



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 313 067**

51 Int. Cl.:

A61K 38/01 (2006.01)

A61P 9/12 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

C07K 5/06 (2006.01)

C07K 5/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04771088 .4**

96 Fecha de presentación : **30.07.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1669463**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.06.2006**

54 Título: **Hidrolizado de caseína, y su procedimiento de preparación y uso.**

30 Prioridad: **01.08.2003 JP 2003-285007**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

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

72 Inventor/es: **Yamamoto, Naoyuki;**
Mizuno, Seiichi;
Nishimura, Shingo;
Gotou, Takanobu;
Matsuura, Keiichi y
Shinoda, Tadashi

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Hidrolizado de caseína, y su procedimiento de preparación y uso.

5 La presente invención se refiere a hidrolizado de caseína que se obtiene por hidrólisis de caseína de leche animal, y se espera que exhiba diversas funciones que incluyen actividad inhibidora de la enzima convertidora de las angiotensinas y efecto hipotensor, y es útil para diversos alimentos y medicamentos, así como a un método para preparar hidrolizado de caseína, y uso del mismo.

10 Se han consignado una diversidad de péptidos que tienen diversas funciones, tales como efecto hipotensor, actividad antibacteriana, efecto de solubilización del calcio, y efecto inmunomodulador, y estos péptidos se utilizan en alimentos y medicamentos.

15 Por ejemplo, se han propuesto péptidos hipotensores, muchos de los cuales tienen actividad inhibidora de la enzima convertidora de las angiotensinas (abreviada en lo sucesivo como ACE). La ACE convierte un precursor, la angiotensina I, en angiotensina II que tiene actividad vasoconstrictora en el organismo vivo, aumentando con ello la presión sanguínea. Así, se espera que los péptidos que tienen actividad inhibidora de la ACE exhiban efecto hipotensor por inhibir la ACE para suprimir la producción de angiotensina II en el organismo vivo. En el desarrollo de péptidos hipotensores, las investigaciones se dirigen usualmente en primer lugar hacia péptidos que tengan actividad inhibidora de la ACE, con lo que el efecto hipotensor de los péptidos propuestos se indica principalmente por el efecto inhibidor de la ACE como índice de referencia. Un gran número de agentes que tienen efecto hipotensor evaluados por la actividad inhibidora de la ACE como índice de referencia, han sido propuestos hasta la fecha, y se utilizan para prevención y tratamiento de la hipertensión.

25 En la producción de péptidos funcionales, tales como péptidos que tengan efecto hipotensor evaluado por el efecto inhibidor de la ACE, en particular, en la producción de péptidos funcionales por digestión de las proteínas alimentarias con enzimas, se requieren usualmente pasos complicados después de la digestión enzimática, tales como concentración, purificación, y aislamiento de los productos digeridos, a fin de mejorar la expresión de los efectos funcionales.

30 Como péptidos que son absorbidos a través del canal alimentario en la sangre para expresar sus funciones en el organismo vivo, se espera que sean ventajosos péptidos indigeribles *in vivo* que tienen susceptibilidad de absorción y resistencia a la digestión altas contra diversas enzimas digestivas en el organismo vivo. Sin embargo, no se conocen en detalle cuáles son los péptidos que contribuyen al aumento de la resistencia a la digestión *in vivo*. Así pues, se desean el desarrollo de productos de digestión enzimática para alimentos y medicamentos, así como métodos para obtener tales productos, productos que tienen resistencia elevada a la digestión *in vivo*, y pueden expresar eficazmente sus funciones deseadas sin someterse a procesos complicados tales como concentración, purificación, o aislamiento después de la digestión enzimática.

40 Por ejemplo, la Publicación de Patente 1 describe un método para producir una mezcla de péptidos de peso molecular bajo compuesta principalmente de dipéptidos y tripéptidos, que tiene una longitud media de cadena no mayor que 3, y que tienen susceptibilidad de absorción intestinal excelente. La mezcla de péptidos se prepara a partir de proteína de soja por acción simultánea o secuencial de dos o más enzimas que tienen actividad de endoproteasas pero que no tienen sustancialmente actividad alguna de exoproteasa, sin que se genere más de 5% de aminoácidos libres. La Publicación de Patente 2 describe un alimento funcional que utiliza productos de digestión de proteína de soja y un método para producir el mismo. Los productos de digestión contienen como ingredientes activos un dipéptido y tripéptidos constituidos por Ala-Tyr, Gly-Tyr-Tyr, Ala-Asp-Phe, y Ser-Asp-Phe, preparados por digestión de proteína de soja desnaturizada por calentamiento con enzimas tales como proteasas derivadas de *Aspergillus oryzae*. Los productos de digestión tienen preferiblemente una longitud media de cadena peptídica de 2 a 4, y contienen 20 a 30% en peso de aminoácidos libres.

55 Sin embargo, estos productos de digestión enzimáticos de proteína de soja tienen componentes que son muy diferentes de los de los productos de digestión enzimática de la caseína de leche animal. Por ello, las publicaciones de patente anteriores no sugieren nada en cuanto a métodos de preparación, a partir de caseína de leche animal como materia prima, productos de digestión de caseína e hidrolizado de caseína que tengan una concentración elevada de ingredientes activos y susceptibilidad de absorción excelente en el organismo vivo, y pueden utilizarse sin ser sometidos necesariamente a procesos complicados tales como concentración, purificación y aislamiento.

60 Por otra parte, las Publicaciones de Patente 3 y 4 proponen métodos para preparar péptidos que tienen diversas funciones por digestión de la caseína de leche animal con enzimas tales como proteasas y peptidasas, así como péptidos funcionales particulares obtenidos por los métodos.

65 Los productos de digestión enzimática descritos en estas publicaciones están destinados, sin embargo, a la obtención de péptidos particulares como ingredientes activos. Así pues, no se contiene en estas publicaciones doctrina alguna en cuanto a la hidrólisis de caseína de leche animal que tiene una longitud de cadena media no mayor que 2,1, proceso específico de la hidrólisis, y eficacia del hidrolizado de caseína que tiene la longitud media de cadena particular.

Publicación de Patente 1: JP-5-252979-A

Publicación de Patente 2: JP-2003-210138-A

5 Publicación de Patente 3: JP-6-128287-A

Publicación de Patente 4: JP-2001-136995-A

10 Es un objeto de la presente invención proporcionar un hidrolizado de caseína que contiene péptidos indigeribles *in vivo* y aminoácidos libres que tienen digestibilidad enzimática *in vivo* minimizada, y se espera que expresen funciones, tales como efecto hipotensor, en el organismo vivo.

15 Es otro objeto de la presente invención proporcionar un método para preparar el hidrolizado de caseína arriba mencionado, que permite una producción fácil y eficiente del hidrolizado de caseína arriba indicado, sin implicar necesariamente procesos complicados.

20 Es todavía otro objeto de la presente invención proporcionar un agente que tiene actividad inhibidora de la ACE o efecto hipotensor, que contiene péptidos indigeribles *in vivo* y aminoácidos libres, se espera que tenga efecto hipotensor excelente en el organismo vivo, y es útil para diversos alimentos o medicamentos funcionales.

25 Los autores de la presente invención han realizado investigaciones intensivas para alcanzar los objetos anteriores, para descubrir que, por hidrólisis de caseína de leche animal que tiene una longitud media de cadena no mayor que 2,1 en términos del número de residuos de aminoácidos, puede obtenerse un hidrolizado de caseína que contiene aminoácidos libres y péptidos de peso molecular bajo, tales como tripéptidos y dipéptidos, formándose eficazmente aminoácidos libres y moléculas de péptidos indigeribles *in vivo* que tienen un residuo Pro en el terminal carboxilo.

30 Los autores de la presente invención han descubierto también que los péptidos indigeribles *in vivo* que tienen un residuo Pro en el terminal carboxilo se espera que tengan alta resistencia a la digestión contra las peptidasas *in vivo*, de tal modo que es bastante posible que tales péptidos indigeribles exhiban plenamente sus funciones en el organismo vivo, y que el hidrolizado de caseína tiene un contenido elevado de péptidos que tienen una susceptibilidad de absorción satisfactoria *in vivo*, tales como dipéptidos y tripéptidos, de tal manera que el hidrolizado de caseína es capaz de exhibir plenamente diversas funciones, tales como un efecto hipotensor, en el organismo vivo, para completar de este modo la presente invención.

35 Adicionalmente, los autores de la presente invención han realizado investigaciones en busca de enzimas que produzcan eficientemente el hidrolizado de caseína de la presente invención a partir de diversas enzimas conocidas descubriendo que una clase particular de enzimas es particularmente capaz de producir eficientemente el hidrolizado de caseína de la presente invención.

40 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un hidrolizado de caseína que comprende aminoácidos libres y péptidos obtenidos por hidrólisis de caseína de leche animal con un grupo de enzimas que tiene una longitud media de cadena no mayor que 2,1 en términos del número de residuos de aminoácidos, en donde dicho grupo de enzimas comprende peptidasas capaces de escindir un enlace peptídico Pro-Xaa y leucina-aminopeptidasas, y comprende adicionalmente al menos una de proteasa I neutra y proteasa II neutra, todas las cuales son enzimas extracelulares derivadas de *Aspergillus oryzae*, en donde los péptidos comprenden péptidos indigeribles *in vivo* constituidos por dipéptidos que tienen una secuencia Xaa-Pro y tripéptidos que tienen una secuencia Xaa-Pro-Pro, y en donde un contenido de los dipéptidos que tienen una secuencia Xaa-Pro no es inferior a 5% en peso de la cantidad total de los péptidos y los aminoácidos libres en hidrolizado, y un contenido de los tripéptidos que tienen una secuencia Xaa-Pro-Pro no es inferior a 1% en peso de la cantidad total de los péptidos y los aminoácidos libres en el hidrolizado.

50 Tal como se utiliza en esta memoria, Xaa puede ser cualquier aminoácido.

55 De acuerdo con la presente invención, se proporciona también un método para preparar un hidrolizado de caseína que comprende aminoácidos libres y péptidos obtenidos por hidrólisis de caseína de leche animal que tiene una longitud media de cadena no mayor que 2,1 en términos del número de residuos de aminoácidos, en donde dicho método comprende el paso de (A) hidrolizar caseína de leche animal que tiene una longitud media de cadena no mayor que 2,1 con un grupo de enzimas capaces de digerir caseína de leche animal en un hidrolizado de caseína que tiene una longitud media de cadena no mayor que 2,1 en términos del número de residuos de aminoácidos, en donde dicho grupo de enzimas comprende peptidasas capaces de escindir un enlace peptídico Pro-Xaa y leucina-amino-peptidasas, y comprende adicionalmente al menos una de proteasa neutra I y proteasa neutra II, todas las cuales son enzimas extracelulares derivadas de *Aspergillus oryzae*.

