

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 540 926**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/57 (2006.01)
C12N 9/48 (2006.01)
A23J 3/34 (2006.01)
A23J 3/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2003 E 03735546 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015 EP 1509609**

(54) Título: **Hidrolizado de proteínas rico en tripéptidos**

(30) Prioridad:

04.06.2002 EP 02100667

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

14.07.2015

(73) Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
HET OVERLOON 1
6411 TE HEERLEN, NL**

(72) Inventor/es:

**EDENS, LUPPO;
DEKKER, PETRUS JACOBUS THEODORUS y
DE ROOS, ANDRE LEONARDUS**

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 540 926 T3

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

DESCRIPCIÓN

Hidrolizado de proteínas rico en tripéptidos.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un hidrolizado de proteínas y los usos del mismo.

5 **Antecedentes de la Invención**

Existe un interés creciente en el uso de hidrolizados de proteínas para aplicaciones tanto médicas como no-médicas. En ambas aplicaciones, una dieta fácilmente asimilable que ofrezca una absorción gastrointestinal de proteínas facilitada es un factor de importancia primordial. Los hidrolizados de proteínas para aplicaciones médicas requieren también propiedades alergénicas muy reducidas. Para productos destinados a aplicaciones no-médicas, 10 características de sabor agradable y solubilidades satisfactorias en condiciones ácidas son características importantes. Lamentablemente, el proceso de hidrólisis requerido para conseguir estos beneficios lleva consigo varias desventajas. Éstas incluyen sabores residuales amargos, materiales inmunógenos residuales rendimientos bajos de aminoácidos nutricionalmente indispensables, valores osmóticos altos causados por la liberación de aminoácidos libres y, finalmente, estabilidades limitadas en medio ácido.

15 En publicaciones anteriores se han descrito varias mezclas de enzimas destinadas a optimizar las características del hidrolizado y reducir los costes de producción. Todas estas publicaciones se refieren al uso de endoproteasas simples o mezcladas. Ejemplos incluyen EP321 603, que se refiere al uso de endoproteasas derivadas de animales como tripsina, quimotripsina y pancreatina, así como EP 325 986 y WO 96/13.174, que favorecen el uso de endoproteasas obtenidas de especies *Bacillus* o *Aspergillus*. Lamentablemente, estas combinaciones de enzimas 20 producen siempre mezclas de péptidos que son amargas y exhiben una distribución amplia de pesos moleculares. Los péptidos de peso molecular alto son indeseables, dado que son responsables de la respuesta alergénica y su absorción requiere pasos de proceso enzimático adicionales en el intestino. La reducción del sabor residual amargo en los hidrolizados hace indispensable el uso de exoproteasas tales como aminopeptidasas o carboxipeptidasas. 25 Desventajas de este proceso de eliminación del amargor son la liberación de cantidades sustanciales de aminoácidos libres y por tanto sabores caldosos desagradables y pérdidas de aminoácidos nutricionalmente importantes.

En conclusión, la producción industrial de hidrolizados de proteínas sigue estando basada en mezclas de enzimas que están lejos de ser óptimas, por lo que se precisan pasos costosos de purificación para producir mezclas de péptidos que tengan distribuciones de tamaño sub-óptimas.

30 Después de la absorción dietética normal, las proteínas presentes en los alimentos se hidrolizan gradualmente a fragmentos más pequeños que son transportados finalmente a través de la pared del intestino delgado. Durante el paso a través del tracto gastrointestinal, son activas cierto número de diferentes proteasas que se originan en el estómago, páncreas e intestino delgado. Endoproteasas tales como pepsina, tripsina y quimotripsina escinden las 35 proteínas de peso molecular alto en oligopéptidos más pequeños. Estos oligopéptidos son hidrolizados luego adicionalmente por cierto número de otras enzimas tales como di- y tripeptidil-peptidasas así como amino- y carboxipeptidasas. Los pasos finales de hidrólisis tienen lugar en el intestino delgado y dan como resultado una mezcla de aminoácidos libres y di- y tripéptidos (Grimble, G.K. 1994. Annu.Rev.Nutr. 14; 419-447).

40 A pesar de la gran colección de proteasas que son activas en el tracto gastrointestinal, es probable que péptidos que resisten a la hidrólisis proteolítica ulterior en el intestino delgado formen una fracción importante de la población superviviente de di- y tripéptidos. Por ejemplo, se ha comunicado que di- y tripéptidos que llevan residuos prolina carboxi-terminales exhiben estabilidades en el cuerpo que son hasta 3 órdenes de magnitud mayores que otros péptidos (Ashmarin, I.P. *et al.*; Biochemistry (Moscow), Vol 63, No 2,1998, pp119-124). Sistemas portadores específicos para el transporte de los aminoácidos libres o los di- y tripéptidos son responsables del transporte eficiente a través de la pared intestinal. Ha sido identificado un mecanismo independiente de la secuencia peptídica 45 capaz de transportar cantidades cuantitativamente significativas de di- y tripéptidos intactos (Doering, F. *et al.*; 1998; J. Biol. Chem. 273,23211- 23218). Después de entrar en la circulación sanguínea, los péptidos pueden actuar potencialmente como moduladores fisiológicos del metabolismo. Los efectos fisiológicos de los péptidos con actividades opioides, inhibidoras de la ACE, antitrombosis, antiúlcera, antiartrítica y anoréxica han sido descritos (Pihlanto-Leppala, A; Trends in Food Science & Technology 11 (2001) 347-356; Ashmarin, I.P. *et al.*; Biochemistry (Moscow), Vol 63, No 2,1998, pp119-124).

50 La reciente comercialización de diversos hidrolizados de proteínas que reivindican efectos antihipertensivos pone de manifiesto el alcance incrementado del uso de hidrolizados de proteínas que contienen péptidos "bioactivos" en aplicaciones médicas y no-médicas. Estos péptidos bioactivos e hidrolizados de proteína que contienen tales péptidos bioactivos han sido descritos en numerosas solicitudes de patente. Por ejemplo, WO 97/00078 describe hidrolizados obtenidos por incubación con bacterias probióticas o enzimas obtenidas de tales bacterias. WO

99/16.461 describe la inhibición de la enzima convertidora de las angiotensinas por tripéptidos específicos obtenidos por fermentación de *Lactobacillus*. WO 01/32.905 describe la preparación de un producto que contiene péptidos antihipertensivos por fermentación de caseína con bacterias de ácido láctico. Varias otras solicitudes (véase por ejemplo WO 01/68.114) describen el uso de péptidos altamente purificados o sintetizados químicamente para para 5 reducción de la presión sanguínea o tratamiento de diabetes, deterioro renal u obesidad.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona un proceso para producir un hidrolizado de proteínas que es rico en tripéptidos en el cual al menos 20% molar de los péptidos tienen un peso molecular de 200 a 2000 Da y están presentes como un tripéptido, y en el cual al menos 30% de los tripéptidos tienen una prolina carboxi-terminal. Preferiblemente, el hidrolizado de proteínas de la invención carece de amargor. El hidrolizado puede comprender opcionalmente 10 dipéptidos.

Conforme a una realización preferida del proceso de la invención, la proteína o sustrato proteináceo seleccionada(o) se pone en contacto con una endoproteasa adecuada. Esta endoproteasa adecuada es preferiblemente una endoproteasa específica de prolina (PSE o EndoPro), utilizándose más preferiblemente una PSE. Además, este 15 sustrato se pone en contacto con una tripeptidasa (TPAP) adecuada o una mezcla de tripeptidasas. Tales tripeptidasas se definen como enzimas capaces de liberar tripéptidos a partir de un polipéptido, sea del lado N-terminal del polipéptido que abarca por tanto las denominadas tripeptidil-peptidasas, o del lado C-terminal del polipéptido, abarcando así las denominadas peptidil-tripeptidasas. Ventajosamente, el sustrato proteínico se 20 fermenta primeramente con una endoproteasa, tal como una serina-proteasa, metaloendoproteasa o una proteasa aspártica, para hidrolizar parcialmente la proteína. Se ha encontrado que la TPAP es, en general, más eficaz sobre tales sustratos proteínicos prehidrolizados.

El proceso conforme a la invención implica una combinación de una o más endoproteasas con una o más tripeptidasas. Ventajosamente, las enzimas se utilizan en forma aislada y en un intervalo de ratios de proteína tripeptidasa a endoproteasa comprendida entre 1:0,05 y 1:50, preferiblemente entre 1:0,1 a 1:10.

25 El sustrato proteínico o el hidrolizado parcial formado puede someterse primeramente a la primera endoproteasa adecuada y subsiguientemente puede añadirse la TPAP o la mezcla de TPAP's. En los casos en que las condiciones de actividad óptimas de las enzimas son aproximadamente idénticas, puede preferirse un proceso en un solo paso. Preferiblemente, la TPAP utilizada en el presente proceso es una TPAP que después de una incubación a 30 pH 5 durante una hora a 50° C exhibe al menos una actividad residual de 70% sobre un sustrato Ala-Ala-X-pNA como se mide en el Ejemplo 1. X puede variar con la TPAP en cuestión dependiendo de la especificidad de la TPAP. 35 X es un residuo de aminoácido que da lugar a al menos una actividad significativa de la TPAP (véase por ejemplo Fig. 1).

40 Para ser útil como adyuvante de proceso en la preparación de ingredientes alimentarios, una enzima tiene que cumplir preferiblemente varios criterios económicos y legislativos estrictos. Para cumplir los criterios legislativos, la enzima debería obtenerse a partir de una fuente nada sospechosa, por ejemplo un microorganismo de grado alimentario. Para cumplir los criterios económicos, la enzima debería ser secretada por el microorganismo, producirse con rendimientos altos y exhibir varias características bioquímicas tales como estabilidad a largo plazo en 45 condiciones de proceso industrial. Para minimizar los riesgos de infecciones microbianas en tales condiciones no estériles, el proceso industrial emplea a menudo condiciones de pH ácido y una temperatura de 50°C o mayor. Una enzima utilizada en la presente invención cumple ventajosamente estas demandas.

