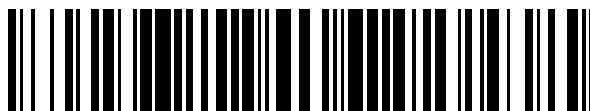


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 595**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 15/01 (2006.01)

A23C 9/123 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07731005 .0**

96 Fecha de presentación: **19.02.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **1991661**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.11.2008**

54 Título: **Cepas de lactobacillus helveticus que no fermentan la lactosa**

30 Prioridad:
20.02.2006 EP 06290286
21.02.2006 US 774654 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2012

73 Titular/es:
COMPAGNIE GERVAIS DANONE
17 BOULEVARD HAUSSMANN
75009 PARIS, FR

72 Inventor/es:
GARAULT, Peggy;
DRUESNE, Anne;
FAURIE, Jean-Michel;
QUEGUINER, Claire;
SAINT DENIS, Thierry y
SMOKVINA Tamara

74 Agente/Representante:
Veiga Serrano, Mikel

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).

ES 2 380 595 T3

DESCRIPCIÓN

Cepas de *Lactobacillus helveticus* que no fermentan la lactosa

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 un fenotipo negativo para la lactosa. La presente invención también se refiere a un procedimiento de obtención de tales cepas de *Lactobacillus helveticus*.

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. También se ha descrito en la bibliografía un efecto similar del tripéptido IPP (Ile Pro Pro). Estos péptidos inhiben la ACE bloqueando su sitio activo e impidiendo así que active la angiotensina.

Estado de la técnica

Se conoce 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 mostrado que la ingestión diaria de algunos miligramos de estos tripéptidos permite reducir eficazmente la tensión arterial, en particular en sujetos con hipertensión, reduciendo en consecuencia el riesgo de accidente cardiovascular.

Péptidos procedentes de una leche fermentada mediante *Lactobacillus helveticus* han mostrado *in vivo* su efecto inhibidor de la ACE (ACEI) y esos péptidos han podido encontrarse de nuevo a nivel de la aorta de las ratas que han participado 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 con hipertensión tras la ingestión de péptidos procedentes de una leche fermentada mediante *L. helveticus* (Yamamoto N. *et al.*, 1994. Biosci. Biotech. Biochem. 58, 776-8).

En el ser humano, la misma leche fermentada también ha permitido 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 propone la hipótesis según la cual el mecanismo de acción mencionado anteriormente (inhibición de la ACE) para explicar el efecto antihipertensivo de una leche fermentada mediante un *L. helveticus* podría no obstante no ser el mecanismo de acción determinante en el ser humano.

Una gran mayoría de los *Lactobacillus helveticus* puede producir los tripéptidos IPP y VPP mediante fermentación de leche, pero las cantidades producidas pueden ser variables. El documento EP 1 016 709 describe un medio de producir los tripéptidos VPP e IPP mediante fermentación de leche con ayuda de cepas de bacterias lácticas específicas pertenecientes a la especie *Lactobacillus helveticus*. No obstante, el producto así fabricado (leche fermentada) contiene una cantidad muy grande de ácido láctico, y por tanto se caracteriza por una acidez inaceptable desde el punto de vista sensorial y gustativo. Además surge el problema de la acidificación posterior: aunque se detenga la fermentación (normalmente mediante enfriamiento) a pH organolépticamente aceptables (pH > 4), la acidificación continúa en frío debido a las propiedades intrínsecas de los *Lactobacillus helveticus*. Esto conduce a una caída del pH del producto, que se vuelve igualmente inaceptable para su consumo.

Con el fin de evitar la acidificación posterior, es posible detener la fermentación a un pH aceptable destruyendo inmediatamente la cepa mediante tratamiento térmico (pasteurización, termización): la acidificación posterior es entonces nula (la acidez del producto ya no evoluciona durante su conservación). Desgraciadamente, la cantidad de tripéptidos se reduce debido a la parada precoz de la fermentación. Por tanto, los productos así obtenidos sólo tienen contenidos bajos en IPP y VPP. También es posible fermentar la leche mediante la misma cepa hasta obtener una concentración máxima de tripéptidos. La gran cantidad de ácido láctico generada en paralelo debe retirarse entonces mediante un procedimiento de múltiples etapas complejo y costoso. Además, el procedimiento no es "natural", ya que hace intervenir etapas de separación. Por tanto, un procedimiento de este tipo no está adaptado a la escala industrial.

Objeto de la invención

La presente invención propone soluciones a los inconvenientes del estado de la técnica. En particular, la presente invención propone cepas de *Lactobacillus helveticus* que permiten la preparación de productos alimenticios, concretamente productos lácteos fermentados, que presentan numerosas propiedades ventajosas:

- Los productos lácteos según la invención tienen una acidez perfectamente controlada, no solamente al final de la fermentación, sino también en almacenamiento. En particular, no están sujetos al fenómeno de acidificación posterior. Por tanto, los productos lácteos según la invención son organolépticamente muy satisfactorios.

- Los productos lácteos según la invención pueden consumirse directamente como productos probióticos, es decir que contienen una cantidad significativa de bacterias vivas, sin ningún impacto sobre sus calidades gustativas, y concretamente, sin ningún impacto sobre su acidez.

- La preparación de los productos según la invención no necesita ninguna etapa de termización, ni ninguna etapa compleja de purificación. Los procedimientos según la invención pueden por tanto ponerse en práctica de manera sencilla, en instalaciones lácteas clásicas, sin modificación importante del equipo.

Por otro lado, los procedimientos según la invención son totalmente naturales.

- Los productos alimenticios, concretamente lácteos, según la invención pueden contener contenidos muy grandes en tripéptidos VPP e IPP, y ello con razones elevadas de (IPP+VPP) / (ácido láctico). Estos resultados pueden obtenerse sin etapa de purificación o de concentración previa.

- Los productos alimenticios, concretamente lácteos, según la invención contienen ventajosamente una biomasa importante (es decir una concentración importante de microorganismos vivos).

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 cepa de "fenotipo negativo para la lactosa", se entiende cualquier cepa que no tiene la capacidad de transformar la lactosa en ácido láctico.

Por cepa de "fenotipo negativo para la fructosa", se entiende cualquier cepa que no tiene 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 polvo de leche bovina (desnatada 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, tales como nata, nata helada, mantequilla, queso, yogur, leche fermentada; los productos secundarios, tales como suero de la leche, 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, kefires, 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 también puede ser 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 los lactantes, de los niños, de los adolescentes, y de los adultos. Los productos alimenticios según la invención pueden contener en su totalidad o en parte al menos un producto lácteo fermentado según la invención. Los productos alimenticios según la invención también pueden contener otros ingredientes habitualmente usados 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.

Descripción detallada de la invención

Según un modo de realización, la presente invención se refiere a una cepa de *Lactobacillus helveticus* que no tiene la capacidad de transformar la lactosa en ácido láctico, y que presenta al menos una mutación puntual que introduce un codón de parada obtenida a partir de las cepas I-3431, I-3434 e I-3435 depositadas en la CNCM el 25/05/05, y

que puede, mediante fermentación a una temperatura de entre 30 y 45 °C, más preferiblemente entre 32 y 43 °C y aún más preferiblemente a 37 °C de un medio lácteo que contiene una cantidad de glucosa superior al 3% (p/p) y con un contenido total en proteínas superior o igual al 2% (p/p), preferiblemente entre el 2 y el 10% (p/p), más preferiblemente entre el 2,5 y el 6% y aún más preferiblemente igual al 4%, producir los tripéptidos de secuencia IPP y/o VPP en una cantidad de al menos 25 mg, preferiblemente al menos 50 mg, más preferiblemente al menos 75 mg de VPPEq por kg de producto fermentado. Según un modo de realización aún más preferible, dicha mutación puntual que introduce un codón de parada está situada en el gen *lacL* del operón lactosa. Por mutación puntual se entiende cualquier sustitución de nucleótido que interviene en la secuencia, en comparación con una secuencia denominada "de tipo natural". El experto en la técnica sabe identificar un codón de parada (también denominado codón sin sentido), y que corresponde generalmente en cuanto al ARNm a uno de los tripletes: UAA, UAG, UGA.

Por tanto, las cepas de *Lactobacillus helveticus* según la invención no tienen la capacidad de degradar la lactosa (no hay transformación de la lactosa en ácido láctico). En efecto, las cepas según la invención tienen un fenotipo negativo para la lactosa. En cambio, pueden crecer en presencia de glucosa como azúcar de carbono (fermentación de la glucosa en ácido láctico), y metabolizar determinados componentes de la leche, concretamente las proteínas.

