



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e Comércio Exterior
Instituto Nacional de Propriedade Industrial

(21) **PI0707985-0 A2**

(22) Data de Depósito: 19/02/2007
(43) Data da Publicação: 17/05/2011
(RPI 2106)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 1/20
C12N 15/01
A23C 9/123
A61K 35/74

(54) Título: **NOVAS CEPAS DE LACTOBACILLUS
HELVETICUS**

(30) Prioridade Unionista: 20/02/2006 EP 06290286.1,
21/02/2006 US 60/774,654

(73) Titular(es): Compagnie Gervais Danone

(72) Inventor(es): Anne Druesne, Claire Queguiner, Jean-Michel
Faurie, Peggy Garault, Tamara Smokvina, Thierry Saint Denis

(74) Procurador(es): Montauray Pimenta, Machado &
Lioce S/C Ltda

(86) Pedido Internacional: PCT FR2007000294 de 19/02/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/096510 de 30/08/2007

(57) Resumo: NOVAS CEPAS DE LACTOBACILLUS
HELVETICUS. A presente invenção refere-se a novas cepas de
Lactobacillus helveticus. Mais particularmente, a presente invenção
propõe cepas de Lactobacillus helveticus possuindo um fenótipo
lactose negativa, e suas aplicações na indústria agro-alimentar. A
presente invenção refere-se igualmente a um processo de obtenção de
tais cepas de Lactobacillus helveticus.

"NOVAS CEPAS DE *LACTOBACILLUS HELVETICUS*"

A presente invenção refere-se a novas cepas de *Lactobacillus helveticus*, assim como a suas aplicações no campo agro-alimentar. Mais particularmente, a presente
5 invenção propõe cepas de *Lactobacillus helveticus* possuindo um fenótipo lactose negativa. A presente invenção refere-se, igualmente, a um processo de obtenção de tais cepas de *Lactobacillus helveticus*.

A hipertensão atinge uma grande parte da
10 população. A utilização do peptídeo VPP (Val Pro Pro) e de peptídeos contendo a seqüência VPP como agentes capazes de reduzir a pressão arterial por inibição da enzima de conversão da angiotensina (ACE) foi descrita na EP 0 583 074. Um efeito similar do tripeptídeo IPP (Ile Pro Pro) foi
15 igualmente descrito na literatura. Esses peptídeos inibem a ACE bloqueando seu sítio ativo e impedindo, assim, tornar ativa a angiotensina.

É sabido que as duas seqüências VPP e IPP estão presentes na caseína Beta bovina e que a hidrólise adequada
20 desta caseína (ou, mais geralmente, do leite que a contém) permite obter os referidos tripeptídeos. Numerosos estudos no animal e no homem mostraram que a ingestão diária de alguns miligramas destes tripeptídeos permite reduzir eficazmente a pressão arterial, em particular nos sujeitos
25 hipertensos, reduzindo, desta forma, o risco de acidente cardiovascular.

Peptídeos obtidos de um leite fermentado por *Lactobacillus helveticus* mostraram *in vivo* seu efeito inibidor do ACE (ACEI) e esses peptídeos puderam ser
30 encontrados no nível da aorta dos ratos que participaram no estudo (Masuda O. e outros, 1996. J. Nutr. 126, 3063-8). Outros estudos também mostraram especificamente uma

diminuição da pressão arterial em ratos hipertensos em resposta à ingestão de peptídeos obtidos de um leite fermentado por *L. helveticus* (Yamamoto N. e outros, 1994. Biosci. Biotech. Biochem. 58, 776-8).

5 No homem, o mesmo leite fermentado também permitiu diminuir a pressão arterial sistólica (Hata e outros; 1996. Am. J. Clin. Nutr., 64, 767-71). Um estudo mais recente confirma que os peptídeos presentes no produto AMEAL S® comercializado pela sociedade CALPIS reduzem, de
10 maneira significativa, a pressão arterial em sujeitos que têm uma pressão arterial superior à normal (Mizuno e outros, 2005. British Journal of Nutrition; vol 94, edição 1, 84-91).

 Em um outro estudo recente (Jauhiainen e outros;
15 2005. Am. J. of Hypertension, 18: 1600-1605) é anunciada a hipótese de acordo com a qual o mecanismo de ação acima citado (inibição do ACE) para explicar o efeito anti-hipertensivo de um leite fermentado por um *L. helveticus* poderia, no entanto, não ser o mecanismo de ação
20 determinante no homem.

 Uma grande maioria dos *Lactobacillus helveticus* é capaz de produzir os tripeptídeos IPP e VPP por fermentação de leite, mas as quantidades produzidas podem ser variáveis. EP 1 016 709 descreve um meio de produzir os
25 tripeptídeos VPP e IPP por fermentação de leite com o auxílio de cepas de bactérias lácticas específicas pertencentes à espécie *Lactobacillus helveticus*. No entanto, o produto assim fabricado (leite fermentado) contém uma quantidade muito grande de ácido láctico e é
30 então caracterizado por uma acidez inaceitável do ponto de vista sensorial e gustativo. Além disso, surge o problema da pós-acidificação: mesmo se a fermentação é interrompida (classicamente por resfriamento) em pH organolepticamente

aceitáveis ($\text{pH} > 4$), a acidificação prossegue no frio devido às propriedades intrínsecas dos *Lactobacillus helveticus*. Isto leva a uma queda do pH do produto, que se torna igualmente inaceitável ao consumo.

5 A fim de evitar a pós-acidificação, é possível interromper a fermentação em um pH aceitável matando imediatamente a cepa por tratamento térmico (pasteurização, termização): a pós-acidificação é então nula (a acidez do produto não evolui durante sua conservação). Infelizmente,
10 a quantidade de tripeptídeos é reduzida devido à interrupção precoce da fermentação. Os produtos assim obtidos só possuem, então, baixos teores de IPP e VPP. É igualmente possível fermentar o leite pela mesma cepa até se obter uma concentração máxima de tripeptídeos. A grande
15 quantidade de ácido láctico gerada em paralelo deve então ser retirada por um processo de múltiplas etapas complexo e caro. Além disso, o processo não é "natural", pois ele menciona etapas de separação. Um processo desse tipo não é, assim, adaptado à escala industrial.

20 A presente invenção propõe soluções aos inconvenientes do estado da técnica. Em particular, a presente invenção propõe cepas de *Lactobacillus helveticus* que permitem a preparação de produtos alimentares, notadamente produtos lácteos fermentados, possuindo
25 numerosas propriedades vantajosas:

- Os produtos lácteos de acordo com a invenção possuem uma acidez perfeitamente controlada, não somente ao final da fermentação, mas igualmente ao armazenamento. Em particular, eles não estão sujeitos ao fenômeno de pós-
30 acidificação. Assim, os produtos lácteos de acordo com a invenção são organolepticamente muito satisfatórios.

- Os produtos lácteos de acordo com a invenção são diretamente consumíveis como probióticos, quer dizer que

eles contêm uma quantidade significativa de bactérias vivas, sem nenhum impacto sobre suas qualidades gustativas e, notadamente, sem nenhum impacto sobre sua acidez.

5 - A preparação dos produtos de acordo com a invenção não necessita de nenhuma etapa de termização, nem nenhuma etapa complexa de purificação. Os processos de acordo com a invenção podem, assim, ser implementados de maneira simples, em instalações de fábricas de laticínios clássicas, sem grande modificação do equipamento. Por outro
10 lado, os processos de acordo com a invenção são inteiramente naturais.

 - Os produtos alimentares, notadamente lácteos, de acordo com a invenção podem conter teores muito altos de tripeptídeos VPP e IPP, e isto, com razões elevadas de (IPP
15 + VPP) / (ácido láctico). Esses resultados podem ser obtidos sem etapa de purificação ou de concentração prévia.

 - Os produtos alimentares, notadamente lácteos, de acordo com a invenção, contêm, vantajosamente, uma biomassa grande (i.e., uma grande concentração de
20 microorganismos vivos).

 Por cepa, entende-se, no sentido da presente invenção, qualquer cultura, geralmente pura, de um microorganismo, obtida a partir de uma única célula ou de uma colônia isolada.

25 Por variante ou mutante de uma cepa X, entende-se designar, no sentido da presente invenção, qualquer cepa obtida a partir de uma cepa de referência X. No presente contexto, serão utilizados mais particularmente os termos "variante" para designar uma cepa obtida principalmente por
30 mutação e seleção a partir de uma cepa de referência X e "mutante" para designar, mais especificamente, uma cepa obtida por técnicas de mutagênese aleatória ou dirigida

(por exemplo, transformação genética com o auxílio de vetores), aplicadas à cepa X.

Os mutantes ou as variantes das cepas de acordo com a presente invenção serão afetados pela proteção conferida por esta patente a partir do momento em que eles
5 passam a conservar os aspectos essenciais da invenção, notadamente o fenótipo lactose negativa.

Por cepa com "fenótipo lactose negativa", entende-se qualquer cepa que não tenha a capacidade de
10 transformar a lactose em ácido láctico.

Por cepa com "fenótipo frutose negativa", entende-se qualquer cepa que não possua a capacidade de metabolizar a frutose.

Por meio lácteo, entende-se qualquer meio
15 contendo proteínas de leite, por exemplo, um leite bovino padronizado com 4% de proteínas com leite em pó bovino (desnatado ou não) ou com leite concentrado.

Por produto lácteo, no sentido da presente invenção, entende-se além do leite, qualquer produto
20 derivado do leite, tal como a nata, o sorvete, a manteiga, o queijo, o iogurte, o leite fermentado; os produtos secundários, como o soro de leite, a caseína, assim como diversos alimentos preparados contendo como ingrediente principal o leite ou constituintes do leite. Dentre os
25 produtos lácteos, os produtos lácteos fermentados compreendem entre outros os iogurtes, os leites fermentados, os queijos brancos, os kefirs, os queijos, os produtos lácteos probióticos e, mais geralmente, qualquer produto lácteo que tenha sofrido pelo menos uma etapa de
30 fermentação. O referido leite é, geralmente, leite de vaca, mas pode, igualmente, ser leite de outros mamíferos, como a cabra, a ovelha, a égua, o camelo fêmea, a búfala.