La presente invención proporciona adicionalmente un hidrolizado rico en tripéptidos en el cual preferiblemente estos 50 tripéptidos son ricos en prolina carboxiterminal. Rico en tripéptidos significa que al menos 20% molar, preferiblemente al menos 25% molar, más preferiblemente al menos 30% molar o muy preferiblemente al menos 35% molar de los péptidos más pequeños presentes en el hidrolizado está presente como tripéptido. Los péptidos más pequeños se definen como péptidos con un peso molecular de 200-2000 Da. Rico en prolina significa que al menos 20%, preferiblemente al menos 30%, más preferiblemente al menos 40% y aún más preferiblemente 50% de la prolina presente en el sustrato proteínico de partida, está presente en los tripéptidos, preferiblemente como prolina carboxi-terminal. Con preferencia, el 30% de los tripéptidos o más preferiblemente 35% de los tripéptidos tienen un residuo prolina carboxi-terminal, cuyos valores pueden obtenerse con sustratos proteínicos que son ricos en prolina.

55 El hidrolizado producido conforme a la presente invención tiene en general un grado de hidrólisis comprendido entre 10 y 40, preferiblemente entre 15 y 30. El grado de hidrólisis se determina utilizando el método OPA tal como se describe por Nielsen, P. M. et al (Journal of Food Science, vol. 66, No 5, pp 642-646, 2001). Los hidrolizados producidos conforme al proceso de la presente invención pueden fraccionarse en caso deseado. Por ejemplo, se pueden utilizar técnicas de separación tales como centrifugación o filtración (por ejemplo microfiltración y ultrafiltración) para producir composiciones que se enriquecen ulteriormente en péptidos que tienen un peso molecular de 2000 Da o menos. De esta manera es posible producir una composición que comprende al menos 10% en peso, preferiblemente al menos 20% peso, más preferiblemente al menos 30% y muy preferiblemente al menos

40% en peso de péptidos que tiene un peso molecular de 200-2000 Da, basado en la cantidad total de péptidos presente.

5 Aunque los productos principales que contienen hidrolizados de proteínas son fórmulas para niños y productos alimenticios para personas hospitalizadas, productos destinados a personas con necesidades no-médicas, tales como atletas o personas sometidas a una dieta de adelgazamiento están haciéndose cada vez más comunes.

10 La proteína del lactosuero representa un sustrato muy adecuado para la producción de hidrolizados por el proceso de la invención. La proteína de lactosuero es relativamente rica en aminoácidos "esenciales" y "de cadena ramificada" y tiene una alta digestibilidad biológica. Además, los hidrolizados de lactosuero exhiben un perfil de amargor relativamente bajo. Dado que el lactosuero tiene un contenido de prolina relativamente bajo, el papel de la tripeptidasa en la generación de una mezcla de péptidos fácilmente asimilables es importante.

15 En comparación con el lactosuero, proteínas como caseína, gluten de trigo y maíz, soja, proteína de arroz, plumas de pollo y gelatina exhiben composiciones de aminoácidos muy diferentes. Basadas en su composición de aminoácidos, algunas de estas proteínas forman potencialmente el sustrato de elección para la producción de hidrolizados por el proceso de la invención. Por ejemplo, el gluten de trigo es extremadamente rico en glutamina, y la proteína de arroz es rica en residuos arginina. Es sabido que ambos aminoácidos mejoran la duración física y la tasa de recuperación después de ejercicio de alta intensidad. Sin embargo, como aminoácido libre, la glutamina no es estable, por lo que es ventajoso el suministro en un péptido fácilmente asimilable. El gluten de maíz es un sustrato económico que es extremadamente rico en leucina y fenilalanina, sabiéndose que estos aminoácidos pueden modular las respuestas de glucosa e insulina después de consumo oral. Las plumas de pollo, así como la proteína de lactosuero forman una fuente barata y potencialmente importante de cisteína, un aminoácido con un papel importante en la modulación de las funciones inmunes y la lucha contra el estrés por oxidación. Al igual que la glutamina, la cisteína es un compuesto lábil que se suministra preferiblemente en la forma de di- o tripéptidos. Sin embargo, hasta la presente invención, el desarrollo de protocolos de hidrólisis optimizados para tales productos no era viable económicamente.

20 25 Caseína, gelatina y gluten de trigo y maíz contienen todos ellos niveles altos de residuos proteína, a saber más de 6 g de aminoácido libre por 100 g de proteína. Como se ha mencionado anteriormente, la prolina confiere una estabilidad incrementada a los péptidos, aumentando con ello su importancia potencial como causante de efectos fisiológicos tales como disminución de la presión sanguínea, acción como agonistas o antagonistas de opioides, contracción de la musculatura lisa e inhibición de la agregación plaquetaria. Además, investigaciones recientes han implicado secuencias específicas que contienen prolina o una escasez de proteasas específicas de prolina con efectos inmunológicos asociados con propiedades fisiológicas. Por ejemplo, el esprue celíaco es una enfermedad autoinmune de alta prevalencia inducida por exposición al gluten dietético (Shan, L. *et al*; Science Vol 297, 2002, 2275- 2279) y relacionada con cambio de comportamiento (Bernejo, M. and Polanco I, Rev Neurol 2002 Feb 28; 34 Suppl 1: S24-33).

30 35 Hasta ahora, los enlaces peptídicos que implican residuos prolina han sido notablemente difíciles de escindir utilizando enzimas disponibles comercialmente, por lo que los hidrolizados de proteínas preparados a partir de sustratos ricos en prolina contienen fracciones importantes de material de peso molecular alto. Además, la prolina es un aminoácido sumamente hidrófobo y produce hidrolizados extremadamente amargos. Así pues, la producción de hidrolizados aceptables a partir de sustratos ricos en prolina utilizando las tecnologías existentes conduciría a niveles bajos y productos de precio alto.

40 45 50 La mayoría de las endoproteasas disponibles comercialmente exhiben una acusada preferencia a la escisión en el lado carboxi-terminal de cualesquier residuos de aminoácidos hidrófobos tales como Phe, Tyr o Leu o en el lado carboxi-terminal de residuos básicos como Lys y Arg. A fin de producir un hidrolizado que sea relativamente rico en péptidos pequeños, la proteasa específica de prolina arriba mencionada es indudablemente una adición importante a la caja de herramientas. Sin embargo, muchas proteínas tienen un contenido sorprendentemente alto de residuos glutamina/glutamato y asparagina/aspartato, por lo que una tripeptidasa capaz de escindir detrás de estos residuos puede ser muy ventajosa. Contra este antecedente, los hidrolizados de proteína ricos en di- y tripéptidos representan los productos ideales para facilitación de la absorción gastrointestinal. Actualmente, los hidrolizados de proteínas se fabrican utilizando endoproteasas disponibles industrialmente por lo que la formación de di- y tripéptidos en tales productos es aleatoria y está lejos de ser óptima. Aunque se conocen di- y tripeptidilpeptidasas, la mayoría de estas enzimas se han obtenido a partir de fuentes de mamífero, por lo que estas enzimas no son adecuadas para aplicación industrial. Las pocas enzimas descritas para fuentes microbianas son citosólicas, es decir que no son secretadas o exhiben pH y temperatura óptimos desfavorables (Springer Handbook of Enzymes, Volume 6, Class 3.4; Second Edition, ISBN 3-540- 43012-1; and WO 96/14404).

55 Hasta ahora no estaban disponibles peptidasas potencialmente de grado alimentario eficaces en coste, que pudieran utilizarse en condiciones industriales, por lo que no podían producirse hidrolizados atractivos que presenten proporciones elevadas de tripéptidos, particularmente si el hidrolizado tiene que obtenerse a partir de un sustrato rico en prolina. La presente invención da a conocer una mezcla de enzimas que permitiría protocolos simples para

convertir todos los sustratos proteináceos relevantes en hidrolizados sumamente deseables con sabor agradable, absorción gastrointestinal eficiente, niveles alergénicos bajos y, en caso requerido, un contenido elevado de péptidos bioactivos.).

5 Esta composición de enzimas constituida por una endoproteasas, preferiblemente una endoproteasas específica de prolina, y una tripeptidasa cuando se añade a una proteína adecuada, es capaz de producir el hidrolizado de proteínas que es rico en tripéptidos y opcionalmente dipéptidos en el cual los di- y/o tripéptidos son ricos en prolina en un extremo del péptido.

10 En todas las aplicaciones, estos hidrolizados de proteínas ofrecen ventajas atractivas tales como alergenicidad reducida, absorción gastrointestinal facilitada, menos deterioro químico de los aminoácidos deseables como glutamina y cisteína y, finalmente, ausencia de precipitados proteináceos en bebidas ácidas durante períodos de almacenamiento prolongados. Todas estas ventajas pueden combinarse si el hidrolizado se prepara utilizando una combinación de una endoproteasas, preferiblemente una endoproteasas específica de prolina, y una o más tripeptidasas. Conforme a la invención, se utilizan preferiblemente varias tripeptidasas útiles en un estado puro o aislado. Una tripeptidasa pura puede obtenerse por ejemplo por sobreexpresión de la enzima en un microorganismo hospedador transformado adecuado. Se prefieren aquellas tripeptidasas que exhiben una selectividad baja hacia el sustrato a escindir, es decir exhiben mínimas únicamente preferencias para la escisión de residuos de aminoácido. Se prefieren combinaciones de tripeptidasas que hidrolizan porcentajes altos de los enlaces peptídicos existentes naturalmente. A pesar de esta actividad alta para enlaces peptídicos existentes naturalmente, se evita una hidrólisis total a aminoácidos libres por la naturaleza de las tripeptidasas. Asimismo, se deciden tripeptidasas que son óptimamente activas entre pH 4 a 8 y exhiben estabilidad térmica adecuada. Estabilidad térmica adecuada significa que al menos 40%, preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente entre 70 y 100% de la actividad hidrolítica inicial sobrevive después de calentamiento de la enzima junto con el sustrato durante una hora a 50 °C. La tripeptidil-aminopeptidasa es la tripeptidasa preferida.

25 Las tripeptidil-aminopeptidasas son enzimas que pueden liberar tripéptidos a partir del término N de un oligopeptido. Se conoce poco acerca de enzimas que puedan liberar tripéptidos a partir del término carboxi del oligopeptido ("tripeptidil-carboxipeptidasas o peptidil-tripeptidasas"). Las diversas ventajas fisiológicas de la mezcla de tripéptidos que pueden ser formados por tales enzimas se han ilustrado anteriormente. Los tripéptidos ofrecen una variación de secuencia mucho mayor que los dipéptidos, pudiendo aumentar por tanto la probabilidad de una adaptación óptima con los receptores responsables para modulación de las actividades biológicas. Esto se ilustra muy bien por el número documentado de péptidos bioactivos que tienen un residuo prolina carboxi-terminal (véase por ejemplo WO 01/68.114).

