener la reacción añadiendo en cada tubo 250 µl de la disolución de HCl 1 M.

ES 2 323 087 T3

Tabla recapitulativa de la composición de los diferentes medios de reacción:

	Toma de ensayo	Adición de sustrato	Desencadenamiento de la hidrólisis
Control al 100%	80 µl de agua desmineralizada	200 µl de HHL	20 µl de ACE
Control al 0%	80 µl de agua desmineralizada	200 µl de HHL	20 µl de tampón borato
Muestra (ensayo)	80 µl de muestra	200 µl de HHL	20 µl de ACE
Muestra en blanco	80 µl de muestra	200 µl de HHL	20 µl de tampón borato

Se realiza la lectura mediante extracción del sustrato hidrolizado (ácido hipúrico) y su cuantificación con ayuda de un espectrofotómetro, con el protocolo siguiente:

Añadir en cada tubo 1,7 ml de acetato de etilo, agitar.

Centrifugar a 2.000 g durante 5 min. a 10°C

Extraer exactamente 1 ml del sobrenadante en un microtubo Eppendorf

Evaporar el acetato de etilo a 120°C durante 10 min. en un bloque de calentamiento

Añadir exactamente 1 ml de agua desmineralizada y después agitar durante 10 seg. para recuperar el ácido hipúrico.

Leer la absorbancia a 228 nm en cubas adaptadas para la lectura en el UV.

Expresión de los resultados

El porcentaje de inhibición de la ACE se calcula tal como sigue:

$$\frac{(\text{Abs de ctl al 100\%} - \text{Abs de ctl al 0\%}) - (\text{Abs de mues} - \text{Abs de mues en blanco})}{(\text{Abs de ctl al 100\%} - \text{Abs de ctl al 0\%})} \times 100$$

Con Abs = absorbancia a 228 nm tras la extracción del ácido hipúrico

ctl = control

mues = muestra

Para una leche fermentada, se expresa la CI50 como la cantidad de sobrenadante de esta leche fermentada que inhibe el 50% de la actividad enzimática de la ACE en el medio de reacción, es decir en microlitros de sobrenadante de leche fermentada por mililitro de medio de reacción.

Resultados

La figura 3 muestra una comparación de la actividad inhibidora de la enzima de conversión de la angiotensina de las diferentes cepas según la presente invención comparadas con cepas de la técnica anterior.

En las ordenadas se expresa la concentración equivalente de leche fermentada por ml de medio de reacción necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la enzima de conversión de la angiotensina (CI50). Cuanto más elevada es esta concentración, menos capacidad tiene por tanto la cepa para inhibir la enzima de conversión de la angiotensina.

Ejemplo 5

Preparación de un producto lácteo (probiótico) según la invención

Se normaliza en cuanto a proteínas (4,0%) leche a granel, previamente descremada, previamente pasteurizada y enfriada a 4°C, con leche descremada en polvo. Se somete el medio lácteo así preparado a una pasteurización (95°C-8 min.). Tras el enfriamiento a 32°C, se siembra el medio lácteo con la cepa I-3435 a una razón de 10⁷ UFC/ml y se mantiene a 32°C durante toda la duración de la fermentación. Cuando se alcanza el pH 3,5, se retira la cuajada de la cuba de fermentación para someterla a un alisado (mediante paso a través de un filtro) y se enfría hasta 10°C en un intercambiador de placas. A continuación se añade a la cuajada alisada y enfriada una preparación de frutas (que tiene un pH de entre 4 y 4,1) a una razón del 15% del producto acabado, acondicionada en copos de 110 ml y almacenada a 4°C durante 28 días. El producto así preparado contiene tripéptidos de secuencia IPP/VPP a una razón de 90 mg/kg de equivalente de VPP. El contenido en péptidos del producto es estable durante toda la duración de vida del producto.

