



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 789**

51 Int. Cl.:
A23J 3/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **01970375 .0**
96 Fecha de presentación : **11.09.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1317186**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.06.2003**

54 Título: **Hidrolizado proteico de suero bioactivo mejorado.**

30 Prioridad: **11.09.2000 NZ 506866**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.05.2011

73 Titular/es: **NEW ZEALAND DAIRY BOARD**
Pastoral House 25 The Terrace
Wellington 1, NZ

72 Inventor/es: **Schlothauer, Ralf-Christian;**
Schollum, Linda, May;
Reid, Julian, Robert;
Harvey, Stephanie, Adele;
Carr, Alistair y
Fanshawe, Rachel, Lois

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 359 789 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

Hidrolizado proteico de suero bioactivo mejorado

ÁREA TÉCNICA

5 [0001] Esta invención se refiere a un proceso para producir productos mejorados de proteína de suero lácteo hidrolizada que carecen de sabor amargo y que contienen péptidos bioactivos. Los productos del proceso tienen elevada digestibilidad y buenas propiedades organolépticas. Los productos tienen un sabor insípido y carecen de gusto a jabón o a caldo. Los productos mejorados de proteína de suero lácteo hidrolizada son fuentes útiles de péptidos bioactivos para la incorporación en alimentos funcionales.

ESTADO DE LA TÉCNICA

10 [0002] Una cantidad de ingredientes alimentarios y productos alimentarios fueron producidos a partir de la hidrólisis de una fuente de proteínas como las proteínas de la leche, la caseína y las proteínas del suero lácteo. [0003] Los productos alimentarios de proteína hidrolizada pueden presentar ventajas respecto a los productos alimentarios de proteína no hidrolizada en una serie de áreas del cuidado de la salud. Por ejemplo, se sabe que las proteínas hidrolizadas enzimáticamente son menos alergénicas. También se digieren y se absorben más rápidamente que las proteínas enteras. Los productos alimentarios que contienen proteínas hidrolizadas también son útiles en la alimentación de pacientes hospitalizados por ejemplo con enfermedades digestivas.

15 [0004] Se sabe que la hidrólisis de las proteínas del suero y las caseínas libera péptidos bioactivos que pueden tener una serie de efectos fisiológicos (Maubois et al, 1991; EP 4745506). Varias publicaciones describen dichos péptidos bioactivos, por ejemplo, se liberaron péptidos que inhiben la ECA, que tienen propiedades antihipertensivas, mediante un tratamiento enzimático de β -lactoglobulina y concentrados de proteínas de suero lácteo (Mullally et al, 1997). Los péptidos inhibidores de la ECA también se encuentran en la leche cortada y en hidrolizados de α_s y β caseína (JP 4282400; Nakamura et al 1994, Yamamoto 1997).

20 [0005] EP 4745506 divulga la hidrólisis de la proteína de la leche lactoferrina en suero para liberar lactoferrina que actúa como antimicrobiano útil para el tratamiento de la diarrea, el pie de atleta, las infecciones oculares, la mastitis, etc. en humanos y animales

25 [0006] No obstante, se sabe que la hidrólisis de la mayoría de las proteínas de los alimentos, especialmente la hidrólisis de los productos que contienen suero y caseína genera sabor amargo. Esto causa problemas de palatabilidad particularmente al intentar formular productos para ingerir oralmente que incorporan hidrolizados de proteínas lácteas como fuente de péptidos bioactivos

30 [0007] En el campo de la hidrólisis de proteínas se usan comúnmente uno o dos métodos para controlar o eliminar el sabor amargo en los hidrolizados de proteínas a fin de aumentar la palatabilidad de los productos.

35 [0008] Se sabe que una hidrólisis extensa del sustrato proteico reduce el sabor amargo en los hidrolizados de proteínas lácteas (EP 065663; EP 0117047; US 3970520). Así se producen de manera relativamente fácil y económica productos menos amargos. Sin embargo, la hidrólisis extensa reduce las longitudes de las cadenas de todos los péptidos, inclusive los péptidos bioactivos de interés. La hidrólisis extensa del sustrato proteico destruye la actividad funcional y biológica del péptido de interés. Además a menudo se desarrollan gustos desabridos a jabón y a caldo, con la consecuencia de que la palatabilidad del producto final sigue siendo baja en comparación con el sustrato proteico insípido original. Una desventaja final es que para algunos hidrolizados el sabor amargo solo es eliminado parcialmente (Roy 1992 y 1997).

40 [0009] Un segundo método común para el control del sabor amargo en los hidrolizados de proteínas es usar enzimas de desamargado, en particular las provenientes de *Aspergillus oryzae*.

45 [0010] Se cree que la generación de "sabor amargo" en los hidrolizados de proteínas se debe a la presencia de péptidos "amargos" hidrófobos grandes. Las enzimas de desamargado hidrolizan selectivamente los péptidos amargos presentes en los hidrolizados de proteínas. Un experto en el tema puede, mediante la selección juiciosa de las enzimas de desamargado y las condiciones de tratamiento, desamargar eficazmente hidrolizados de proteínas lácteas dejando intactos los péptidos bioactivos particulares de interés. Sin embargo, el uso de enzimas de desamargado hace que el proceso sea más costoso y que la conservación de algunos de los péptidos bioactivos no se logre fácilmente o satisfactoriamente. Otra desventaja es que los tratamientos con enzimas de desamargado tienen la tendencia a liberar aminoácidos libres en el producto final y, como consecuencia, los hidrolizados desarrollan un desagradable gusto a caldo o a jabón.

50 [0011] Los diversos métodos de desamargado de los hidrolizados de proteínas crean pasos adicionales en el proceso y agregan costos a la fabricación del producto final. Además el producto final también pierde el equilibrio en cuanto al suministro de aminoácidos libres.

55 [0012] Sería más ventajoso si se pudiera desarrollar un proceso para hidrolizar proteínas que liberara péptidos bioactivos de interés y limitara la formación de péptidos amargos y aminoácidos libres, permitiendo de esta manera retener el sabor insípido de los sustratos que contienen proteínas lácteas.

[0013] Algunos péptidos bioactivos, en particular los péptidos antihipertensivos, son relativamente estables durante la hidrólisis de las proteínas y se liberan muy precozmente durante la hidrólisis del sustrato que contiene proteínas lácteas como se muestra en la figura 1

5 .[0014] Los sabores amargos de los hidrolizados de proteínas lácteas se pueden mejorar agregando azúcares o hidrolizando azúcares naturales, como lactosa, que ya están presentes en el sustrato que contiene proteínas lácteas (Bernal y Jelen, 1989). Por ejemplo los sueros ácidos y los sueros de quesos se tornan más sabrosos cuando han sido edulcorados mediante hidrólisis de lactosa con β -galactosidasa y lactasa (FR 2309154; US 4358464; JP 8056568).