60 De acuerdo con la presente invención, se proporciona también un agente que tiene actividad inhibidora de la ACE o efecto hipotensor que comprende el hidrolizado de caseína anterior como ingrediente activo.

65 De acuerdo con la presente invención, se proporciona adicionalmente el uso del hidrolizado de caseína anterior en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de la hipertensión.

El hidrolizado de caseína de la presente invención contiene aminoácidos libres y péptidos de peso molecular bajo tales como péptidos indigeribles *in vivo*, obtenidos por hidrólisis de caseína de leche animal que tiene una longitud media de cadena no mayor que 2,1 en términos del número de residuos de aminoácidos.

Así pues, se espera que el presente hidrolizado de caseína exhiba, por administración oral, una susceptibilidad de absorción excelente *in vivo* y diversas funciones en el organismo vivo, y sea útil para diversos alimentos, medicamentos, y aditivos alimentarios. Por ejemplo, se espera que el presente hidrolizado de caseína sea utilizado en un agente que tiene actividad inhibidora de la ACE o efecto hipotensor que contiene el presente hidrolizado como ingrediente activo.

El presente método incluye el paso (A) de hidrolizar caseína de leche animal para obtener una longitud media de cadena no mayor que 2,1 con un grupo de enzimas capaces de digerir la caseína de leche animal en un hidrolizado de caseína que tiene una longitud media de cadena no mayor que 2,1 en términos del número de residuos de aminoácidos. Así pues, el método permite una producción fácil y eficiente del hidrolizado de caseína de la presente invención. De acuerdo con ello, el presente método es ventajoso en la producción industrial del hidrolizado de caseína de la presente invención.

La Fig. 1 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de la susceptibilidad de absorción *in vivo* y resistencia a la digestión de Xaa-Pro y Xaa-Pro-Pro realizadas en el Ejemplo 1.

La Fig. 2 es un gráfico que muestra los resultados de experimentos para determinación del efecto hipotensor dependiente de la dosis de los polvos de hidrolizado de caseína preparados en el Ejemplo 1.

La Fig. 3 es un gráfico que muestra la relación entre el patrón de elución de proteína combinada con un gradiente lineal de NaCl 0 a 0,6 M y la actividad proteolítica en el Ejemplo de Análisis 1.

La Fig. 4 es un gráfico que muestra la relación entre el tiempo de digestión de la caseína con el grupo de enzimas y la actividad inhibidora de la ACE del hidrolizado de caseína resultante del Ejemplo 3.

La Fig. 5 es un gráfico que muestra la relación entre la longitud media de cadena y la actividad inhibidora de la ACE del hidrolizado de caseína obtenido por hidrólisis de caseína con el grupo de enzimas en el Ejemplo 3.

La presente invención se explicará a continuación en detalle.

El hidrolizado de caseína de la presente invención contiene aminoácidos libres y péptidos obtenidos por hidrólisis de caseína de leche animal que tienen un intervalo particular de longitud media de cadena en términos del número de residuos de aminoácidos. La cantidad de los aminoácidos libres y los péptidos es preferiblemente no inferior a 80% en peso, más preferiblemente 80 a 90% en peso de la cantidad total del hidrolizado de caseína. El hidrolizado tiene un contenido particular de péptidos indigeribles *in vivo* como los péptidos, compuestos de dipéptidos que tienen la secuencia Xaa-Pro y tripéptidos que tienen la secuencia Xaa-Pro-Pro. Los péptidos pueden ser sales peptídicas.

Tal como se utiliza en esta memoria, la longitud media de cadena puede expresarse como una relación del número total de moles de los péptidos y los aminoácidos libres generados por hidrólisis de caseína de leche animal con respecto al número de moles de todos los aminoácidos contenidos en el hidrolizado ácido de caseína del mismo peso. En este caso, el hidrolizado ácido de caseína se obtiene por digestión de la proteína caseína en aminoácidos simples.

La longitud media de cadena puede determinarse, por ejemplo, por evaluación de las concentraciones molares de los grupos amino en los hidrolizados por el método OPA utilizando un reactivo OPA (aldehído o-ftálico), que se colorea por reacción con grupos amino, y se expresa como:

$$\text{Longitud media de cadena} = (\text{número de moles de grupos amino en el hidrolizado ácido de caseína}) / (\text{número de moles de grupos amino en el hidrolizado enzimático de caseína}).$$

Como se utiliza en esta memoria, los péptidos indigeribles *in vivo* significan dipéptidos Xaa-Pro y tripéptidos Xaa-Pro-Pro que tienen Pro en el terminal carboxilo, que tienen resistencia elevada a la digestión contra las peptidasas *in vivo* cuando se absorben intestinalmente en el organismo vivo.

De acuerdo con la presente invención, la longitud media de cadena del hidrolizado obtenido por hidrólisis de la caseína de leche animal no es mayor que 2,1, siendo preferiblemente 1,1 a 2,1, más preferiblemente 1,3 a 2,1, en términos del número de residuos de aminoácidos. Con la longitud media de cadena mayor que 2,1, los contenidos de los dipéptidos y tripéptidos deseados así como los aminoácidos libres son bajos, y por tanto el contenido de los péptidos absorbibles *in vivo* e indigeribles *in vivo* deseados es bajo.

El contenido de los dipéptidos que tienen la secuencia Xaa-Pro en el hidrolizado de caseína de la presente invención es no inferior a 5% en peso, preferiblemente 5 a 25% en peso de la cantidad total de los péptidos y los aminoácidos libres en el hidrolizado. Para proporción menor que 5% en peso, la susceptibilidad de absorción deseada *in vivo* disminuye y la expresión de las funciones es insuficiente.

El contenido de los tripéptidos que tienen la secuencia Xaa-Pro-Pro en el hidrolizado de caseína de la presente invención no es inferior a 1% en peso, preferiblemente 1 a 5% en peso de la cantidad total de los péptidos y los aminoácidos libres en el hidrolizado. Para contenido inferior a 1% en peso, la susceptibilidad de absorción deseada *in vivo* se reduce y la expresión de las funciones es insuficiente.

En el hidrolizado de caseína de la presente invención, Xaa en los dipéptidos que tienen la secuencia Xaa-Pro y los tripéptidos que tienen la secuencia Xaa-Pro-Pro puede ser cualquier aminoácido.

El hidrolizado de caseína de la presente invención puede contener preferiblemente Ile+Pro, Glu-Pro, Arg-Pro, Gln-Pro, Met-Pro y Tyr-Pro como los dipéptidos que tienen la secuencia Xaa-Pro, y Ser-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro, y Val-Pro-Pro como los tripéptidos que tienen la secuencia Xaa-Pro-Pro.

El hidrolizado de caseína de la presente invención, que contiene tales dipéptidos y tripéptidos, exhibe eficazmente en particular actividad inhibidora de la ACE y efecto hipotensor.

El hidrolizado de caseína de la presente invención contiene aminoácidos libres además de los péptidos. El contenido de los aminoácidos libres es usualmente 35 a 50% en peso, preferiblemente 40 a 55% en peso de la cantidad total de los péptidos y los aminoácidos libres en el hidrolizado.

El hidrolizado de caseína de la presente invención puede contener opcionalmente, además de los péptidos y los aminoácidos libres, por ejemplo, lípido, cenizas, carbohidrato, fibras dietéticas y agua, que están contenidos usualmente en la caseína de leche animal disponible comercialmente, en una cantidad de aproximadamente 10 a 20% en peso. Algunos o la totalidad de estos ingredientes pueden eliminarse en caso deseado.

El hidrolizado de caseína de la presente invención, así como un hidrolizado de caseína que comprende aminoácidos libres y péptidos obtenidos por hidrólisis de caseína de leche animal que tienen una longitud media de cadena no mayor que 2,1 en términos del número de residuos de aminoácidos, puede prepararse por el método de la presente invención que incluye el paso de (A) hidrolizar caseína de leche animal para tener una longitud media de cadena no mayor que 2,1 con un grupo de enzimas capaces de digerir caseína de leche animal en un hidrolizado que tiene una longitud media de cadena no mayor que 2,1 en términos del número de residuos de aminoácidos, en donde dicho grupo de enzimas comprende peptidasas capaces de escindir un enlace peptídico Pro-Xaa y leucina-amino-peptidasas, y comprende adicionalmente al menos una de proteasa neutra I y proteasa neutra II, todas las cuales son enzimas extracelulares derivadas de *Aspergillus oryzae*.

La caseína de leche animal es una proteína que tiene un alto contenido de Pro y seguridad confirmada para uso en alimentos y análogos, y puede ser, por ejemplo, caseína procedente de leche de vaca, leche de caballo, leche de cabra, y leche de oveja, siendo particularmente preferida la caseína de leche de vaca.

La concentración de caseína en la hidrólisis de la caseína de leche animal puede ser preferiblemente 3 a 19% en peso para la producción eficiente del hidrolizado de la presente invención.

El grupo de enzimas utilizado en el método de la presente invención es un grupo de enzimas en el cual las enzimas capaces de digerir caseína de leche animal en un hidrolizado que tiene una longitud media de cadena no mayor que 2,1 en términos del número de residuos de aminoácidos se seleccionan y combinan convenientemente. Por ejemplo, puede utilizarse preferiblemente un grupo de enzimas que contienen peptidasas capaces de escindir el enlace peptídico Pro-Xaa en el terminal carboxilo de Xaa-Pro-Xaa o Xaa-Pro-Pro-Xaa.

El grupo de enzimas puede contener preferiblemente serina-proteasas que tienen serina en el centro activo.

El grupo de enzimas contienen metaloproteinasas que tienen un metal en el centro activo.

Las metaloproteinasas son al menos una de proteasa neutra I y proteasa neutra II; y leucina-amino-peptidasa. Con estas metaloproteinasas, el hidrolizado objetivo puede obtenerse eficientemente en un tiempo breve, y e incluso en una reacción de un solo paso, siendo preferido esto. Las peptidasas capaces de escindir el enlace peptídico Pro-Xaa pueden ser preferiblemente enzimas que tienen puntos isoeléctricos en la región ácida.

