

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 910**

51 Int. Cl.:  
**C12P 21/06** (2006.01)  
**C12P 13/22** (2006.01)  
**A61K 38/01** (2006.01)  
**A61K 38/47** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07847086 .1**  
96 Fecha de presentación: **30.10.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2079847**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.07.2009**

54 Título: **Uso de hidrolizados de lisozima que contienen triptófano**

30 Prioridad:  
**02.11.2006 EP 06123358**  
**18.01.2007 EP 07100755**  
**03.09.2007 EP 07115528**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**14.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**14.06.2012**

73 Titular/es:  
**DSM IP ASSETS B.V.**  
**HET OVERLOON 1**  
**6411 TE HEERLEN, NL**

72 Inventor/es:  
**ROOS, DE, Andre Leonardus;**  
**EDENS, Luppo;**  
**BECKHOVEN, VAN, Rudolf Franciscus Wilhelmus C.;**  
**DUCHATEAU, Alexander Lucia Leonardus y**  
**KLOEK, Joris**

74 Agente/Representante:  
**Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 382 910 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

Uso de hidrolizados de lisozima que contienen triptófano.

### Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere a una composición que comprende un péptido soluble en agua que contiene triptófano que se obtiene por hidrólisis de lisozima de huevo de gallina para uso en la mejora del estado de ánimo, la cognición, el apetito, el estado de alerta, la vigilancia, el comienzo y la calidad del sueño, los efectos ansiolíticos, la depresión, el control de las reacciones adictivas, o el comportamiento sexual.

### Antecedentes de la invención

10 Los niveles de serotonina en el cerebro han sido relacionados con el estado de ánimo, el estado de alerta, la vigilancia, el comienzo y la calidad del sueño, los efectos ansiolíticos, la depresión, el control de las relaciones afectivas, el apetito y el comportamiento sexual. Existen muchas publicaciones en las cuales los cambios en los niveles cerebrales de serotonina se correlacionan con la disponibilidad del aminoácido natural L-triptófano (Trp o W). Debido a esta correlación, los métodos para aumentar los niveles de triptófano en plasma han recibido mucha atención. Se ha informado que cantidades de triptófano de alrededor de 1 gramo/día por individuo producen efectos clínicamente  
15 significativos (Markus et al., Am. J Clin. Nutr. 2005; 81, 1026-1033). Un método para aumentar los niveles de triptófano en plasma implica el consumo de preparaciones proteínicas enriquecidas en la proteína del lactosuero alfa-lactoalbúmina. Las preparaciones de alfa-lactoalbúmina son fácilmente disponibles y tienen una concentración de triptófano relativamente alta. Sin embargo, métodos en los cuales se proporciona la alfa-lactoalbúmina como tal, véase por ejemplo DE 4.130.284 y JP 2.279.700 no tienen en cuenta que el determinante principal de los niveles de  
20 triptófano y serotonina cerebrales no es la concentración de triptófano en plasma por sí sola sino la denominada ratio Trp/LNAA (Fernstrom y Wurtmam. Science 1971, 173, 149-152). Esta ratio Trp/LNAA representa la ratio molar de triptófano con relación a los niveles de Aminoácidos Grandes Neutros (LNAA: es decir, la suma de tirosina, fenilalanina, leucina, isoleucina y valina) en plasma. Estos LNAA compiten con triptófano para absorción en el cerebro, debido probablemente a que se utiliza el mismo mecanismo de transporte a través de la barrera hematoencefálica.  
25 Por esta razón, el modo más eficaz para incrementar las concentraciones cerebrales de triptófano consiste en suministrar preparaciones con una ratio Trp/LNAA alta. Numerosas publicaciones, entre otras WO 02/46210, se refieren a la preparación de fracciones peptídicas de alfa-lactoalbúmina que tienen ratios Trp/LNAA aumentadas.

Obviamente, el uso de triptófano libre, es decir el aminoácido libre, proporcionaría el método más simple y económico para proporcionar preparaciones con una ratio Trp/LNAA alta. Sin embargo, en muchos países existe legislación  
30 que regula estrictamente el suministro de triptófano libre. Los niveles máximos permisibles de triptófano libre en sus diversas formas de aplicación varían por país. Para suministrar triptófano dietético adicional de una manera más natural, métodos más recientes apuntan a proporcionar proteínas ricas en triptófano. Como se ha mencionado, la alfa-lactoalbúmina así como sus hidrolizados han ganado popularidad como opción segura para aumentar los niveles de triptófano en plasma. Sin embargo, el uso de alfa-lactoalbúmina como punto de partida para preparaciones  
35 ricas en triptófano, presenta ciertas desventajas en términos de ratios Trp/LNAA máximas y costes. La alfa-lactoalbúmina y la beta-lactoglobulina constituyen los componentes proteínicos principales del lactosuero. Debido a que en escala industrial es difícil una separación completa de alfa-lactoalbúmina y beta-lactoglobulina, la implicación es que las preparaciones de alfa-lactoalbúmina eficaces en costes contendrán también beta-lactoglobulina. Mientras que la alfa-lactoalbúmina tiene un contenido molar de triptófano de 5,3%, el contenido de triptófano de la beta-lactoglobulina es sólo 2%. Mientras que la alfa-lactoalbúmina tiene una ratio molar Trp/LNAA 0,11, la beta-lactoglobulina tiene una ratio molar Trp/LNAA no mayor que 0,04. Por tanto, obviamente, cualquier contaminación de la preparación de alfa-lactoalbúmina con beta-lactoglobulina reducirá espectacularmente la ratio Trp/LNAA del producto final.

WO 2006/009488 describe péptidos con actividad inhibitora de la ACE y su uso como apersonas anti-hipertensivos.

45 Sharmanov (PubMed Abstract 3739316) *Vopr Pitan* 1986 (3):59-62 Abstract, propone un hidrolizado de lisozima para uso como aditivo para mixturas de leche infantil.

Teniendo en cuenta el gran interés en preparaciones que puedan modular los niveles cerebrales de serotonina, existe necesidad de métodos de producción mejorados para preparaciones de proteínas y péptidos que tengan una ratio Trp/LNAA alta que sean aplicables en general en diversos productos alimenticios y neutracéuticos.

### 50 Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere al uso de una composición que comprende un péptido que contiene triptófano, soluble en agua, preferiblemente al menos dos péptidos que contienen triptófano solubles en agua, y que tiene una ratio Trp/LNAA mayor que 0,15, preferiblemente entre 0,15 y 1,8, que se obtiene por hidrólisis de lisozima de huevo de gallina, para preparar un hidrolizado que tiene un DH comprendida entre 5 y 45, y eliminación opcional de parte de  
55 los péptidos que contienen arginina o lisina. Preferiblemente, la composición comprende AW o GNW, más preferiblemente AW y GNW. El hidrolizado tiene preferiblemente un DH entre 10 y 40.

La presente invención se refiere también al uso de una composición que comprende al menos dos péptidos diferentes solubles en agua y en donde la ratio molar Trp/LNAA de la composición es al menos 0,15, preferiblemente entre 0,15 y 1,8. Preferiblemente, esta composición comprende AW o GNW, preferiblemente AW y GNW y muy preferiblemente AW y GNW en donde la ratio molar de AW a GNW está comprendida entre 1 a 2 y 10 a 1, con preferencia entre 1 a 2 y 5 a 1. Además, la presente invención proporciona el uso de una composición de péptidos solubles en agua que son ricos en triptófano. Ventajosamente, la presente invención se refiere además al uso de una composición que comprende al menos dos di- y/o tripéptidos diferentes, en donde dos péptidos seleccionados de di- o tripéptidos están presentes en una cantidad de al menos 5% molar de la cantidad total de di- y tripéptidos, y en cuya composición más de 30% molar, preferiblemente más de 40% molar, más preferiblemente más de 50% molar, aún más preferiblemente más de 60% molar, todavía más preferiblemente más de 70% molar y muy preferiblemente más de 80% molar del triptófano combinado al péptido está presente en la forma de un di- o un tripéptido, teniendo preferiblemente la composición una ratio Trp/LNAA mayor que 0,15, preferiblemente entre 0,15 y 1,8. Por triptófano combinado a péptido se entiende un triptófano que está presente como aminoácido en un péptido.

Esta composición es un hidrolizado de lisozima de huevo de gallina o un hidrolizado de lisozima purificado. Preferiblemente, el hidrolizado de lisozima es particularmente rico en residuos arginina. La arginina no pertenece al grupo de aminoácidos grandes neutros (LNAA's), pero es conocida por su efecto estimulante de insulina. Se ha encontrado que el hidrolizado de acuerdo con la invención puede generar ratios Trp/LNAA elevadas en plasma sanguíneo in vivo. De modo totalmente sorprendente, se encontró que las ratios Trp/LNAA detectadas en plasma sanguíneo, son mayores que la ratio Trp/LNAA del hidrolizado. Otra ventaja adicional de la invención es que los péptidos que contienen Trp son muy pequeños, por lo que incluso en combinación con productos ricos en proteínas con ratio Trp/LNAA menos favorables, el hidrolizado puede generar inmediatamente ratios Trp/LNAA elevadas en plasma sanguíneo. La composición puede comprender adicionalmente triptófano libre. Preferiblemente, el hidrolizado no contiene más de 1% en peso (sobre materia seca) de triptófano libre.

Un aspecto de la invención es el uso de una composición que se obtiene por hidrólisis de lisozima de huevo de gallina para mejorar el estado de ánimo, la cognición, el apetito, el estado de alerta, la vigilancia, el comienzo y la calidad del sueño, los efectos ansiolíticos, la depresión, el control de las reacciones afectivas o el comportamiento sexual, o para uso como ingrediente en la preparación de un alimento, comida para mascotas, pienso, suplemento dietético o composición neutracéutica para el estado de ánimo, la cognición, el apetito, el estado de alerta, la vigilancia, el comienzo y la calidad del sueño, los efectos ansiolíticos, la depresión, el control de las reacciones afectivas o el comportamiento sexual. Aparte del hidrolizado de lisozima, la composición puede comprender también carbohidratos así como compuestos recomendados para nutrición "del cerebro", para alivio del estrés o la depresión o para mejora del estado de alerta, el estado de ánimo, la cognición o los patrones de sueño.

Además, la presente invención se refiere al uso de AW, SW o GNW para mejora del estado de ánimo, la cognición, el apetito, el estado de alerta, la vigilancia, el comienzo y la calidad del sueño, los efectos ansiolíticos, la depresión, el control de las reacciones afectivas, o el comportamiento sexual, o para uso como ingrediente en la preparación de un alimento, pienso, suplemento dietético o composición neutracéutica para el estado de ánimo, el apetito, el estado de alerta, el comienzo y la calidad del sueño, los efectos ansiolíticos, la depresión, el control de las reacciones afectivas, o el comportamiento sexual.

Se describe un alimento (con inclusión de fórmulas para niños), comida para mascotas, pienso, suplemento dietético o composición neutracéutica, que comprende la composición producida de acuerdo con el proceso de la invención que incluye GNW, SW o AW como péptidos presentes.

De acuerdo con una realización adicional, el uso de péptidos solubles en agua que contienen triptófano o una composición de la invención para aumentar la ratio Trp/LNAA en plasma en el transcurso de 90 minutos, preferiblemente 60 minutos, muy preferiblemente 30 minutos después de la ingestión de los péptidos o la composición, o para la preparación de una composición neutracéutica para aumentar la ratio Trp/LNAA en plasma en el transcurso de 90 minutos, preferiblemente 60 minutos, y muy preferiblemente 30 minutos después de la ingestión de los péptidos.

#### **Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona el uso de una composición que contiene triptófano presente en forma de péptido que es muy adecuada para proporcionar un aumento eficaz de la ratio Trp/LNAA en plasma en un intervalo de tiempo muy corto. Se ha observado que los di- y tripéptidos que comprenden triptófano contribuyen ventajosamente a este aumento. En una realización de la presente invención, la lisozima de huevo de gallina se (pre)-hidroliza enzimáticamente en un proceso industrial, es decir se proporciona enzimáticamente lisozima de huevo de gallina en la forma de un hidrolizado. Ofrecida en la forma de un hidrolizado, la absorción gastro-intestinal de los péptidos que contienen triptófano se facilita notablemente. En otra realización de la presente solicitud, la lisozima de huevo de gallina se convierte en un hidrolizado en el cual los niveles de péptidos que comprenden los residuos arginina y lisina cargados positivamente se han reducido. Los últimos hidrolizados se caracterizan por ratios moleculares Trp/LNAA mayores que 0,15. En otra realización adicional de la presente solicitud, la lisozima de huevo de gallina se convierte en un hidrolizado que comprende una población de péptidos de la cual más del 50%, preferiblemente más de 60%, más preferiblemente más de 75% de los péptidos presentes tienen un peso molecular inferior a 500 Da.

Esto, con la salvedad de que la distribución de pesos moleculares de los péptidos presentes en el hidrolizado se realiza como se describe en la sección Materiales y Métodos de la presente solicitud.

Una ventaja importante de la última realización es que el triptófano comprendido en los di- y tripéptidos se transporta a través de la pared intestinal al torrente sanguíneo inmediatamente después del consumo oral. Como consecuencia, los niveles de triptófano en plasma aumentan casi instantáneamente con un efecto directo sobre los niveles cerebrales de serotonina. Datos presentados en el Ejemplo 6 de la presente solicitud muestran que los residuos triptófano presentados en la forma de tales di- y tripéptidos conducen muy rápidamente a ratios Trp/LNAA altas. A este respecto, los residuos triptófano presentados en la forma de estos di- y tripéptidos parecen ser aún más eficaces que el triptófano libre. De acuerdo con el presente proceso, se obtiene una fracción de péptidos soluble en agua que tiene una ratio molecular Trp/LNAA de al menos 0,15 con la condición de que el análisis de aminoácidos del hidrolizado se lleva a cabo como se describe en la sección Materiales y Métodos de la presente solicitud. Otra ventaja importante adicional del ofrecimiento de triptófano en la forma de di- y tripéptidos es que la absorción gastrointestinal de estos péptidos es tan rápida, que los mismos pueden consumirse en combinación con alimentos que contengan proteínas, tales como productos lácteos que tienen naturalmente una ratio Trp/LNAA menos favorable, y conducir todavía a un aumento eficaz de la ratio Trp/LNAA en el plasma dentro de 90 minutos, preferiblemente 60 minutos, y más preferiblemente un periodo de 30 minutos después de su consumo.

Por consiguiente, la presente invención proporciona el uso de la composición para obtener una ratio Trp/LNAA incrementada en plasma dentro de 90 minutos, preferiblemente 60 minutos, y muy preferiblemente 30 minutos después de la ingestión de los péptidos. Se describe adicionalmente la preparación de una composición neutracéutica para obtener una ratio Trp/LNAA incrementada en plasma dentro de 90 minutos, preferiblemente 60 minutos, muy preferiblemente 30 minutos después de la ingestión de los péptidos. Preferiblemente, el consumo de proteína o alimento que contiene proteína se realiza al mismo tiempo o prácticamente al mismo tiempo que los péptidos solubles en agua. La ratio Trp/LNAA incrementada significa un aumento de esta ratio comparado con la situación anterior al consumo o ingestión de la composición.

Una "proteína" o "polipéptido" se define en esta memoria como una cadena que comprende más de 30 residuos de aminoácidos.