30 Se han aislado tripeptidil-aminopeptidasas (EC 3.4.14) a partir de fuentes tanto de mamífero como de plantas. Microorganismos a partir de los cuales se han aislado tripeptidilpeptidasas son por ejemplo especies de *Streptomyces* (JP08308565, WO 95/17.512 y US 5856166), *Porphyromonas gingivalis* (WO 00/52147), 35 *Dactyliostelium discoideum* y especies de *Aspergillus* (WO 96/14404). Hasta la fecha, la existencia de tripeptidil-carboxipeptidasas (EC 3.4.15) ha sido demostrada únicamente en células de mamífero y en el microorganismo *Clostridium histolyticum*.

40 Una mezcla de tripeptidasas es especialmente preferida en el proceso de la presente invención. Se ha encontrado que una mezcla de este tipo puede acortar el tiempo de reacción. Además, se forma una mayor cantidad de tripéptidos si se compara con el uso de una sola peptidasa. Peptidasas especialmente adecuadas en la presente invención se describen en la solicitud de patente de los mismos inventores, también en tramitación, PCT/EP02/01984 (= WO 02/068.623). Estas enzimas se obtienen a partir de *A. niger*. En la Tabla 1 de PCT/EP02/01984 se dan los números SEQ ID de las tripeptidasas. Las secuencias correspondientes se dan también en esta solicitud.

45 Desde un punto de vista económico, la implicación de las observaciones de los autores de la presente invención es que existe una necesidad clara en el presente proceso para el uso de tripeptidasas y/o endoproteasas en cantidades altas y en una forma pura o aislada. Una vía preferida para la obtención de tripeptidasas purificadas y aisladas es por superproducción utilizando técnicas de DNA recombinante. Dado que muchos productos alimentarios son ácidos y las incubaciones enzimáticas de larga duración en circunstancias industriales no estériles requieren también 50 condiciones de incubación ácidas y un proceso a temperaturas elevadas a fin de prevenir la contaminación microbiana, un método preferido es la superproducción de tripeptidasas estables en medio ácido que exhiban estabilidades adecuadas en condiciones de proceso de 50 °C o temperaturas más altas utilizando técnicas de DNA recombinante. Un método particularmente preferido es la superproducción de tales tripeptidasas derivadas de *Aspergillus*, y un método muy preferido es la superproducción de tales tripeptidasas a partir de *Aspergillus niger*.

55 Un polipéptido utilizado en el proceso de la invención que tiene actividad de endoproteasas o tripeptidasa puede encontrarse en forma aislada. Como se define en esta memoria, un polipéptido aislado es un polipéptido producido endógenamente o recombinante que está esencialmente exento de otros polipéptidos, y típicamente tiene una pureza de al menos 20%, preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente al menos 60%, aún más

preferiblemente al menos 80%, todavía más preferiblemente al menos 90%, o muy preferiblemente al menos 95%, como se determina por SDS-PAGE. El polipéptido puede aislarse por centrifugación, filtración (por ejemplo ultrafiltración) o métodos cromatográficos, o cualquier otro método conocido en la técnica para la obtención de proteínas puras a partir de soluciones brutas. Se comprenderá que el polipéptido puede estar mezclado con portadores o diluyentes que no interfieran con la finalidad propuesta del polipéptido, y por tanto el polipéptido en esta forma se considerará todavía como aislado. El mismo comprenderá generalmente el polipéptido en una preparación en la cual más de 10%, por ejemplo más de 20%, 30%, 40%, 50%, 80%, 90%, 95% o 99% en peso de las proteínas en la preparación es un polipéptido para uso en el proceso de la presente invención.

5 La finalidad principal de los hidrolizados de la invención es minimizar la alergenicidad o respuesta inmunológica del producto, o facilitar la absorción gastrointestinal. En la producción de tales hidrolizados, el uso de una endoproteasa específica de prolina en combinación con una o más tripeptidasas es de especial importancia, dado que éstas ofrecen una vía eficiente para producción de tales hidrolizados.

10 La mezcla de enzimas conforme a la invención puede comprender una tripeptidasa o una mezcla de tripeptidasas. La mezcla de enzimas puede comprender también una endoproteasa, tal como una serina-proteasa, una 15 metaloendoproteasa, una proteasa aspártica, o una endoproteasa específica de prolina (PSE o E.C. 3.4.21.26) que operan junto con la tripeptidasa para proporcionar un hidrolizado de proteínas primario. Por supuesto, la endoproteasa puede ser una o más endoproteasas diferentes que se incuban simultánea o consecutivamente con el sustrato de proteína; por ejemplo, el sustrato proteináceo puede digerirse primeramente con una endoproteasa, 20 preferiblemente una serina-proteasa, una metaloendoproteasa o una proteasa aspártica, y digerirse subsiguientemente con una segunda endoproteasa, preferiblemente PSE. Antes de añadir la segunda endoproteasa, las enzimas ya presentes se desactivan opcionalmente.

25 Las serina-proteasas representan una clase bien conocida de endoproteasas alcalinas. Ejemplos incluyen subtilisina (E.C. 3.4.21.62) y quimotripsina (E.C.3.4.21.1 que prefieren la escisión de la cadena peptídica en el lado carboxi-terminal de aminoácidos hidrófobos tales como Tyr, Trp, Phe y Leu. La mezcla de enzimas de la invención puede 30 contener quimotripsina y/o subtilisina. La subtilisina es producida por especies de *Bacillus*, tiene una especificidad de sustrato particularmente amplia y un pH alcalino óptimo amplio. La enzima es óptimamente activa entre 50 °C y 60 °C. La enzima está disponible económicamente como producto comercial regular y es útil en la producción de, por ejemplo, diversos hidrolizados lácteos. La quimotripsina se puede obtener de páncreas de animales, tiene una especificidad de sustrato algo más estrecha a valores de pH ligeramente más alcalinos que la subtilisina y es óptimamente activa por debajo de 50 °C.

35 La clase de metaloendoproteasas está muy extendida en bacterias, hongos y organismos superiores. Las mismas pueden dividirse en metaloproteasas neutras y ácidas. De estas 2 subclases, únicamente las proteasas neutras exhiben la preferencia de escisión deseable, es decir la escisión de la cadena peptídica en el lado carboxi-terminal de residuos de aminoácidos hidrófobos tales como Phe y Leu. Ejemplos bien conocidos de las metaloproteasas 40 neutras son bacilolisinina (EC 3.4.24.28) y termolisina (E.C. 3.4.24.27) y cualquiera de ellas, o ambas, pueden estar presentes en la mezcla de enzimas de la invención. Ambas enzimas se obtienen de especies de *Bacillus* y exhiben actividad máxima en condiciones neutras o ligeramente alcalinas. Ejemplos menos conocidos de estas metaloendoproteasas neutras se han obtenido de especies de *Aspergillus*. En casos en que la endoproteasa específica de prolina no se utiliza por sus efectos supresores del amargor sino para ayudar en la hidrólisis de secuencias proteínicas ricas en prolina, puede ser ventajosa la combinación con una metaloproteasa ácida, como 45 por ejemplo deuterolisinina (E.C. 3.4.24.39).

50 Al contrario que las serina- y metaloendoproteasas, las proteasas aspárticas presentan un pH ácido óptimo que puede ser utilizado ventajosamente en combinación con una endoproteasa específica de prolina y una tripeptidasa que tengan también pH óptimos ácidos. Entre las proteasas aspárticas, la pepsina está reconocida especialmente como una endoproteasa con especificidad amplia. Endoproteasas aspárticas derivadas de *A. niger* adecuadas han sido especificadas en la solicitud de patente de los mismos inventores, también en tramitación, también en tramitación, PCT/EP02/01984.

55 El proceso conforme a la invención implica una combinación de una o más endoproteasas con una o más tripeptidasas. Ventajosamente, las enzimas se utilizan en forma aislada y en un intervalo de ratio proteínica de endoproteasa a tripeptidasa entre 1:0,05 y 1:50, preferiblemente entre 1:0,1 y 1:10.

Para establecer la ratio proteínica de endoproteasa(s) a tripeptidasa(s) como se utiliza en el proceso conforme a la invención, las enzimas sustancialmente puras se someten a análisis SDS-PAGE seguido por un protocolo estándar de tinción de proteínas utilizando Azul Brillante Coomassie. La cuantificación de las enzimas utilizadas se lleva a cabo utilizando un densímetro de punto que mide los valores de densidad integrados de las bandas de proteína correspondientes con las enzimas activas. Para evitar la degradación de las enzimas durante el paso de desnaturalización realizado antes de la SDS-PAGE, la desnaturalización se lleva a cabo por mezcla de las enzimas con un inhibidor de proteasas, inmersión de la mezcla en un baño de agua a 99 °C durante 5 minutos, después de lo cual se añaden las cantidades requeridas de SDS y compuesto reductor. Las serina-endoproteasas se inhiben por

mezcla con Pefabloc, las metaloproteasas por mezcla con fosforamidón y las proteasas aspárticas por mezcla con pepstatina. Todos los inhibidores más los procedimientos de trabajo pueden obtenerse de Roche.

