



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 249 242**

(51) Int. Cl.:

A23C 9/123 (2006.01)

A23C 20/02 (2006.01)

A23C 11/10 (2006.01)

A23C 21/02 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

(96) Número de solicitud europea: **00900164 .5**

(96) Fecha de presentación : **11.01.2000**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1142481**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **10.10.2001**

(54) Título: **Procedimiento para producir leche fermentada que contiene un péptido inhibidor de la enzima de conversión de la angiotensina y procedimiento para producir suero lácteo.**

(30) Prioridad: **11.01.1999 JP 11-3946**

(73) Titular/es: **Calpis Co., Ltd.**
4-1, Ebisu-Minami 2-chome
Shibuya-ku, Tokyo 150-0022, JP

(45) Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.04.2006**

(72) Inventor/es: **Kitamura, Shuji y**
Ueyama, Takashi

(45) Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **12.02.2010**

(45) Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **12.02.2010**

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 249 242 T5

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para producir leche fermentada que contiene un péptido inhibidor de la enzima de conversión de la angiotensina y procedimiento para producir suero lácteo.

La presente invención se refiere a un método para producir suero que contiene un péptido inhibidor de la enzima de conversión de la angiotensina que permite la separación y producción eficaz de suero que contiene un péptido inhibidor de la enzima de conversión de la angiotensina.

La enzima de conversión de la angiotensina (abreviado como "ACE" de aquí en adelante) se encuentra principalmente en pulmones y células del endotelio vascular. ACE actúa sobre angiotensina I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Pro-Phe-His-Leu), que se ha generado mediante digestión con renina, para liberar un dipéptido (His-Leu) de su terminal C, dando así angiotensina II, que causa contracción del músculo liso vascular y tiene efecto hipertensor fuerte. Esta enzima también descompone e inactiva bradicina, que tiene efecto hipotensor. Tal ACE produce péptido hipertensor (angiotensina II) y al mismo tiempo inactiva el péptido hipotensor (bradicina), de modo que presenta efecto hipertensor. Por lo tanto, el inhibidor de la enzima de conversión de la angiotensina (abreviado como ACEI de aquí en adelante), que inhibe la actividad de ACE, tiene efecto inhibidor de hipertensión.

Como ACEI, hay péptidos conocidos que tienen de tres a diez residuos de aminoácidos incluyendo Val-Pro-Pro (patente japonesa N° 2.782.142) y un tripéptido Ile-Pro-Pro (JP-A-3-120.225). También hay un péptido conocido que tiene actividad ACEI, que se produce por digestión de caseína de leche por proteasa producida por bacteria ácido láctica, y se encuentra en estado disuelto en suero de leche fermentada (J. Dairy Sci. 78, 6, p1253-1257, 1995).

Tales péptidos como ACEI se pueden tomar en la forma de leche fermentada *per se* que contiene Val-Pro-Pro y/o Ile-Pro-Pro. Sin embargo, en vista de la concentración y dosis eficaz de los péptidos como ACEI en la leche fermentada, es necesario tomar una cantidad considerable de leche fermentada. Así, se demanda el desarrollo de un método para producir leche fermentada o suero que contiene una gran cantidad de ACEI.

Se sabe que ACEI tal como Val-Pro-Pro y/o Ile-Pro-Pro es altamente seguro y así se puede usar en fármacos, alimentos funcionales, alimentos saludables, y similares. Para producir Val-Pro-Pro y/o Ile-Pro-Pro, hay un método propuesto que incluye las etapas de cultivar bacteria ácido láctica en un medio que contiene péptidos y/o proteínas que tienen unidades Val-Pro-Pro y/o Ile-Pro-Pro para preparar leche fermentada, y purificar la leche fermentada (patente japonesa N° 2.782.153).

