



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 282 164**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/30** (2006.01)

**C07K 2/00** (2006.01)

**C07K 14/76** (2006.01)

**A23J 1/20** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

**A23J 3/08** (2006.01)

**A23J 3/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00993921 .6**

86 Fecha de presentación : **06.12.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1339735**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **03.09.2003**

54 Título: **Método para preparar péptidos ricos en triptófano.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.10.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.10.2007**

73 Titular/es: **Campina Nederland Holding B.V.**  
**Hogeweg 9**  
**5301 LB Zaltbommel, NL**

72 Inventor/es: **Mallee, Leon, Franciscus;**  
**Caessens, Petronella, Wilhelmina, Josephina,**  
**Rosa y**  
**Boumans, Johannes, Wilhelmus, Leonardus**

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 282 164 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

Método para preparar péptidos ricos en triptófano.

5 La invención se refiere a un método para aislar de manera selectiva péptidos que contienen triptófano (Trp) de una mezcla acuosa, a los péptidos enriquecidos con triptófano obtenibles mediante el método y al uso de dichos péptidos como aditivo alimenticio y medicamento.

10 El triptófano es uno de los aminoácidos que son usados para la producción de proteínas por organismos, incluido el humano. El triptófano es uno de los aminoácidos menos destacados en los alimentos del mundo occidental; la cantidad diaria de triptófano consumida es aproximadamente 1 gramo por día.

15 El triptófano actúa indirectamente sobre el sistema nervioso central; aproximadamente el 1% del triptófano de los alimentos consumidos es convertido en el cerebro en el transmisor sináptico serotonina (Herderich y Gutsche, Food Rev Int 1997; 13: 103-35). La serotonina desempeña un papel importante en varios procesos biológicos tales como el estado de ánimo, el apetito y la percepción del dolor (Young, The clinical psychopharmacology of tryptophan. En: Nutrition and the brain. Vol. 7. Eds: Wurtman RJ, Wurtman JJ Rayen Press, Nueva York, págs 49-88). Además, la serotonina desempeña un papel esencial en el proceso del sueño (Hartmann E, Greenwald D, Tryptophan and human sleep: an analysis of 43 studies. En: Progress in tryptophan and serotonin research. Eds: Schlossberger HG, Kochen W. Walter de Gruyter & Co, Berlín, Alemania, págs. 297-304; Schneider Helmert D, Spinweber CL. Psychopharmacol 1986; 89: 1-7; Cunliffe *et al.* Eur J Clin Nutr 1998, 52: 425-30). Como, a diferencia del precursor triptófano, la serotonina no puede pasar la barrera del cerebro de la sangre, la síntesis de la serotonina en el cerebro depende del transporte de triptófano desde la sangre al sistema nervioso central (Fernstrom JD. J Nutr 1988, 118: 1417-19). La investigación en animales y en humanos ha revelado que la cantidad de triptófano en el cerebro, y con ello la producción de serotonina, depende de la cantidad de triptófano que circula en la sangre.

25 En condiciones normales, la afluencia de triptófano al cerebro no depende sólo del nivel de triptófano en la sangre. La proporción entre triptófano y los otros grandes aminoácidos neutrales (LNAA) en la sangre también es importante. Los LNAAs son definidos como leucina (Leu), valina (Val), isoleucina (Ile), tirosina (Tir), fenilalanina (Phe) y metionina (Met) (Heine, 1995, The significance of tryptophan in infant nutrition. Amino Acid, 9: 191-205). Estos LNAAs usan un mecanismo de transporte similar para pasar la barrera del cerebro de la sangre. Cuanto más elevada es la proporción triptófano/LNAAs en la sangre, más triptófano puede ser transportado al sistema nervioso central, y más serotonina es producida en el cerebro (Herderich y Gutsche, *Supra*).

35 El consumo de triptófano puro conduce a una proporción más elevada entre el triptófano y los LNAAs en la sangre, y, de este modo, induce los efectos neurológicos descritos arriba. El uso de triptófano puro en productos comerciales tales como alimentos funcionales está no obstante sometido a normas estrictas, las cuales pueden variar por país. Para cambiar la proporción mencionada arriba de manera positiva, esto se debe conseguir por lo tanto mediante cambios en la pauta de consumo alimenticio; los alimentos ricos en proteínas conducen a la reducción de dicha proporción, puesto que el triptófano es uno de los aminoácidos menos disponibles (Fernstrom y Fernstrom. Am J Clin Nutr 1995; 40 61: 312-29). Los alimentos, ricos en carbohidratos aumentan dicha proporción. Los azúcares, tales como la glucosa, aumentan la liberación de insulina por el páncreas. La insulina estimula la absorción de LNAA en el tejido muscular, por la cual la proporción entre el triptófano y LNAA en la sangre aumenta (Young, *Supra*).