- 5 La solicitud de patente de los mismos inventores, también en tramitación, PCT/EP01/14.480 describe el uso de una endoproteasa específica de prolina que, en conjunción con las endoproteasas de la técnica anterior, es capaz de generar hidrolizados de proteína no amargos. Esta endoproteasa específica de prolina es una enzima capaz de escindir péptidos o polipéptidos en el extremo carboxi-terminal de residuos prolina. Endoproteasas específicas de prolina se encuentran ampliamente en animales y plantas, pero su presencia en microorganismos parece ser limitada. Hasta la fecha, se han identificado endoproteasas específicas de prolina en especies de *Aspergillus* (EP 0 522 428 y WO 02/45.524), *Flavobacterium* (EP 0 967 285), *Aeromonas* (J.Biochem.113, 790-796), *Xanthomonas* y *Bacteroides*. Se ha demostrado que una incidencia alta de residuos prolina en el extremo carboxi-terminal de los péptidos puede estar correlacionada con amargor bajo. Además, los autores de la invención han demostrado que la alta incidencia deseada de residuos prolina carboxi-terminales puede conseguirse sólo con concentraciones elevadas de una endoproteasa específica de prolina, a saber concentraciones que exceden de la actividad especificada en JP5.015.314 por varios órdenes de magnitud y además en ausencia de una carboxipeptidasa.
- 10 15 En conjunción con las endoproteasas de la técnica anterior, la endoproteasa específica de prolina es capaz de hidrolizar extensamente proteínas ricas en prolina produciendo péptidos relativamente pequeños con una distribución de tamaños estrecha. Debido a la preferencia de escisión, de la endoproteasa específica de prolina, muchos de los péptidos formados tienen un residuo prolina carboxi-terminal. Adicionalmente, el proceso del hidrolizado es relativamente simple, dado que no está implicado un paso de eliminación del amargor por exoproteasas, por lo que únicamente se formarán niveles bajos de aminoácidos libres.
- 20 25 30 35

Desde un punto de vista económico, la implicación de esta observación es que existe una clara necesidad en el presente proceso para el uso de endoproteasas específicas de prolina en cantidades altas y en una forma pura o aislada, que se describe en la solicitud de patente de los mismos inventores, también en tramitación, PCT/EP01/14.180. Una vía preferida de obtención de PSE purificada y aislada es por la superproducción de una endoproteasa específica de prolina de este tipo utilizando técnicas de DNA recombinante. Dado que muchos productos alimenticios son ácidos y las incubaciones enzimáticas de larga duración en circunstancias industriales no estériles requieren condiciones de incubación ácidas y una temperatura de proceso de 50 °C o mayor para prevenir la contaminación microbiana, un método más preferido es la superproducción de una endoproteasa específica de prolina estable en medio ácido utilizando técnicas de DNA recombinante. Un método particularmente preferido es la superproducción de una endoproteasa específica de prolina derivada de *Aspergillus*, y un método muy preferido es la superproducción de una endoproteasa específica de prolina derivada de *Aspergillus niger*. Adicionalmente, las enzimas conforme a la invención pueden utilizarse en forma inmovilizada, con lo que pueden tratarse grandes cantidades de líquidos que contengan proteínas. Vías para seleccionar materiales soporte apropiados y métodos de inmovilización adecuados han sido descritos extensamente en la bibliografía, por ejemplo en "Immobilization of Enzymes and Cells" (ed. Gordon F. Bickerstaff; ISBN 0-89603-386-4)

Una vez que las nuevas enzimas se han hecho disponibles en forma relativamente pura, se contemplan otras aplicaciones nuevas y sorprendentes que presentan ventajas técnicas y económicas.

- 40 Una nueva aplicación podría ser la creación de hidrolizados no amargos a partir de sustratos proteináceos con nuevas composiciones de aminoácidos. Dichas nuevas composiciones de aminoácidos pueden ofrecer ventajas importantes en ciertas aplicaciones alimentarias y médicas. Ejemplos son caseína o aislado de proteína de gluten de trigo o maíz con niveles altos de residuos de aminoácidos hidrófobos y, más específicamente, residuos prolina presentes. Hasta ahora, tales sustratos no tenían uso práctico alguno debido a los desagradables sabores amargos generados por hidrólisis y los grados limitados de hidrólisis obtenidos utilizando los métodos de la técnica anterior. Por utilización del método de hidrólisis conforme a la invención, pueden hacerse disponibles nuevos hidrolizados no amargos para uso en nutrición infantil y clínica, en dietas terapéuticas así como en dietas para el consumidor y nutrición deportiva.

- 45 50 55 Otras ventajas, no relacionadas directamente con la supresión de sabores amargos, incluyen la incubación de la enzima con proteínas alimentarias a fin de reducir su respuesta alergénica o inmunológica. Varias proteínas alimentarias contienen subfracciones altamente alergénicas, tales como el gluten de trigo que contiene prolaminas con secuencias peptídicas ricas en prolina. Estas proteínas pueden someterse a las nuevas enzimas para atenuar su antigenicidad. Una aplicación específica es el uso de una combinación de una endoproteasa, preferiblemente una endoproteasa específica de prolina con una tripeptidasa para consumo oral. Una composición de este tipo para ingestión oral podría ser una tableta o una píldora o un polvo o líquido en el cual la combinación de las dos enzimas exhibe una estabilidad al almacenamiento satisfactoria. Si se mantiene en forma seca, la estabilidad al almacenamiento deseada de las enzimas planteará pocos problemas técnicos. Formulaciones líquidas de enzimas que proporcionan estabilidades al almacenamiento satisfactorias y adecuadas para consumo oral han sido descritas en la técnica anterior. Por ingestión oral y la combinación de las 2 enzimas estables en medio ácido, se facilitará la digestión de proteínas ricas en prolina tales como caseínas o glútenes, previniendo o minimizando con ello los efectos descritos para, por ejemplo, el esprue celíaco.

La endoproteasa específica de prolina se utiliza para generar péptidos que tienen un residuo prolina carboxi-terminal. Tales péptidos son adiciones deseables para diversos productos alimenticios o nutrientes farmacéuticos como los que se han implicado en efectos anoréxicos, fibrinolíticos, antitrombóticos y antihipertensivos, así como en la protección de la mucosa gástrica y la prevención de la artritis reumatoide.

- 5 En la mayoría de estas nuevas aplicaciones, la endoproteasa específica de prolina debería exhibir preferiblemente un espectro de actividad con un pH ácido óptimo.

Para resolver los problemas arriba mencionados, la invención demuestra que la actividad por sí sola de una endoproteasa específica de prolina aislada y purificada, es decir sin actividad sustancial concomitante o subsiguiente de una enzima exoproteolítica, es suficiente para eliminar significativamente el amargor de un hidrolizado de proteínas. Para ello, la endoproteasa específica de prolina puede comprender al menos 5 unidades por gramo de proteína de la preparación enzimática de la invención, preferiblemente 10 u/g, más preferiblemente 25 u/g y aún más preferiblemente 50 u/g. Además, estudios realizados conforme a la invención demuestran que la actividad por sí sola de una endoproteasa específica de prolina aislada y purificada, es decir sin la actividad concomitante o subsiguiente de una enzima exoproteolítica, es suficiente para reducir significativamente el nivel global de inmunogenicidad de los hidrolizados de proteínas, así como para aumentar significativamente su solubilidad global en condiciones ácidas. Los hidrolizados producidos conforme a la invención están enriquecidos en péptidos que tienen un residuo prolina carboxi-terminal.

20 Una realización de la presente invención proporciona el uso de una endoproteasa específica de prolina, preferiblemente aislada y/o purificada, para la producción con alto rendimiento de hidrolizados de proteínas que tienen un amargor sustancialmente bajo y propiedades alergénicas bajas sin la producción concomitante de niveles sustanciales de aminoácidos libres en combinación con una TPAP. Todas las enzimas pueden añadirse al mismo tiempo al sustrato, o el proceso enzimático puede realizarse en 2 fases, primeramente la hidrólisis con PSE seguida por la hidrólisis con TPAP.

25 Las tripeptidasas son las enzimas de elección para la preparación de hidrolizados de proteínas fácilmente asimilables. No sólo los péptidos formados pueden transponerse directamente a través de la pared del intestino delgado sino que, debido a su pequeño tamaño, estos péptidos combinan una solubilidad satisfactoria en agua con ausencia de cualquier potencial alergénico. Además, aminoácidos vulnerables pero indispensables como glutamina, cisteína y tirosina son mucho más estables si se presentan en la forma de tripéptidos que los aminoácidos libres. Así, por digestión de sustratos proteináceos seleccionados con una endoproteasa adecuada en combinación con una tripeptidil-peptidasa, se forman hidrolizados en los cuales los residuos de aminoácido seleccionados están presentes en una forma estable y todavía fácilmente asimilable. Productos imaginables que pueden producirse convenientemente utilizando la mezcla de enzimas conforme a la invención son hidrolizados de gluten fácilmente asimilables que suministran niveles altos de glutamina, así como hidrolizados obtenidos a partir de queratina o fracciones ricas en lactalbúmina de lactosuero que suministran niveles altos de cisteína. Análogamente, hidrolizados que contienen tripéptidos que ejercen una actividad mejorada moduladora, reguladora o de tipo hormona como resultado de su mayor estabilidad, por ejemplo tripéptidos ricos en residuos prolina o glicina, podrían formarse por la digestión de sustratos como gelatina o caseína o proteína de maíz. Debido al tamaño óptimo y la estabilidad mejorada de los péptidos presentes en estos hidrolizados, la absorción por vía oral es probable que dé como resultado niveles de tripéptidos relativamente altos en la circulación sanguínea, con lo que se realiza el concepto de nutrientes farmacéuticos verdaderos. Efectos mejorados pueden ser alcanzables por conversiones químicas menores de los péptidos formados, v.g. ciclación de péptidos que contienen residuos prolina.

40 El proceso de la invención es adecuado para preparación de hidrolizados de diversas fracciones proteínicas. En particular, un sustrato proteínico, tal como proteína de leche, puede incubarse con una endoproteasa específica de prolina aislada y purificada y una TPAP para producir un hidrolizado de proteínas enriquecido en fragmentos peptídicos que tienen una prolina carboxi-terminal.

45 La longitud media de los péptidos en los hidrolizados es en general de 2 a 9 aminoácidos, preferiblemente de 3 a 6 aminoácidos, más preferiblemente de 3 a 5 aminoácidos. Esta longitud media está basada en péptidos que tienen masas moleculares de 200 a 2000 Da y puede calcularse tomando la suma del número de cada péptido multiplicado por la longitud de dicho péptido, y dividiendo esta suma por el número total de péptidos.

50 Por péptidos o fragmentos peptídicos se entienden péptidos con masas moleculares de 200 a 2000 Da. Estos péptidos pueden analizarse conforme al análisis LC/MC como se describe en la sección "Materiales y Métodos".

55 En general, en la producción de los hidrolizados de proteínas de la invención el sustrato se hidroliza sustancialmente, con preferencia al menos 20% (p/p) del sustrato de proteínas se convierte en péptidos que tienen masas moleculares de 200 a 2000 Dalton. Más preferiblemente, de 30 a 90% (p/p) y aún más preferiblemente de 40 a 80 % (p/p) del sustrato proteínico se convierte en tales péptidos.