Un "péptido" u "oligopéptido" se define en esta memoria como una cadena de al menos dos aminoácidos que están unidos por enlaces peptídicos. Los términos "péptido" y "oligopéptido" se consideran sinónimos (como se reconoce comúnmente) y cada término puede utilizarse intercambiamente cuando lo requiera el contexto.

Un péptido "soluble en agua" es un péptido que es soluble en agua a un pH de 5,0.

Todas las fórmulas o secuencias de (oligo)péptidos y polipéptidos de esta memoria se escriben de izquierda a derecha en la dirección del término amino al término carboxi, de acuerdo con la práctica común. El código de una sola letra para los aminoácido utilizado en esta memoria se conoce comúnmente en la técnica y puede encontrarse en Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ColdSpring Harbor, NY, 1989).

Por hidrolizado de proteínas, hidrolizado o proteína hidrolizada se entiende el producto que se forma por hidrólisis enzimática de la proteína, siendo un hidrolizado enriquecido una fracción del hidrolizado de proteínas enriquecida por ejemplo en péptidos seleccionados o en donde péptidos o polipéptidos han sido eliminados del hidrolizado. Así, un hidrolizado enriquecido es preferiblemente una mezcla de péptidos (o una mezcla peptídica). La mezcla peptídica de la invención es por consiguiente una mezcla de al menos dos, preferiblemente al menos tres, más preferiblemente al menos cuatro péptidos que contienen triptófano. Más preferiblemente, la mezcla comprende una población de péptidos de los cuales más del 50%, preferiblemente aún más del 60%, y muy preferiblemente más de 75% de los péptidos presentes tienen un peso molecular inferior a 500 Da. Un péptido que contiene triptófano significa un péptido que comprende al menos un residuo de aminoácido L-triptófano.

La ratio Trp/LNAA representa la ratio molar de triptófano referida a los niveles de otros Aminoácidos Grandes Neutros (LNAA: es decir la suma de tirosina, fenilalanina, leucina, isoleucina y valina). Excepto en lo que respecta a la ratio Trp/LNAA en plasma, la ratio Trp/LNAA se refiere únicamente a aminoácidos combinados en péptidos. Así, triptófano libre, tirosina, fenilalanina, leucina, isoleucina y valina no se tienen en cuenta en la ratio Trp/LNAA.

Los aminoácidos combinados en péptidos son aminoácidos que forman parte de un péptido y no son aminoácidos libres.

La ratio Tyr/BCAA presenta la ratio molar de tirosina con relación a los niveles de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA; es decir la suma de leucina, isoleucina y valina). Preferiblemente, la ratio Tyr/BCAA es mayor que 0,1, preferiblemente mayor que 0,12.

Un comienzo y calidad favorables del sueño se define como un sueño tranquilo que comienza dentro de los 45 minutos después de acostarse.

El estado de ánimo se define como el estado emocional de la mente y se mide preferiblemente utilizando el cuestionario de Perfil de Estados de Ánimo (véase el Ejemplo 6 de la presente solicitud).

La cognición se define como las experiencias combinadas relativas a áreas tales como resolución de problemas, aprendizaje, memoria y lenguaje.

- 5 El apetito se define como el deseo de comer, estimulado por sensaciones de hambre.

El estado de alerta se define como el estado atento o vigilante de la mente, medido preferiblemente utilizando el Test del Reloj de Mackworth y la Tarea Crítica de Progreso (véase el Ejemplo 9 de la presente solicitud).

Los efectos ansiolíticos son efectos que conducen a sensaciones de alivio del temor, la aprensión o la preocupación.

- 10 La depresión se define como un estado de la mente caracterizado por sensaciones severas y persistentes de pérdida de placer.

El término comportamiento sexual se utiliza en esta memoria como sinónimo de la libido.

- 15 En WO02/46210 se describe un método para aumentar el nivel de triptófano en hidrolizados de proteína de lactosuero. En el método utilizado, el lactosuero se hidroliza primeramente a pH ácido por una o más proteasas ácidas, preferiblemente por una pepsina, renina, proteasa ácida fúngica, quimosina, papaína, bromelaina, quimopapaína o ficina. Las condiciones preferidas de incubación están comprendidas entre pH 1,5 y 3,5 y se eligieron para generar péptidos que tienen una naturaleza hidrófoba. La hidrólisis se lleva a cabo deliberadamente de tal modo que los residuos triptófano llegan a incorporarse en péptidos hidrófobos de gran tamaño. Un número mucho menor de residuos triptófano están presentes en los péptidos pequeños, más solubles en agua. En un paso de proceso subsiguiente, el pH se eleva a 4,0 hasta 6,0 a fin de promover la precipitación de estos grandes péptidos que contienen triptófano, facilitando con ello su recuperación selectiva del hidrolizado de lactosuero. Sin embargo, el proceso tal como se describe presenta varios inconvenientes. El triptófano se obtiene formando parte de péptidos grandes, insolubles en medio ácido, lo que implica que la aplicación, por ejemplo, en bebidas ácidas sería problemática. Además del hecho de que el triptófano está presente en péptidos relativamente grandes, la absorción de triptófano en la sangre se retardará limitando con ello las posibilidades de aplicación de la preparación como un ingrediente de alimentos o bebidas, especialmente en combinación con otras proteínas. Otra desventaja del uso de tales péptidos grandes es que dichos péptidos pueden dar lugar a reacciones alérgicas. Tales reacciones a las proteínas del lactosuero son bien conocidas.

- 20 La presente invención resuelve estas desventajas por describir un proceso de hidrólisis sencillo, que comienza con una proteína que está disponible industrialmente y se caracteriza por una ratio Trp/LNAA elevada. El presente proceso tiene un rendimiento en triptófano mayor que 30% basado en el triptófano de las proteínas y genera una composición de péptidos solubles en agua que comprende triptófano. El hecho de que la mayor parte de los residuos triptófano está comprendida en di- y tripéptidos, implica una absorción inmediata en el torrente sanguíneo. Como se expondrá, esta propiedad permite la incorporación del hidrolizado en una mayor diversidad de productos alimenticios o neutracéuticos. De modo muy sorprendente, la presente invención describe también que después del consumo oral, el hidrolizado puede generar ratios Trp/LNAA en plasma sanguíneo mayores que la ratio Trp/LNAA del hidrolizado actual. Finalmente, la mixtura de péptidos que contienen triptófano se caracteriza también por una antigenicidad muy baja.

- 30 De acuerdo con la presente invención, se utiliza lisozima de huevo de gallina como sustrato conveniente para proporcionar preparaciones con una ratio Trp/LNAA alta. La lisozima está presente en la clara de huevo en una concentración de 3-4%. Aprovechando la ventaja de su punto isoelectrico excepcionalmente alto, la lisozima se aísla industrialmente a partir de clara de huevo utilizando un paso simple de purificación cromatográfica de cationes. El producto resultante es prácticamente puro y este producto industrialmente disponible tiene un contenido molecular de triptófano de 7,8% y una ratio molecular Trp/LNAA de al menos 0,15. Así, la lisozima pura tiene una ratio Trp/LNAA que es significativamente mayor que la alfa-lactoalbúmina y/o beta-lactoglobulina puras. Por consiguiente, el hidrolizado de lisozima tiene preferiblemente una ratio molar Trp/LNAA que es mayor que 0,15, siendo más preferiblemente la ratio Trp/LNAA mayor que 0,20, siendo más preferiblemente aún la ratio Trp/LNAA mayor que 0,23, siendo aún más preferiblemente la ratio Trp/LNAA mayor que 0,25, y siendo muy preferiblemente la ratio Trp/LNAA mayor que 0,30. En general, la ratio molar Trp/LNAA es inferior a 3,0. Como tal, la lisozima representa un punto de partida preferido para péptidos o composiciones que contienen triptófano. La lisozima (EC 3.2.1.17) es una enzima capaz de hidrolizar enlaces específicos de peptidoglicanos en las paredes de las células bacterianas, conduciendo a la lisis de las células. Debido a su efecto bactericida, la lisozima juega un papel importante en las defensas del hospedador por prevenir las infecciones. En condiciones fisiológicas, la molécula de lisozima es muy resistente al ataque proteolítico. Esta resistencia inusual puede explicarse sobre bases evolutivas: dado que las bacterias invasoras son capaces de excretar una gran diversidad de proteasas, una molécula de lisozima sensible a tales proteasas se desactivaría rápidamente. Su resistencia a las proteasas se ha ilustrado para, entre otras, lisozimas del estómago de los rumiantes (Dobson et al, J. Biol Chem. 1984, 259 (18) 11607-11616). Desde un punto de vista estructural, puede esperarse que la presencia de cuatro enlaces disulfuro en la molécula contribuya a la resistencia de la lisozima a las proteasas. Sobre la base de los datos presentados en el Ejemplo 1 de la presente solicitud, la lisozima de

huevo de gallina puede considerarse tan resistente al ataque proteolítico que es improbable que la molécula pueda ser digerida eficientemente en la parte relevante del tracto intestinal humano. La consecuencia de esta resistencia a las proteasas es que, a pesar de su ratio Trp/LNAA muy atractiva, la lisozima intacta no es una fuente adecuada para aumentar los niveles de triptófano en plasma, debido simplemente a que los residuos triptófano no se liberan en las condiciones fisiológicas existentes en el tracto gastrointestinal.

Después de la ingestión en la dieta, las proteínas presentes en los alimentos se hidrolizan gradualmente a fragmentos más pequeños y son transportadas luego a través de la pared del intestino delgado y absorbidas en la sangre. En el tracto gastrointestinal, cierto número de diferentes proteasas que se originan en el estómago, el páncreas y el intestino delgado son activas para hidrolizar las proteínas dietéticas. Las endoproteasas tales como pepsina, tripsina y quimotripsina escinden las proteínas de peso molecular elevado en oligopéptidos más pequeños. Estos oligopéptidos son hidrolizados luego adicionalmente por cierto número de otras enzimas tales como di- y tripeptidil-peptidasas para producir di- y tripéptidos y por las amino- y carboxipeptidasas para producir aminoácidos libres. Los sistemas portadores específicos para el transporte de aminoácidos libres o di- y tripéptidos son responsables de un transporte eficiente a través de la pared intestinal al torrente sanguíneo. Después de la ingestión en la dieta, los aminoácidos libres, di- y tripéptidos se incorporan inmediatamente en el torrente sanguíneo. Los péptidos mayores que tripéptidos requieren escisión enzimática adicional para permitir su absorción.

Se ha encontrado que el hidrolizado es eficaz también si se incorpora en matrices de alimentos que tienen contenidos elevados de proteínas como se presentan, por ejemplo, en los productos lácteos. Esto es sumamente sorprendente, dado que las matrices de los alimentos que contienen proteínas representan cargas altas de LNAA y por consiguiente puede esperarse que reduzcan el efecto de los productos con ratios Trp/LNAA altas. Una posible explicación para este fenómeno inesperado es que los productos alimenticios usuales incorporan proteínas intactas, más bien que proteínas hidrolizadas extensivamente. Una distribución de tamaños típica de un hidrolizado de acuerdo con la invención se presenta en la Figura 3. De acuerdo con esta figura, la mayoría de los péptidos que incorporan triptófano y tirosina tienen un peso molecular inferior a 500 Da. Teniendo en cuenta el peso molecular muy alto del triptófano (MW = 186) y la tirosina (MW = 163) y el hecho de que sólo están presentes niveles muy bajos de triptófano libre, la implicación es que la mayoría de estos péptidos serán tri- o dipéptidos. Dado que el triptófano tiene una absorción molar mucho mayor que la tirosina a la longitud de onda utilizada, los valores pico corresponderán principalmente a péptidos que incorporan triptófano.

Dado que los di- y tripéptidos que contienen triptófano se absorben mucho más rápidamente que, por ejemplo, la gran cantidad de LNAA's presentada por las proteínas no hidrolizadas de la matriz, los inventores suponen que esta es la razón de que incluso en presencia de grandes cantidades de proteínas de la matriz puedan obtenerse ratios Trp/LNAA elevadas en plasma. Dicha explicación es particularmente relevante para las matrices de alimentos que incorporan caseínas y proteínas de cereales dado que dichas proteínas exhiben una solubilidad escasa en las condiciones ácidas del estómago. Sin embargo, ello es aplicable también a matrices que incorporan proteínas intactas más solubles tales como las proteínas del lactosuero, dado que incluso la digestión gastro-intestinal de tales proteínas es relativamente lenta, por lo que la incorporación de los péptidos resultantes se ve también significativamente retardada en comparación con los di- y tripéptidos que contienen triptófano. De acuerdo con los datos presentados en el Ejemplo 6, dicho retardo es entre 30 y 60 minutos: suficientemente largo para absorber todos los di- y tripéptidos que contienen triptófano. Por esta razón, la absorción de alimentos proteínicos o que contienen proteínas puede tener lugar al mismo tiempo o prácticamente al mismo tiempo que los péptidos solubles en agua. Prácticamente al mismo tiempo significa que la absorción de los péptidos tiene lugar dentro de 60 minutos, preferiblemente 30 minutos después de la absorción de la proteína.

Resulta interesante que los datos experimentales actuales de los autores de la invención parecen indicar también que el hidrolizado puede generar ratios Trp/LNAA en la sangre de voluntarios humanos que son mayores que la ratio Trp/LNAA del hidrolizado. Aunque un fenómeno de este tipo es desconocido y de acuerdo con el mejor conocimiento de los inventores no existe ninguna explicación aceptada para este efecto, se cree que ello puede estar causado por el contenido extremadamente alto de arginina de la molécula de lisozima. La hipótesis de trabajo aquí planteada se describe en esta memoria para explicar los datos experimentales presentados en los Ejemplos. Esta hipótesis se utiliza para exponer la presente intuición de los inventores, pero la presente invención no está ligada o limitada en modo alguno a esta hipótesis. Por tanto, la presente invención se mantiene en pie con indiferencia de la corrección de la hipótesis. Un aumento de insulina en la sangre estimula la absorción de los aminoácidos de la sangre en el tejido periférico, especialmente el tejido muscular. Sin embargo, el triptófano escapa en gran parte de esta ruta debido al hecho de que, en la sangre, el triptófano está unido a la proteína albúmina del plasma. Como consecuencia, los niveles incrementados de insulina reducen las concentraciones de LNAA, pero no de triptófano, aumentando así la ratio Trp/LNAA en la sangre. Dado que la ingestión de carbohidratos provoca la secreción de insulina y estimula la absorción de LNAA en los tejidos periféricos y notablemente en los músculos, los ratios Trp/LNAA en plasma se incrementan por la ingestión de carbohidratos (Fernstrom y Wurtman, 1972, Metabolism, Vol. 21, No. 4, 337-342). Aparte de la ingestión de carbohidratos, se sabe también que la secreción de insulina es estimulada por aminoácidos particulares. Si los niveles de nitrógeno amínico en plasma resultantes de la infusión de los aminoácidos individuales son muy similares, las respuestas de insulina varían considerablemente. Floyd et al (J. Clin. Invest. 45 (9): 1487-502), establecieron una respuesta decreciente a la insulina para los aminoácidos arginina > lisina > leucina > fenilalanina > valina > metionina. Teniendo en cuenta el hecho de que la lisozima es particularmente rica en el ami-

noácido arginina, es tentador especular que un efecto estimulador de insulina desencadenado por la arginina conduce a las ratios Trp/LNAA altas. Dado que los carbohidratos son conocidos por su efecto estimulador de insulina, los hidrolizados se formulan preferiblemente en combinación con carbohidratos.

