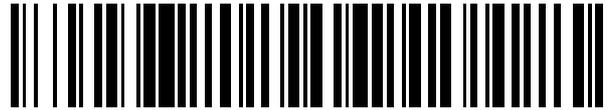


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 463**

51 Int. Cl.:

A23J 3/34 (2006.01)

A23L 1/29 (2006.01)

A23L 1/305 (2006.01)

C12P 13/22 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2009 E 09738099 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 2268157**

54 Título: **Mezcla de triptófano unido a un péptido y de triptófano unido a un polipéptido**

30 Prioridad:

29.04.2008 EP 08155315

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

10.11.2015

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**GERHARDT, CINDERELLA CHRISTINA y
EDENS, LUPPO**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 550 463 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

Mezcla de triptófano unido a un péptido y de triptófano unido a un polipéptido

5 Sector de la invención

La presente invención, se refiere a composiciones, las cuales comprenden triptófano.

10 Antecedentes y trasfondo de invención

10 Los niveles de serotonina en el cerebro se han venido relacionado con el estado de ánimo, con el estado de alerta, con la vigilancia, con el inicio y la calidad del sueño, con los efectos ansiolíticos, con la depresión, con el control de la reacción afectiva, y con el apetito y el comportamiento sexual. Existen muchas publicaciones en las que, los cambios en los niveles de serotonina en el cerebro se correlacionan con la disponibilidad del aminoácido L-triptófano natural (del tipo Trp o del tipo W). Debido a esta correlación, los métodos para aumentar los niveles de triptófano en el plasma, han atraído una gran atención. Se han reportado cantidades de triptófano de alrededor de 1 gramo / día por individuo, para producir unos efectos clínicamente significativos (véase, a dicho efecto, Markus et al, Am J Clin Nutr 2005; 81, 1026 - 1033). Un procedimiento para incrementar los niveles de plasma, involucra el consumo de preparaciones de proteína, en la alfa-lactoalbúmina de proteína de suero láctico. Las preparaciones de alfa-lactoalbúmina, se encuentran fácilmente disponibles, y éstas tienen una alta concentración de triptófano. Sin embargo, no obstante, los enfoques o propuestas de procedimientos, en los cuales, la alfa-lactoalbúmina, se proporcionan como tales – véanse, a dicho efecto, la patente alemana DE 4 130 284 y la patente japonesa JP 2 279 700, no tienen en cuenta el hecho consistente en que, el principal determinante de los niveles de triptófano y de serotonina en el cerebro, no es únicamente la concentración del triptófano en el plasma, sino así mismo, también, el denominado factor de relación o cociente Trp / LNAA (véase, a dicho efecto, Fernstrom y Wurtman, Science, 1971, 173, 149 – 152). Este ratio (factor de relación o cociente) Trp / LNAA, representa el factor de relación molar del triptófano, con relación a los niveles de amino ácidos neutros de cadena larga (LNAA – [del inglés, Large Neutral Amino Acids] -), a saber, la suma de tirosina, fenilalanina, leucina, isoleucina, y valina), en el plasma. Estos LNAA, compiten con el triptófano, en cuanto a lo referente a su captación por parte del cerebro, es decir, para su introducción en éste, presumiblemente, debido al hecho de que se utiliza el mismo mecanismo de transporte a través de la barrera hematoencefálica (barrera de la sangre en el cerebro). Así, por lo tanto, la forma más efectiva para incrementar las concentraciones de triptófano en el cerebro, es la consistente en suministrar las preparaciones, con un alto ratio (factor de relación o cociente) Trp / LNAA. Un gran número de publicaciones, entre otras, la publicación del documento de patente internacional WO 02 / 46 210, se refieren a la preparación de factores de péptidos, a partir de la alfa-lactoalbúmina, las cuales tienen unos factores de relación o cocientes (ratios) Trp / LNAA incrementados.

35 La patente estadounidense U S 2006 / 286 252, se refiere a una fórmula para niños pequeños lactantes, la cual comprende proteína de suero láctico, parcialmente hidrolizado.

40 El uso del triptófano, es decir, el aminoácido, proporcionaría la forma más simple y más barata, para proporcionar preparaciones con un alto factor de relación o cociente Trp / LNAA. Sin embargo, no obstante, en muchos países, existe una legislación, la cual regula firmemente el suministro de triptófano libre. Los niveles máximos permisibles de triptófano libre, en sus diversas formas de aplicación, varían, de país a país. Con objeto de suministrar triptófano dietético adicional, en una forma más natural, más recientemente, han aparecido muchos enfoques o propuestas de procedimientos, los cuales tienen como finalidad u objetivo, el proporcionar proteínas ricas en triptófano. Tal y como se ha mencionado, la alfa-lactoalbúmina, así como, también, sus hidrolizados, han ganado popularidad, como una opción segura para incrementar los niveles de triptófano en el plasma. Sin embargo, no obstante, el uso de la alfa-lactoalbúmina, como un punto de partida, para las preparaciones ricas en triptófano, viene acompañada de desventajas, en términos de factores de relación o cocientes Trp / LNAA máximos, y en términos de costes. La alfa-lactoalbúmina y la beta-lactoglobulina, forman los constituyentes proteínicos principales del suero láctico. Debido al hecho consistente en que, a una escala industrial, es difícil el llevar a cabo una separación completa de la alfa-albúmina con respecto a la beta-globulina, la implicación resultante, es la consistente en el hecho de que, la preparaciones efectivas en cuanto al coste, de alfa-lactoalbúmina, contendrán así mismo, también, beta-lactoglobulina. Mientras que, la alfa-lactoalbúmina tiene un contenido molar de triptófano correspondiente a un porcentaje del 5,3 %, el contenido de triptófano de la beta-lactoglobulina, es de únicamente un porcentaje del 2 %. Mientras que, la alfa-lactoalbúmina, tiene un factor de relación o cociente molar Trp / LNAA correspondiente a un valor de 0,11, la beta-lactoglobulina, tiene un factor de relación o cociente molar Trp / LNAA correspondiente a un valor no superior a 0,04. Así, de este modo, obviamente, cualquier contaminación de la preparación de alfa-lactoalbúmina con beta-lactoglobulina, hará disminuir, de una forma considerable, el factor de relación o cociente Trp / LNAA, del producto final.

60 En vistas del gran interés en las preparaciones las cuales puedan modular los niveles de serotonina en el cerebro, existe una necesidad, en cuanto al hecho de mejorar los de procedimientos de producción, para las preparaciones de péptidos, las cuales tengan un alto factor de relación o cociente Trp / LNAA, y que sean susceptibles de poderse aplicar, de una amplia forma, en diversos productos alimenticios y nutracéuticos.

Descripción resumida de la invención

La presente invención, se refiere a un procedimiento para producir una composición, la cual contiene triptófano, y la cual comprende, el reunir conjuntamente, de una forma preferible, el proceder a mezclar:

- una composición de triptófano unido a un péptido, la cual, de una forma preferible, es soluble en agua, y la cual tiene un factor de relación o cociente Trp / LNAA, superior a un valor de 0,1, siendo dicho valor, de una forma preferible, de más de 0,15, y / o triptófano libre; y

- una composición de triptófano unido a un polipéptido, la cual, de una forma preferible, es soluble en agua, y la cual tiene un factor de relación o cociente Trp / LNAA, superior a un valor de 0,15.

De una forma preferible, la composición de triptófano unido a un polipéptido, se obtiene procediendo a hidrolizar una lisozima, de una forma preferible, una lisozima de huevo, con objeto de preparar un hidrolizado, el cual tenga un valor de DH (grado de hidrólisis – [DH, del inglés, degree of hydrolysis) correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 5 y 45, y de una forma opcional, procediendo a fraccionar, a enriquecer, o a purificar el hidrolizado, tal como, por ejemplo, procediendo a retirar una parte de los péptidos los cuales contienen arginina o lisina. De una forma preferible, la composición de triptófano unido a un polipéptido, es una lisozima intacta, siendo ésta, de una forma preferible, la lisozima de huevo de gallina.

La presente invención, se refiere así mismo, también, a una composición, la cual contiene triptófano, y en donde, una cantidad de triptófano correspondiente a un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 10 % hasta un 90 %, de una forma preferible, una cantidad de éste, correspondiente a una cantidad comprendida dentro de unos márgenes que van desde un 20 % hasta un 80 %, se encuentra presente como triptófano libre, o como triptófano unido a un péptido, y en donde, una cantidad de triptófano correspondiente a un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 10 % hasta un 90 %, de una forma preferible, una cantidad de éste, correspondiente a una cantidad comprendida dentro de unos márgenes que van desde un 20 % hasta un 80 %, se encuentra presente como triptófano unido a un polipéptido. De una forma opcional, la composición en cuestión, comprende triptófano libre, adicionalmente al triptófano unido a un polipéptido. De una forma general, una cantidad del triptófano presente en la composición, correspondiente a un porcentaje de menos del 10 %, se encontrará presente en forma de triptófano libre, siendo dicha cantidad de triptófano libre, de una forma preferible, el correspondiente a un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 0 % hasta un 2 %, y de una forma preferible, de un 0 % a un 1 %, en el caso en el que se encuentre presente así mismo, también, triptófano unido a un péptido. De una forma general, para una dosis de ingesta, se procederá a utilizar una cantidad correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde los 0,1 g hasta los 20 g.

De una forma preferible, el triptófano unido a un péptido, se encuentra presente en forma de un di- ó tripéptido, en una cantidad correspondiente a un porcentaje de más de un 30 % molar, de una forma preferible, en una cantidad correspondiente a un porcentaje de más de un 40 % molar, de una forma más preferible, en una cantidad correspondiente a un porcentaje de más de un 50 % molar, de una forma todavía más preferible, en una cantidad correspondiente a un porcentaje de más de un 60 % molar, de una forma aún todavía más preferible, en una cantidad correspondiente a un porcentaje de más de un 70 % molar, y de la forma mayormente preferible, en una cantidad correspondiente a un porcentaje de más de un 80 % molar. Adicionalmente, además, el triptófano unido a un péptido, se encuentra presente en forma de proteína intacta; de una forma preferible, en forma de lisozima, en una cantidad correspondiente a un porcentaje de más de un 40 % molar, de una forma preferible, en una cantidad correspondiente a un porcentaje de más de un 50 % molar, de una forma más preferible, en una cantidad correspondiente a un porcentaje de más de un 60 % molar, de una forma todavía más preferible, en una cantidad correspondiente a un porcentaje de más de un 70 % molar, y de la forma mayormente preferible, en una cantidad correspondiente a un porcentaje de más del 80 % molar.

Otro aspecto de la presente invención, se refiere a la composición de la invención, o a la lisozima, como un nutracéutico, de una forma preferible, como un medicamento, o al uso de la composición de la invención, como un nutracéutico, de una forma preferible, como un medicamento, o al uso de la composición de la invención, en la preparación de un nutracéutico, de una forma preferible, en la preparación de un medicamento, preferiblemente, en donde, el nutracéutico, de una forma preferible, un medicamento, se usa para prevenir o para tratar el estado de ánimo, la cognición, el apetito, el estado de alerta, la vigilancia, el inicio y la calidad del sueño, los efectos ansiolíticos, la depresión, el control de la reacción afectiva, el apetito y el comportamiento sexual, o éste se utiliza como un ingrediente, en la preparación de un producto alimenticio, o de un suplemento alimenticio o dietético.

De una forma adicional, la presente invención, se refiere al uso de la lisozima o a la composición de la invención, para la ingesta, con objeto de incrementar el factor de relación Trp / LNAA, en el plasma, durante un transcurso de tiempo situado entre los 15 minutos y los 240 minutos, de una forma preferible, durante un transcurso de tiempo situado entre los 30 minutos y los 240 minutos, después del consumo. Este incremento, se compara con el factor de relación o cociente Trp / LNAA en el plasma, justo antes de la ingesta de la composición de la invención o lisozima, o sin la ingesta de la composición de la invención o lisozima.

De una forma ventajosa, la composición de la presente invención, abarca así mismo, también, un hidrato de carbono.

5 Descripción detallada de la invención

La presente composición con contenido en triptófano, comprende dos fracciones, las cuales son claramente distinguibles, las cuales, después de la ingesta oral, facilitan unos altos factores de relación o cocientes Trp / LNAA, en el plasma sanguíneo, durante prolongados transcurros de tiempo. Una fracción, comprende triptófano unido a un péptido, y así, de este modo, a un péptido con contenido en triptófano, en forma de péptidos de bajo peso molecular, fácilmente absorbibles o triptófano libre. Esta fracción, en el caso de un péptido que contiene triptófano, incluye una amplia porción de di- y tripéptidos los cuales incorporan al triptófano. La otra fracción, comprende triptófano unido a un polipéptido y, así, de este modo, un polipéptido que contiene triptófano, de una forma preferible, en forma de proteína intacta, el cual, después de la ingesta oral, libera su triptófano unido a un péptido, únicamente de una forma muy lenta. Así, por lo tanto, la presente solicitud de patente, describe una nueva combinación de estas dos fracciones ricas en triptófano, las cuales, una vez se haya producido su consumo oral, provocan y mantienen unos altos niveles de Trp / LNAA, en la sangre, durante un prolongado transcurso de tiempo, en comparación con la utilización de únicamente la fracción de péptido con contenido en triptófano. El triptófano unido a un péptido, el cual se encuentra presente en la fracción de bajo peso molecular, se deriva, de una forma preferible, de la lisozima de huevo de gallina, la fracción de triptófano unido a un polipéptido, del peso molecular más alto es, de una forma preferible, una lisozima, tal como, por ejemplo, lisozima de huevo de gallina, u otra fuente de triptófano unido a un polipéptido, tal como el consistente en la proteína intacta, con un alto factor de relación o cociente Trp / LNAA. De una forma preferible, el polipéptido con contenido en triptófano, es una proteína, la cual puede resistir la descomposición proteolítica, en unas condiciones estomacales. De una forma ventajosa, tales tipos de triptófano unido a un polipéptido, tales como los consistentes en la proteína intacta, como una lisozima intacta, pueden resistir la descomposición proteolítica, en unas condiciones estomacales, tales como las que se describen en el test de ensayo para la resistencia de las proteasas (véase, a dicho efecto, la sección de Materiales y Procedimientos).