[0015] Para lograr una gran aceptación del sabor para un producto de proteína hidrolizada que contiene péptidos bioactivos, es necesario un preciso control de la hidrólisis para evitar que se produzca un sabor amargo

10 .[0016] Un método común de finalización de la hidrólisis es mediante la desactivación de las enzimas, generalmente mediante desactivación térmica a temperaturas elevadas, típicamente > 90 - 100°C durante un período prolongado. Sin embargo, este método no puede ser utilizado para detener la hidrólisis de las proteínas del suero puesto que todas las proteínas del suero intactas, sin hidrolizar, que permanecen en la mezcla se desnaturalizarían y precipitarían haciendo el producto final menos soluble y menos aceptable para el uso como un ingrediente alimentario.

15 [0017] Dicho problema fue resuelto en WO 99/65326 que da a conocer un proceso de hidrólisis suave de suero dulce o concentrado de proteína de suero dulce (WPC, por sus siglas en inglés) para producir hidrolizados que contienen péptidos bioactivos con una o más de las propiedades siguientes:

- actividad antihipertensiva ECA-I
- actividad de promoción de la proliferación de bifidus
- 20 • sabor no pegajoso, no amargo
- sabor agradable a ligeramente dulce
- buenas propiedades organolépticas.

25 [0018] La presente invención usa un sustrato que contiene proteína de suero diferente al utilizado en WO 99/65326 aunque se utiliza un proceso de hidrólisis semejante. Sorprendentemente, el uso de este sustrato diferente da lugar a un hidrolizado que muestra mejorías impresionantes en las propiedades mencionadas antes de los hidrolizados de suero, particularmente en la actividad antihipertensiva ECA-I, el sabor y la funcionalidad del producto.

[0019] En términos generales la presente invención apunta al proceso de hidrólisis de un sustrato diferente que contiene proteína de suero y al nuevo hidrolizado producido mediante ese proceso.

RESUMEN DE LA INVENCÓN

30 [0020] La presente invención proporciona un proceso para preparar un hidrolizado de proteína de suero mejorado que contiene péptidos bioactivos, que comprende hidrolizar un aislado de proteína de suero (WPI, por sus siglas en inglés) con una o más enzimas, **caracterizado porque:**

i) la enzima es una proteasa termolábil;

35 ii) la hidrólisis se lleva a cabo a una temperatura entre aproximadamente 30°C y 65°C a un pH entre aproximadamente 3.5 y aproximadamente 9.0 cuando dicha enzima es una proteasa neutra, a un pH entre aproximadamente 2.5 y aproximadamente 6.0 cuando dicha enzima es una proteasa ácida;

iii) la hidrólisis se finaliza cuando se alcanza un grado de hidrólisis que no es superior a aproximadamente 10%; y

40 iv) la hidrólisis se finaliza desactivando dichas una o más enzimas en condiciones que evitan la desnaturalización sustancial de los péptidos o las proteínas residuales en dicho hidrolizado, donde dichas condiciones de desactivación se seleccionan del grupo que consiste en; desactivación por calor que comprende calentar dicho hidrolizado hasta diez segundos a una temperatura de hasta aproximadamente 100°C ;

45 o cuando dicha hidrólisis se lleva a cabo a una temperatura por debajo de aproximadamente 65°C , dicho paso de desactivación por calor se lleva a cabo entre aproximadamente 65°C y aproximadamente 70°C durante entre aproximadamente 10 segundos y aproximadamente 15 minutos; o cuando dicha hidrólisis se lleva a cabo a una temperatura por debajo de aproximadamente 60°C , dicha desactivación por calor se lleva a cabo entre aproximadamente 60°C y aproximadamente 65°C durante entre aproximadamente 10 segundos y aproximadamente 30 minutos; llevando el pH de dicho sustrato que contiene proteína de suero a un pH al cual dicha proteasa no es activa; o sometiendo dicho hidrolizado a ultrafiltración con una membrana de ultrafiltración con un corte de peso molecular nominal en el rango de aproximadamente 10-500 kDa, donde el producto del proceso es altamente soluble.