Referencias citadas en la memoria

Esta lista de referencias citadas por el solicitante se dirige únicamente a ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Incluso si se ha procurado el mayor cuidado en su concepción, no se pueden excluir errores u omisiones y el OEB declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente mencionados en la memoria

- EP 0583074 A (0002)
- WO 2004060073 A (0011)
- EP 1016709 A (0002)(0011)

Documentos no patentados citados en la descripción

- MASUDA O. *et al. J. Nutr.* 1996 vol. 126, 3063-8 (0002)
- YAMAMOTO N. *et al. Biosci. Biotech. Biochem.*, 1994, vol. 58, 776-8 (0002)
- HATA *et al. Am. J. Clin. Nutr.*, 1996 vol. 64, 767-71 (0002)
- MIZUNO *et al. British Journal of Nutrition*, 2005, vol. 94 (1), 84-91 (0002)
- JAUHIAINEN *et al. Am. J. Of Hypertension*, 2005, vol. 18, 1600-1605 (0002)
- CUSHMAN *et al. Biochem. Pharmacol.*, 1971, vol. 20, 1637 (0012)

REIVINDICACIONES

- 5 1. Cepa de *Lactobacillus helveticus* 1-3435 depositada el 25.05.05 ante la CNCM (Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos), 28 rue du Docteur Roux, 75724 París, Francia, según las disposiciones del Tratado de Budapest, sus variantes y sus mutantes que pueden, mediante fermentación a una temperatura de entre 30 y 45°C, de un medio lácteo con un contenido total en proteínas superior o igual al 2% (p/p), producir los tripéptidos de secuencia IPP y/o VPP en una cantidad de al menos 65 mg de VPPEq por kg de producto fermentado.
- 10 2. Cepa de *Lactobacillus helveticus* según la reivindicación 1, pudiendo dichas variantes y mutantes, mediante fermentación a una temperatura de entre 30 y 45°C, de un medio lácteo con un contenido total en proteínas superior o igual al 2% (p/p), producir los tripéptidos de secuencia IPP y/o VPP en una cantidad de al menos 70 mg de VPPEq por kg de producto fermentado.
- 15 3. Cepa de *Lactobacillus helveticus* según la reivindicación 1, pudiendo dichas variantes y mutantes, mediante fermentación a una temperatura de entre 30 y 45°C; de un medio lácteo con un contenido total en proteínas superior o igual al 2% (p/p), producir los tripéptidos de secuencia IPP y/o VPP en una cantidad de al menos 75 mg de VPPEq por kg de producto fermentado.
- 20 4. Cepa de *Lactobacillus helveticus* según la reivindicación 1, pudiendo dichas variantes y mutantes, mediante fermentación a una temperatura de entre 30 y 45°C, de un medio lácteo con un contenido total en proteínas superior o igual al 2% (p/p), producir los tripéptidos de secuencia IPP y/o VPP en una cantidad de al menos 80 mg de VPPEq por kg de producto fermentado.
- 25 5. Cepa de *Lactobacillus helveticus* según la reivindicación 1, pudiendo dichas variantes y mutantes, mediante fermentación a una temperatura de entre 30 y 45°C, de un medio lácteo con un contenido total en proteínas superior o igual al 2% (p/p), producir los tripéptidos de secuencia IPP y/o VPP en una cantidad de al menos 85 mg de VPPEq por kg de producto fermentado.
- 30 6. Cepa de *Lactobacillus helveticus* según la reivindicación 1, pudiendo dichas variantes y mutantes, mediante fermentación a una temperatura de entre 30 y 45°C, de un medio lácteo con un contenido total en proteínas superior o igual al 2% (p/p), producir los tripéptidos de secuencia IPP y/o VPP en una cantidad de al menos 90 mg de VPPEq por kg de producto fermentado.
- 35 7. Cepa de *Lactobacillus helveticus* según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que presenta además un fenotipo de fructosa menos.
8. Uso de una cepa de *Lactobacillus helveticus* según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para la preparación de un producto alimenticio o farmacéutico, especialmente de un producto lácteo fermentado.
- 40 9. Uso según la reivindicación 8, tal que dicho producto alimenticio o farmacéutico tiene propiedades antihipertensivas.
10. Producto alimenticio, especialmente producto lácteo fermentado, que comprende al menos una cepa de *Lactobacillus helveticus* según una de las reivindicaciones 1-7.
- 45 11. Producto alimenticio según la reivindicación 10, que contiene al menos 10^6 UFC/mL de bacterias *Lactobacillus helveticus* vivas.
- 50 12. Producto alimenticio según la reivindicación 10, que contiene al menos 10^7 UFC/mL de bacterias *Lactobacillus helveticus* vivas.
13. Producto alimenticio según la reivindicación 10, que contiene al menos 10^8 UFC/mL de bacterias *Lactobacillus helveticus* vivas.
- 55 14. Producto alimenticio según la reivindicación 10, que contiene al menos 25 mg de VPPEq por kg de dicho producto alimenticio.
15. Producto alimenticio según la reivindicación 10, que contiene al menos 50 mg de VPPEq por kg de dicho producto alimenticio.
- 60 16. Producto alimenticio según la reivindicación 10, que contiene al menos 75 mg de VPPEq por kg de dicho producto alimenticio.
- 65 17. Producto alimenticio según la reivindicación 10, que contiene al menos 90 mg de VPPEq por kg de dicho producto alimenticio.