La fracción de péptido con contenido en triptófano, fácilmente absorbible, de una forma preferible, es soluble en agua, y ésta tiene, de una forma preferible un valor de DH (grado de hidrólisis), mayor de 15, teniendo, de una forma más preferible, un valor de DH, mayor de 20, un factor de relación o cociente Trp / LNAA, de más de 0,10, de una forma preferible, de más de 0,15, y ésta comprende de una forma preferible, los péptidos AW (como dipéptido), o GNW (como tripéptido), comprendiendo, de una forma preferible, AW y GNW. Los ejemplos de una fracción de péptido que contiene triptófano, son los hidrolizados de lisozima y alfa-lactoalbúmina, siendo, el hidrolizado de lisozima, una fracción preferible de péptido con contenido en triptófano.

La fracción de triptófano unido a un polipéptido, la cual proporciona el triptófano a un ritmo más lento, tiene un valor de DH, inferior a 10, siendo, dicho valor de DH, de una forma preferible, inferior a 5. La proteína intacta, tiene un valor de DH de 10. La fracción de triptófano unido a un polipéptido es, de una forma preferible, soluble en agua. De una forma adicional, la fracción de triptófano unida a un polipéptido, tiene un factor de relación o cociente Trp / LNAA, de más de 0,15, y ésta resiste una descomposición proteolítica, bajo una condiciones prevalentes en el estómago humano. Un test de ensayo in vitro, para el último requerimiento, se encuentra especificado en la sección de Materiales y Procedimientos, del presente documento de solicitud de patente.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, arriba, la composición de la presente invención, comprende, de una forma preferible, un hidrato de carbono, para estimular, por ejemplo, la producción de la insulina.

La presente invención, se refiere a una composición la cual comprende triptófano, o una fracción de triptófano unido a un péptido, así como una fracción de triptófano unido a un polipéptido. La fracción de triptófano unido a un péptido, tiene un factor de relación o cociente molar Trp / LNAA, de por lo menos valor de 0,1, siendo éste, de una forma preferible, de por lo menos un valor de 0,15 y, de una forma preferible, de un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 0,15 y 1,8, y ésta comprende, de una forma preferible, por lo menos un péptido, de una forma preferible, por lo menos dos péptidos diferentes, los cuales, de una forma preferible, son solubles en agua. De una forma preferible, la composición, comprende AW (como dipéptido) ó GNW (como tripéptido), de una forma preferible, AW y GNW, y de una forma mayormente preferible, AW y GNW, en donde, el factor de relación o cociente molar de AW con respecto a GNW, es el correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 1 a 2, y 10 a 1, siendo dicho de factor de relación, de una forma preferible, es el correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 1 a 2, y 5 a 1. De una forma adicional, los péptidos con contenido en triptófano, son ricos en triptófano, y éstos comprenden por lo menos un di- ó tripéptido, de una forma preferible, por lo menos dos di- ó tripéptidos diferentes, en donde, el polipéptido o los polipéptidos seleccionado(s) de entre los di- ó tripéptidos, se encuentra(n) presente(s) en una cantidad correspondiente a un porcentaje del 5 % molar de la cantidad total de di- y tripéptidos, y en cuya composición, una cantidad correspondiente a un porcentaje de más de un 30 % molar, de una forma preferible, una cantidad correspondiente a un porcentaje de más de un 40 % molar, de una forma más preferible, una cantidad correspondiente a un porcentaje de más de un 50 % molar, de una forma todavía más preferible, una cantidad correspondiente a un porcentaje de más de un 60 % molar, de una forma aún todavía más preferible, una cantidad correspondiente a un porcentaje de más de un 70 % molar, y de la

- forma mayormente preferible, una cantidad correspondiente a un porcentaje de más de un 80 % molar, del triptófano unido a un péptido, se encuentra presente en forma de un di- ó tripéptido. La fracción de triptófano unido a un polipéptido, de una forma preferible, es un hidrolizado de lisozima o hidrolizado de lisozima, fraccionado purificado. Hemos encontrado el hecho consistente en que, este hidrolizado en concordancia con la presente invención, genera,
- 5 de una forma muy rápida, unos altos factores de relación o cocientes Trp / LNAA en el plasma sanguíneo, *in vivo*. Es bastante sorprendente, el hecho consistente en que, los factores de relación o cocientes de Trp / LNAA detectados en el plasma sanguíneo, según se ha encontrado, eran mayores que los correspondientes a los factores de relación o cocientes Trp / LNAA de los hidrolizados, cuando éstos se suministraban a una dosis lo suficientemente alta. Una dosis suficientemente alta es, de una forma preferible, una dosis correspondiente a una
- 10 cantidad de 10 gramos, de más de 12 gramos, o de más de 14 gramos, del hidrolizado de lisozima. Todavía otra ventaja de este fracción, es la consistente en que, los péptidos que contienen Trp, son muy pequeños, de tal forma que, incluso en combinación con los productos ricos en proteínas, con unos factores de relación o cocientes Trp / LNAA, menos favorables, el hidrolizado, puede generar, de una forma inmediata, unos altos factores de relación o cocientes Trp / LNAA, en el plasma sanguíneo. La composición de la presente invención, puede comprender, de una
- 15 forma adicional, triptófano libre, tal como por ejemplo, triptófano libre que puede añadirse a la composición. De una forma preferible, la composición, no contiene más de una cantidad correspondiente a un porcentaje del 1 %, en peso (en base a la materia en seco), de triptófano libre, en el caso en el que se encuentre presente el triptófano unido a un péptido.
- 20 De una forma preferible la fracción de triptófano unida a un polipéptido, tiene un factor de relación o cociente molar Trp / LNAA, correspondiente a un valor de más de 0,15, siendo éste, de una forma preferible, el correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 0,15 y 0,5, y la lisozima intacta, tiene un factor de relación o cociente, molar Trp / LNAA, correspondiente a un valor de 0,23. Después haber procedido a su consumo, la fracción de triptófano unida a un polipéptido, proporciona así mismo, también, triptófano unido a un péptido, pero,
- 25 el triptófano unido a un péptido, *in vivo*, procedente de esta fracción de triptófano unido a un polipéptido, se convierte en mucho más tarde en disponible, para la absorción intestinal, que el triptófano unido a un péptido, procedente de la fracción de triptófano unido a un péptido. De una forma ventajosa, la absorción intestinal del triptófano unido a un péptido, procedente de la fracción de triptófano unido a un polipéptido, acontece así, de este modo, más tarde, en el tiempo, que la correspondiente a la absorción intestinal de triptófano libre, o triptófano unido a un péptido, procedente del fracción de triptófano unido a un péptido, en el caso en el que, ambas fracciones, se consuman de una forma simultánea. Hemos encontrado el hecho consistente en que, tal tipo de liberación retardada de triptófano, puede lograrse mediante la ingesta oral de proteínas intactas, las cuales resistan la hidrólisis enzimática en el estómago humano. De una forma preferible, tales tipos de proteínas intactas, tienen un alto factor de relación o
- 30 cociente Trp / LNAA.
- 35 En concordancia con otro aspecto de la presente invención, se mejora el sabor de una composición de mezclas de lisozima hidrolizada y de lisozima (intacta), en comparación con una composición la cual comprenda lisozima hidrolizada, sin la lisozima (intacta).
- 40 Otro aspecto de la presente invención, es el uso de lisozima o de una composición la cual comprende triptófano libre o una fracción de triptófano unido a un péptido, en combinación con triptófano unido a un polipéptido y, de una forma opcional, hidrato de carbono, con objeto de mejorar el estado de ánimo, el síndrome premenstrual (PMS – [de sus siglas en inglés, correspondientes a premenstrual syndrome] -), la cognición, el estado de alerta, la vigilancia, el inicio y la calidad del sueño, los efectos ansiolíticos, la depresión, el control de la reacción afectiva, o el
- 45 comportamiento sexual, o para su uso como un ingrediente, en la preparación de un producto alimenticio, de un alimento para animales de compañía o domésticos, de un suplemento de un suplemento alimenticio o dietético o de una composición nutracéutica, para el estado de ánimo, la cognición, el apetito, el estado de alerta, la vigilancia, el inicio y la calidad del sueño, los efectos ansiolíticos, la depresión, el control de la reacción afectiva, el apetito o el comportamiento sexual. Aparte del triptófano libre o de triptófano unido a un péptido, triptófano unido a un
- 50 polipéptido y, de una forma opcional, hidrato de carbono, la composición, puede también comprender, así mismo, compuestos recomendados para la nutrición del “cerebro”, para aliviar el estrés o la depresión, o para mejorar el estado de alerta, el estado de ánimo, la cognición, o los modelos patrón del sueño.
- 55 Se da a conocer un producto alimenticio (incluyendo una fórmula para niños pequeños lactantes), un producto alimenticio para animales de compañía, un suplemento dietético o una composición nutracéutica, los cuales comprenden la composición de la presente invención, o que se producen en concordancia con el procedimiento de la presente invención, o de una forma preferible, la composición en concordancia con la presente invención, la cual comprende los péptidos GNW (como tripéptido) SW (como dipéptido), ó AW (como dipéptido), en combinación con lisozima de huevo de gallina, intacta.
- 60 En concordancia con una forma de presentación adicional de la presente invención, se da a conocer el uso de la composición con contenido en triptófano de la invención, para incrementar el factor de relación o cociente Trp / LNAA, en el plasma, en un transcurso de tiempo de 90 minutos, de una forma preferible, en un transcurso de tiempo de 60 minutos, de una forma más preferible, en un transcurso de tiempo de 30 minutos, y de la forma mayormente
- 65 preferible, en un transcurso de tiempo de 15 minutos, después de la ingesta de los péptidos o de la composición, o para la preparación la preparación de una composición nutracéutica, para incrementar el factor de relación o

cociente Trp / LNAA, en el plasma, en un transcurso de tiempo de 90 minutos, de una forma preferible, en un transcurso de tiempo de 60 minutos, de una forma más preferible, en un transcurso de tiempo de 30 minutos, y de la forma mayormente preferible, en un transcurso de tiempo de 15 minutos, después de la ingesta de la composición. En concordancia con todavía otra forma de presentación en concordancia con la presente invención, se da conocer el uso de la composición con contenido en triptófano de la presente invención, para mantener unos factores de relación o cocientes Trp / LNAA en plasma incrementados, durante unos transcurros de tiempo que vayan más allá de un transcurso de tiempo de 90 minutos, de una forma preferible, durante unos transcurros de tiempo situados entre los 120 minutos y los 240 minutos, y de una forma más preferible, durante unos transcurros de tiempo que vayan más allá de un transcurso de tiempo de 150 minutos, después de la ingesta de la composición. En concordancia con todavía otra forma de presentación adicional de la presente invención, se da conocer el uso de lisozima, o de la composición con contenido en triptófano de la presente invención, para la preparación de una composición nutracéutica, para mantener unos factores de relación o cocientes Trp / LNAA en plasma incrementados, durante unos transcurros de tiempo que vayan más allá de un transcurso de tiempo de 90 minutos, de una forma preferible, durante unos transcurros de tiempo situados entre los 120 minutos y los 240 minutos, y de una forma más preferible, durante unos transcurros de tiempo que vayan más allá de un transcurso de tiempo de 150 minutos, después de la ingesta de la composición.

La presente invención, proporciona una composición la cual comprende triptófano, el cual se encuentra presente como triptófano libre y / o de una forma unida a un péptido, la cual es muy apropiada para proporcionar un incremento efectivo del factor de relación o cociente Trp / LNAA en el plasma, después de un intervalo de tiempo muy corto, triptófano unido a un polipéptido, para mantener un alto factor de relación o cociente Trp / LNAA, en el plasma, durante un prolongado transcurso de tiempo, en comparación con la situación, en la cual no se encontraba presente triptófano unido a un polipéptido, en la composición. Este efecto, es especialmente notable, después de un transcurso de tiempo que va de 90 a 240 minutos, después de la ingesta de la composición de la invención, Hemos notado que, las dos fracciones que comprenden triptófano, en combinación con hidrato de carbono, contribuyen a un rápido y prolongado incremento de Trp / LNAA.