Otra realización de la invención es un hidrolizado de proteínas enriquecido con un contenido relativamente alto de péptidos que tienen prolina como el residuo de aminoácidos carboxi-terminal. Dado que las preparaciones

enzimáticas utilizadas típicamente en la génesis de hidrolizados de proteínas no son capaces de generar péptidos que llenen residuos prolina en los términos carboxi, se desean hidrolizados de proteínas que sean relativamente ricos en tales péptidos.

5 Sustratos para hidrólisis por una mezcla enzimática de la invención incluyen leche entera, leche desnatada, caseína ácida, caseína de cuajo, productos ácidos de lactosuero o productos de suero de queso. Son también útiles fracciones obtenibles industrialmente como por ejemplo fracciones enriquecidas en lactalbúmina. Es sumamente sorprendente que la endoproteasa específica de prolina derivada de *Aspergillus* no sólo escinde en el lado carboxi-terminal de residuos prolina sino también en el lado carboxi-terminal de residuos hidroxiprolina, lo que hace que otras proteínas animales basadas en colágeno tales como gelatina, así como huesos o espinas de pescado que contienen carne residual sean sustratos interesantes para la enzima. Además, sustratos vegetales como gluten de trigo o maíz y fracciones proteínicas obtenidas de estos glútenes así como fracciones de proteínas obtenidas de, por ejemplo, soja, arroz o trigo son sustratos adecuados. Los hidrolizados de proteínas de leche producidos conforme a la invención pueden utilizarse con o sin pasos adicionales de filtración o purificación en diversos productos alimenticios especiales tales como hidrolizados hipoalergénicos para nutrición infantil, hidrolizados básicos para nutrición enteral y dietética, así como concentrados de proteínas para diversas formas de alimentos dietéticos. Así pues, los hidrolizados de proteínas de la invención pueden utilizarse para obtener productos alimenticios que tienen antigenicidad baja, tales como fórmulas para niños o que requieren absorción gastrointestinal facilitada, tales como diversos productos médicos o relacionados con la salud. Adicionalmente, las preparaciones de enzimas conforme a la invención se pueden utilizar para reducir el amargor en alimentos saborizados por al menos un hidrolizado de proteínas, incluso cuando el hidrolizado de proteínas esté presente en grandes cantidades. Por ejemplo, los alimentos pueden comprender entre 5 % y 10 % (p/v) de un hidrolizado de proteínas y tener todavía su amargor reducido utilizando una preparación enzimática de la invención.

10

15

20

25

30

35

40

La presente invención utiliza preferiblemente una endoproteasa específica de prolina aislada o purificada con un pH ácido óptimo en combinación con una o más tripeptidas aisladas que exhiben valores ácidos de pH óptimos para la preparación de un hidrolizado de proteínas para diversas aplicaciones alimentarias. Una endoproteasa específica de prolina aislada y purificada de este tipo se define por tener al menos 10 unidades de actividad de endoproteasa específica de prolina por gramo de material proteináceo. Estas unidades deberían medirse utilizando el péptido sintético Z-Gly-Pro-pNA (Bachem, Suiza) a 37 grados C y pH 7. No obstante, si el pH óptimo de la endoproteasa específica de prolina es inferior a pH 6, por ejemplo en el caso de la endoproteasa específica de prolina de *Aspergillus niger*, las unidades deberían medirse a pH 5, como se especifica en la sección Materiales y Métodos. La mezcla de enzimas de la invención evita numerosas desventajas de las mezclas de enzimas conocidas previamente en la técnica. Y lo que más importante, la endoproteasa específica de prolina aislada y purificada es clave en la producción de hidrolizados que combinan potencial alergénico bajo, rendimiento elevado y perfil de amargor bajo. Las tripeptidas aisladas son claves en la generación de péptidos fácilmente asimilables sin potencial alergénico alguno y con una composición de aminoácidos específica preferida. Además, los hidrolizados producidos con una mezcla de enzimas que comprende esta endoproteasa específica de prolina son relativamente estables en el cuerpo, exhiben una estabilidad sorprendente al almacenamiento después de su incorporación en productos ácidos y contienen niveles muy bajos de aminoácidos libres, por lo que se generan sabores desagradables mínimos durante los pasos de calentamiento, tales como secado por pulverización o esterilización del producto. Los hidrolizados conforme a la invención contendrán menos de 900 micromoles de aminoácidos libres por gramo de peso seco, preferiblemente menos de 300 micromoles de aminoácidos libres por gramo de peso seco, más preferiblemente menos de 150 micromoles de aminoácidos libres por gramo de peso seco, y aún más preferiblemente menos de 50 micromoles por gramo de peso seco.

Leyendas de las figuras

45 Fig. 1. Comparación de la especificidad de TPAP-A y TPAP-B utilizando sustratos A-A-X-pNA donde X es cualquiera de los aminoácidos naturales, a pH 4.

Fig. 2. Composición de los péptidos solubles obtenidos por hidrólisis de alfa-lactalbúmina con las combinaciones de enzimas que se indican.

Materiales y Métodos

50 Se obtuvo caseinato de sodio que contenía 90 % de proteína de DMV International (Holanda). Se obtuvo subtilisina de *B. licheniformis* (Delvolase®, 560.000 DU por gramo) de DSM Food Specialties (Seclin, Francia).

La actividad enzimática de las endoproteasas específicas de prolina que exhiben valores óptimos de pH superiores a pH 6,0 se ensaya conforme a T. Diefenthal y H. Dargatz (World Journal of Microbiology & Biotechnology 11, 209-212 (1995)) sobre Z-Gly-Pro-pNA 0,26 mM en tampón de fosfato 0,1 M a pH 7,0 y a 25 °C. El producto se monitorizó espectrofotométricamente a 410 nm. Las endoproteasas específicas de prolina de *Aspergillus* se midieron conforme al método descrito en la patente japonesa JP5015314 con modificaciones menores. En resumen, la actividad enzimática se testa sobre Z-Gly-Pro-pNA a 37 °C en un tampón citrato/fosfato disódico de pH 5. Se elige pH 5,0 debido a que en este test el pH óptimo de la enzima es inferior a pH 6. El producto de reacción se monitorizó

5 también espectrofotométricamente a 410 nM utilizando un coeficiente de extinción molar de 10.500 por mol/litro. La actividad de la tripeptidilaminopeptidasa purificada sobre la producida por *A. niger* (TPAP-A) se midió de manera similar. No obstante, en este caso se utilizó el sustrato sintético Ala-Ala-Phe-pNA (Bachem, Suiza) en una incubación en tampón de citrato de 0,1 mol/litro a pH 4,0 y 60 °C. La TPAP-A purificada tenía una actividad de 8 unidades/mL.

Una unidad se define como la cantidad de enzima que provoca la liberación de 1 µmol de p-nitroanilida por minuto en estas condiciones.

El Grado de Hidrólisis (DH) como se obtiene durante la incubación con las diversas mezclas proteolíticas se monitorizó utilizando un test OPA rápido (JFS, Vol 66, nº 5, 2001).

10 La evaluación sensorial de los hidrolizados de proteínas formados fue realizada por un instituto independiente que se valía de un panel adiestrado en detección y clasificación de diversos niveles de amargor. Durante las sesiones, las pruebas de sabor se realizaron de modo 'ciego' y el amargor se registró en una escala de 0 (ninguno)- 4 (muy amargo). Los miembros del panel se adiestraron con sulfato de quinina con las soluciones siguientes:

15 ppm sulfato de quinina > intensidad de amargor = 1

15 20 ppm sulfato de quinina > intensidad de amargor = 2

30 ppm sulfato de quinina > intensidad de amargor = 3

50 ppm sulfato de quinina > intensidad de amargor = 4.

Análisis LC/MS

20 Se utilizó HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) utilizando un espectrómetro de masas Qtof-2 (Micromass, Manchester, Reino Unido) para separar los péptidos formados durante la digestión con tripsina. Se atraparon 5 microlitros de la solución de péptidos en una micro-precolumna, C18, 5*0,3 mm (MCA30-05-C18, LC Packings, Amsterdam, Holanda) utilizando agua Milli Q que contenía 0,1 % de ácido fórmico a una tasa de flujo de 20 microlitros/min. Los péptidos se eluyeron luego de la precolumna, utilizando un gradiente rápido 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). El gradiente comenzaba a 100 % de Solución A y aumentaba hasta 60 % de Solución B en 20 minutos, y se mantuvo en la última ratio durante 5 minutos más. La tasa de flujo utilizada durante la elución de los péptidos fue 200 nl/minuto. Utilizando análisis LC/MS/MS pudieron determinarse las secuencias parciales de aminoácidos de la endopeptidasa específica de prolina de *A. niger*, por nueva secuenciación de péptidos adecuados.

30 Se utilizó HPLC empleando un espectrómetro de masas con trampa iónica (Thermoquest®, Breda, Holanda) acoplado a una bomba P4000 (Thermoquest®, Breda, Holanda) en la caracterización de los hidrolizados enzimáticos de proteínas producidos por la mezcla de enzimas de inventiva. Los péptidos formados se separaron utilizando una columna PEPMAP C18 300A (MIC-15-03-C18-PM, LC Packings, Amsterdam, Holanda) en combinación con un gradiente de ácido fórmico al 0,1% + ácido noafluoropentanoico (NFPA) 1 mM en agua Milli Q (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.; Solución A) y ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo (Solución B) para la elución. El gradiente comenzaba a 100 % de Solución A y aumentaba hasta 40 % de Solución B en 140 minutos, manteniéndose a la última ratio durante 5 minutos más. El volumen de inyección utilizado fue 50 microlitros, la tasa de flujo era 50 microlitros por minuto y la temperatura de la columna se mantenía a 30 °C. La concentración de proteínas de la muestra inyectada era aproximadamente 50 microgramos/mL.

40 Se obtuvo información detallada de los péptidos individuales utilizando el algoritmo MS/MS "dependiente de escaneo", que es un algoritmo característico para un espectrómetro de masas con trampa iónica.

