

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 366**

51 Int. Cl.:

C12P 21/06 (2006.01)

A23J 3/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.07.2011 PCT/ES2011/070551**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2012 WO12172129**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2011 E 11842461 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2728011**

54 Título: **Procedimiento optimizado para la obtención de péptidos inhibidores de la actividad de la ECA a partir de suero lácteo, péptidos inhibidores de la ECA y alimento que los comprende**

30 Prioridad:
15.06.2011 ES 201131001

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.03.2018

73 Titular/es:
**QUEIZUAR, S.L. (100.0%)
A Silva - Bama
15822 Touro (A Coruña), ES**

72 Inventor/es:
**PEREIRA RAMOS, BENIGNO;
PEREIRA RODRIGUEZ, ANGEL;
ESTEVEZ TELLE, NATALIA;
FUCIÑOS GONZALEZ, JUAN PABLO;
RUA RODRIGUEZ, MARIA LUISA y
PASTRANA CASTRO, LORENZO**

74 Agente/Representante:
CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 657 366 T3

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

Procedimiento optimizado para la obtención de péptidos inhibidores de la actividad de la ECA a partir de suero lácteo, péptidos inhibidores de la ECA y alimento que los comprende.

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento optimizado para obtener péptidos que inhiben la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) a partir de suero lácteo, péptidos inhibidores de la ECA y un alimento funcional que comprende dichos péptidos.

Los objetos anteriores se incluyen dentro del sector alimentario, en especial, en el campo de la industria láctea.

Antecedentes de la invención

- 10 Existen numerosos procedimientos descritos en la bibliografía para la liberación de péptidos bioactivos a partir de las proteínas lácteas. Algunos de ellos se basan en la fermentación de esos materiales y otros, los más, en la hidrólisis enzimática con proteasas tanto de origen animal (pepsina, tripsina y quimotripsina) como vegetal (papaína y la bromelaína) o microbiano (proteínasa K o la termolisina). Las ventajas de estos últimos procedimientos se relacionan con las condiciones de reacción más suaves en las que transcurren (Otte et al., 1997) y con la distinta especificidad por los residuos implicados en el enlace peptídico que facilitan el aislamiento y caracterización de los péptidos generados. Por el contrario, el principal inconveniente de la hidrólisis enzimática es que con frecuencia conduce a la producción de un intenso sabor amargo, debido a la presencia de residuos aminoácidos hidrófobos en el péptido obtenido.

- 15 El documento EP1967524 A1 describe un procedimiento en dos etapas para obtener hidrolizados con péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, ECA, el cual utiliza un concentrado rico en proteínas de suero rico en β -lactoglobulina, como material de partida. El contenido de α -lactoalbúmina in dicho concentrado es inferior a 0,01%, de acuerdo con la caracterización mostrada en la página 8, mediante RP-HPLC. Aquí, la hidrólisis se realiza bajo control del pH.

- 20 Hernandez-Ledesma B. *et al* ("Efecto de la hidrólisis de β -lactoglobulina con termolisina a temperaturas de desnaturalización sobre la liberación de péptidos bioactivos", Journal of Chromatography, Elsevier Science Publiiser B.V., NL, vol. 1116, no. 1-2, páginas 31-37, 2006.05.26) describen la hidrólisis de β -lactoglobulina A bovina (β -Lg-A) con termolisina, en condiciones térmicas de desnaturalización y de no desnaturalización, en la cual se identificaron un total de 25 péptidos mediante HPLC-MS/MS, y donde la hidrólisis se realizó a 37°C, durante 5-30 minutos, y utilizaba 10mM de tampón (*buffer*) CaCl₂ (pH 8).

- 25 De las proteínas lácteas, las caseínas son muy susceptibles a la hidrólisis debido a su estructura abierta y flexible. Por este motivo están descritos un gran número y variedad de péptidos antihipertensivos de este origen (Yamamoto et al., 1999). Por el contrario, la generación de actividad antihipertensiva a partir de las proteínas del suero lácteo dependen en mayor medida de la proteasa utilizada y de las condiciones de hidrólisis.