Por tanto, las cepas según la invención permiten ventajosamente una fermentación de pH totalmente controlado: el pH final tras la fermentación se controla perfectamente según la cantidad de glucosa inicialmente contenida en el medio de fermentación. Esto resulta del hecho de que una cantidad dada de glucosa da como resultado de manera casi estequiométrica la misma cantidad de ácido láctico. Por otro lado, el empleo de las cepas según la invención evita cualquier fenómeno de acidificación posterior. Por tanto, gracias a las cepas según la invención, es posible obtener productos alimenticios particularmente satisfactorios en el plano organoléptico.

De manera ventajosa, según un modo de realización, las cepas de *Lactobacillus helveticus* según la invención son tales que un medio lácteo al 4,0% de proteínas totales que contiene el 1,0% (p/p) de glucosa fermentado por dichas cepas de *Lactobacillus helveticus* durante un tiempo máximo de fermentación de 30 h, a una temperatura de entre 30 y 45 °C, presenta un pH superior o igual a 4,0; preferiblemente superior o igual a 4,1; preferiblemente superior o igual a 4,2; preferiblemente superior o igual a 4,3; preferiblemente superior o igual a 4,5.

Esta ventaja es por tanto particularmente notable en el caso de cepas de *Lactobacillus helveticus* hiperproductoras de tripéptidos IPP y/o VPP: no se requiere en absoluto elegir un equilibrio entre

- una gran producción en tripéptidos durante la fermentación (que necesita un tiempo de fermentación lo más largo posible), y

- propiedades organolépticamente aceptables (que necesitan una acidificación limitada, y por tanto, no sólo un tiempo de fermentación lo más corto posible, con el fin de limitar la producción de ácido láctico mediante fermentación, sino también una termización/pasteurización con el fin de evitar el fenómeno de acidificación posterior).

En efecto, ventajosamente según la presente invención, la producción de tripéptidos VPP y/o IPP y la producción de ácido láctico se desacoplan parcialmente: la producción de ácido láctico sólo es función de la cantidad de glucosa inicialmente presente en el medio de fermentación, y no ya función del tiempo de fermentación.

Una manera de expresar la concentración en tripéptidos de manera sencilla es expresarla en concentración de equivalentes de VPP [VPPEq].

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

Por tanto, 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 25 mg, preferiblemente al menos 30 mg, preferiblemente al menos 35 mg, preferiblemente al menos 40 mg, preferiblemente al menos 45 mg, preferiblemente al menos 50 mg, preferiblemente al menos 55 mg, preferiblemente al menos 60 mg, preferiblemente al menos 65 mg, preferiblemente al menos 70 mg, preferiblemente al menos 75 mg, más preferiblemente al menos 80 mg de VPPEq por kg de producto fermentado. Tales cantidades de VPP y/o IPP se obtienen mediante fermentación mediante una cepa según la invención a una temperatura de entre 30 y 45 °C, preferiblemente entre 31 y 44 °C, preferiblemente entre 32 y 43 °C, preferiblemente entre 33 y 42 °C, preferiblemente entre 34 y 41 °C, preferiblemente entre 35 y 40 °C, y más preferiblemente a 37 °C, de un medio lácteo que contiene una cantidad de glucosa superior al 3% (p/p) y con un contenido total en proteínas superior o igual al 2% (p/p), preferiblemente entre el 2 y el 10% (p/p), más preferiblemente entre el 2,5 y el 6% (p/p) y aún más preferiblemente igual al 4% (p/p).

Según un modo de realización, las cepas de *Lactobacillus helveticus* según la invención presentan además un fenotipo negativo para la fructosa. La combinación de los fenotipos negativo para la lactosa y negativo para la fructosa es particularmente ventajosa. En efecto, la fructosa tiene un fuerte poder edulcorante, y es un ingrediente útil en los productos alimenticios. Por tanto, si la fructosa no puede degradarse mediante la cepa de *Lactobacillus*

helveticus, el producto alimenticio conserva excelentes propiedades organolépticas. Además, una cepa a la vez negativa para la lactosa y negativa para la fructosa sólo podrá crecer en un medio que contenga glucosa. Por tanto, el pH final se controlará ventajosamente mejor en el caso en el que el producto alimenticio contiene una preparación de fruta(s), concretamente trozos y/o zumo de fruta(s).

Según un modo de realización, la cepa según la invención se elige de:

I-3504 depositada en la CNCM el 14/10/05;

I-3505 depositada en la CNCM el 14/10/05;

I-3508 depositada en la CNCM el 14/10/05.

Según otro modo de realización, la presente invención se refiere al uso de una cepa de *Lactobacillus helveticus* según la invención, para la preparación de un producto alimenticio o farmacéutico, concretamente de un producto lácteo fermentado. De manera ventajosa, según un aspecto de la invención, dicho producto alimenticio o farmacéutico presenta propiedades antihipertensivas.

La presente invención también se refiere a un producto alimenticio, concretamente 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 , preferiblemente al menos 10^7 , preferiblemente al menos 10^8 UFC/mL de bacterias *Lactobacillus helveticus* vivas. Por tanto, el producto alimenticio según la invención contiene una importante biomasa.

Según un modo de realización, dicho producto alimenticio contiene al menos 25 mg, preferiblemente al menos 30 mg, preferiblemente al menos 35 mg, preferiblemente al menos 40 mg, preferiblemente al menos 45 mg, preferiblemente al menos 50 mg, preferiblemente al menos 55 mg, preferiblemente al menos 60 mg, preferiblemente al menos 65 mg, preferiblemente al menos 70 mg, preferiblemente al menos 75 mg, más preferiblemente al menos 80 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), concretamente trozos y/o zumo de fruta(s).

Según un modo de realización, el producto alimenticio según la invención presenta un pH superior o igual a 3,85; preferiblemente superior o igual a 3,90; preferiblemente superior o igual a 3,95; preferiblemente superior o igual a 4,00; preferiblemente superior o igual a 4,05; preferiblemente superior o igual a 4,10; preferiblemente superior o igual a 4,15; más preferiblemente superior o igual a 4,20.

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 siguientes etapas:

- seleccionar una materia prima que contiene proteínas de la leche, concretamente proteínas que contienen las secuencias peptídicas IPP y/o VPP. Puede ser por ejemplo leche que contiene el 2-10% (p/p) de proteínas totales.
- seleccionar al menos una cepa de *Lactobacillus helveticus* según la invención,
- sembrar dicha materia prima con dicha cepa,
- fermentar dicha materia prima en presencia del 1-3% (p/p) de glucosa durante 12-30 horas a 30-45 °C, y en presencia de dicha cepa.

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

La presente invención también proporciona un procedimiento de obtención de tales cepas de *Lactobacillus helveticus*.

Según un modo de realización, dicho procedimiento de obtención de cepas de *Lactobacillus helveticus* que presentan un fenotipo negativo para la lactosa, comprende las siguientes etapas:

- proporcionar al menos una cepa de *Lactobacillus helveticus* elegida de las cepas I-3431, I-3434 e I-3435 depositadas en la CNCH el 25/05/05;
- poner en contacto dicha al menos una cepa con una cantidad eficaz de estreptozotocina en presencia de lactosa;
- aislar la o las colonias de fenotipo negativo para la lactosa.

En efecto, ventajosamente la población de células de *Lactobacillus helveticus* que pueden sobrevivir en presencia de estreptozotocina está extremadamente enriquecida en células negativas para la lactosa.

Según un modo de realización, se añade una etapa de prueba colorimétrica en un medio que contiene Xgal y/o Sgal y/o cualquier otro compuesto unido mediante un enlace β -galactosídico a galactosa y que se vuelve detectable tras la ruptura de este enlace mediante el microorganismo, a dicho procedimiento de obtención de cepas según la invención. También puede añadirse IPTG para realizar esa prueba ya que este compuesto actuará como indicador del transportador de la lactosa o como inductor del uso de la lactosa por el microorganismo.

A modo de ejemplo, dicho procedimiento puede realizarse de la siguiente manera:

- 1º trasplante de las cepas de *Lactobacillus helveticus* de partida (cepas madres), a un caldo MRS (Man Rogosa Sharp) neutro, durante la noche a 35-40 °C.

- 2º trasplante al MRS neutro.

- Incubación hasta la obtención de una biomasa suficiente, por ejemplo 10-30 h a 35-40 °C.

- Siembra de MRS que contiene una concentración de lactosa que permite obtener una biomasa suficiente, por ejemplo del 2-7% (p/p); incubación con seguimiento de la DO a 580 nm.