- [0021] Mediante WPI se quiere dar a entender un aislado de proteína de suero producido mediante cualquier método conocido en el área. Preferentemente el WPI es producido por un método de intercambio iónico a partir de un concentrado de proteína de suero, como un queso, un concentrado de proteína de suero ácido o lácteo, como podrá apreciar un experto en el tema.
- 5 [0022] Mediante termolábil se quiere dar a entender que la enzima es susceptible a la desactivación irreversible a temperaturas relativamente moderadas como podrá apreciar un experto en el tema.
- [0023] Preferentemente la enzima se selecciona del grupo que consiste en proteasa P6, proteasa A, proteasa M, peptidasa, neutrasa, validasa, AFP 2000, y cualquier otra proteasa termolábil.
- 10 [0024] El paso de hidrólisis enzimática se puede llevar a cabo en las condiciones que sean adecuadas para la enzima particular utilizada como comprenderá un experto en el tema.
- [0025] Preferentemente, dicha membrana de ultrafiltración tendrá un corte de peso molecular nominal en el rango de aproximadamente 10-200 kDa.
- [0026] De manera ventajosa, dicha enzima es inmovilizada sobre un soporte inerte durante dicho paso de hidrólisis ii).
- 15 [0027] De manera conveniente, el soporte inerte es un polímero funcional a base de metacrilato, partículas de carragenina, partículas de quitosana o cualquier otro material de soporte inerte adecuado.
- [0028] Preferentemente, el grado de hidrólisis es entre aproximadamente 3% y aproximadamente 10%.
- [0029] De manera ventajosa, el grado de hidrólisis es entre aproximadamente 3% y aproximadamente 5%.
- 20 [0030] De manera conveniente, el hidrolizado de proteína de suero producido de esta manera comprende uno o más péptidos bioactivos seleccionados del grupo que consiste en SAP (SEC. ID N°: 1), VSLPEW (SEC. ID N°: 5), INYWL (SEC. ID N°: 6), LKPTPEGDLEIL (SEC. ID N°: 7) y LKGYGGVSLPEW (SEC. ID N°: 8).
- 25 [0031] Preferentemente, el hidrolizado de proteína de suero preparado de esta manera contiene al menos un péptido bioactivo seleccionado del grupo que consiste en LIVTQ (SEC. ID N°: 4), MKG (SEC. ID N°: 2) y ALPMH (SEC. ID N°: 3), en combinación con al menos un péptido bioactivo seleccionado del grupo que comprende SAP (SEC. ID N°: 1), VSLPEW (SEC. ID N°: 5), INYWL (SEC. ID N°: 6), LKPTPEGDLEIL (SEC. ID N°: 7) y LKGYGGVSLPEW (SEC. ID N°: 8).
- [0032] La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que contiene al menos un péptido bioactivo seleccionado del grupo que consiste en SAP (SEC. ID N°: 1), VSLPEW (SEC. ID N°: 5), INYWL (SEC. ID N°: 6), LKPTPEGDLEIL (SEC. ID N°: 7) y LKGYGGVSLPEW (SEC. ID N°: 8) en combinación con el péptido bioactivo MKG (SEC. ID N°: 2) junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable
- 30 [0033] Además, la invención proporciona un producto WPI hidrolizado, altamente soluble, que no es amargo, que contiene péptidos bioactivos, preparado mediante el proceso de la reivindicación 8 o 9.
- [0034] De manera ventajosa, el grado de hidrólisis del WPI es entre aproximadamente 3% y aproximadamente 5%.
- [0035] De manera conveniente, el tamaño principal de partícula de las proteínas de suero en el producto es menor de aproximadamente 30 micrómetros.
- 35 [0036] Preferentemente, el tamaño principal de partícula es menor de aproximadamente 3 micrómetros.
- [0037] De manera ventajosa, el producto es transparente o blanco en solución.
- [0038] De manera conveniente, uno o más de dichos péptidos bioactivos se seleccionan del grupo que consiste en SAP (SEC. ID N°: 1), VSLPEW (SEC. ID N°: 5), INYWL (SEC. ID N°: 6), LKPTPEGDLEIL (SEC. ID N°: 7) y LKGYGGVSLPEW (SEC. ID N°: 8).
- 40 [0039] Preferentemente, al menos un péptido bioactivo seleccionado del grupo que consiste en LIVTQ (SEC. ID N°: 4), MKG (SEC. ID N°: 2) y ALPMH (SEC. ID N°: 3), en combinación con al menos un péptido bioactivo seleccionado del grupo que comprende SAP (SEC. ID N°: 1), VSLPEW (SEC. ID N°: 5), INYWL (SEC. ID N°: 6), LKPTPEGDLEIL (SEC. ID N°: 7) y LKGYGGVSLPEW (SEC. ID N°: 8).
- 45 [0040] La invención también proporciona un producto alimentario que contiene un producto hidrolizado de WPI de acuerdo con la invención.
- [0041] También se proporciona el uso de un producto preparado según la invención, en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir la hipertensión en un paciente que lo necesita.
- [0042] Además, la invención proporciona una composición farmacéutica que contiene el producto de la invención junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 0043]** Además, la invención proporciona un hidrolizado que comprende uno o más péptidos seleccionados entre SAP (SEC. ID N°: 1), VSLPEW (SEC. ID N°: 5), INYWL (SEC. ID N°: 6), LKPTPEGDLEIL (SEC. ID N°: 7) y LKGYGGVSLPEW (SEC. ID N°: 8).
- 5 **[0044]** Además, la invención proporciona un hidrolizado que comprende una mezcla de al menos un primer péptido y al menos un segundo péptido, donde el primer péptido se selecciona del grupo que consiste en LIVTQ (SEC. ID N°:4), MKG (SEC. ID N°: 2) y ALPMH (SEC. ID N°: 3), y donde el segundo péptido se selecciona del grupo
- [0045]** que comprende SAP (SEC. ID N°: 1), VSLPEW (SEC. ID N°: 5), INYWL (SEC. ID N°:6), LKPTPEGDLEIL (SEC. ID N°: 7) y LKGYGGVSLPEW (SEC. ID N°: 8).
- 10 **[0046]** La invención también proporciona una composición farmacéutica que contiene el hidrolizado de acuerdo con la invención junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- [0047]** Asimismo la invención proporciona el uso del hidrolizado de la invención para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir la hipertensión en un paciente que necesita dicho tratamiento.
- [0048]** La invención comprende además el paso de combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica.
- 15 **[0049]** El producto WPI hidrolizado de la invención tiene una o más de las características siguientes:
- actividad antihipertensiva ECA-I
 - actividad promotora de la proliferación probiótica
 - sabor no pegajoso, no amargo
 - sabor agradable a ligeramente dulce
- 20
- buenas propiedades organolépticas
 - elevada solubilidad
 - muy buenas propiedades de espumación
 - muy buenas propiedades de gelificación
 - mayor termoestabilidad
- 25 **[0050]** La aplicación de la tecnología de hidrólisis suave al sustrato que contiene aislados de proteína de suero (WPI) reveló algunas mejoras impresionantes en el producto final en comparación con el concentrado de proteína de suero dulce (WPC) como el sustrato que contiene proteína de suero dado a conocer en WO 99/65326, a saber:
- Solubilidad
Aunque de todas maneras el WPI se desnaturaliza ligeramente en las condiciones de calor necesarias para detener la reacción de la proteasa, no produce ningún material insoluble. La solubilidad permanece alrededor de 96% que es superior a la del hidrolizado de WPC correspondiente.
- 30
- Termoestabilidad
El WPI hidrolizado fue significativamente más termoestable que el WPC hidrolizado. Después de 120 °C durante 10 minutos con 5% de ST (sólidos totales) la solubilidad permanece en 95%.
- 35
- Aspecto
La selección adecuada de las condiciones de reacción puede determinar si el hidrolizado final se verá blanco o transparente en solución. El ejemplo 1, siguiente, produce un producto opaco, en tanto los ejemplos 2 y 3 (más adelante) dan lugar a un producto transparente en solución a pH neutro. Los hidrolizados de WPC tuvieron todos un aspecto sustancialmente blanco.
- 40
- Capacidad de espumación y estabilidad de la espumaEl WPI hidrolizado tiene aproximadamente el doble de la capacidad de espumación y aproximadamente cuatro veces la estabilidad de la espuma del WPI no hidrolizado. Esto hace que el producto sea muy adecuado como un ingrediente para incluir en yogures y postres. El WPI hidrolizado también mostró mejores capacidad de espumación y estabilidad de espuma en comparación con un hidrolizado de WPC.
- 45
- Fuerza de gel
El WPI hidrolizado suavemente muestra una fuerza de gel marcadamente mayor en comparación con el WPI no hidrolizado. Esto hace que el producto sea muy adecuado como un ingrediente para incluir en yogures y

postres. El WPI hidrolizado también mostró una mayor fuerza de gel en comparación con un hidrolizado de WPC.

- Sabor
El WPI hidrolizado mostró un sabor significativamente menos amargo en comparación con los productos de WPC hidrolizados suavemente. El sabor amargo no muestra una tendencia a aumentar con el tiempo de hidrólisis, lo que facilita mucho el control del proceso en comparación con la hidrólisis del WPC.
- Actividad ECA-I in vitro

El WPI muestra aproximadamente el doble de actividad ECA-I in vitro que el WPC hidrolizado suavemente, en condiciones de reacción y agregado de enzima comparables.

- Aceleración de la fermentación probiótica
El WPI hidrolizado muestra una aceleración en la velocidad del tiempo de fermentación del yogur probiótico de aproximadamente 40% a una relación de adición de 1.5%.