La fermentación convencional ácido láctica, por ejemplo para la producción de productos de leche fermentada típicos tal como yogur, se lleva a cabo mezclando bacteria iniciadora y un material de inicio agitando para formar una mezcla uniforme, y después fermentando la mezcla bajo condiciones estáticas para hacer el producto resultante como una unidad en la forma de una cuajada. Se cree que se requieren tales condiciones estáticas porque, cuando un líquido de fermentación está a pH reducido debido a la proliferación fermentativa de bacteria ácido láctica, la aplicación de vibración, tal como agitando o removiendo, a tal líquido de fermentación causará salida de suero y textura basta en los productos de leche fermentada que resultan. Además, las bacterias ácido lácticas para la fermentación ácido láctica son anaerobias facultativas, por lo que su crecimiento a menudo se inhibe por el oxígeno. En consecuencia, nunca se ha tenido la intención de efectuar el cultivo agitando durante el periodo donde se requiere la fermentación ácido láctica bajo condiciones estáticas. En producción de queso, también, la fermentación se lleva a cabo mezclando bacteria iniciadora y un material de inicio agitando para formar una mezcla uniforme, fermentando la mezcla bajo condiciones estáticas, y después coagulando caseína mediante la acción de cuajo bajo condiciones estáticas, después de lo cual la mezcla se agita y se prensa para eliminar el suero.

Se requiere la mejora en la recuperación de suero para purificación industrial de suero a partir de leche fermentada seguida de concentración de sus componentes activos. Hasta ahora se han propuesto una variedad de métodos para recuperar la fracción cuajada de la leche fermentada, pero la separación efectiva del suero de la leche fermentada casi no se ha llevado a cabo hasta hoy.

Es un objeto de la presente invención proporcionar métodos para preparar suero que contiene un péptido ACEI que permite la producción eficaz a alto rendimiento de suero que tiene alto contenido de un péptido ACEI que es altamente seguro y aplicable a fármacos, alimentos funcionales, alimentos saludables, y similares.

Según la presente invención, se proporciona el método de la reivindicación 1 adjunta.

Según la presente invención, también se proporciona el método de la reivindicación 2 adjunta.

Ahora se explicará la presente invención en detalle.

Los presentes métodos incluyen la etapa de mezclar bacterias ácido lácticas que comprenden *Lactobacillus helveticus* y un material de inicio que contiene leche agitando para preparar un material mezclado.

La leche como un material de inicio puede ser, por ejemplo, leche animal tal como leche de vaca, leche de cabra, o leche de oveja; leche vegetal tal como leche de soja; o leche animal o vegetal procesada tal como leche desnatada,

leche reconstituida, leche en polvo, o leche condensada. Estas se pueden usar como una mezcla. Tal leche contiene péptidos y proteínas que tienen unidades Val-Pro-Pro y/o Ile-Pro-Pro.

El contenido sólido de la leche no está particularmente limitado. Por ejemplo, cuando se usa leche desnatada para producción de leche fermentada, el contenido de sólidos no grasos de la leche es normalmente aproximadamente 9% en peso. Sin embargo, considerando la productividad por facilidad, el contenido de sólidos no grasos de la leche preferentemente se eleva a un cierto grado para mantener el coste de producción a un nivel más bajo. Cuando en leche con contenido de sólidos no grasos de 13% en peso o más alto sólo se lleva a cabo la fermentación ácido láctica bajo condiciones estáticas normales, la viscosidad de la leche fermentada que resulta se hace alta, lo que causará dificultades en la separación del suero. Así, el contenido de sólidos no grasos de la leche no se puede elevar en la fermentación estática normal. Por el contrario, los métodos de la presente invención mantienen la leche fermentada que resulta a viscosidad baja incluso con contenido de sólidos no grasos de la leche de 15% en peso o más alto, ya que la fermentación en los presentes métodos viene acompañada de agitación, como se discutirá más tarde. Así, se puede obtener suero fácil y eficazmente.

En los métodos de la presente invención, el material de inicio opcionalmente puede contener otros materiales a parte de leche siempre que se logre el objeto de la presente invención. Tales otros materiales se pueden seleccionar adecuadamente a partir de materiales convencionales usados en producción de leche fermentada, dependiendo de los resultados deseados.

Las bacterias ácido lácticas usadas en los métodos de la presente invención son *Lactobacillus helveticus*. En particular, se prefiere *Lactobacillus helveticus* CM4 (National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, depósito N° FERM BP-6060, fecha de depósito: 15 de agosto de 1997) (referida como *Lactobacillus helveticus* CM4 de aquí en adelante) como bacteria ácido láctica productora de péptido ACEI. Se ha aceptado *Lactobacillus helveticus* CM4 bajo el número de depósito mencionado anteriormente, para depositarse bajo el Tratado de Budapest del Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los propósitos del procedimiento de la patente. Todas las restricciones sobre la disponibilidad al público de FERM BP-6060 se eliminarán irrevocablemente bajo la garantía de una patente.