5 La lisozima de huevo de gallina se (pre)hidroliza enzimáticamente en un proceso industrial, es decir la lisozima de huevo de gallina se proporciona en la forma de un hidrolizado o un hidrolizado enriquecido. Ofrecida en la forma de dicho hidrolizado (enriquecido), la absorción intestinal de péptidos que contienen triptófano se facilita notablemente. En otra realización de la presente solicitud, la lisozima de huevo de gallina se convierte en un hidrolizado o hidrolizado enriquecido que comprende una población de péptidos que contienen triptófano de la cual más del 50%, preferiblemente más del 60%, más preferiblemente más de 75% de los péptidos presentes tienen un peso molecular inferior a 500 Da. Preferiblemente, dicho hidrolizado (enriquecido) no contiene más de 1% en peso (basado en materia seca) de triptófano libre. El análisis de pesos moleculares de los péptidos que comprenden triptófano presentes en el hidrolizado se realiza como se describe en la sección Materiales y Métodos de la presente solicitud, y se ilustra en la Figura 3. Una ventaja importante de lo último es que el triptófano comprendido en di- y tripéptidos se transporta a través de la pared intestinal al torrente sanguíneo inmediatamente después del consumo oral. Como consecuencia, los niveles de triptófano en plasma se incrementan casi instantáneamente, con un efecto directo sobre los niveles cerebrales de serotonina. De modo totalmente sorprendente, los datos presentados en el Ejemplo 6 de la presente solicitud demuestran que la eficacia de los residuos triptófano presentados en la forma de estos di- y tripéptidos es aún mayor que la del triptófano libre. Esta observación hace resaltar las ventajas ofrecidas por la presente invención.

20 En otra realización adicional de la presente solicitud, el hidrolizado de lisozima de huevo de gallina se fracciona a fin de aumentar el contenido de triptófano de una fracción del hidrolizado. Esta fracción o hidrolizado enriquecido tiene preferiblemente una ratio Trp/LNAA incrementada en comparación con el hidrolizado antes del fraccionamiento. Se prefiere el enriquecimiento del hidrolizado o hidrolizado enriquecido con triptófano libre adicional. En una opción preferida para preparar dicho hidrolizado enriquecido, se hace uso de la observación realizada por los inventores, según la cual la lisozima incorpora una cantidad singularmente alta de los residuos básicos arginina y lisina. Sorprendentemente, y como resultado de las condiciones de incubación de enzimas seleccionadas, es decir la elección de una endoproteasa que tiene la preferencia de escisión adecuada (tal como subtilisina) en combinación con condiciones de incubación que producen una cantidad elevada de di- y tripéptidos que incorporan triptófano pero prácticamente nada de residuos arginina o lisina, es posible producir el hidrolizado de lisozima enriquecido de acuerdo con la invención. Así pues, los péptidos que contienen LNAA que incorporan residuos arginina o lisina pueden separarse de los péptidos que contienen triptófano que no poseen tales residuos básicos. Por ejemplo, ajustando el pH del hidrolizado a un valor comprendido entre 4 y 6, más preferiblemente entre 5,0 y 5,5, los péptidos sin dicho residuo básico no tendrán carga alguna y por tanto, tendrán un carácter hidrófilo reducido. Estas características pueden ser aprovechadas ventajosamente por los inventores, por ejemplo en un proceso de separación cromatográfico o de otro tipo para eliminar selectivamente una gran proporción de los péptidos que contienen arginina o lisina. Como resultado, el contenido de péptidos que contienen triptófano se incrementa en un grado espectacular y, opcionalmente la ratio Trp/LNAA de este hidrolizado enriquecido. Los péptidos cargados que incorporan arginina o lisina pueden separarse por técnicas conocidas tales como cromatografía iónica, cromatografía de interacción hidrófoba o electrodialisis. Un antecedente práctico en cuanto al uso de tales características en la separación cromatográfica de los péptidos relevantes, puede encontrarse, entre otros lugares, en la obra Protein Purification Handbook (publicado por Amersham Pharmacia Biotech, actualmente GE Healthcare Bio-Sciences, Diegem, Bélgica). En una ruta de purificación aún más avanzada hacia preparaciones que combinan un contenido elevado de triptófano con una ratio Trp/LNAA alta, se utiliza ventajosamente la presencia de aminoácidos con grupos laterales ácidos tales como residuos glutamato (Glu) y aspartato (Asp) en la lisozima. En este método, el pH del hidrolizado de lisozima se ajusta primeramente a 3,0 y se cromatografía luego sobre una resina catiónica. A este valor de pH, los péptidos que incorporan un Glu o Asp avanzarán a lo largo de la columna, mientras que otros péptidos quedarán fijados. Una elución subsiguiente con un tampón de pH 5 desorberá todos los péptidos fijados sin un residuo lisina o arginina como se ha descrito. La mayor parte de los péptidos que contienen triptófano se encontrarán en esta fracción desorbida. Los péptidos fijados restantes se retiran luego de la columna por elución con un tampón que tiene un valor de pH aún mayor. Este elegante método se ilustra en el Ejemplo 4 de la presente solicitud.

Aunque para la presente invención se utilizan preferiblemente cromatografía de intercambio iónico y/o cromatografía de interacción hidrófoba, están también disponibles otros métodos de separación cromatográfica adecuados que comprenden cromatografía de afinidad y cromatografía de exclusión por tamaño. La recuperación de los péptidos enriquecidos en triptófano a partir de las fracciones acuosas resultantes puede realizarse por métodos que son conocidos en la técnica. Con objeto de obtener productos concentrados y estables al almacenamiento, la recuperación incorpora preferiblemente un paso de evaporación y secado (pulverización). Asimismo, procesos de nanofiltración y extracción que implican disolventes orgánicos seguidos por pasos de evaporación/precipitación presentan opciones para la purificación deseada. La recuperación de los péptidos enriquecidos en triptófano a partir de disolventes orgánicos se lleva a cabo preferiblemente por evaporación del disolvente.

60 WO 2006/009448 proporciona hidrolizados de proteínas obtenidos a partir de proteínas de huevo de gallina que tienen propiedades antihipertensivas, así como productos alimenticios y suplementos alimenticios que comprenden estos hidrolizados. Este documento divulga la preparación de un gran número de hidrolizados, que incluyen los ob-

- tenidos a partir de lisozima de huevo de gallina. Todos estos hidrolizados están orientados a reducir la presión sanguínea o prevenir las subidas de presión sanguínea después de ingestión oral en humanos. WO 2006/009448 describe también la preparación de hidrolizados de lisozima obtenidos en condiciones alcalinas utilizando subtilisina (EC3.4.21.62; nombres comerciales Alcalase o Protex). Conforme a los altos grados de hidrólisis que se obtienen, estos hidrolizados de lisozima contienen una gran proporción de péptidos con un peso molecular inferior a 500 Da. Sin embargo, en ningún punto del texto de WO 2006/009448 se hace referencia al hecho de que la lisozima es una fuente de proteínas que tiene un elevado contenido de triptófano que puede afectar positivamente a los niveles cerebrales de serotonina. Tampoco se menciona que los hidrolizados de lisozima comprenden péptidos solubles en agua que incorporan una elevada cantidad de triptófano y una cantidad relativamente baja de LNAA. WO 2006/009448 no menciona tampoco el alto contenido de arginina y lisina de la lisozima o los hidrolizados de lisozima. Los autores de esta invención han encontrado que, basándose en los datos expuestos en la presente solicitud, el alto contenido de triptófano de la molécula de lisozima en combinación con la presencia ubicua de arginina y lisina hace de la lisozima la materia prima perfecta para una generación in vivo de ratios Trp/LNAA altas. Además, el texto de WO 2006/009448 no menciona las ventajas ofrecidas por el presente hidrolizado en su consumo conjunto con otros alimentos que contienen proteínas. Aparte del uso de filtros de membrana, el texto de WO 2006/009448 no menciona tampoco métodos para obtener fracciones peptídicas a partir de estos hidrolizados que tienen composiciones seleccionadas de aminoácidos o la utilización de métodos específicos para aumentar los contenidos de triptófano o aumentar las ratios Trp/LNAA. Adicionalmente, no se registra la ventaja de ofrecer un hidrolizado de lisozima altamente degradado e hipoalergénico.
- A pesar del hecho de que la lisozima resulta ser sumamente resistente a la hidrólisis proteolítica en condiciones fisiológicas, es decir a un pH ácido utilizando pepsina, tripsina y quimotripsina como proteasas, los hidrolizados de lisozima pueden obtenerse también en tales condiciones ácidas menos favorables. Sin embargo, en dichas condiciones se requieren condiciones de incubación relativamente severas, tales como concentraciones mucho mayores de enzimas, temperaturas más altas y opcionalmente endoproteasas adicionales.
- Los datos presentados en el Ejemplo 4 de la presente solicitud indican que el hidrolizado de lisozima obtenido por incubación de lisozima a un pH alcalino con subtilisina es particularmente rico en el dipéptido Ala-Trp (AW). Este descubrimiento sugiere que un dipéptido AW sintetizado químicamente podría proporcionar una alternativa adecuada para el presente hidrolizado de lisozima. Aunque el uso de un dipéptido sintético tiene inconvenientes legislativos obvios, ventajas importantes son su eficacia en costes y su ratio Trp/LNAA ideal. Teóricamente, están disponibles 20 dipéptidos que contienen triptófano diferentes, pero las investigaciones de los autores de la presente invención han demostrado que los dipéptidos Ala-Trp (AW) y Ser-Trp (SW) representan opciones particularmente preferidas para aumentar las ratios Trp/LNAA en plasma por la vía de un dipéptido sintético. La producción de los dipéptidos AW y SW por síntesis química es posible utilizando técnicas convencionales como las descritas por ejemplo en "Peptides: Chemistry and Biology" por N. Sewald y H.D. Jakubke, Eds. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2002, Capítulo 4. Métodos particulares de síntesis química de péptidos eficaces en costes, adecuados para producción en gran escala están basados en el uso de cloroformiatos de alquilo o cloruro de pivaloilo para la activación del grupo carboxílico combinada con el uso de ésteres metílicos para la protección del terminal C y grupos benciloxicarbonilo (Z) o terc-butiloxicarbonilo para protección de N. Un procedimiento detallado para una síntesis eficaz en costes del dipéptido SW se proporciona en el Ejemplo 5.
- Cuando se tienen disponibles hidrolizados de lisozima, se contemplan otras aplicaciones nuevas y sorprendentes que poseen ventajas técnicas y económicas.
- Una nueva aplicación podría ser utilización sería la incorporación de los péptidos en diversos productos de fórmulas para niños. La leche de vaca contiene 20% de proteína de lactosuero y la leche humana 40 a 60%. Como consecuencia, la leche de vaca contiene menos alfa-lactoalbúmina y por consiguiente triptófano que la leche humana. Los niños normales a término se alimentan usualmente con formas basadas en leche de vaca, productos que no proporcionan un perfil de aminoácidos equivalente al de la leche materna. Aunque las consecuencias de un suministro insuficiente de triptófano no se conocen plenamente, los productos de fórmulas para niños ricas en triptófano pueden presentar efectos beneficiosos sobre la eficiencia consciente y el comienzo y la calidad del sueño del niño. Una indicación clara de que un nivel elevado de triptófano en plasma promueve un comienzo rápido de un sueño tranquilo en los recién nacidos sanos fue proporcionada por Yogman y Zeisel en N. Engl J Med., de 10 de noviembre de 1983; 309 (19): 1147-1149. De acuerdo con ello, se describen composiciones para productos de fórmulas para niños en los cuales el nivel de triptófano se ha incrementado utilizando un hidrolizado (enriquecido) obtenido a partir de lisozima (de huevo de gallina). Preferiblemente, la lisozima (de huevo de gallina) utilizada en tales productos de fórmula para niños se hidroliza en tal proporción que se evitan los problemas de alergenicidad, es decir la lisozima de huevo de gallina se proporciona preferiblemente en la forma de un hidrolizado hipoalergénico.
- Los hidrolizados (enriquecidos) pueden utilizarse en productos sustitutivos de comida. Por ejemplo, WO 2005/023017 describe las ventajas de la gelatina en dosis altas como componente adecuado en productos sustitutivos de comida. Si bien proporciona propiedades organolépticas excelentes, la gelatina no proporciona el balance de aminoácidos requerido; por ejemplo, la misma no incorpora el aminoácido esencial triptófano. Así pues, con objeto de llegar a una composición que tenga el equilibrio de aminoácidos adecuado tal como se requiere por la Directiva de la EC 96/8/EC, tiene que añadirse triptófano a tales composiciones que contienen gelatina. En WO 2005/023017

se añade preferiblemente triptófano en la forma de proteína rica en triptófano, v.g., polvo de clara de huevo o polvo de huevo entero. Se ha encontrado ahora que los hidrolizados que contienen triptófano ofrecen una solución mejorada a este problema, dado que estos hidrolizados suministran triptófano en una forma mucho más concentrada. Además, la lisozima propiamente dicha contiene todos los aminoácidos esenciales en la cantidad requerida, y como tal es una proteína nutricionalmente completa que se ajusta idealmente como sustitutivo de comida.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, los hidrolizados de acuerdo con la invención se utilizan para estimular el apetito. De modo sorprendente, los autores de la invención han encontrado que preparaciones con una ratio Trp/LNAA alta estimularán los niveles de grelina en plasma. La grelina es conocida como una hormona de "hambre" y se ha demostrado que la estimulación de la producción de grelina aumenta la ingestión de comida y el peso corporal en el hombre (Wren et al., 2001, J Clin Endocrinol Metab 86, 5992-5995). Debido a este efecto inesperado, los hidrolizados ofrecen ventajas, por ejemplo, en las comidas de clínica, dado que las personas enfermas críticas tienden a abstenerse de todo tipo de comida ralentizando con ello su recuperación.

De acuerdo con otro aspecto adicional de la invención, los hidrolizados se utilizan para mejorar el comienzo y la calidad del sueño en niños, muchachos y adultos. Los problemas del sueño son muy prevalentes entre individuos que pertenecen a diversos grupos de edad y están asociados con trastornos médicos. Los hidrolizados son útiles para tratar los problemas del sueño en general, pero constituyen una herramienta útil para resolver los problemas relacionados con perturbaciones cognitivas, psicológicas, sociales y conductuales. Ejemplos son el establecimiento de una higiene del sueño satisfactoria, resolviendo una asociación de comienzo del sueño o un trastorno del sueño de ritmo circadiano. Los productos pueden ser útiles también en la mejora del comienzo y la calidad del sueño y el estado mental de, por ejemplo, los pacientes de fibromialgia. El síndrome de fibromialgia es un síndrome de dolor crónico que está relacionado con comienzo y calidad del sueño gravemente alterados y estrés emocional. Se ha encontrado que una ingestión regular de los hidrolizados enriquecidos en triptófano mejora el comienzo y la calidad del sueño de individuos que padecen problemas de sueño en general.