Por produto alimentar, no sentido da presente invenção, entende-se qualquer produto destinado à nutrição humana ou animal. Em particular, os produtos alimentares compreendem produtos destinados à alimentação dos lactentes, das crianças, dos adolescentes e dos adultos. Os produtos alimentares de acordo com a invenção podem conter, no todo ou em parte, pelo menos um produto lácteo fermentado de acordo com a invenção. Os produtos alimentares de acordo com a invenção podem igualmente conter outros ingredientes habitualmente utilizados na indústria agro-alimentar, tais como aditivos, conservantes, frutas ou extratos de frutas, aromatizantes, corantes, agentes de textura, cereais, pedaços de chocolate, etc.

Por fermento, entende-se, no sentido da presente invenção, qualquer composição contendo pelo menos uma cepa viva de microorganismo suscetível de fermentar um meio dado. Dentre os fermentos, os fermentos lácteos são composições contendo pelo menos uma cepa viva de microorganismo suscetível de fermentar um meio lácteo.

De acordo com um modo de realização, a presente invenção refere-se a uma cepa de *Lactobacillus helveticus* que não tem a capacidade de transformar a lactose em ácido láctico. A presente invenção refere-se igualmente a uma cepa de *Lactobacillus helveticus* que não tem a capacidade de transformar a lactose em ácido láctico, e que possui pelo menos uma mutação no operão lactose.

De acordo com um modo de realização, a referida mutação no operão lactose é uma mutação pontual introduzindo um códon de terminação (codon stop). De acordo com um modo de realização ainda mais preferencial, a referida mutação pontual introduzindo um códon de terminação está situada no gene lacL do operão lactose. Por mutação pontual, entende-se qualquer substituição de

nucleotídeo intervindo na sequência, em comparação com uma sequência dita "do tipo selvagem". O versado na técnica sabe identificar um códon de terminação (igualmente chamado de códon sem sentido), e que corresponde geralmente em
5 termos de ARNm a um dos tripletos: UAA, UAG, UGA.

Assim, as cepas *Lactobacillus helveticus* de acordo com a invenção não têm a capacidade de degradar a lactose (não há transformação da lactose em ácido láctico). De fato, as cepas de acordo com a invenção possuem um
10 fenótipo lactose negativa. Por outro lado, elas são capazes de crescer na presença de glicose como fonte de carbono (fermentação da glicose em ácido láctico) e de metabolizar certos componentes do leite, notadamente as proteínas.

Assim, as cepas de acordo com a invenção
15 permitem, vantajosamente, uma fermentação com pH totalmente controlado: o pH final após fermentação é perfeitamente controlado de acordo com a quantidade de glicose inicialmente contida no meio de fermentação. Isto resulta do fato que uma quantidade dada de glicose resulta de
20 maneira quase estequiométrica na mesma quantidade de ácido láctico. Além disso, o emprego das cepas de acordo com a invenção evita qualquer fenômeno de pós-acidificação. Assim, graças às cepas de acordo com a invenção, é possível obter produtos alimentares particularmente satisfatórios no
25 plano organoléptico.

De maneira vantajosa, de acordo com um modo de realização, as cepas de *Lactobacillus helveticus* de acordo com a invenção são tais que um meio lácteo a 4,0% de proteínas totais contendo 1,0% (p/p) de glicose fermentado
30 pelas referidas cepas de *Lactobacillus helveticus* durante um tempo máximo de fermentação de 30h, a uma temperatura entre 30 e 45°C, possua um pH superior ou igual a 4,0; preferencialmente superior ou igual a 4,1;

preferencialmente superior ou igual a 4,2;
 preferencialmente superior ou igual a 4,3;
 preferencialmente superior ou igual a 4,5.

Esta vantagem é então particularmente marcada no
 5 caso das cepas de *Lactobacillus helveticus* hiperprodutoras
 em tripeptídeos IPP e/ou VPP: não é, de forma alguma,
 exigida a escolha de um compromisso entre:

- uma grande produção em tripeptídeos no momento
 da fermentação (necessitando de um tempo de fermentação tão
 10 longo quanto possível), e

- propriedades organolepticamente aceitáveis
 (necessitando de uma acidificação limitada e,
 consequentemente, não apenas um tempo de fermentação tão
 curto quanto possível, a fim de limitar a produção de ácido
 15 láctico por fermentação, mas igualmente uma
 termização/pasteurização a fim de evitar o fenômeno de pós-
 acidificação).

De fato, vantajosamente de acordo com a presente
 invenção, a produção de tripeptídeos VPP e/ou IPP e a
 20 produção de ácido láctico são parcialmente desassociadas: a
 produção de ácido láctico é apenas função da quantidade de
 glicose inicialmente presente no meio de fermentação, e não
 mais função do tempo de fermentação.

Um meio de expressar a concentração em
 25 tripeptídeos de maneira simples consiste em expressar em
 concentração equivalente VPP [VPPEq].

Ela é expressa em mg/kg:

$$[VPPEq] = [VPP] + (9/5 \times [IPP])$$

Assim, de acordo com um modo de realização, as
 30 cepas de *Lactobacillus helveticus* de acordo com a invenção
 são vantajosamente capazes, por fermentação, de produzir os
 tripeptídeos de sequência IPP e/ou VPP em uma quantidade de
 pelo menos 25 mg, preferencialmente pelo menos 30 mg,

preferencialmente pelo menos 35 mg, preferencialmente pelo menos 40 mg, preferencialmente pelo menos 45 mg, preferencialmente pelo menos 50 mg, preferencialmente pelo menos 55 mg, preferencialmente pelo menos 60 mg, 5 preferencialmente pelo menos 65 mg, preferencialmente pelo menos 70 mg, preferencialmente pelo menos 75 mg, mais preferencialmente pelo menos 80 mg de VPP eq por kg de produto fermentado. Tais quantidades de VPP e/ou IPP são geralmente obtidas por fermentação por uma cepa de acordo 10 com a invenção a uma temperatura entre 30 e 45°C, preferencialmente entre 31 e 44°C, preferencialmente entre 32 e 43°C, preferencialmente entre 33 e 42°C, preferencialmente entre 34 e 41°C, preferencialmente entre 35 e 40°C, e mais preferencialmente a 37°C, de um meio 15 lácteo contendo uma quantidade de glicose superior a 3% (p/p) e com um teor total em proteínas superior ou igual a 2% (p/p), preferencialmente entre 2 e 10% (p/p), mais preferencialmente entre 2,5 e 6% (p/p) e ainda mais preferencialmente igual a 4% (p/p).

20 De acordo com um modo de realização, as cepas de *Lactobacillus helveticus* de acordo com a invenção possuem adicionalmente um fenótipo frutose negativa. A combinação dos fenótipos lactose negativa e frutose negativa é particularmente vantajosa.

25 De fato, a frutose tem um grande poder adoçante, e é um ingrediente útil nos produtos alimentares. Assim, se a frutose não pode ser degradada pela cepa de *Lactobacillus helveticus*, o produto alimentar conserva excelentes propriedades organolépticas. Além disso, uma cepa ao mesmo 30 tempo lactose negativa e frutose negativa só poderá germinar em um meio contendo glicose. Assim, o pH final será vantajosamente melhor controlado no caso onde o

produto alimentar contém uma preparação de fruta(s), notadamente pedaços e/ou sucos de fruta(s).

De acordo com um modo de realização, a cepa de acordo com a invenção é escolhida dentre:

- 5 I-3504 depositada na CNCM em 14/10/05;
 I-3505 depositada na CNCM em 14/10/05;
 I-3508 depositada na CNCM em 14/10/05;
 e as cepas variantes ou mutantes destas.

De acordo com um outro modo de realização, a
10 presente invenção refere-se à utilização de uma cepa de *Lactobacillus helveticus* de acordo com a invenção, para a preparação de um produto alimentar ou farmacêutico, notadamente de um produto lácteo fermentado.

De maneira vantajosa, de acordo com um aspecto da
15 invenção, o referido produto alimentar ou farmacêutico possui propriedades anti-hipertensivas.

A presente invenção refere-se igualmente a um produto alimentar, notadamente produto lácteo fermentado, compreendendo pelo menos uma cepa de *Lactobacillus*
20 *helveticus* de acordo com a invenção.

De maneira vantajosa, de acordo com um modo de realização, o referido produto alimentar contém pelo menos 10^6 , preferencialmente pelo menos 10^7 , preferencialmente pelo menos 10^8 UFC/mL de bactérias *Lactobacillus helveticus*
25 vivas. Assim, o produto alimentar de acordo com a invenção contém uma grande biomassa.

De acordo com um modo de realização, o referido produto alimentar contém pelo menos 25 mg, preferencialmente pelo menos 30 mg, preferencialmente pelo
30 menos 35 mg, preferencialmente pelo menos 40 mg, preferencialmente pelo menos 45 mg, preferencialmente pelo menos 50 mg, preferencialmente pelo menos 55 mg, preferencialmente pelo menos 60 mg, preferencialmente pelo

menos 65 mg, preferencialmente pelo menos 70 mg, preferencialmente pelo menos 75 mg, mais preferencialmente pelo menos 80 mg de VPPEq por kg de produto alimentar.

De acordo com um modo de realização, o produto alimentício de acordo com a invenção compreende
5 adicionalmente preparações de fruta(s), notadamente pedaços e/ou sucos de fruta(s).

De acordo com um modo de realização, o produto alimentício de acordo com a invenção possui um pH superior
10 ou igual a 3,85; preferencialmente superior ou igual a 3,90; preferencialmente superior ou igual a 3,95; preferencialmente superior ou igual a 4,00; preferencialmente superior ou igual a 4,05; preferencialmente superior ou igual a 4,10;
15 preferencialmente superior ou igual a 4,15; mais preferencialmente superior ou igual a 4,20.

Vantajosamente de acordo com um modo de realização, o produto alimentício de acordo com a invenção possui propriedades anti-hipertensivas.

De acordo com um outro aspecto, a presente invenção refere-se a um processo de preparação de um
20 produto alimentício.

De acordo com um modo de realização, o referido processo compreende as seguintes etapas:

25 - selecionar uma matéria-prima contendo proteínas de leite, notadamente proteínas contendo as seqüências peptídicas IPP e/ou VPP. Isto pode, por exemplo, ser do leite contendo 2-10% (p/p) de proteínas totais.

- selecionar pelo menos uma cepa de *Lactobacillus*
30 *helveticus* de acordo com a invenção,

- inocular a referida matéria-prima com a referida cepa;

- fermentar a referida matéria-prima em presença de 1-3% (p/p) de glicose durante 12-30 horas a 30-45°C, e em presença da referida cepa.