En la presente invención, las bacterias ácido lácticas preferentemente están en la forma de un iniciador precultivado que tiene suficiente actividad. El recuento celular inicial del iniciador es preferentemente aproximadamente 10^5 a 10^7 cels/ml.

En la presente invención, opcionalmente se pueden añadir otros microorganismos al material mezclado siempre que se logre el objeto de la presente invención. Por ejemplo, adicionalmente se puede usar levadura para mejorar el sabor y palatabilidad del suero que resulta como alimento funcional, alimento saludable, y similar.

Las cepas de la levadura no están particularmente limitadas, y por ejemplo, preferentemente se puede usar levadura del género *Saccharomyces* tal como *Saccharomyces cerevisiae*. El contenido de la levadura se puede seleccionar adecuadamente, dependiendo del resultado deseado.

En los métodos de la presente invención, el mezclado mediante agitación para preparar un material mezclado se puede realizar por un método convencional de modo que la bacteria ácido láctica y el material de inicio estén mezclados uniformemente. Casualmente, este mezclado (A) es una etapa convencional, y diferente de la etapa de fermentación, se discutirá después.

Los métodos de la presente invención incluyen (B-1) fermentar el material mezclado bajo agitación de modo que se generen trozos de cuajada y suero que contiene un péptido ACEI, o esta fermentación (B-1) y (B-2) fermentar dicho material mezclado bajo condiciones estáticas, donde se produce leche fermentada que contiene los trozos de cuajada y el suero que contiene el péptido ACEI.

Estas etapas son para fermentación ácido láctica del material mezclado. Se ha efectuado fermentación ácido láctica convencional bajo condiciones estáticas de modo que el material mezclado como una unidad se hace un pedazo tal como una cuajada.

En los métodos de la presente invención, se pueden fijar óptimamente las condiciones de la fermentación ácido láctica y la acidez final para terminar la fermentación, teniendo en cuenta la cantidad del péptido ACEI que hay que generar, ya que las condiciones óptimas varían dependiendo de las cepas de bacterias ácido lácticas *Lactobacillus helveticus*, así como del contenido de sólidos de la leche. Por ejemplo, cuando se usa *Lactobacillus helveticus* CM4, la temperatura óptima es 25 a 40°C, y la duración de la fermentación es aproximadamente 12 a 40 horas. La acidez final para terminar la fermentación es preferentemente aproximadamente 1,5 a 3% en peso (porcentaje en peso de ácido láctico).

En la etapa (B-1), la fermentación se efectúa bajo agitación. Cuando la fermentación ácido láctica se efectúa sólo por la etapa (B-1), la fermentación se efectúa bajo agitación básicamente continua. Por otro lado, cuando la fermentación se efectúa por las etapas (B-1) y (B-2), cada una de las etapas se puede llevar a cabo al menos una vez, y preferentemente se lleva a cabo una pluralidad de veces. En este caso, el orden de las etapas no está particularmente limitado. Las condiciones para la agitación, y las condiciones para la agitación y el reposo se pueden decidir adecua-

damente siempre que se generen un número de trozos de cuajada y de suero que contiene el péptido ACEI en la etapa o etapas de fermentación. Preferentemente, tales condiciones se pueden decidir de modo que la mezcla que resulta que contiene los trozos de cuajada y el suero que contiene el péptido ACEI, tenga una viscosidad no más alta que 20 cp, más preferentemente no más alta que 10 cp. Aquí, el límite más bajo de la viscosidad no está impuesto particularmente, pero normalmente es aproximadamente 2,0 cp. La generación de los trozos de cuajada se logra, fijando las condiciones de modo que la agitación se lleva a cabo mientras el pH está bajando a medida que la fermentación avanza desde aproximadamente pH 5, al cual comienzan a generarse cuajadas blandas, hasta pH 4,7-4,6, que es el punto isoeléctrico de la caseína.