- Se prepara la estreptozotocina extemporáneamente, y se añade a lo largo de la fermentación, de manera que se tiene una concentración final que es bactericida para la cepa considerada. Esta concentración depende de la cepa.

- Tras la incubación a 35-40 °C, se lavan los cultivos dos veces con sal triptona.

- Se recuperan los sedimentos en sal triptona, después vuelven a cultivarse caldos de MRS neutro.

- Incubación a 35-40 °C, hasta que hay crecimiento de la cepa.

- A continuación se realizan aislamientos en MRS neutro + Xgal + IPTG, después se incuban a 35-40 °C bajo CO₂. Esta etapa es una prueba colorimétrica que permite determinar si una cepa bacteriana es positiva para la lactosa o negativa para la lactosa: si la cepa puede usar la lactosa como fuente de carbono, hay producción de una sustancia azul, por tanto la colonia será azul, y en el caso contrario (cepa negativa para la lactosa), será blanca.

- Se trasplantan las colonias blancas a MRS neutro y se incuban a 35-40 °C.

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

Ejemplos de realización

EJEMPLO 1: obtención de cepas que presentan un fenotipo negativo para la lactosa

Material y métodos

Cepas de partida (cepas denominadas "madres")

I-3431 depositada en la CNCM el 25/05/05

I-3434 depositada en la CNCM el 25/05/05

I-3435 depositada en la CNCM el 25/05/05

Prueba de sensibilidad a la estreptozotocina

En un primer momento, se verifica que las cepas madres son sensibles al antibiótico usado, la estreptozotocina. Se realiza un seguimiento de la densidad óptica (DO) a 580 nm en cultivos a 42 °C en caldo MRS (Man Rogosa Sharp) neutro. Cuando alcanza 0,1, se añade la estreptozotocina en un tubo con el fin de tener 50 µg/ml al final (por ejemplo 100 µl de una disolución a 5 mg/ml por 10 ml de medio).

Selección de cepas negativas para la lactosa

Se realizan las siguientes etapas con el fin de obtener cepas de *Lactobacillus helveticus* negativas para la lactosa:

- 5 - 1º trasplante de las cepas de *Lactobacillus helveticus* de partida (cepas madres) a partir de las cúpulas de la reserva de trabajo, a caldo MRS neutro, durante la noche a 37 °C.
- 2º trasplante al 1% a MRS neutro.
- 10 - Incubación 16 h a 37 °C.
- Siembra de 10 ml de MRS al 5% (p/p) de lactosa, al 1% e incubación a 40 °C con seguimiento de la DO a 580 nm.
- 15 - Se prepara la estreptozotocina extemporáneamente, y se añade al cabo de 2 h 15 o de 4 h de fermentación, de manera que se tiene una concentración final de 50 µg/ml.
- Tras 7 h 30 de incubación a 40 °C, se lavan los cultivos dos veces con sal triptona.
- 20 - Se recuperan los sedimentos en 2 ml de sal triptona, después se siembran caldos de MRS neutro al 10%.
- Incubación a 37 °C, hasta que hay crecimiento de la cepa.
- 25 - A continuación se realizan aislamientos en MRS neutro + Xgal + IPTG, después se incuban a 37 °C bajo CO₂. Esta etapa es una prueba colorimétrica que permite determinar si una cepa bacteriana es positiva para la lactosa o negativa para la lactosa: si la cepa puede usar la lactosa como fuente de carbono, hay producción de una sustancia azul, por tanto la colonia será azul, y en el caso contrario (cepa negativa para la lactosa), será blanca.
- Se trasplantan las colonias blancas a MRS neutro y se incuban a 37 °C.

30 Resultados

Esto ha permitido obtener las siguientes cepas, que presentan un fenotipo negativo para la lactosa que a continuación han sido objeto de deposiciones ante la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Micro-Organismes, Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos), 28 rue du Docteur Roux, 75724 París, Francia, según las disposiciones del Tratado de Budapest:

- I-3504 depositada en la CNCM el 14/10/05; procedente de la cepa madre I-3431
- I-3505 depositada en la CNCM el 14/10/05; procedente de la cepa madre I-3434
- I-3508 depositada en la CNCM el 14/10/05; procedente de la cepa madre I-3435

Se confirma de nuevo el fenotipo negativo para la lactosa de las cepas obtenidas en un medio gelosa MRS neutro + Xgal + IPTG (prueba de coloración denominada "blanco/azul").

45 EJEMPLO 2: Cepas que presentan un fenotipo negativo para la lactosa

La cepa I-3504, depositada el 14/10/05 ante la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Micro-Organismes), 28 rue du Docteur Roux, 75724 París, Francia, según las disposiciones del Tratado de Budapest, es una cepa de *Lactobacillus helveticus* que presenta las siguientes propiedades:

- negativa para la lactosa; negativa para la fructosa
- producción de IPP y VPP: véanse las figuras 4 y 5
- propiedades de acidificación: véase la figura 1
- inhibición de la ACE: véase la figura 6

60 La cepa I-3505 depositada el 14/10/05 ante la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Micro-Organismes), 28 rue du Docteur Roux, 75724 París, Francia, según las disposiciones del Tratado de Budapest, es una cepa de *Lactobacillus helveticus* que presenta las siguientes propiedades:

- negativa para la lactosa; negativa para la fructosa
- producción de IPP y VPP: véase la figura 5

- propiedades de acidificación: véase la figura 2

La cepa I-3508, depositada el 14/10/05 ante la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Micro-Organismes), 28 rue du Docteur Roux, 75724 París, Francia, según las disposiciones del Tratado de Budapest, es una cepa de *Lactobacillus helveticus* que presenta las siguientes propiedades:

- negativa para la lactosa; negativa para la fructosa

- producción de IPP y VPP: véase la figura 5

- propiedades de acidificación: véase la figura 3

1. Medición de las propiedades de acidificación de las diferentes cepas variantes

Se evalúan las propiedades de acidificación de la siguiente manera:

Se pasteuriza un medio que contiene 120 g de polvo de leche desnatada (PLD) 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 en presencia de diferentes concentraciones de glucosa. (La abreviatura Gx indica una concentración del x% (p/p) de glucosa en el medio antes de la fermentación). Entonces se realiza un seguimiento del pH en función del tiempo, para diferentes cepas. Se usará una toma de medio fermentado realizada a las 30 h de fermentación para las mediciones de producción de los tripéptidos IPP y VPP así como para las mediciones de actividad ACEI cuyos resultados se facilitarán a continuación.

Para I-3504, se presentan también los resultados de la cepa madre (I-3431, cepa positiva para la lactosa). (Véase la figura 1).

Para I-3505, se presentan también los resultados de la cepa madre (I-3434, cepa positiva para la lactosa). (Véase la figura 2).

Para I-3508, se presentan también los resultados de la cepa madre (I-3435, cepa positiva para la lactosa). (Véase la figura 3).

Los resultados presentados en las figuras 1-3 muestran que las cepas según la invención permiten ventajosamente controlar con precisión el pH al final de la fermentación según la cantidad de glucosa inicialmente presente en el medio. Por otro lado, la fermentación mediante cepas negativas para la lactosa conduce ventajosamente a valores de pH elevados, que proporcionarán productos alimenticios organolépticamente aceptables.

2. Medición de la producción de los tripéptidos IPP y VPP

Material y método

Se usa una muestra de medio lácteo tomada a las 30 horas de fermentación, tal como se describió anteriormente en el punto 1, para realizar esta medición.

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

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

- La preparación de la muestra se realiza 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 VPP deuteriado (indicado 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 IPP deuteriado (indicado a continuación IPPd, de fórmula H-Ile[D10 N15]-Pro-Pro-OH, MM = 336,2 g/mol, disponible de la sociedad NEOMPS, Groupe SNPE, 7 rue de Boulogne, 67100 Estrasburgo, Francia) en una razón de 1 a 3 (por ejemplo, pesada precisa en un recipiente Eppendorf de 600 mg de muestra en 1200 mg de mezcla de agua-metanol-TFA que contiene los patrones internos).

- A continuación se centrifuga esta muestra diluida a 14000 g durante 15 minutos. A continuación se diluye el sobrenadante claro obtenido, que contiene los péptidos generados durante la fermentación, de manera precisa a 1/50 en una mezcla de agua-metanol (50/50, v/v) que contiene el 0,1% de ácido trifluoroacético.