[0051] La invención consiste en lo anterior y también concibe construcciones de las cuales lo que sigue proporciona ejemplos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0052] La presente invención se describirá a continuación con referencia a los dibujos adjuntos en los cuales:

Figura 1

es un gráfico de amargura y bioactividad en el eje de las ordenadas en función del grado de hidrólisis en las abscisas. La "ventana de oportunidad" de obtención de un producto de acuerdo con la presente invención que contenga péptidos bioactivos y que tenga sabores aceptables antes que la reacción de hidrólisis produzca péptidos amargos se encuentra entre las líneas x_1 y x_2 .

Figura 2

muestra el efecto agudo a corto plazo sobre la presión arterial sistólica de la dosificación de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) maduras con 6.0 g de hidrolizado de WPC/kg de peso corporal.

Figura 3

muestra el efecto agudo a corto plazo sobre la presión arterial sistólica de la dosificación de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) maduras con 3.6 g de hidrolizado de WPI/kg de peso corporal.

Figura 4

muestra el efecto agudo a corto plazo sobre la presión arterial sistólica de la dosificación de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) maduras con 165 mg de péptido MKG (SEC. ID N°: 2)/kg de peso corporal.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0053] Según se trató antes, la presente invención proporciona un proceso para producir un producto WPI hidrolizado que contiene péptidos bioactivos, por medio del cual se lleva a cabo la hidrólisis bajo un alto grado de control para evitar que se desarrollen durante la hidrólisis sabores indeseables (por ejemplo, amargo, a jabón y a caldo). La hidrólisis se finaliza dentro de la "ventana de oportunidad", es decir antes del surgimiento de una amargura sustancial -como se muestra en la figura 1-para proporcionar hidrolizados con buenas propiedades organolépticas y un máximo de péptidos bioactivos. En la figura 1 el grado de hidrólisis es representado cualitativamente sobre el eje de las x. La ventana de oportunidad se encuentra entre los puntos x_1 y x_2 que variarán dependiendo de la enzima utilizada. Las condiciones óptimas buscadas son un máximo de bioactividad con un nivel de amargura aceptable.

[0054] En realizaciones particularmente preferidas del proceso de la invención, la enzima que hidroliza el WPI es termolábil y se selecciona del grupo que consiste en proteasa P6, proteasa A, proteasa M, peptidasa, neutrasa, validasa y AFP 2000 (todas según se definieron en este documento), y la hidrólisis del WPI se finaliza mediante un tratamiento térmico durante un período corto a una temperatura elevada (aproximadamente 85 -100 °C durante aproximadamente 1-10 segundos). Los solicitantes encontraron sorprendentemente que las enzimas anteriores (1) son capaces de producir un hidrolizado de proteína de suero con un buen nivel de péptidos bioactivos, y (2) que puede ser inactivado mediante un tratamiento a alta temperatura durante un tiempo corto que causa solo una desnaturalización parcial de las proteínas de suero en el hidrolizado, y sorprendentemente mejora las propiedades organolépticas de las proteínas de suero, en cuanto a proporcionar un producto con un aspecto sustancialmente blanco o transparente.

[0055] La presente invención se ejemplifica mediante los ejemplos siguientes usando ALACEN™ 895 o ALACEN™ 894 (aislados de proteína de suero, comercializados por NZDB), cuyas especificaciones se adjuntan en el Apéndice I:

Ejemplo 1

Producción en planta piloto de hidrolizado suave de WPI

5 **[0056]** Se reconstituyó un aislado de proteína de suero producido mediante tecnología de intercambio catiónico (ALACEN™ 895) con un contenido de proteína $\geq 90\%$ p/p hasta un contenido de sólidos totales de 20% en agua (50 °C) El ALACEN™ 895 reconstituido se transfirió a un tanque de 150 L a 50 °C. Se agregó agua (50 °C) al tanque para tener un contenido de sólidos totales final de 4%. La solución se agitó y se le agregó neutrasa (E:S 0.9%)

10 **[0057]** Dos horas después de la adición de la enzima el primer hidrolizado se bombeó a través de la planta de UHT. Se logró la inactivación de la enzima usando inyección directa de vapor para calentar el hidrolizado a 88 °C y el hidrolizado se mantuvo a esta temperatura durante 1.5 segundos. El hidrolizado se enfrió instantáneamente y se pasó a través de difusores y tubos de intercambio de calor para enfriar hasta temperatura ambiente.

[0058] A continuación se evaporó y se secó el hidrolizado.

[0059] Un hidrolizado preparado según el proceso del ejemplo 1 tiene las características siguientes:

15 Solubilidad: 95%

Termoestabilidad: 120 °C durante 10 minutos con 5% de ST solubilidad de 95%

Actividad ECA-I *in vitro*: Cl_{50} 289 mg/L

Espumación: marcadamente aumentada con respecto al WPI no hidrolizado

Sabor: marcadamente mejorado con respecto a los hidrolizados suaves a base de WPC

20 Aspecto: blanco opaco, tamaño de partícula $\sim 0.1 \mu m$

[0060] La solubilidad, la termoestabilidad, la espumación y el aspecto del hidrolizado de WPI se midieron mediante métodos corrientes conocidos por los expertos en el tema. La solubilidad de una solución con 5% de sólidos totales (ST) se determinó por centrifugación a 3000 g durante 10 min (a temperatura ambiente). La termoestabilidad de las soluciones con 5% de ST se determinó calentando a 120 °C durante 10 min, enfriando rápidamente y después centrifugando a 700 g durante 10 min. Se determinaron los ST contenidos en el sobrenadante y en la solución original. La solubilidad se definió como ST (sobrenadante)/ST (solución original). Se determinó la espumación de las soluciones con 10% de ST a pH 7.0 mezclando con un mezclador Hobart (modelo N-50G, Hobart Corporation) durante 15 min. Se utilizó el porcentaje de rebasamiento para comparar la muestra, como comprenderá un experto en el tema. El aspecto de una solución con 5% de ST se determinó mediante observación visual y el tamaño de partícula se midió utilizando equipo Malvern MasterSizer (modelo MSE00SM, Malvern Instruments Ltd).

25

30

[0061] La actividad ECA-I (*in vitro*) en el producto seco se determinó usando FAPGG como sustrato (producto 305-10 ex Sigma Chemical Corporation, St Louis, MO, EE.UU) de acuerdo con el método de D W Cushman & H S Cheung (1971). Las actividades ECA-I se expresan como la cantidad de material (mg/L) necesario para reducir la actividad de la enzima ECA-I en un 50%.

35 **[0062]** El sabor se evaluó subjetivamente con referencia a la amargura y astringencia de los hidrolizados, en particular, el perfil sensorial fue evaluado por un grupo formal de evaluadores sensoriales expertos. Se degustaron muestras 5% p/p a 24 °C usando una escala multidimensional.