45 El análisis de escaneo completo fue seguido por análisis de escaneo con zoom para la determinación del estado de carga del ion más intenso en el intervalo de masas de escaneo completo. El análisis MS/MS subsiguiente del último ion dio como resultado información parcial de la secuencia peptídica, que pudo utilizarse para búsqueda en bases de datos utilizando la aplicación SEQUEST de Xcalibur Bioworks (Thermoquest®, Breda, Holanda). Los bancos de datos utilizados se extrajeron del banco de datos OWL.fasta, disponible en el NCBI (National Centre for Biotechnology informatics), que contenía las proteínas de interés para la aplicación utilizada. En aquellos experimentos en los que se medían sustratos proteínicos bien caracterizados tales como proteínas de lactosuero o caseínas, la precisión de la técnica de análisis se aumentó por omisión de aquellos espectros MS/MS con un ajuste de secuencia menor que 50%.

50 Utilizando diferentes mezclas de enzimas de la invención, el intervalo de masas de los péptidos formados comienza en di- y tripéptidos. Utilizando el reactivo volátil de apareamiento iónico NFPA en combinación con cromatografía líquida en fase inversa pueden monitorizarse también péptidos más pequeños y más hidrófilos que terminan con una

masa comprendida entre aproximadamente 200 y 2000 Daltons, considerada adecuada para análisis ulterior por secuenciación MS.

5 Se utilizó angiotensina ($M = 1295,6$) para ajustar la sensibilidad óptima en modo MS y para fragmentación óptima en modo MS/MS, realizando una infusión constante de 60 mg/mL, que daba como resultado especies con carga principalmente doble y triple en modo MS, y una energía de colisión óptima de aproximadamente 35% en modo MS/MS.

Análisis LC/MS de fórmulas para niños e hidrolizados comerciales de proteínas

10 Antes de la LC/MS tuvo que retirarse el material graso de las fórmulas para niños. A este fin, las muestras de nutrición completa (13,5 g de polvo en 100 mL de agua Milli Q) se extrajeron 3 veces con 30 mL de hexano. Se añadieron pequeñas cantidades de NaCl para mejorar la separación de las capas de disolvente. Se obtuvieron luego 5 mL de la capa de agua y se liofilizaron. Antes del análisis, la muestra se redissolvió en 25 mL de agua Milli Q, se centrifugó 2 veces (a 13.000 rpm) y se filtró a través de un filtro de 0,22 μm . A partir de las muestras hidrolizadas puras, se disolvieron 400 mg en 100 mL de agua Milli Q, se centrifugaron 2 veces (a 13.000 rpm) y se filtraron a través de un filtro de 0,22 μm . Para caracterizar los péptidos presentes en los hidrolizados de proteína comerciales, 15 se siguió la misma estrategia que se ha descrito arriba para los hidrolizados enzimáticos formados por la mezcla de enzimas de inventaria, es decir el hidrolizado filtrado se aplicó a la columna HPLC y los péptidos individuales con masas moleculares entre 200 y 2000 Daltons se caracterizaron ulteriormente por el análisis MS/MS.

Determinación de la fracción molar de péptidos (%) que llevan una prolina carboxi-terminal

20 Puede utilizarse LC/MS/MS para el análisis del término C de un péptido. Con un algoritmo en el que la masa molecular del péptido (analizada con LC/MS) y su secuencia (parcial) de aminoácidos (analizada con LC/MS/MS) enlazadas con procedimientos de búsqueda automáticos en bancos de datos de proteínas, pueden analizarse mezclas de péptidos complejas. Estas opciones han permitido a los inventores cuantificar la incidencia de péptidos que llevan un residuo prolina carboxi-terminal.

25 Para determinar la fracción molar de péptidos que llevan una prolina carboxi-terminal en un hidrolizado de proteínas, se seleccionan picos de péptidos individuales que se eluyen de la columna PEPMAP y se determinan secuencias parciales de aminoácidos carboxi-terminales utilizando las técnicas arriba especificadas. El análisis de al menos 20, preferiblemente al menos 30 y más preferiblemente entre 40 y 60, por ejemplo 50 de los péptidos más abundantes seleccionados aleatoriamente, proporciona así una idea de la frecuencia con la que aparecen péptidos que llevan un residuo prolina en el término carboxi del péptido. El cociente del número de péptidos encontrados que llevan un 30 residuo prolina carboxi-terminal multiplicado por 100 y el número total de péptidos analizados proporciona así la fracción molar de péptidos (%) que llevan una prolina carboxi-terminal.

Determinación de la fracción molar (%) de prolina en el sustrato proteínico utilizado para generar el hidrolizado

35 Cualquier material graso se eliminó primeramente por extracción en hexano como se detalla en el párrafo que describe el análisis LC/MS de fórmulas para niños e hidrolizados comerciales de proteínas. La hidrólisis ácida del sustrato proteínico para convertir las proteínas presentes en aminoácidos libres se consiguió preparando una suspensión de 100 miligramos de material proteináceo en 2 mL de HCl 6 N. La hidrólisis ácida se realizó durante 22 horas a 112 °C en una atmósfera exenta de oxígeno. Después de centrifugación, se diluyó 10 veces el sobrenadante con HCl diluido. Después de esta hidrólisis, los aminoácidos se derivatizaron y se analizaron conforme al método Picotag como se especifica en el manual de operadores del Sistema de Análisis de Aminoácidos de Waters (Milford, 40 MA, EE.UU.). El nivel de prolina presente se cuantificó utilizando métodos HPLC. Para determinar la fracción molar (%) de prolina en la muestra, los micromoles de prolina presentes multiplicados por 100 se dividieron por la suma de los micromoles de todos los aminoácidos presentes en la muestra analizada. Dado que durante la hidrólisis ácida se destruyen Trp y Cys, estos 2 aminoácidos no están incluidos en esta suma de los micromoles de todos aminoácidos.

Determinación de los niveles de aminoácidos libres en hidrolizados de proteínas o fórmulas para niños

45 Una muestra pesada exactamente del material proteináceo se disolvió en ácido diluido y los precipitados se separaron por filtración en una centrífuga Eppendorf. El análisis de aminoácidos se llevó a cabo sobre el sobrenadante claro conforme al método PicoTag como se especifica el manual de operadores del Sistema de Análisis de Aminoácidos de Waters (Milford, MA, EE.UU.). A este fin, se obtuvo una muestra adecuada del líquido, se añadió a ácido diluido y se homogeneizó. Se tomó una nueva muestra de la última solución, se secó y se derivatizó utilizando isotiocianato de fenilo. Los diversos aminoácidos derivatizados presentes se cuantificaron utilizando métodos HPLC y se sumaron para calcular el nivel total de aminoácidos libres en la muestra pesada.

50 Para relacionar este nivel total de aminoácidos libres en la muestra con el nivel total de aminoácidos que pueden liberarse de esta muestra, se somete también la muestra a hidrólisis ácida seguida por una cuantificación del total de aminoácidos libres presentes como se ha detallado arriba.

Ejemplos**Ejemplo 1****Propiedades de la tripeptidilpeptidasa codificada por el gen 12 (TPAP-A) de *Aspergillus niger***

La enzima codificada por el gen 12 (descrita en la solicitud de patente de los mismos inventores, también en trámite, PCT/EP02/01984) se obtuvo por superproducción en una célula hospedadora de *A. niger* y se purificó por cromatografía. La purificación se llevó a cabo en una columna Resource Q en acetato de 50 milimoles/litro de pH 4,5. La elución por aumento de la concentración de NaCl produjo la enzima en un pico de actividad neta. La actividad se midió por incubación con el péptido sintético Ala-Ala-Phe-pNA. La solución con la enzima purificada contenía 8 unidades/mL si se ensayaba en el péptido sintético Ala-Ala-Phe-pNA a pH 4,0 y 60 °C (véase la sección Materiales y Métodos).

En un primer experimento, la enzima pura se incubó a pH 5 y 50 °C con 2 sustratos cromógenos sintéticos diferentes, a saber Ala-Ala-Phe-pNA y Ala-Phe-pNA (ambos de Bachem, Suiza). Se prepararon soluciones stock de estos péptidos en DMSO, que se diluyeron luego 100 veces en el tampón acuoso deseado. La incubación con el sustrato Ala-Ala-Phe-pNA condujo a un aumento significativo de la absorbancia a 410 nanómetros, mientras que la incubación con Ala-Phe-pNA no lo hizo. Esta observación demuestra claramente que esta tripeptidasa puede escindir únicamente tripéptidos y no exhibe actividad de aminopeptidasa que pueda conducir a un aumento indeseable de aminoácidos libres.

En un segundo experimento, se demostraron las características preferidas de estabilidad de la enzima codificada por el gen 12. Cuatro muestras de la enzima purificada se incubaron a pH 5 durante una hora a 0, 40, 50 y 60 °C respectivamente. Se añadió luego a cada muestra de enzima el sustrato Ala-Ala-Phe-pNA arriba mencionado y se determinó la actividad enzimática en cada muestra calentada por medida del aumento de absorbancia a 410 nanómetros. Mientras que la muestra de 0 °C exhibía 100% de actividad, la muestra de 40 grados exhibía 96% de actividad residual, la muestra de 50 grados 92% de actividad residual y la muestra de 60 grados 88% de actividad residual. Estos datos confirman la estabilidad sorprendente de esta tripeptidasa TPAP-A de *Aspergillus* en las condiciones de proceso preferidas por la industria alimentaria.

Por último, se obtuvo una impresión de las preferencias de escisión de la tripeptidilpeptidasa corriente. A este fin, la incubación se llevó a cabo con los péptidos sintéticos Ala-Ala-Phe-pNA, Ala-Ala-Ala-pNA y Ala-Ala-Pro-pNA. Los 3 péptidos se disolvieron en DMSO a una concentración 150 milimolar. La reacción se efectuó en tampón de citrato (citrato 0,1 M), a pH 4,0 y a 60 °C.

Se añadieron a la cubeta 940 microlitros de tampón, 50 microlitros de muestra enzimática y 10 microlitros de sustrato, y después de agitar se midió cinéticamente la reacción a 405 nanómetros durante 10 minutos. La enzima se testó en diferentes diluciones.