45 Las proteínas en alimentos contienen en realidad demasiado poco triptófano para provocar los efectos mencionados arriba sobre el sistema nervioso central. La proteína  $\alpha$ -lactalbumina es un ingrediente de suero y es la fuente de triptófano mejor conocida en alimentos; se compone de 123 aminoácidos, siendo cuatro de los cuales residuos de triptófano. Esto es aproximadamente 6 gr. de triptófano por 100 gr. de proteína (Heine *et al.* J Nutr 1991; 121: 277-83). El catabolismo de la  $\alpha$ -lactalbumina en el intestino es no obstante lento y conduce a una absorción muy lenta del triptófano (Scanff *et al.* J Agric Food Chem 1990; 38: 1623-29). El cambio deseado (sustancial) en la proporción entre triptófano y LNAA en la sangre, y con ello los efectos positivos del triptófano sobre el sistema nervioso central no se producen. Las proteínas pueden ser fragmentadas en péptidos que se compongan de un pequeño número de aminoácidos. Los péptidos que están formados tras la fragmentación de las proteínas del suero suelen ser digeribles más rápida y fácilmente que la proteína materna (Nakano *et al.* J Japanese Soc Nutr Food Sci 1994; 47: 195-201).

55 Por los motivos de arriba, hay una necesidad en la técnica de péptidos ricos en triptófano disponibles fácilmente.

60 En el pasado, han sido desarrollados diferentes métodos para aumentar los niveles de Trp en productos proteínicos. Por ejemplo, la EP 22696 de INRA, la cual describe un método para purificar la alfa-lactalbumina; la WO 91/10441 (Medgennix) describe una composición caracterizada por el hecho de que comprende un polipéptido con un alto contenido de Trp, y arginina y/o ornitina. La WO 98/14204 (Laboratorios Oenobiol) describe usos nuevos de la alfa-lactalbumina y composiciones que la contienen, como complemento nutricional y como medicamento para la regulación del sueño y el reloj biológico.

65 No obstante, las descripciones mencionadas arriba no mencionan un método para aumentar el nivel de triptófano en productos proteínicos que no sea mediante otra purificación de una proteína intacta que ya tenga un contenido de Trp relativamente alto. Así, la única forma de la técnica de arriba para proporcionar una dosis aumentada de triptófano a sujetos es mediante la administración de una gran cantidad de alfa-lactalbumina. La desventaja de este método es que

## ES 2 282 164 T3

la proporción de Trp con respecto a LNAA todavía es demasiado baja como se menciona en la introducción. La DE 4130284 (Heine) describe la preparación de péptidos que contienen triptófano, mediante el tratamiento de la pepsina de la proteína del suero a pH 3. La  $\beta$ -lactoglobulina es resistente frente a este tratamiento y es precipitada seguidamente, mientras que la solución que queda contiene productos de degradación de la  $\alpha$ -lactalbumina. No obstante, el nivel de triptófano todavía es bajo (3'0-5'9%) y no se describe ninguna purificación específica.

La JP 2279700 (Asahi) describe niveles más altos de triptófano, pero el método usado requiere la adición de acetona en grandes cantidades después de la hidrólisis enzimática con una cantidad muy alta de pronasa. En la industria alimenticia, el uso de acetona es discutible; y la enzima usada es muy cara y, por lo tanto, menos adecuada para el uso a gran escala.

La FR-A-2.671.351 expone la separación de las diferentes proteínas del suero. Con este fin, el suero primero es concentrado, y entonces se añade un agente precipitante, y el pH es ajustado a pH 4.4 para precipitar la  $\beta$ -lactoglobulina contenida en él. Este proceso se repite a sí mismo aunque en un valor de pH diferente (3.5) para obtener la precipitación de la  $\alpha$ -lactalbumina, etcétera.

El resumen de la JP-A-2000 001500 se refiere al aislamiento de un único péptido que puede ser derivado del suero, el cual está degradado enzimáticamente con una proteasa y tratado mediante la absorción de una resina para obtener el único péptido.

La presente invención proporciona un método mejorado para péptidos que contienen triptófano aislados selectivamente de una mezcla acuosa de péptidos, que comprende los pasos de:

1. • i) dividir enzimáticamente proteínas del suero en pH ácido para producir una mezcla acuosa de péptidos;
2. • ii) inactivar la enzima;
3. • iii) ajustar el pH de la mezcla acuosa de péptidos en entre 4.0 y 6.0, formando un precipitado de péptidos que contienen triptófano, y
4. • iv) aislar los péptidos precipitados.

La presente invención también proporciona una mezcla de péptidos derivados de proteínas del suero, con un contenido de triptófano de entre el 8 y el 15% en peso sobre la base de los péptidos.