Con la fermentación convencional sólo mediante cultivo estacionario, se genera cuajada en la forma de un gel como yogur que es básicamente contiguo a todo el volumen de un fermentador (tanque). Tal cuajada de leche fermentada no se puede hacer de leche fermentada de baja viscosidad como se mencionó anteriormente por agitación de la cuajada haciéndola trozos después de la fermentación. Por el contrario, con los métodos de la presente invención que esencialmente incluyen la etapa (B-1), no se genera tal lote único de cuajada en la forma de un gel continuo, si no que los trozos de cuajada flotan, están dispersos, o precipitan en el suero. El tamaño de los trozos de cuajada puede variar dependiendo de varias condiciones y el tipo de bacterias ácido lácticas *Lactobacillus helveticus*. Por ejemplo, cuando se somete el material mezclado que contiene *Lactobacillus helveticus* CM4 alternativamente a la fermentación bajo agitación y la fermentación bajo condiciones estáticas, el tamaño de los trozos de cuajada será aproximadamente 3 μ m a 5 mm.

En la presente invención, la fermentación se efectúa preferentemente de modo que el crecimiento de la bacteria ácido láctica no se inhiba por exceso de oxígeno, ya que las bacterias son anaeróbicas facultativas. En consecuencia, la agitación en la etapa de fermentación se lleva a cabo preferentemente de modo que se suprime el incremento de la cantidad de oxígeno que está disuelto en el líquido de fermentación debido al arrastre de burbujas de aire. Por ejemplo, la agitación, cuando continua a lo largo de toda la fermentación, preferentemente se lleva a cabo a baja velocidad de modo que el líquido de fermentación se mezcla y fluidiza suavemente. Específicamente, la velocidad de agitación puede ser aproximadamente 1 a 50 rpm. Alternativamente, cuando la fermentación se efectúa por una combinación de fermentación bajo agitación y fermentación bajo condiciones estáticas, es decir, por una combinación de las etapas (B-1) y (B-2), la agitación se puede realizar vigorosamente durante un tiempo corto para causar arrastre de burbujas de aire del líquido de fermentación, siempre que se suprima el incremento de la cantidad de oxígeno disuelto en el líquido.

Sorprendentemente, mediante la selección adecuada de las condiciones de agitación anteriores, la fermentación bajo agitación según la presente invención puede proporcionar leche fermentada que contiene el péptido ACEI en la misma proporción e incluso en proporción más alta que la producida sólo por la fermentación bajo condiciones estáticas, como se demuestra en los siguientes ejemplos.

Durante el método de la presente invención, se puede producir eficazmente leche fermentada que contiene un gran número de trozos de cuajo y suero y que tiene una viscosidad baja y excelente moldeabilidad. Se produce después suero a partir de leche fermentada a través de las etapas adicionales que se discutirán después.

En los métodos de la presente invención, las etapas de fermentación pueden ser seguidas por agitación convencional. En particular, cuando la fermentación incluye la etapa (B-2) de fermentar bajo condiciones estáticas, es preferente agitar el producto de fermentación después del final de la fermentación.

Los métodos para producir suero que contiene un péptido ACEI de la presente invención incluyen, siguiendo la producción de la leche fermentada anterior, la etapa de someter la leche fermentada que resulta a centrifugación y/o filtrado a presión para separar y recuperar suero.

La centrifugación de la leche fermentada se puede llevar a cabo en una centrífuga. Por ejemplo, se prefiere que la centrifugación se lleve a cabo continuamente a la velocidad de centrifugación de aproximadamente 2.000 a 10.000 rpm. El filtrado a presión se puede llevar a cabo en un filtro prensa. Se prefiere que el filtrado prensa se lleve a cabo bajo la presión de 2 a 8 kg/cm².

El suero que contiene un péptido ACEI obtenido por los métodos de la presente invención se pueden usar como bebida de leche fermentada o bebida de suero de leche. Además, se puede someter el suero que contiene un péptido ACEI a tratamiento tal como desacidificación, desalado, concentración, separación, y similares, para la preparación de productos líquidos; o a tratamientos de secado o pulverizado para la preparación de productos en la forma de gránulos o píldoras.

Los métodos para producir suero que contiene un péptido ACEI de la presente invención incluyen las etapas de fermentar bajo agitación para preparar leche fermentada, y someter la leche fermentada que resulta a centrifugación y/o filtrado a presión para separar y recuperar suero. Así, se puede recuperar eficazmente suero con alto contenido de péptido ACEI. Por lo tanto, estos métodos facilitan la producción de productos que contienen un péptido ACEI, y son sorprendentemente eficaces desde el punto de vista industrial.