[0063] Las muestras fueron evaluadas y puntuadas sobre una escala lineal de 150 mm ajustada en los extremos (ausente (0) a intenso (150)).

40 Ejemplo 2

[0064] La reacción de hidrólisis se repitió según se describió antes para el ejemplo 1 (10% de sólidos totales, E:S 0.9%, 150 L). Luego de la inactivación el hidrolizado fue inmediatamente evaporado y secado.

[0065] Un hidrolizado preparado por este método tuvo las características siguientes que se midieron según se describe antes para el ejemplo 1:

Solubilidad: 97%

Termoestabilidad: 120 °C durante 10 minutos con 5% de ST solubilidad de 96%

Actividad ECA-I in vitro: CI_{50} 503 mg/L

Espumación: marcadamente aumentada con respecto al WPI no hidrolizado

5 Gelificación: marcadamente aumentada con respecto al WPI no hidrolizado

Sabor: marcadamente mejorado con respecto a los hidrolizados suaves a base de WPC

Aspecto: amarillento transparente

Ejemplo 3

10 **[0066]** La reacción de hidrólisis del ejemplo 1 se repitió según se describió antes (4% de sólidos totales, E:S 0.9%, 150 L). Cuatro horas después de la adición de la enzima el primer hidrolizado se bombeó a través de la planta de UHT usando las mismas condiciones que en el ejemplo 1

[0067] Un hidrolizado preparado por este método tuvo las características siguientes que se midieron según se dio a conocer antes para el ejemplo 1:

Actividad ECA-I in vitro: CI_{50} 230 mg/L

15 Espumación: marcadamente aumentada con respecto al WPI no hidrolizado

Gelificación: marcadamente aumentada con respecto al WPI no hidrolizado

Sabor: marcadamente mejorado con respecto a los hidrolizados suaves a base de WPC

Aspecto: amarillento transparente

Ejemplo 4

20 **[0068]** Una solución de ALACEN™ 894 al 2% (WPI microfiltrado) se llevó a pH 3.0 antes de someterla a ultrafiltración a 10 °C con una membrana de corte de peso molecular nominal de 3 000 Dalton (CDUF001LB, Millipore Corporation, Bedford). El pH del retenido se llevó a 7.0 y se diluyó hasta un 2% de sólidos totales antes de la ultrafiltración a 10 °C con la misma membrana utilizada previamente. Los sólidos totales del retenido se ajustaron a 5.0% antes de ser hidrolizados con neutrasa E:S 0.9% p/p (Novo, Nordisk, Dinamarca) a 50 °C. Después de 4 h la muestra se inactivó a 88 °C durante 3 segundos y a continuación se liofilizó. Se determinó que la actividad ECA-I era de 227 mg/L.

Ejemplo 5

30 **[0069]** Se observó que el WPI suavemente hidrolizado del ejemplo 3 promovía la proliferación de un microorganismo probiótico cuando se agregaba a leche semidescremada a una relación de adición de 1.5%. La leche se trató térmicamente a 90 °C durante 10 minutos. Después de enfriar hasta 37 °C la leche se inoculó con 0.1% de *S. thermophilus* y 2% de *L. rhamnosus* HN001(DR20™). El tiempo de fermentación del control fue de 20 h para alcanzar el pH requerido de 4.4. En contraposición, la adición de hidrolizado de WPI redujo el tiempo de fermentación a 13 h.

Ejemplo 6

Identificación de los péptidos inhibidores de ECA en hidrolizados de WPI

35 **[0070]** El objetivo de este ejemplo fue aislar e identificar péptidos inhibidores de ECA presentes en los hidrolizados de WPI

Metodología

[0071]

- El material de partida para el aislamiento de péptidos ECA-I fue un permeato UF (10 kDa) obtenido a partir del hidrolizado original del ejemplo 1;
- Los péptidos presentes en el hidrolizado se separaron utilizando HPLC de fase reversa;
- Se ensayaron individualmente péptidos purificados con respecto a su actividad de inhibidores de ECA como se describe en el ejemplo 1;
- La secuencia de aminoácidos de cada péptido activo se identificó mediante una combinación de espectrometría de masas y análisis de secuencia N-terminal;
- El origen de los péptidos activos se determinó comparando sus secuencias con las secuencias conocidas de las proteínas de la leche.

[0072] Los péptidos, sus orígenes, actividades y similitudes conocidas se indican en la tabla 1 siguiente:

TABLA 1: Péptidos inhibidores-ECA aislados de un hidrolizado de WPI

Péptido	Secuencia inhibidora-ECA	Origen	¹ Actividad CI50
1	SAP (SEQ ID NO: 1)	β-LG(36-38)	22
2	² MKG (SEQ ID NO: 2)	β-LG(7-9)	23
3	² ALPMH (SEQ ID NO: 3)	β-LG(142-146)	23
4	² LIVTQ (SEQ ID NO: 4)	β-LG(1-5)	19
5	VSLPEW (SEQ ID NO: 5)	α-LA(21-26)	8
6	³ INYWL (SEQ ID NO: 6) ³ LKPTPEGDLEIL (SEQ ID NO: 7)	α-LA(101-105) β-LG(46-57)	11
7	LKGYGGVSLPEW (SEQ ID NO: 8)	α-LA(15-26)	7

¹mg/L

²también se detectaron en los hidrolizados de WPC de WO 99/65326

³dos péptidos estaban presentes en la muestra; uno o ambos pueden ser péptidos activos

- Tres de los péptidos activos del hidrolizado de WPI fueron identificados previamente en el hidrolizado de WPC, a saber β-LG(7-9), β-LG(142-146) y β-LG(1-5).

Ejemplo 7

Comparación sensorial del WPI suavemente hidrolizado con el WPC suavemente hidrolizado y el WPI sin hidrolizar

[0073] El WPI se hidrolizó como se expuso antes en el ejemplo 1.

[0074] El WPC se hidrolizó como se expuso en el ejemplo 1 de WO 99/65326. (ALACEN™ 392, 10%, hidrolizado e inactivado después de 2 horas).

[0075] ALATAL™ 819 es un producto comercial del New Zealand Dairy Board; cuyo resumen de las especificaciones del producto se adjunta en el apéndice I.

[0076] Un grupo de evaluadores sensoriales expertos puntuó la amargura y la astringencia de los productos sobre una escala lineal de 150 mm con los extremos ajustados (ausente (0) a intensa (150)).

[0077] El grado de hidrólisis se determinó usando el método del O-ftaldialdehído modificado (MOPA, por sus siglas en inglés) descrito por Frister *et al.* (1988).

Tabla 2 Puntaje promedio (/150) para WPI y muestras de hidrolizado evaluados por un grupo de evaluadores sensoriales expertos formal, grado de hidrólisis, y actividad ECA-I de WPI estándar y proteína de suero hidrolizada.