De acordo com um modo de realização, o processo
5 de acordo com a invenção é vantajosamente desprovido de qualquer etapa de termização após a fermentação. Isto permite conservar bactérias vivas no produto alimentício (probiótico).

De acordo com um modo de realização, a presente
10 invenção refere-se a uma utilização de estreptozotocina para a obtenção de cepas *Lactobacillus helveticus* possuindo um fenótipo lactose negativa.

A presente invenção fornece igualmente um processo de obtenção de tais cepas de *Lactobacillus*
15 *helveticus*.

De acordo com um modo de realização, o referido processo de obtenção de cepas *Lactobacillus helveticus* possuindo um fenótipo lactose negativa, compreende as seguintes etapas:

20 - fornecer pelo menos uma cepa de *Lactobacillus helveticus*;

- colocar em contato a referida pelo menos uma cepa com uma quantidade eficaz de estreptozotocina em presença de lactose;

25 - isolar a ou as colônias de fenótipo lactose negativa.

A população de células de *Lactobacillus helveticus* capaz de sobreviver em presença de estreptozotocina é, de fato, vantajosamente extremamente
30 enriquecida em células lactose negativa.

De acordo com um modo de realização, uma etapa de teste colorimétrico em um meio contendo Xgal e/ou Sgal e/ou qualquer outro composto ligado por uma ligação β -

galactosídica à galactose e que se torna localizável após a ruptura desta ligação pelo microorganismo, é acrescentada ao referido processo de obtenção das cepas de acordo com a invenção. O IPTG pode ser igualmente acrescentado para
5 realizar este teste uma vez que este composto agirá como um indutor do transportador da lactose ou como um indutor da utilização da lactose pelo microorganismo.

A título de exemplo, o referido processo pode ser conduzido da seguinte maneira:

10 - Primeira repicagem das cepas *Lactobacillus helveticus* iniciais (cepas mães), em caldo MRS (Man Rogosa Sharp) neutro, à noite, a 35-40°C;

- Segunda repicagem em MRS neutro.

15 - Incubação até a obtenção de uma biomassa suficiente, por exemplo, 10-30h, a 35-40°C.

- Inoculação de MRS contendo uma concentração de lactose permitindo obter uma biomassa suficiente, por exemplo, 2-7% (p/p); incubação com acompanhamento da DO a 580 nm.

20 - A estreptozotocina é preparada extemporaneamente, e é acrescentada no curso da fermentação, de forma a ter uma concentração final que seja bactericida para a cepa considerada. Esta concentração é dependente de cepa.

25 - Após a incubação a 35-40°C, as culturas são lavadas duas vezes com triptona sal.

- Os resíduos são recuperados na triptona sal, em seguida, caldos de MRS neutros são recolocados em cultura.

30 - Incubação a 35-40°C, até que se tenha um crescimento da cepa.

- Isolamentos são, em seguida, realizados no MRS neutro + Xgal + IPTG, em seguida incubados a 35-40°C sob CO₂. Esta etapa é um teste colorimétrico que permite

determinar se uma cepa bacteriana é lactose positiva ou lactose negativa: Se a cepa for capaz de utilizar a lactose como fonte de carbono, haverá produção de uma substância azul, a colônia será, conseqüentemente, azul e no caso
5 contrário (cepa lactose negativa), ela será branca.

- As colônias brancas são repicadas em MRS neutro e incubadas a 35-40°C.

A invenção será adicionalmente descrita com o auxílio dos exemplos a seguir, os quais são não
10 limitativos.

EXEMPLOS DE REALIZAÇÃO

EXEMPLO 1: Obtenção de cepas possuindo um fenótipo lactose negativa

Material e métodos

15 Cepas iniciais (cepas ditas "mães")

I-3431 depositada na CNCM em 25/05/05

I-3434 depositada na CNCM em 25/05/05

I-3435 depositada na CNCM em 25/05/05

Teste de sensibilidade à estreptozotocina

20 Em um primeiro momento, é verificado que as cepas mães são sensíveis ao antibiótico utilizado, a estreptozotocina. A densidade óptica (DO) a 580 nm é realizada em culturas a 42°C em caldo MRS (Man Rogosa Sharp) neutro. Quando esta atinge 0,1, a estreptozotocina é
25 acrescentada em um tubo a fim de se ter 50 µg/mL ao final (por exemplo, 100 µl de uma solução a 5 mg/ml por 10 ml de meio).

Seleção de cepas lactose negativa

30 As etapas a seguir são realizadas a fim de se obter cepas *Lactobacillus helveticus* lactose negativa:

- Primeira repicagem das cepas *Lactobacillus helveticus* iniciais (cepas mães) a partir das cúpulas do estoque de trabalho, em caldo MRS neutro, à noite, a 37°C.

- Segunda repicagem a 1% em MRS neutro.
- Incubação, 16h, a 37°C.
- Inoculação de 10 ml de MRS a 5% (p/p) de lactose, a 1% e incubação a 40°C com acompanhamento da DO a 580 nm.
- A estreptozotocina é preparada extemporaneamente, e é acrescentada ao final de 2h15 ou de 4h de fermentação, de forma a ter uma concentração final de 50 µg/ml.
- Após as 7h30 de incubação a 40°C, as culturas são lavadas duas vezes com triptona sal.
- Os resíduos são recuperados em 2 ml de triptona sal, em seguida, caldos de MRS neutros são inoculados a 10%.
- Incubação a 37°C, até que se tenha um crescimento da cepa.
- Isolamentos são, em seguida, realizados em MRS neutro + Xgal + IPTG, em seguida incubados a 37°C sob CO₂. Esta etapa é um teste colorimétrico que permite determinar se uma cepa bacteriana é lactose positiva ou lactose negativa: Se a cepa for capaz de utilizar a lactose como fonte de carbono, há uma produção de uma substância azul, a colônia será, conseqüentemente, azul e no caso contrário (cepa lactose negativa), ela será branca.
- As colônias brancas são repicadas em MRS neutro e incubadas a 37°C.

Resultados

Este procedimento permitiu obter as cepas vivas, possuindo um fenótipo lactose negativa que, em seguida, foram o objeto de depósitos junto à CNCM (Coleção Nacional de Culturas de Microorganismos), rua du Docteur Roux n°28, 75724 Paris, França, em conformidade com as disposições do Tratado de Budapeste:

I-3504 depositada na CNCM em 14/10/05;
proveniente da cepa mãe I-3431

I-3505 depositada na CNCM em 14/10/05;
proveniente da cepa mãe I-3434

5 **I-3508** depositada na CNCM em 14/10/05;
proveniente da cepa mãe I-3435

O fenótipo lactose negativa das cepas obtidas é de novo confirmado em um meio gelose de MRS neutro + Xgal + IPTG (teste de coloração dito "branco/azul").

10 **EXEMPLO 2: Cepas possuindo um fenótipo Lactose negativa**

A cepa **I-3504**, depositada em 14/10/05 junto à CNCM (Coleção Nacional de Culturas de Microorganismos), rua du Docteur Roux n°28, 75724 Paris, França, em conformidade
15 com as disposições do Tratado de Budapeste, é uma cepa de *Lactobacillus helveticus* possuindo as seguintes propriedades:

- Lactose negativa; Frutose negativa
- produção de IPP e VPP: vide Figuras 4 e 5
- 20 - propriedades de acidificação: vide figura 1
- inibição da ACE: vide Figura 6

A cepa **I-3505**, depositada em 14/10/05 junto à CNCM (Coleção Nacional de Culturas de Microorganismos), rua du Docteur Roux n°28, 75724 Paris, França, em conformidade
25 com as disposições do Tratado de Budapeste, é uma cepa de *Lactobacillus helveticus* possuindo as seguintes propriedades:

- Lactose negativa; Frutose negativa
- produção de IPP e VPP: vide Figura 5
- 30 - propriedades de acidificação: vide figura 2

A cepa **I-3508**, depositada em 14/10/05 junto à CNCM (Coleção Nacional de Culturas de Microorganismos), rua du Docteur Roux n°28, 75724 Paris, França, em conformidade

com as disposições do Tratado de Budapeste, é uma cepa de *Lactobacillus helveticus* possuindo as seguintes propriedades:

- Lactose negativa; Frutose negativa
- 5 - produção de IPP e VPP: vide Figura 5
- propriedades de acidificação: vide figura 3

1. Medida das propriedades de acidificação das diferentes cepas variantes

As propriedades de acidificação são avaliadas
10 como a seguir:

Um meio contendo 120g de leite em pó desnatado (PLE) em 930ml de água é pasteurizado 10 min a 95°C. Este meio é inoculado a 0,5%, em seguida submetido à fermentação a 37°C em presença de diferentes concentrações de glicose.
15 (A abreviação Gx indica uma concentração de x% (p/p) de glicose no meio antes da fermentação). O pH é então controlado em função do tempo, para diferentes cepas. Uma extração de meio fermentado efetuada a 30h de fermentação será utilizada para as medidas de produção dos tripeptídeos
20 IPP e VPP, assim como para as medidas de atividade ACEI cujos resultados serão indicados abaixo.

Para I-3504, são apresentados também os resultados da cepa mãe (I-3431, cepa lactose positiva).
(vide figura 1)

25 Para I-3505, são apresentados também os resultados da cepa mãe (I-3434, cepa lactose positiva).
(vide figura 2)

Para I-3508, são apresentados também os resultados da cepa mãe (I-3435, cepa lactose positiva).
30 (vide figura 3)

Os resultados apresentados nas figuras 1 a 3 demonstram que as cepas de acordo com a invenção permitem vantajosamente controlar finamente o pH ao fim da

fermentação de acordo com a quantidade de glicose inicialmente presente no meio. Por outro lado, a fermentação por cepas lactose negativa conduz vantajosamente a valores de pH elevados, que darão produtos alimentares organolepticamente aceitáveis.

2. Medida da produção dos tripeptídeos IPP e VPP

Material e método

Uma amostra de meio lácteo extraída em 30 horas de fermentação, tal como descrito precedentemente no ponto 1, é utilizada para fazer esta medida.

A análise do conteúdo em peptídeos, notadamente o teor em tripeptídeos IPP e VPP, é conduzida com um método de cromatografia líquida CLHP associada a um sensor do tipo MS/MS como descrito a seguir:

- Devido às interferências inerentes à análise de amostras complexas, o uso de padrões internos deuterados acrescentados em quantidade conhecida e controlada no momento da preparação da amostra é fortemente aconselhado.