Ahora se explicará la presente invención en detalle con referencia a ejemplos y ejemplos comparativos. Sin embargo, la presente invención no está limitada a estos ejemplos.

ES 2 249 242 T5

Ejemplo comparativo 1

Se disolvieron 900 g de leche desnatada en polvo (fabricada por Yotsuba Milk Products Co., Ltd.) en 9.100 g de agua, y la disolución que resultó se sometió a pasteurización HTHS (alta temperatura corto tiempo) a 90°C durante 1 minuto. La disolución pasteurizada se enfrió a temperatura ambiente, se inoculó con 300 g de *Lactobacillus helveticus* CM4 precultivado, y se agitó para hacer una mezcla uniforme. Después la mezcla fermentó bajo condiciones estáticas a 34°C durante 25 horas para obtener así cuajada (a) de leche fermentada en la forma de un gel continuo con la acidez de ácido láctico de 2,06% en peso.

Luego, la cuajada (a) de leche fermentada obtenida se agitó y después se colocó en una centrífuga (fabricada por Hitachi Ltd., 20PR52), que funcionó a 3.000 rpm durante 10 minutos para eliminar la fracción de cuajada y recuperar 2,5 kg de suero.

Se midieron la viscosidad y el contenido de péptido ACEI de la cuajada (a) de leche fermentada bajo las siguientes condiciones. Los resultados se muestran en la tabla 1. Además, la cuajada (a) de leche fermentada se agitó, y se midió el tamaño de las partículas de los trozos de cuajada con un analizador de tamaño de partículas (LA-920 fabricado por Horiba Ltd.). Se encontró que 90% de los trozos de cuajada tenían un diámetro no mayor que 47 μm , y la media aritmética del diámetro era 27 μm .

Medición de viscosidad

Se midió la viscosidad con viscosímetro Vismetron (fabricado por Shibaura System Co., Ltd.) a la temperatura del líquido de 25°C, velocidad de revolución de 60 rpm, usando rotor n° 2 para viscosidad media. La duración de la medición fue 60 segundos.

Medición de los contenidos de Val-Pro-Pro y Ile-Pro-Pro

Se colocó aproximadamente 1 ml de cuajada (a) de leche fermentada como tal en una centrífuga experimental, que funcionó a 15.000 rpm durante 10 minutos, para recoger el sobrenadante. Se sometieron 0,3 ml del sobrenadante obtenido a adsorción en cartucho Sep-Pak (fabricado por Waters Co.), seguido de lavado con agua destilada. El material adsorbido se eluyó con 5 ml de metanol, y se secó en un concentrador centrífugo bajo presión reducida. Se disolvió el producto seco obtenido en 0,3 ml de una disolución acuosa de ácido trifluoracético 0,05%, y se analizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Condiciones de análisis por HPLC

Aparatos: detector Hitachi L4000UV

(detección a 215 nm)

L6200 bomba inteligente

L5030 horno de columna (35°C)

Condiciones de separación: caudal a 0,5 ml/min

Disolvente de elusión: NaCl 0,3M, disolución acuosa de ácido trifluoracético 0,05%

Columna: Asahipak GS320 (ϕ 3,9 x 600 mm)

Contenido de péptido ACEI: se calculó el contenido de péptidos ACEI mediante la siguiente fórmula, ya que Val-Pro-Pro y Ile-Pro-Pro tienen diferentes actividades ACEI:

Contenido de péptidos ACEI (mg/100 g) = cantidad de IPP (mg/100 g) x 1,7 + cantidad de VPP (mg/100 g).

Ejemplo 1

Se disolvieron 900 g de leche desnatada en polvo (fabricada por Yotsuba Milk Products Co., Ltd.) en 9.100 g de agua, y la disolución que resultó se sometió a pasteurización HTHS (alta temperatura corto tiempo) a 90°C durante 1 minuto. La disolución pasteurizada se enfrió a temperatura ambiente, se inoculó con 300 g de *Lactobacillus helveticus* CM4 precultivado, y se agitó para hacer una mezcla uniforme. Después la mezcla fermentó a 34°C durante 29 horas bajo agitación a 50 rpm, para obtener así leche (b) fermentada con la acidez de ácido láctico de 1,88% en peso. Se midió el tamaño de las partículas de los trozos de cuajada de la leche (b) fermentada que resultó, con el analizador de tamaño de partículas (LA-920 fabricado por Horiba Ltd.). Se encontró que 90% de los trozos de cuajada tenían un diámetro no mayor que 30 μm , y la media aritmética del diámetro era 18 μm .