Producto analizado	Evaluación sensorial		Grado de hidrólisis (%)	Actividad ECA-I (mg/L)
	Amargo	Astringente		
ALACEN™ 895 (WPI)	36.2	24	0	□2000
WPC suavemente hidrolizado	78	67.1	4.5	440
WPI suavemente hidrolizado	55.1	41.6	4.3	230
ALATAL™ 819	93.1	53.3	10	-

5

[0078] Ni el WPI suavemente hidrolizado ni el WPC suavemente hidrolizado fueron más amargos ni más astringentes que los productos de WPI no hidrolizados, como se esperaba. Sin embargo, estos productos fueron significativamente menos amargos y astringentes que ALATAL™ 819 (un producto del New Zealand Dairy Board, NZ) más vigorosamente hidrolizado.

10

[0079] Los productos WPI suavemente hidrolizados dieron productos con sabores más aceptables y tuvieron una actividad ECA-I significativamente superior, en comparación con el WPC suavemente hidrolizado (descrito en WO 99/65326). Los resultados también mostraron que el WPI suavemente hidrolizado fue significativamente menos amargo y astringente que el producto WPC equivalente, a pesar de que el grado de hidrólisis para ambos fue semejante. Además de tener un perfil de sabor más aceptable, la actividad ECA-I del WPI suavemente hidrolizado fue casi dos veces la del WPC suavemente hidrolizado.

15

[0080] Aunque la hidrólisis adicional del WPC puede producir un aumento de la actividad ECA-I, se observa una disminución significativa en el perfil de sabor en comparación con el WPI suavemente hidrolizado, comprometiendo el perfil de sabor debido al aumento de la amargura y la astringencia.

Ejemplo 8

Medición de la presión arterial

20

[0081] La presión arterial se midió utilizando un monitor de manguito de presión para cola y un aparato designado a propósito para medir la presión arterial de animales pequeños [IITC Inc, 239 Victory Blvd., Woodland Hills, CA 91367, EE.UU]. Cada punto correspondiente al tiempo fue el promedio de 3-5 lecturas tomadas en el transcurso de aproximadamente 5-10 minutos.

Cepa del animal

[0082] Se obtuvieron ratas espontáneamente hipertensivas (SHR, por sus siglas en inglés) del Animal Resource Centre, Western Australia.

25

Dosis de muestra

[0083] Las sustancias de prueba se administraron a cada rata en una base por kg de peso corporal a menos que se indique algo diferente. La dosis individual para cada animal fue incorporada en una jalea saborizada, que fue fácilmente consumida por los animales.

30

[0084] Las tres muestras en que se evaluó la respuesta de la presión arterial a corto plazo fueron un concentrado de proteína de suero suavemente hidrolizada (figura 2), un aislado de proteína de suero suavemente hidrolizada (véase la figura 3) y un péptido sintetizado de la tabla 1, denominado MKG (SEC. ID N°: 2) (véase la figura 4). El WPC se preparó de acuerdo con la metodología descrita en el ejemplo 1 de WO 99/65326.

35

[0085] Se determinaron los efectos agudos o a corto plazo de los agentes, tratando SHR adultas con el agente y luego estudiando las respuestas de su presión arterial en las horas siguientes. El estudio detecta si un agente disminuye la presión arterial que ya está elevada.

Resultados

5 [0086] La dosificación a corto plazo de SHR con 3.6 g/kg de peso corporal de hidrolizado de WPI (Figura 3) produjo una disminución significativa de la presión arterial en comparación con las ratas de control ($p=0.0378$). La disminución en la presión arterial fue semejante a la obtenida en ratas a las que se administraron 6.0 g/kg de peso corporal de hidrolizado de WPC (Figura 2). Por consiguiente, el hidrolizado de WPI parece ser más activo que el hidrolizado de WPC comparativo, o sea que se necesita aproximadamente 50% menos de hidrolizado de WPI para producir una disminución semejante de la presión arterial (sistólica) en SHR maduras.

10 [0087] La dosificación a corto plazo de SHR con 165 mg/kg de peso corporal de péptido MKG (Figura 4) mostró una disminución mucho mayor en la presión arterial en comparación con las ratas de control ($p=0.0021$ después de 4 horas; $p<0.0001$ después de 8 horas) al igual que en la comparación con el hidrolizado suave de WPI y el hidrolizado suave de WPC.

Conclusiones

15 [0088] El proceso de hidrólisis suave de WPI de acuerdo con la presente invención proporciona hidrolizados de WPI útiles que muestran una mejoría funcional significativa respecto a los hidrolizados de WPC de WO 99/65326. En particular, los hidrolizados de WPI de la presente invención comprenden péptidos más activos requiriéndose mucho menos hidrolizado de WPI para disminuir la presión arterial in vivo al mismo grado que con un hidrolizado de WPC. El WPI se puede hidrolizar por más tiempo sin que pierda las características de sabor aceptable y mantenga simultáneamente la mayor actividad ECA-I. Por lo tanto, en general, el proceso de la presente invención proporciona un hidrolizado de proteína de suero bioactivo que tiene sabor, actividad de ECA-I y funcionalidad mejores en comparación con los de WO 99/65326.

APLICACIÓN INDUSTRIAL

25 [0089] El proceso de la presente invención es útil para producir un nuevo hidrolizado de proteína de suero con propiedades sorprendentemente beneficiosas y que puede ser usado como un alimento o un medicamento como un antihipertensivo.

[0090] Se apreciará que no se tiene la intención de limitar la invención únicamente a los ejemplos mencionados precedentemente, siendo posibles muchas variaciones, como las que podrían fácilmente ocurrírsele a un experto en el tema, sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

BIBLIOGRAFÍA**[0091]**

- Bernal V & Jelen P (1989). Effectiveness of lactose hydrolysis in Cottage cheese whey for the development of whey drinks. *Milchwissenschaft* 44: 222-225
- FR 2309154, 30 December 1976 Fromageries Bel La Vache Qui (From), France.
- 5 US 3970520, 20 July 1976, General Electric Co, USA.
- EP0117047, 29 August 1984, General Foods Corporation, USA.
- Maubois J L, Léonil J, Trouvé R & Bouhallab S (1991) Les peptides du lait A activité physiologique III. Peptides du lait A effect cardiovasculaire: activités antithrombotique et antihypertensive. *Lait*, 71, 249-255.
- JP 4282400, 7 October 1992, Calpis Shokuhin Kogyo KK, Japan.
- 10 EP065663, 1 December 1982, Miles Laboratories Incorporated, USA.
- JP 8056568, 17 August 1994. Morinaga Milk Co Ltd Japan.
- EP4745506, 11 March 1992, Morinaga Milk Co Ltd, Japan.
- Mullally M M, Meisel H & FitzGerald R J (1997) Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine β -lactoglobulin. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 402, 99-101.
- 15 Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K & Takano T (1994) Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*, 77, 917-922.
- Roy G (1992). Bitterness: reduction and inhibition. *Trends in Food Science and Technology* 3: 85-91
- 20 Roy G (1997). *Modifying bitterness: Mechanism, ingredients and applications*. Technomic Publishers, Lancaster, UK.
- US 4358464, 9 September 1982, Superior Dairy Company, USA.
- Yamamoto N (1997). Antihypertensive peptides derived from food proteins. *Biopolymers* 43: 129-134.
- 25 Frister H, Meisel H & Schlimme E (1988). OPA method modified by use of N,N-dimethyl-2-mercaptoethylammoniumchloride as thiol component. *Fresenius Z Anal Chem.* 330, 631-633
- Cushman D W & Cheung H S (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotension converting enzyme in rabbit lung. *Biochem Pharmacol* 20: 1637-1648.
- WO 9965326, 23rd December, 1991, New Zealand Dairy Board, NZ.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0092]