En concordancia con un aspecto de la presente invención, el triptófano unido a un péptido, fácilmente absorbible, puede obtenerse a partir de lisozima, de una forma preferible, a partir de lisozima de huevo de gallina, mediante una (pre-)hidrólisis enzimática, en un proceso industrial, a saber la lisozima (de huevo de gallina), se proporciona, de una forma preferible, en forma de un hidrolizado. Proporcionada en forma de un hidrolizado, la absorción gastrointestinal de péptidos con contenido en triptófano, se facilita en gran manera. La fracción de triptófano unido a un polipéptido, se representa, de una forma preferible, mediante una proteína intacta, con un alto factor de relación o cociente Trp / LNAA, el cual no se degrada, o únicamente se degrada de una forma marginal, en el estómago humano. De una forma preferible, esta proteína intacta, es lisozima de huevo de gallina. La alfa-lactoalbúmina procedente de leche bovina, la cual se utiliza, de una forma frecuente, para elevar los factores de relación o cocientes Trp / LNAA, en la sangre, no se encuentra calificada como una fuente apropiada de triptófano unido a un polipéptido, ya que, esta molécula, tiene un factor de relación o cociente Trp / LNAA, que el de la lisozima. Una composición en concordancia con la presente invención, se caracteriza por una mezcla de triptófano libre, fácilmente absorbible / o triptófano unido a un polipéptido, tal como un hidrolizado de lisozima, y el triptófano unido a un polipéptido, resistente a la proteasa, tal como una proteína intacta, de una forma preferible, lisozima. De una forma opcional, la composición, puede comprender hidrato de carbono o triptófano libre. De una forma preferible, la composición de la presente invención, se produce procediendo a mezcla el triptófano libre y / o triptófano unido a un péptido, de una forma preferible, como hidrolizado, y triptófano unido a un polipéptido, de una forma preferible, como proteína intacta, tal como la lisozima, en una factores de relación o cocientes, en peso, (medidos como peso en seco de la proteína), correspondientes a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde 1 : 3 hasta 1 : 0,2. De una forma más preferible, la composición, comprende el hidrolizado y la proteína intacta, en un factor de relación o cociente, correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde 1 : 1 hasta 1 : 0,4, referido a la materia seca de la proteína. Ambas fracciones, la fracción fácilmente absorbible y la proteína resistente a la proteasa, se caracterizan por unos factores de relación o cociente nucleares Trp / LNAA, correspondientes a un valor mayor de 0,20, siendo éstos, de una forma preferible, de un valor de más de 0,15. Las composiciones en cuestión, pueden proporcionarse como materias en polvo, en forma líquida, o en forma de pastas. Estos líquidos o pastas, pueden tener unos valores pH neutros, o bien pueden tener unos valores pH ácidos. De una forma preferible, las mezclas en cuestión, tienen un valor pH inferior a 5, siendo, de una forma preferible, de un valor inferior a 4.

En todavía otra forma de presentación de la presente invención, la lisozima de huevo de gallina se convierte en un hidrolizado, el cual comprende una composición peptídica, de la cual, más de un porcentaje correspondiente a un 50 % molar, de una forma preferible, más de un porcentaje correspondiente a un 60 % molar, de una forma más preferible, más de un porcentaje correspondiente a un 75 % molar, de los péptidos los cuales se encuentran presentes, tienen un peso molecular inferior a los 500 Da. Esto es así, con la condición de que, la distribución del peso molecular, de los péptidos que se encuentren presentes en el hidrolizado, se lleve a cabo de la forma la cual se encuentra descrita en la sección de Materiales y Procedimientos del presente documento de solicitud de patente.

Una importante ventaja de la fracción fácilmente absorbible, reside en el hecho consistente en que, el triptófano el cual se encuentra abarcado en el triptófano libre o en los di- y tripéptidos, se transporta a través de la pared del

intestino, hacia el interior de la corriente sanguínea, inmediatamente después del consumo oral. Como consecuencia de ello, los niveles de triptófano en el plasma, se incrementan casi de una forma instantánea, con un efecto directo sobre los niveles de serotonina en el cerebro. Los datos los cuales se presentan en los Ejemplos 6 y 11 de presente documento de solicitud de patente, muestran el hecho consistente en que, los residuos de triptófano, los cuales se presentan en la forma de tales tipos de di- y tripéptidos, conducen, de una forma muy rápida, a altos factores de relación o cocientes Trp / LNAA. En este respecto, los residuos de triptófano los cuales se presentan en forma de estos di- y tripéptidos, parecen ser incluso más eficaces que el triptófano libre. En concordancia con el presente procedimiento, se obtiene a un fracción peptídica, la cual tiene un factor de relación o cociente molecular, correspondiente a un valor de por lo menos 0,10, siendo éste, de una forma preferible, el correspondiente a un valor de 0,15, con la condición de que, el análisis de los aminoácidos del hidrolizado, se lleve a cabo de la forma que se encuentra descrita en la sección de Materiales y Procedimientos del presente documento de solicitud de patente.

Todavía otra ventaja importante de ofrecer el triptófano en la forma de di- y tripéptidos, reside en el hecho consistente en que, la ingesta o captación gastrointestinal de estos péptidos, es tan rápida, que éstos pueden consumirse en combinación con productos alimenticios los cuales contengan proteínas, tales como los productos lácteos, los cuales tengan, de una forma natural, un factor de relación o cociente Trp / LNAA, menos favorable, pero que todavía conduzcan a un incremento efectivo del factor de relación o cociente Trp / LNAA, en el plasma, dentro de un transcurso de tiempo de 90 minutos, de una forma preferible, dentro de un transcurso de tiempo de 60 minutos, de una forma más preferible, dentro de un transcurso de tiempo de 30 minutos, después de haberse producido el consumo.

Así, por lo tanto, la presente invención, proporciona el uso de lisozima y / o la composición de la invención, para el uso de la obtención de un factor de relación o cociente Trp / LNAA incrementado, en el plasma, dentro de un transcurso de tiempo de 90 minutos, de una forma preferible, dentro de un transcurso de tiempo de 60 minutos, de una forma más preferible, dentro de un transcurso de tiempo de 30 minutos, después de haberse producido la ingesta de los péptidos, o para la preparación de una composición nutracéutica, para la obtención de un factor de relación o Trp / LNAA incrementado, en el plasma, dentro de un transcurso de tiempo de 90 minutos, de una forma preferible, dentro de un transcurso de tiempo de 60 minutos, y de una forma mayormente preferible, dentro de un transcurso de tiempo de 30 minutos, después de la ingesta de los péptidos. Un factor de relación o cociente Trp / LNAA incrementado, en el presente texto de esta solicitud de patente, significa el hecho consistente en un incremento de este factor de relación o cociente, comparado con la situación previa al consumo o ingesta de la composición de la invención.

Una "proteína" o "polipéptido", se define aquí, en este documento de solicitud de patente, como una cadena, la cual comprende más de 30 residuos de aminoácidos.

Una "proteína intacta", se define aquí, en este documento de solicitud de patente, como una proteína con un peso molecular idéntico a la de la proteína de origen natural, si se procede a sus comparación, mediante el uso de un procedimiento o método de SDS - PAGE, el cual se encuentra descrito en la sección de Materiales y Procedimientos del presente documento de solicitud de patente.

"Resistencia a la proteasa", de una proteína intacta, se determina según se especifica en la sección de Materiales y Procedimientos del presente documento de solicitud de patente.

Un "péptido" u "oligopéptido", se define aquí, en este documento de solicitud de patente, como una cadena de por lo menos dos aminoácidos, los cuales se encuentran unidos mediante enlaces o eslabones peptídicos. Los términos "péptido" y "oligopéptido", se consideran como sinónimos (tal y como se encuentra usualmente reconocido) y, cada término, puede utilizarse, de una forma intercambiable, de la forma que se requiera en el contexto.

Mediante triptófano el cual contiene un péptido, o composición o fracción de un péptido el cual contiene triptófano (fracción y composición, se usan de una forma intercambiable, en este contexto), se pretende dar a entender una composición, la cual comprende por lo menos un péptido que contiene triptófano. En el presente texto de este documento de solicitud de patente, triptófano que contiene un péptido, o composición de un péptido que contiene triptófano, puede comprender únicamente un péptido, si bien, esta composición, puede comprender más de un péptido. Mediante triptófano que contiene un polipéptido, o composición o fracción de un polipéptido el cual contiene triptófano (fracción y composición, se usan de una forma intercambiable, en este contexto), se pretende dar a entender una composición, la cual comprende por lo menos un polipéptido que contiene triptófano. En el presente texto de este documento de solicitud de patente, triptófano que contiene un polipéptido, o composición de un polipéptido que contiene triptófano, puede comprender únicamente un polipéptido.

Un péptido que contiene triptófano, significa un péptido, el cual contiene por lo menos un residuo de aminoácido triptófano. Un polipéptido que contiene triptófano, significa un polipéptido, el cual contiene por lo menos un residuo de aminoácido triptófano.

Mediante triptófano unido a un péptido, se pretende dar a entender triptófano, el cual se encuentra presente como un aminoácido, en un péptido. Mediante triptófano unido a un polipéptido, se pretende dar a entender triptófano, el cual se encuentra presente como un aminoácido, en un polipéptido.

La composición que contiene triptófano de la presente invención, comprende una composición de triptófano que contiene un péptido y una composición de triptófano que contiene un polipéptido, y así, de este modo, ésta comprenderá por lo menos un péptido que contiene triptófano y por lo menos un polipéptido que contiene triptófano.

Triptófano libre, pretende dar a entender triptófano, como aminoácido libre, y así, por lo tanto, no formando parte de un péptido o polipéptido.

Un péptido "soluble en agua", es un péptido, el cual es soluble en agua, a un valor pH de 5,0.

La totalidad de las fórmulas de (oligo)péptidos y de polipéptidos, o secuencias presentadas aquí, en este documento de solicitud de patente, se encuentran escritas de izquierda a derecha, en la dirección que va desde el término amino, hacia el término carboxi, en concordancia con la práctica común. El código de una letra, de los aminoácidos, los cuales se utilizan aquí, en este documento de solicitud de patente, se conoce, de una forma usual, en el arte especializado de la técnica, y éste puede encontrarse en el trabajo de Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, - Clonación molecular, un manual de laboratorio -, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

Mediante hidrolizado de proteína, hidrolizado, o proteína hidrolizada, se pretende dar a entender el producto el cual se forma mediante la hidrólisis enzimática de la proteína, un hidrolizado enriquecido o fraccionado, el cual es una fracción del hidrolizado de proteína, tal como, por ejemplo, enriquecido, en péptidos seleccionados, o en donde, se han retirado los péptidos o polipéptidos del hidrolizado. Así, por lo tanto, un hidrolizado enriquecido, de una forma preferible, es una mezcla de péptidos (o una mezcla peptídica). La mezcla peptídica de la presente invención, es así, por lo tanto, una mezcla de por lo menos dos péptidos que contienen triptófano, de una forma preferible, de por lo menos tres péptidos que contienen triptófano, y de una forma más preferible, de por lo menos cuatro péptidos que contienen triptófano. De una forma más preferible, la mezcla, comprende una composición peptídica, de la cual, más de un porcentaje correspondiente a un 50 % molar de los péptidos presentes, de una forma preferible, más de un porcentaje correspondiente a un 60 % molar de los péptidos presentes, de una forma mayormente preferible, más de un porcentaje correspondiente a un 75 % molar de los péptidos presentes, tienen un peso molecular inferior a los 500 Da. El factor de relación o cociente Trp / LNAA , representa el factor de relación o cociente molar del triptófano con relación a otros aminoácidos de cadena larga (LNAA – [de sus siglas en idioma inglés, correspondientes a Large Neutral Amino Acids]; a saber la suma de tirosina, fenilalanina, leucina, isoleucina, y valina). Excepto en cuanto a lo referente al factor de relación o cociente Trp / LNAA en el plasma, el factor de relación o cociente Trp / LNAA , se refiere únicamente aminoácidos unidos a un péptido y / o aminoácidos unidos a un polipéptido. Para el factor de relación o cociente Trp / LNAA en el plasma, el factor de relación o cociente Trp / LNAA , se refiere aminoácidos libres. Así, por lo tanto, triptófano libre, tirosina, fenilalanina, leucina, isoleucina, y valina, no se toman en consideración, en el factor de relación Trp / LNAA .

Los aminoácidos unidos a un péptido, son aminoácidos, los cuales son parte de un péptido, y no son aminoácidos libres.

El factor de relación o cociente Tyr / BCAA , representa el factor de relación o cociente molar de la tirosina, con relación a lo niveles de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA – [de sus siglas en inglés, correspondientes a Branched Chain Amino Acids]; a saber, la suma de leucina, isoleucina y valina).

De una forma preferible, el factor de relación o cociente Tyr / BCAA , es mayor de 0,1, siendo éste, de una forma preferible, mayor de 0,12.

Un inicio y calidad del sueño favorables, se define como un sueño tranquilo, en el que se entra, después de un transcurso de tiempo de 45 minutos, desde que se haya ido a la cama.

El estado de ánimo, se define como el estado emocional de la mente y éste se mide, de una forma preferible, mediante la utilización del Cuestionario sobre el Perfil de los Estados Emocionales (véase, a dicho efecto, el Ejemplo 6 de la presente invención, facilitado posteriormente, más abajo, en este documento de solicitud de patente).

La cognición, se define como aquéllas facultades combinadas y las cuales se refieren a áreas tales como las consistentes en la resolución de los problemas, en el aprendizaje, en la memoria, y en el lenguaje.

El apetito, se define como el deseo de comer, el cual se estimula mediante la sensación de hambre.

La alerta o estado de alerta, se define como el estado de atención o de vigilancia de la mente, el cual se mide, de una forma preferible, mediante el Test de Ensayo de reloj, de Mackworth, y la Tarea del seguimiento crítico véase, a dicho efecto, el Ejemplo 9 de la presente invención, facilitado posteriormente, más abajo, en este documento de solicitud de patente).

Los efectos ansiolíticos, son efectos los cuales tienen como resultado el alivio o la mitigación de las sensaciones de los miedos o angustias, de la aprehensión, o de las inquietudes o preocupaciones.

La depresión, se define como el estado de la mente, el cual se caracteriza mediante unas sensaciones graves y persistentes de la pérdida del placer.

El término comportamiento sexual, se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, como un sinónimo de libido.