Con objeto de calcular la actividad específica, se determinó espectrofotométricamente la concentración de proteínas de la solución enzimática a 280 nanómetros utilizando un coeficiente de extinción molar de 1,21 para 1 gramo/litro (basado en contenido de Trp y Tyr en la molécula de enzima).

sustratos	dilución	U/mL	Actividad específica, U/mg
Ala-Ala-Phe-pNA	1:50	7,81 - 8,95	2,3
Ala-Ala-Ala-pNA	1:50 a 1:200	76,2 - 81,5	21,8
Ala-Ala-Pro-pNA	No diluida	0,0	0,0

Por comparación de las absorbancias a 410 nanómetros, estaba claro que la enzima exhibe una preferencia clara para escisión del sustrato Ala-Ala-Ala-pNA. Ala-Ala-Phe-pNA se escindía también, pero a una tasa significativamente menor. No pudo registrarse actividad alguna hacia el sustrato Ala-Ala-Pro-pNA. La última observación demuestra claramente que la combinación con una endonucleasa específica de prolina se prefiere para convertir sustratos proteínicos ricos en residuos prolina en tripéptidos fácilmente asimilables y resistentes a la degradación con residuos prolina carboxi-terminales.

Ejemplo 2

Los hidrolizados de caseína sometidos a una endoproteasa específica de prolina en combinación con una tripeptidilaminopeptidasa están exentos de amargor y contienen una proporción elevada de tripéptidos que tienen residuos prolina carboxiterminales.

Se preparó una solución de caseína al 6% (p/p referido a proteína) por disolución de caseinato de sodio en agua. Despues de ajustar el pH a 8,0 con NaOH, se añadió la serina-proteasa Delvolase a una concentración del 4%

(volumen del producto enzimático comercial referido a peso de caseinato de sodio) y la mezcla se incubó durante 2,5 horas a 60 °C en condiciones de pH no estático. Se paró luego la reacción por disminución del pH a 5,0 utilizando ácido láctico seguido por un tratamiento térmico de 10 minutos a 90 °C. La solución se enfrió a 50 °C y se tomaron 2 muestras. La primera muestra (Muestra A) sirvió como referencia para caracterización del material que se

5 ha sometido sólo a la acción de una serina-proteasa de amplio espectro. La segunda muestra se utilizó para incubaciones subsiguientes con EndoPro ("EndoPro" se refiere a una endoproteasa específica de prolina, obtenida por superproducción y purificada cromatográficamente de *A. niger* como se escribe en WO 02/45.524) y finalmente TPAP-A. La incubación con EndoPro se llevó a cabo por adición de una solución purificada cromatográficamente de la endoproteasa de *A. niger* específica de prolina obtenida por superproducción en una concentración de 2 unidades/gramo de proteína (véase la solicitud de patente de los mismos inventores, también en tramitación, PCT/EP01/14.480 = WO02/45.524). Después de incubar durante 16 horas a 50 °C en condiciones de pH no estático, la enzima EndoPro se desactivó por otro tratamiento térmico para producir la Muestra B.

10 En esta etapa, las muestras A y B fueron evaluadas sensorialmente por un panel adiestrado. Las dos muestras se saborearon "a ciegas" y se registraron luego en una escala de 0 (no amarga) a 4 (muy amarga) como se describe en la sección Materiales y Métodos. La Muestra A se registró unánimemente como "muy amarga", la Muestra B se registró unánimemente como "no amarga". Este resultado confirmó una vez más la sorprendente capacidad de eliminación del amargor de la enzima EndoPro.

15 Parte de la Muestra B se incubó luego con 20 unidades de TPAP-A purificada por cromatografía por gramo de proteína caseína durante 5 horas a pH 4,0 y 60 °C. Como en el caso anterior, la reacción enzimática se terminó por calentamiento de la solución durante 10 minutos a 95°C para producir la Muestra C.

20 Las muestras A, B y C se sometieron luego a análisis LC/MS (véase la sección Materiales y Métodos) para determinar la distribución de tamaños de los principales péptidos presentes. De todos los hidrolizados se analizaron al menos 124 péptidos diferentes. Los datos obtenidos se muestran a continuación.

Enzimas utilizadas para preparar hidrolizado de caseína	Heptapéptidos o más pequeños (% molar de todos los péptidos detectados)	Di + tripéptidos (% molar de todos los péptidos detectados)	Tripéptidos que tienen residuos prolina carboxiterminales (% molar de todos los tripéptidos detectados)
Subtilisina ("Delvolase")	68	15	0
+ EndoPro (PCT/EP02/01984)	65	17	26
+EndoPro+TPAP-A (Ejemplo 1)	76	21	38

25 Combinando los resultados de la evaluación sensorial y el análisis LC/MS, está claro que una incubación con EndoPro y TPAP-A a la vez (es decir, después de una incubación con subtilisina) permite obtener un producto superior en términos de amargor (Un hidrolizado de caseína no exhibe amargor alguno después de incubación con EndoPro), alergenicidad (péptidos menores que 8 residuos de aminoácidos) y contenido de péptidos potencialmente bioactivos (tripéptidos que resisten a la degradación proteolítica debido a su residuo prolina carboxi-terminal).

30 Ejemplo 3

Frecuencia de di- y tripéptidos que tienen residuos prolina carboxiterminales en un producto comercial de fórmula para niños basado en caseína

35 Entre los diversos productos testados de fórmula para niños (véase Ejemplo 6 en la solicitud de patente de los mismos inventores también en tramitación PCT/EP01/14.180), Nutramigén (Mead Johnson, que contiene 14 gramos de hidrolizado de caseína por 100 g de polvo) contiene la fracción molar máxima (a saber, 22%) de péptidos que llevan prolina C-terminal. En el Ejemplo presente, se muestran los resultados de un análisis LC/MS de este hidrolizado centrándose en su contenido de di- y tripéptidos y la frecuencia de tales péptidos que tienen residuos prolina carboxiterminales.

40 Antes del análisis LC/MS, tuvo que eliminarse el material graso presente en las fórmulas para niños. Como se especifica en la sección Materiales y Métodos, esto se realizó por extracción en hexano. La fase acuosa así obtenida se centrifugó, se filtró y se sometió luego a análisis LC/MS para caracterizar los diversos péptidos presentes.

Conforme a los resultados obtenidos, la fracción molar de di- a heptapéptidos derivados de caseína presente en Nutramigén da cuenta del 83% de todos los péptidos detectados. Adicionalmente, pudo demostrarse que la fracción

molar de di- y tripéptidos presentes entre todos péptidos detectados en Nutramigén asciende a 18%. Entre los tripéptidos identificados, pudo demostrarse que una fracción molar de 23% tiene un residuo prolina carboxi-terminal.

A pesar del hecho de que el hidrolizado de proteína utilizado representa un producto que ha sido probablemente muy purificado y enriquecido selectivamente por varias técnicas tales como ultrafiltración y cromatografía, el hidrolizado exhibe un nivel bajo de residuos prolina carboxiterminales, lo que implica un amargor considerable y una fracción limitada de tripéptidos resistentes a proteasas solamente.

Ejemplo 4

Los hidrolizados de beta-caseína obtenidos por una endoproteasa específica de prolina en combinación con una tripeptidil-aminopeptidasa contienen proporciones elevadas de tripéptidos así como péptidos que tienen residuos prolina carboxiterminales

Para permitir un análisis LC/MS/MS más preciso de los diversos productos de reacción obtenidos por combinación de una endoproteasa específica de prolina con una tripeptidilpeptidasa, se llevó a cabo otro experimento de hidrólisis en el cual se utilizó beta-caseína de bovino pura como sustrato. A dicho fin, se preparó una solución al 0,2% (p/p referido a proteína) por disolución de beta-caseína pura (Sigma) en agua y ajuste del pH a 8,0 con NaOH. Se añadió luego la serina-proteasa subtilisina (Delvolase) a una concentración de 5% (volumen del producto enzimático comercial referido a peso de beta-caseína) y la mezcla se incubó durante una hora a 60°C en condiciones de pH no estático. La reacción se paró por disminución del pH a 5,5 utilizando ácido láctico seguido por tratamiento térmico durante 10 minutos a 90 °C. Se enfrió luego la mezcla a 50°C y se tomó una muestra para análisis LC/MS/MS. Se llevó a cabo una incubación subsiguiente con EndoPro (véase el Ejemplo 2) por adición de una solución purificada cromatográficamente de la endoproteasa específica de prolina obtenida por superproducción de *A. niger* en una concentración de 20 unidades/gramo de proteína. Después de incubación durante 2 horas a 50 °C en condiciones de pH no estático, la enzima EndoPro se desactivó por otro tratamiento térmico para producir otra muestra para análisis LC/MS/MS. Por último, se añadió TPAP-A purificada por cromatografía (véase Ejemplo 1) en una concentración de 4 unidades por gramo de sustrato y se continuó la incubación durante 2 horas a 60 °C, después de lo cual se desactivó por calentamiento para producir otra muestra LC/MS/MS. Se llevaron a cabo incubaciones subsiguientes en beta-caseína sin Delvolase utilizando EndoPro y TPAP, solas o en combinación, en las condiciones arriba descritas. Las últimas muestras se sometieron también a análisis LC/MS/MS. Los datos obtenidos se muestran a continuación.

Enzimas utilizadas para preparar hidrolizado de beta-caseína	Número de péptidos analizados	Péptidos con Pro C-terminal (% molar de todos los péptidos analizados)	Di + tripéptidos (% molar de todos los péptidos analizados)	Tripéptidos (% molar de todos los tripéptidos analizados)
Subtilisina	93	0	12	6
Subtilisina +EndoPro	68	41	34	25
Subtilisina +EndoPro+TPAP-A	69	36	45	36
EndoPro	55	49	11	11
TPAP-A	1	0	100	100
EndoPro+TPAP-A	68	40	43	40

A pesar de la amplia especificidad de la enzima TPAP-A utilizada (véase Ejemplo 5), la incubación de la beta-caseína pura sólo con la enzima TPAP-A da como resultado únicamente la liberación de un solo péptido, a saber el tripéptido N-terminal Arg-Glu-Leu de beta-caseína. Por una razón que se desconoce, la enzima TPAP-A utilizada no puede separar el tripéptido siguiente de este sustrato, demostrando claramente con ello la necesidad de combinar la TPAP con una endoproteasa tal como subtilisina o EndoPro. Los resultados que se muestran arriba indican claramente que tales combinaciones de una TPAP con una endoproteasa conducen a un aumento considerable en el número de tripéptidos generados. Las combinaciones que implican EndoPro exhiben todas ellas un aumento espectacular del número de péptidos que tienen residuos prolina carboxiterminales.