<110> NEW ZEALAND DAIRY BOARD

<120> Hidrolizado mejorado de proteína de suero bioactivo

<130> P425133 CJE

5 <140>

<141>

<150> NZ 506866

<151> 2000-09-11

<160> 8

10 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3

<212> PRT

<213> Péptido

15 <400> 1

Ser Ala Pro
1

<210> 2

<211> 3

<212> PRT

20 <213> Péptido

<400> 2

Met Lys Gly
1

<210> 3

<211> 5

25 <212> PRT

<213> Péptido

<400> 3
 Ala Leu Pro Met His
 1 5

 <210> 4

 <211> 5
5 <212> PRT

 <213> Péptido

 <400> 4
 Leu Ile Val Thr Gln
 1 5

 <210> 5
10 <211> 6

 <212> PRT

 <213> Péptido

 <400> 5
 Val Ser Leu Pro Glu Trp
 1 5
15 <210> 6

 <211> 5

 <212> PRT

 <213> Péptido

 <400> 6
 Ile Asn Tyr Trp Leu
 1 5

 <210> 7

 <211> 12

 <212> PRT

 <213> Péptido
25 <400> 7

 Leu Lys Pro Thr Pro Glu Gly Asp Leu Glu Ile Leu
 1 5 10

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Péptido

5

<400> 8

Leu Lys Gly Tyr Gly Gly Val Ser Leu Pro Glu Trp
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para preparar un hidrolizado mejorado de proteína de suero que contiene péptidos bioactivos, que comprende hidrolizar un aislado de proteína de suero (WPI) con una o más enzimas **que se caracteriza porque:**

i) la enzima es una proteasa termolábil;

ii) la hidrólisis se lleva a cabo a una temperatura entre aproximadamente 30 °C y 65 °C a un pH entre aproximadamente 3.5 y aproximadamente 9.0 cuando dicha enzima es una proteasa neutra, a un pH entre aproximadamente 2.5 y aproximadamente 6.0 cuando dicha enzima es una proteasa ácida;

5 iii) la hidrólisis se finaliza cuando se alcanza un grado de hidrólisis que no es superior a aproximadamente 10%; y

10 iv) la hidrólisis se finaliza desactivando dichas una o más enzimas en condiciones que evitan la desnaturalización sustancial de los péptidos o las proteínas residuales en dicho hidrolizado, donde dichas condiciones de desactivación se seleccionan del grupo que consiste en; desactivación por calor que comprende calentar dicho hidrolizado hasta diez segundos a una temperatura de hasta aproximadamente 100 °C;

15 o cuando dicha hidrólisis se lleva a cabo una temperatura por debajo de aproximadamente 65 °C, dicha desactivación por calor se lleva a cabo entre aproximadamente 65 °C y aproximadamente 70 °C durante entre aproximadamente 10 segundos y aproximadamente 15 minutos; o cuando dicha hidrólisis se lleva a cabo una temperatura por debajo de aproximadamente 60 °C, dicha desactivación por calor se lleva a cabo entre aproximadamente 60 °C y aproximadamente 65 °C durante entre aproximadamente 10 segundos y aproximadamente 30 minutos; o llevando el pH de dicho sustrato que contiene proteína de suero a un pH al cual dicha proteasa no es activa; o sometiendo dicho hidrolizado a ultrafiltración con una membrana de ultrafiltración con un corte de peso molecular nominal en el rango de aproximadamente 10-500 kDa, donde el producto del proceso es altamente soluble.

20 2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la enzima se selecciona del grupo que consiste en proteasa P6, proteasa A, proteasa M, peptidasa, neutrasa, validasa, AFP 2000, y cualquier otra proteasa termolábil.

3. Un proceso como el que se reivindica en la reivindicación 1, donde dicha membrana de ultrafiltración tiene un corte de peso molecular nominal en el rango de aproximadamente 10-200 kDa.

25 4. Un proceso como el que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha enzima es inmovilizada sobre un soporte inerte durante dicho paso de hidrólisis ii).

5. Un proceso como el que se reivindica en la reivindicación 4, donde dicho soporte inerte es un polímero funcional a base de metacrilato, partículas de carragenina, partículas de quitosana o cualquier otro material de soporte inerte adecuado.

30 6. Un proceso como el que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el grado de hidrólisis es entre aproximadamente 3% y aproximadamente 10%.

7. Un proceso como el que se reivindica en la reivindicación 6, donde el grado de hidrólisis es entre aproximadamente 3% y aproximadamente 5%.

35 8. Un proceso como el que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el hidrolizado de proteína de suero producido de esa manera comprende uno o más péptidos bioactivos seleccionados del grupo que consiste en SAP (SEC. ID N°: 1), VSLPEW (SEC. ID N°: 5), INYWL (SEC. ID N°: 6), LKPTPEGDLEIL (SEC. ID N°: 7) y LKGYGGVSLPEW (SEC. ID N°: 8).

40 9. Un proceso como el que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el hidrolizado de proteína de suero preparado de esa manera comprende al menos un péptido bioactivo seleccionado del grupo que consiste en LIVTQ (SEC. ID N°: 4), MKG (SEC. ID N°: 2) y ALPMH (SEC. ID N°: 3), en combinación con al menos un péptido bioactivo seleccionado del grupo que comprende SAP (SEC. ID N°: 1), VSLPEW (SEC. ID N°: 5), INYWL (SEC. ID N°: 6), LKPTPEGDLEIL (SEC. ID N°: 7) y LKGYGGVSLPEW (SEC. ID N°: 8).

45 10. Una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido bioactivo seleccionado del grupo que consiste en SAP (SEC. ID N°: 1), VSLPEW (SEC. ID N°: 5), INYWL (SEC. ID N°: 6), LKPTPEGDLEIL (SEC. ID N°: 7) y LKGYGGVSLPEW (SEC. ID N°: 8) en combinación con el péptido bioactivo MKG (SEC. ID N°: 2) junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

11. Un producto hidrolizado de WPI altamente soluble, no amargo, que contiene péptidos bioactivos, preparado por el proceso de la reivindicación 8 o 9.