- 30 Las proteasas digestivas más utilizadas son la tripsina, la pepsina y la quimotripsina. La tripsina se ha empleado con éxito en la producción de péptidos inhibidores de la ECA a partir proteínas séricas. Esto puede deberse a la especificidad que presenta la ECA por sustratos o inhibidores competitivos con Lys o Arg en el extremo C-terminal (López-Fandiño et al., 2006). La β -Lg bovina contiene muchos enlaces susceptibles teóricamente a la pepsina. Sin embargo, es resistente a la acción de dicha enzima (Reddy et al., 1988), debido a la estructura compacta de la proteína que oculta los aminoácidos hidrofóbicos susceptibles a la hidrólisis (Brownlow et al., 1997). La desnaturalización térmica parcial de la β -Lg supone la aparición de enlaces susceptibles a la pepsina. Por el contrario, la α -La es sensible a la acción de la pepsina (Schmidt y van Marwijk, 1993), pero se requieren tiempos superiores a las tres horas para que se produzca la liberación de péptidos inhibidores de la ECA (Pihlanto-Leppälä et al., 2000). Finalmente, la quimotripsina hidroliza rápidamente la α -La, y más lentamente la β -Lg se hidroliza (Schmidt y Poll, 1991). La combinación de las tres enzimas digestivas, pepsina, tripsina y quimotripsina ha permitido la liberación de péptidos de pequeño tamaño y con actividad inhibitoria de la ECA (Pihlanto-Leppälä et al., 2000).

La principal ventaja del uso de enzimas digestivas para obtener péptidos antihipertensivos es que simula las condiciones fisiológicas del organismo en la liberación de péptidos con actividad biológica. La principal desventaja es que la menor disponibilidad y alto precio de estas enzimas, comparadas con las de origen microbiano.

- 35 Las enzimas microbianas más utilizadas para la hidrólisis de las proteínas de suero son la proteinasa K y la termolisina. Los hidrolizados obtenidos tras la acción de estas enzimas sobre concentrados de proteínas de suero presentan porcentajes de inhibición de la ECA superiores al 95% (Saito et al., 1997). Por ejemplo, hidrolizados

con termolisina y proteinasa K poseían una potente actividad inhibitoria de la ECA (Hernández-Ledesma et al., 2002; 2006; Abubakar et al., 1998). En cualquier caso, nunca se han realizado experiencias con mezclas de enzimas microbianas con este fin.

5 En la tabla 1 se muestran algunos de los péptidos inhibidores de la ECA identificados en hidrolizados de suero lácteo con distintas enzimas y los correspondientes valores de IC₅₀.

Tabla 1: Péptidos inhibidores de la ECA obtenidos por hidrólisis enzimática de proteínas séricas.

Péptido	Secuencia	Enzima	IC ₅₀ (µM)	Referencia
β-Lg f(78-80)	IPA	Proteinasa k	141	Abubakar <i>et al.</i> , (1998)
β-Lg f(81-83)	VFK	Tripsina	1029	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> (2000)
β-Lg f(22-25)	LAMA	Tripsina	556	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> (2000)
β-Lg (f 142–148)	ALPMHIR	Tripsina	42,6	Mullally <i>et al.</i> (1997)
β-Lg f(32-40)	LDAQSAPLR	Tripsina	635	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> (2000)
β-Lg f(103–105)	LLF	Termolisina	79,8	Hernández-Ledesma <i>et al.</i> (2002)
β-Lg f(58–61)	LKQW	Termolisina	34,7	Hernández-Ledesma <i>et al.</i> (2002)
β-Lg f(94-100)	VLDTDYK	Pepsina, tripsina, quimotripsina	946	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> (2000)
β-Lg f(106-111)	CMENSA	Pepsina, tripsina, quimotripsina	788	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> (2000)
β-Lg f(15-19)	VAGT	Pepsina, tripsina, quimotripsina	1054	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> (2000)
β-Lg f(142-146)	ALPMH	Pepsina, tripsina, quimotripsina	521	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> (2000)
β-Lg (f 102-105)	YLLF	Pepsina, tripsina, quimotripsina	172	Mullally <i>et al.</i> (1997)
β-Lg (f 46-53)	LKPTPEGN	Termolisina	>2700	Hernández-Ledesma <i>et al.</i> (2002)
β-Lg (f 122-125)	LVRT	Termolisina	2470	Hernández-Ledesma <i>et al.</i> (2002)
α-La f(50–53)	YGLF	Pepsina	733	Mullally <i>et al.</i> (1997)
α-La f(50–52)	YGL	Pepsina, tripsina, quimotripsina	409	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> (2000)
α-La f(104-108)	WLAHK	Tripsina	77	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> (2000)

α -La f(99-108)	VGINYWLAHK	Tripsina	327	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> (2000)
BSA f(221-222)	FP	Proteinasa k	315	Abubakar <i>et al.</i> (1998)
BSA f(208-216)	ALKAWSVAR	Tripsina	3	Chiba y Yoshikawa (1991)