En la patente internacional WO 02 / 46 210, se describe un procedimiento para incrementar el nivel de triptófano en los hidrolizados de proteína de suero láctico. En el método o procedimiento utilizado, se procede, en primer lugar a hidrolizar el suero láctico, a un valor pH ácido, mediante una o más proteasas ácidas, de una forma preferible, mediante una pepsina, una renina, una proteasa fúngica, una quimosina, una papaína, una bromelaina, una quimopapaína, o una ficina. Las condiciones preferidas de incubación, son las correspondientes a un valor pH comprendido dentro de unos márgenes situados entre un valor pH de 1,5 y un valor pH de 3,5, y éstas se eligen con objeto de generar péptidos, los cuales tengan una naturaleza hidrofóbica. La hidrólisis, se lleva a cabo, de una forma deliberada, de tal forma que, los residuos de triptófano, se convierten en residuos de triptófano incorporados en péptidos hidrofóbicos de cadena larga. Muchos menos residuos de triptófano, se encuentran presentes en los péptidos de cadena corta, más solubles en agua. En una etapa de procesamiento subsiguiente, el valor pH, se hace crecer a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde un valor pH de 4,0 hasta un valor pH de 6,0, con objeto de fomentar la precipitación de estos péptidos con contenido en triptófano, de cadena larga, facilitando, con ello, su recuperación selectiva, del hidrolizado de suero láctico. El triptófano, se encuentra únicamente presente en péptidos relativamente grandes, la captación y entrada de triptófano, al interior de la sangre, se retardará, limitándose con ello las posibilidades de la preparación, como un ingrediente de producto alimenticio o como un ingrediente de una bebida, de una forma especial, en combinación con otras proteínas. Vale la pena enfatizar el hecho consistente en que, la alfa-lactoalbúmina, no se encuentra calificada como una fracción de proteína intacta en concordancia con la presente invención, ya que, ésta, no resistente a la proteasa, en concordancia con el test de ensayo especificado en la sección de Materiales y Métodos (o Procedimientos), del presente documento de solicitud de patente.

La presente invención, da a conocer un procedimiento de hidrólisis simple, en donde se parte de una proteína, la cual se encuentra industrialmente disponible en el mercado, y que se caracteriza por un alto factor de relación o cociente Trp / LNAA . El presente procedimiento de hidrólisis, tiene un rendimiento productivo de triptófano correspondiente a un porcentaje de más de un 30 %, en base a triptófano proteínico, y éste genera una composición peptídica soluble en agua, la cual comprende triptófano. El hecho consistente en que, la parte mayor de los residuos de triptófano, se encuentra englobada en di- y tri-péptidos, implica una inmediata captación y entrada al interior de la corriente sanguínea. Tal y como se revelará, esta propiedad, permite la incorporación del hidrolizado, en una mayor variedad de productos alimenticios o de productos nutracéuticos. De una forma bastante sorprendente, la presente invención, da también a conocer el hecho consistente en que, después del consumo oral, el hidrolizado en concordancia con la presente invención, puede generar unos factores de relación o cocientes Trp / LNAA en la sangre, más altos, que el correspondiente al factor de relación o cociente Trp / LNAA , del hidrolizado efectivo.

En concordancia con la presente invención, la lisozima de huevo de gallina, se usa como un material de partida conveniente, para la composición de la invención, con un alto factor de relación o cociente Trp / LNAA , el cual, después de la ingesta oral, conduce rápidamente a unos factores de relación o cocientes Trp / LNAA incrementados, y de larga duración, en la sangre. La lisozima, se encuentra presente en la clara de huevo, en una concentración correspondiente a un porcentaje del 3 – 4 %. Tomando ventaja de este excepcionalmente alto punto isoeléctrico, la lisozima, se aísla, de una forma industrial, a partir de la clara de huevo, mediante la utilización una simple etapa de purificación cromatográfica catiónica, seguida, de una forma opcional, de una etapa de cristalización. El producto resultante, es casi puro, y éste es un producto el cual se encuentra industrialmente disponible en el mercado, el cual tiene un contenido molecular en triptófano, correspondiente a un porcentaje del 7,8 %, y un factor de relación o cociente molecular TRP / LNAA , de por lo menos un valor de 0,15. Así, de este modo, la lisozima, a saber, la proteína intacta, tiene un factor de relación o cociente Trp / LNAA , el cual es significativamente más alto que el correspondiente a la alfa-lactoalbúmina y / o a la beta-lactoglobulina. Así, por lo tanto, los hidrolizados de lisozima en concordancia con la presente invención tienen, de una forma preferible, un factor de relación o cociente Trp / LNAA , el cual es mayor de un valor de 0,15, siendo el factor de relación o cociente Trp / LNAA , de una forma más preferible, mayor de un valor de 0,20, siendo el factor de relación o cociente Trp / LNAA , de una forma todavía más preferible, mayor de un valor de 0,23, siendo el factor de relación o cociente Trp / LNAA , de una forma aún más preferible, mayor de un valor de 0,25, y siendo el factor de relación o cociente Trp / LNAA , de la forma mayormente preferible, mayor de un valor de 0,30. De una forma general, el factor de relación o cociente Trp / LNAA , es inferior a un valor de 3,0. Como tal, la lisozima, presenta un punto de partida, para los péptidos o composiciones con contenido en triptófano, y ésta puede utilizarse como una composición de triptófano unido a un polipéptido. Las lisozimas (EC 3. 2. 1. 17), es una enzima capaz de hidrolizar enlaces o eslabones específicos de peptidoglicano, en paredes celulares bacterianas, conduciendo a una lisis celular. Debido al hecho consistente en su efecto bactericida, la lisozima, juega un importante rol interpretativo, en la defensa del huésped, mediante la prevención de las infecciones. Bajo unas condiciones fisiológicas, la molécula de lisozima, es muy resistente al ataque proteolítico.

Esta inusual resistencia, puede explicarse mediante motivos evolutivos; puesto que, las bacterias invasivas, son capaces de excretar una gran variedad de proteasas, una molécula de lisozima susceptible a tales tipos de proteasas, se inactivaría de una forma muy rápida. Su resistencia a la proteasa, se ha ilustrado, entre otros, para las lisozimas en el estómago de los rumiantes (véase, a dicho, efecto, (Dobson et al, J. Biol Chem. 1984, 259 (18) 11607 - 11616). Desde un punto de vista estructural, la presencia de cuatro eslabones o enlaces de disulfuro, en la molécula, puede esperarse que se añada a la resistencia a la proteasa de la lisozima. En base a los datos presentados en el Ejemplo 1, de la presente solicitud de patente, la lisozima de huevo de gallina, puede considerarse como siendo tan resistente, al ataque proteolítico, que resulta improbable el hecho de que, la molécula, pueda digerirse de una forma eficiente, en la parte proximal del tracto intestinal humano. La consecuencia de esta resistencia a la proteasa, reside en el hecho consistente en que, a pesar de su muy atractivo factor de relación o cociente Trp / LNAA, la lisozima intacta, no es una fuente apropiada para aumentar de una forma rápida los niveles de triptófano en el plasma, sencillamente, debido al hecho de que, los residuos de triptófano, no se liberan fácilmente, bajo unas condiciones fisiológicas existentes en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, no obstante la lisozima intacta de huevo de gallina, puede hidrolizarse, de una forma enzimática, bajo unas condiciones cercanas a un valor pH neutro (véase, a dicho efecto, Porter et al., J. Agric. Food Chem. 1984, 32, 334 - 339). Este artículo, se encuentra en línea con nuestras observaciones, en cuanto a lo referente al hecho de que, la lisozima de huevo de gallina, intacta, será capaz de liberar triptófano unido a un péptido, en las partes más distales del intestino humano. Conjuntamente con el anteriormente descrito hidrolizado de lisozima "predigerido", rápidamente absorbible, esto abre una inesperada posibilidad de crear una preparación, la cual, después de la ingesta oral, conduce a un inmediato aumento del factor de relación o cociente Trp / LNAA, en el plasma, seguido de una lenta y sostenida liberación del factor de relación o cociente Trp / LNAA. Esta cinética, se reproduce en los niveles de Trp / LNAA en el plasma, conduciendo a unos nuevos y sorprendentes efectos en la serotonina, así como en la dopamina, en el cerebro.

Después de la ingesta dietética, las proteínas presentes en el producto alimenticio, se hidrolizan, de una forma gradual, a fragmentos más pequeños, y a continuación, éstas se transportan a través de la pared del intestino delgado, y se llevan al interior del intestino. En el tracto gastrointestinal, se encuentran activas un gran número de diferentes proteasas, las cuales se originan en el estómago, en el páncreas y en el intestino delgado, para hidrolizar las proteínas dietéticas. Las endoproteasas, tales como las consistentes en la pepsina, en la tripsina, y en la quimotripsina, dividen a las proteínas dietéticas, convirtiéndolas en oligopéptidos más pequeños. De entre estas endoproteasas, únicamente la pepsina, es activa, en las inmediaciones o ambientes ácidos del estómago. La tripsina y la quimotripsina, se convierten en activas, en las inmediaciones o ambientes casi neutros, prevalentes en el duodeno, en el yeyuno y las partes más distales del intestino. Los oligopéptidos formados por estas endoproteasas, se hidrolizan adicionalmente, a continuación, mediante un gran número de otras enzimas, tales como las consistentes en di- y tripeptidil-peptidasas, para proporcionar di- y tripéptidos, y mediante amino- y carboxipeptidasas, para proporcionar aminoácidos libres. Los sistemas de portadores, específicos para el transporte de aminoácidos libres di- ó tripéptidos, son responsables para un transporte eficiente, a través de la pared del intestino, hacia la corriente sanguínea. Después de la ingesta dietética, los aminoácidos libres y los di- y tripéptidos, se incorporan, inmediatamente, en la corriente sanguínea. Los péptidos mayores que los tripéptidos, requieren una segmentación enzimática adicional, con objeto de posibilitar la admisión o captación.

Nosotros, los solicitantes, hemos encontrado el hecho consistente en que, la composición la cual contiene triptófano de la presente invención, es también efectiva, así mismo, si ésta se incorpora en matrices alimenticias las cuales contengan una proteína superior, tal y como se presenta, por ejemplo, en los productos lácteos. Este hecho, es verdaderamente sorprendente, ya que, as matrices alimenticias las cuales contienen proteínas, presentan unos altas cargas en LNAA, y así, por lo tanto, puede esperarse el hecho de poder reducir el efecto de los productos con unos altos factores de relación o cocientes Trp / LNAA. Una posible explicación para este inesperado fenómeno, reside en el hecho de que, los productos alimenticios usuales, proteínas intactas, en lugar de proteínas ampliamente hidrolizadas. Una típica distribución del tamaño, de un hidrolizado en concordancia con la presente invención, es el que se representa en la Figura 3. En concordancia con lo representado en esta figura, la mayor parte de los péptidos los cuales incorporan el triptófano y la tirosina, tienen un peso molecular correspondiente a un valor inferior a los 500 Da. En vistas del muy alto peso molecular del triptófano (MW = 188), y de la tirosina (MW = 163), y debido también al hecho consistente en que, únicamente se encuentran presentes unos niveles muy bajos de triptófano libre, la implicación resultante, es la consistente en que, la mayor parte de estos péptidos, serán tri- ó dipéptidos. Debido al hecho de que, el triptófano, tiene una absortividad molar mucho mayor que la correspondiente a la tirosina, a la longitud de onda utilizada, los valores pico, se referirán, principalmente, a los péptidos los cuales incorporan triptófano.

Debido al hecho consistente en que, los di- y tripéptidos los cuales contienen triptófano, los cuales se encuentran presentes en la composición con contenido en triptófano en concordancia con la presente invención, se absorben de una forma mucho más rápida, que la correspondiente, por ejemplo, a la gran cantidad de LNAAs, la cual se encuentra presentes en la proteínas de matriz no hidrolizada, nosotros, los solicitante, asumimos el hecho consistente en que, ésta, es la razón de que, incluso en presencia de grandes cantidades de proteínas en la matriz, pueden obtenerse unos altos factores de relación o cocientes de Trp / LNAA, en el plasma.

Unas situaciones particulares, requieren unos altos factores de relación o cocientes de Trp / LNAA, en el plasma, durante unos prolongados transcurros de tiempo. Por ejemplo, con objeto de mejorar y ampliar el tiempo de sueño, o las situaciones las cuales requieran un rendimiento cognitivo, mejorado, durante un prolongado transcurso de tiempo. Así mismo, también, las situaciones en las cuales se requiere un mejora del estado de ánimo, tal y como se ha descrito para casos de síndrome premenstrual o de síndrome postmenstrual, de la mujer, la composiciones de la presente invención, son de una relevancia particular. Mientras que, el triptófano unido a un péptido, tal como el consistente en el hidrolizado de lisozima, proporcionará un aumento casi instantáneo del factor de relación o cociente Trp / LNAA en el plasma, la lenta digestión del triptófano unido a un polipéptido, tal como la proteína resistente a la pepsina, con su alto factor de relación o cociente Trp / LNAA, garantizará una liberación continuada de triptófano unido a un péptido, en las partes más terminales del intestino humano, dando ello como resultado un factor de relación o cociente Trp / LNAA, en el plasma, dentro del período de tiempo comprendido dentro de unos márgenes situados entre 120 minutos y 240 minutos, a partir del momento en el que se haya producido la ingesta de la composición de la presente invención.