El grupo de enzimas son un grupo de enzimas extracelulares derivadas del moho koji tales como *Aspergillus oryzae*. Dicho grupo de enzimas extracelulares pueden ser las obtenidas por cultivo del cuerpo celular en un medio apropiado, y extracción con agua de las enzimas producidas extracelularmente. Un grupo de enzimas extracelulares derivadas de *Aspergillus oryzae* que tienen puntos isoeléctricos en la región ácida son particularmente preferidas.

El grupo de enzimas extracelulares derivadas de *Aspergillus oryzae* puede ser un producto comercial, tal como SUMIZYME FP, LP o MP (todas ellas marcas comerciales registradas, fabricadas por SHIN NIHON CHEMICAL CO., LTD.), UMAMIZYME (marca comercial registrada, fabricada por AMANO ENZYME, INC.), Sternzyme B11024 y PROHIDROXY AMPL (ambos nombres comerciales, fabricados por HIGUCHI INC.), ORIENTASE ONS (marca comercial registrada, fabricada por HANKYU BIOINDUSTRY CO.), y DENAZYME AP (marca comercial registrada, fabricada por NAGASE SEIKAGAKU), siendo particularmente preferida SUMIZYME FP (marca comercial registrada, fabricada SHIN NIHON CHEMICAL Co., LTD.).

ES 2 313 067 T3

Tales enzimas disponibles comercialmente tienen por regla general condiciones óptimas específicas. Las condiciones, tales como la cantidad de enzimas utilizadas y el tiempo de reacción, pueden ajustarse convenientemente dependiendo del grupo de enzimas utilizadas de tal manera que pueda obtenerse el hidrolizado de caseína de la presente invención.

Para la hidrólisis, el grupo de enzimas pueden añadirse, por ejemplo, a una solución acuosa de caseína de leche animal en un grupo de relación de enzimas/caseína de leche animal no inferior a 1/1000, preferiblemente 1/10 a 1/1000, más preferiblemente 1/10 a 1/100, muy preferiblemente 1/20 a 1/40, en peso.

Las condiciones de reacción pueden seleccionarse convenientemente dependiendo del grupo de enzimas utilizadas a fin de que se obtenga el hidrolizado de caseína objetivo. La reacción puede efectuarse usualmente a 25 hasta 60°C, preferiblemente 45 a 55°C, a un pH de 3 a 10, preferiblemente 5 a 9, más preferiblemente 5 a 8. El tiempo de reacción de la enzima es usualmente 2 a 48 horas, preferiblemente 7 a 15 horas.

La reacción enzimática puede terminarse por desactivación de las enzimas. Usualmente, las enzimas se desactivan a 60 hasta 110°C para terminar la reacción.

Una vez terminada la reacción enzimática, el precipitado resultante puede separarse preferiblemente por centrifugación o a través de diversos filtros, en caso deseado.

Adicionalmente, el hidrolizado obtenido puede someterse a eliminación de péptidos que tengan sabor amargo u olor, lo que puede efectuarse utilizando carbono activado, una resina hidrófoba o análogos. Por ejemplo, 1 a 20% en peso de carbono activado con respecto a la cantidad de caseína utilizada puede añadirse al hidrolizado, y hacerse reaccionar durante 1 a 10 horas para eliminar tales componentes amargos y olorosos. El carbono activado utilizado puede eliminarse por un método convencional, tal como centrifugación o filtración con membrana.

El líquido de reacción que contiene el hidrolizado de caseína obtenido por el paso (A) puede añadirse como tal a productos líquidos tales como bebidas. Para la mejora de la versatilidad del hidrolizado de caseína de la presente invención, el líquido de reacción puede concentrarse y secarse preferiblemente para obtener polvos.

Tales polvos pueden utilizarse como diversos alimentos funcionales, aditivos para los mismos, medicamentos, y un ingrediente activo para los mismos. Los polvos pueden mezclarse opcionalmente con diversos aditivos adyuvantes para mejora del equilibrio nutritivo o sabor. Ejemplos de tales aditivos auxiliares pueden incluir diversos carbohidratos, lípidos, vitaminas, minerales, edulcorantes, agentes saborizantes, pigmentos, y mejoradores de la textura.

Los polvos que contienen el hidrolizado de caseína de la presente invención pueden utilizarse por adición a, por ejemplo, bebidas, yogur, alimento líquido, jalea, caramelos, alimentos tratados en autoclave, caramelos en tabletas, galletas, tortas esponjosas, pan, bizcochos, chocolate y análogos, o por formulación en cápsulas, tabletas y análogos.

Dado que el hidrolizado de caseína de la presente invención puede utilizarse de la manera arriba mencionada, el presente hidrolizado puede utilizarse eficazmente en la fabricación de alimentos funcionales tales como diversas bebidas isotónicas, bebidas en general, alimentos en general, suplementos dietéticos, alimento funcional nutritivo, incorporando en ellos beneficios para la salud, o en la fabricación de medicamentos.

Se ha confirmado que el hidrolizado de caseína de la presente invención tiene actividad inhibidora de la ACE y efecto hipotensor en los ejemplos que se expondrán más adelante, por lo que el presente hidrolizado puede utilizarse, por ejemplo, como agente para la fabricación de alimentos funcionales que tienen dicha actividad y efecto, o como agente para la fabricación de medicamentos.

Cuando el hidrolizado de caseína de la presente invención se utiliza como agente que tiene actividad inhibidora de la ACE y efecto hipotensor, una dosis preferida del agente para administración oral a humanos es usualmente aquella que permite la ingestión de 0,1 a 100 mg/kg, preferiblemente 1 a 20 mg/kg de los péptidos y los aminoácidos libres en el hidrolizado de caseína por cada administración. Así, la cantidad del hidrolizado de caseína de la presente invención o del agente que tiene actividad inhibidora de la ACE y efecto hipotensor, cuando se utiliza por adición a diversas bebidas, alimentos o medicamentos, puede seleccionarse convenientemente teniendo en cuenta la dosis arriba indicada.

De acuerdo con el método de la presente invención, por hidrólisis de la caseína de leche animal en una reacción de un solo paso con el grupo de enzimas arriba mencionado, puede obtenerse Xaa-Pro-Pro contenido en la caseína de leche animal, en particular Ile-Pro-Pro y/o Val-Pro-Pro, de los cuales se han confirmado diversas funciones que incluyen efecto hipotensor y efecto anti-estrés, con un rendimiento mayor y más próximo a la recuperación teórica, por ejemplo no inferior a 60%, preferiblemente no inferior a 70%, comparado con los métodos convencionales. Así pues, este método no sólo es un método para preparación de un hidrolizado de caseína, preferiblemente el hidrolizado de caseína de la presente invención, sino que es también un método eficaz para producir productos digeridos que contienen una cantidad considerable del Xaa-Pro-Pro objetivo, o productos purificados del mismo, a partir de caseína de leche animal o proteína alimentaria que tiene un contenido elevado de Xaa-Pro-Pro.

ES 2 313 067 T3

La presente invención se explicará a continuación con mayor detalle con referencia a Ejemplos, Ejemplo de Análisis y Ejemplos Comparativos.

5 Ejemplo 1 y Ejemplos Comparativos 1 a 8

Se añadió 1 g de caseína derivada de leche de vaca (fabricada por NIPPON NZMP) a 99 g de agua destilada a aproximadamente 80°C y se mezcló concienzudamente. Se añadió a la mezcla hidróxido de sodio 1 N (fabricado por WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) para ajustar el pH a 7,0. La temperatura se ajustó a 20°C, a fin de preparar una solución sustrato.

A la solución sustrato así obtenida, se añadió cada una de las diversas enzimas que se muestran en la Tabla 1, de tal modo que la relación enzima/caseína era 1/25 en peso. La mezcla se hizo reaccionar a 50°C durante 14 horas, y se sometió después a tratamiento en autoclave a 110°C durante 10 minutos para desactivar las enzimas, a fin de obtener de este modo una solución de productos de digestión enzimáticos de caseína. La solución obtenida de los productos de digestión enzimáticos se secó por pulverización para preparar polvos.

Los polvos así obtenidos se sometieron a análisis de ingredientes. La proteína se determinó por el método de Kjeldahl, y los aminoácidos con un analizador de aminoácidos. La cantidad obtenida por sustracción de la cantidad de aminoácidos de la cantidad de proteína se tomó como la cantidad de péptidos. Adicionalmente, la cantidad de lípidos se determinó por el método de hidrólisis ácida, las cenizas por ignición directa, y el agua por el método del horno de aire. La cantidad de cada ingrediente se sustrajo de 100, tomándose el resto como la cantidad de carbohidrato. Como resultado, se determinó que los polvos contenían 35,8% en peso de aminoácidos, 45,7% en peso de péptidos, 6,6% en peso de agua, 0,2% en peso de lípidos, 4,1% en peso de cenizas, y 7,6% en peso de carbohidrato.

Medida de la longitud media de cadena

La longitud media de cadena de los aminoácidos y los péptidos contenidos en los polvos obtenidos se determinó por medida del número de moles utilizando un reactivo OPA, que reacciona con los grupos amino de los aminoácidos libres y los péptidos en el polvo, midiendo análogamente el número de moles de un hidrolizado ácido de caseína, y evaluando la relación de estos dos. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Se disolvieron 40 mg de aldehído o-ftálico (reactivo garantizado para análisis de fluorescencia, fabricado por NACALAI TESQUE, INC.) en 1 ml de metanol, y se añadieron 100 µl de β-mercaptoetanol. La solución de aldehído o-ftálico se diluyó a 25 ml con 25 ml de una solución de tetraborato de sodio 100 mM mezclada previamente con 2,5 ml de dodecilsulfato de sodio al 20%, y adicionalmente a 50 ml con agua destilada, para preparar un reactivo OPA.

Cada muestra de polvo de hidrolizado enzimático de caseína al 1% obtenida por reacción con cada enzima (Tabla 1) se disolvió en un disolvente apropiado a una concentración apropiada, y se centrifugó a 15.000 rpm durante 10 minutos. Se retiraron 50 µl del sobrenadante. A continuación se añadió 1 ml del reactivo OPA arriba preparado, se agitó concienzudamente, y se dejó a la temperatura ambiente durante 5 minutos. Se midió la absorbancia a 340 nm utilizando un absorciómetro (nombre comercial Ubest-35, fabricado por JASKO CORPORATION).