Los hidrolizados que contienen triptófano ofrecen ventajas adicionales tales como el suministro de aminoácidos (semi-)esenciales. La lisozima no sólo tiene un nivel elevado de triptófano sino que incorpora también un número significativo de residuos tirosina. La tirosina es el precursor del neurotransmisor dopamina y es sabido que los niveles de tirosina en plasma afectan a los niveles de dopamina en el cerebro. El hidrolizado de lisozima no sólo contiene menos LNAA's que otros péptidos ricos en triptófano conocidos, sino que contiene también menos aminoácidos de cadena ramificada (BCAA's) que otros péptidos ricos en triptófano conocidos. Esto es importante, dado que se sabe que los BCAA's disminuyen la disponibilidad en plasma del precursor de dopamina tirosina. Así, su alta ratio Trp/LNAA en combinación con su alta ratio Tyr/BCAA hace de la lisozima una molécula singular. Por esta razón, el hidrolizado de lisozima está muy oportunamente clasificado como "alimento para el cerebro", es decir, para el suministro de los aminoácidos esenciales requeridos para los niveles apropiados de neurotransmisores. El sistema de la dopamina es conocido por su papel crítico en la mediación de la recompensa y la motivación y sus efectos sobre concentración, memoria, estado de alerta, atención, resolución de problemas y coordinación psicomotora. Como se ilustra en el Ejemplo 9, la ingestión del hidrolizado de lisozima tiene efectos beneficiosos sobre la vigilancia, el estado de alerta, la concentración y la coordinación psicomotora. Este descubrimiento demuestra que puede esperarse que el hidrolizado de lisozima estimule no sólo el sistema de la serotonina, sino también el sistema de la dopamina.

Varios grupos de individuos pueden beneficiarse de este descubrimiento. Por ejemplo, las mujeres durante sus años de la menopausia se quejan en general en cuanto a su capacidad reducida para la resolución de problemas, atribuyéndolo a una incapacidad de concentrarse. Por esta razón, el hidrolizado de lisozima es especialmente adecuado para combatir estos problemas en las mujeres de este grupo de edad. En la categoría de las mujeres jóvenes y de edad intermedia, el síndrome premenstrual es muy común. El síndrome se caracteriza por una gran diversidad de síntomas, pero las quejas acerca de depresión e inestabilidad del estado de ánimo ocurren frecuentemente. Para combatir estos fenómenos, se prescriben frecuentemente inhibidores selectivos de la reabsorción de serotonina tales como fluoxetina y, en las mujeres con síntomas más moderados, adaptaciones dietéticas y prevención del estrés. Sobre la base del resultado de los experimentos descritos en los Ejemplos 6 y 9 de la presente solicitud, el hidrolizado de lisozima constituye un tratamiento excelente, especialmente para dichos casos moderados. Además, una dopamina insuficiente se ha asociado con el trastorno de hiperactividad con déficit de atención (ADHD), por lo que puede esperarse que los síntomas de este trastorno sean aliviados por el hidrolizado de lisozima. El descubrimiento por los autores de la presente invención de que los efectos beneficiosos sobre la eficiencia post-estrés son especialmente prominentes en los individuos resistentes al estrés es sorprendente. Una posible explicación puede ser que las personas estresadas, con un sistema de serotonina (hiper-)activo, necesitan el triptófano de las bebidas para reponer sus almacenes de serotonina y por tanto no pueden utilizar este triptófano para mejorar su rendimiento en los trabajos. De acuerdo con dicha línea de razonamiento, las personas resistentes al estrés sin un sistema serotoninérgico hiperactivo no necesitan triptófano para reponer sus almacenes de serotonina y pueden utilizarlo para mejorar su rendimiento post-estrés. Una explicación alternativa puede ser que estos efectos sean debidos de hecho a un efecto estimulador de procesos dopaminérgicos. La síntesis de la dopamina puede aumentarse por ingredientes de alimentos ricos en tirosina, particularmente si se combinan con niveles bajos de aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs). Estas hipótesis de trabajo se describen en esta memoria para explicar los datos experimentales que se muestran en los Ejemplos y se utilizan para dar a conocer la presente intuición de los inventores. Sin embargo, la presente invención no está ligada o limitada en modo alguno a estas hipótesis. Por tanto, la presente invención se

mantiene en pie con independencia de la corrección de estas hipótesis. Como se ha indicado en otro lugar, la lisozi-  
ma no sólo tiene un nivel elevado de triptófano sino que incorpora además un número importante de residuos tirosi-  
na.

5 Los hidrolizados (enriquecidos) aumentan también el contenido de cisteína en los productos alimenticios. Aunque no  
se trata de un aminoácido esencial, las concentraciones de cisteína son limitantes en muchos productos alimentici-  
cios. La síntesis endógena de cisteína requiere la presencia de metionina y, al igual que la cisteína, las concentra-  
ciones de metionina son limitantes en muchos productos alimenticios. Las ventajas de un contenido incrementado de  
10 cisteína en los alimentos están relacionadas, entre otras cosas, con el efecto antagonista sobre la homocisteína del  
suero elevando el efecto de la metionina. Este descubrimiento ha sido descrito en WO 03/055335. Los hidrolizados  
de lisozima de acuerdo con la invención se caracterizan también por un alto nivel de cisteína. De hecho, la molécula  
de lisozima contiene aún más residuos cisteína (8) que residuos triptófano (6). A este respecto, los hidrolizados  
constituyen una fuente excelente para aumentar el contenido de cisteína de ciertos productos. Se ha encontrado que  
15 contenidos incrementados de cisteína son importantes para productos tales como las fórmulas para niños. No sólo  
en las fórmulas para niños basadas en caseína o mixturas de caseína y proteínas de lactosuero, sino también para  
productos basados en soja y de hecho para todos los productos ricos en proteínas en los cuales la fuente principal  
de la proteína es proporcionada por una proteína que contiene cantidades relativamente bajas de triptófano o cisteí-  
na. Aparte de los componentes proteínicos de la leche de bovino y gelatina, proteína de maíz, proteína de levadura,  
20 proteína de guisante, proteína de soja y proteína de arroz representan ejemplos de tales proteínas. Adicionalmente,  
los productos de sustitución de comida arriba mencionados que contienen dosis altas de gelatina contienen cantida-  
des inadecuadas de cisteína.

El hidrolizado de proteínas (enriquecido), o la fracción peptídica obtenida de este hidrolizado de proteínas, o un di- o  
tripéptido que comprende triptófano, especialmente SW o AW, puede utilizarse en cualquier forma adecuada tal  
como un alimento o una bebida, como Alimento para Usos Nutricionales Especiales, como suplemento dietético,  
25 como producto neutracéutico, o incluso en piensos o comidas para mascotas. El hidrolizado de lisozima puede añ-  
adirse en cualquier etapa durante el proceso normal de estos productos. Si se utilizan en alimentos o bebidas, se  
prefieren productos con un contenido de proteínas relativamente bajo a fin de mantener la alta ratio Trp/LNAA en la  
sangre después de su consumo. Adicionalmente, se añaden preferentemente carbohidratos a las comidas o bebidas  
que contienen hidrolizado de lisozima a fin de aumentar aún más la elevada ratio Trp/LNAA en sangre después de  
30 su consumo. Productos alimenticios adecuados incluyen v.g., barras de cereales, productos de repostería tales co-  
mo bizcochos y galletas y también alimentos líquidos tales como sopas o polvos para sopa. Aparte de productos  
lácteos tales como leche y yogur, otras bebidas adecuadas abarcan bebidas no alcohólicas y alcohólicas así  
como preparaciones líquidas para adición al agua de beber y alimentos líquidos. Las bebidas no alcohólicas son preferi-  
blemente agua mineral, bebidas para deportes, zumos de frutas, limonadas, té, bebidas concentradas tales como  
35 chutes, bebidas energéticas (por ejemplo bebidas que contienen glucuronolactona, cafeína o taurina) y bebidas  
carbonatadas (por ejemplo refrescos, gaseosas y bebidas de cola). Combinaciones preferidas del hidrolizado de  
triptófano son con compuestos recomendados para "nutrición del cerebro" tales como hierro, cinc, magnesio, vitamí-  
nas (especialmente B2, B6, ácido fólico y C), grasas o ácidos grasos omega-3 y DHA, glucosa, GABA, colina, fosfa-  
tidil-serina, co-enzima Q10, creatina, taurina y 5-HTP, o con compuestos recomendados para alivio del estrés o la  
40 depresión tales como valeriana, chocolate, hierba de San Juan, 5-HTP, fosfatidil-serina, alcohol, bálsamo de limón,  
té verde o extractos de té verde, manzanilla o S-adenosil-metionina, o con compuestos recomendados para mejorar  
el estado de alerta tales como cafeína, guarana, ginseng, ginkgo biloba, hierba de San Juan, y 5-HTP o con com-  
puestos recomendados para mejora del estado de ánimo tales como GABA, 5-HTP, PEA, té verde o extractos de té  
verde, ginkgo biloba, Salvia o S-adenosil-metionina o con compuestos recomendados para mejora del sueño tales  
45 como péptidos lácteos, triptófano libre, péptidos opioides o melatonina. Ejemplos de Alimentos para Usos Nutriciona-  
les Especiales incluyen las categorías de alimentos para deportes, alimentos adelgazantes, fórmulas para niños y  
alimentos de clínica. El término suplemento dietético como se utiliza en esta memoria denota un producto ingerido  
por boca que contiene un compuesto o mixtura de compuestos destinados a actuar como suplemento de la dieta. El  
compuesto o mixtura de compuestos en estos productos puede incluir: vitaminas, minerales, hierbas u otros produc-  
tos botánicos y aminoácidos. Los suplementos dietéticos pueden ser también extractos o concentrados, y pueden  
50 encontrarse en muchas formas tales como tabletas, cápsulas, geles blandos, cápsulas de gel, líquidos, o polvos. El  
término neutracéutico como se utiliza en esta memoria denota la utilidad tanto en el campo de aplicación nutricional  
como en el farmacéutico. Las composiciones neutracéuticas pueden encontrarse en cualquier forma que sea ade-  
cuada para administración al cuerpo de los animales con inclusión del cuerpo humano, especialmente en cualquier  
forma que sea convencional para administración oral, v.g., en forma sólida tal como (aditivos/suplementos para)  
55 alimento o pienso, premezcla de alimento o pienso, tabletas, píldoras, gránulos, grageas, cápsulas, y formulaciones  
efervescentes tales como polvos y tabletas, o en forma líquida tal como soluciones, emulsiones o suspensiones  
como v.g. bebidas, pastas y suspensiones aceitosas. Se describen también formulaciones de liberación controlada  
(retardada) que incorporan los hidrolizados. Adicionalmente, puede añadirse un suplemento multivitamínico y mine-  
ral a las composiciones neutracéuticas a fin de obtener una cantidad adecuada de un nutriente esencial, que está  
60 ausente en algunas dietas. El suplemento multi-vitamínico y mineral puede ser útil también para prevención de en-  
fermedades y protección contra pérdidas nutricionales y deficiencias debidas a los patrones de estilo de vida.

Las composiciones pueden utilizarse como un suplemento nutricional, v.g., para mejora del estado de ánimo o para  
la mejora de las funciones cognitivas tales como aprendizaje, memoria, vigilancia y estado de alerta, por ejemplo en

personas de edad avanzada, pero también en gente más joven tales como estudiantes que están preparando exámenes y para personas que participan, por ejemplo, en juegos de ordenador o de Internet. Como se ha mencionado anteriormente, las composiciones son de particular relevancia para las mujeres pre- y post-menopáusicas. Las composiciones son también de relevancia particular para personas que practican deportes; tanto atletas profesionales con esquemas de entrenamiento exigentes, como para personas que practican deportes recreativos, tales como personas que juegan a tenis o golf. Esto significa que la presente invención se refiere al uso de los hidrolizados como se ha indicado arriba y como "mejorador de la condición", es decir como medio para reducir la irritabilidad y el cansancio (reduciendo eventualmente el riesgo de sobreentrenamiento), para reducir, prevenir o aliviar la fatiga física y mental, para favorecer el sueño tranquilo, es decir para actuar contra el insomnio y los trastornos del sueño y mejorar el sueño, y para aumentar la energía en términos más generales, especialmente para aumentar la producción de energía en el cerebro, en individuos enfermos o con salud normal. Además, para mejora de la cognición en general, y en especial para mantenimiento o mejora de la atención y concentración, de la memoria y de la capacidad para recordar, de la capacidad de aprendizaje, del procesamiento del lenguaje, de la resolución de problemas y del funcionamiento intelectual; para mejora de la memoria tanto a corto como a largo plazo; para aumentar el estado de alerta mental; para aumentar la vigilancia mental; para reducir la fatiga mental; para mantener el equilibrio de salud cognitiva, y para mantener una función cognitiva equilibrada. Adicionalmente, la presente invención está relacionada con el uso de los hidrolizados para aumentar el apetito. Si es preciso, para obtener preparaciones eficaces en costes con una ratio Trp/LNAA alta, los hidrolizados comprenden opcionalmente triptófano libre.

### Legendas de las figuras

- 20 Fig. 1. La ratio molar Trp/LNAA en plasma en función del tiempo después del consumo de los productos detallados en el Ejemplo 6. REF = hidrolizado de caseína, ALAC = alfa-lactoalbúmina intacta, Trp = triptófano libre, WEPS = hidrolizado de lisozima enriquecido en triptófano, SYN = dipéptido sintético Ser-Trp.
- 25 Fig. 2. Estado de ánimo negativo (como se mide por el test Perfil de Estados de Ánimo (POMS)) en función del tiempo después del consumo de los productos detallados en el Ejemplo 6. REF = hidrolizado de caseína, ALAC = alfa-lactoalbúmina intacta, Trp = triptófano libre, WEPS = hidrolizado de lisozima enriquecido en triptófano, SYN = dipéptido sintético Ser-Trp.
- 30 Fig. 3. Distribución de tamaños de la fracción de péptidos solubles en agua de un hidrolizado de lisozima. Utilizando el método para determinar la distribución de pesos moleculares de los péptidos y proteínas presentes en los hidrolizados como se detalla en la sección Materiales y Métodos, se analizó un hidrolizado de lisozima preparado de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 3. Las medidas de absorbancia a 214 nm registran la presencia de enlaces peptídicos. Las medidas de absorbancia a 280 nm registran la presencia de las cadenas laterales aromáticas de triptófano y tirosina. Dado que el triptófano tiene una absorptividad molar mucho mayor que la tirosina a esta longitud de onda, los valores pico se refieren principalmente a péptidos que incorporan triptófano.
- 35 Fig. 4. Llegada de flujo del diseño de estudio del experimento descrito en el Ejemplo 9. *Alto*: voluntarios sensibles al estrés; *bajo*: voluntarios resistentes al estrés; *hydr*:: hidrolizado de lisozima rico en Trp; *placebo*: hidrolizado de caseína.
- 40 Fig. 5. Diagrama de flujo de un día típico de estudio del experimento descrito en el Ejemplo 9. *Bebida*: consumo de bebida que contiene hidrolizado rico en Trp o placebo; *sangre*: muestra de sangre para evaluación de los niveles de aminoácidos en plasma; *eficiencia*: tests de eficiencia antes y después de estrés incontrolable; *estrés*: trabajo aritmético.
- 45 Fig. 6. Ratios Trp/LNAA en plasma ( $\mu\text{mol/l}$ ) después de ingestión de placebo (*plc*) o del hidrolizado de lisozima (*Trp-hydr*) del experimento descrito en el Ejemplo 9. *Símbolos negros*: individuos sensibles al estrés; *símbolos blancos*: individuos resistentes al estrés.
- 50 Fig. 7. Resultados del Test del Reloj de Mackworth realizado como se describe en el Ejemplo 9. El número de respuestas correctas (eje vertical) después del consumo de placebo (*plc*; panel del lado izquierdo) o hidrolizado rico en Trp (*Trp-hydr*; panel del lado derecho), antes (*pre-estrés*) o después (*post-estrés*) del trabajo aritmético. *Símbolos negros*: individuos sensibles al estrés; *símbolos blancos*: individuos resistentes al estrés. Dado que se dieron productos de intervención diferentes en días separados, únicamente pueden hacerse comparaciones relevantes entre las condiciones pre-estrés y post-estrés dentro de los mismos tratamiento y día.
- Fig. 8. Resultados del Trabajo Crítico de Progreso realizado como se describe en el Ejemplo 9. El valor lambda CT (que indica el nivel final de complejidad que es alcanzado por los individuos) se expresa después de la ingestión de placebo (*plc*) o hidrolizado rico en Trp (*Trp-hydr*). *Símbolos negros*: individuos sensibles al estrés; *símbolos grises*: individuos resistentes al estrés.