Aquí, el término "péptidos" se refiere a cadenas de aminoácidos que tengan un peso molecular de entre 500 y 5.000 Dalton. Sorprendentemente, se ha descubierto que cuando el pH de la mezcla acuosa de péptidos es controlado en entre 4.0 y 6.0, preferiblemente entre 4.5 y 6.0 y más preferiblemente alrededor de 5.0 (es decir, entre 4.7 y 5.3), los péptidos que contienen triptófano se precipitan, cuyo precipitado puede ser usado convenientemente para aislar los péptidos que contienen triptófano. En la técnica, la hidrólisis de proteínas mediante ácidos minerales para obtener mezclas peptídicas no era recomendada, puesto que estaba correlacionada con la destrucción casi completa del triptófano (ver W. Heine *et Al, Supra*). "Controlar" el pH significa que el pH debería ser ajustado o mantenido en el valor de pH descrito arriba durante la precipitación de los péptidos que contienen Trp.

El aislamiento de los péptidos precipitados puede hacerse mediante métodos que sean conocidos en la técnica. Los péptidos precipitados pueden, por ejemplo, ser recogidos por centrifugado, decantación o filtración y similares. Para obtener un tiempo de conservación largo, el aislamiento comprende preferiblemente una fase de secado. El experto en la materia es consciente de las técnicas de secado adecuadas.

Preferiblemente, la precipitación se realiza a una temperatura por debajo de 20°C. Por debajo de dicha temperatura, los péptidos que contienen triptófano han mostrado que se precipitan de manera muy eficaz.

En una forma de realización preferida, la mezcla acuosa de péptidos es preparada por división enzimática de una fuente proteínica.

Preferiblemente, la fuente proteínica es dividida en pH ácido por una o más proteasas ácidas o proteasas de la cistina, en especial por una o más enzimas, escogidas del grupo compuesto por la pepsina, la renina, las proteasas del ácido fúngico, la quimosina, la papaína, la bromelaína, la quimopapaína o la ficina o mezclas de dos o más de las mismas. Mediante la división de una fuente proteínica por una o más de dichas proteasas ácidas, en especial la pepsina con un pH entre 1.5 y 3.5, son generados preferiblemente entre 2 y 3 péptidos con una naturaleza hidrofóbica. Se descubrió que de estas mezclas peptídicas, los péptidos que contienen triptófano podían ser aislados selectivamente de manera muy eficaz mediante el control del pH en entre 4.0 y 6.0, preferiblemente en alrededor de 5.0. En el caso de que el pH en la división enzimática estuviera por debajo de 4.0, el pH tenía que ser ajustado a entre 4.0 y 6.0 para precipitar los péptidos que contienen triptófano. Preferiblemente, la actividad enzimática es calmada por inactivación de la enzima antes de la fase de la precipitación. El experto en la materia sabrá cómo inactivar la enzima proteolítica. En el caso de que una enzima sea elegida teniendo su pH óptimo dentro del intervalo de pH mencionado arriba de entre 4.5 y 6.0, tales como por ejemplo la papaína o la bromelaína, será posible diseñar el método de acuerdo con la invención de tal forma que la división de la fuente proteínica y la precipitación de los péptidos que contienen triptófano

pueda suceder de manera simultánea. Se ha de tener cuidado en que la precipitación sea hecha en condiciones en las cuales los péptidos hidrolizados se precipiten preferencialmente; de otro modo, se puede obtener un precipitado de péptidos hidrolizados parcialmente.

5 Preferiblemente, la mezcla peptídica es desalada antes de la fase de control del pH (paso a). Se ha descubierto que una fase de desalación antes de la fase de control del pH conduce a un rendimiento mejorado de los péptidos que contienen trp precipitados. La desalación es una técnica conocida y puede realizarse mediante, por ejemplo, nanofiltración, ultrafiltración o electrodiálisis. En especial cuando los péptidos son obtenidos por división enzimática, la desalación de la mezcla peptídica obtenida conduce a resultados mejorados. La desalación es llevada a cabo preferi-  
10 blemente de tal manera que entre el 50 y el 95% de la sal presente durante la reacción de división es eliminada de la mezcla peptídica.