- 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 creciente de disolvente B (acetonitrilo + el 0,100% de ácido fórmico) en el disolvente A (agua + el 0,106% de ácido fórmico), durante un periodo de 35 min a 2 horas en función de la resolución cromatográfica deseada. El método adaptado para la valoración de los péptidos IPP y VPP usa el siguiente gradiente:

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

- La detección se realiza con ayuda de un detector específico de tipo EM/EM, por ejemplo con un aparato de trampa iónica tal como Esquire3000+ (Bruker Daltonique, rue de l'Industrie, 67166 Wissembourg Cedex), parametrizado en ionización por electrospray en modo positivo, o bien para el análisis global del contenido peptídico (modo EM-EM), o bien para la cuantificación precisa y específica de un péptido a partir de sus fragmentos característicos (modo MRM). En el caso de la valoración de los péptidos IPP y VPP, pero también de los patrones internos IPPd y VPPd, estos péptidos se aíslan a partir de su masa específica (iones monocargados de 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).

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 a continuación calcular, mediante regresión lineal sencilla, el contenido inicial de la muestra en VPP e IPP (expresado generalmente en mg/kg o ppm).

Resultados

	VPPeq (mg/kg de medio fermentado)
Calpis CM4	51
CNRZ 244	57
I-3504 (con el 2% (p/p) de glucosa)	80

La figura 4 muestra una comparación de la producción de tripéptidos IPP y VPP de la cepa I-3504 (se añade el 2% (p/p) de glucosa al medio) 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.

Queda claro en esta figura que la cepa I-3504 (cepa según la invención) tiene una producción de tripéptidos IPP y VPP muy superior a esas dos cepas anteriores en las mismas condiciones.

La figura 5 muestra una comparación de la producción en tripéptidos IPP y VPP de las cepas según la invención entre sí.

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

Material y método

Se usa una muestra de medio lácteo tomada a las 30 horas de fermentación, tal como se describió anteriormente en el punto 1, para realizar esta medición. El presente método se basa en el método de Cushman y Cheng (Cushman *et al.* Biochem. Pharmacol. 1971. 20:1637), adaptado para hacer que sea compatible con muestras de tipo productos lácteos fermentados.

1. Preparación de los reactivos y 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 H_3BO_3 (Carlo Erba ref: 402 766). Disolver en aproximadamente 800 ml de agua desmineralizada, ajustar a pH 8,3 con una disolución de NaOH, después añadir 12,0 g de NaCl (concentración final de 0,3 M) y completar hasta 1 litro con 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, después completar hasta 20 mL con ese 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. La disolución así preparada debe usarse, almacenada a 4 °C, durante 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 está próxima 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), después se somete a ultrafiltración con ayuda de una unidad de filtración Vivaspin con un umbral de corte de 10.000 Daltones (Vivascience, Francia) con el fin de mejorar los elementos interferentes (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 únicamente a su sobrenadante.

- Tomar 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 $\frac{1}{2}$ teniendo en cuenta el volumen exacto de NaOH añadido (por ejemplo: muestra de ensayo de sobrenadante = 2 mL + 250 μ L de NaOH + 1,75 mL de tampón borato)

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

- Ultracentrifugar la muestra a 12.000 g durante 15 min a 10 °C con ayuda de unidades de filtración Vivaspin de 10.000 Daltones (capacidad de 4-6 mL) con el fin de obtener una muestra límpida.

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

Durante cada serie de análisis, deben prepararse los patrones control (el 0 y el 100% de actividad ACE). Para cada muestra, se realizan dos ensayos independientes y un blanco de muestra para cada dilución. En efecto, es necesario ajustar con la mayor precisión (diluyendo) la cantidad de muestra necesaria para disminuir en un 50% la actividad de la ACE.

Para ello:

- Depositar 80 μ L de la muestra acondicionada a pH 8,3 en el tubo de blanco y en los tubos de ensayo

- Depositar 80 μ L de agua desmineralizada en los tubos control del 0 y el 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 termostatzado 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 por el blanco de muestra y el control del 0% para los que es necesario depositar 20 µL de tampón borato pH 8,3.

- Dejar que se hidrolice durante 1 h exactamente a 37 °C.

- Detener la reacción añadiendo en cada tubo 250 µL de la disolución de HCl 1 M. Tabla recapitulativa de la composición de los diferentes medios de reacción:

	Muestra de ensayo	Adición de sustrato	Desencadenamiento de hidrólisis
Control del 100%	80 µL de agua desmineralizada	200 µL de HHL	20 µL de ACE
Control del 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
Blanco de muestra	80 µL de muestra	200 µL de HHL	20 µL de tampón borato

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

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

Centrifugar a 2000 g durante 5 min a 10 °C

Tomar 1 mL exactamente del sobrenadante en un microtubo Eppendorf

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

Añadir exactamente 1 mL de agua desmineralizada, después agitar 10 seg. para recuperar el ácido hipúrico.

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

Expresión de los resultados:

El porcentaje de inhibición de la ACE se calcula de la siguiente manera:

$$\frac{(\text{Abs ctl } 100\% - \text{Abs ctl } 0\%) - (\text{Abs mues} - \text{Abs blan mues})}{(\text{Abs ctl } 100\% - \text{Abs ctl } 0\%)} \times 100$$

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 esa 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 6 muestra una comparación de la actividad inhibidora de la enzima de conversión de la angiotensina de las diferentes cepas según la presente invención en comparación con otras 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 de inhibir la enzima de conversión de la angiotensina.

EJEMPLO 3: preparación de un producto lácteo (probiótico) según la invención

Se obtiene un producto lácteo fermentado tal como se indica a continuación.

- 5 Se normaliza leche a granel, previamente desnatada, previamente pasteurizada y enfriada a 4 °C, en cuanto a las proteínas (4,0%) con polvo de leche desnatada y se le añade glucosa a razón del 1,8% (p/p). Se somete el medio lácteo así preparado a una pasteurización (95 °C-8 min). Tras el enfriamiento a 37 °C, se siembra el medio lácteo con una cepa según la presente invención a razón de 10⁷ UFC/mL y se mantiene a 37 °C durante todo el periodo de la fermentación. Cuando se alcanza el pH 3,8, se retira el cuajado de la cuba de fermentación para experimentar un
- 10 lisado (mediante paso a través de un filtro) y se enfría hasta 10 °C en un intercambiador de placas. A continuación se le añade al cuajado lisado y enfriado una preparación de frutas (que tiene un pH de entre 4 y 4,1) a razón del 15% del producto acabado, se acondiciona en frascos de 110 mL y se almacena a 4 °C durante 28 días.

- 15 El producto así preparado contiene tripéptidos de secuencia IPP/ VPP a razón de 65 mg/kg de equivalente de VPP. El contenido en péptidos del producto es ventajosamente estable durante toda la vida útil del producto. La disminución de pH a lo largo del almacenamiento refrigerado es ventajosamente despreciable (inferior a 0,1 unidades) y la población de las cepas según la presente invención permanece ventajosamente comprendida entre 10⁷ y 10⁸ UFC/mL.

20 EJEMPLO 4: Identificación de mutaciones puntuales sin sentido en el operón lactosa de cepas según la invención

- A partir de las secuencias de los operones lactosa de las cepas DPC4571 y ATCC15009 disponibles en Genbank, se han elegido oligonucleótidos (cebadores) en genes que parecían los más conservados. Estos oligonucleótidos han permitido realizar una PCR “de largo alcance”, después de comenzar la secuenciación del operón lactosa de
- 25 cepas según la invención. A continuación se practicó la secuenciación paso a paso, es decir que en función de las secuencias obtenidas, otros cebadores han servido para nuevas reacciones de secuencia.

- Se ha identificado una mutación sin sentido en la cepa I-3504 con respecto a la cepa madre I-3431: en el sentido 5'-3', se sustituye una base citosina por una timina, lo que hace que aparezca un codón de parada a 1320 pares de bases del codón de iniciación del gen *lacL* (que tiene aproximadamente 1900 pb) que codifica para la β-galactosidasa.
- 30

Aparte de esta mutación, los operones lactosa de las dos cepas I-3431 e I-3504 son idénticos.