**Materiales y Métodos****Materiales**

La subtilisina bajo el nombre comercial de "Protex 6L" se obtuvo de Genencor (Leiden, Países Bajos), LA pepsina de Sigma y la mixtura de tripsina/quimotripsina (Porcine PEM) de Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca). La lisozima se obtuvo como Delvozyme L (22% de materia seca) de DSM Food Specialities (Delft, Países Bajos). El hidrolizado de caseína ("REF") se obtuvo esencialmente como se describe por Edens et al (J Agric Food Chem, 53 (20) 7950-7957, 2005). El caseinato de sodio se hidrolizó extensivamente con Protex 6L y, después de rebajar el pH a 4,5, con una endoproteasa específica de prolina para alcanzar un DH > 20%. Después de ultrafiltración, el permeabilizado se trató en caliente para desactivar cualesquiera actividades enzimáticas remanentes y finalmente se secó por pulverización. La alfa-lactoalbúmina intacta ("ALAC") se obtuvo como "Biopure" (> 90% alfa-lactoalbúmina) de Davisco Foods International, Inc. (Le Seuer, MN); el hidrolizado de lisozima enriquecido en triptófano ("WEPS") se obtuvo como se describe en el Ejemplo 4; el dipéptido sintético Ser-Trp ("SYN") se obtuvo como se describe en el Ejemplo 5; el triptófano L puro ("TRP") se obtuvo como L-triptófano-400 de Orthica, Almere, Países Bajos.

**SDS-PAGE**

La pureza de las preparaciones de lisozima utilizadas se comprobó por SDS-PAGE. Todos los materiales utilizados para SDS-PAGE y tinción se adquirieron de Invitrogen (Carlsbad, CA, EE.UU.). Las muestras se prepararon utilizando tampón SDS de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes y se separaron en geles Bis-Tris al 12% utilizando el sistema tampón MES-SDS de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. La tinción se realizó utilizando Simply Blue Safe Stain (Collodial Coomassie G250). Antes de la hidrólisis, la lisozima aparecía como una sola banda con un peso molecular de aprox. 14 kDa en el gel.

**Análisis LC/MS/MS**

Se utilizó HPLC utilizando un espectrómetro de masas con trampa iónica (Thermo Electron, Breda, Países Bajos) acoplado a una bomba P4000 (Thermo Electron, Breda, Países Bajos) para determinar la presencia de péptidos que contenían triptófano (principalmente di- y tri-péptidos) en los hidrolizados de proteínas enzimáticas producidos por el proceso de acuerdo con la invención. Los péptidos formados se separaron utilizando una columna Inertsil 3 ODS 3, 3 µm, 150\*2,1 mm (Varian Belgium, Bélgica) en combinación con un gradiente de ácido fórmico al 0,1% en agua Milli Q (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.; solución A) y ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo (Solución B) para elución. El gradiente comenzaba a 100% de solución A, y se mantenía en dicho valor durante 10 minutos, aumentando linealmente hasta 20% B en 25 minutos y volviendo inmediatamente a las condiciones iniciales, manteniéndose así durante 15 minutos para estabilización. El volumen de inyección utilizado era 50 microlitros, el caudal era 200 microlitros por minuto y la temperatura de la columna se mantenía a 55°C. La concentración de proteínas de la muestra inyectada era aprox. 50 microgramos/mililitro. La identificación de los péptidos de interés está basada en el tiempo de retención, la molécula protonizada y la utilización de MS/MS diseñada específicamente para los péptidos de interés, utilizando energía óptima de colisión de aproximadamente 30%. La cuantificación de los péptidos específicos que contienen triptófano se realiza utilizando un método estándar externo. Se utilizó el tetrapéptido VVPP (M = 410,2) para sintonizar sensibilidad óptima en el modo MS y para fragmentación óptima en modo MS/MS, realizando infusión constante de 5 µg/ml, dando como resultado una molécula protonizada en modo MS, y una energía óptima de colisión de aproximadamente 30% en el modo MS/MS, generando una serie de iones B e Y.

Antes de la LC/MS/MS, los hidrolizados enzimáticos de proteínas se centrifugaron a la temperatura ambiente y a 13000 rpm durante 10 minutos, y el sobrenadante se diluyó 1:100 con agua desmineralizada filtrada a través de un equipo de filtración de agua Millipore (agua MilliQ).

**Análisis de aminoácidos**

Los perfiles de aminoácidos en plasma se analizaron como se describe en el Ejemplo 6 por HPLC de acuerdo con van Eijk et al (J. Chromatogr. 1993: 620: 143-148).

Se realizaron análisis de otros aminoácidos de acuerdo con el método PicoTag como se especifica en el manual para operadores del Sistema de Análisis de Aminoácidos de Waters (Milford, MA, EE.UU.). A dicho fin, las muestras se secaron y se derivatizaron directamente utilizando fenilisotiocianato. Los aminoácidos derivatizados presentes se cuantificaron utilizando métodos HPLC como se ha descrito. Dado que durante la hidrólisis ácida usual Trp y Cys se destruyen, se utilizaron métodos especiales para cuantificar estos dos aminoácidos. Para prevenir la degradación de Cys durante la hidrólisis, este aminoácido se oxida primeramente a ácido cisteico utilizando peróxido de hidrógeno y se cuantifica luego. El análisis de triptófano está basado en un procedimiento ligeramente modificado de Waters. En este procedimiento, se seca a vacío una parte alícuota de la solución de péptido y se hidroliza luego durante una hora a 150°C bajo nitrógeno en ácido metanosulfónico 4 M que contiene 0,2% de triptamina. El producto de reacción se cuantifica directamente utilizando HPLC equipada con una columna Alltech Altima C18 y detección por fluorescencia.

Grado de Hidrólisis

El Grado de Hidrólisis (DH) como se obtiene durante la incubación con las diversas mezclas proteolíticas se monitorizó utilizando un test OPA rápido (Nielsen, P.M.; Petersen, D.; Dambmann, C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science* 2001, 66, 642-646).

5 Nitrógeno Kjeldahl

El nitrógeno total Kjeldahl se midió por Análisis de Inyección de Flujo. Utilizando un Sistema de Inyección de Flujo FIASTAR 5000 equipado con una Cassette TKN Method 5000-040, un ordenador Pentium 4 con software SOFIA y un tomamuestras automático Tecator 5027, se cuantificó a 590 nm el amoníaco liberado por las soluciones que contenían proteínas. Una cantidad de muestra correspondiente con el intervalo dinámico del método (0,5-20 mg N/l) se puso en el tubo de digestión junto con ácido sulfúrico de 95-97% y una pastilla Kjeltab sometida a un programa de digestión de 30 minutos a 200°C seguido por 90 minutos a 360°C. Después de la inyección en el sistema FIASTAR 5000, se mide el pico de nitrógeno, a partir del cual puede deducirse la cantidad de proteína medida.

Distribución de pesos moleculares de los péptidos y proteínas presentes en los hidrolizados.

15 El análisis de la distribución de tamaños de péptido de las muestras de proteínas tratadas con proteasa se realizó en un sistema HPLC automático equipado con una bomba de alta presión, un dispositivo de inyección capaz de inyectar muestras de 10-100 microlitros y un detector UV capaz de monitorizar el efluente de la columna a 214 nm.

20 La columna utilizada para este análisis era una Superdex Peptide HR 10/300 GL (Amersham) equilibrada con tampón fosfato de sodio 20 mM/cloruro de sodio 250 mM de pH 7,0. Después de inyectar una muestra (típicamente 50 microlitros) los diversos componentes se eluyeron de la columna con tampón en 90 min a un caudal de 0,5 ml/min. El sistema se calibró utilizando una mezcla de citocromo C (Mw 13500 Da), aprotinina (Mw 6510 Da) y tetra-glicina (Mw 246 Da) como marcadores de peso molecular.

Los ejemplos siguientes ilustran adicionalmente la invención.

**EJEMPLOS**

**Ejemplo 1**

25 ***La lisozima de huevo de gallina no es escindida por pepsina o tripsina/quimotripsina***

30 Para testar su digestibilidad en el tracto gastrointestinal humano, se incubó in vitro lisozima de huevo de gallina con pepsina y con una mezcla de tripsina y quimotripsina. Ambas incubaciones se realizaron en condiciones de pH que son predominantes en el estómago (pepsina) y el duodeno (tripsina/quimotripsina). A dicho fin, se incubó una solución de lisozima al 5% (p/p) con las enzimas (1% p/p enzima a proteína lisozima) durante 2 horas a 37°C. Para prevenir grandes cambios de pH como resultado de la hidrólisis progresiva de la proteína, la incubación se realizó en un tampón Mc Ilvane (ácido cítrico 0,2 M más Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Los bajos valores de DH que se obtienen después de dos horas de hidrólisis a 37°C (véase Tabla 1), demuestran que la molécula de lisozima no puede degradarse en condiciones que mimetizan las condiciones de digestión en el estómago y en el duodeno y yeyuno debido a que puede esperarse una proteólisis con éxito que conduzca a un valor de DH de al menos 10%. Por consiguiente, los residuos triptófano presentes en la molécula de lisozima de huevo de gallina intacta no se liberarán en el tracto gastrointestinal, lo que implica que las moléculas de triptófano presentes en la lisozima de huevo de gallina intacta no pueden contribuir a los niveles de triptófano en plasma.

Tabla 1: Hidrólisis de la lisozima por pepsina y una mezcla tripsina/quimotripsina

Enzima	pH inicial	pH final	DH inicial (%)	DH final (%)
Pepsina	2,8	2,4	=0	2,4
Pepsina	3,6	3,2		<1
Pepsina	4,6	4,3		1,0
Tripsina/quimotripsina	4,6	4,3		<1
Tripsina/quimotripsina	5,9	5,5		<1
Tripsina/quimotripsina	7,2	7,0		1,3

**Ejemplo 2*****La lisozima de huevo de gallina es escindida eficientemente por subtilisina a valores de pH elevados***

Para testar la susceptibilidad de la lisozima a la hidrólisis enzimática a pH no fisiológico y en condiciones enzimáticas, se incubó in vitro una solución de lisozima con una subtilisina microbiana (EC3.4.21.62) en condiciones de pH alcalino. A tal fin, se incubó una solución de lisozima al 5% (p/p) a pH 7,0, 8,0 y 9,0 con 12,5 microlitros de Protex 6L por gramo de proteína lisozima presente. La incubación se llevó a cabo durante 3 horas a 60°C con un ajuste constante del pH utilizando NaOH 1 M. Las incubaciones produjeron soluciones ligeramente turbias sin cantidad alguna de precipitados significativa. Después de un paso de calentamiento para desactivar la actividad de subtilisina, se midieron los valores DH de las diversas incubaciones de acuerdo con el protocolo descrito en la sección Materiales y Métodos. En contraste con los resultados obtenidos en condiciones fisiológicas (véase el Ejemplo 1), las condiciones de incubación alcalina usando subtilisina dan como resultado una hidrólisis completa de la lisozima. La incubación a pH 7,0 producía un DH de 6,3, la incubación a pH 8,0 un DH de 11,2 y la incubación a pH 9,0 un DH de 16,4. Un análisis subsiguiente SDS-PAGE de los productos de reacción indicó que la molécula entera de lisozima se degradaba, es decir no sobrevivía fragmento alguno de peso molecular alto a la incubación con subtilisina. Adicionalmente, el análisis HPLC del hidrolizado en una columna Crownpak CR+ (Daicel) reveló que no tenía lugar racemización significativa alguna de los péptidos que contenían triptófano, ni siquiera después de calentamiento prolongado a pH 9,0.

**Ejemplo 3*****Hidrólisis de la lisozima utilizando Protex e identidad de los péptidos formados***

Una solución que contenía 10% (p/p) de lisozima pura se ajustó a pH 8,2 utilizando NaOH y se calentó a 52°C. La hidrólisis se inició por adición de 25 microlitros de Protex/g de proteína presente. Bajo agitación continua y manteniendo el pH a 8,2, se continuó la hidrólisis durante 5,5 horas para producir una solución prácticamente clara sin un precipitado visible. Después de un paso de calentamiento para desactivar la actividad de Protex, se tomó una muestra para análisis del DH. El DH de la solución resultó ser prácticamente 30%. La solución tratada térmicamente se sometió a ultrafiltración sobre un filtro de 10 kDa para producir un líquido completamente claro. Este líquido claro se utilizó para análisis LC/MS, para distribución de los pesos moleculares de los péptidos y proteínas presentes, y para cromatografía de intercambio iónico.

Para conseguir una impresión de la distribución de pesos moleculares de los péptidos y proteínas presentes, se sometió el líquido claro a un análisis de tamaños moleculares como se describe en la sección Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos (véase Figura 3), indican claramente que prácticamente todos los péptidos que incorporan aminoácidos con una cadena lateral aromática (es decir triptófano, tirosina y fenilalanina) tienen un peso molecular inferior a 500 kDa. Teniendo en cuenta el alto peso molecular de estos aminoácidos, la implicación es que la mayoría de estos pequeños péptidos son tri- o dipéptidos.

El análisis LC/MS se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento que se describe en la sección Materiales y Métodos. Por selección de los péptidos que contenían triptófano ("W"), pudieron detectarse péptidos AW, GNW, WIR, NAW, WVA, VAW, AWR, SLGNW y cantidades menores de WW y SRWW. Se comprobó que el nivel de triptófano libre en el hidrolizado después de la incubación representaba menos de 1% del triptófano total (lisozima) presente.

Dado que los di- y tripéptidos son fácilmente absorbidos por los transportadores peptídicos presentes en la pared intestinal, hay pocas dudas de que los residuos triptófano presentes en dichos péptidos serán absorbidos rápidamente y conducirán a niveles de triptófano en plasma incrementados después de la ingestión oral del presente hidrolizado de lisozima.

**Ejemplo 4*****Aumento del contenido de triptófano del hidrolizado***

La lisozima incorpora una cantidad sorprendentemente alta de los residuos básicos arginina y lisina. Adicionalmente, la molécula de lisozima incorpora un número significativo de los residuos ácidos glutamato y aspartato. Este dato se ha utilizado para idear una ruta innovadora y elegante de purificación hacia hidrolizados que caractericen ratios Trp/LNAA altas. Un requerimiento esencial para esta ruta de purificación es, sin embargo, que sólo muy pocos de los residuos triptófano aparecen en péptidos que contengan también un residuo arginina o lisina o un residuo glutamato o aspartato. Como se muestra en el Ejemplo 3, la ruta específica de hidrólisis utilizada en este caso produce sólo pocos péptidos que contienen triptófano que contengan un residuo arginina y ningún péptido que contenga un residuo lisina, glutamato o aspartato.