Preferiblemente, los péptidos que contienen triptófano son derivados de proteína del suero. Esto significa que preferiblemente las proteínas del suero son elegidas como una fuente proteínica para la mezcla peptídica acuosa. Las  
15 proteínas del suero tienen un contenido de Trp relativamente alto (alrededor del 1'8% de p/p), haciendo a estas proteínas muy adecuadas para el método conforme a la presente invención. No obstante, toda las proteínas que contienen triptófano pueden ser usadas en el método conforme a la invención, aunque las proteínas ricas en Trp son preferidas. En una forma de realización muy atractiva de la invención, los péptidos que contienen triptófano son derivados del concentrado de proteínas de lactosuero (CPL) enriquecido con  $\alpha$ -lactalbumina o el aislado de proteínas de lactosuero  
20 (APL) enriquecido con  $\alpha$ -lactalbumina. Tales aislados son derivados de proteína de lactosuero y tienen un alto contenido en  $\alpha$ -lactalbumina. La  $\alpha$ -lactalbumina tiene un alto contenido en Trp de aproximadamente el 5'8% del p/p. Un aislado de proteínas del lactosuero que contenga aproximadamente el 60% del p/p de  $\alpha$ -lactalbumina puede ser obtenido de DMV International, Holanda.

25 Mediante el método de la invención, se puede obtener una mezcla peptídica con un contenido de triptófano de entre el 8 y el 15% del p/p sobre la base peptídica, que puede ser usada ventajosamente en, por ejemplo, un ingrediente alimenticio o un medicamento. Como ingrediente alimenticio, la mezcla peptídica obtenible mediante la presente invención puede, por ejemplo, ser usada como ingrediente (fuente de Trp) para completar fórmulas nutricionales recientes, tales como polvo sustituto de leche materna. Para poner los contenidos de tal mezcla nutricional  
30 en conformidad con la leche materna natural tanto como sea posible, se necesita en la fórmula una gran cantidad de péptidos que comprendan Trp. Los péptidos según la presente invención son excelentes candidatos.

Es conocido que el Trp desempeña un papel importante como precursor en la síntesis de los neurotransmisores serotonina y triptamina así como para la vitamina ácido nicotínico y la melatonina. Puesto que la falta de consumo  
35 de triptófano conduce a serios problemas en la síntesis de los compuestos vitales mencionados arriba, los péptidos conforme a la presente invención pueden ser usados ventajosamente en un medicamento humano o veterinario para inducir la síntesis de serotonina, triptamina, ácido nicotínico o melatonina.

Además, se cree que los péptidos que contienen Trp son útiles en el tratamiento del cáncer (ver, por ejemplo, Panzer  
40 y Viljoen, 1997, J. Pineal Res 22: 184-202; Bubenik *et al*, 1998, Biological Signals and Receptors 7: 195-219; Blask *et al*, 1999, Biological Signals and Receptors 8: 4955). Por lo tanto, la mezcla peptídica según la invención puede ser usada como ingrediente activo en un medicamento contra el crecimiento de células malignas.

Con el método de la presente invención, se puede obtener una mezcla peptídica, que tenga una proporción de  
45 Trp/(Phe+Tir) de al menos 0'900 sobre la base del peso. Puesto que la fenilalanina (Phe) y la tirosina (Tir) a menudo compiten con el Trp en la absorción por las células (Heine, *Supra*), es muy ventajoso tener una proporción de Trp/(Phe+Tir) tan elevada como sea posible, puesto que la Phe y la Tir no son limitativas en la nutrición. Es conocido que para una administración eficaz de triptófano, la proporción de triptófano en grandes aminoácidos neutros debería ser tan grande como sea posible, puesto que estos grandes aminoácidos neutros (LNAA) compiten con el Trp en la  
50 absorción por las células en el cuerpo humano y animal (ver arriba). Por lo tanto, los LNAA inhiben la absorción adecuada de Trp.

En otra forma de realización preferida, la mezcla de péptidos según la invención tiene en consecuencia una proporción de Trp/Phe+Tir+Leu+Val+Ile+Met de al menos 0'25 sobre la base del peso, resultando la mezcla peptídica  
55 muy adecuada para el uso como ingrediente alimenticio o medicamento. Debido al contenido de LNAA muy bajo, el triptófano puede ser absorbido fácilmente por el cuerpo humano o animal al cual sea administrado.

Los péptidos que contienen triptófano pueden ser identificados en una mezcla peptídica acuosa y cuantificados diluyendo la mezcla peptídica en una solución que contenga acetonitrilo y ácido trifluoroacético, separando los péptidos  
60 en fracciones, y midiendo la absorción de luz específica de los péptidos y la fluorescencia específica del triptófano sobre cada fracción.