De una forma interesante, nuestros presentes datos experimentales, parecen así mismo indicar, así mismo, el hecho consistente en que, el hidrolizado en concordancia con la presente invención, puede generar unos factores de relación o cocientes Trp / LNAA, en la sangre de seres humanos voluntarios, los cuales son más altos que los correspondientes al factor de relación o cociente Trp / LNAA del hidrolizado, cuando éste se administra en unas dosis las cuales sean lo suficientemente altas. Una dosis la cual sea lo suficientemente alta, de una forma preferible, es la consistente en una dosis de más de 10 gramos, de más de 12 gramos, o de más de 14 gramos, del hidrolizado de la lisozima. Si bien es verdad que, tal tipo de fenómeno, es desconocido, y que, según nuestro leal y mejor conocimiento, no existe una explicación aceptable para la existencia de este efecto, nosotros, los solicitantes, creemos que éste viene provocado por el extremado alto contenido de arginina de esta molécula de lisozima. La hipótesis de trabajo planteada en el momento presente, se da a conocer aquí, en este documento de solicitud de patente, con objeto de explicar los datos experimentales mostrados en los Ejemplos. Esta hipótesis, se usa para proporcionar la visión o perspectiva de los presentes inventores, pero, la presente invención, no se encuentra vinculada o limitada, en modo alguno, a dicha hipótesis. Así, de este modo, la presente invención, se soporta, de una forma independiente de que la hipótesis en cuestión sea correcta o no. Un incremento de la insulina, en la sangre, estimula la captación de los aminoácidos de la sangre, conduciéndolos hacia el interior del tejido peritoneal de una forma especial, el músculo. Sin embargo, no obstante, el triptófano, se escapa en gran manera de esta ruta o vía, debido al hecho consistente en que, en la sangre, el triptófano se une a la albúmina proteínica del plasma. Como consecuencia de ello, los niveles incrementados de insulina, hacen disminuir las concentraciones de la insulina, pero no del triptófano, incrementando, con el ello, el factor de relación o cociente Trp / LNAA, en la sangre. Puesto que, la ingestión de hidratos de carbono, provoca la secreción de insulina, y estimula la captación de LNAA, en los tejidos periféricos, y de una forma notable, en los músculos, este tiene como resultado el hecho consistente en que se incrementan los factores de relación o cocientes Trp / LNAA, en el plasma, mediante la ingesta de hidratos de carbono (véase, a dicho efecto, el trabajo de Fernstrom y Wurtman, 1972, Metabolism, - Metabolismo -, Volumen 21, nº 4, 337 – 342). Aparte de la ingestión de hidratos de carbono, es también conocido el hecho de que, la secreción de la insulina, se estimula mediante determinados aminoácidos particulares. En el caso en el que, los niveles de nitrógeno amínico en el plasma, resultantes de la infusión de los aminoácidos individuales, sean muy similares, las respuestas de la insulina, pueden variar de una forma considerable. Floyd et al (J. Clin. Invest. 45 (1487 – 502), establecieron una respuesta disminuida de la insulina, para los aminoácidos arginina > leucina > fenilalanina > valina > metionina. En vistas del hecho consistente en que, la lisozima, es particularmente rica en el aminoácido arginina, es tentador el hecho de especular que, un efecto estimulante de la insulina, desencadenado por la arginina, conduce a los altos factores de relación o cocientes Trp / LNAA.

Debido al hecho de que, los hidratos de carbono se conocen por su efecto estimulante de la insulina, los hidrolizados en concordancia con la presente invención, se formulan, de una forma preferible, en combinación con hidratos de carbono. Conjuntamente con la presencia de triptófano unido a un péptido, rápidamente absorbible, y triptófano unido a un péptido, absorbible de una forma lenta, la composición preferida en concordancia con la presente invención, comprende hidratos de carbono.

En una forma de presentación, en concordancia con la presente invención, la lisozima, de una forma preferible, lisozima de huevo de gallina, se (pre)hidroliza, en un proceso industrial, a saber la composición del péptido el cual contiene triptófano (de gallina de huevo), se proporciona, de una forma preferible, en forma un hidrolizado o de un hidrolizado enriquecido. Ofrecido en forma de un hidrolizado (enriquecido) de este tipo, tal cual, la absorción intestinal de los péptidos que contienen triptófano, se facilita enormemente. En otra forma de presente de la presente solicitud de patente, se procede a convertir una lisozima de huevo de gallina, a un hidrolizados o hidrolizado enriquecido, el cual comprende una población de péptidos los cuales comprenden triptófano, de los cuales, una cantidad correspondiente a un porcentaje de más de un 50 % molar, de una forma preferible, una cantidad correspondiente a un porcentaje de más de un 60 % molar, de una forma más preferible, una cantidad correspondiente a un porcentaje de más del 75 % molar, de los péptidos los cuales se encuentran presentes, tienen un peso molecular inferior a los 500 Da. De una forma preferible, tal tipo de hidrolizado (enriquecido), no contiene más de porcentaje del 1 %, en peso (en base a la materia en seco), de triptófano libre. Le análisis de los pesos moleculares de los péptidos que contienen triptófano, los cuales se encuentran presentes en el hidrolizado, se lleva a cabo y se realiza, en la sección correspondiente a Materiales y Métodos (procedimientos), del presente documento

de solicitud de patente, y éste se encuentra ilustrado en la Figura 3. Un importante ventaja de esta última forma de presentación, en concordancia con la presente invención, reside en el hecho de que, el triptófano el cual se encuentra englobado en los di- y tripéptidos, se trasporta a través de la pared intestinal, conduciéndose hacia el interior de la corriente sanguínea, inmediatamente después del consumo oral. Como consecuencia de ello, los niveles de triptófano en el plasma, se incrementan casi de una forma instantánea, con un efecto directo sobre los niveles de la serotonina en el cerebro. Es bastante sorprendente, el hecho consistente en que, los datos los cuales se presentan en el Ejemplo 6 del presente documento de solicitud de patente, muestran el hecho de que la eficacia de los residuos de triptófano, presentados en forma de estos di- y tripéptidos, es incluso más eficaz, que la del triptófano libre. Esta observación, enfatiza las ventajas ofrecidas por la presente invención.

La patente internacional WO 2006 / 009 448, proporciona hidrolizados de proteínas, los cuales se obtienen de la proteínas de huevos de gallina, y que tienen una propiedades antihipertensivas, así como productos alimenticios y suplementos alimenticios, los cuales comprenden estos hidrolizados. El documento en cuestión, divulga la preparación de un gran número de hidrolizados, incluyendo a aquéllos los cuales se obtienen a partir de liozima de huevo de gallina. Todos estos hidrolizados, tienen como finalidad, la reducción de la presión sanguínea, o prevenir o evitar que la presión sanguínea suba, después de su ingestión oral, en humanos. La patente internacional WO 2006 / 009 448, describe así mismo, también, la preparación de hidrolizados de liozima, obtenidos bajo unas condiciones alcalinas, mediante la utilización de subtilisina (EC 3. 4. 21. 62); nombres comerciales, Alcalase o Protex). En concordancia con los altos grados de hidrólisis los cuales se obtienen, estos hidrolizados de liozima, contienen una gran proporción de péptidos, con un peso molecular inferior a los 500 Da. Sin embargo, no obstante, en ningún lugar del documento publicado de la patente internacional WO 2006 / 009 448, se hace referencia al hecho consistente en que, la liozima, es un fuente de proteína, la cual tiene un alto contenido en triptófano, el cual puede afectar, de una forma positiva, a los niveles de la serotonina en el cerebro. No se menciona, tampoco, el hecho consistente en que, los hidrolizados de liozimas, comprenden péptidos solubles en agua, los cuales incorporan una alta cantidad de triptófano y una cantidad relativamente bajo de LNAA. La patente internacional WO 2006 / 009 448, tampoco menciona el hecho consistente en el alto contenido de arginina y de lisina, de ambos, la liozima y el hidrolizado de liozima. Nosotros, los solicitantes, hemos encontrado el hecho consistente en que, en base a los datos presentados en el presente documento de solicitud de patente, el alto contenido en triptófano de la molécula de liozima, en combinación con la ubicua u omnipresente presencia de la arginina y de la lisina, hace, de la liozima, el perfecto material de partida para una generación, *in vivo*, de unos altos factores de relación o cocientes Trp / LNAA. De una forma adicional, el texto del documento publicado de la patente internacional WO 2006 / 009 448 no menciona, tampoco, la ventajas ofrecidas por los hidrolizados los cuales se utilizan en la presente invención, en su co-consumo con otros productos alimenticios los cuales contienen proteínas. Aparte del uso de filtros de membrana, el texto del documento publicado de la patente internacional WO 2006 / 009 448, tampoco hace mención de los métodos o procedimientos para la obtención de fracciones de péptidos de estos hidrolizados, las cuales tengan unas composiciones seleccionadas de aminoácidos, ni tampoco hacen mención de procedimientos o métodos específicos para la incrementar los contenidos de triptófanos, o para incrementar los factores de relación o cocientes Trp / LNAA. De una forma adicional, no se encuentra registrada la ventaja consistente en ofrecer un hidrolizado de liozima altamente degradada, en combinación con una liozima intacta, no degradada.

Los datos los cuales se presentan en el Ejemplo 4 del presente documento de solicitud de patente, indican el hecho consistente en que, el hidrolizado de liozima obtenido mediante la incubación de la liozima, a un valor pH alcalino, con subtilisina, es particularmente rico en el dipéptido Ala-Trp (AW). Este descubrimiento, sugiere el hecho consistente en que, unipéptido AW químicamente sintetizado, podría proporcionar una alternativa apropiada para el presente hidrolizado de liozima. A pesar del hecho consistente en que, el uso de un dipéptido sintético, tiene unos inconvenientes legislativos obvios, las importantes ventajas que éste aporta, son las consistentes en su eficiencia en cuanto a lo referente al coste, y su factor de relación o cociente Trp / LNAA ideal. De una forma teórica, se encuentran disponibles veinte diferentes tipos de dipéptidos los cuales contienen triptófano, pero, sin embargo, no obstante, nuestras investigaciones, han mostrado el hecho consistente en que, los dipéptidos Ala-Trp (QW) y Ser-Trp (SW), representan, de una forma particular, unas opciones preferidas, para mejorar los factores de relación o cocientes Trp / LNAA, en el plasma, vía un dipéptido sintético. La producción de los dipéptidos AW y SW, vía una síntesis química, es posible, mediante la utilización de técnicas convencionales tales como las que se encuentran descritas en "Peptides: Chemistry and Biology", - Péptidos: Química y biología -, por N. Sewald y H.D. Jakubke, Eds. Wiley - VCH Verlag GmbH, 2002, capítulo 4. Los procedimientos y métodos efectivos en cuanto lo referente al coste, de la síntesis química de los péptidos, y los cuales son particularmente apropiados para la producción a escala industrial, se basan en el uso de cloroformatos de alquilo, o de cloruro de pivaloilo, para la activación del grupo carboxílico, combinado con el uso de ésteres de metilo, para la protección C-terminal, y grupos de benciloxicarbonilo o de (Z) o grupos de tert.-butoxicarbonilo, para la N-protección. Un procedimiento detallado para la síntesis efectiva en cuanto al coste, del dipéptido SW, es la que se proporciona en el Ejemplo 5 de este documento de solicitud de patente. La combinación de tal tipo de dipéptido con contenido en triptófano, químicamente sintetizado, en combinación con un triptófano unido a un polipéptido, tal como el consistente en un proteína resistente a la pepsina, con un alto factor de relación o cociente Trp / LNAA, de una forma preferible, liozima intacta, es nueva.

Teniendo disponible la composición en concordancia con la presente invención, se prevén otras nuevas y sorprendentes aplicaciones, las cuales tienen unas ventajas técnicas y económicas.

Un nuevo uso, sería el consistente en la incorporación de lisozima y / o de la composición de la presente invención, en varios productos de fórmula para niños pequeños lactantes. La leche de vaca, tiene un contenido de proteína de suero láctico, correspondiente a un porcentaje del 20 %, y la leche humana, tiene un contenido de proteína de suero láctico, correspondiente a un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde un 40 % hasta un 60 %. Como consecuencia de ello, la leche de vaca, contiene menos alfa-lactoalbúmina y así, de este modo, triptófano, que la leche humana. Los niños pequeños lactantes, no prematuros, se alimentan, de una forma usual, con fórmulas alimenticias a base de leche de vaca, productos éstos, los cuales no proporcionan un perfil de aminoácidos equivalente al de la leche materna. Si bien las consecuencias de un suministro insuficiente de triptófano, no se conocen de una forma completa, los productos de fórmulas para niños pequeños lactantes, con un alto contenido en triptófano, pueden tener unos efectos beneficiosos sobre el comportamiento consciente y el inicio y la calidad del sueño del niño pequeño lactante. Una fuerte indicación, en cuanto al hecho consistente en que, el nivel de triptófano en el plasma, fomenta un rápido inicio de un sueño tranquilo, en neonatos sanos, es la que se ha proporcionado por parte de Yogman y Zeisel en N Engl J Med., en fecha 10 de Noviembre de 1983; 309 (19): 1147 - 1149. De una forma correspondientemente en concordancia, la presente invención, proporciona composiciones para niños pequeños lactantes, en los cuales, se ha procedido a aumentar el nivel de triptófano.