La teoría predice que una diferencia máxima de carga entre péptidos con y sin un residuo glutamato o aspartato puede alcanzarse alrededor de pH 3. Una diferencia máxima de carga entre péptidos con y sin un residuo arginina o lisina puede alcanzarse alrededor de pH 5.

Para ilustrar el poder selectivo de este método, se preparó un hidrolizado de lisozima de acuerdo con el procedimiento especificado en el Ejemplo 3. A continuación, se ajustó el pH del hidrolizado a pH 3,1 utilizando ácido acético y se aplicaron aproximadamente 0,5 gramos de proteína a un volumen de lecho de 15 ml de una columna SP Sepharose FF (GE Healthcare, Diegem, Bélgica) equilibrada con citrato de sodio 20 mM de pH 3,1. Después de lavar la columna con un volumen de columna del tampón de citrato de sodio para eliminar la mayor parte de los péptidos que incorporaban un glutamato o aspartato, se cambió el tampón de elución a un tampón citrato de sodio 20 mM de pH 5,1. Durante el lavado de la columna con 3 volúmenes de columna del último tampón, se eluyó una gama de péptidos que contenían triptófano. De acuerdo con el análisis LC/MS, estaba presente en grandes cantidades el dipéptido AW así como los tripéptidos GNW, NAW, WVA, VAW y una pequeña cantidad del pentapéptido SLGNW. El análisis de aminoácidos de las diversas fracciones a pH 5,1 indicó que el agrupamiento selectivo producía una solución que tenía una ratio molecular Trp/LNAA de 1,75 y un contenido de triptófano de casi 30%. Un agrupamiento menos selectivo producía una solución con una ratio molecular Trp/LNAA de 0,4 y un rendimiento de triptófano de 70%. Subsiguientemente, la columna se lavó con 3 volúmenes de columna de citrato de sodio 20 mM a pH 7,1. De acuerdo con los datos LC/MS, este paso eluía péptidos que contenían arginina WIR, AWIR y, sorprendentemente, el péptido WW. Un lavado final de la columna con 1 M de NaOH, agua y 1 M de ácido acético preparó la columna para una operación subsiguiente.

### Ejemplo 5

#### **Síntesis química del dipéptido Ser-Trp**

El dipéptido Ser-Trp se sintetizó de acuerdo con tecnología estándar de péptidos. En un primer paso, se acoplaron Z-Ser-OH y Trp-OMe por la metodología del anhídrido carbónico (*J. Am. Chem. Soc.* 1967, 5012) para producir el dipéptido protegido Z-Ser-Trp-OMe. A este fin, se suspendió Trp-OMe.HCl en tetrahidrofurano (THF) y se añadió subsiguientemente *N*-metilmorfolina (NMM). La mixtura se agitó durante una hora y se añadió subsiguientemente a una solución de Z-Ser en tetrahidrofurano/dimetilformamida (THF/DMF). Se añadió un segundo equivalente de NMM y la mixtura se enfrió a -15°C. Se añadió cloroformiato de isobutilo a un ritmo tal que la temperatura interna no excediera de -15°C. Subsiguientemente, se agitó la mixtura durante 3 horas, se dejó que la temperatura ascendiera hasta la temperatura ambiente y el NMM.HCl precipitado se separó por filtración. El filtrado se mantuvo a 4°C durante una noche, después de lo cual se filtró cualquier precipitado adicional y se concentró el filtrado a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, acetato de etilo/heptano). Las fracciones combinadas se concentraron, se lavaron con agua para eliminar cualquier DMF remanente y se concentraron a vacío.

En un segundo paso, se realizó la hidrólisis enzimática de Z-Ser-Trp-OMe utilizando Alcalase 2,5L DX (*Int. J. Peptide Protein Res.* 1990, 52) y la hidrogenólisis catalítica subsiguiente proporcionó el péptido deseado como un sólido blanquecino. A tal fin, el Z-Ser-Trp-OMe purificado se disolvió en *t*BuOH y agua, y se añadió Alcalase 2,5L DX (Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca). La mixtura se agitó hasta que (prácticamente) la totalidad del material de partida se consumió. La mixtura se concentró luego a vacío y el residuo se absorbió en agua de pH 7. La mixtura acuosa se extrajo con acetato de etilo a fin de eliminar el material de partida remanente y subsiguientemente se acidificó la fase acuosa. El producto deseado, es decir Z-Ser-Trp-OH, se aisló por extracción con acetato de etilo; el extracto se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a vacío.

En un tercer paso, se obtuvo el dipéptido Ser-Trp-OH. A tal fin, el Z-Ser-Trp-OH concentrado se disolvió en MeOH y agua (1:1), se añadió Pd/C y la mixtura se agitó en una atmósfera de hidrógeno positiva (5 bar). Una vez completada la reacción, el catalizador más la mayor parte del producto se separó por filtración y se desechó el filtrado. El filtro se lavó extensamente con agua MilliQ y el filtrado se concentró a vacío, obteniéndose el dipéptido Ser-Trp-OH como un sólido blanco a blanquecino. Se realizó una purificación adicional por agitación del producto en una mixtura de acetona/agua y aislamiento del péptido por filtración. Esto permitió obtener un producto adecuado para consumo oral.

### Ejemplo 6

#### **Efectos de diferentes fuentes de triptófano sobre las ratios Trp/LNAA en plasma y el estado de ánimo en voluntarios sanos**

La finalidad del presente estudio fue investigar en voluntarios sanos los perfiles de Trp/LNAA en plasma y el estado de ánimo después del consumo de diferentes preparaciones que contenían triptófano. Se testaron las preparaciones siguientes:

- alfa-lactoalbúmina intacta (véase Materiales y Métodos).
- caseinato hidrolizado (DH > 20%; véase Materiales y Métodos)
- un hidrolizado de lisozima enriquecido en Trp con una ratio Trp/LNAA alta (véase Ejemplo 4)
- un dipéptido SW sintético (Ejemplo 5)
- L-triptófano libre (véase Materiales y Métodos).

Participaron en el estudio 18 estudiantes sanos (9 varones y 9 mujeres: edad entre 18 y 30 años). Los criterios de exclusión para la participación fueron enfermedad crónica y actual, historia de enfermedad psiquiátrica o médica, uso de medicación o drogas, consumo de alcohol (> 2 unidades/día), enfermedades metabólicas, hormonales o

- 5 intestinales y dietas irregulares o hábitos de alimentación desviados (evaluado por cuestionarios de salud y estilo de vida). Los individuos que participaron en el experimento se encontraban dentro del intervalo normal para el Índice de Masa Corporal (BMI en kg/m<sup>2</sup> entre 20 y 25) y los individuos de sexo femenino se emparejaron respecto al uso de anticonceptivos. Las mujeres participaron durante su fase folicular media-tardía (días 4-10), mientras que las mujeres que utilizaban anticonceptivos participaron cuando las mismas utilizaban realmente la píldora anticonceptiva. Los participantes eran no fumadores y no utilizaron alcohol en absoluto antes de ni durante el estudio. Todos los individuos participantes en el experimento firmaron un Formulario de Consentimiento Informado. Este estudio se condujo de acuerdo con los principios EC de Buena Práctica Clínica (GCP) adoptados por la Asamblea General 52<sup>a</sup> de la WMA, Edimburgo, Escocia, octubre de 2000.
- 10 Los individuos se instruyeron para mantenerse en ayunas durante la noche; únicamente se permitía agua o té sin azúcar. Durante cinco sesiones experimentales matutinas, los individuos visitaron el laboratorio para monitorizar las concentraciones de Trp/LNAA en plasma y el estado de ánimo después de la ingestión de una bebida que contenía concentraciones diferentes de Trp o LNAA. El orden de presentación de las diversas medidas estaba equilibrado y los cuatro días experimentales estaban separados por un periodo de una semana. En cada mañana del experimento, se proporcionó una bebida de 312 ml que contenía concentraciones diferentes de triptófano (Trp) o LNAA (Tabla 1). Todas las bebidas contenían 0,10 g de edulcorante (acesulfamo) y se completaron con agua del grifo hasta alcanzar 312 ml. Un asistente de investigación, ignorante de las condiciones dietéticas, condujo la administración de las diferentes bebidas.

Tabla 1: Composición de proteínas/aminoácidos de las bebidas utilizadas.

Fuente de la proteína	Hidrol. de caseína	Alfa-lac intacta	Hidrol. de Lisozi- ma enriquecido en Trp	Ser-Trp	L-Trp libre
Código utilizado	REF	ALAC	WEPS	SYN	TRP
gramos	20	20	300 ml de solución	1,20	0,82
Trp (g)	0,40	0,80	0,80	0,80	0,80
Trp/LNAA (molar)	0,04	0,10	1,1	∞	∞

- 20 Se recogieron muestras de sangre por duplicado antes y 15, 30, 60, 90, 120, 180 y 210 minutos después de la ingestión en tubos Vacutainer de 5 ml que contenían heparina sódica y se centrifugaron luego a 5000 rpm durante 5 min a 4°C. Los sobrenadantes resultantes se mezclaron con ácido sulfasalíclico (4 mg/100 microlitros) y se guardaron directamente a -80°C hasta el análisis. El análisis de aminoácidos en plasma se realizó por HPLC, haciendo uso de una columna de 2-3 µm Bischof Spherisorb ODS II como se describe por van Eijk et al. (J. Chromatogr. 1993: 620:143-148). Las ratios Trp/LNAA en plasma se calcularon dividiendo la concentración molar de triptófano en plasma por la suma de las concentraciones molares en plasma de los aminoácidos neutros grandes valina, isoleucina, leucina, tirosina y fenilalanina. El análisis estadístico se realizó por medio de medidas repetidas multivariante y análisis univariantes de la varianza (MANOVA y ANOVA) utilizando el Modelo General Lineal (GLM: SPSS 12.0 para Windows). Todas las estadísticas se evaluaron a un nivel de significación de P = 0,05.

Valores Trp/LNAA en plasma

- 35 Un primer análisis de medidas repetidas de la varianza con *Condición* y *Tiempo* como factores intra-individuales sobre la ratio Trp/LNAA en plasma reveló un primer efecto significativo de *Tiempo* y *Condición* y una interacción significativa de *Condición* x *Tiempo*. Los aumentos más significativos en la ratio Trp/LNAA en plasma se encontraron (véase Figura 1) después de proporcionar "SYN" (aumento de 263% después de 60 min) y "WEPS" (aumento 255% después de 90 min). El aumento en Trp/LNAA después de estos dos productos era significativamente más rápido y mayor que después de la ingestión de "TRP" (aumento 191% después de 120 min) o "ALAC" (aumento 67% después de 120 min). Después del consumo de "REF", se registraba una disminución importante en Trp/LNAA que comenzaba 60 minutos hasta 210 min (-27%).

El aumento de 255% en Trp/LNAA que se encontró con "WEPS" excede considerablemente de los aumentos de 50-70% encontrados previamente con alfa-lactoalbúmina intacta (Markus et al., 2000; Booij et al., 2006) y todos los aumentos de 20-45% comunicados anteriormente con otros alimentos de tipo carbohidrato (Markus, 2003). Si bien se cree que una variación de 40-50% de Trp/LNAA en plasma es suficiente para cambiar los niveles de Trp y la síntesis y liberación de 5-HT en el cerebro (Markus et al., 2000), se espera que este aumento de 255% cause una subida mucho mayor en Trp y 5-HT disponibles en el cerebro y por consiguiente puede dar también como resultado una mayor liberación de 5-HT cerebral funcionalmente activa.

Perfil de Estados de Ánimo (POMS)

Se midieron los cambios de estado de ánimo de los diversos participantes utilizando una versión para papel y lápiz de la versión holandesa abreviada del cuestionario de Perfil de Estados de Ánimo (Wald y Mellenbergh, Ned Tijdschr Psychol 1990: 45: 86-90) como una escala VAS que abarcaba desde 'estar claramente en desacuerdo' a 'estar claramente de acuerdo'. El POMS comprende cinco subescalas diferentes para estado de ánimo, que abarcan Ira, Angustia, Depresión, Fatiga y Tensión que se refieren a un estado de ánimo negativo, hasta Vigor, que concierne a un estado de ánimo positivo.

El análisis de medidas repetidas de la varianza con *Condición* y *Tiempo* como factores intrínsecos del individuo sobre los registros totales de estado de ánimo reveló un efecto significativo de *Tiempo* y una interacción significativa de *Condición x Tiempo*; lo que indicaba que los cambios de estado de ánimo a lo largo del tiempo diferían significativamente entre las condiciones. Se encontraron mejoras de estado de ánimo comparables 60 min después de la toma de "WEPS" y "TRP", pero sólo con "WEPS" el estado de ánimo mejoraba adicionalmente hasta 210 min después de la toma en comparación con "TRP". En contraste, no se encontró cambio alguno del estado de ánimo después de la toma de "REF" y "ALAC". La ausencia de efecto sobre el estado de ánimo después de alfa-lactoalbúmina intacta es comparable con estudios previos que indican efectos beneficiosos moderados sobre el estado de ánimo después de alfa-lactoalbúmina intacta y únicamente en individuos vulnerables al estrés bajo exposición a estrés aguda (Markus et al., 2000; Markus et al., 2000; Markus, 2003). Aunque el estado de ánimo parecía mejorar también después de la toma de "SYN", este efecto no era significativo en esta disposición experimental.

Estos estudios actuales sugieren que un gran incremento de 255% en Trp/LNAA en plasma puede ser suficiente para un estado de ánimo mejorado en los individuos normales no vulnerables al estrés. Basándose en descubrimientos previos, se espera que estos efectos beneficiosos del hidrolizado de lisozima incrementado en Trp sobre el estado de ánimo serán mayores aún en los individuos vulnerables al estrés en condiciones de estrés mental fuerte (Markus, 2003). Contrariamente a las expectativas de los inventores, no se encontró mejora significativa alguna en el estado de ánimo después de la toma del dipéptido sintético. Este resultado inesperado puede ser atribuible a la disposición experimental actual o a diferencias en biodisponibilidad de triptófano de estas diversas fuentes.

Tabla 2: Cambios en las concentraciones de aminoácidos en plasma ( $\mu\text{mol/l}$ ) con el tiempo después de la ingestión de hidrolizado de caseína ("REF"), alfa-lactoalbúmina intacta ("ALAC") o hidrolizado de lisozima mejorado en Trp ("WEPS").