La identificación de péptidos que contienen triptófano es importante para controlar el método de preparación mencionado arriba y para poder proporcionar un control de calidad del contenido de triptófano de una mezcla peptídica.  
65 El método de identificación se basa en el hecho que el triptófano ejerce una fluorescencia específica, la cual no se observa con otros aminoácidos (ver Heine, *Supra*). Una combinación de medición de la fluorescencia para establecer el contenido de triptófano con una medición específica de péptidos mediante mediciones de la absorción de la luz ultravioleta es un modo muy conveniente de obtener toda la información que se necesita para establecer tanto el con-

## ES 2 282 164 T3

tenido proteínico (basado en la absorción) como el contenido de triptófano (basado en los datos de la fluorescencia) de las fracciones. Para el fraccionamiento de los péptidos, la mezcla de péptidos es diluida preferiblemente en una solución de entre el 0'5 y el 2% del v/v de acetonitrilo y entre el 0'05 y el 0'25% del p/p de ácido trifluoroacético. En tal solución, los péptidos pueden ser separados fácilmente por cromatografía en columna, preferiblemente en una columna de fase reversa. Para esto, la solución contiene preferiblemente un 1% del v/v de acetonitrilo y el 0'1% del p/p de ácido trifluoroacético.

La absorción de luz específica de los péptidos es medida en una longitud de onda de 214 nm. La invención ahora se ilustrará más mediante algunos ejemplos no limitativos.

### Ejemplo 1

Un 5% de la solución de proteínas de lactosuero que contiene un 45% de  $\alpha$ -lactalbumina (DMV International, Holanda) es disuelto en agua desmineralizada. El pH es ajustado en 2'0 usando 1M de ácido clorhídrico. Después de esto, la solución se calienta a 50°C.

La reacción hidrolítica es comenzada añadiendo el 1% de pepsina. Después de seis horas, la reacción es detenida aumentando el pH a 5.0 y bajando la temperatura a 10°C. Después de un almacenamiento de cuatro horas a esta temperatura, los péptidos de triptófano son recogidos por centrifugado y posteriormente son secados por congelación.

El triptófano es determinado usando una técnica específica basada en la hidrólisis enzimática total (García, S.E.; Baxter, J.H. (1992) Determination of tryptophan content in infant formulas and medical nutrition. J. AOAC Int. 75:1112-1119). Los aminoácidos fenilalanina, tirosina, leucina, isoleucina, valina y metionina son determinados según la directiva CE 98/64 (3-9-1998; publicación L257/14-23 de 19-9-1998). La proteína es determinada usando el método estándar Kjeldahl (IDF-FIL 20A, 1986). El producto resultante contiene un 9'7% de triptófano en proteína.

Las proporciones importantes calculadas de Trp/LNAA están enumeradas en la tabla 1.

TABLA 1

*Porcentajes de aminoácidos en  $\alpha$ -lactosuero y productos preparados a partir de aquí*

### Proporciones de aminoácidos (basadas en valores del producto en g/100 g)

	Trp/(Phe+Tir)	Trp/(Phe+Tir+Leu+Val+Ile+Met)
$\alpha$ -lactalbumina purificada (Sigma)	0'45	0'195
Solución de proteínas de lactosuero	0'47	0'11
Péptidos de triptófano	0'97	0'32

### Ejemplo 2

Un aislado de proteínas de lactosuero (APL), que contiene el 60% de  $\alpha$ -lactalbumina (producto experimental de DMV International, Holanda), es disuelto en una solución acuosa. El pH de la solución es ajustado usando ácido fosfórico diluido y calentado a 45°C.

La hidrólisis es comenzada añadiendo el 2% de pepsina (Merck, 2.500 FIP-U/g) y realizada durante dos horas. La reacción es detenida pasteurizando la solución a 85°C durante diez minutos. Después de esto, el pH es aumentado a 5.5 y la solución es enfriada a < 15°C. Después de diez horas, los péptidos que contienen triptófano son recogidos usando microfiltración. Normalmente, se usa una membrana que tenga un corte de peso molecular nominal de 1  $\mu$ m. Después de esto, los péptidos son secados por pulverización. El producto resultante contiene el 9'3% de triptófano en proteína.

### Ejemplo 3

Una solución de proteínas de lactosuero similar al ejemplo 1, fue hidrolizada con pepsina (American Laboratories) usando el 025% y el 075% de E/S. Después de cinco horas, la reacción fue detenida aumentando el pH a 5.2 usando 1'0 M de NaOH y enfriando la solución a < 15°C.

Los péptidos precipitados fueron recogidos después de dieciséis horas por centrifugado. Los análisis pertinentes fueron realizados sobre ambos péptidos ricos en triptófano precipitados y el sobrenadante. Éstos son dados en la tabla abajo.