En concordancia con otro aspecto de la presente invención, la composición en concordancia con la invención, puede utilizarse en productos que reemplazan a una comida. Así, por ejemplo, la patente internacional WO 2005 / 02 3017, describe las ventajas de la gelatina, en altas dosificaciones, como un componente apropiado en los productos que reemplazan a una comida. Al mismo tiempo que proporciona unas excelentes propiedades organolépticas, la gelatina, no proporciona el equilibrio necesario de aminoácidos, por ejemplo, ésta no incorpora el aminoácido esencial consistente en el triptófano. Así, por lo tanto, con objeto de llegar a una composición la cual tenga un equilibrio apropiado de aminoácidos, según requiere la Directiva EC 96 / 8 / EC, debe añadirse triptófano, a tales tipos de composiciones con contenido en gelatina. En la patente internacional WO 2005 / 02 3017, el triptófano, se añade, de una forma preferible, en forma de una proteína rica en triptófano, tal como, por ejemplo, la clara de huevo en polvo, o huevo entero en polvo. Nosotros, los solicitantes, hemos encontrado, ahora, el hecho consistente en que, la composición con contenido en triptófano, en concordancia con la presente invención, ofrece una solución mejorada a este problema, ya que, estos hidrolizados, proporcionan triptófano, en una forma mucho más concentrada. De una forma adicional, la lisozima, en sí misma, contiene la totalidad de aminoácidos esenciales en la cantidad requerida, y como tal, ésta es una proteína nutritivamente completa, la cual encaja de una forma ideal, en un reemplazo de una comida.

En concordancia con todavía otro aspecto de la presente invención, la lisozima y / o la composición en concordancia con la presente invención, se utilizan para mejorar el inicio y la calidad del sueño, en niños pequeños lactantes, en niños, y en adultos. Los problemas del sueño, son muy prevalentes, entre los individuos pertenecientes a varios grupos de edad, y éstos se encuentran asociados con trastornos o desórdenes médicos. La composición con contenido en triptófano en concordancia con la presente invención es de utilidad en el tratamiento de problemas del sueño en general, pero sin embargo, no obstante, ésta presenta adicionalmente, además, herramientas apropiadas para superar los problemas conectados con los trastornos cognitivos, los trastornos psicológicos, y los trastornos del comportamiento. Los ejemplos de ello, son los consistentes en el establecimiento de una buena higiene del sueño, la superación de un trastorno asociado con el inicio del sueño, o la superación de un trastorno del ritmo circadiano durante el sueño. Los productos en cuestión, pueden ser de utilidad en la mejora del inicio y de la calidad del sueño, y en el estado mental de, por ejemplo, los pacientes afectados de fibromialgia. El síndrome de la fibromialgia, es un síndrome consistente en un dolor crónico, el cual se encuentra relacionado con un inicio y una calidad del sueño gravemente alterados, y con un estrés emocional. Nosotros, los solicitantes, hemos encontrado el hecho consistente en que, la ingesta de la composición en concordancia con la presente invención y / o lisozima, mejora el inicio y la calidad del sueño, de los individuos los cuales sufren de problemas del sueño en general.

La composición en concordancia con la presente invención, ofrece unas ventajas adicionales, tales como en las consistentes en el aporte de aminoácidos (semi-) esenciales. La lisozima, no únicamente tiene un alto nivel de triptófano, sino que ésta incorpora, así mismo, también, un significativo número de residuos de tirosina. La tirosina, es el precursor para la dopamina neurotransmisora, y se conoce el hecho consistente en que, los niveles de tirosina en el plasma, afectan a los niveles de dopamina en el cerebro. El hidrolizado de lisozima, no únicamente contiene menos LNAAs que otros péptidos con alto contenido de triptófano, sino que, éste contiene así mismo, también, menos aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs), que los correspondientes a los conocidos péptidos con alto contenido de triptófano. Este hecho, es importante, debido al hecho consistente en que, según se conoce, los BCAAs, reducen la disponibilidad en el plasma del precursor de la dopamina, tirosina. Así, de este modo, su alto factor de relación o cociente Trp / LNAAs, en combinación con su alto factor de relación o cociente Tyr / BCAA, convierte al lisozima en una molécula única. Así, por lo tanto, la composición en concordancia con la presente invención, el cual comprende hidrolizado de lisozima y lisozima intacta, se encuentra muy bien situado, como "alimento del cerebro", es decir, para el suministro de los aminoácidos esenciales requeridos para unos niveles apropiados de neurotransmisores. El sistema de la dopamina, es conocido, debido a su crítico rol interpretativo en la mediación de la recompensa y la motivación y sus efectos en la acción de resolver los problemas de la concentración, de la memoria, del estado de alerta, de la atención, así como en la coordinación psicomotora. Tal y como se ilustra en el Ejemplo 9 del presente documento de solicitud de patente, la ingesta del hidrolizado de lisozima en concordancia con la presente invención, tiene unos significativos efectos beneficiosos, en la vigilancia,

en estado de alerta, en la concentración, y en la coordinación psicomotora. Este descubrimiento, demuestra el hecho consistente en que puede esperarse el hecho consistente en que, la composición de la presente invención, no únicamente estimule el sistema de la serotonina, sino que, adicionalmente, además, ésta estimule el sistema de la dopamina.

5 Algunos grupos de individuos, pueden beneficiarse de este descubrimiento. Así, por ejemplo, las mujeres, durante sus años de menopausia, se quejan, de una forma general, de su reducida capacidad para solucionar problemas, los cuales, según informan éstas, son problemas relacionados con la incapacidad para concentrarse. Así, por lo tanto, la composición en concordancia con la presente invención, es especialmente apropiada para luchar contra estos problemas, en las mujeres las cuales se encuentran en este grupo de edad. En la categoría correspondiente al grupo de mujeres que va desde una edad joven, hasta una edad media, el síndrome premenstrual, es bastante común. El síndrome en cuestión, se caracteriza por una gran variedad de síntomas, pero las quejas sobre la depresión y sobre la inestabilidad emocional, acontecen de una forma muy frecuente. Con objeto de luchar contra los problemas correspondientes a estas quejas, se prescriben, de una forma frecuente, inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina, y para las mujeres las cuales presentan unos síntomas más ligeros, se recomiendan adaptaciones dietéticas y la prevención del estrés. En base a los resultados de los experimentos los cuales se encuentran descritos en el Ejemplo 6 y en Ejemplo 9 del presente documento de solicitud de patente, la composición en concordancia con la presente invención, presenta un excelente tratamiento, de una forma especial, para tales tipos de casos más ligeros. De una forma adicional, una dopamina insuficiente, se encuentra asociada con el trastorno de hiperactividad, con déficit de atención (ADHD – [de sus siglas en idioma inglés, correspondientes a attention – déficit hyperactivity disorder] -), de tal forma que, los síntomas de este desorden o trastorno, según se espera, puede aliviarse mediante la composición en concordancia con la presente invención. Nuestro descubrimiento, en cuanto al hecho consistente en que, los efectos beneficiosos en el comportamiento o rendimiento post-estrés, son especialmente prominentes en los sujetos resistentes al estrés, es verdaderamente sorprendente. Una posible explicación para ello, puede ser el consistente en que, las personas estresadas, con un sistema de la serotonina (hiper-) activo, necesitan el triptófano, procedente de la bebida, para reponer sus reservas de serotonina y, así, de este modo, éstas no pueden utilizar este triptófano para mejorar su comportamiento o rendimiento en las tareas usuales. En concordancia con esta base o línea de razonamiento, las personas resistentes al estrés, sin un sistema serotoninérgico hiperactivo, no necesitan el triptófano para reponer sus reservas de serotonina, y pueden utilizarlo para mejorar su comportamiento o rendimiento post-estrés. Una explicación alternativa, para ello, puede ser la consistente en que, estos efectos, son debidos, de hecho, a un efecto estimulante de los procesos dopaminérgicos. Las síntesis de la dopamina, puede mejorarse mediante la utilización de ingredientes alimenticios ricos en tirosina, de una forma particular, si éstos se combinan con unos altos niveles de aminoácidos de cadena ramificada (BCAAs). Estas hipótesis de trabajo, se dan a conocer aquí, en este documento de solicitud de patente, con objeto de explicar los datos experimentales, los cuales se exhiben en los Ejemplos, facilitados más abajo, a continuación, y éstos se utilizan para proporcionar la presente visión o perspectiva de los inventores. Sin embargo, no obstante, la presente invención, no se encuentra en ningún caso vinculada a estas hipótesis, o limitadas por ellas. Así, de este modo, la presente invención, se soporta, de una forma independiente en cuanto a lo referente a la exactitud de estas hipótesis. Tal y como se ha indicado en otro lugar, la lisozima, no únicamente tiene un alto nivel de triptófano, sino que, ésta incorpora, así mismo, también, un gran número de residuos de tirosina.

40 La lisozima y / o la composición en concordancia con la presente invención, aumenta así mismo, también, el contenido o cisteína en los productos alimenticios. Si bien no un aminoácido esencial, las concentraciones de cisteína, se encuentran limitadas, en muchos productos alimenticios. La síntesis endógena de la cisteína, requiere la presencia de la metionina, y, de la misma forma que lo que sucede con la cisteína, las concentraciones de metionina, se encuentran limitadas, en muchos productos alimenticios. Las ventajas de un contenido incrementado de cisteína, en los productos alimenticios, se refieren, entre otras, al efecto antagonístico sobre el efecto de la elevación de la homocisteína, de la metionina. Este descubrimiento, se ha descrito en la patente internacional WO 03 / 055 335. La composición en concordancia con la presente invención, se caracteriza así mismo, también, por un alto nivel de cisteína. De hecho, la molécula de lisozima, contiene incluso más residuos de cisteína (8), que los correspondientes a los residuos de triptófano (6). En este respecto, la composición en concordancia con la presente invención, forma una excelente fuente para incrementar el contenido de cisteína de determinados productos. Se ha encontrado el hecho consistente en que, unos contenidos incrementados de cisteína, son importantes, para los productos tales como los consistentes en las fórmulas alimenticias para niños pequeños lactantes. No únicamente para las fórmulas alimenticias para niños pequeños lactantes a base de caseína, o de mezclas de caseína y de proteínas de suero láctico, sino también, así mismo, para productos a base de soja y, de hecho, para todas los productos ricos en proteínas, en los cuales, la fuente principal de proteínas se proporciona mediante una proteína la cual contenga unas cantidades relativamente bajas de triptófano o de cisteína. Aparte de los componentes proteínicos procedentes de la leche bovina y de la gelatina, la proteína de maíz, la proteína de fermentos o levaduras, la proteína de guisante, la proteína de soja, y la proteína de arroz, representan ejemplos de tales tipos de proteínas. De una forma adicional, los productos que reemplazan a una comida, anteriormente mencionados, arriba, los cuales contienen unas altas dosificaciones de gelatina, contienen unas cantidades inadecuadas de cisteína.

La lisozima y / o la composición en concordancia con la presente invención, la cual comprende, por ejemplo, un di-ó tripéptido, el cual comprende triptófano, especialmente SW (como dipéptido) ó AW (como dipéptido), puede utilizarse de cualquier forma apropiada, tal como la consistente en un producto alimenticio o en una bebida, como un Producto Alimenticio para Usos Nutricionales Especiales, como un suplemento dietético, como un nutracéutico, o

incluso como un alimento o producto alimenticio para animales de compañía o domésticos. La composición con contenido en lisozima en concordancia con la presente invención, puede añadirse en cualquier etapa, durante el procesado normal de estos productos. En el caso en el que ésta se utilice en productos alimenticios, o en bebidas, se prefieren, entonces los productos con un contenido relativamente bajo de proteínas, con objeto de mantener el alto factor de relación o cociente Trp / LNAA, en la sangre, después del consumo de los productos en concordancia con la presente invención. Los productos alimenticios relevantes, incluyen, por ejemplo, a las barras de cereales, a las bebidas que contienen chocolate, a los productos de pastelería o de panadería, tales como los consistentes en los bizcochos y las galletas, y así mismo, también, a los productos alimenticios líquidos, tales como los consistentes en las sopas, o en las sopas en polvo. Aparte de los productos lácteos, tales como los consistentes en la leche y el yogurt, otras bebidas apropiadas, incluyen a las bebidas no alcohólicas y a las bebidas alcohólicas, así como también, así mismo, a las preparaciones líquidas a ser añadidas al agua potable, y a un producto alimenticio líquido. Las bebidas no alcohólicas son, de una forma preferible, las consistentes el agua mineral, en las bebidas deportivas, en los jugos o zumos de frutas, en la limonadas, en los tés, en el café, en el café descafeinado, en las bebidas concentradas, tales como las consistentes en las copitas o "chupitos" de diversos tipos de cremas o jarabes alcohólicos, en la bebidas energéticas (tales como, por ejemplo, las consistentes las bebidas, las cuales contienen glucuronolactona, cafeína o taurina), y en las bebidas carbonatadas (tales como, por ejemplo, las consistentes en las bebidas denominadas "pop", en las sodas, o en las bebidas de cola).

Las combinaciones preferidas con lisozima y / o la composición en concordancia con la presente invención, son con los compuestos recomendados para la "nutrición cerebral, tales como los consistentes en el hierro, en el zinc, en el magnesio, en las vitaminas (de una forma especial, las vitaminas consistentes en la vitamina B2, en la vitamina B6, en ácido fólico, y en la vitamina C), en los ácidos grasos omega -3 y grasas de DHA (ácido decosaheptaenoico), o en los ácidos grasos, en el GABA (ácido γ -aminobutírico), en la colina, en la fosfatidilserina, en la coenzima Q10, en la creatina, en la taurina, y en la 5- HTP (5-hidroxitriptamina), o con los compuestos recomendados para aliviar el estrés o la depresión, tales como los consistentes en la valeriana, en el chocolate, en la hierba de San Juan, en el 5-HTP, en la fosfatidilserina, en el alcohol, el bálsamo de limón, en el té verde o en los extractos de té verde, en la camomila o manzanilla o en la S-adenosilmetionina, o con los compuestos recomendados para mejorar la alerta, tales como los consistentes en la cafeína, en la guarana (Paullina cupana), en el ginseng, en el ginkgo bilboa, en la hierba de San Juan, en la 5-HTP, o con los compuestos recomendados para mejorar el estado de ánimo, tales como los consistentes en el GABA, en la 5-HTP, en la PEA (feniletilamina), en el chocolate, en el té verde, o en los extractos de té verde, en el ginkgo bilboa, en la Salvia, o en la S-adenosil metionina, o con los compuestos recomendados para mejorar el sueño, tales como los consistentes en los péptidos lácticos, en el triptófano libre, en péptidos de opioides, o en la melatonina. Los ejemplos de Productos Alimenticios para Usos Nutricionales Especiales, incluyen a las categorías de los alimentos deportivos, de los alimentos adelgazantes, de las fórmulas alimenticias para niños pequeños lactantes, y de los productos alimenticios clínicos. El término suplemento dietético, tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, significa un producto, el cual se toma por la boca, y el cual contiene un compuesto o una mezcla de compuestos, destinados para suplementar la dieta. El compuesto o mezcla de compuestos, en estos productos, pueden incluir a: las vitaminas, los minerales, las hierbas u otros entes botánicos, y los aminoácidos. Los suplementos dietéticos, pueden también ser extractos o concentrados, y éstos pueden encontrarse en muchas formas, tales como en forma de tabletas, en forma de cápsulas, en forma de geles blandos, en forma de cápsulas de gel, en forma de líquidos, o en forma de materias en polvo.