Luego, la leche (b) fermentada obtenida se colocó en una centrífuga (fabricada por Hitachi Ltd., 20PR52), que funcionó a 3.000 rpm durante 10 minutos para eliminar la fracción de cuajada y recuperar 6 kg de suero.

ES 2 249 242 T5

Se midieron la viscosidad y el contenido de péptido ACEI de la leche (b) fermentada bajo las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1. Los resultados se muestran en la tabla 1. Casualmente, la viscosidad se midió usando rotor nº 1 para viscosidad baja, durante la duración de 30 segundos.

5 Ejemplo comparativo 2

Se disolvió 1 kg de leche desnatada en polvo (fabricada por Yotsuba Milk Products Co., Ltd.) en 8,5 kg de agua, y la disolución que resultó se sometió a pasteurización HTHS (alta temperatura corto tiempo) a 90°C durante 1 minuto. La disolución pasteurizada se enfrió a temperatura ambiente, se inoculó con 300 g de *Lactobacillus helveticus* CM4 precultivado, y se agitó para hacer una mezcla uniforme. Después la mezcla fermentó bajo condiciones estáticas a 34°C durante 28 horas, obteniendo así cuajada (c) de leche fermentada en la forma de un gel continuo con la acidez de ácido láctico de 2,81% en peso.

Luego, la cuajada (c) de leche fermentada obtenida se agitó y se colocó en una centrífuga (fabricada por Hitachi Ltd., 20PR52), que funcionó a 3.000 rpm durante 10 minutos para eliminar la fracción de cuajada y recuperar 100 g de suero.

Se midieron la viscosidad y el contenido de péptido ACEI de la cuajada (c) de leche fermentada bajo las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1. Los resultados se muestran en la tabla 1. Casualmente, la viscosidad se midió usando rotor nº 3 para viscosidad alta, durante la duración de 60 segundos. Se midieron la viscosidad y el contenido de péptido ACEI de la cuajada (c) de leche fermentada bajo las siguientes condiciones.

Ejemplo 2

Se disolvió 1,5 kg de leche desnatada en polvo (fabricada por Yotsuba Milk Products Co., Ltd.) en 8,5 kg de agua, y la disolución que resultó se sometió a pasteurización HTHS a 90°C durante 1 minuto. La disolución pasteurizada se enfrió a temperatura ambiente, se inoculó con 300 g de *Lactobacillus helveticus* CM4 precultivado, y se agitó para hacer una mezcla uniforme. Después la mezcla fermentó a 34°C durante 30 horas bajo agitación a 50 rpm, obteniendo así leche (d) fermentada con la acidez de ácido láctico de 3,04% en peso.

Luego, la leche (d) fermentada obtenida colocó en una centrífuga (fabricada por Hitachi Ltd., 20PR52), que funcionó a 3.000 rpm durante 10 minutos para eliminar la fracción de cuajada y recuperar 6,4 kg de suero.

Se midieron la viscosidad y el contenido de péptido ACEI de la leche (d) fermentada bajo las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1. Los resultados se muestran en la tabla 1. Casualmente, la viscosidad se midió usando rotor nº 1 para viscosidad baja, durante la duración de 30 segundos.

Ejemplo 3

Se disolvió 712 kg de leche desnatada en polvo (fabricada por Yotsuba Milk Products Co., Ltd.) en 7.288 kg de agua, y la disolución que resultó se sometió a pasteurización en placa a 92°C y después se introdujo en un tanque (tanque de 18.000 litros fabricado por Iwai Kikai). La disolución pasteurizada se enfrió a 35°C, se inoculó con 240 kg de *Lactobacillus helveticus* CM4 precultivado, y se agitó para hacer una mezcla uniforme. Después la mezcla fermentó a 32°C durante 27 horas bajo agitación intermitente a 50 rpm (por repetición de ciclos de agitación durante 15 minutos y dejándolo en reposo durante 45 minutos), para obtener así leche (e) fermentada con la acidez de ácido láctico de 1,8% en peso. Se midió el tamaño de las partículas de los trozos de cuajada de la leche (e) fermentada que resultó con un analizador de tamaño de partículas (LA-920 fabricado por Horiba Ltd.). Se encontró que 90% de los trozos de cuajada tenían un diámetro no mayor que 172 μm , y la media aritmética del diámetro era 86 μm .