Se preparó un hidrolizado ácido de caseína al 1%, se diluyó adecuadamente, y se sometió a la misma medida para obtener una curva de calibración, a partir de la cual se determinó la relación entre absorbancia y concentración molar. La longitud media de la cadena se calculó de acuerdo con la fórmula siguiente:

Longitud media de cadena = (concentración molar de hidrolizado ácido de caseína al 1%)/(concentración molar de cada muestra de hidrolizado enzimático de caseína al 1%)

TABLA 1

	Origen de la enzima	Enzima comercial	Longitud media de cadena
Ejemplo 1	<i>Aspergillus oryzae</i>	SUMIZYME FP ¹⁾	1,4
Ej. Comp. 1	Bazo de cerdo	Tripsina ²⁾	6,0
Ej. Comp. 2	<i>Bacillus subtilis</i>	SUMIZYME CP ³⁾	4,1
Ej. Comp. 3	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	PROTEASA S ⁴⁾	4,5
Ej. Comp. 4	Carica papaya	Papaína purificada ⁵⁾	7,9
Ej. Comp. 5	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	Thermoasa ⁶⁾	4,6
Ej. Comp. 6	<i>Rizopus niveus</i>	NEURASA F3G ⁷⁾	4,9
Ej. Comp. 7	<i>Rizopus delemar</i>	SUMIZYME RP ⁸⁾	4,0
Ej. Comp. 8	<i>Pineapple cannery</i>	BROMELAÍNA ⁹⁾	5,5

1), 3), 8), 9): fabricada por SHIN NIHON CHEMICAL CO., LTD.; 2): fabricada por HIGUCHI, INC.; 4) fabricada por AMANO ENZYME, INC.; 5): fabricada por NAGASE & CO., LTD.; 6): fabricada por DAIWA KASEI K.K.; 7): fabricada por NOVOZYME JAPAN.

Medida de aminoácidos que constituyen péptidos

Los polvos preparados en el Ejemplo 1 se disolvieron en una cantidad adecuada de agua destilada, y se analizaron utilizando un analizador de péptidos automático (nombre comercial PPSQ-10, fabricado por SHIMADZU CORPORATION) para determinar los residuos de aminoácidos desde el terminal N en los polvos. Los resultados se muestran en la Tabla 2. Incidentalmente, el analizador de péptidos automático no detecta aminoácidos libres.

La cantidad total de los residuos del quinto aminoácido era 120 pmol, y la cantidad total de los residuos del sexto aminoácido era 100 pmol. A partir de estos resultados se encontró que la mayoría de los péptidos contenidos en los polvos eran dipéptidos y tripéptidos. Se encontró también que el porcentaje de péptidos que tenían Pro en el segundo residuo era 49,5%, lo cual era notablemente alto, y el porcentaje de péptidos que tenían Pro en el tercer residuo era 29,8%, lo que era también alto.

Así pues, se espera que los polvos contengan una cantidad considerable de Xaa-Pro y Xaa-Pro-Pro, que son altamente resistentes contra la digestión enzimática con las proteasas *in vivo*, por lo que estos péptidos son óptimos para uso como péptidos funcionales.

TABLA 2

Aminoácido	Primer residuo (pmol)	Segundo residuo (pmol)	Tercer residuo (pmol)	Cuarto residuo (pmol)	Contenido de caseína (% p)
Asp	82	304	115	63	6,6
Glu	139	127	89	121	20,5
Asn	55	49	46	91	incluido en Asp
Gin	80	97	104	80	incluido en Glu
Ser	105	36	27	16	5,23
Thr	31	16	25	18	4,2
His	28	94	58	0	2,6
Gly	256	38	33	16	1,9
Ala	323	101	58	30	2,8
Tyr	725	114	52	28	5,4
Arg	13	7	6	8	3,6
Met	182	43	36	10	2,5
Val	869	127	196	64	6,1
Pro	42	1371	431	186	10,1
Trp	94	46	26	6	1,3
Phe	800	88	60	28	4,6
Lys	81	33	57	19	7,5
Ile	350	37	17	10	5,1
Leu	400	39	50	10	9,4
Total	4317	2767	1447	387	100,0

Evaluación de la absorbabilidad y resistencia a la digestión de Xaa-Pro y Xaa-Pro-Pro en el organismo vivo

Con objeto de evaluar la susceptibilidad de absorción y resistencia a la digestión en el organismo vivo de los péptidos que tienen la secuencia Xaa-Pro o Xaa-Pro-Pro contenido en los polvos del hidrolizado enzimático de caseína preparado en el Ejemplo 1 e indicado en la Tabla 1, se testó la absorción de los péptidos en la sangre después de administración oral en ratas, como sigue.

A dos ratas SD (Sprague Dawley) de 6 semanas se administraron por vía oral 500 mg/animal de cada uno de Val-Pro-Pro como ejemplo de Xaa-Pro-Pro y Gly-Gly como un dipéptido que no contenía cantidad alguna de Pro. Se tomaron muestras de sangre de la vena porta a intervalos, y se determinó la absorción de cada péptido en la sangre. Los resultados se muestran en la Fig. 1.

A partir de la Fig. 1, se confirmó que Gly-Gly era digerido fácilmente *in vivo*, por lo que se detectaba Gly, mientras que Val-Pro-Pro era absorbido en la sangre de modo relativamente estable. A partir de estos resultados, se espera que los dipéptidos y los tripéptidos que tienen las secuencias Xaa-Pro y Xaa-Pro-Pro, respectivamente, exhiban alta susceptibilidad de absorción y resistencia a la digestión en el organismo vivo.

Evaluación del efecto hipotensor

Cada uno de los polvos de hidrolizado de caseína preparados en el Ejemplo y los Ejemplos Comparativos que se muestran en la Tabla 1 se administraron por vía oral a cinco ratas espontáneamente hipertensas (SHR) de 27 semanas (machos) a una dosis de 32 mg/kg de peso corporal. Se midió la presión sanguínea antes de la administración y 5 horas después de la administración por el método del manguito en la cola con Tail-Cuff PB-98 (fabricado por Softron) para evaluar el cambio en la presión sanguínea. Como control, se administró caseína en lugar de los polvos, y se realizó la misma evaluación. Antes de la medida de la presión sanguínea, se calentaron las ratas en una jaula de precalentamiento (fabricada por CSI-Japan) a 45°C durante 8 minutos. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Por la Tabla 3, se encuentra que no se observaba cambio alguno en la presión sanguínea con caseína como control, mientras que se observaba un efecto hipotensor con la administración de los polvos del Ejemplo 1. Por otra parte, no se observaba cambio alguno en la presión sanguínea con ninguno de los polvos de los Ejemplos Comparativos. Se demuestra así que el hidrolizado de caseína del Ejemplo 1 que contenía una cantidad particular de Xaa-Pro y Xaa-Pro-Pro y que tenía una longitud media de cadena no mayor que 2,1, tenía un efecto hipotensor excelente.

Adicionalmente, de acuerdo con el método anterior, se testó un efecto hipotensor dependiente de la dosis utilizando los polvos de hidrolizado de caseína preparados en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 4 y en la Fig. 2.

Evaluación de la actividad inhibidora de la ACE

Se disolvió ACE derivada de pulmón de bovino (fabricada por WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) en un tampón de borato 0,1 M a pH 8,3 en una cantidad de 0,1 U, para obtener una solución de ACE. Se introdujeron en un tubo 80 µl de una solución diluida de hidrolizado enzimático preparada por dilución de polvos de cada hidrolizado enzimático mostrado en la Tabla 1 50 veces con agua destilada, 200 µl de una solución de hipuril-histidil-leucina 5 mM (fabricada por SIGMA), y 20 µl de la solución de ACE arriba preparada, y se dejaron reaccionar a 37°C durante 30 minutos. Subsiguientemente, se terminó la reacción por adición de 250 µl de ácido clorhídrico 1 N. Se añadieron luego 1,7 ml de acetato de etilo, y se agitó. Se tomaron 1,4 ml de la capa de acetato de etilo, se pusieron en otro tubo, y se evaporaron a 120°C durante aproximadamente 60 minutos para obtener un producto seco. El producto seco se disolvió en 1 ml de agua destilada, y se midió la absorbancia a 228 nm del ácido hipúrico extraído con acetato de etilo. Como controles, se midió la absorbancia de una solución sin la solución diluida de hidrolizado enzimático y una solución sin la solución de hidrolizado enzimático diluido, y la solución de ACE. A partir de la absorbancia obtenida, se calculó la actividad inhibidora de la ACE de acuerdo con la fórmula siguiente. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

$$\text{Actividad inhibidora de ACE (\%)} = [(A-B)/A] \times 100$$

A: (Absorbancia de la solución sin solución diluida de hidrolizado enzimático pero con solución de ACE) - (Absorbancia de la solución diluida sin solución de hidrolizado enzimático y solución de ACE)

B: (Absorbancia de la solución con solución diluida de hidrolizado enzimático y solución de ACE) - (Absorbancia de la solución con solución diluida de hidrolizado enzimático pero sin solución de ACE)

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 3

Hidrolizado enzimático	Actividad inhibidora de ACE (%/ μ g)	Disminución de presión sanguínea (valor medio $\pm$ DE)
Ejemplo 1	4,1	-25,0 $\pm$ 4,3 ***
Ej. Comp. 1	0,8	-4,3 $\pm$ 5,3
Ej. Comp. 2	1,2	-
Ej. Comp. 3	1,4	-3,7 $\pm$ 6,4
Ej. Comp. 4	1,0	2,8 $\pm$ 5,2
Ej. Comp. 5	1,1	-
Ej. Comp. 6	0,9	2,9 $\pm$ 5,4
Ej. Comp. 7	0,7	-5,1 $\pm$ 7,0
Ej. Comp. 8	1,1	-4,6 $\pm$ 6,9
Control	-	-2,5 $\pm$ 7,5

TABLA 4

Dosis de polvos (mg/kg)	Cambio en la presión sanguínea (mm Hg)	Desviación estándar
96	-31	4,3
32	-25	1,9
9,6	-14,4	3,2
0	0	6,9

Determinación de péptidos en el hidrolizado enzimático

Los polvos del hidrolizado enzimático del Ejemplo 1 que se muestran en la Tabla 1 se disolvieron en agua destilada a una concentración de 10 mg/ml. Por otra parte, se prepararon soluciones de 25 μ g/ml, 50 μ g/ml y 100 μ g/ml de cada péptido estándar sintetizado químicamente que tenía la secuencia que se muestra en la Tabla 5. Estas soluciones se analizaron por LC/MS en las condiciones indicadas más adelante. Entre los picos indicados en el análisis de la solución de polvo, se identificaron picos correspondientes a los pesos moleculares y los tiempos de retención idénticos a los de péptidos estándar, como representativos de las mismas secuencias que los péptidos estándar. Los picos de la solución de polvo se compararon con los de los péptidos estándar, para determinar el contenido de cada péptido mostrado en la Tabla 4 en la solución de polvo. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Se encontró que la cantidad de los péptidos y los aminoácidos libres en la solución preparada por disolución de los polvos con agua destilada era 8,15 mg/ml, la cantidad de péptidos era 4,57 mg/ml y la cantidad de Xaa-Pro en los péptidos era 514,5 μ g, por lo que el porcentaje de Xaa-Pro con respecto a la cantidad total de los péptidos y los aminoácidos libres en los polvos era 6,3% en peso. Adicionalmente, la cantidad de Xaa-Pro-Pro en los péptidos era 116,5 μ g, por lo que el porcentaje de Xaa-Pro-Pro respecto a la cantidad total de los péptidos y los aminoácidos libres en los polvos era 1,4% en peso.