- A preparação da amostra é feita por diluição do meio fermentado em uma mistura de água, de metanol e de ácido trifluoroacético (50/50/0,1%), contendo 25 ppm de padrão interno VPP deuterado (referido, a seguir, como VPPd, de fórmula H-Val [D8]-Pro-Pro-OH, MM = 319,45 g/mol, disponível junto à sociedade Bachem Chemicals, França) e 10 ppm de padrão interno deuterado (referido, a seguir, como IPPd, de fórmula H-Ile [D10N15]-Pro-Pro-OH, MM = 336,2 g/mol, disponível junto à sociedade NEOMPS, Groupe SNPE, rua de Boulogne n°7, 67100 Strasbourg, França) em uma relação de 1 para 3 (por exemplo, pesagem precisa em um eppendorf de 600 mg de amostra em 1200 mg de mistura água-metanol-TFA contendo os padrões internos).

- Esta amostra diluída é, em seguida, centrifugada a 14000g durante 15 minutos. O sobrenadante

claro obtido, contendo os peptídeos gerados durante a fermentação, é, em seguida, diluído precisamente ao 1/50 em uma mistura de água-metanol (50/50, v/v) contendo 0,1% de ácido trifluoroacético.

- 5 - A solução diluída assim obtida é, em seguida, analisada em um sistema cromatográfico CLHP do tipo Agilent 1100 (sociedade Agilent Technologies France, rua Galvani n°1 91745 Massy cedex, França), equipado de uma colônia adaptada para a análise dos peptídeos, do tipo Waters
- 10 Biosuite® (3mm 2,1 x 150mm, C18 PA-A, WAT186002427, Waters France, rua Jacques Monod n°5, 78280 Guyancourt) à temperatura de 50°C, vazão de 0,25 ml/min. Os peptídeos são eluídos de forma clássica com um gradiente crescente de solvente B (Acetonitrila + 0,100% de ácido fórmico) no
- 15 solvente A (Água + 0,106% de ácido fórmico), em uma duração de 35 min a 2 horas em função da resolução cromatográfica desejada. O método adaptado à dosagem dos peptídeos IPP e VPP utiliza o seguinte gradiente:

Tempo	% Tampão A	% Tampão 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

- 20 - A detecção é feita com o auxílio de um detector específico do tipo MS/MS, por exemplo, com um aparelho com porta iônica como o Esquire3000+ (Bruker Daltonique, rua de l'Industrie, 67166 Wissembourg Cedex), parametrizado em

ionização por eletrospray no modo positivo, seja para a análise global do conteúdo peptídico (modo MS-MS), seja para a quantificação precisa e específica de um peptídeo a partir de seus fragmentos característicos (modo MRM). No caso da dosagem dos peptídeos IPP e VPP, mas também dos padrões internos IPPd e VPPd, esses peptídeos são isolados a partir de sua massa específica (íons monocarregados 312,2 Da para VPP; 326,2 Da para IPP; 320,2 Da para VPPd; 337,3 Da para IPPd) e quantificados a partir da intensidade de seus íons específicos após a fragmentação (fragmentos ≥ 85 Da).

A integração dos picos cromatográficos de cada um dos peptídeos IPP, VPP e a comparação nas superfícies de pico dos padrões internos de concentrações conhecidas IPPd e VPPd permite, em seguida, calcular, por regressão linear simples, o teor inicial da amostra em VPP e IPP (geralmente expresso em mg/kg ou ppm).

Resultados

	VPPEq (mg/kg de meio fermentado)
Calpis CM4	51
CNRZ 244	57
I-3504 (com 2% (p/p) de glicose)	80

A **figura 4** mostra uma comparação da produção em tripeptídeos IPP e VPP da cepa **I-3504** (2% (p/p) de glicose são acrescentados ao meio) em relação a duas cepas da técnica anterior.

A cepa CM4 da sociedade CALPIS é descrita na patente EP 1 016 709 enquanto que a cepa CNRZ 244 é descrita no pedido de patente WO 2004/060073.

É claro nesta figura que a cepa **I-3504** (cepa de acordo com a invenção) possui uma produção de tripeptídeos IPP e VPP bem superior àquelas duas cepas precedentes nas mesmas condições.

5 A **figura 5** mostra uma comparação da produção em tripeptídeos IPP e VPP das cepas de acordo com a invenção entre si.

3. Medida da atividade ACEI (Inibição da Enzima de Conversão da Angiotensina)

10 Material e método

Uma amostra de meio lácteo extraída depois de 30 horas de fermentação, tal como descrito precedentemente no ponto 1, é utilizada para fazer esta medida. O presente método tem como base o método de Cushman e Cheng (Cushman e
15 outros Biochem. Pharmacol. 1871. 20:1637), adaptado para torná-lo compatível com amostras do tipo produtos lácteos fermentados.

1. Preparação dos reativos e das soluções

20 **1.1 Tampão borato de sódio 0,1M pH 8,3, adicionado de 0,3M de NaCl**

Pesar 6,1843 g de H_3BO_3 (Carlo Erba ref: 402 766). Dissolver em aproximadamente 800 ml de água desmineralizada, ajustar ao pH 8,3 com uma solução de NaOH, em seguida acrescentar 12,0 g de NaCl (concentração final
25 0,3M) e completar em 1 litro com a água desmineralizada.

1.2 Preparação do substrato HHL: solução de Hip-His-Leu a 5mM em um tampão de borato de sódio 0,1M pH 8,3 com 0,3M de NaCl

Pesar exatamente 42,95 mg de peptídeo HHL anidro
30 (N-Hipuril-Histidil-Leucina tetrahidrato PM: 501,5 g, Sigma-Aldrich ref: 53285-250 mg) e dissolver em aproximadamente 15 mL de tampão de borato de sódio 0,1M pH

8,3 com 0,3M de NaCl, depois completar em 20 mL com este mesmo tampão.

1.3 Preparação da solução de ACE a 0,1 U/mL

5 A enzima de conversão da angiotensina sob a forma de pó liofilizado (origem: pulmões de coelho, Sigma-Aldrich ref. A6778, 0,25 unidades) é solubilizada em 2,5 mL de tampão de borato de sódio 0,1M pH 8,3 para obter uma solução a 0,1 U/mL. A solução assim preparada deve ser
10 utilizada, armazenada a 4°C, até no máximo 2 semanas para preservar uma atividade enzimática suficiente.

2. Preparação das amostras de leite fermentado

 É necessário acondicionar a amostra a um pH compreendido entre 8,0 e 8,5 de forma a ficar próximo do pH
15 ótimo da ACE. O leite fermentado é primeiramente centrifugado, o pH do sobrenadante é, em seguida, ajustado entre 8,0 e 8,5 (idealmente pH 8,3), depois ultrafiltrado com o auxílio da unidade de filtração Vivaspin com um limiar de clivagem de 10000 Daltons (Vivascience, França) a
20 fim de eliminar os elementos interferentes (proteínas inteiras, sais de cálcio).

 O protocolo completo é o seguinte:

 - Depositar cerca de 6 mL de leite fermentado em um tubo tipo falcon de 15 mL após ter previamente pesado o
25 tubo vazio. Peser a quantidade de leite fermentado depositada no tubo.

 - Centrifugar em 14000 g durante 10 min a 10°C.

 - Recuperar o sobrenadante.

 - Quantificar a proporção resíduo/sobrenadante, o
30 que permite, se necessário, determinar o IC50 equivalente ao produto de origem e não a seu único sobrenadante.

 - Extrair 2,0 mL de sobrenadante em um tubo de ensaio e medir o pH.

- Acrescentar o volume necessário de NaOH 2M a fim de obter um pH compreendido entre 8,0 e 8,5 (alvo: 8,3) após o acréscimo do tampão de borato, e depois agitar.

5 - Acrescentar o volume necessário de tampão de borato para diluir o sobrenadante inicial a 1/2 levando em conta o volume exato de NaOH acrescentado (por exemplo: amostra de ensaio de sobrenadante = 2 mL + 250 µL NaOH + 1,75 mL tampão borato).

10 - Verificar que o pH final está compreendido entre 8,0 e 8,5. Mais à frente, recomeçar acrescentando mais ou menos NaOH. Um precipitado é formado: ele é devido aos sais de cálcio.

15 - Ultracentrifugar a amostra em 12000 g durante 15 min a 10°C com o auxílio de unidades de filtração Vivaspín 10000 Daltons (capacidade 4-6 mL) a fim de obter uma amostra límpida.

3. Medida da inibição da ACE pelas amostras de leites fermentados

20 A cada série de análise, testes de controle (0 e 100% atividade ACE) devem ser preparados. Para cada amostra, dois ensaios independentes e um branco são realizados para cada diluição. Deve-se, na verdade, ajustar ao máximo (diluindo) a quantidade de amostra necessária para diminuir de 50% a atividade da ACE.

25 Para isto:

- Depositar 80 µL da amostra condicionada a um pH 8,3 no tubo branco e nos tubos de ensaio.

- Depositar 80 µL de água desmineralizada nos tubos de controle 0 e 100%.

30 - Acrescentar 200 µL da solução de substrato HHL a 5mM em todos os tubos. Agitar.

- Colocar os tubos em um banho de água termostatado a 37°C, deixar se equilibrar na temperatura.

- Desencadear a reação enzimática por acréscimo, em cada tubo, de 20 µL da solução de ACE a 0,1U/mL, salvo para os brancos e controle 0% para as quais se deve depositar 20 µL de tampão borato pH 8,3.

- 5 - Deixar hidrolisar durante 1h exatamente a 37°C.
 - Interromper a reação acrescentando, em cada tubo, 250 µL da solução de HCl 1M.

Tabela recapitulativa da composição dos diferentes meios reacionais:

	Amostra de ensaio	Acréscimo do substrato	Desencadeamento hidrólise
100% controle	80 µL água desmineralizada	200 µL HHL	20 µL ACE
0% controle	80 µL água desmineralizada	200 µL HHL	20 µL tampão borato
Amostra (ensaio)	80 µL amostra	200 µL HHL	20 µL ACE
Amostra branca	80 µL amostra	200 µL HHL	20 µL tampão borato

- 10 A leitura é feita por extração do substrato hidrolisado (ácido hipúrico) e sua quantificação com o auxílio de um espectrofotômetro, com o seguinte protocolo:

Acrescentar, em cada tubo, 1,7 mL acetato de etila, agitar.