**Tabla 2: Concentración de triptófano y proporción Trp/LNAA de ambas fracciones, precipitado y sobrenadante, después del centrifugado.**

	0'25% de E/S		0'75% de E/S	
	granulado	sobrenadante	granulado	sobrenadante
Resultado (%)	12'1	87'9	11'4	88'6
Contenido proteínico (%)	74'3	71'6	72'6	74'3
Contenido de Trp (g/kg)	70'6	24'9	70'5	23'7
Trp / Proteína	10'5	3'4	10'7	3'1
Trp / (Phe +Tir)	1'26	0'42	1'26	0'40
Trp / (Phe+Tir+Leu+Val+Ile+Met)	0'35	0'10	0'35	0'10

#### Ejemplo 4

Un 10% de solución de proteína de lactosuero que contenga el 45% de  $\alpha$ -Lactalbumina (DMV International, Holanda) es disuelto en agua desmineralizada. El pH es ajustado en 7.0 usando 1M de hidróxido sódico. Después de esto, la solución se calienta a 50°C.

La reacción hidrolítica es comenzada añadiendo el 2% de Bromelaína 240 de ENZECO (Enzyme Development Corporation). Después de veintidós horas, la reacción es detenida calentando la solución a 85°C durante diez minutos. Entonces, la mezcla peptídica es enfriada a temperatura ambiente, el pH ajustado a 4.5 usando ácido fosfórico y la temperatura es bajada a 10°C. Después del almacenamiento durante doce horas a esta temperatura, los péptidos de triptófano son recogidos por centrifugado y seguidamente secados por congelación.

La concentración resultante de triptófano de los péptidos fue el 8%.

#### Ejemplo 5

Son preparados 100 l. de una solución de aislado de proteína de lactosuero (Davisco) y, luego, son hidrolizados usando el 2% de pepsina. La solución fue hidrolizada durante doce horas a pH 3.0. La reacción fue detenida calentando la solución a 80°C durante treinta minutos. Después de esto, la solución fue ultrafiltrada en una unidad de piloto NF usando membrana Celgard NF-PES-10. El pH del retenido fue controlado a 3.0 y la solución filtrada hasta el 200% de diafiltración.

Después de la desalación, el pH del retenido fue ajustado a 5.5 y la solución es enfriada a < 10°C para facilitar la precipitación de los péptidos que contienen triptófano. Después de diez horas de almacenamiento, el precipitado fue recogido usando centrifugado. Después de esto, los péptidos fueron secados.

El triptófano y la concentración de proteína en la muestra eran 9'5% y 91%, respectivamente. La composición de los péptidos es enumerada en la tabla de abajo.

**Tabla 3: Porcentajes de aminoácidos de fracción de péptidos ricos en triptófano**

	Porcentajes de aminoácidos (basados en valores del producto en g/100g)	
	Trp/(Phe+Tir)	Trp/(Phe+Tir+Leu+Val+Ile+Met)
Solución de proteínas de lactosuero	0'47	0'11
Péptidos de triptófano	1'03	0'35

## ES 2 282 164 T3

### Ejemplo 6

#### HPLC específico para péptidos de triptófano

5 Un método de HPLC de fase inversa (RPC) fue establecido para identificar y cuantificar los péptidos con contenido en triptófano en una mezcla de péptidos, haciendo uso de las propiedades fluorescentes específicas de este aminoácido. Una solución fue preparada de una mezcla de péptidos en tampón de unión. Estas soluciones fueron filtradas usando un filtro de 0'2  $\mu\text{M}$  y luego son analizadas por cromatografía en fase inversa. Se usó una columna de RPC C18 de poro ancho de 5  $\mu\text{m}$  (Baker). El tampón de unión se componía de agua desmineralizada/0'1% de TFA (ácido trifluoroacético) y los péptidos fueron eluidos usando un tampón de acetonitrilo/ de 0'083% de TFA (tampón B).  
10 El nivel del tampón B fue aumentado al 60% en noventa minutos, después de lo cual fue retirado material unido estrechamente aplicando el 100% del tampón durante veinte minutos.

15 Los péptidos son detectados midiendo la absorción a 214 nm. y la fluorescencia (excitación y longitudes de onda de emisión de respectivamente 290 nm. y 340 nm.).

La mezcla peptídica después de la hidrólisis y los péptidos precipitados del ejemplo 1 son enumerados en la figura 1 y 2.

20 Figura 1 muestra la absorción en la señal OD de 214 nm. (panel superior) y la señal de fluorescencia (panel inferior) de la mezcla peptídica del ejemplo 1.

Figura 2 muestra la absorción en la señal OD de 214 nm. (panel superior) y la señal de fluorescencia (panel inferior) de la fracción peptídica rica en triptófano del ejemplo 1.