ES 2 313 067 T3

Aparato utilizado

Cromatógrafo líquido de alta resolución-espectrómetro de masas:

- 5 LCMS-2010; controlador del sistema: SCL-10Adv; inyector automático: SIL-10Adv; bomba de suministro de disolvente: NC-10Adv x 2; horno de la columna: CT0-10Adv; detector del sistema de fotodiodos: SPD-M10AVP; desgasificador en línea: DGU-14A (todos ellos nombres comerciales, fabricados por SHIMADZU CORPORATION); columna: Develosil C30-UG-3 (2,0 mm D.I. x 150 mm l) (fabricada por NOMURA CHEMICAL CO., LTD.)

10 Condiciones para la medida

Fase móvil A: solución acuosa de ácido fórmico al 0,1% en peso;

- 15 Fase móvil B: solución de acetonitrilo al 100%; programa de tiempos: 0% B (0 minutos) - 7,5% B (30 minutos) - 80% B (30,01 minutos) - 100% B (35 minutos) - 0% B (35,1 minutos) - PARADA (45 minutos); cantidad de muestra para inyección: 5 µl; temperatura de columna: 50°C; longitud de onda de detección: 200 a 300 nm; modo de ionización: ESI (+); caudal de gas atomizado: 4,5 l/min; voltaje aplicado: +4,5 kV; temperatura de CDL: 250°C; temperatura del calentador de bloque: 200°C; voltaje CDL: 0,0 V; voltaje de la red Q: SCAN; modo de análisis: medida de SIM; intervalo analizado: EP (m/z = 245,2), IP (m/z = 229,3), MP (m/z = 247,3), QP (m/z = 244,2), RP (m/z = 272,3), SPP (m/z = 300,3); VPP (m/z = 312,1), IPP (m/z = 326,1); tiempo de toma: 0,5 s/Ch.

TABLA 5

25	Secuencia peptídica	Concentración en 10 mg/ml de polvos (µg/ml)
	Ile-Pro	16,0
30	Glu-Pro	7,1
	Arg-Pro	10,3
35	Gln-Pro	34,5
	Met-Pro	18,4
	Tyr-Pro	128,9
40	Otros Xaa-Pro	299,4
	Ser-Pro-Pro	2,9
	Val-Pro-Pro	29,5
45	Ile-Pro-Pro	28,1
	Phe-Pro-Pro	27,2
50	Otros Xaa-Pro-Pro	28,8

Ejemplo de Análisis 1

55 Identificación de las enzimas

- Entre las enzimas extracelulares derivadas de *Aspergillus oryzae* utilizadas en el Ejemplo 1, las enzimas necesarias para obtener el hidrolizado de caseína de la presente invención se analizaron por el método siguiente. Incidentalmente, todas las operaciones que siguen se realizaron a 4°C a no ser que se especifique otra cosa. Los reactivos utilizados eran todos ellos reactivos garantizados fabricados por WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. a no ser que se especifique otra cosa.

Impacto de diversos agentes inhibidores sobre las enzimas

- 65 Se disolvieron 2000 mg de SUMIZYME FP (marca comercial registrada, fabricada por SHIN NIHON CHEMICAL CO., LTD.) en 10 ml de un tampón de fosfato 50 mM a pH 7,2, y se filtraron a través de una membrana de acetato de celulosa (DISMIC-25cs, diámetro de poro 0,45 µm, fabricada por ADVANTEC), para obtener una solución de enzima bruta.

Esta solución de enzima bruta se hizo reaccionar con 1% de caseína del mismo modo que en el Ejemplo 1. Cuando se añadió al sistema de reacción un inhibidor de metaloproteasa, EDTA (ácido etilendiaminatetraacético), o un inhibidor de serina-proteasa, PMSF (fluoruro de fenilmetanosulfonilo), la longitud media de cadena era más larga, y no pudo obtenerse el hidrolizado objetivo. Esto sugiere que la metaloproteasa o serina-proteasa juega un papel importante en la producción del hidrolizado de caseína de la presente invención.

Aislamiento con resina cambiadora de iones

Se activaron 20 ml de una resina cambiadora de aniones, DEAE Sephacel (fabricada por AMERSHAM BIOSCIENCES K.K.), se equilibraron con un tampón de fosfato 50 mM a pH 7,2, y se compactaron en una columna de vidrio de 1,5 cm de diámetro x 12 cm. Mientras que todo el efluente se recogía como muestra no adsorbida, la solución de enzima bruta se sometió a adsorción a un caudal de 1,0 ml/min. A continuación se lavó concienzudamente la columna con un tampón de fosfato 50 mM a pH 7,2 en una cantidad 10 veces el volumen del gel, y se eluyó con 200 ml de un tampón de fosfato 50 mM a pH 7,2 que contenía un gradiente lineal de NaCl (0 a 600 mM). El material eluido se fraccionó en 100 fracciones de 5 ml cada una. Se midieron para cada fracción la absorbancia a 280 nm, la actividad de proteinasa, y la actividad inhibidora de la ACE.

Medida de la actividad de proteinasa

Se disolvieron 25 mg de un material fluorescente, caseína marcada con (isotiocianato de fluoresceína) (FITC-caseína, fabricada por SIGMA) en 5 ml de un tampón de fosfato 50 mM a pH 7,2 para preparar una solución sustrato. Se mezclaron 10 μ l de cada fracción con 20 μ l de la solución sustrato, y se dejaron reaccionar a 55°C durante 10 minutos. La reacción se terminó por adición de 120 μ l de una solución de tricloroacetato al 5%, y el líquido de reacción resultante se centrifugó a 1500 rpm. Se tomaron 60 μ l del sobrenadante, se mezclaron con 3 ml de un hidrocloreuro de Tris 0,5M a pH 8,5, y se sometieron a la medición utilizando un fluorómetro (F-1300, fabricado por HITACHI, LTD.) para determinar la longitud de onda de excitación a 485 nm, y la longitud de onda de la fluorescencia a 525 nm.

A partir de los resultados de la medida de la absorbancia a 280 nm de cada fracción de material eluido de DEAE-Sephacel, se confirmó que aproximadamente el 73% de la proteína se adsorbía en la resina cambiadora de iones aniónica. La Fig. 3 muestra el patrón de elución de la proteína combinada con un gradiente lineal de NaCl 0 a 0,6 M y la actividad proteolítica.

Las fracciones 21 a 60 contenían una cantidad particularmente grande de proteínas eluidas en ellas. Adicionalmente, la solución de enzima eluida de cada fracción se evaluó respecto a la actividad para generar componentes inhibidores de la ACE en la hidrólisis de la caseína. Como resultado, se confirmó que principalmente las fracciones 20 a 60 tenían actividad para generar componentes inhibidores de la ACE.

Por otra parte, la actividad de proteinasa medida con la FITC-caseína como sustrato se observó principalmente en las fracciones 19 a 27 (para NaCl 0,1 M a 0,2 M), lo que indica que la actividad de proteinasa tiene una función importante en la generación de los componentes inhibidores de la ACE. A partir de estos resultados, se encontró que la actividad de proteinasa juega un papel importante en la actividad enzimática para la purificación de los componentes inhibidores de la ACE respecto a la caseína.

Identificación de las proteinasas contenidas

A partir de las fracciones eluidas de DEAE-Sephacel, se recogieron las fracciones 21 a 35 que tenían actividad de proteinasa, y se dializaron contra 5 litros de un tampón de fosfato 5 mM a pH 7,2. Se suspendió Sephacryl S-300 HR (fabricado por AMERSHAM BIOSCIENCES K.K.) en un tampón de fosfato 50 mM a pH 7,2 que contenía NaCl 200 mM, se desgasificó concienzudamente, y se compactó en una columna de vidrio de 18 cm de diámetro x 100 cm. Esta columna se equilibró concienzudamente con un tampón de fosfato 50 mM a pH 7,2 que contenía NaCl 200 mM a un caudal constante de 2 ml/min. La muestra dializada se aplicó a esta columna, y se recuperaron 100 fracciones de 10 ml cada una. Se midieron para cada fracción la absorbancia a 200 nm y la actividad de proteinasa utilizando FITC-caseína como sustrato.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se tomaron 10 μ l de cada fracción, se mezclaron con 10 μ l de un tampón de muestra compuesto de un tampón Tris 0,125M a pH 6,8, 3% SDS, 5% β -mercaptoetanol, 10% glicerol, y 0,01% azul de bromofenol, se calentaron a 95°C durante 5 minutos, y se enfriaron a la temperatura ambiente.

La muestra resultante se sometió a electroforesis de acuerdo con el método de Laemmli (Nature, 227, 680 (1970)), utilizando una mini-placa (fabricada por ATTO CORPORATION) y un gel de poliacrilamida a una concentración designada en las condiciones de 30 mA por gel. Una vez completada la electroforesis, se impregnó el gel en una solución de tinción de Azul Coomassie Brillante compuesta de 0,25% de Azul Coomassie Brillante R-250, 50% de metanol, y 7,5% de ácido acético durante 10 minutos, y se infiltró en un decolorante compuesto de 5% de metanol y 7,5% de ácido acético hasta que el sustrato se decoloró por completo. El peso molecular se obtuvo por cálculo a partir de la movilidad de cada banda de proteína, utilizando marcadores de peso molecular (fabricados por AMERSHAM BIOSCIENCES K.K.).