35 Secuencia del operón lactosa de la cepa I-3431 (mutación en un recuadro)

```

aaatgaaaattcatgatctaactctggattaatgtgataagcgcttcaacatcagtgcccagctgtcaattcctccaacgccgcg
aactgcacctgcaattactaacacaggttctgcgaacaagtggtagtcttcaatgtagtagcgttctcaagctcctcagcagcata
aggcaacaactgaaattaaaatggttttctgctgtggaattgagagactgaactttcattgtacgatctacatttttgggtgttgc
acgattaatggtaactctttagttgcatgtgcatccatttctgcggaaccaaatactcggttaactggcaaacatcgatatgga
atttaccttcttagctccagccattctatcaggataagtttcaccggataaaccttcataatcaaactcgtagcagccgttggcata
atcaatcgaataccaattacaggcaggggtggaatcccttctaccataataacgcattgtaaccttaattgtgaccgacatcatc
aatattatagatgattttgcatttggcaggagtagttaaagttgataggtaaatgaaatttcagcacttttgcatactcgtgattgct
aaatttgggttaaagggtgcaataggcagttcggcaaaagtcagtctgtctacttttaaatggatatcagtacatttagtaaacatat
cagctccgagccattgagctgccttagattaaatccactgcctcggtcgttatctgtagttgctcgccaaaaagtaggagtaggta
cacgataaagccattccttgccgtgtacttttaacgattcaagtcgcccgcgttcataactaaagatgattgaaaatctttgccatta
acgcaaatgtggcatccccataaatgatgcaattgattatttgtgtaatccataatagtatctcacttctgcatagtctggtttggt
tttctatctgcgaacattaaaccatcgccagaaaattcataatcgaatgacgatcatcaaaattgccgccataacgcaaaacat
catgtccactaatttcatcatgaaccaataatgcctgatcgataaagtcacagataaaaccacgaagattagggtattatcaa
gtaattgatataatgaatccatgccgccgttagaattgccatgtcgtcatattcgattccataaatggcttgggtggtatctttg
caagtattcttcaaccttttaggtggtaatacatcacagcttcaacatctgaaatttatcttttaattcgggacgggtgcactacgcctt
catagtgaaactaagcgtgtatcatcgtgagattgtaaaattcattcattgcgatgatgtgtctccagcataggattcgttgccaagt
gaccaaaagagaatagagggtgtgattcttgaagtcctgtagttatgtcgtgctgatcaatcactgcttcttcattgccggaatcg
aacctggtacattgtcagaagggtcaatctctccatttttccaagtagcatgtgattcaaggtaattctcggcatgacataaatg
ccatttgcgcgaagataataccacggaatttgggttgggtagtgacatgttctaacagcattaatattttcttaaaagatttaa
tgtcagttgtcatatcacctattgtatgctgcgaccagctttgcatccattcatgtcggtaactccattgataaataacgcttgcca
ttaacaaaacaacttttctggactaattcaattctcctaaagccaaattggaaggaatcagctctagcaagtttgggttcatca

```

taaacttcaattagaagctgataaagatatggaatcatggttattccaaagatgcacgttttcgaattttcattattaatttgaacgttctc
 ttgatatcttcatlitttccagaagagtagtcccttaataatcttgactaataaatggaatgaaccggatttttaccataaaaatgaa
 gcttaaggttgaagatgccatcttgataattatctgcaactcgtggttccaaatccatgtccattaagtggttagcggggatacctag
 tagttcaactgagcggaagatgccagagaagcggaacatgtcttggtcttagccaagatgcagtactgtttaaacttcta
 ctgctaaaagattatcttitttgaatataatggcgtaaaatcaaatctggaaggagtaaagctgtctccgcatagcccacaaaatg
 cccgtttaaaccatacatatcttcttgcagcgcttcaaatlaatatgaacatcttccaattaaaggctgagcttaaatcaaatcg
 cttaagtaagaaccgactgtgtatctgcgccttgcataatgagcctcttcatgatcattaggtctaaagcgtaagctgggagg
 cgaagatttgccttccaaggaaggaggacattaatattgattttgagtalagttgctcaattcgatttcaacttggaaactgggat
 cgaatcaaaaattgaagaatcaaaatcacgctgataaaaaatctgtggacgatccataggattagcggaaaaatgaaatttccat
 ttccatttaaactttgtgatagctactgtgttgccttgcactcgcgataatcttaaaaaagggaatgatcactgtgtcgggcaatt
 gattgacctgaatacctcaggattatctagccaattgatatttgcctgcataatatgacctcatttctataaaaatatttgcgaagc
 gctttattatagcatgtaataaacaatttatttagtattagtaaagaatttattacaatatttaataagatttacttgcataaagactg
 aatacatgcagataatagaaccttatttatttgaatttagtaaatatttgcataataaagaaagagaattataaaaatagaaaag
 aaataattatgagaacaattaaagaattgcgctggaatcaggctatttccagcgacagtatcacgtttattaataatgatccta
 atttgcattactgcagataccaaaaataagatttgggagattgctaataattgggctattgggaagatcatcaagaaaagaaa
 atcaagcccacaattgcttacttctatcgagtaaatacagaagaacattgcaggatgagatttcaacttgcgtgaacaagcatta
 gttcaactgtagagcgagatgcgctgaagatgaaaaactttatgacatagaagatttaatacaagaacgcttcttgttccaagga
 ttattggagtagggggcgagccaattgaaaacgccaggttggtaagctgcataaagtttgcctaattggtgttttgtgataccaa
 tccagctcccgaatttattgattcaattcgccctaatactgcctctacggtaaaaaatgctattgattgtttatcaaaaatggcattaac
 aagatcggtttatcggtggcgttggccctaagcatgaccatattcaggaaaaagatttgcgttcaattacttgttgaatacatgaa
 aactagaggcatggatactaaatggacatgcgttgaaggaccggtagcgttgaataatgggaaaaatggtttg
 gctaaatacaaaaatgatttacctgaagcatttttaattgcatctgatactttagccgttggcgttttacaagccttaacgaagaaaa
 cgtaaatgtacaaaagataactaagatcttaagtatttaataalagcaatgtggttaagtagtttaccaccacttcttgcgtcaaca
 ttaatacaagaagaatgattgataatggcactgatacttgcacttattgatttcatccagatcgaccaaagattgatatccggatg
 aacactaatttggtagtagcaaaaagcttgcgttcccaagaaaaagtaaatttttagtaaaaaaatattttttagatagaaaaataaaa
 aagagaatgtgaacagctcacatttcttttatttacttagttaacaaaggagcgtataatgacttcatgcaaacgattgcagagatt
 cattggggagggaaggaaaaagatgaataatcataaaatctcaggaaagcaagtcatttctatgcgttcttgttggggaattt
 aggatacgcagcttittatggcgtaatgagtagctattttattttatcactagtgccatgtttacaggactagatcattcagttgcag
 ataagtttaattggcctaattactgcattgatagttttagtaagaatttagagtagtaattgatccagtttggggaacatcggtgat
 aatactaaaacaaggtagggcaagtttaagccttggatcttatttgaacggtagctagtgccgacttactgtaattcttcttactg
 gtatttgcgttggcacataagagttgatttcttgcattttatttgaatcatttatatcggtttgacgttttttattccttatcagatgg
 ggcattggtccagcctaagtaggattcacacgcacgtggtatttatactgcttggggacttttcagggtcaattggttgaacg
 gactaactatcattgttgcactggttaccggtgaacttaagcaatgactggcaagcatgaagaaggggctcctggttgggttg
 ccttgcggcggttattcagccttagctatttcttgcactaatcgtagtttaggaactaatgaaaaacataatttaattagaaattct
 gccaagtaaaaaacaacttttaggtcaagatttggggcaatttcacataatgatcagattttatagccaagtttggcttattgatgtc
 tcatgtgctaattgaaatgaaatgggtaatttattctgtacaaatctgtgattaataaaccacaaatgacttctgggttgttgggtgca
 ttgccacattaatcggttttgcattagtcattgtttccaattttaaataaataatattccaagaaaatggctatttattggcggtcaaaattg
 tatgatttggcatacgggtgttcttcttgcgtgcgaataacgctattttaaattggaatttagggttagctctatttaatatcaactttgctcaa
 tttagtaactgtttaaactaactgatgccatcgaaatggtcagctgaaaagtggtcagagaaatgaagccgctggtttagctgttc
 gaccaatggctgataaattaccggtgctatttcaaacgcgctagtaggatatgtagcaattgcccagggcatgactggttcagc
 aactgcagcagatagacaagtcacgatattagcatttcaatattatggccttataatgccaattatttggcagtttagctattatcat
 tttaataagcaaggttaacttctgaaaagaaacacgctcaagtggttgaagaattaaagagcaaacctgcacaaggaagat
 cgaagatggcaatttaccctgagcaaaattaaagtcgactgcaatttgcacctgcagatggttaaatatgactatgtctgaagt
 aatcagatgaaaatggcaaacatttctggttaaggttgcattatgcataagcagtgggcaaatittgccaatttgcatttgcattggtg
 aaattaaagttaacttggtagcaagcatgcgttgaatttgaactgaaaatggtctgcaagttatagttcacgttggcttggcaca
 gtttaattgcgtggtgaaggatttgagtcattatgatgatggacaaattgttaaaaaagggtgaactgctattagaatctgaccgtg
 atttagcactaaaaaatggttataaagatacagatagtaatttctatactcaacctggtagtagtaaaaaatgagtaaaattcgg
 caggtaagttgtgaacatggtaaaaagggtggtgaagtgaagtttaagtagaggaaactgatgaagcataaaatttaattga
 ttacatgtataaaaaagaatgacttttagtttaagtaaaacttttggtaagaaaaaatttataagccttttttaaaaaaagaatg
 acgtaataaagccttttcttaaatatttatacttagtaaatagcttagtaaatctaaataaatttttactagaacaaaaaaatgat
 aaattattctgtgaagcatttctgaaaaggaatcttgggaggaattatcatgcataatcataaagtttgcgggaacaaatagttt
 cctatgcattcatttgcgtggcaatttggggcactcagcattttaggtgtaattgagtagacataattttatttttattactagtggaatgtt
 agcggattaaatcaatccgttgcgtgataaattagtaggttaattactggattaatggtactagtaagaattatcgaactagtcattga
 cctattttgcagcatttacttatttatttactggtatttttgattagcacaacagaattggatccttttgcattttgttgttattt
 acatgcctttagtatttctattcattatcagatgttcatattggggcatggttccagctttagtgaagattcacatgaacgtggtattt
 atacttcaacttgggtcctttcagggtactattggttgaatagtttgcgaattattgttgcacttgggtaccggtgtaacttaccggtt