La composición con contenido en triptófano y / o la lisozima en concordancia con la presente invención, puede también utilizarse, así mismo, como una composición nutracéutica, o en una composición nutracéutica, o en la preparación de un nutracéutico. El término nutracéutico, tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, significa que éste es útil en ambos sectores, el sector nutricional y el sector farmacéutico de aplicación. La lisozima y / o las composiciones nutracéuticas en concordancia con la presente invención, pueden ser en cualquier forma la cual sea apropiada para la administración, al cuerpo del animal, incluyendo a un cuerpo humano, de una forma especial, en cualquier forma, la cual sea convencional para la administración oral, tal como, por ejemplo, en forma sólida, tal como la consistente en un producto alimenticio (o aditivos / suplementos para productos alimenticios), o alimentos en forma de piensos o forrajes, en premezclas de productos alimenticios, o de forrajes o piensos, en tabletas, en píldoras, en gránulos o granulados, el grageas, en cápsulas, y en formulaciones efervescentes, tales como los consistentes en materias en polvo y en tabletas, o en formas líquidas, tales como las consistentes en soluciones, en emulsiones o suspensiones, tal como, por ejemplo, las consistentes en bebidas, en pastas, y en suspensiones aceitosas. Las formulaciones con una liberación controlada (retardada), las cuales incorporan a los hidrolizados en concordancia con la presente invención, forman también parte, así mismo, de la presente invención. De una forma adicional, puede procederse a añadir un suplemento multivitamínico y multimineral, a las composiciones nutracéuticas de la presente invención, para obtener una cantidad apropiada de un nutriente esencial, el cual falte en algunas dietas. El suplemento multivitamínico y multimineral, puede también ser de utilidad para la prevención de enfermedades y para la protección contra las pérdidas y deficiencias nutricionales, debidas a los modelos patrón de determinados estilos de vida.

En un aspecto preferido de la presente invención, la lisozima y / la composición en concordancia con la invención, puede utilizarse como un suplemento nutracéutico o nutritivo, tal como por ejemplo, un suplemento nutracéutico o nutritivo para la mejora del estado de ánimo, para la mejora de las funciones cognitivas, tales como las consistentes en el aprendizaje, en la memoria, en la vigilancia, y en el estado de alerta, en personas mayores, pero así mismo,

también, en personas jóvenes, tales como las consistentes en estudiantes, los cuales se estén preparando para la realización de exámenes, y para personas la cuales jueguen, por ejemplo, en juegos de computadoras u ordenadores, o en juegos de internet. Tal y como se ha mencionado anteriormente, arriba, en este documento de solicitud de patente, para las mujeres en la etapa de premenopausia, y para las mujeres en la etapa de premenopausia, la lisozima y / o la composición en concordancia con la presente invención, son de una relevancia particular. La lisozima y / o la composición en concordancia con la presente invención, son así mismo, también, de una relevancia particular, para las personas deportivas; a saber, en ambos, los atletas profesionales con unos demandas de esquemas de entrenamiento, así como las personas las cuales ejercen unos deportes recreativos, tales como las personas las cuales juegan a golf o juegan al tenis. Esto significa el hecho consistente en que, la presente invención, se refiere al uso de los hidrolizados en concordancia con la invención, tal como se ha referenciado anteriormente, arriba, y como "mejorador de la condición", es decir, como medios para reducir la irritabilidad y la fatiga o el cansancio (de una forma eventual, reduciendo el riesgo de un sobreentrenamiento), con objeto de reducir o de prevenir o aliviar la fatiga física y mental, para favorecer un sueño no perturbado, es decir, para actuar contra el insomnio y los trastornos del sueño, y para mejorar el sueño, y para incrementar la energía, en términos más generales, de una forma especial, para incrementar la producción de energía cerebral, en individuos enfermos o en individuos sanos. De una forma adicional, para la mejora de la cognición en general, y de una forma especial, para el mantenimiento o para la mejora de la atención y de la concentración, para la mejora de la memoria, y de la capacidad para recordar, para mejorar la capacidad de aprendizaje, para mejorar el proceso del lenguaje, para mejorar la resolución de los problemas, y para mejorar el funcionamiento intelectual; para mejorar la memoria a corto plazo así como también la memoria largo plazo; para incrementar el estado de alerta mental; para mejorar la vigilancia mental; para reducir la fatiga mental; para soportar o estimular el bienestar cognitivo, para mantener el equilibrio de la función cognitiva. En el caso en el que así se requiera, para la obtención de preparaciones efectivas en cuanto a lo referente a su coste, con un alto factor de relación o cociente Trp /LNAA, los hidrolizados en concordancia con la presente invención, comprenden, de una forma adicional, triptófano libre.

25 Leyendas de las figuras

Figura 1.- El factor de relación molar o cociente Trp / LNAA, en el plasma, como función del tiempo, después del consumo de los productos los cuales se encuentran detallados en el Ejemplo 6. REF = hidrolizado de caseína, ALAC = alfa-lactoalbúmina intacta, TRP = triptófano libre, WEPS = hidrolizado de lisozima enriquecido con triptófano, SYN = dipéptido sintético Ser – Trp.

Figura 2.- Estado de ánimo negativo (según se mide mediante el test de ensayo del perfil de los estados de ánimo (POMS – [de sus siglas en idioma inglés, correspondientes a Profile of Mood States test] -), como función del tiempo, después del consumo de los productos, los cuales se encuentran detallados en el Ejemplo 6: REF = hidrolizado de caseína, ALAC = alfa-lactoalbúmina intacta, TRP = triptófano libre, WEPS = hidrolizado de lisozima enriquecido con triptófano, SYN = dipéptido sintético Ser – Trp.

Figura 3.- Distribución de tamaño de la fracción peptídica soluble en agua, de un hidrolizado de lisozima. Mediante la utilización de un procedimiento para la determinación de la distribución del peso molecular de los péptidos y de las proteínas, los cuales se encuentran presentes en los hidrolizados, de la forma la cual se encuentra detallada en la sección de Materiales y Métodos (procedimientos), de este documento de solicitud de patente, se procedió a analizar un hidrolizado de lisozima, preparado en concordancia con el procedimiento descrito en el Ejemplo 3. Las mediciones de la absorbancia, a 214 nm de longitud de onda, registran la presencia de eslabones o enlaces de péptidos. Las mediciones de la absorbancia, a 280 nm de longitud de onda, registran la presencia de cadenas aromáticas laterales de triptófano y de tirosina. Puesto que, el triptófano, tienen una absorptividad molar mucho más alta que la correspondiente a la tirosina, a esta longitud de onda, los valores pico, se referirán, principalmente, a los péptidos los cuales incorporan al triptófano.

Figura 4.- Diagrama de flujo del diseño del estudio, del experimento descrito en el Ejemplo 9. High (Alto) : voluntarios susceptibles al estrés; low (bajo): voluntarios resistentes al estrés; hydr.: hidrolizado de lisozima rico en Trp; placebo: hidrolizado de caseína.

Figura 5.- Diagrama de flujo de un estudio típico de un día, del experimento descrito en el Ejemplo 9. Drink (Bebida): consumo de una bebida, la cual contiene hidrolizado rico en Trp, o placebo; blood (sangre): muestreo de sangre, para la evaluación de los niveles de aminoácidos en el plasma; performance (rendimiento): tests de ensayo de rendimiento, antes y después del estrés incontrolable; stress (estrés): tasca (tarea) aritmética.

Figura 6.- Factores de relación o cocientes Trp / LNAA en el plasma ($\mu\text{mol} / \text{l}$), después de la ingestión del placebo (plc) o del hidrolizado de lisozima (Trp – hydr), del experimento el cual se encuentra descrito en el Ejemplo 9. Símbolos negros: sujetos susceptibles al estrés; símbolos abiertos: sujetos resistentes al estrés.

Figura 7.- Resultados del Test de Ensayo del Reloj, de Mackworh, los cuales se encuentran descritos en el Ejemplo 9. El número de respuestas correctas (eje vertical), después del consumo de placebo (plc: panel de la mano izquierda) o hidrolizado rico en Trp (Trp – Hydr: panel de la mano derecha), antes (Pre-stress – [Pre-estrés] -) o después (Post-stress – [Post-estrés] -) de la tasca (tarea) aritmética. Símbolos negros: sujetos susceptibles al estrés;

símbolos abiertos: sujetos resistentes al estrés. Puesto que se proporcionaron diferentes productos de intervención, en días separados, sólo se pueden llevar a cabo comparaciones relevantes entre las condiciones pre-estrés y las condiciones post-estrés, dentro del mismo tratamiento y del mismo día.

5
 Figura 8.- Resultados del Test de Ensayo o Tarea del seguimiento crítico, según se describe en el Ejemplo 9. Lambda CT (indicando el nivel final de complejidad la cual se alcanza por parte de los sujetos), se expresa después de la ingesta de placebo (plc) ó de hidrolizado rico en Trp (Trp-hydr). Símbolos negros: sujetos susceptibles al estrés; símbolos grises: sujetos resistentes al estrés.

10
 Figura 9.- SDS-PAGE de lisozima y de proteínas de suero láctico, incubados con pepsina, bajo unas condiciones de un valor pH ácido. (SDS-PAGE = Electroforesis en gel de poliamida con dodecilsulfato [de sus iniciales en idioma inglés, correspondientes a sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis] -).
 Pista 1: lisozima como tal; pista 2: lisozima, después de la digestión de pepsina; pista 3: proteína de suero láctico, como tal; pista 4: proteína de suero láctico, después de la digestión de pepsina; pista 5: pepsina, como tal.

15
 Figura 10.- Cinética de los factores de relación o cociente Trp / LNAA, después del consumo de un producto de lisozima hidrolizada (P2B = diamantes), lisozima intacta (Lys = cuadrados) y una mezcla de lisozima intacta e hidrolizada (Mezcla = triángulos). La totalidad de los tres tratamientos, tienen el mismo contenido de Trp. Es digno de atención, el hecho consistente en que, la totalidad de los tres productos, producen exactamente los mismos valores de “área bajo la curva”, indicando el hecho de que, el hidrolizado de lisozima, así como también la molécula de lisozima intacta, se digieren de una forma completa, y se incorpora al interior de la sangre.

20
Materiales y Métodos

25
Materiales

La estabilina, se obtuvo en el mercado, bajo el nombre comercial de “Protex 6L”, de procedencia de la firma de la firma Genencor (Leiden, The Netherlands -), la pepsina, se obtuvo de la firma Sigma y, la mezcla de tripsina / quimotripsina (PEM porcino), se obtuvo de la firma Novozymes (Bagsveerd, Dinamarca). La lisozima, se obtuvo bien ya sea como Delvozyme L (22% de materia seca) o bien ya sea como Delvozyme G granulado, de procedencia de la firma DSM Food Specialities (Delft, The Netherlands- [Holanda] -).

30
 El hidrolizado de caseína (“REF”) se obtuvo, esencialmente, de la forma descrita por parte de Edens et al (J Agric Food Chem, 53 (20) 7950 - 7957, 2005). El caseinato de sodio, se hidrolizó extensamente, con Protex 6, y después de haber procedido a hacer descender el valor pH, a un valor de 4,5, con una endoproteasa específica de prolina, para alcanzar un grado de hidrólisis DH > 20 %. Después de haber procedido al ultrafiltrado, se procedió a tratar el permeato mediante calor, con objeto de inactivar cualesquiera actividades enzimáticas restantes, y finalmente, éste se secó mediante secado (secado por espray). La alfa-lactoalbúmina intacta (“ALAC”), se obtuvo como “Biopure” (> 90 % de alfa-lactoalbúmina) de procedencia de la firma Davisco Foods International, Inc. (Le Seuer, MN); el hidrolizado de lisozima enriquecido con triptófano (“WEPS”), se obtuvo de la forma la cual se encuentra descrita en el Ejemplo 4. El dipéptido Ser-Trp sintético (SYN), se obtuvo de la forma la cual se encuentra descrita en el Ejemplo 5; el L-triptófano puro (“TRP”), se obtuvo como L-triptófano 400, de procedencia de la firma Orthica, Almera, The Netherlands – [Holanda] -).

40
Test de ensayo para la resistencia a la proteasa de los polipéptidos con contenido en triptófano, de una forma especial, de las proteínas intactas.