Las fracciones adsorbidas en la resina de intercambio aniónico que tenían actividad para generar componentes inhibidores de la ACE, se sometieron a filtración con gel a través de resina Sephacryl S-300, y se observó la actividad en fracciones correspondientes al peso molecular de aproximadamente 45 kDa. Estas fracciones se analizaron por electroforesis en SDS-gel de poli-acrilamida en un gel al 12,5% para observar una banda sustancialmente simple a 44 kDa y 40 kDa. Estas bandas se separaron por corte y se sometieron a análisis de las secuencias N-terminales. Se reveló que la banda de 44 kDa tenía una secuencia que era sumamente homóloga a una proteasa I neutra conocida del moho koji (*Aspergillus*) y la banda de 40 kDa tenía una secuencia que era sumamente homóloga a una proteasa II neutra conocida del moho koji (*Aspergillus*).

A partir de estos resultados se determinó que las proteinasas adsorbidas en la resina de intercambio aniónico que generaban componentes inhibidores de la ACE para caseína, contenían al menos dos proteinasas, proteasa neutra I y proteasa neutra II.

Para hidrolizar ulteriormente los componentes generados por hidrólisis de caseína con proteinasas, se analizaron por el método siguiente las peptidasas que actúan sobre los péptidos.

Con objeto de identificar las enzimas para producir péptidos que tenían contenidos más altos de Xaa-Pro y Xaa-Pro-Pro, que son el rasgo característico de la presente invención, se sintetizaron diversos péptidos precursores para Val-Pro-Pro, y se evaluó su transformabilidad en Val-Pro-Pro.

Purificación de enzimas para transformación de los terminales amino

A partir de las fracciones eluidas de DEAE-Sephacel, se recogieron las fracciones 21 a 37 que tenían actividad para generar componentes inhibidores de la ACE, y se dializaron contra 5 litros de un tampón de fosfato 5 mM a pH 7,2. Se suspendió hidroxipatito (fabricado por WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) en un tampón de fosfato 5 mM a pH 7,2, se desgasificó completamente, y se compactó en una columna de plástico de 1,5 cm de diámetro x 12 cm. Esta columna se lavó con un tampón de fosfato 5 mM a pH 7,2 en una cantidad no menor que 10 veces la cantidad del hidroxipatito. Las fracciones dializadas que tenían actividad para generar componentes inhibidores de la ACE se aplicaron a esta columna de hidroxipatito, y se recogieron todas las fracciones que pasaban a través de la columna.

Medida de la actividad de aminopeptidasa

Se midió la actividad de aminopeptidasa por el método siguiente. El péptido sintetizado Val-Val-Val-Pro-Pro se disolvió en un tampón de fosfato 50 mM a pH 7,2 en una concentración de 50 µg/ml para preparar una solución sustrato. Se mezclaron 45 µl de esta solución sustrato con 5 µl de la fracción enzimática, y se hicieron reaccionar en una incubadora a 55°C durante 30 minutos. La reacción se terminó por calentamiento a 98°C durante 5 minutos. Se tomó una cantidad apropiada de este líquido de reacción, y se sometió a análisis en un cromatógrafo líquido de alta resolución-espectrómetro de masas (fabricado por SHIMADZU CORPORATION) para evaluar la cantidad de Val-Pro-Pro generada.

Las fracciones adsorbidas en la resina cambiadora de aniones que tenían actividad para generar componentes inhibidores de la ACE se sometieron a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida en un gel al 10%, y se separó por corte la banda de 32 kDa. Se extrajo la proteína principal, y se purificó para dar una proteína sustancialmente simple de 32 kDa. La secuencia en el terminal N de la proteína se analizó para revelar que la secuencia hasta el décimo residuo desde el terminal N era homóloga a la secuencia de la leucina-aminopeptidasa conocida del moho koji (*Aspergillus*). Se llegó a la conclusión de que las fracciones que tenían actividad confirmada para generar componentes inhibidores de la ACE contenían leucina-aminopeptidasa.

A partir de estos resultados, se entiende que las fracciones adsorbidas en la resina cambiadora de aniones que tenían actividad para generar componentes inhibidores de la ACE contenían al menos leucina-aminopeptidasa que tenía actividad de aminopeptidasa, que jugaba un papel importante en la actividad para generar componentes inhibidores de la ACE.

Medida de la transformabilidad del terminal carboxilo de las enzimas

Se disolvió el péptido Val-Pro-Pro-Phe-Leu sintetizado en un tampón de fosfato 50 mM a pH 7,2 en una concentración de 45 µg/ml a fin de preparar una solución sustrato. Se mezclaron 50 µl de esta solución sustrato con 5 µl de cada solución enzimática, y se dejaron reaccionar en una incubadora a 55°C durante 30 minutos. La reacción se terminó por calentamiento a 98°C durante 5 minutos. Se tomó una cantidad apropiada de este líquido de reacción, y se sometió a análisis en un cromatógrafo líquido de alta resolución-espectrómetro de masas (fabricado por SHIMADZU CORPORATION) para evaluar la concentración de Val-Pro-Pro generada.

La transformabilidad del terminal carboxilo de cada fracción eluida de DEAE-Sephacel se evaluó para encontrar que las fracciones 30 a 50 tenían actividad enzimática para convertir Val-Pro-Pro-Phe-Leu en Val-Pro-Pro.

Ejemplo 2

Confirmación de la actividad inhibidora de ACE del hidrolizado de caseína por combinación de enzimas purificadas

Por el Ejemplo de Análisis 1, se confirmó que la actividad para generar componentes inhibidores de la ACE de las fracciones adsorbidas en la resina cambiadora de aniones de la enzima extracelular derivada de *Aspergillus oryzae* (SUMIZYME FP (marca comercial registrada, fabricada por SHIN NIHON CHEMICAL CO., LTD.)) incluían cuatro actividades enzimáticas, a saber, las actividades de proteinasa que incluían las de al menos las proteasas neutras I y II, la actividad de aminopeptidasa que incluía la de leucina-aminopeptidasa, y la actividad para escindir el terminal carboxilo inmediatamente después de la prolina.

A partir de las fracciones adsorbidas (véase la Fig. 3), se proporcionaron la Fracción I que tenía actividad alta de proteinasa (fracciones 1 a 35 en la Fig. 3), la Fracción II que tenía actividad alta para escindir el terminal carboxilo inmediatamente después de la prolina (fracciones 36 a 55 en la Fig. 3), la Fracción III posterior (fracciones 56 a 100 en la Fig. 3), y las fracciones no adsorbidas que tenían actividad de proteinasa.

Se añadió cada fracción, sola o en combinación como se muestra en la Tabla 6 a 1 ml de una solución al 1% de caseína derivada de leche de vaca, y se dejó reaccionar a 55°C durante 13 horas para preparar un hidrolizado de caseína. Una vez completada la reacción, se midió cada uno de los hidrolizados de caseína obtenidos respecto a actividad inhibidora de la ACE, y la longitud media de cadena de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1. Como control, se sometió a las mismas medidas la solución de enzima bruta en 1/10000 la cantidad sometida a la purificación. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

TABLA 6

Fracciones utilizadas	Inhibición de ACE (%)	Longitud media de cadena de los productos digeridos
Fracciones enzimáticas brutas	79	1,8
Fracciones no adsorbidas	45	3,7
Fracción I	46	2,3
Fracción II	27	2,75
Fracción III	0	-
Fracciones no adsorbidas + Fracción II	70	2,1
Fracciones I + II	56	1,8
Fracciones no adsorbidas + Fracciones I + II	77	1,7
Fracciones no adsorbidas + Fracciones I + II + III	78	1,6
Fracciones no adsorbidas + Fracción III	52	-
Fracciones I + III	40	-
Fracciones II + III	12	-
Fracciones no adsorbidas + Fracciones II + III	68	-
Fracciones I + II + III	43	-

Por la Tabla 6, se descubrió que los componentes que tenían actividad inhibidora fuerte de la ACE estaban contenidos en las fracciones no adsorbidas, las fracciones que tenían actividad alta de proteinasa, y hasta las fracciones que tenían actividad para escindir el terminal carboxilo inmediatamente después de la prolina. Se descubrió también que el grupo de enzimas eluidas en NaCl aproximadamente 300 mM generaban los componentes inhibidores de la ACE, por lo que la Fracción III era innecesaria.

Se midió y se comparó la longitud media de cadena del hidrolizado de caseína obtenido por hidrólisis con cada fracción que exhibía actividad fuerte para generar componentes inhibidores de la ACE. Se encontró que las longitudes medias de cadena para las fracciones no adsorbidas, Fracción I y Fracción II eran superiores a 2,1, pero por combinación de estas fracciones se obtuvo un hidrolizado de caseína que tenía la longitud media de cadena no mayor que 2,1.

Ejemplo 3

Se añadieron 15 g de caseína derivada de leche de vaca (fabricada por NIPPON NZMP) a 85 g de agua destilada a aproximadamente 80°C y se mezclaron concienzudamente. Se añadió solución 1 N de hidróxido de sodio a la mezcla para ajustar el pH a 7,0. Se ajustó la temperatura a 20°C para preparar una solución sustrato.

A la solución sustrato así obtenida, se añadió SUMIZYME FP (marca comercial registrada, fabricada por SHIN NIHON CHEMICAL CO., LTD.), que son enzimas extracelulares derivadas de *Aspergillus oryzae*, como el grupo de enzimas de tal modo que la relación enzima/caseína era 1/25 en peso. La mezcla se dejó reaccionar a 50°C durante 20 horas, muestreando el líquido de reacción a intervalos para evaluar la actividad inhibidora de la ACE y la longitud media de cadena en función del tiempo del mismo modo que en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en las Figs. 4 y 5. La solución digerida con enzimas tomada después de 12 horas de reacción, que exhibía la actividad inhibidora máxima de ACE, se secó por pulverización para obtener polvos de mezcla peptídica.

Por las Figs. 4 y 5, se confirmó que la actividad inhibidora de la ACE aumentaba con el aumento del tiempo de reacción, y disminuía después de 12 horas de reacción. Se confirmó también, por la evaluación de la cantidad de péptido, que la actividad inhibidora de la ACE aumentaba para la longitud media de cadena de aproximadamente 1,3 a 2,1.