actggcaaacacgaagaaggagctcctggctgggtcgcccttgcggccgtaatttcagccttagcaattattgtgccttgattgttg
 ctttggtactaaagaaaagcacaacattattagaaattcgggccaaacagaaaaccactttgcgtcaagatttgggtgcgattttcc
 ataattgatcaaattttgtggccaagtttagcttacttattgtattcacttgcgttgaattactaatgggttttctacatgtacaagttt
 glaattggcaagccaaatgatttctgggtagtaggtgaattgcaacaattattgggtgctgcattagtcacatttcccggtttgaac
 aaatattccaagaaaaatggtgtttattgcaggccaaacttgtatggatttagcatatgtcctatttatcttgggtcgtaacaatgtctt
 cttaattggatttaggcttagtttattcaataattaacttcgctctgttggtaactgttttaactttaactgatgctattgaatatggtaactta
 agattggtaaagaaatgaagccgttgggttagctgttcgctccaatgattgataaatttactgggtgctgtttcaaatgccttagttggta
 tgtggcaattgcagctgggatgactggatcagctactgcagcagatatgacgagcaaagggtattaacacatttaattatggcttt
 atatactccttagcttggcagttttatctattgtatgtttttagcaaagtaactttgagtgaagaaacacgcacaagttattgaa
 gaattgaagagtaaaacttcacaaggcgagattgaaaagaagacttcagtagatacaggaacaaaagaagtaactatttatg
 cacctgctgatgggtgaattaatgcaaatgtcttctgttggatgaagatggtaaacattccctggtaaaggatttgcaattgagcc
 aagcagtggtcaaatattatgcacatttgatggaacgatcaagtttactttcggtacaaagcatgcattcgagattgtgtcacaaaa
 tggactacaagttgttgcattgtaggattgggtactgtcaattacgtggagaaggctttgaaactttctacgatgatggtaaaaca
 gtgaaaaaggcgataaattacttgagtttgatcgtgatttggctcttaacaatgggtataaagacacgatcgtgatattctatactc
 aaccaggtagaattcaaaattctgggtctattcaagctggtaagatat

Asimismo, análisis de secuenciaciones revelan las siguientes mutaciones en el operón lactosa de cepas según la invención:

- 5 - Cepa I-3505 en comparación con la cepa I-3434:

En la cepa I-3505, una base adenosina sustituye a una base guanina lo que provoca la aparición de un codón de parada, a 1713 pares de bases del comienzo del gen *lacL* que codifica para la beta-galactosidasa.
- 10 - Cepa I-3508 en comparación con la cepa I-3435:

En la cepa I-3508, una base adenosina sustituye a una base guanina lo que provoca la aparición de un codón de parada, a 183 pares de bases del comienzo del gen *lacL* que codifica para la beta-galactosidasa.
- 15

REIVINDICACIONES

1. Cepa de *Lactobacillus helveticus* caracterizada porque no tiene la capacidad de transformar la lactosa en ácido láctico y que presenta al menos una mutación puntual que introduce un codón de parada en el operón lactosa, obtenida a partir de las cepas I-3431, I-3434 e I-3435 depositadas en la CNCM el 25/05/05, y que puede, mediante fermentación a una temperatura de entre 30 y 45 °C, más preferiblemente entre 32 y 43 °C y aún más preferiblemente a 37 °C, de un medio lácteo que contiene una cantidad de glucosa superior al 3% (p/p) y con un contenido total en proteínas superior o igual al 2% (p/p), preferiblemente entre el 2 y el 10% (p/p), más preferiblemente entre el 2,5 y el 6% y aún más preferiblemente igual al 4%, producir los tripéptidos de secuencia IPP y/o VPP en una cantidad de al menos 25 mg, preferiblemente al menos 50 mg, más preferiblemente al menos 75 mg de VPPEq por kg de producto fermentado.
2. Cepa de *Lactobacillus helveticus* según la reivindicación 1, caracterizada porque un medio lácteo al 4,0% de proteínas totales que contiene el 1,0% (p/p) de glucosa fermentado por dicha cepa de *Lactobacillus helveticus* durante un tiempo máximo de fermentación de 30 h, a una temperatura de entre 30 y 45 °C, presenta un pH superior o igual a 4,0, preferiblemente superior o igual a 4,1.
3. Cepa de *Lactobacillus helveticus* según la reivindicación 1 ó 2, caracterizada porque presenta además un fenotipo negativo para la fructosa.
4. Cepa de *Lactobacillus helveticus* según la reivindicación 1, caracterizada porque es elegida de:
 - I-3504 depositada en la CNCM el 14/10/05;
 - I-3505 depositada en la CNCM el 14/10/05;
 - I-3508 depositada en la CNCM el 14/10/05.
5. Uso de una cepa de *Lactobacillus helveticus* según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizado porque se usa para la preparación de un producto alimenticio o farmacéutico, concretamente de un producto lácteo fermentado.
6. Uso de una cepa de *Lactobacillus helveticus* según la reivindicación 5, caracterizado porque dicho producto alimenticio o farmacéutico tiene propiedades antihipertensivas.
7. Producto alimenticio, concretamente producto lácteo fermentado, caracterizado porque comprende al menos una cepa de *Lactobacillus helveticus* según una de las reivindicaciones 1-4.
8. Producto alimenticio según la reivindicación 7, caracterizado porque contiene al menos 10^6 , preferiblemente al menos 10^7 , preferiblemente al menos 10^8 UFC/mL de bacterias *Lactobacillus helveticus* vivas.
9. Producto alimenticio según una cualquiera de las reivindicaciones 7-8, caracterizado porque contiene al menos 25 mg, preferiblemente al menos 50 mg, más preferiblemente al menos 75 mg de VPPEq por kg de dicho producto alimenticio.
10. Producto alimenticio según una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, caracterizado porque comprende además preparaciones de fruta(s), concretamente trozos y/o zumo de fruta(s).
11. Producto alimenticio según una cualquiera de las reivindicaciones 7-10, caracterizado porque presenta un pH superior o igual a 3,85, preferiblemente superior o igual a 4,00, más preferiblemente superior o igual a 4,20.
12. Producto alimenticio según una cualquiera de las reivindicaciones 7-11, caracterizado porque presenta propiedades antihipertensivas.
13. Procedimiento de preparación de un producto alimenticio caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
 - seleccionar una materia prima que contiene proteínas de la leche, concretamente proteínas que contienen las secuencias peptídicas IPP y/o VPP;
 - seleccionar al menos una cepa de *Lactobacillus helveticus* según una de las reivindicaciones 1-4,
 - sembrar dicha materia prima con dicha cepa,