Ejemplo 5

Las diferentes tripeptidasas tienen especificidades de sustrato diferentes

Las diferentes tripeptidasas pueden poseer especificidades de sustrato diferentes de tal modo que las combinaciones de una endoproteasa específica de prolina con diferentes tripeptidasas conducirán a hidrolizados de

proteínas con composiciones de tripéptidos diferentes. Para ilustrar esto, se obtuvo una serie completa de sustratos peptídicos cromógenos (Ala-Ala-X-pNA, donde X representa los diversos residuos de aminoácidos naturales) de Pepscan (Lelystat, Holanda), después de lo cual se caracterizaron las preferencias de aminoácidos no sólo de TPAP-A (que se correspondía con la enzima codificada por el gen 12 como se describe en la solicitud de patente de los mismos inventores, también en tramitación, PCT/EP02/01984 y obtenida por superproducción en una célula hospedadora de *A. niger*) sino también de la tripeptidilaminopeptidasa TPAP-B (que se correspondía con la enzima codificada por el gen 10 como se describe en la solicitud de patente 2 mismos inventores, también en tramitación, PCT/EP02/0 1984 y obtenida por superproducción en una célula hospedadora de *A. niger*). Exactamente como la enzima TPAP-A, la enzima TPAP-B superproducida y secretada se purificó primeramente por cromatografía; en este caso en una columna FF de sefarosa Q (AA1188, Pharmacia) equilibrada en tampón Bis-Tris de 20 milímoles/litro, pH 5,5 y eluida con un gradiente que contenía 1 mol/L de NaCl en el mismo tampón.

La preincubación de las enzimas TPAP-A y TPAP-B con una subserie de los péptidos sintéticos indicó que ambas tripeptidasas tienen su actividad óptima entre pH 3 y 5. Por ello, la incubación con la subserie completa de sustratos cromógenos para determinar la preferencia de escisión de las 2 enzimas se realizó a pH 4,0. Se prepararon soluciones stock de los diversos sustratos sintéticos en DMSO en una concentración de 150 milímoles/litro. Estas soluciones stock se diluyeron luego 100 veces en acetato de sodio de 0,1 mol/L, CaCl₂ de 20 milímoles/L y pH 4,0, después de lo cual se transfirieron 200 microlitros de cada solución a pocillos de placas de microtitulación individuales. Despues de equilibración a 40 °C, se inició la reacción por adición de 200 microlitros de la tripeptidasa purificada cromatográficamente a cada pocillo. El desarrollo de la extinción se siguió a 405 nanómetros utilizando un lector de placas de microtitulación Tecan Genios. A continuación se presentan las eficiencias de ambas enzimas para los diversos sustratos, en las cuales se utilizó la actividad para el sustrato Ala-Ala-Ala-pNA como el valor 100%. Las diversas letras en el eje X en la figura que se muestra a continuación se refieren a los símbolos internacionales de una sola letra utilizados para especificar el residuo de aminoácido "X" en el sustrato Ala-Ala-X-pNA.

Los datos obtenidos ilustran claramente (véase figura 1) las diferentes especificidades de sustrato de la enzima TPAP-A y la enzima TPAP-B. Si bien ambas enzimas exhiben preferencia para escindir en el término C de aminoácidos como Asp ("D"), Glu ("E") and Gln ("Q"), la enzima TPAP-B es más eficiente para los residuos de aminoácido Tyr ("Y"), Trp ("W"), Thr ("T") and Ser ("S").

Ejemplo 6

30 Beneficios de la combinación de una endoproteasa específica de prolina con una tripeptidilaminopeptidasa sobre sustratos bajos en prolina

Los beneficios de la hidrólisis de sustratos de proteínas ricas en prolina tales como caseínas o glútenes o compuestos basados en colágeno con la combinación de una endoproteasa específica de prolina y una tripeptidilpeptidasa han sido demostrados adecuadamente en los Ejemplos anteriores. Aquí se demostrará que la combinación de enzimas se utiliza también ventajosamente en la hidrólisis de sustratos con contenidos de prolina inferiores.

Una fracción de lactalbúmina bruta de leche de bovino (Sigma) se suspendió en agua en una concentración de 20 g/litro, después de lo cual se ajustó el pH a 8,0. Se añadió la serina-proteasa subtilisina (Delvolase) a una concentración del 4% (volumen del producto enzimático comercial referido a peso del sustrato) y la mezcla se incubó durante 2 horas a 60 °C en condiciones de pH no estático. Se redujo luego el pH de la suspensión a pH 4,5 utilizando ácido cítrico y se dividió en 4 porciones. Una porción se calentó para desactivar la enzima Delvolase y se mantuvo luego congelada hasta su análisis LC/MS/MS. Se añadió a las otras 3 porciones enzima EndoPro purificada cromatográficamente (1 unidad/gramo de lactalbúmina) o tripeptidilaminopeptidasa (TPAP-A; 20 unidades/gramo de lactalbúmina) o una combinación de EndoPro y TPAP-A (1 unidad + 20 unidades/gramo de lactalbúmina; véase Materiales y Métodos para definiciones de la unidad). Las mezclas se incubaron durante una noche a 50 °C, se sometieron a tratamiento térmico para desactivar las enzimas y se almacenaron a -20 °C. Las muestras se centrifugaron primeramente y el sobrenadante claro se utilizó para análisis LC/MS/MS. Únicamente se tuvieron en cuenta aquellos péptidos que se ajustaban a la secuencia de aminoácidos de alfa-lactalbúmina.

Los datos LS/MS/MS obtenidos se representan en la Figura 2 en longitud de péptidos de los residuos de aminoácidos representados en el eje X, representándose en el eje Y el número de péptidos analizados. Incluso sin un nuevo cálculo de péptidos de una longitud específica en porcentajes de los péptidos totales analizados, se hacen patentes los beneficios de una incubación con una endopeptidasa específica de prolina o una tripeptidasa o una combinación de estas 2 enzimas. Junto con los resultados proporcionados en los Ejemplos anteriores, los datos obtenidos demuestran claramente que la combinación de una endoproteasa específica de prolina con una tripeptidasa proporciona hidrolizados excelentes, sea sobre sustratos ricos en prolina o sobre otros sustratos proteináceos.

REIVINDICACIONES

1. Un hidrolizado de proteínas en el que al menos 20% molar de los péptidos que tienen un peso molecular de 200 a 2000 Daltons está presente en el hidrolizado como tripéptido y en el cual al menos 30% de los tripéptidos tienen una prolina carboxi-terminal.
- 5 2. Un hidrolizado de proteínas conforme a la reivindicación 1, en donde al menos 25% molar, o más preferiblemente al menos 30% molar de los péptidos que tienen un peso molecular de 200 a 2000 Daltons está presente en el hidrolizado como tripéptido.
- 10 3. Un hidrolizado de proteínas conforme a la reivindicación 1 ó 2, en donde preferiblemente al menos 20%, preferiblemente al menos 30%, o más preferiblemente al menos 40% de la prolina presente en la proteína de partida está presente en los tripéptidos.
- 15 4. Un hidrolizado de proteínas conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde al menos 35% de los tripéptidos tienen una prolina carboxi-terminal.
- 5 5. Un hidrolizado de proteínas conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde al menos 70% molar de los péptidos, o preferiblemente al menos 75% molar de los péptidos contienen 2 a 7 residuos de aminoácido (dipéptido a heptapéptido).
- 15 6. Un método de producción de un hidrolizado de proteínas, comprendiendo el método poner en contacto un sustrato proteínico con:
 - a) 1 endoproteasa específica de prolina que tiene un pH óptimo ácido; y
 - b) 1 tripeptidil-aminopeptidasa.
- 20 7. Uso del hidrolizado de proteínas conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para consumo por mamíferos, preferiblemente humanos.
8. Una composición enzimática que comprende
 - a) una endoproteasa específica de prolina que tiene un pH óptimo ácido; y
 - b) una tripeptidil-aminopeptidasa.
- 25 9. Una composición enzimática conforme a la reivindicación 8, en donde la tripeptidil-aminopeptidasa es capaz de escindir detrás de los residuos glutamina/glutamato y asparagina/aspartato.
10. Una composición enzimática conforme a las reivindicaciones 8 ó 9 en donde, cuando esta composición se añade a una proteína adecuada, es capaz de producir un hidrolizado de proteínas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 30 11. Un producto alimenticio o un pienso que comprende un hidrolizado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
12. El uso de una composición enzimática conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9 para reducir la intolerancia a productos alimenticios ricos en prolina.
- 35 13. El uso de una composición enzimática conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9 en alimentos o piensos o en la producción de alimentos o piensos

Fig.1

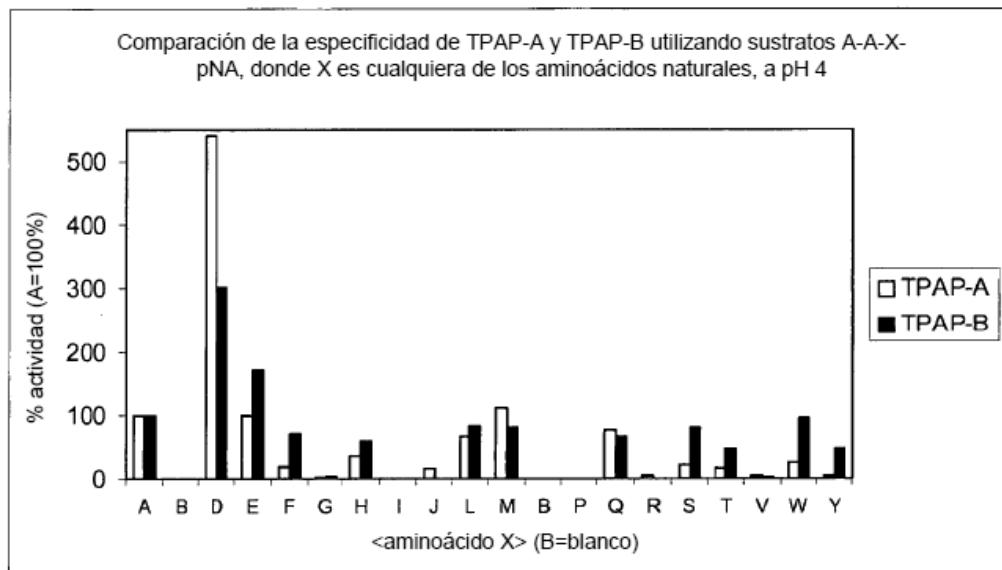


Fig.2