12. Un producto como el que se reivindica en la reivindicación 11, donde el grado de hidrólisis del WPI es entre aproximadamente 3% y aproximadamente 5%.
13. Un producto como el que se reivindica en la reivindicación 12, donde el tamaño principal de partícula de las proteínas de suero en el producto es menor de aproximadamente 30 micrómetros.
- 5 14. Un producto como el que se reivindica la reivindicación 13, donde el tamaño principal de partícula es menor de aproximadamente 3 micrómetros. 15. Un producto como el que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14 que es transparente o blanco en solución.
- 10 16. Un producto como el que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, donde uno o más de dichos péptidos bioactivos se seleccionan del grupo que consiste en SAP (SEC. ID N°: 1), VSLPEW (SEC. ID N°: 5), INYWL (SEC. ID N°: 6), LKPTPEGDLEIL (SEC. ID N°: 7) y LKGYGGVSLPEW (SEC. ID N°: 8).
- 15 17. Un producto como el que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15 que comprende al menos un péptido bioactivo seleccionado del grupo que consiste en LIVTQ (SEC. ID N°: 4), MKG (SEC. ID N°: 2) y ALPMH (SEC. ID N°: 3), en combinación con al menos un péptido bioactivo seleccionado del grupo que comprende SAP (SEC. ID N°: 1), VSLPEW (SEC. ID N°: 5), INYWL (SEC. ID N°: 6), LKPTPEGDLEIL (SEC. ID N°: 7) y LKGYGGVSLPEW (SEC. ID N°: 8).
18. Un producto alimentario que contiene un producto hidrolizado de WPI como el que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17.
19. El uso de un producto como el que se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17 en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir la hipertensión en un paciente que lo necesita.
- 20 20. Una composición farmacéutica que comprende el producto de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17 junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
21. Un hidrolizado que comprende uno o más péptidos seleccionados entre SAP (SEC. ID N°: 1), VSLPEW (SEC. ID N°: 5), INYWL (SEC. ID N°: 6), LKPTPEGDLEIL (SEC. ID N°: 7) y LKGYGGVSLPEW (SEC. ID N°: 8).
- 25 22. Un hidrolizado que comprende una mezcla de al menos un primer péptido y al menos un segundo péptido, donde el primer péptido se selecciona del grupo que consiste en LIVTQ (SEC. ID N°:4), MKG (SEC. ID N°: 2) y ALPMH (SEC. ID N°: 3), y donde el segundo péptido se selecciona del grupo que comprende SAP (SEC. ID N°: 1), VSLPEW (SEC. ID N°: 5), INYWL (SEC. ID N°:6), LKPTPEGDLEIL (SEC. ID N°: 7) y LKGYGGVSLPEW (SEC. ID N°: 8).
23. Una composición farmacéutica que comprende el hidrolizado que se reivindica en la reivindicación 21 o 22 junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 30 24. El uso de un hidrolizado como el que se reivindica en la reivindicación 21 o 22 para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir la hipertensión en un paciente que necesita dicho tratamiento.
25. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9 que comprende además un paso de combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica.

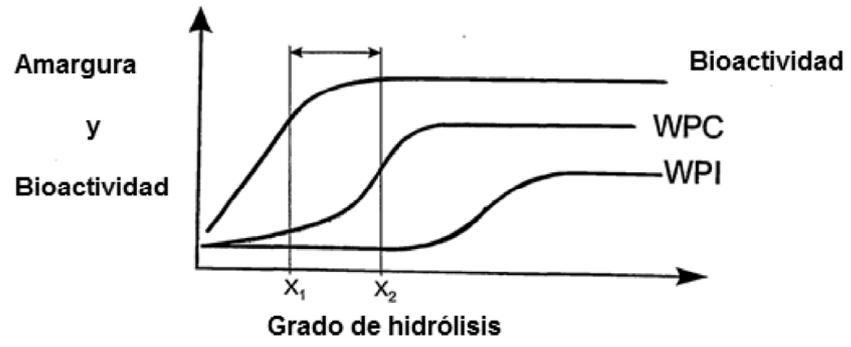


Figura 1

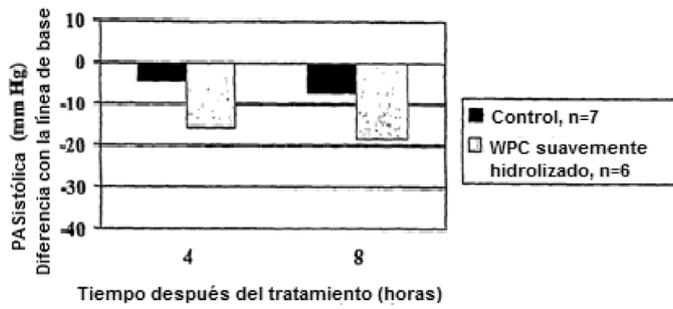


Figura 2

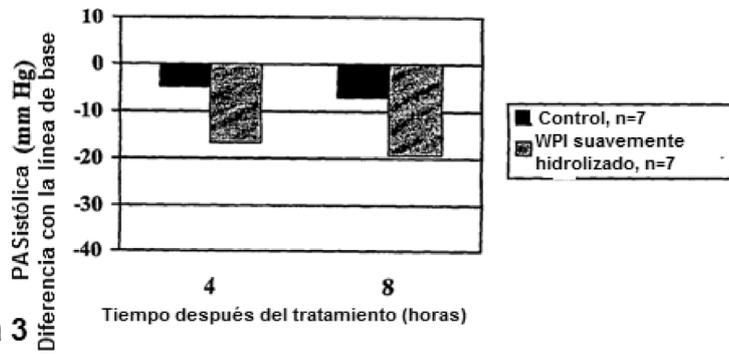


Figura 3

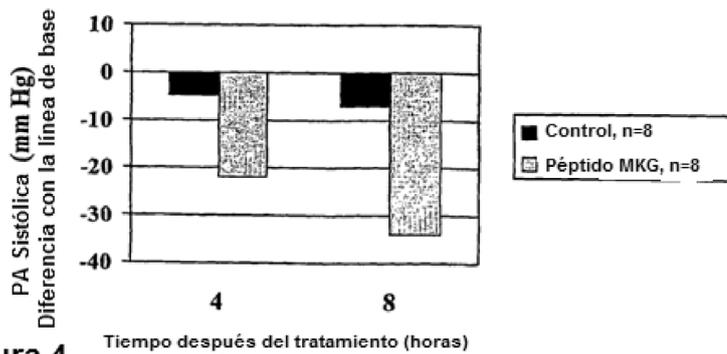


Figura 4