REIVINDICACIONES

1. Un hidrolizado de caseína que comprende aminoácidos libres y péptidos obtenidos por hidrólisis de caseína de
leche animal con un grupo de enzimas que tiene una longitud media de cadena no mayor que 2,1 en términos del
número de residuos de aminoácidos,

en donde dicho grupo de enzimas comprende peptidasas capaces de escindir un enlace peptídico Pro-Xaa y leucina-
amino-peptidasas, y comprende adicionalmente al menos una de proteasa neutra I y proteasa neutra II, todas las cuales
son enzimas extracelulares derivadas de *Aspergillus oryzae*,

en donde dichos péptidos comprenden péptidos indigeribles *in vivo* constituidos por dipéptidos que tienen una
secuencia Xaa-Pro y tripéptidos que tienen una secuencia Xaa-Pro-Pro, y en donde el contenido de dichos dipéptidos
que tienen una secuencia Xaa-Pro no es menor que 5% en peso de la cantidad total de aminoácidos libres y péptidos
en el hidrolizado, y el contenido de dichos tripéptidos que tienen una secuencia Xaa-Pro no es menor que 1% en peso
de la cantidad total de aminoácidos libres y péptidos en el hidrolizado.

2. El hidrolizado de caseína de la reivindicación 1 para uso como aditivo alimentario o en medicina.

3. El hidrolizado de caseína de la reivindicación 1, en donde dichos dipéptidos que tienen una secuencia Xaa-Pro
comprenden Ile-Pro, Glu-Pro, Arg-Pro, Gln-Pro, Met-Pro, y Tyr-Pro, y dichos tripéptidos que tienen una secuencia
Xaa-Pro-Pro comprenden Ser-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro, y Val-Pro-Pro.

4. Un método para preparar un hidrolizado de caseína que comprende aminoácidos libres y péptidos obtenidos
por hidrólisis de caseína de leche animal que tienen una longitud media de cadena no mayor que 2,1 en términos del
número de residuos de aminoácidos, en donde dicho método comprende el paso de (A) hidrolizar caseína de leche
animal para tener una longitud media de cadena no mayor que 2,1 con un grupo de enzimas capaces de digerir caseína
de leche animal en un hidrolizado de caseína que tiene una longitud media de cadena no mayor que 2,1 en términos del
número de residuos de aminoácidos, en donde dicho grupo de enzimas comprende peptidasas capaces de escindir un
enlace peptídico Pro-Xaa y leucina-amino-peptidasas, y comprende adicionalmente al menos una de proteasa neutra I
y proteasa neutra II, todas las cuales son enzimas extracelulares derivadas de *Aspergillus oryzae*.

5. El método de la reivindicación 4, en donde dicha hidrólisis se realiza en una reacción de un solo paso con dicho
grupo de enzimas.

6. El método de la reivindicación 4, en donde dicho grupo de enzimas comprende adicionalmente al menos una de
metaloproteasas y serina-proteasas.

7. El método de la reivindicación 4, en donde dichas peptidasas capaces de escindir un enlace peptídico Pro-Xaa
son un grupo de enzimas que tienen puntos isoeléctricos en una región ácida.

8. El método de la reivindicación 4, en donde en dicho paso (A), la relación de dicho grupo de enzimas a caseína
de leche animal no es menor que 1/100 en peso.

9. Uso de un hidrolizado de caseína de la reivindicación 1, en la fabricación de un medicamento para la prevención
o el tratamiento de la hipertensión.