Luego, la leche (e) fermentada obtenida se colocó en un separador de boquilla (MBUX510T-34C fabricado por Alfalaval, tamaño de la boquilla 1 mm, caudal 3.500 litros por hora), que funcionó a 7.490 rpm para recuperar 6.160 kg de suero.

Se midieron la viscosidad y el contenido de péptido ACEI de la leche (e) fermentada bajo las mismas condiciones que en el ejemplo comparativo 1. Los resultados se muestran en la tabla 1. Casualmente, la viscosidad se midió usando rotor nº 1 para viscosidad baja, durante la duración de 30 segundos.

ES 2 249 242 T5

TABLA 1

Leche fermentada	Viscosidad (cp)	Recuperación de suero (%)	Contenido de péptido ACEI (mg/100g)
Leche (a) fermentada (ejemplo comparativo 1)	415	25	7,1
Leche (b) fermentada (ejemplo 1)	4,5	60	9,0
Leche (c) fermentada (ejemplo comparativo 2)	1.832	1	10,5
Leche (d) fermentada (ejemplo 2)	8,1	64	10,8
Leche (e) fermentada (ejemplo 3)	3,8	77	8,6

REIVINDICACIONES

5 1. Un método para producir suero que contiene un péptido inhibidor de la enzima de conversión de la angiotensina que comprende:

(A) mezclar bacterias ácido lácticas que comprenden *Lactobacillus helveticus* y un material de inicio que contiene leche agitando para preparar un material mezclado,

10 (B-1) fermentar dicho material mezclado bajo agitación de modo que se generen trozos de cuajada y suero que contiene un péptido inhibidor de la enzima de conversión de la angiotensina,

en el que se produce leche fermentada que contiene dichos trozos de cuajada y dicho suero que contiene péptido inhibidor de la enzima de conversión de la angiotensina; y

15 (C) someter la leche fermentada a al menos uno de centrifugación y filtrado a presión para separar y recuperar el suero;

20 en donde dicha etapa (B-1) de agitación se lleva a cabo mientras el pH disminuye según se produce la fermentación de pH 5 a pH 4,7-4,6.

2. Un método para producir suero que contiene un péptido inhibidor de la enzima de conversión de la angiotensina que comprende:

25 (A) mezclar bacterias ácido lácticas que comprenden *Lactobacillus helveticus* y un material de inicio que contiene leche agitando para preparar un material mezclado;

(B-1) fermentar dicho material mezclado bajo agitación de modo que se generen trozos de cuajada y suero que contiene un péptido inhibidor de la enzima de conversión de la angiotensina,

30 (B-2) fermentar dicho material mezclado bajo condiciones estáticas,

en el que se produce leche fermentada que contiene dichos trozos de cuajada y dicho suero que contiene el péptido inhibidor de la enzima de conversión de la angiotensina; y

35 (C) someter la leche fermentada a al menos uno de centrifugación y filtrado a presión para separar y recuperar el suero;

40 en donde dicha etapa (B-1) de agitación se lleva a cabo mientras el pH disminuye según se produce la fermentación de pH 5 a pH 4,7-4,6.

45 3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha leche se selecciona a partir del grupo que consiste en leche de vaca, leche de cabra, leche de oveja, leche de soja, leche desnatada, leche reconstituida, leche en polvo, leche condensada y sus mezclas.

4. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha leche fermentada tiene una viscosidad no más alta que 20 cp a 25°C.

50 5. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho péptido inhibidor de la enzima de conversión de la angiotensina se selecciona a partir del grupo que consiste en Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro, y sus mezclas.

6. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho material mezclado además contiene una levadura.

55 7. El método de la reivindicación 1, en el que dicho *Lactobacillus helveticus* comprende *Lactobacillus helveticus* CM4 (National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, depósito N° FERM BP-6060, fecha de depósito: 15 de agosto de 1997).

60

65