- 15 Centrifugar a 2000 g durante 5 min a 10°C.

 Extrair 1 mL exatamente do sobrenadante em um microtubo eppendorf.

 Evaporar o acetato de etila a 120°C durante 10 min em um bloco aquecedor.

- 20 Acrescentar exatamente 1 mL de água desmineralizada, depois agitar 10 seg para retomar o ácido hipúrico.

 Ler a absorvância a 228 nm em cubas adaptadas à leitura em UV.

Expressão dos resultados:

A porcentagem de inibição da ACE é calculada como a seguir:

$$\frac{(\text{Abs } 100\% \text{ ctl} - \text{Abs } 0\% \text{ ctl}) - (\text{Abs am} - \text{Abs am branca})}{(\text{Abs } 100\% \text{ ctl} - \text{Abs } 0\% \text{ ctl})} \times 100$$

com Abs = absorvância a 228 nm após a extração do ácido hipúrico

ctl = controle

am = amostra

Para um leite fermentado, expressamos o IC50 como sendo a quantidade de sobrenadante deste leite fermentado que inibe 50% da atividade enzimática da ACE no meio reacional, seja em microlitros de sobrenadante de leite fermentado por mililitro de meio reacional.

Resultados

A **figura 6** mostra uma comparação da atividade inibitória da enzima de conversão da angiotensina das diferentes cepas de acordo com a presente invenção com a de outras cepas da técnica anterior.

Na ordenada é expressa a concentração equivalente de leite fermentado por ml de meio reacional necessária para inibir 50% da atividade da enzima de conversão da angiotensina (IC50). Quanto mais elevada for esta concentração, menos capacidade tem, consequentemente, a cepa de inibir a enzima de conversão da angiotensina.

EXEMPLO 3: preparação de um produto lácteo (probiótico) de acordo com a invenção

Um produto lácteo fermentado é obtido como indicado abaixo.

Leite de grande mistura, previamente desnatado, pré-pasteurizado e resfriado a 4°C é padronizado em proteínas (4,0%) com leite em pó desnatado e adicionado com

glicose a uma razão de 1,8% (p/p). O meio lácteo então preparado é submetido a uma pasteurização (95°C - 8 min). Após o resfriamento a 37°C, o meio lácteo é inoculado com uma cepa de acordo com a presente invenção a uma razão de 5 10^7 UFC/mL e mantido a 37°C durante toda a duração da fermentação. Quando o pH 3,8 é alcançado, a coalhada é retirada da cuba de fermentação para sofrer filtração (lissage) (por passagem através de um filtro) e resfriada até 10°C em um permutador de placa. A coalhada filtrada e 10 resfriada é, em seguida, adicionada de uma preparação de frutas (tendo um pH entre 4 e 4,1) a uma razão de 15% do produto final, acondicionada em frascos de 110 mL e estocada a 4°C durante 28 dias.

O produto assim preparado contém tripeptídeos de 15 sequência IPP/VPP a uma razão de 65 mg/kg de equivalente em VPP. O teor em peptídeos do produto é vantajosamente estável durante toda a duração de vida do produto. A diminuição de pH no curso da estocagem refrigerada é vantajosamente desprezível (inferior a 0,1 unidade) e a 20 população das cepas de acordo com a invenção permanece vantajosamente compreendida entre 10^7 e 10^8 UFC/mL.

EXEMPLO 4: Identificação de mutações pontuais sem sentido no operão lactose de cepas de acordo com a invenção

A partir das seqüências dos operões lactose das 25 cepas DPC4571 e ATCC15009 disponíveis no genbank, oligonucleotídeos (percursores) foram escolhidos em genes que pareciam estar mais conservados. Esses oligonucleotídeos permitiram realizar uma PCR de "longa faixa", depois de começar a seqüenciação do operão lactose 30 de acordo com a invenção. A seqüenciação foi, em seguida, praticada passo a passo, isto é, em função das seqüências obtidas, outros percursores serviram para novas reações de seqüência.

5 códon de iniciação do gene *lacL* (que faz cerca de 1900 pbs)
codificador para a β -galactosidase.

Fora esta mutação, os operões lactose das duas cepas I-3431 e I-3504 são idênticos.

10 Sequência do operão lactose da cepa I-3431
 (mutação delimitada)

aaatgaaaaltcatgatctaactctggtatattgtgataagcgctttcaacatcagtgccccagctgtcaattctccaacgccgcg
aactgcacctgcaattactaacacgcgttctgcgaagaagtggtatgttcttcaatgtagtagcggttctcaagctcctcagcagtagta
aggcaaaactgaaattaaatggttttctgcttgtgtaagttagagagactgaacttttcatgttactatcatttltgtgtggttct
acgattaatggttaacttcttagttgcatgtgcattcttctggtgaacccaataactacgttaactcgttagcgagccgttggcata
atttaccttctttagctccagccattctatcaggataagtttaccggataaaacctataatcaactctgttagcgagccgttggcata
atcaatcgaataccaattacaggcagggttggaatcccttcttaccataataacgcattgtaaccttaatgtagcagccagcatc
aatattatagatgattttgcatttgttcaggagtagttaaagttgataggtaaatgaaatttcagcacttttgcatactcgtgattgc
aaatttgtttaaagggtgcaataggcagttcggcaaaagtcagtcgtctactttaaatggatatcagtaacattagttaaacata
cagctccgagccattgagctgccttttagattaaatccactgcctcggtcgttactgttagttgctcggcaaaaagtaggagtaggta
cacgataaagccattccttgcgtgtacttttaacgattcaagtcggccggttcataactaaagaigtatgaaaatcttggcatta
acgccaatgtggcatcccataaatgatatgcaattgattttgtgtaatccataatagtagtctacttctcgtcatagctggtttgtg
ttctatctcggaacattaaaccatcgccagaaaaltcataatctgaatgacgatacataaaatggccgataacgcaaaacat
catgiccactaatttcatcatgaaccaataatgccgtatcgataaagtcagataaaatccaccgaagtattgagggtatttatcaa
gtaatttgatatatgaalccatgccgcccgttagaattgccatgtcatgcataatcgcattccataaatggcgttgggtgcatctttg
caagtattcttcaacclttttagggtgfaaatacatacagcttcaacatctgaaattttatctttaaattcgggacgggtgactacgcctt
catagtgaaactaagcgtgtatcatcgtgagatttgtaaaattcaltcattgcatgatgttgcctccagcataggattcgttgccaagt
gaccaaagagaatagagggtgtatttctgaaagtcctgtagittattgcgtgctgatcaatcactgcttcttctcattgcggaatcg
aacctgggtacattgtcagaaggttcaatctctccatttttgcgaagttaccatgtgattcaagggtatttctcgccatgacataaatg
ccatttgcacgcaagataataccacggaatttggttgggtagtgacatgttctaacagcattaaatatttttctttaaagtattaa
gtcagttgtcatalcactcattgttatgctgcgaccacggttgcacccattcatgtcggtaactccattgataaataacgcttgcca
ttaacaaaacaacttttctggactaatttcaatttctctaagccaaattggaaaggaatcagctctagcaagtttgtgttcatca
taaaccttcaattagaagctgataaagatatggatcatgggtatttccaagatgcacgttttgaatttttcaattatttgaacgttctc
ttgatattcttcaatttctccagaagagtagtgccttataatctttagactaataaaatggaaatgaaccggatttttaaccaataaaatgaa
gcttaaggtgaagatgccatcttgataattatctgcaactcgtgttcaaatccatgtccattagtggttagcggggatccctag
tagtcaactgagcgggaagatgccagagaagcgggaacatgtcttgggtcttctagccaagaatgcagtagctgtgttataaaacttcta
ctgctaaaagattatcttttctgaaatatatggcgttaaatcaaatctggaaggagtaaagcgtgtcttccgcatagcccacaaaatg
cccgttaaccatacacaattgcttttgcagcccttcaaatttaatatgaacatcttttccaattaaggctgagcttaaatcaaatcg
cttcaagtagaacccgactgtgttactgcgccttctgctaaatgagcccttctcatgatcattaggatctaaagcgtgaagctggggcg
cggaagatttgccttccaaggaaggaggacattaatatattgattttagttagtattgtcicaattcgatttcaacttgggaactgggat
cgaatcaaaattgaagaatcaaaatcacgcgtgataaaaatctgtggaagatccatagaggattagcggaaaaatgaaatttccat
tttccatttaaactttgttagactactgtgttgccttggcactcgcgataatcttcaaaaaagggatgatcactgtgtgcggggcaatt
gattgacccgaatacctcaggattatctagccaattgatatttgcgtgcataatgatgcctcatttctattaaaaatatttcgaaagc
gctttattatagcatgataaataaacatttatttagtattagtaagaatttattacaattattataagattacttgcataaagactg
aatatcagtcagataaataaaccttatttagtggaatttagtaaaattttgtataataaagaagaagaaattataaaaaatagaaaaag
aaataattatgagaacaattaaagaaattgcgtggaatcaggttatctccagcgacagatcacggttatttataaataatgatocia
attgtctattactgcagataccaaaaataagatttggagattgcataaaattgggtcatttgggaagatcacaagaagaagaaa
atcaagcccacaattgcttactttatcagtagtaaatcataaggaaacaattgcaggatgagtagtttactcgttgaaacaaagcatta
gtttcaactgtagagogagatgcgtggaagatgaaaaactttatgacatagaagatttaaatcaagsaacgcttcttgttccaagga
ttattggagtagggggcggaagccaattgaaaacgccagttgggttaagctgcataaagtttgcctaatagttcttcttaataccaa