### 25 Ejemplo 7

Los péptidos pueden ser usados en fórmula lactante. Una receta modelo es como sigue:

30

Componente	Concentración (g/l)
Péptidos ricos en triptófano	10'0
35 Esprion 580 (DMV International)	10'0
Lactosa comestible (DMV International)	30'0
40 Maltodextrina DE-20	23'0
Sólidos de sirope de maíz	25'0
Emulsionante (Sternphil E60; Popel)	5'0
45 Mezcla de aceites (45% de girasol; 25% de MCT; 30% aceite de soja)	40'00
Ortofosfato de calcio	1'8
50 Carbonato cálcico	1'3
Cloruro de magnesio	0'3
55 Cloruro de potasio	0'4
Citrato trisódico	0'5
60 Agua	852'7
Total 1000	1.000

65 El emulsionante es disuelto en la fracción de aceite. Los péptidos y carbohidratos son disueltos en parte del agua de 70°C. Los minerales son disueltos por separado. La mezcla de aceites es añadida entonces a la solución de péptidos/carbohidratos y mezclada usando un mezclador de alta cizalla durante tres minutos.

## ES 2 282 164 T3

La preemulsión es entonces homogeneizada dos veces a 250 barías. La fórmula puede ser pasteurizada por calentamiento a 80°C durante quince minutos y secada por pulverización (fórmula en polvo), o esterilizada en botellas a 120°C durante diez minutos (fórmula líquida).

### 5 Ejemplo 8

Los péptidos pueden ser incorporados en una mezcla de bebida instantánea. La receta contiene:

10	<b>Péptidos ricos en triptófano</b>	<b>15'0%</b>
	<b>Concentrado de proteínas de lactosuero</b>	<b>60'0%</b>
15	<b>80 (Esprion 580; DMV International)</b>	
	<b>Péptidos de glutamina (WGE80GPU;</b>	<b>10'0%</b>
	<b>DMV International)</b>	
20	<b>Glucodry (sólidos de jarabe de maíz de</b>	<b>5'0%</b>
	<b>Avebe)</b>	
	<b>Mezcla de vitaminas (Roche)</b>	<b>4'90%</b>
25	<b>Polvo de cacao (D-11-S, cacao ADM,</b>	<b>3'00%</b>
	<b>Holanda)</b>	
30	<b>Sabor; vainilla JSH00712F,</b>	<b>1'15%</b>
	<b>McCormick&amp;Co.</b>	
	<b>Sabor; dulce de chocolate FF22034,</b>	<b>0'95%</b>
35	<b>McCormick&amp;Co.</b>	
	<b>Edulcorante (aspartamo, Nutrasweet)</b>	<b>0'20%</b>
40	<hr/> <b>Total</b>	<hr/> <b>100%</b>

Los ingredientes secos son mezclados y luego añadidos a 118 ml. de agua. La solución es mezclada de modo que los componentes se disuelven. Un servido contiene 35 g. de mezcla de polvo que proporciona aproximadamente 525 mg. de triptófano.

50

55

60

65

## ES 2 282 164 T3

### REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de producción de péptidos que contienen triptófano con un peso molecular entre 500 y 5.000 Da, comprendiendo los pasos de:
- i) división enzimática de proteínas de lactosuero en pH ácido para producir una mezcla peptídica acuosa;
  - ii) inactivación de la enzima;
  - 10 iii) ajuste del pH de la mezcla peptídica acuosa a entre 4.0 y 6.0, formando un precipitado de péptidos que contienen triptófano, y
  - iv) aislamiento de los péptidos precipitados.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, donde el paso iii) es llevado a cabo a una temperatura por debajo de 20°C.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, donde las proteínas de lactosuero son divididas por una o más proteasas ácidas o proteasas de cisteína.
- 20 4. Método según la reivindicación 3, donde las proteínas de lactosuero son divididas por unas o más proteasas elegidas de la pepsina, la papaína y la bromelaína.
5. Método según la reivindicación 4, donde las proteínas de lactosuero son divididas por la pepsina a un pH de entre 1.5 y 3.5, preferiblemente entre 2 y 3.
- 25 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la mezcla peptídica acuosa es desalada antes del paso iii).
- 30 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las proteínas de lactosuero comprenden proteína de lactosuero enriquecido con  $\alpha$ -lactalbumina.
8. Mezcla de péptidos enriquecidos con triptófano derivados de proteínas de lactosuero, que comprende péptidos que contienen triptófano con un peso molecular entre 500 y 5.000 Da, teniendo la mezcla de péptidos un contenido de triptófano de entre el 8 y el 15% en peso sobre la base de péptidos.
- 35 9. Mezcla de péptidos según la reivindicación 8, con un porcentaje de Trp/(Phe+Tir) de al menos 0'900 sobre la base del peso.
- 40 10. Mezcla de péptidos según la reivindicación 8 ó 9, con un porcentaje de Trp/(Phe+Tir+Leu+Val+Ile+Met) de al menos 0'300 sobre la base del peso.
11. Mezcla de péptidos según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 para el uso como ingrediente alimenticio.
- 45 12. Mezcla de péptidos según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 para el uso como ingrediente activo en un medicamento.
13. Mezcla de péptidos según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 para el uso en un medicamento humano o veterinario como ingrediente activo para inducir la síntesis de serotonina, triptamina, ácido nicotínico o melatonina.
- 50 14. Mezcla de péptidos según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 para el uso como ingrediente activo en un medicamento contra el crecimiento de células malignas.
15. Producto alimenticio que comprende la mezcla de péptidos según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10.