ES 2 323 087 T3

18. Producto alimenticio según una cualquiera de las reivindicaciones 10-17, que comprende además preparaciones de fruta(s), especialmente trozos y/o zumo de fruta(s).

19. Producto alimenticio según una cualquiera de las reivindicaciones 10-18, que presenta propiedades antihipertensivas.

20. Procedimiento de preparación de un producto alimenticio que comprende las siguientes etapas:

- seleccionar una materia prima que contiene proteínas de la leche, especialmente proteínas que contienen las secuencias peptídicas IPP y/o VPP;
- seleccionar al menos una cepa de *Lactobacillus helveticus* según una de las reivindicaciones 1-7,
- sembrar dicha materia prima con dicha cepa,
- fermentar dicha materia prima durante 12-30 horas a 30-45°C,
- opcionalmente, someter a termización el producto fermentado obtenido.

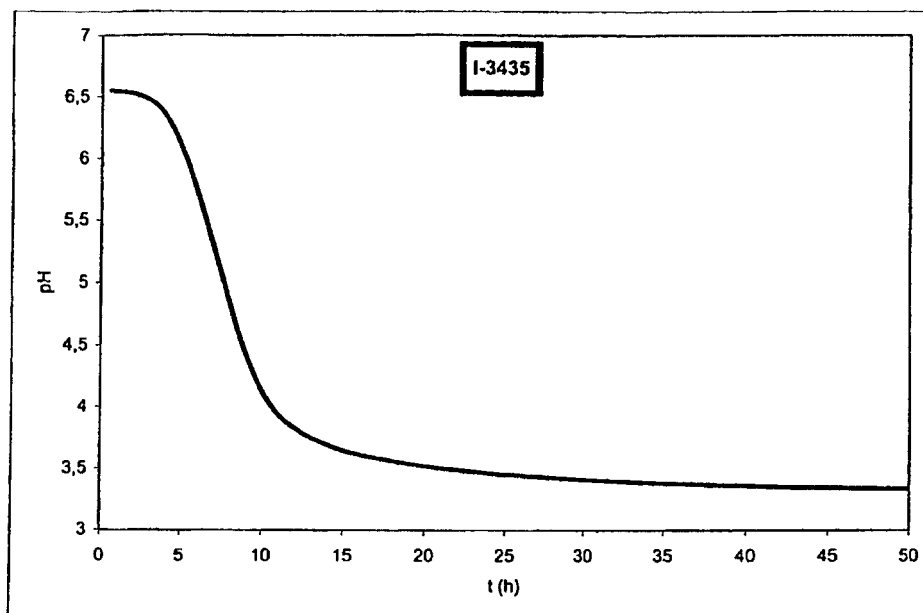


Figura 1

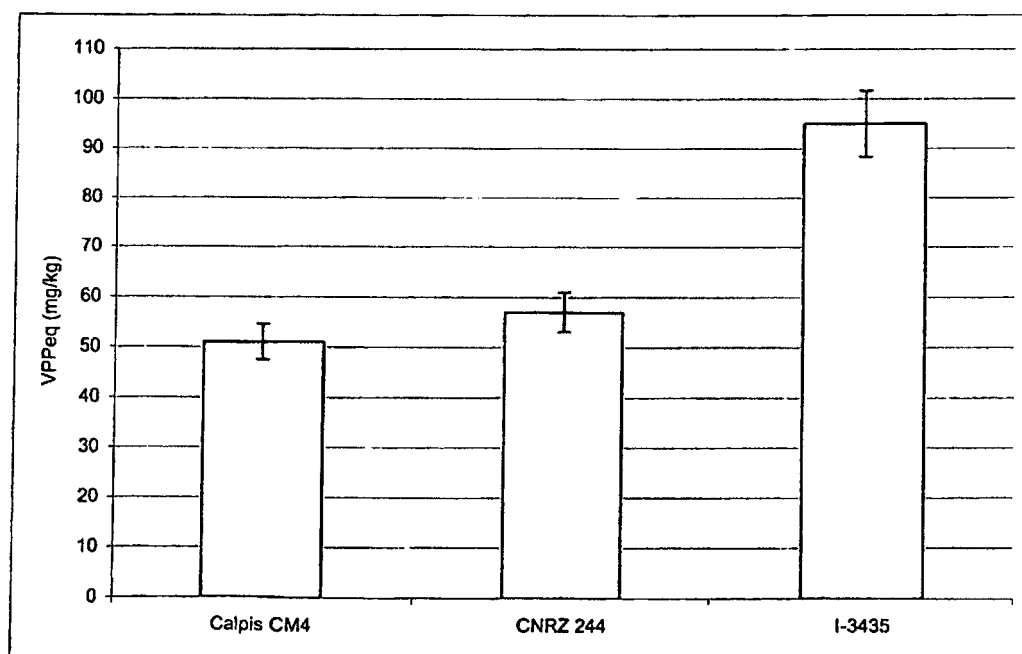


Figura 2

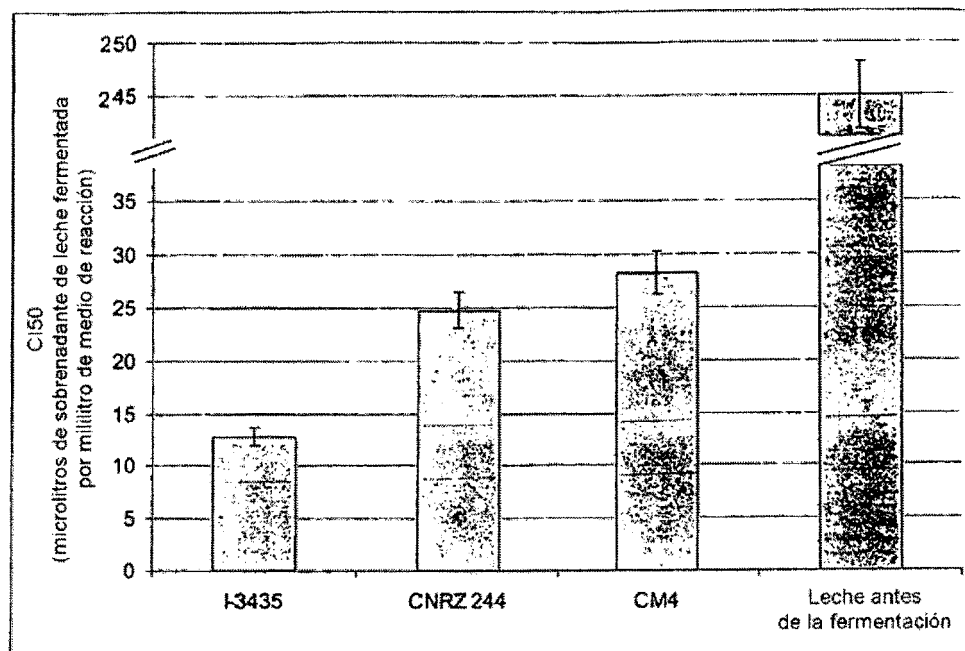


Figura 3