tccagctccogaattattgattcaattcgccctaactcgcccttacgggttaaaaaatgctattgatttgtttatcaaaaatggcattaac
 aagatcggttttatcggtggcgttggccctaagcatgaccatattcaggaaaaagatttgcgttaattacttttggtaatacatgaa
 aactagaggcatggalactaaatggacatcggtgaaggaccggttagcgttgaaaaatgggtataaaatgggaaaaatgggttgg
 gctaaatacaaaaatgattacctgaagcatttttaattgcatctgatactttagcogttggcgttttacaagcccttaacgaagaaaa
 cglaaaatgacaaaagatacgaatcctaagtaataalagcaatgttggttaagtaatttaccaccactttctcgttcaaca
 ttaatacaacaagaaatgattgatgacacttgcactttgactcaattgattatccagatcgaccaaagatgatalccggatg
 aacactaaattggtaglacgaaaaagccttgcgttcccaagaaaagtaaattttttagtaaaaaataattttgatagaaaataaaa
 aagagaatgtgaacagctcacattctcttttatttacttagttaacaaaggagcgtatagactttcatgcaaacgattgcagagatt
 cattggggagggaaggaaaaagatgaataatcataaaatcaggaagcaagtcatttccatgcttcttttgggttgggaattt
 aggatcgcagccttttatggcgtaatgagtagcgtattttattttatcactagtgccatgtttacaggactagatcattcagttgcag
 ataagtaattggcctaattactgcatgtagtttagtaagaaaatgtagagtagtaattgatccagtggttgggaacatcgttga
 aataclaaaacaagggtgaggcaagtttaagccttggatcttattggaaacggtagctagtgccgacttactgaattcttactg
 gtatttgcgcttggcacataagagtggttcttttgcaattttatttgaatcattatcggtttgacgttttttcttctatcagatgg
 ggcatggttccagccttaagtgaggattcacacgcacgttggatttatactgcttggggactttttcagggtcaattggttggaaacg
 gactaactatcattgttggcactggttaaccggtgaacttaagcaatgactggcaagcatgaagaagggtctcgttgggttgg
 ccttggcggcgttatttcagccttagctattcttggcactaaatgctattttaggaactaatgaaaaacataatttaatagaaattct
 gccagtaaaaaacaacttttaggtcaagtatttggggcaatttcacataatgatcagattttatagccaagtttggccttattgatgttc
 tcatggcctaattgaattacaaaatggggaatgtttatctgtacaaatcgtgattaataaaocaaatgacttctgggttgggtgca
 ttgccacattaatcgtttttgcaattgcttccaattttaaaataatataccaagaaaatggcatttatttggcgttcaaatgtg
 tatgatttggcatacgggttgcattttcgggtcgaataacgicattttaatggatttagggtagcttatttaatacaactttgctcaa
 tttaglaactgttttaacattaacigatgcaatcgaatattggcagctgaaaagtggtcagagaaaatgaagccgctgttttagctgttc
 gaccaatgttgcgataaatttaccggtgctatttcaaacgcgctagtaggatagttagcaattgctggcaggcatgactggttcagc
 aactgcagcagatagacaagtcacgatatttagcatttcaatatatggccttatatgtgccattaatttggcagtttagctattatcat
 tttataagcaaggtaactttatctgaaaagaaacacgcctcaagtggttgaagaattaaagagcaaacctgcacaagggaagat
 cgaagatggcaatttaoctgcagcaaatttaagtgactgcaattttagcaacctgcagatggtaaatatgactatgtctgaagt
 aatcgatgaaaatggcaaaaacatttctggttaaaggccttgcatacgatccaagcagtgggcaaattttggcacatttgatggtta
 aaatlaagttaccttggtagcaagcatgctgttgaattgtaactgaaaatggctcgaagttatagttcacggttggcttggcaca
 gtaatttgcgttggtagaaggatttgagtcattatgatgatggacaaatgttaaaaaagggtgaactgctattagaatctgaccgtg
 atttagcactaaaaaatgggtataaagatacgtatgtaatttctatactcaacctggtagagtagaaaaaatgagtaaaatttcgg
 caggtaaaagtgttgaacatgggtcaaaaagggttgaagtgaagtttaagtagaggaaactgtagtaagcataaaatlaatatga
 ttacatgtataaaaaagaatgacttttagtgttaaglaaaacttttggtaaaagaaaaaatttataagccttttttaaaaaaagaatg
 acgtaaataagcctttctttaaataattatacttagtaaatagcttagtaaatcctaataaataattttactagaacaaaaaaaatgat
 aaattatttctgtgaagcgaatttgcaaaagggaatcttgggagggaattatcatgcataatcataaagttcggggaaacaaaatgatt
 cctaigcatcattttgttgggcaatttggggcactcagcattttaggttgaatgaglacataattttattttattactagtggaatggtt
 agcggattaaatcaatcgttgcgtataaaatagtaggtttagttagtgcataaaggaatggttagttagttagttagttagttagt
 ccttatttttagcagcattattactatttactgttatttggatttagcacaacagaattggatccttttgcgaatttgggttgggttga
 acatogcctttgatgttttctattcattatcagatgttcatattggggcatggttccagcttgagtggaagatcacatgaacgttgaatt
 atacttacttgggtccctttcaggtagctatttgggtgaatggttggcaatttgggttggcactgggttaccggtgaacttacggtt
 actggcaaacacgaagaaggagctcctggttgggttgccttggcggcgttaatttcagccttagcaattatttggccttgattgttgg
 ctttggtagtaaaagaaaagcacaacattattagaattcggccaaacagaaaaccacttggcgaagtatttgggtcgtatttcc
 ataagatcaaaatttgggtgaaggttagcttacttattgattcacttgcgttgaattactaatgggttttggctacatgtacaagt
 gtaattggcaagccaaatgatcttgggttagtggtgaattgcaacaatttgggtgctgcatagtcatttcccggtttgaac
 aaataatltccaagaaaatggttatttgcaggccaaacttgcattggtattagcatatgcttatttcttggctgaacaatgctt
 ctaattggatttaggcttagtttattcaalattaactcgtctgttggtaactgtttaaacttgaactgtagctattgaatatggtcaactta
 agattgggtcaaaagaaatgaagccgttgggttagctgtcctcaatgattgataaaattactggtgctgttcaaatgccttagttggtta
 tgggtcaattgcagctgggtgactggatcagctcagcagatagcagagcaagggtattacacatttaattatttggcctt
 atalatctttagcttggcagtttattttagtattttagcgaagtaactttagtgaaaagaaacacgcacaaagttattgaa
 gaattgaagagtaaacitgcacaaggcagattgaaaagaagacttcagtagatacaggaaacaaaagaagtaacttattg
 cacctgctgattggtgaattatgcaaatgtcttctgttggatgaagattgtaaaaccatttccctggtaaaaggatttgcattgagcc
 aagcagtggtcaaatattgcaccatttgatggaacgatcaagtttacttgcgtacaaagcatgcatcgagattgtgtcacaacaa
 tggactacaagtgttgcattgtaggttgggtactgtcaattacgtgggaaggccttgaacatttctacgatgattgttcaaacaa
 gtgaaaaagggtgataaattacttaggttgcgtgatttggcttcaacaatgggtataaagacagatcgatatttctatactc
 aaccaggtagaattcaaaattctggtgctattcaagctggttaagatat

Da mesma forma, análises de seqüenciações revelam as seguintes mutações no operão lactose de cepas de acordo com a invenção:

- Cepa I-3505 por comparação com a cepa I-3434:

5 Na cepa I-3505, uma base adenosina substitui uma base guanina que provoca a aparição de um códon de terminação, com 1713 pares de bases do início do gene *lacL* codificador para a beta-galatosidase.

- Cepa I-3508 por comparação com a cepa I-3435:

10 Na cepa I-3508, uma base adenosina substitui uma base guanina que provoca a aparição de um códon de terminação, com 183 pares de bases do início do gene *lacL* codificador para a beta-galatosidase.

REIVINDICAÇÕES

1. Cepa de *Lactobacillus helveticus* que não tem a capacidade de transformar a lactose em ácido láctico.

2. Cepa de *Lactobacillus helveticus*, de acordo com a reivindicação 1, possuindo pelo menos uma mutação no operão lactose.

3. Cepa de *Lactobacillus helveticus*, de acordo com a reivindicação 2, possuindo pelo menos uma mutação pontual introduzindo um códon de terminação no operão lactose.

4. Cepa de *Lactobacillus helveticus*, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, tal que um meio lácteo com 4,0% de proteínas totais contendo 1,0% (p/p) de glicose fermentado pela cepa de *Lactobacillus helveticus* durante um tempo máximo de fermentação de 30h, a uma temperatura entre 30 e 45°C, possua um pH superior ou igual a 4,0, preferencialmente superior ou igual a 4,1.

5. Cepa de *Lactobacillus helveticus*, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, capaz, por fermentação a uma temperatura entre 30 e 45°C, mais preferencialmente entre 32 e 43°C e ainda mais preferencialmente a 37°C de um meio lácteo contendo uma quantidade de glicose superior a 3% (p/p) e com um teor total de proteínas superior ou igual a 2% (p/p), preferencialmente entre 2 e 10% (p/p), mais preferencialmente entre 2,5 e 6% e ainda mais preferencialmente igual a 4%, de produzir os tripeptídeos de sequência IPP e/ou VPP em uma quantidade de pelo menos 25 mg, preferencialmente pelo menos 50 mg, mais preferencialmente pelo menos 75 mg de VPPEq por kg de produto fermentado.

6. Cepa de *Lactobacillus helveticus*, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, que possui adicionalmente um fenótipo frutose negativa.

7. Cepa de *Lactobacillus helveticus*, de acordo com a reivindicação 1, escolhida dentre:

I-3504 depositada na CNCM em 14/10/05;

I-3505 depositada na CNCM em 14/10/05;

I-3508 depositada na CNCM em 14/10/05;

e as cepas variantes ou mutantes derivadas destas.

8. Utilização de uma cepa de *Lactobacillus helveticus* conforme qualquer uma das reivindicações 1 a 7, para a preparação de um produto alimentício ou farmacêutico, notadamente de um produto lácteo fermentado.

9. Utilização, de acordo com a reivindicação 8, tal que o produto alimentício ou farmacêutico possui propriedades anti-hipertensivas.

10. Produto alimentício, notadamente produto lácteo fermentado, compreendendo pelo menos uma cepa de *Lactobacillus helveticus* conforme uma das reivindicações 1 a 7.

11. Produto alimentício, de acordo com a reivindicação 10, contendo pelo menos 10^6 , preferencialmente pelo menos 10^7 , preferencialmente pelo menos 10^8 UFC/mL de bactérias *Lactobacillus helveticus* vivas.

12. Produto alimentício, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 ou 11, contendo pelo menos 25 mg, preferencialmente pelo menos 50 mg, mais preferencialmente pelo menos 75 mg de VPPEq por kg do produto alimentício.

13. Produto alimentício, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 12, compreendendo

adicionalmente preparações de fruta(s), notadamente pedaços e/ou suco de fruta(s).

14. Produto alimentício, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 13, possuindo um pH superior ou
5 igual a 3,85, preferencialmente superior ou igual a 4,00, mais preferencialmente superior ou igual a 4,20.