- fermentar dicha materia prima en presencia del 1-3% (p/p) de glucosa durante 12-30 horas a 30-45 °C, y en presencia de dicha cepa.
- 5 14. Procedimiento según la reivindicación 13, carece de cualquier etapa de termización tras la fermentación.
15. Procedimiento de obtención de cepas de *Lactobacillus helveticus* según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
- 10 ▪ proporcionar al menos una cepa de *Lactobacillus helveticus* elegida de las cepas I-3431, I-3434 e I-3435 depositadas en la CNCM el 25/05/05;
- poner en contacto dicha al menos una cepa con una cantidad eficaz de estreptozotocina en presencia de lactosa;
- 15 ▪ aislar la o las colonias de fenotipo negativo para la lactosa según la reivindicación 1.
16. Procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado porque comprende una etapa de prueba colorimétrica en un medio que contiene Xgal y/o Sgal y/o cualquier otro compuesto unido mediante un enlace β -galactosídico a galactosa y se vuelve detectable tras la ruptura de este enlace por dicha cepa de *Lactobacillus helveticus*.
- 20

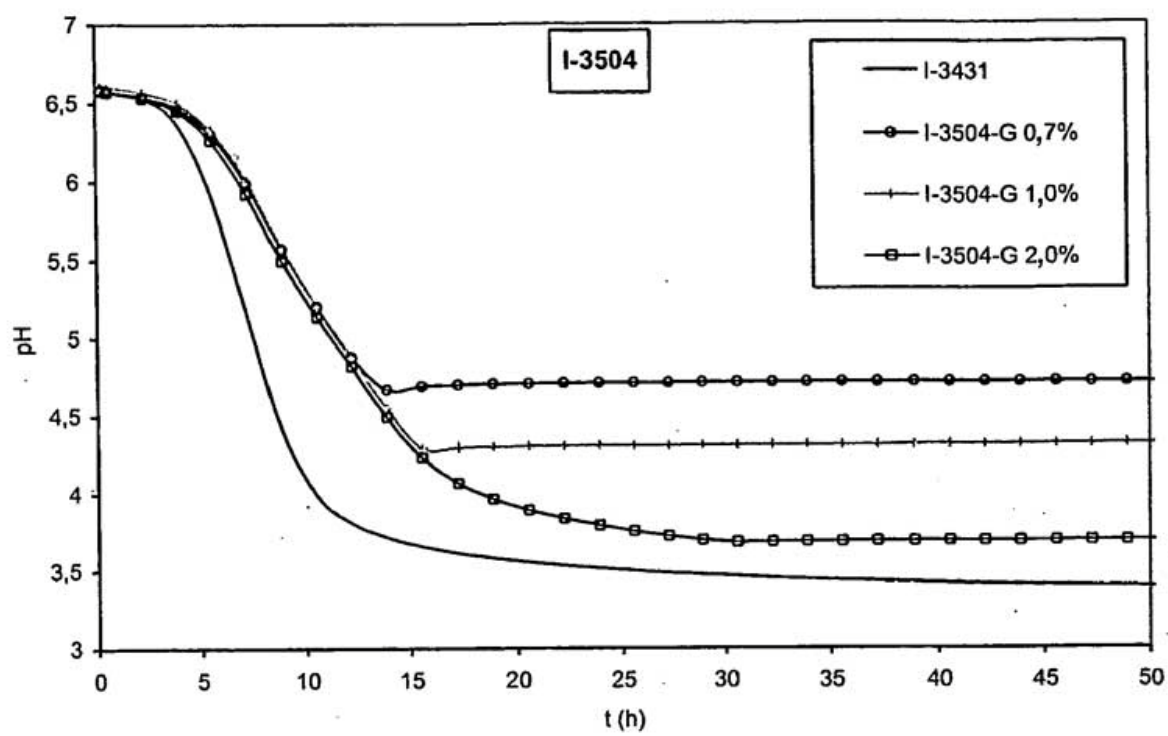


Figura 1

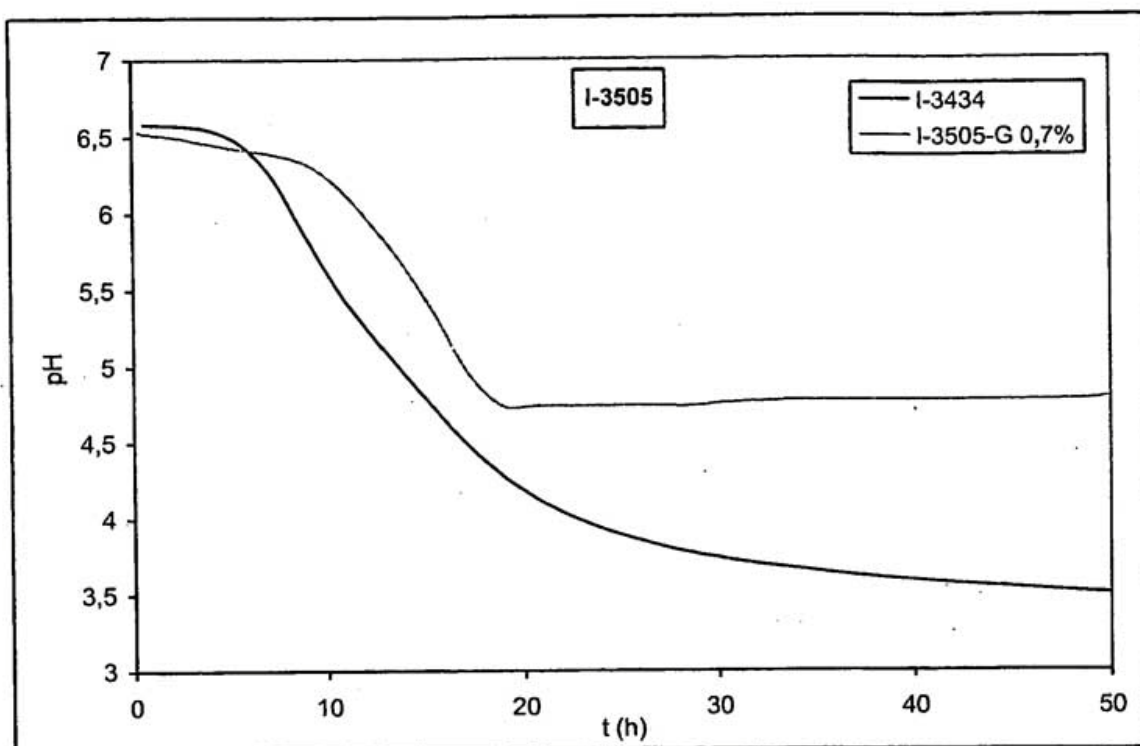


Figura 2

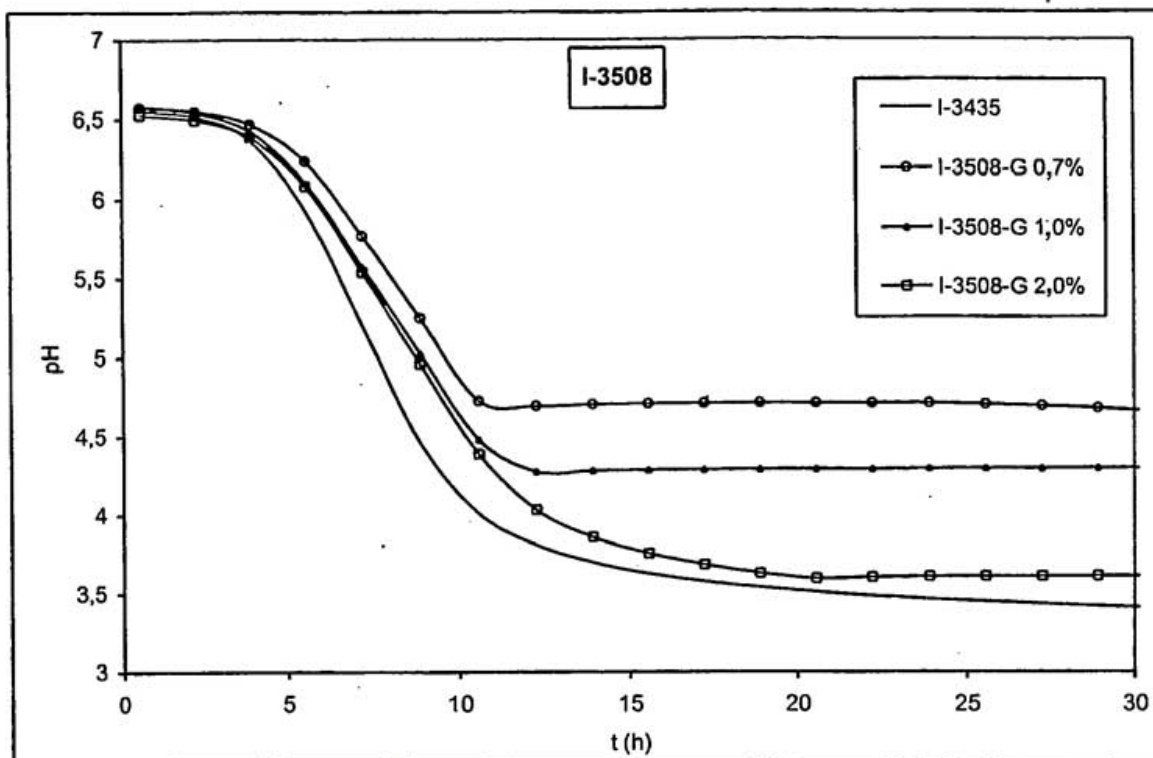


Figura 3

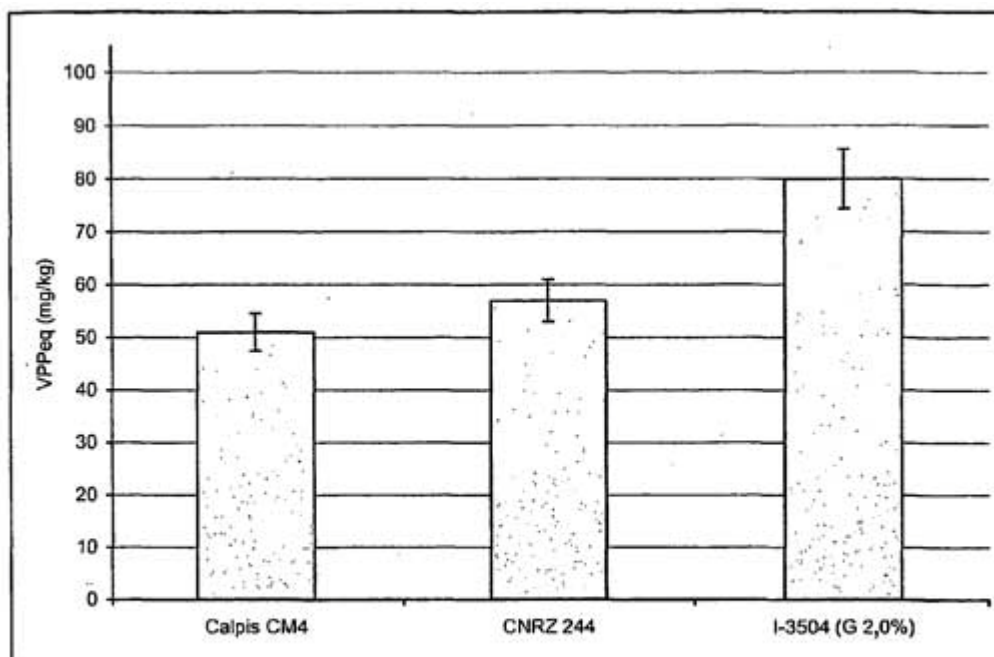


Figura 4

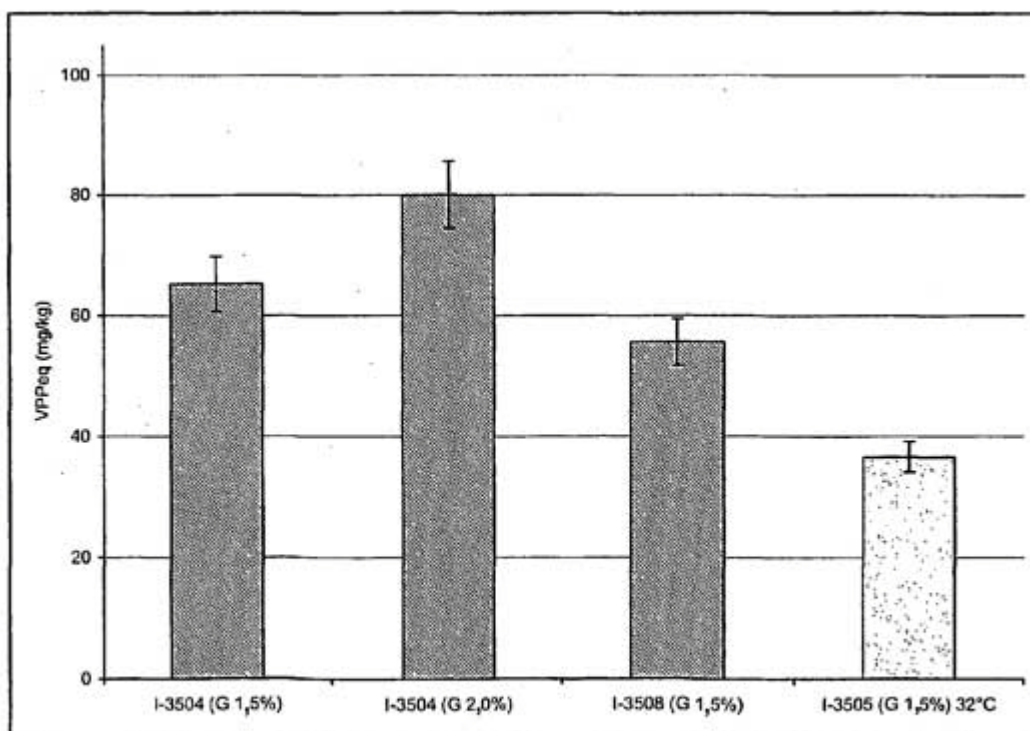


Figura 5

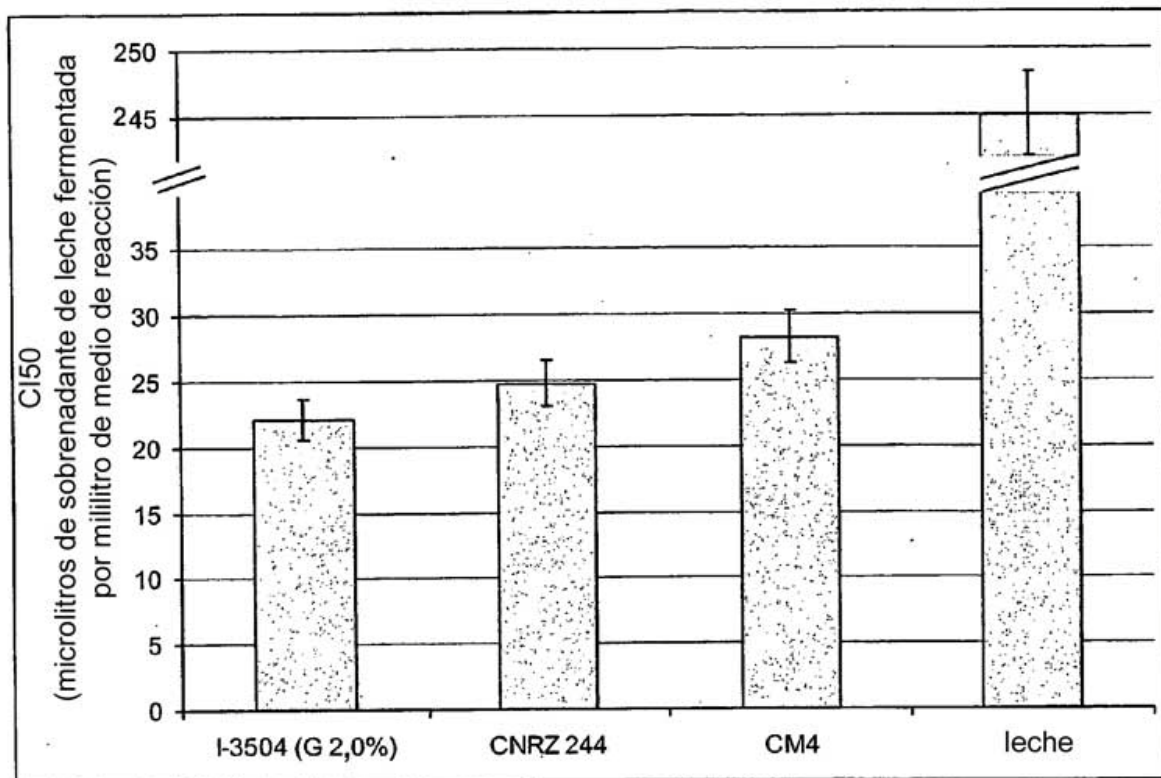


Figura 6