A pesar de la amplia investigación que se ha realizado para la obtención de péptidos antihipertensivos a partir de proteínas de suero de leche, hasta la fecha los procesos diseñados han sido escasamente optimizados tanto en términos del consumo de enzima como de la búsqueda de mezclas de proteasas que permitan reducir la concentración necesaria de enzimas en la mezcla para obtener péptidos con valores de IC₅₀ adecuados. La invención que se propone consiste precisamente en el diseño de un procedimiento que, mediante la adecuada selección y proporción de dos proteasas de acción y especificidad complementaria, permite reducir la concentración de enzimas necesarias para lograr un hidrolizado que proporcione un determinado valor de IC₅₀ y porcentaje de inhibición.

5

10 Descripción de la invención

La presente solicitud se refiere a un procedimiento optimizado para obtener péptidos que inhiben la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (de aquí en adelante, ECA). El procedimiento combina de manera óptima dos proteasas para efectuar la hidrólisis del sustrato y logra una reducción de la cantidad de enzimas utilizadas para obtener los péptidos. Así, con menos concentración de enzimas se alcanzan unos resultados de inhibición de la ECA superiores.

15

Según un primer aspecto, se proporciona un procedimiento optimizado que emplea suero lácteo, como materia prima, en el que están presentes una ultrafiltración de dicho suero a fin de obtener un concentrado de suero, una hidrólisis enzimática de este concentrado de suero durante un tiempo mínimo de 30 minutos, ultrafiltración de hidrolizados proteicos y separación y obtención de péptidos inhibidores de la ECA, que comprende:

20

a. una selección y adición de una mezcla que tiene una adecuada proporción y cantidad de dos proteasas de origen microbiano y acción complementaria a dicho concentrado de suero, para la hidrólisis de éste, en la que dicha proporción de enzima/sustrato oscila entre 0,5 y 3 unidades enzimáticas/mg de proteína de concentrado de suero, con el fin de obtener péptidos con un porcentaje de inhibición de la ECA superior al 70% y un índice IC₅₀ de 30 a 100 µg/ml. El procedimiento optimizado se basa en aplicar un algoritmo matemático estadístico de diseño experimental factorial a partir de lo descrito por Akhnazarova y Kafarov (1982) que permite describir cuantitativamente el efecto que sobre la producción de péptidos antihipertensivos tienen variables del proceso como la concentración de enzimas o la relación enzima/sustrato en la mezcla de reacción y la composición de una mezcla de enzimas. Dado que el algoritmo también permite identificar las interacciones que existen entre las variables estudiadas, es posible definir de forma más exacta las condiciones operacionales que maximizan la producción de péptidos o minimizan el consumo de enzima.

25

30

De un modo operativo, la aplicación de este procedimiento se realiza obteniendo, a partir del algoritmo anterior, un modelo polinómico del tipo $Y = b_0 + b_{1X_1} + b_{2X_2} + b_{12X_2} + b_{11X_{12}} + b_{22X_{22}}$, en donde, X_n y X_{nm} representan respectivamente las variables estudiadas y sus interacciones; b_n y b_{nm} son respectivamente el peso que cada variable y su interacción tienen en el resultado final e Y es la variable objetivo (producción de péptidos, valor de la IC₅₀, gasto de enzima).

35

Según el procedimiento, el suero de leche, se somete a una ultrafiltración para obtener un concentrado de suero con un contenido en proteína de entre 55 y 65 g/l, preferiblemente, en torno a los 60 g/l, lo cual supone un factor de concentración de entre 2,5 a 3 veces. A continuación, dicho concentrado de suero es sometido a una hidrólisis enzimática.

40

En la hidrólisis se ha de tener en cuenta que la comparación de los distintos hidrolizados proteicos obtenidos se basará en el empleo del índice IC₅₀ (concentración inhibitoria 50%), que se define como la concentración (µg/ml) de péptidos necesaria para inhibir un 50% de la actividad de la ECA en el ensayo.

45

En una realización opcional, se hidroliza el concentrado de suero empleando proteasas de pureza de grado analítico, es decir con un grado de pureza como el requerido en los laboratorios de análisis, seleccionadas del siguiente grupo: termolisinas, proteinasas K, tripsinas y quimotripsinas.