Aminoácido	Condición	Tiempo (min)						
		0	30	60	90	120	180	210
Isoleucina	REF	0,07	0,10	0,18	0,15	0,12	0,09	0,08
	ALAC	0,08	0,12	0,20	0,22	0,18	0,12	0,11
	WEPS	0,07	0,09	0,09	0,14	0,09	0,08	0,09
Leucina	REF	0,12	0,19	0,31	0,26	0,22	0,17	0,16
	ALAC	0,13	0,22	0,37	0,38	0,28	0,21	0,20
	WEPS	0,13	0,14	0,14	0,13	0,13	0,13	0,14
Fenilalanina	REF	0,06	0,08	0,10	0,08	0,08	0,06	0,06
	ALAC	0,07	0,09	0,11	0,10	0,09	0,07	0,07
	WEPS	0,07	0,07	0,07	0,06	0,10	0,06	0,07
Tirosina	REF	0,06	0,07	0,12	0,11	0,09	0,07	0,07
	ALAC	0,06	0,08	0,12	0,12	0,10	0,08	0,08
	WEPS	0,06	0,07	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06
Valina	REF	0,24	0,28	0,45	0,42	0,38	0,32	0,30
	ALAC	0,26	0,30	0,38	0,42	0,35	0,29	0,28
	WEPS	0,26	0,27	0,25	0,25	0,25	0,25	0,26

Triptófano	REF	0,06	0,07	0,08	0,08	0,07	0,06	0,05
	ALAC	0,07	0,09	0,18	0,23	0,19	0,13	0,12
	WEPS	0,07	0,13	0,21	0,23	0,20	0,14	0,13
LNAA	REF	0,52	0,67	1,14	1,01	0,86	0,73	0,65
	ALAC	0,60	0,82	1,14	1,22	1,10	0,86	0,82
	WEPS	0,62	0,60	0,65	0,60	0,68	0,55	0,64
Trp/LNAA	REF	0,11	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
	ALAC	0,12	0,12	0,15	0,18	0,2	0,18	0,17
	WEPS	0,11	0,19	0,36	0,39	0,35	0,25	0,22

Tabla 3: Cambios en las concentraciones de aminoácidos en plasma ( $\mu\text{mol/l}$ ) con el tiempo después de la ingestión de L-Trp libre ("TRP") o el dipéptido sintético SW ("SYN").

		Tiempo (min)							
Aminoácido	Condi- ción	0	30	60	90	120	180	210	
Isoleucina	TRP	0,07	0,07	0,07	0,06	0,07	0,07	0,07	
	SYN	0,06	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06	0,07	
Leucina	TRP	0,13	0,13	0,12	0,12	0,12	0,12	0,13	
	SYN	0,11	0,14	0,12	0,12	0,12	0,12	0,13	
Fenilalanina	TRP	0,07	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	
	SYN	0,06	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	
Tirosina	TRP	0,06	0,06	0,06	0,05	0,06	0,05	0,05	
	SYN	0,05	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	
Valina	TRP	0,25	0,25	0,23	0,22	0,23	0,22	0,23	
	SYN	0,21	0,26	0,22	0,22	0,22	0,21	0,23	
Triptófano	TRP	0,07	0,07	0,17	0,18	0,18	0,13	0,11	
	SYN	0,06	0,13	0,21	0,18	0,15	0,11	0,10	
LNAA	TRP	0,62	0,59	0,55	0,50	0,58	0,52	0,53	
	SYN	0,50	0,58	0,48	0,47	0,45	0,48	0,54	
Trp/LNAA	TRP	0,11	0,12	0,29	0,31	0,32	0,24	0,20	
	SYN	0,11	0,22	0,40	0,37	0,31	0,22	0,19	

5

### Ejemplo 7

#### **Hidrólisis de lisozima en gran escala**

En procedimientos de hidrólisis de lisozima en mayor escala, se siguió esencialmente el procedimiento que se ha descrito en el Ejemplo 3 con ciertas modificaciones menores. Una solución que contenía 7,3% (p/p) de lisozima pura se calentó a 65°C, después de lo cual se ajustó el pH a pH 8,2 utilizando NaOH. La hidrólisis se inició por adición de 25 microlitros de Protex 6L/g de materia seca. Bajo agitación continua y manteniendo el pH a 8,2 y la temperatura a 53°C, se continuó la hidrólisis durante 2 horas. Se aumentó luego el valor de pH a 9,0 y se continuó la incubación durante 3,5 horas más para proporcionar una solución con algo de precipitado. Se disminuyó luego el pH de la solución a 4,5 y se enfrió la solución hasta por debajo de 4°C. Para obtener un producto completamente claro, se filtró el líquido sobre un filtro Z 2000 (Pall) y se eliminó luego el exceso de agua y sal por nanofiltración. El concentrado resultante se sometió después a un tratamiento UHT de 7 segundos a 120°C, se evaporó y finalmente se secó por pulverización para obtener el hidrolizado de lisozima en forma seca. El producto así obtenido tiene una ratio molar Trp/LNAA de aproximadamente 0,19.

### Ejemplo 8

#### **Preparación de una bebida que incorpora el hidrolizado de lisozima**

La receta siguiente ilustra la preparación de un hidrolizado de lisozima exento de grasa que contiene una bebida de fresa. A 10 gramos de polvo de hidrolizado de lisozima (preparado de acuerdo con el Ejemplo 7) se añadieron 40

gramos de glucosa, 2,4 gramos de ácido cítrico, 0,38 gramos de ácido málico, 0,15 gramos de sucralosa y 0,5 gramos de esencia de fresa (Buteressence, Zaadam, Países Bajos). Esta mezcla de polvos se disuelve fácilmente en 1 litro de agua para obtener una bebida fácil de beber con una Trp/LNAA alta y una ratio Tyr/BCAA asimismo alta. La mezcla de polvos es adecuada para v.g. llenado en bolsitas. Pueden prepararse productos líquidos envasados utilizando diversas tecnologías conocidas.

### **Ejemplo 9**

#### **Efectos del hidrolizado de lisozima sobre el eficiencia post-estrés en voluntarios sanos sensibles al estrés y resistentes al estrés**

La finalidad del presente estudio fue comparar los efectos de un hidrolizado de lisozima preparado de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 7, con un placebo (hidrolizado proteínico de caseína; véase Ejemplo 6) en términos de niveles Trp/LNAA en plasma y sus consecuencias sobre trabajos de eficiencia post-estrés. Es sabido que los tests de eficiencia utilizados abordan aspectos de "vigilancia" y "control del movimiento de los ojos" de los individuos.

Participaron en el presente estudio 40 individuos, de ellos 20 varones y 20 mujeres. Basándose en un cuestionario previo al estudio, una mitad de este grupo se clasificó como resistentes al estrés y la otra mitad como sensibles al estrés. Los criterios de inclusión y exclusión para los individuos así como la conducción general del estudio eran los mismos que se han descrito en el Ejemplo 6. Un diagrama de flujo del diseño del estudio se proporciona en la Figura 4, y un esquema de un día típico del estudio se proporciona en la Figura 5.

Durante las mañanas del experimento, los individuos llegaban en ayunas al laboratorio. A su llegada, recibían una bebida que contenía el hidrolizado de lisozima o el placebo, es decir la bebida que contenía el hidrolizado de caseína. La composición de la bebida de test y la bebida de placebo se reseña en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición de las bebidas utilizadas.

Fuente de la proteína	Hidrolizado de caseína	Hidrolizado de lisozima
Abreviatura	plc	Trp-hydr
g polvo/300 ml	13,6	14,4
Agua	286 g	285 g
Edulcorante	0,1 g	0,1 g
g Trp/300 ml	0,4	0,8
Ratio Trp/LNAA (molar)	0,04	0,19

Noventa minutos después del consumo de las bebidas de 300 ml, se tomó una muestra de sangre para evaluar los ratios Trp/LNAA (véase el Ejemplo 6). Subsiguientemente, el grupo de individuos resistentes al estrés o el grupo de individuos propensos al estrés se expuso a un test de eficiencia seguido por exposición a un estrés. Este estrés consistía en un trabajo aritmético que tenía que realizarse bajo estimulación del ruido. Se hizo creer a los individuos que la presencia o ausencia del ruido dependía de su eficiencia en el test. En realidad, los trabajos aritméticos se manipularon de tal manera que todos los individuos fallaron en cada una de las pruebas. Es sabido que esta disposición induce estrés psicológico y es percibida como sumamente difícil de controlar (Peters, M.L., Godaert, G.L.R., Ballieux, R.E. et al. (1998). Cardiovascular and catecholamine response to experimental stress: effects of mental effort and controllability. *Psychoneuroendocrinology*. 23, 1-17). Después del trabajo aritmético, se repitió el primer test de eficiencia para cuantificar el efecto del estrés sobre la eficiencia bajo la influencia de los ratios Trp/LNAA en sangre prevalecientes.

Los test de eficiencia realizados fueron el Test del Reloj de Mackworth (Mackworth, N (1948) The breakdown of vigilance during prolonged visual search. *Quart J Exp Psych*. 1, 6-21) y el Trabajo de Seguimiento Crítico (Jex HR et al., (1966) A "critical" tracking task for man-machine research related to the operator's effective delay time. NASA Contract Rep NASA CR.:1-105).

El Test del Reloj de Mackworth es un test utilizado extensamente para medir la "vigilancia", el estado de alerta y la concentración durante un periodo de tiempo prolongado. Los individuos se sientan frente a una pantalla de ordenador que exhibe una configuración circular de 60 puntos que simula las marcas de segundos en un reloj. Los puntos se iluminan brevemente en una rotación en el sentido de las agujas del reloj a un ritmo de uno por 500 ms. Usual-

mente, la rotación procede con un solo salto (un punto). Los individuos fueron instruidos en el sentido de que raramente, a intervalos irregulares, la diana realiza un doble salto (dos puntos) saltándose uno de los puntos en la secuencia normal. Esto debería incitar a los individuos a presionar un botón lo más rápidamente posible. Se presentaban un total de 30 ocasiones de este tipo en el test de 45 minutos. Ocurrían 10 ocasiones en cada periodo sucesivo de 15 minutos, con intervalos que iban desde 8 segundos a 7,2 minutos.

El Test de Seguimiento Crítico se utiliza como tarea de eficiencia perceptivo-motora que mide la capacidad para controlar una señal de error presentada en una tarea de coordinación perceptivo-motora compensadora de primer orden. Durante esta tarea, los individuos tienen que controlar un cursor inestable en una pantalla de ordenador utilizando una palanca de control sensible. Los errores aparecerán como desviaciones horizontales del cursor con respecto al punto medio de una escala lineal horizontal. Los individuos tienen que intentar mantener el cursor inestable en el centro del eje, a fin de reducir las desviaciones a cero, realizando continuamente movimientos compensadores de la palanca de control. La frecuencia de las desviaciones del cursor aumenta como una función estocástica lineal del tiempo, y por consiguiente se requiere que el individuo realice movimientos compensadores con una frecuencia cada vez mayor. Asimismo, las respuestas compensadoras del individuo aumentan en frecuencia con un retardo de fase creciente (una respuesta aumenta el error en lugar de reducir el mismo) y por consiguiente se pierde el control. La frecuencia con la que los individuos pierden el control es la frecuencia crítica. El test se realizó cinco veces; la frecuencia crítica media se calculó sin el registro mínimo y máximo como la variable dependiente de este test.

Las ratios Trp/LNAA en plasma determinadas 90 minutos después del consumo de las bebidas, revelaron un efecto significativo ( $P < 0,0001$ ) en los cambios de la ratio Trp/LNAA en plasma a lo largo de las condiciones experimentales aplicadas. La ingestión del hidrolizado de lisozima ("Trp-hydr") aumentaba el valor Trp/LNAA en plasma hasta  $0,25 \mu\text{mol/l}$ . La ingestión del hidrolizado de caseína ("plc") a una ratio Trp/LNAA de  $0,08 \mu\text{mol/l}$  (Figura 6). Los valores para cada uno de los aminoácidos relevantes se proporcionan en la Tabla 5.

Tabla 5: Concentraciones de aminoácidos ( $\mu\text{mol/l}$ ) después de la ingestión del placebo ("plc") o el hidrolizado de lisozima ("Trp-hydr").

	Tyr	Val	Ile	Phe	Leu	Trp	LNAA	Trp/LNAA
plc	90	315	107	63	168	60	744	0,082
Trp-hydr	73	266	120	58	152	167	670	0,250

Después de la ingestión del hidrolizado de caseína, la eficiencia de ambos grupos de individuos sometidos al Test del Reloj Mackworth se deterioraba significativamente por exposición al estrés. En cambio, la ingestión del hidrolizado de lisozima rico en Trp evitaba dicha eficiencia deteriorada en el grupo resistente al estrés. De modo totalmente sorprendente, el hidrolizado rico en Trp no limitaba dicha eficiencia deteriorada en el grupo propenso al estrés. Los datos obtenidos se representan gráficamente en la Figura 7.

En el Trabajo de Seguimiento Crítico, el valor lambda CT indica el nivel final de complejidad que es alcanzado por los individuos. Cuanto más alto es el valor lambda CT, tanto mejor es el control. Los datos obtenidos en el presente experimento muestran que después de exposición al estrés, el valor lambda CT era significativamente mayor cuando se consumía el hidrolizado rico en Trp. Entre los individuos resistentes al estrés, pudo registrarse un aumento de 16% con relación al tratamiento con placebo. De modo totalmente sorprendente, también en este test, los valores lambda CT en el grupo propenso al estrés no mostraban diferencia significativa alguna entre el hidrolizado rico en Trp y el placebo.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende un péptido soluble en agua que contiene triptófano, que se obtiene por hidrólisis de lisozima de huevo de gallina, para uso en la mejora del estado de ánimo, la cognición, el apetito, el estado de alerta, la vigilancia, el comienzo y la calidad del sueño, los efectos ansiolíticos, la depresión, el control de las reacciones afectivas o la comportamiento sexual.
- 5 2. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, composición que comprende un hidrolizado de lisozima de huevo de gallina que tiene un DH comprendido entre 5 y 45, que comprende un péptido soluble en agua que contiene triptófano y que tiene una ratio Trp/LNAA (Aminoácidos Neutros Grandes, es decir la suma de tirosina, fenilalanina, leucina, isoleucina y valina) mayor que 0,15.
- 10 3. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, que comprende adicionalmente triptófano libre.