55

60

65

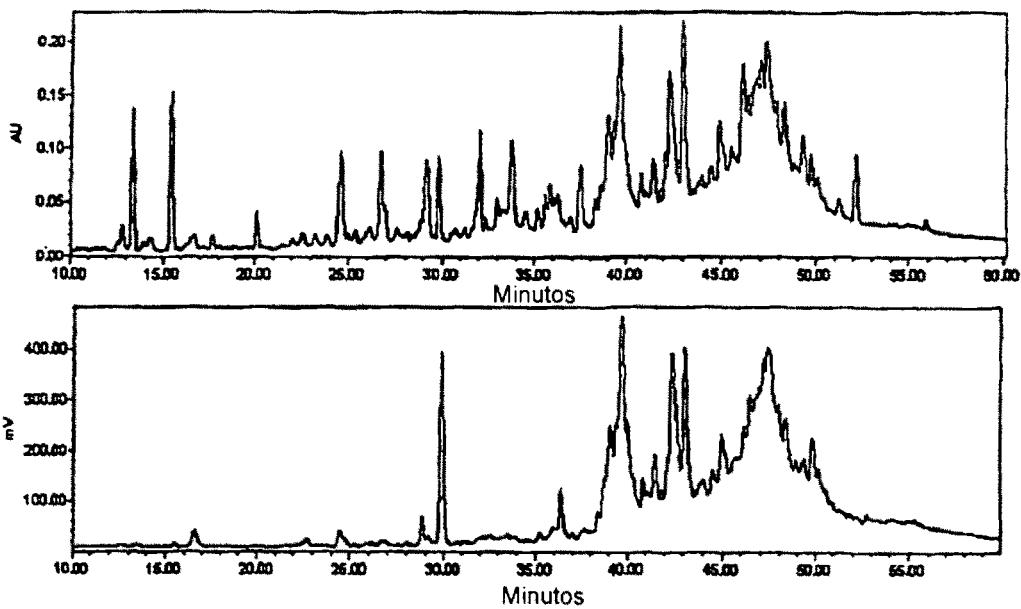


Figura 1

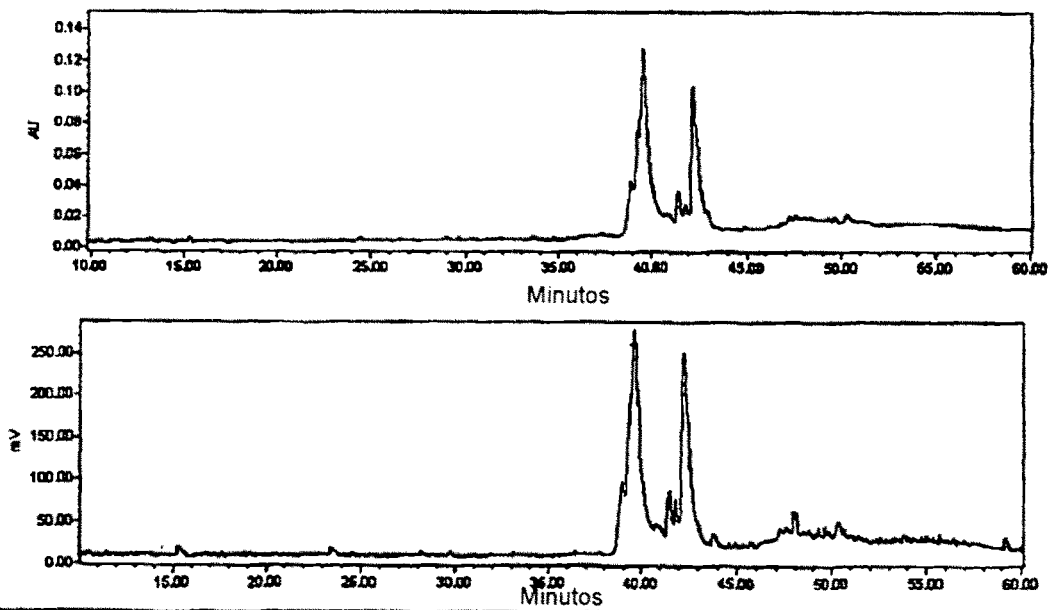


Figura 2