Según otra opción, se hidroliza el concentrado de suero empleando proteasas de "pureza de grado técnico", es

- 5 decir, el grado de pureza que se usa habitualmente en la industria, ya que tienen la ventaja de que, en la fase de escalado, permiten abaratar enormemente los costes del procedimiento si se compara con las enzimas de elevada pureza. Estas proteasas de pureza de grado técnico se seleccionan del grupo formado por alcalasas y neutrasas. Mediante esta opción, se pueden alcanzar, en algunos casos (ensayos con alcalasa y neutrasa), porcentajes de inhibición del 80%, superiores a los obtenidos con las enzimas de elevada pureza.
- 10 Según una realización preferida, se hidroliza el concentrado de suero mediante la acción complementaria y sinérgica de las proteasas de elevada pureza y las proteasas de pureza de grado técnico, por ejemplo, mediante una de las siguientes combinaciones de proteasas: termolisina/proteinasa K, alcalasa/termolisina y termolisina/neutrasa. Para tales combinaciones, las proporciones ensayadas oscilan entre 15 y 85% de cada una de las enzimas en la mezcla. En una realización de la invención, empleando una combinación de proteasas termolisina/proteinasa K, al 50% de cada una, se obtuvo una IC₅₀ de 37 µg/ml. En otra realización, utilizando la combinación neutrasa 85% / termolisina 15%, se obtuvo una IC₅₀ de 57 µg /ml.
- 15 De esta manera, se obtienen porcentajes de inhibición elevados, superiores al 70%, en función de las condiciones ensayadas. Así, es posible (dentro de este intervalo) modificar a placer tanto la cantidad total de enzimas añadidas como la relación entre las mismas, para alcanzar un valor deseado de poder de inhibición de la ECA.
- 20 Por ello, se puede rebajar hasta 7 veces las unidades totales de actividad enzimática de las proteasas que tienen que añadirse al sistema y, al mismo tiempo, seleccionar aquéllas con un menor coste, o bien operar en unas condiciones (de temperatura, por ejemplo) más convenientes. Todo lo cual constituye una tarea de revalorización, ya que la materia prima (suero de leche) apenas tiene valor económico, y, precisamente, el coste en insumos externos y el del propio tratamiento tecnológico son los que determinan el margen de beneficio.
- 25 En relación con los hidrolizados proteicos obtenidos tras la hidrólisis enzimática, se han de tener en cuenta los siguientes hechos: por un lado, se sabe que, en general, los hidrolizados que contienen péptidos con un peso molecular inferior a 1 kDa tienen valores de IC₅₀ menores que aquellos que contienen sólo péptidos con un elevado peso molecular o que los que contienen mezclas de péptidos con un alto o bajo peso molecular y, por otro lado, es necesario eliminar las proteasas, las proteínas no hidrolizadas y, además, los péptidos de mayor tamaño producidos.
- 30 Por tanto, es necesario purificar los hidrolizados. Según una realización opcional, esta purificación se efectúa mediante membrana de ultrafiltración. El empleo de la ultrafiltración tiene demostrado que reduce mucho el valor de IC₅₀ de las mezclas de hidrolizados de muchas fuentes.
- 35 La ultrafiltración se lleva a cabo en dos pasos: inicialmente, una primera ultrafiltración en la que los hidrolizados se fraccionan empleando membranas con un corte de 10 kDa y, a continuación, el permeado obtenido se fraccionó a través de una segunda ultrafiltración, usando membranas con un corte de 1 kDa. Así, se obtiene un permeado con extractos de péptidos de 1 kDa.
- 40 Tras la ultrafiltración, se seleccionan los péptidos con una mayor actividad inhibitoria de la ECA. Para ello, se efectúa una separación mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con columnas de fase reversa. Así, por una parte, se obtienen péptidos inhibidores de mayor pureza, y por otra, los péptidos separados pueden ser secuenciados e identificados (mediante MALDI-TOF, por ejemplo).
- 45 Según un segundo aspecto se suministran péptidos inhibidores de la ECA que se obtienen aplicando el procedimiento descrito antes. Dichos péptidos inhibidores presentan un índice IC₅₀ situado entre 30 y 100 µg/ml y porcentajes de inhibición de la ECA superiores al 70%. Preferiblemente, estos péptidos se emplean en la fabricación de alimentos funcionales.
- Según un tercer aspecto de la invención, se suministra un alimento funcional que comprende péptidos que inhiben la actividad de la ECA que se obtienen mediante el procedimiento enzimático expuesto arriba, a partir de suero lácteo.
- Ejemplo de realización de la invención**
- 45 La siguiente realización sólo pretende ilustrar cómo se lleva a cabo la presente invención y de ningún modo deberá ser tenida en cuenta para definir el alcance de la invención.
- Un volumen de suero lácteo procedente de una quesería, ultrafiltrado hasta alcanzar una concentración de proteína de 60 g/l se somete a una hidrólisis enzimática con diferentes combinaciones de termolisina/proteinasa K y en diferentes proporciones enzima sustrato de acuerdo con el diseño de la tabla siguiente.