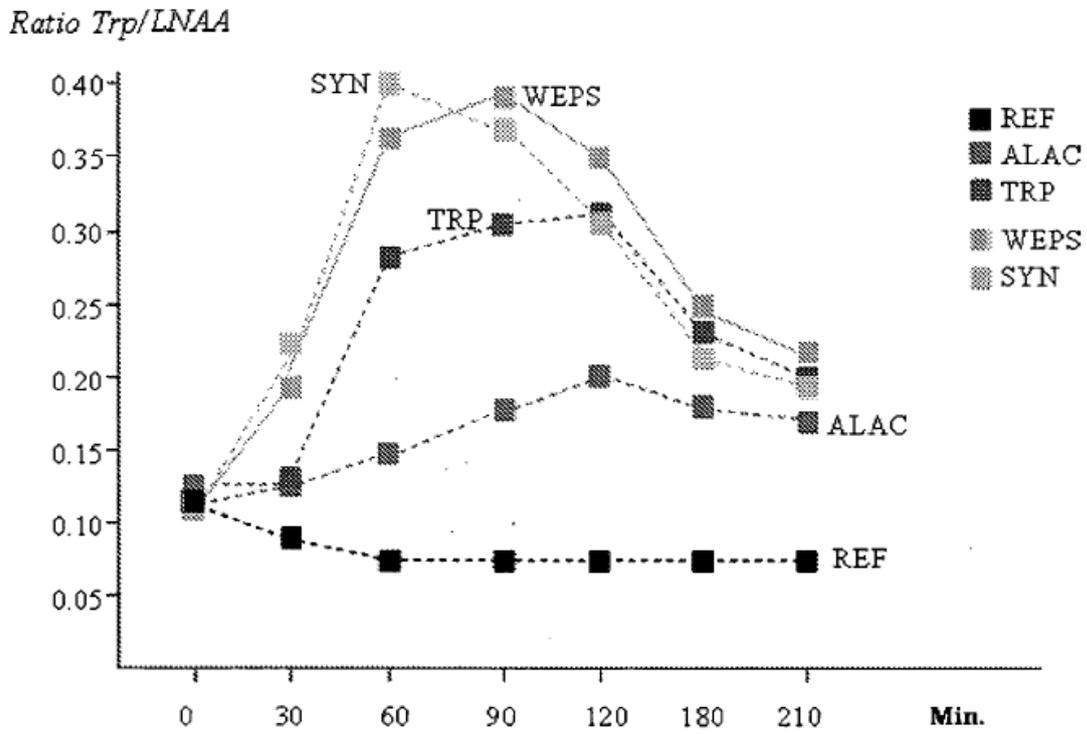


Figura 1

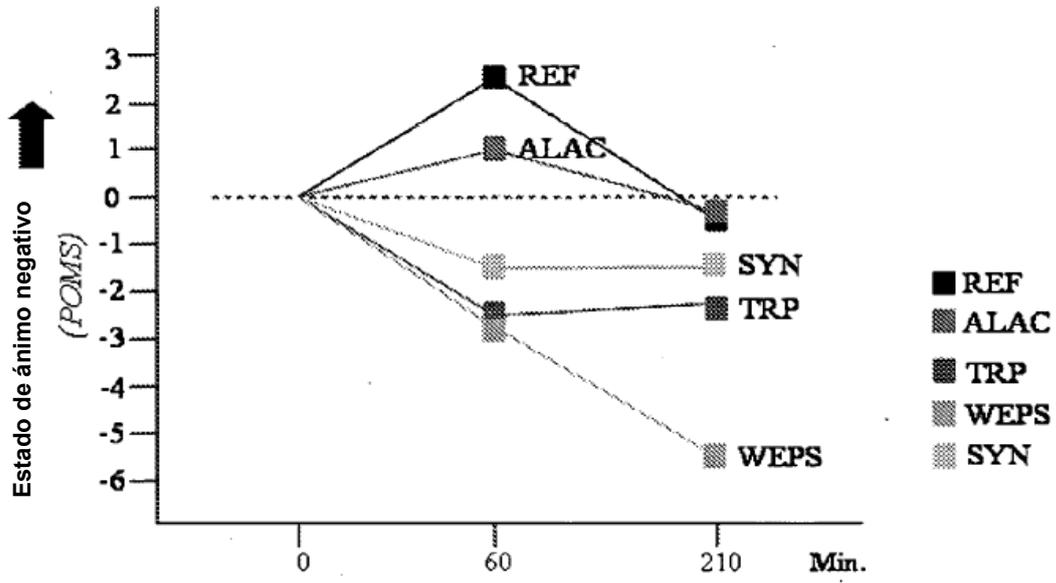


Figura 2

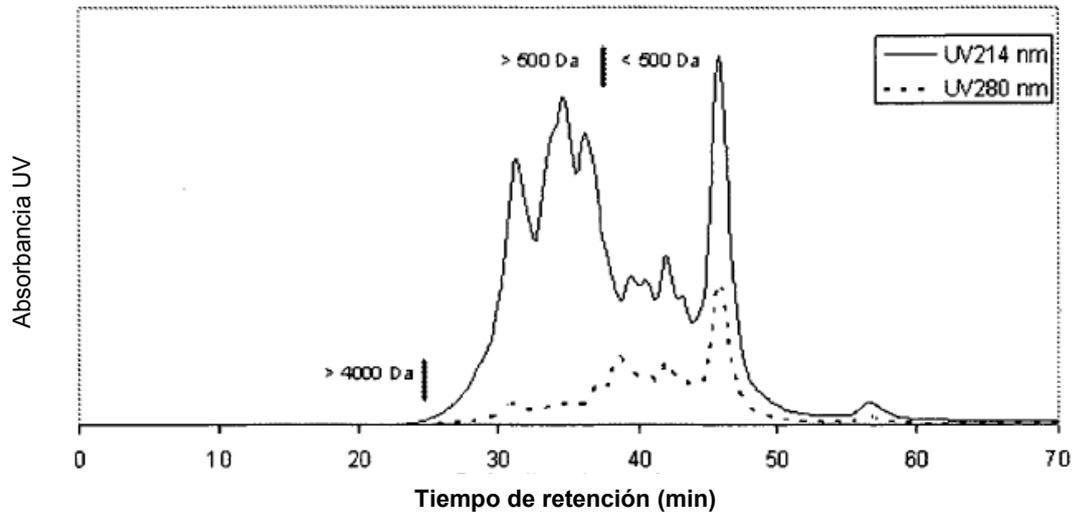


Figura 3

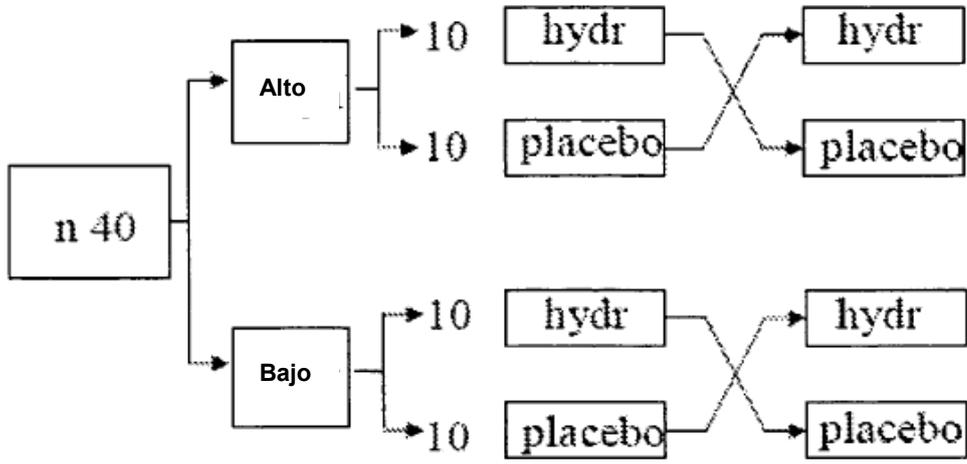


Figura 4

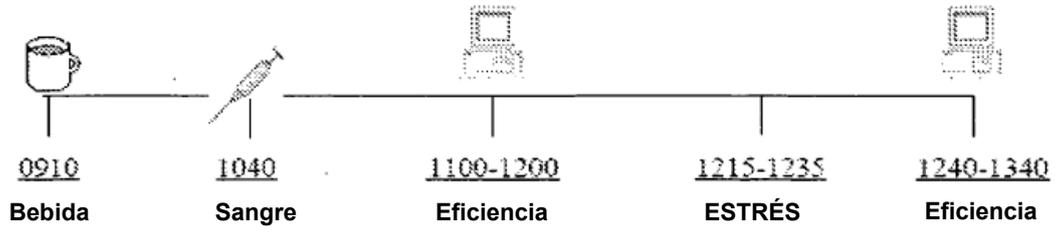


Figura 5

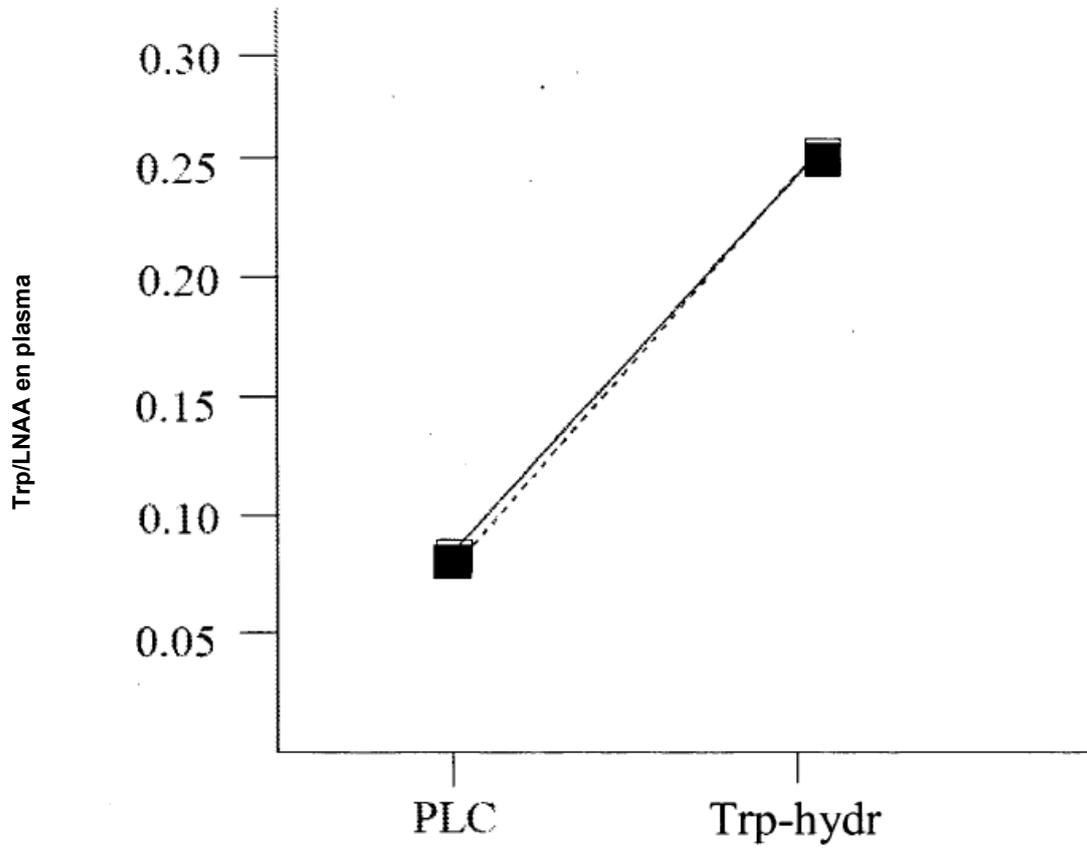


Figura 6

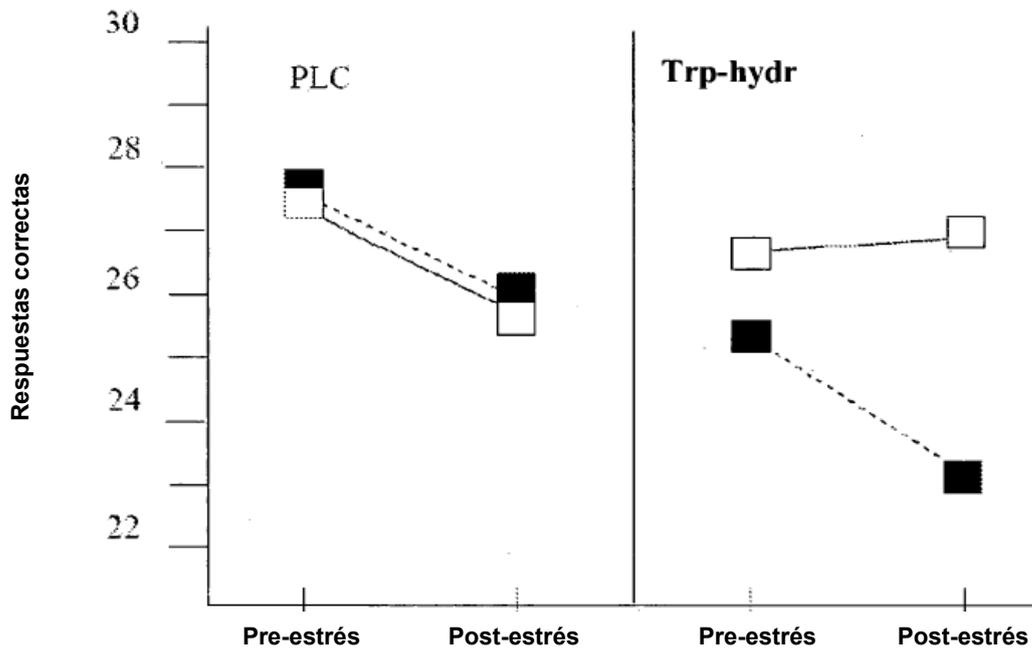


Figura 7

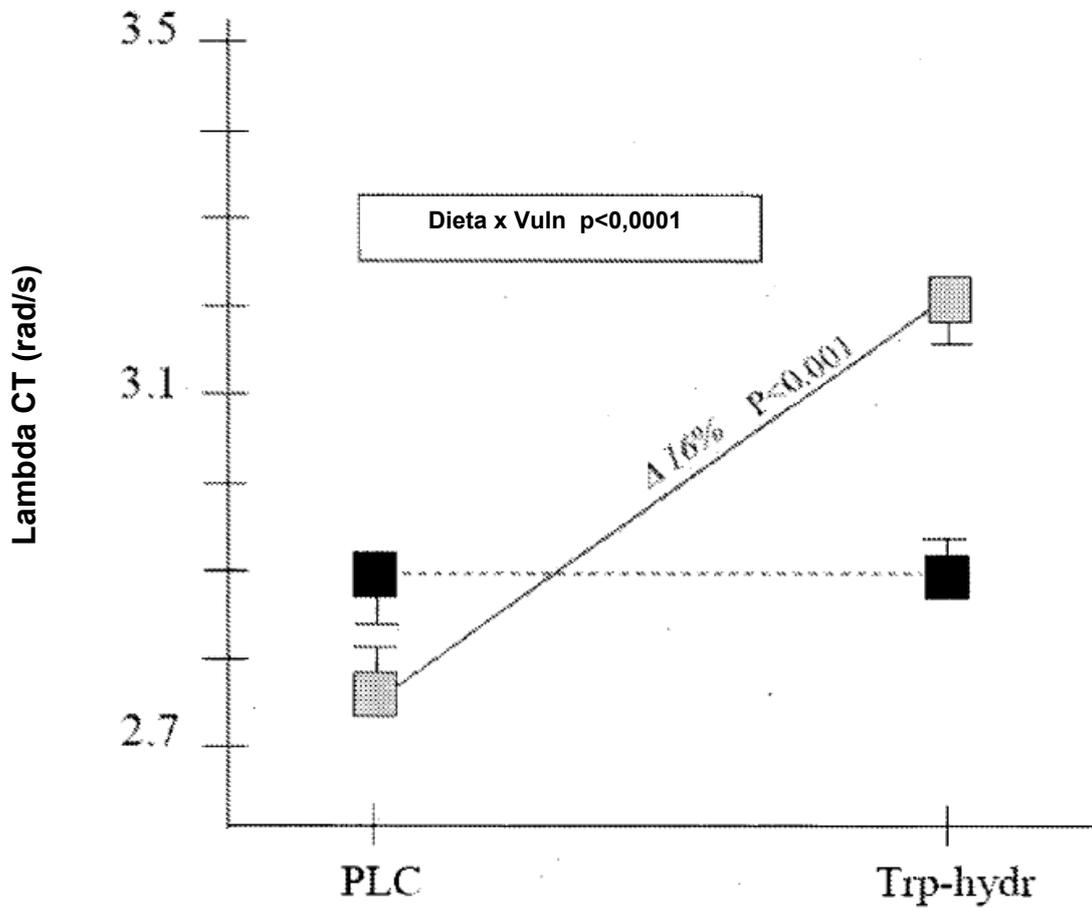


Figura 8