Fig. 1

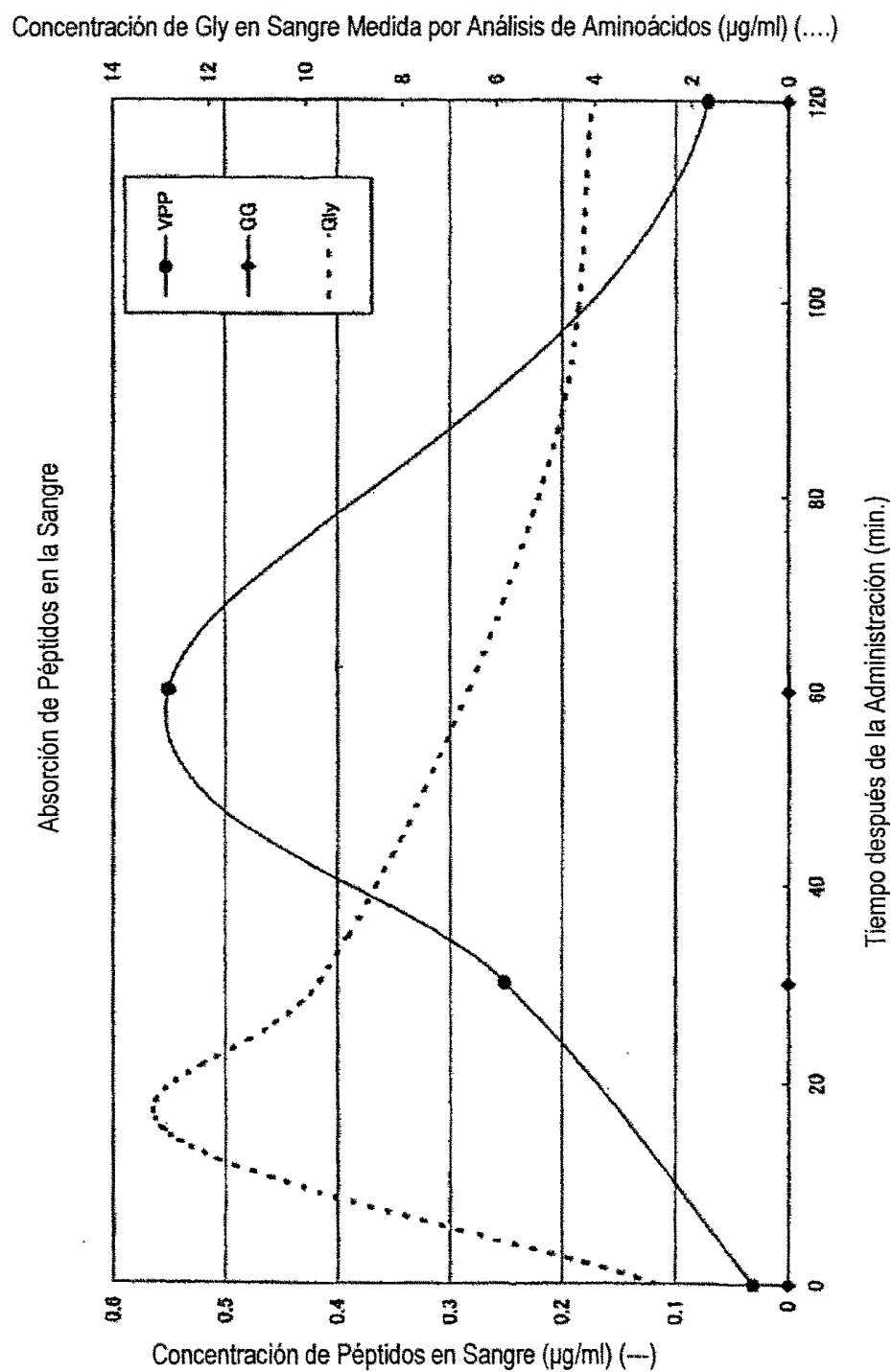


Fig. 2

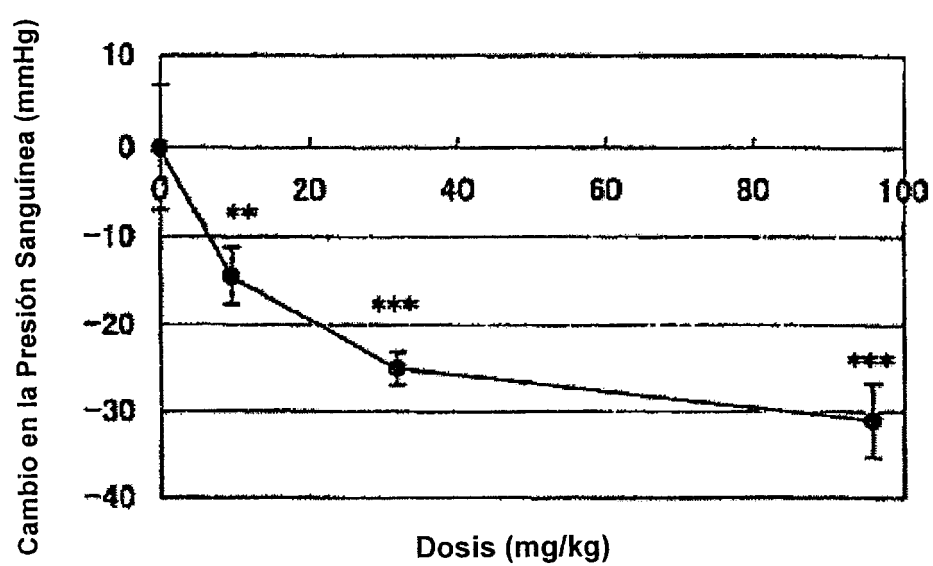


Fig. 3

Perfil de Elución de las Fracciones Adsorbidas en Resina Cambiadora de Aniones

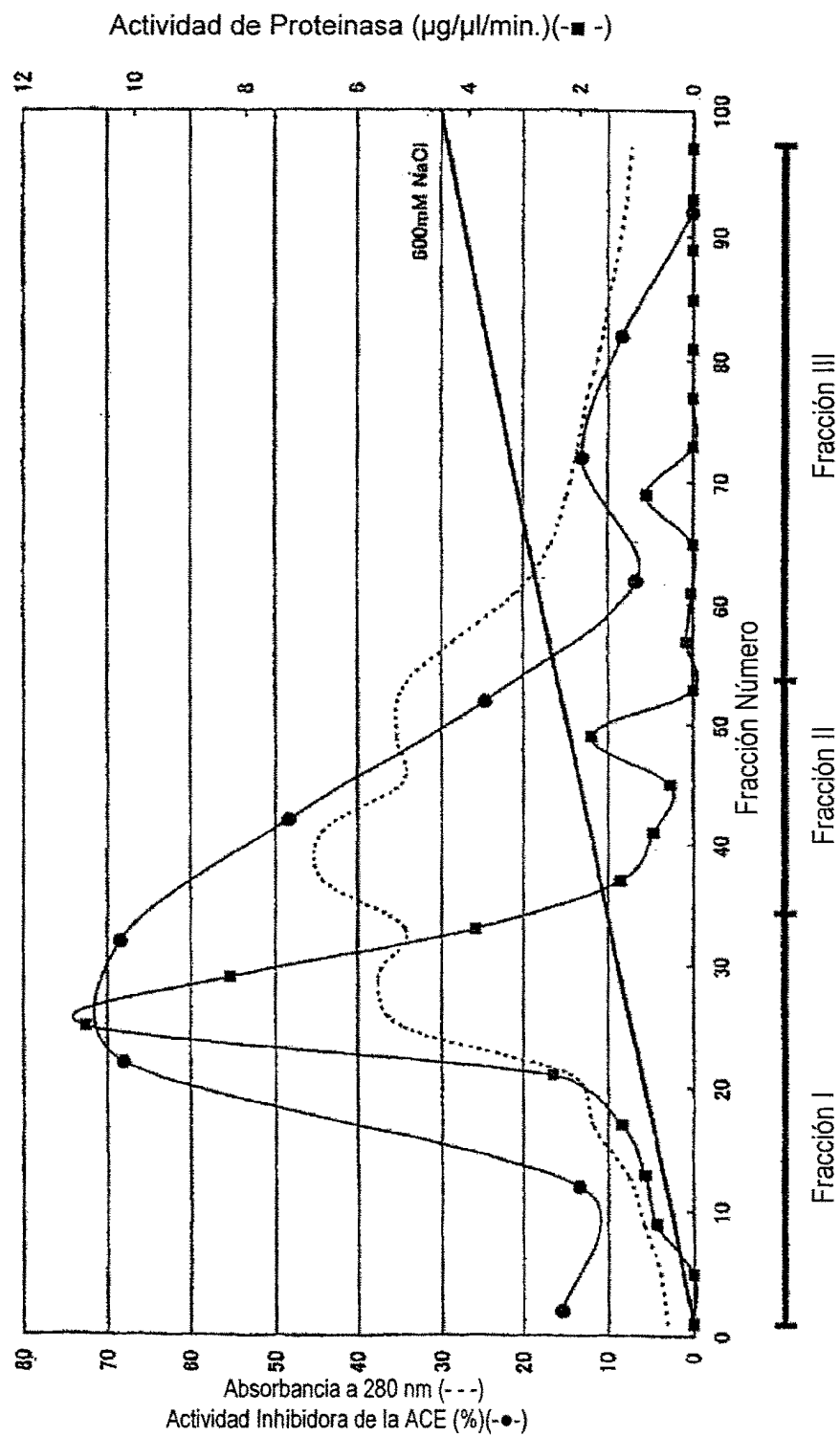


Fig. 4

Tiempo de Reacción de la Hidrólisis de la Caseína y Cambio en la Actividad Inhibidora de ACE con el Tiempo

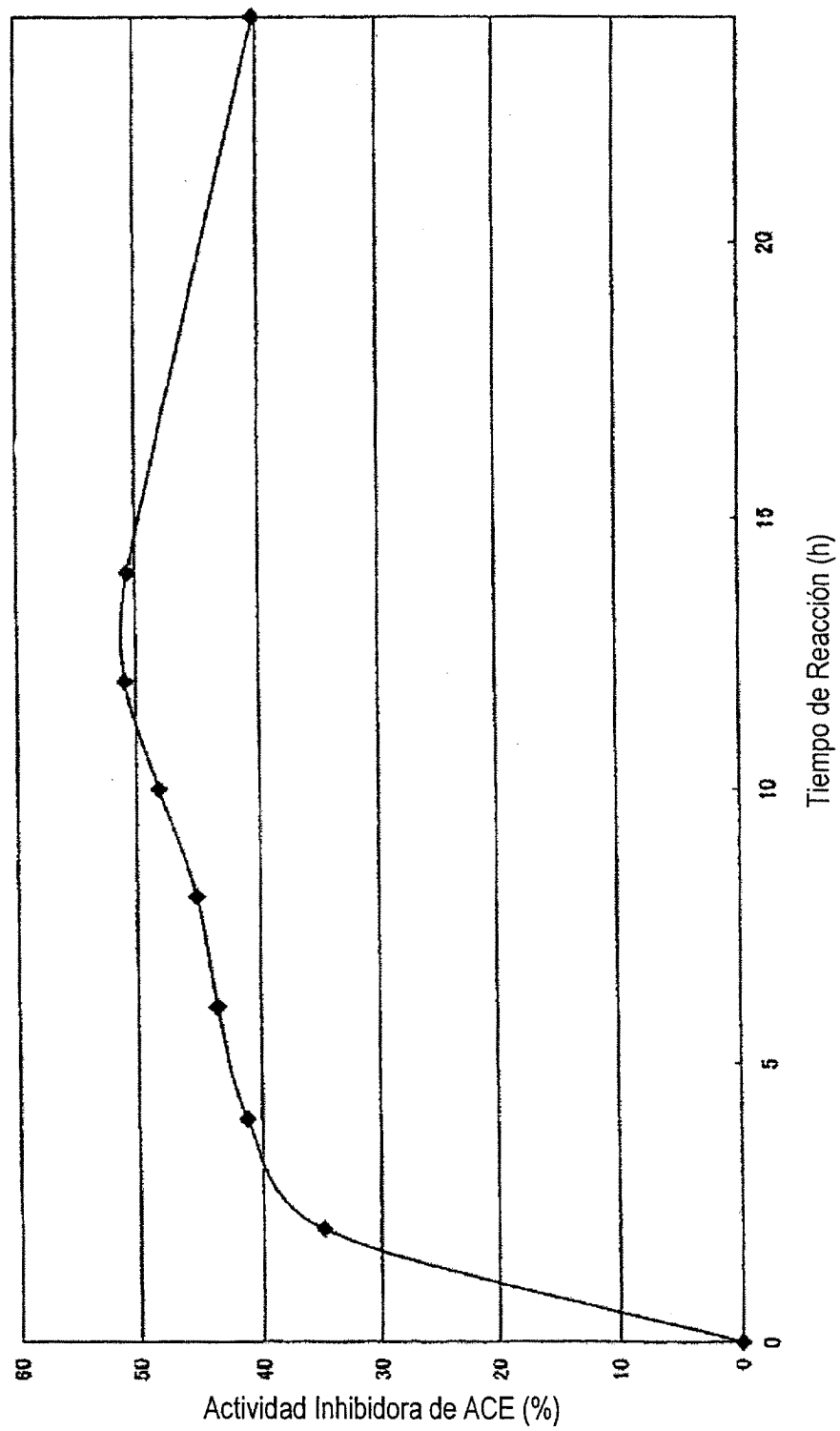
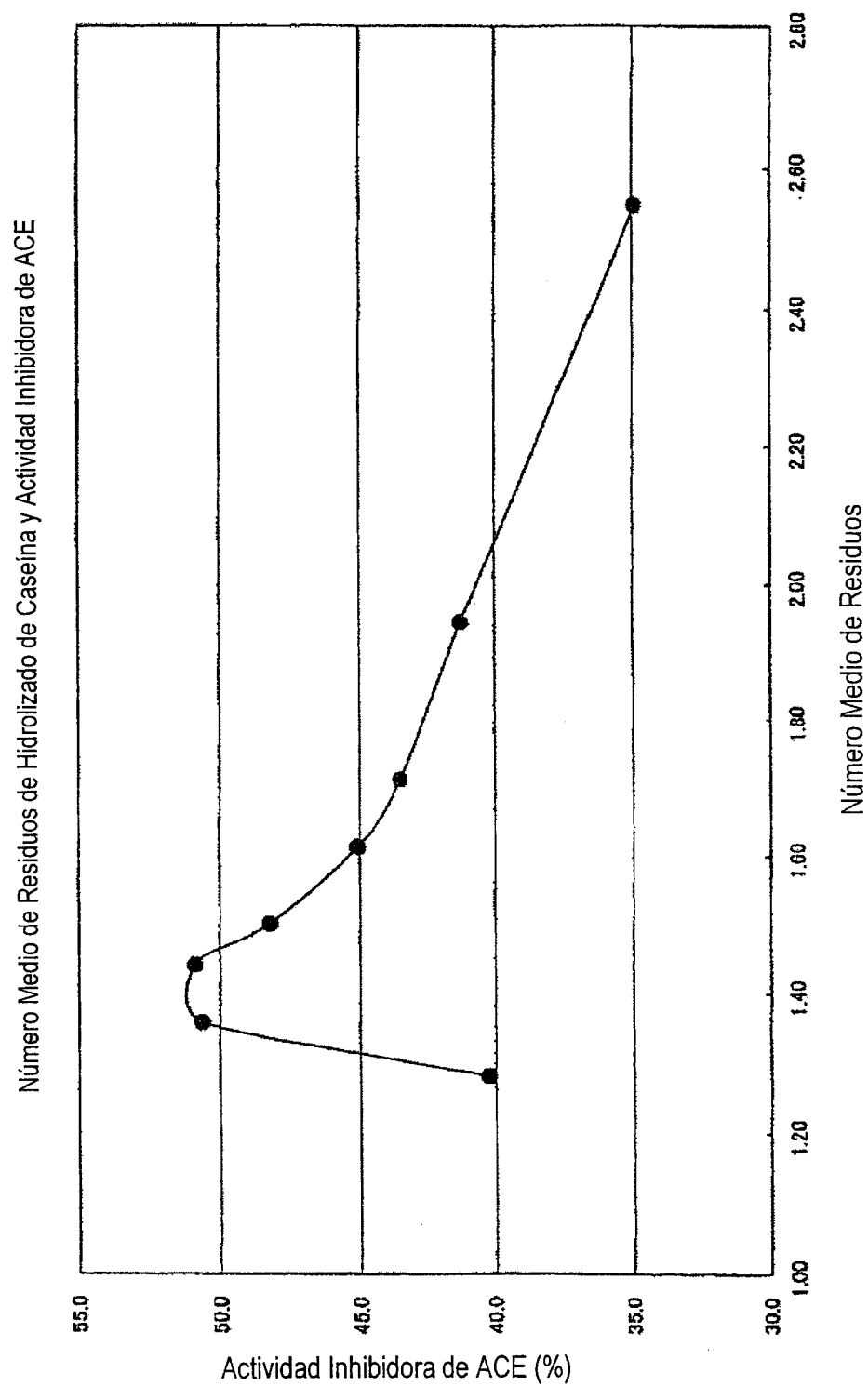


Fig. 5



ES 2 313 067 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CALPIS CO., LTD.

5 <120> HIDROLIZADO DE CASEÍNA, MÉTODO DE PREPARACIÓN DEL MISMO, Y USO DEL MISMO

<130> P042742EP

10 <140> 04771088.4

<141> 2044-07-04

<150> JP2003-285007

15 <151> 2003-08-01

<160> 2

20 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 5

25 <212> PRT

<213> *Bos taurus*

<400> 1

30

Val Val Val Pro Pro
1 5

35 <210> 2

<211> 5

<212> PRT

40 <213> *Bos taurus*

<400> 2

45 Val Pro Pro Phe Leu
1 5

50

55

60

65