15. Produto alimentício, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 14, que possui propriedades anti-hipertensivas.

10 16. Processo de preparação de um produto alimentício compreendendo as etapas a seguir:

selecionar uma matéria-prima contendo proteínas de leite, notadamente proteínas contendo as seqüências peptídicas IPP e/ou VPP;

15 selecionar pelo menos uma cepa de *Lactobacillus helveticus* conforme uma das reivindicações 1 a 7;

inocular a matéria-prima com a cepa;

fermentar a matéria-prima em presença de 1 a 3% (p/p) de glicose durante 12-30 horas a 30-45°C, e em
20 presença da cepa.

17. Processo, de acordo com a reivindicação 16, desprovido de qualquer etapa de termização após a fermentação.

18. Utilização de estreptozotocina para a
25 obtenção de cepas de *Lactobacillus helveticus* possuindo um fenótipo lactose negativo.

19. Processo de obtenção de cepas de *Lactobacillus helveticus* possuindo um fenótipo lactose negativo, compreendendo as etapas a seguir:

30 fornecer pelo menos uma cepa de *Lactobacillus helveticus*;

colocar em contato a, pelo menos uma, cepa com uma quantidade eficaz de estreptozotocina em presença de lactose;

5 isolar a ou as colônias de fenótipo lactose negativo.

20. Processo, de acordo com a reivindicação 19, compreendendo uma etapa de teste colorimétrico em um meio contendo Xgal e/ou Sgal e/ou qualquer outro composto ligado por uma ligação β -galactosídica à galactose e que se torna
10 detectável após a ruptura desta ligação pela cepa de *Lactobacillus helveticus*.