ES 2 657 366 T3

E: Concentración de enzima (unidades/ml)	R: relación termolisina/proteinasa k
172	0,85
172	0,15
51	0,85
51	0,15
197,06	0,5
25,94	0,5
111,5	0,5

5 La reacción se efectuó a 60 °C y pH = 8, en botellas Pyrex de 100 mL, cargadas con un volumen final de reacción de 32 mL, que se cerraron con tapas de rosca para evitar posibles pérdidas por evaporación y bajo agitación continua para favorecer la mezcla. Las dos proteasas se disolvieron en un tampón Tris- HCl 0,02 M-CaCl₂ 0,01 M hasta una concentración de 1 mg/mL en los momentos previos a la hidrólisis. La hidrólisis se prolongó durante un mínimo de 6 horas.

10 La aplicación de un algoritmo matemático consistente en un diseño factorial rotatable de orden 2 a los resultados de las hidrólisis en las condiciones señaladas expresados como valores de IC₅₀ permitió obtener el siguiente modelo estadísticamente significativo: $\%IC_{50} = 24,9 + 1,86E-3,38R^2$ que permite conocer para cualquier combinación de las variables R (relación de proteasas en la mezcla de reacción) y E (unidades de actividad enzimática en la mezcla de reacción) el $\%IC_{50}$ que se va obtener en la hidrólisis o, complementariamente, para un valor requerido de IC₅₀ qué valor de unidades enzimáticas se adicionan a la reacción (variable E) y qué relación de las dos proteasas podríamos utilizar (variable R).

15 Aunque en este ejemplo se utiliza la combinación termolisina/proteinasa k, se pueden utilizar también otras combinaciones, tales como, alcalasa/termolisina K, termolisina/neutrasa.

20 En las condiciones que resulten de interés, definidas de acuerdo con el modelo, se lleva a cabo una ultrafiltración de los hidrolizados obtenidos. En un primer paso, se filtra los hidrolizados a través de una membrana con un corte de 10 kDa, para obtener un primer permeado de hidrolizados con un peso molecular inferior a 10 kDa y, un en segundo paso, este primer permeado se filtra a través de una membrana con un corte de 1 kDa, para obtener un segundo permeado con un peso molecular inferior a 1 kDa y, así, eliminar las fracciones de alto peso molecular.

A continuación, se somete dicho segundo permeado a una etapa de separación mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con columnas de fase reversa para seleccionar extractos de péptidos con mayor actividad inhibitoria.

25 Los péptidos así obtenidos se pueden emplear en la fabricación de alimentos funcionales, por ejemplo, en la fabricación de productos de origen lácteo. También, en la fabricación de bebidas y refrescos.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para obtener péptidos inhibidores de la actividad de la ECA, en el que están presentes las etapas de ultrafiltración de suero lácteo para obtener un concentrado de suero, hidrólisis enzimática, ultrafiltración de hidrolizados y separación de los péptidos inhibidores, que se caracteriza por comprender:
 - 5 una selección y adición de una mezcla que tiene dos proteasas de origen microbiano y acción complementaria a dicho concentrado de suero, para la hidrólisis de éste, en la que dicha proporción de enzima/sustrato oscila entre 0,5 y 3 unidades enzimáticas/mg de proteína de suero, con el fin de obtener péptidos con un porcentaje de inhibición de la ECA superior al 70% y un índice IC₅₀ de 30 a 100 µg/ml.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la mezcla de proteasas se selecciona entre una de las siguientes combinaciones: termolisina-proteinasa k, termolisina-neutrasa y alcalasa-termolisina, para las cuales la proporción de cada una de las proteasas en la mezcla oscila entre 15 y 85%.
 3. Péptidos inhibidores de la ECA que se obtienen mediante el procedimiento definido según las reivindicaciones 1 y 2.
- 15 4. Péptidos inhibidores de la ECA según la reivindicación 3, caracterizados por que presentan un índice IC₅₀ situado entre 30 y 100 µg/ml y porcentajes de inhibición de la ECA superiores al 70%.
 5. Péptidos inhibidores de la ECA según las reivindicaciones 3 y 4, caracterizados por que se emplean en la fabricación de alimentos funcionales.
 6. Alimento funcional que comprende péptidos inhibidores de la ECA, según la reivindicación 3.