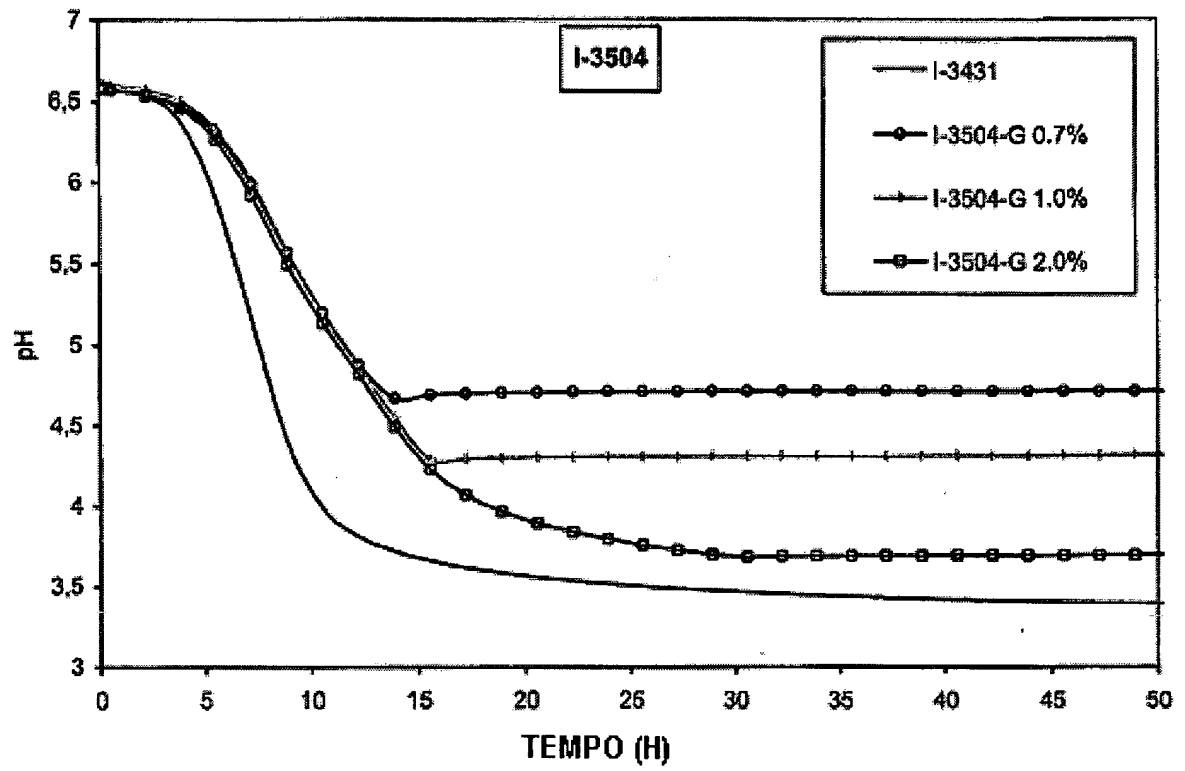


FIGURA 1

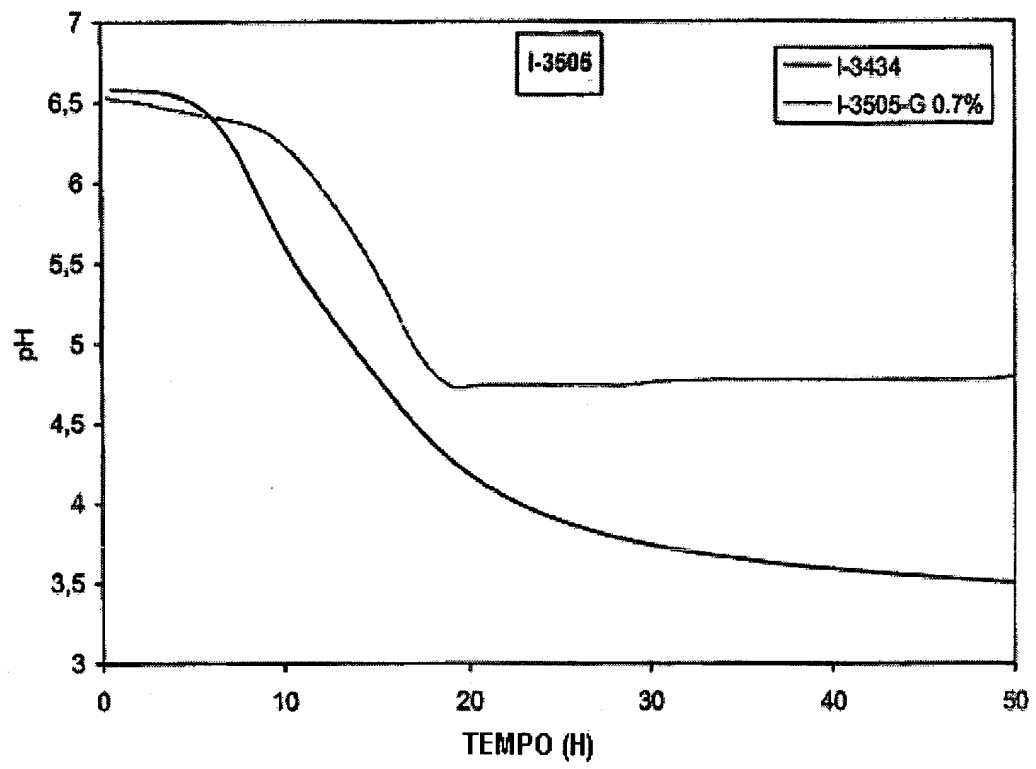


FIGURA 2

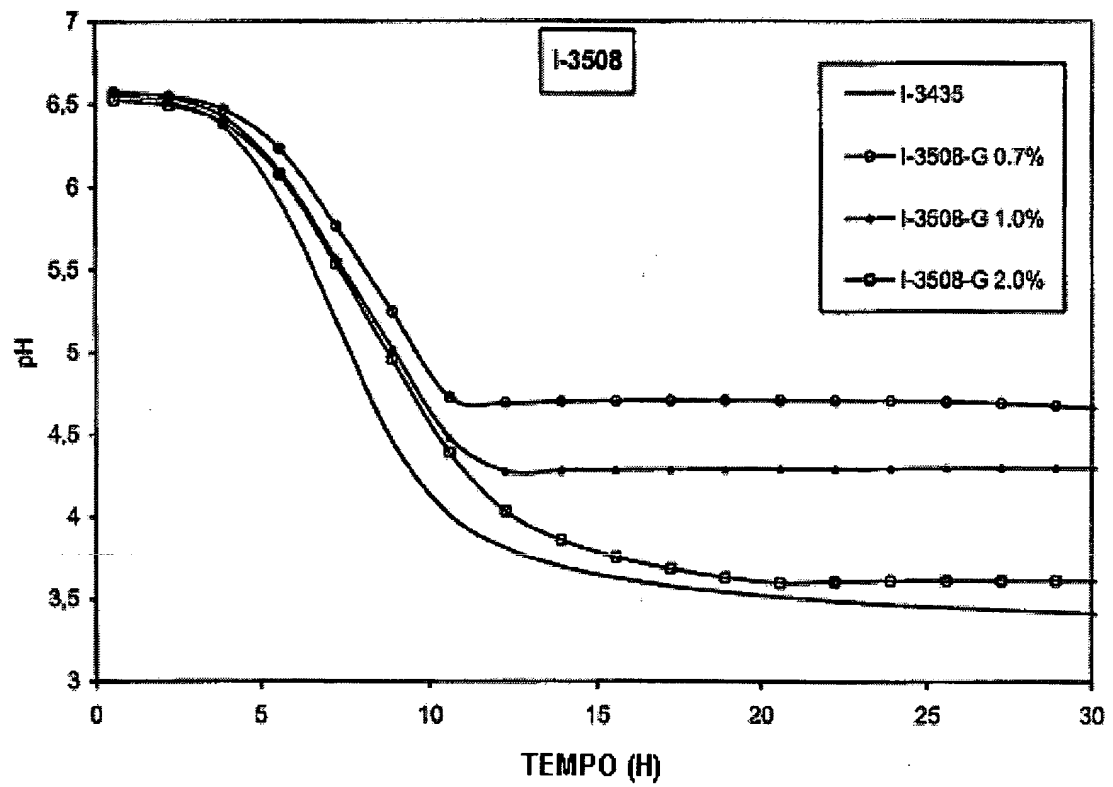


FIGURA 3

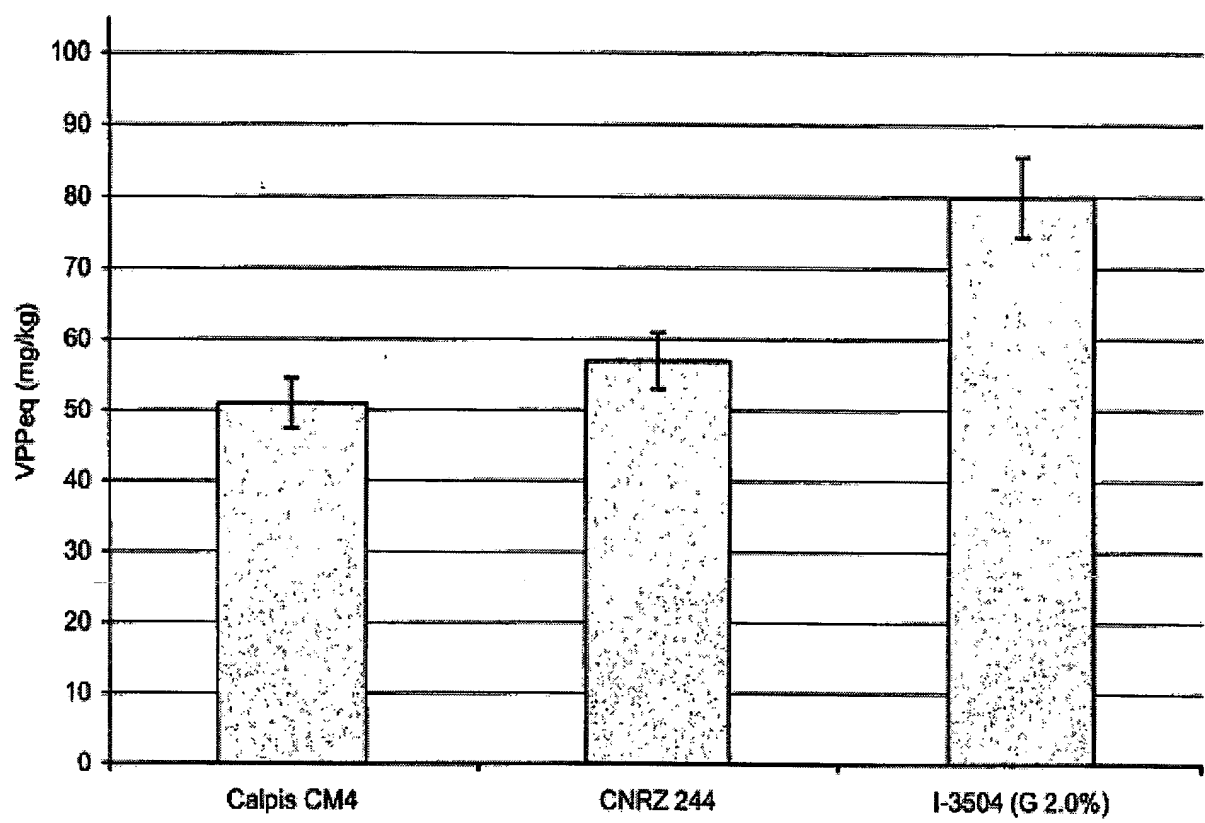


FIGURA 4

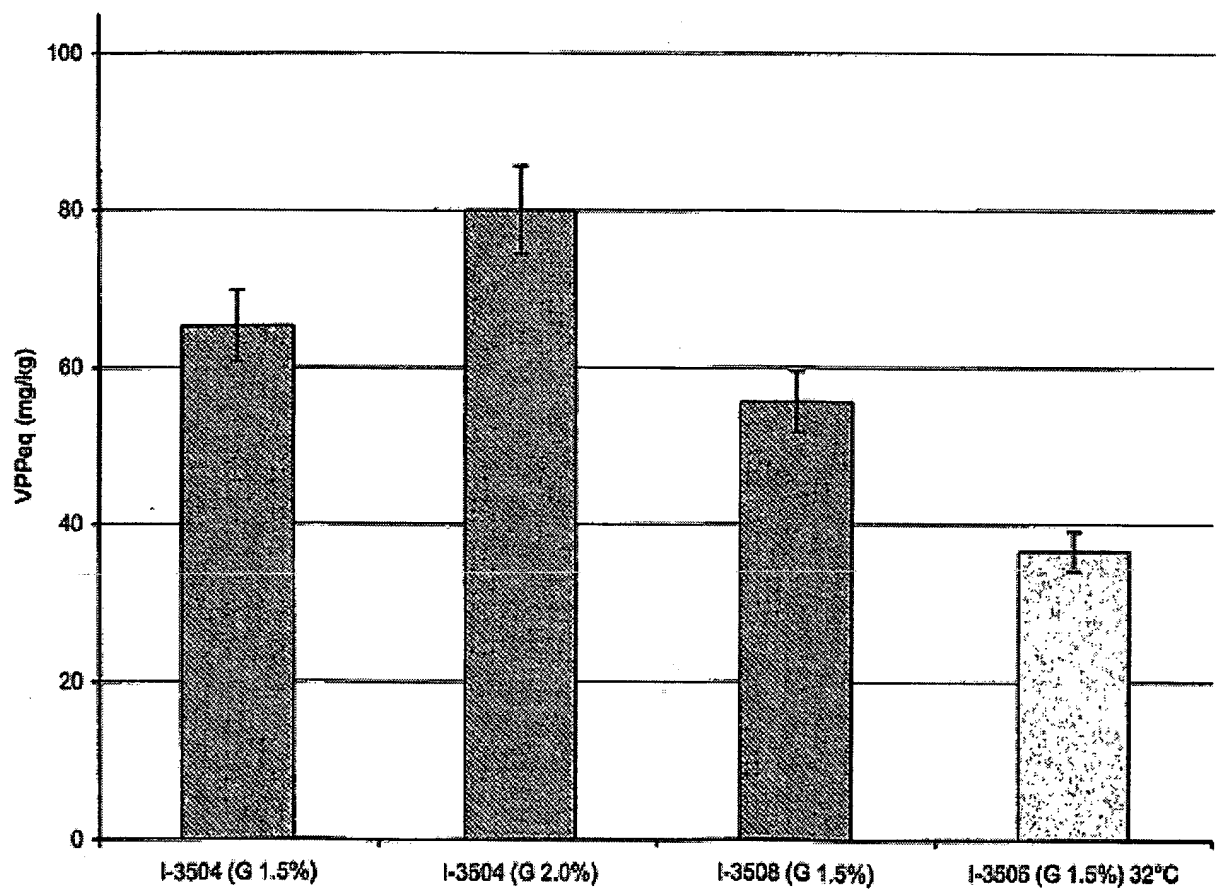


FIGURA 5

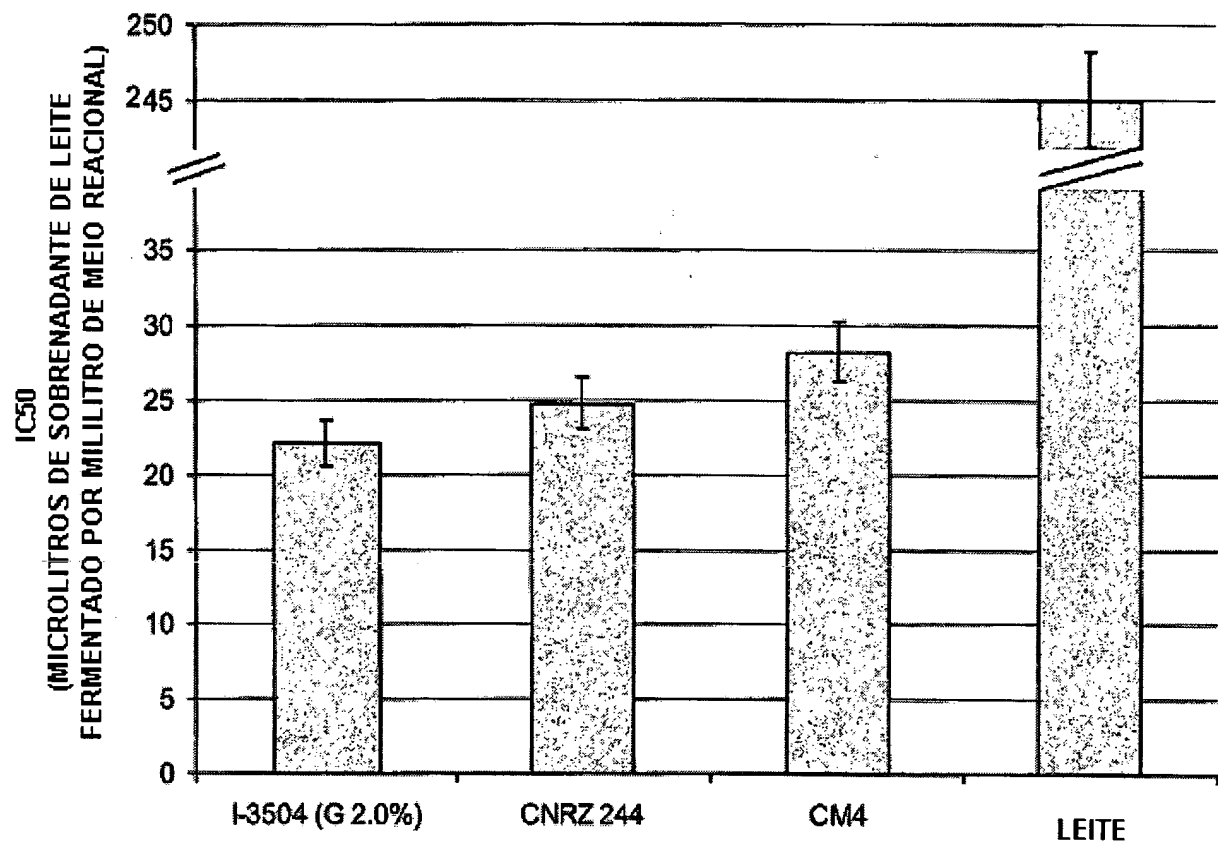


FIGURA 6

PL0707985-0

RESUMO

"NOVAS CEPAS DE *LACTOBACILLUS HELVETICUS*"

5 A presente invenção refere-se a novas cepas de *Lactobacillus helveticus*. Mais particularmente, a presente invenção propõe cepas de *Lactobacillus helveticus* possuindo um fenótipo lactose negativa, e suas aplicações na indústria agro-alimentar. A presente invenção refere-se igualmente a um processo de obtenção de tais cepas de *Lactobacillus helveticus*.