45
 Con objeto de someter a test de ensayo de digestibilidad en el estómago humano, se procedió a incubar una solución al 5% (peso / peso) de la proteína intacta, con pepsina (de procedencia de la firma Sigma; 1% con un factor de relación de un 1% (peso) de la pepsina, con respecto a la proteína intacta), durante un transcurso de tiempo de 2 horas, a una temperatura de 37 °C, en un tampón Mc Ilvane (0,2 M ácido cítrico más Na₂HPO₄) pH 4,0. El grado de resistencia a la proteasa, se define como el porcentaje de la proteína, la cual no se encuentra afectada mediante la incubación de la pepsina. “No afectado”, significa el hecho de que, el peso molecular de la proteína, no ha cambiado, como resultado de la incubación de la pepsina; “porcentaje de la proteína”, significa el área bajo la curva, después de los tiempos de digestión 100, dividido por el área bajo la curva, previamente a la digestión; “área bajo la curva”, es el área de la proteína, la cual tiene el peso molecular inicial, de la forma la cual se proporciona mediante el método de análisis cuantitativo utilizado (véase, más adelante). Los pesos moleculares, se comparan en concordancia con la técnica de SDS-PAGE (Electroforesis en gel de poliamida con dodecilsulfato [de sus iniciales en idioma inglés, correspondientes a sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis] -), seguido de un marcaje por tinción, en concordancia con el protocolo el cual se facilita más abajo, en este documento de solicitud de patente. Después de haber procedido a la tinción del gel, se procede a preparar una imagen digital, mediante la utilización de sistema de tratamiento de imágenes OptiGo (Isogen Life Science; www.isogen-life-science.com), seguido mediante el análisis cuantitativo, de las bandas seleccionadas de la proteína, mediante la utilización del sistema de software informático Totallab TL 100, versión 2006 (Nonlinear Dynamics Ltd; www.nonlinear.com), el cual se hace funcionar con el sistema informático Windows XP. Una proteína, es resistente a la proteasa, en

concordancia con el presente texto, si más de un porcentaje del 50 % de la proteína con el peso molecular original, se encuentra todavía presente, después de la incubación de la proteína.

5 SDS-PAGE

La pureza de las preparaciones de lisozima utilizadas, se verificaron mediante la técnica de SPD-PAGE. Todos los materiales utilizados para la realización de la técnica SPD-PAGE, y el tinte para el marcaje por tinción, se compraron en el mercado, de procedencia de la firma Invitrogen (Carlsbad, CA, Estados Unidos de América), las muestras, se prepararon mediante la utilización de un tampón SDS, en concordancia con las instrucciones del fabricante, y éstas se separaron en geles de Bis-Tris al 12%, mediante la utilización de un sistema tampón MES-SDS, en concordancia con las instrucciones del fabricante. La tinción, se llevó a cabo mediante la utilización de Simply Blue Safe Stain (Collodial Coomassie G250). Previamente a la hidrólisis, la lisozima, aparecía como una banda individual, con un peso molecular de aprox. 14 kDa, en el gel.

15

Análisis de LC / MS / MS

Para este análisis de LC/MS/MS (Espectrometría de masas y cromatografía líquida en tándem), se realizó una HPLC (espectrometría de masas de alto rendimiento) mediante la utilización de un espectrómetro de masas (de procedencia de la firma Thermo Electron, Breda, Países Bajos), acoplado a una bomba del tipo P4000 (de procedencia de la firma Thermo Electron, Breda, Países Bajos), con objeto de determinar la presencia de péptidos con contenido en triptófano (principalmente, di- y tri-péptidos), en hidrolizados proteínicos enzimáticos, producidos mediante el procedimiento de la presente invención. Se procedió a separar los péptidos formados, mediante la utilización de una columna de Inertsil 3, ODS 3, 3 µm, 150* 2,1 mm (de procedencia de la firma Varian Belgium, Bélgica), en combinación con un gradiente del 0,1 % de ácido fórmico, en agua Milli Q (Milli Q water, de la firma Millipore, Bedford, MA, EEUU de América; Solución A) y del 0,1 % en acetonitrilo (Solución B), para la elución. El gradiente, empezó a un porcentaje del 100 % de la solución, se mantuvo ahí durante un transcurso de tiempo de 10 minutos, incrementándose, de una forma lineal, a un porcentaje del 20 % de B, en un transcurso de tiempo de 25 minutos, y llevándose, inmediatamente, a las condiciones de partida, y se mantuvo en estas condiciones, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos, para la estabilización. El volumen de inyección utilizado era de 50 microlitros, el caudal de flujo, era de 200 microlitros por minuto, y la temperatura de la columna, se mantuvo a un valor de 55 °C. La concentración de proteína de la muestra inyectada, era de aprox. 50 microgramos / mililitro. La identificación de los péptidos de interés, se basa en el tiempo de retención, en la molécula protonada, y en la utilización de análisis de MS / MS, para los péptidos de interés. Mediante la utilización de una energía de colisión óptima, de un valor de aprox. un porcentaje del 30 %. La cuantificación de los péptidos con contenido en triptófano específicos, se realiza mediante la utilización de un procedimiento estándar externo. El tetrapéptido VVPP (M = 410,2), se utiliza para realizar el ajuste para la sensibilidad óptima, en el modo MS, y para la fragmentación óptima, en el modo MS / MS, formando una infusión constante de 5 µg / ml, dando ello como resultado un molécula protonada, en el modo MSO, y una energía de colisión óptima, de un valor de aprox. un porcentaje del 30 %, en el modo MS / MS, generando unas series de iones B y de iones Y.

40

Previamente al análisis de LC / MS / MS, se procedió a hidrolizar los hidrolizados de las proteínas, a la temperatura ambiente, a una velocidad angular de 1 300 r. p. m., durante un transcurso de tiempo de 10 minutos y, el sobrenadante, se diluyó a un valor un valor de relación de 1 : 100, con agua desmineralizada, se filtró a través de un equipo de filtrado de agua de la marca Millipore (MilliQ wáter – [agua Milli Q] -).

45

Análisis de aminoácidos

Se procedió a analizar los perfiles de aminoácidos en plasma, mediante HPLC, en concordancia con Eijk et al (J. Chromatogr. 1993: 620: 143 - 148), según se encuentra descrito en el Ejemplo 6 ó en el Ejemplo 11, los cuales se facilitan más abajo, a continuación.

50

Se procedió a llevar a cabo otro análisis de aminoácidos, en concordancia con el método de Pico Tag, de la forma especificada en el manual de operadores del Sistema de Análisis de Aminoácidos de Water (Mitford, Ma, USA). Para llevar a cabo este análisis, se procedió a secar las muestras y éstas de derivatizaron directamente, mediante la utilización de isotiocianato de fenilo. Los aminoácidos derivatizados los cuales se encontraban presentes, se cuantificaron, mediante la utilización de procedimientos de HPLC, de la forma la cual se describe. Puesto que, durante la hidrólisis ácida de los aminoácidos Trp y Cys, se destruyeron, se procedió a utilizar procedimientos especiales, con objeto de cuantificar estos dos aminoácidos. Co objeto de evitar la degradación del Cys, durante la hidrólisis, se procede, en primer lugar, a oxidar el ácido cistéico, mediante la utilización de peróxido de hidrógeno y, a continuación, se procede a su cuantificación. El análisis del triptófano, se basa en un procedimiento de Water, ligeramente modificado. En este procedimiento, se procede a secar un alícuoto de la solución peptídica, bajo la acción del vacío, y a continuación, se procede a su hidrolización, durante un transcurso de tiempo de 1 hora, a una temperatura de 150 °C, bajo atmósfera de nitrógeno, en ácido metanosulfónico 4 M, con un contenido del 0,2 % de triptamiina. El producto de reacción, se cuantifica directamente, mediante la utilización de HPLC; equipada con una columna C18, de Alltech Altima y una detección fluorescente.

65

Grado de hidrólisis

5 El grado de hidrólisis (DH), de la forma la cual se obtiene durante la incubación, con las diversas mezclas protolíticas, se gobernó y controló, mediante la utilización de un test de ensayo OPA, rápido (véase, a dicho efecto, Nielsen, P.M.; Petersen, D.; Dambmann, C, Improved method for determining food protein degree of hydrolysis, - Método mejorado para la determinación de grado de hidrólisis de proteínas alimenticias -, *Journal of Food Science* 2001, 66, 642-646).

10 Nitrógeno Kjeldahl

15 Se procedió el medir el Nitrógeno Kjeldahl Total, mediante el Análisis de inyección de Flujo. Mediante la utilización de un sistema de inyección de flujo, del tipo "FIASTAR 5000 Flow Injection System", equipado con un procedimiento de determinación del nitrógeno total, de Kjeldahl (TKN), del tipo "TKN Method Cassete 5000 - 040, una computadora (ordenador) Pentium con un sistema de software informático y un equipo de muestro automático del tipo "Tecator 5027 Autosampler", se procedió a cuantificar el amoníaco liberado por soluciones las cuales contenían proteínas, a una longitud de onda de 590 nm. Se procedió, a emplazar, en el tubo de digestión, una cantidad de muestra correspondiente en concordancia con el rango dinámico del procedimiento (0,5 - 20 mg N / l), conjuntamente con un ácido sulfúrico al 95 - 97 %, y un Kjeltab sometido al programa de digestión, de un transcurso de tiempo de 30 minutos, a una temperatura de 200 °C, seguido de un transcurso de tiempo de 90 minutos, a una temperatura de 360 °C. Después de la inyección, en el sistema FIASTAR 500, se procede a medir el pico de nitrógeno, a partir del cual se puede inferir la cantidad de proteína medida.

25 Distribución del peso molecular de los péptidos y de las proteínas, los cuales se encuentran presentes en los hidrolizados.

30 El análisis de la distribución del tamaño de los péptidos, de las proteasas tratadas con las muestras de proteínas, se llevó a cabo en un sistema de HPLC automatizado, equipado con una bomba de alta presión, con un dispositivo de inyección apto para inyectar muestras de 10 - 100 microlitros, y con un detector de UV, apto para gobernar y controlar el efluente de la columna, a una longitud de onda de 214 nm.

35 La columna la cual se utilizó para este análisis, era la consistente en una columna del tipo "Superdex Peptide HR 10 / 300 GL (Amesham), equilibrada con un sistema de HPLC, un tampón de 20 mM fosfato sódico / 250 mM cloruro sódico, a un valor pH de 7,0. Después de haber procedido a inyectar la muestra (de una forma típica, de un volumen de 50 microlitros), se procedió a eluir los diversos componentes de la columna, con tampón, en un transcurso de tiempo de 90 minutos, a un caudal de flujo de 0,5 ml / minuto. El sistema, se calibró mediante la utilización de una mezcla de citocromo C (Mw 13 500 Da), aprotinina (Mw 6 510 Da), y tretraglicina (MW 246 Da), como marcadores del peso molecular.

40 Los ejemplos, los cuales se facilitan abajo, a continuación, ilustran la invención, de una forma adicional

EJEMPLOSEjemplo 1

45 La lisozima de huevo de gallina, no se segmenta, mediante bien ya sea la pepsina o bien ya sea tripsina / quimotripsina

50 Con objeto de someter a ensayo su digestibilidad en el tracto gastrointestinal humano, se procedió a incubar la lisozima de huevo de gallina, in vitro, con pepsina, así como también, así mismo, con una mezcla de tripsina y de quimotripsina. Ambas incubaciones, se llevaron a cabo bajo unas condiciones del valor pH, la cuales se encuentran prevalentes en el estómago (pepsina) y en el duodeno (tripsina / quimotripsina). Con objeto de llevar a cabo este ensayo, se procedió a la incubación de una solución de lisozima al 5 % (peso / peso), con las enzimas (con un valor de relación de un 1 % (peso / peso), de la proteína enzima con respecto a la proteína lisozima), durante un transcurso de tiempo de 2 horas, a una temperatura de 37 °C. Con objeto de prevenir o evitar unos cambios mayores del valor pH, como resultado de experimentar una hidrólisis de la proteína, se procedió a llevar a cabo la incubación, en un tampón de Mc Ilvane (0,2 M ácido cítrico más N_2HPO_4). Los valores de DH (grado de hidrólisis), los cuales se obtuvieron, después de una hidrólisis de un transcurso de tiempo de dos horas, a una temperatura de 37 °C (véase la tabla 1), demuestra el hecho consistente en que, la molécula de lisozima, no puede degradarse, en unas condiciones las cuales imitaban las condiciones de digestión en el estómago, y en el duodeno y el yeyuno, debido al hecho de que, puede esperarse que, una proteólisis exitosa, puede conducir a un valor de DH de por lo menos un porcentaje del 10 %. Así, por lo tanto, los residuos de triptófano presentes en la molécula de la lisozima de huevo de gallina, intacta, no se liberará, en tracto intestinal, implicando ello el hecho consistente en que, las moléculas de triptófano las cuales se encuentran presentes en la lisozima de huevo de gallina, intacta, no puede contribuir a los niveles de triptófano en el plasma, poco después del consumo.

Tabla 1: Hidrólisis de la lisozima, mediante la pepsina y mediante una mezcla de tripsina / quimotripsina .

Enzima	Valor pH inicial	Valor 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

5 Ejemplo 2

La lisozima de huevo de gallina, se segmenta, de una forma eficiente, mediante la subtilisina, a unos elevados valores del pH.

10 Con objeto de someter a ensayo la susceptibilidad de la lisozima, a la hidrólisis enzimática, bajo unas condiciones de un valor pH no fisiológicas y de una condiciones enzimáticas, se procede a incubar una solución de lisozimas, en vitro, con una subtilisina microbiana, (EC 3. 4. 21. 62), bajo una condiciones de un valor pH alcalino. Con esta finalidad, se procedió a incubar una solución de lisozima, al 5 % (peso / peso), a un valor pH de 7,0, de 8,0 y de 9,0, con 12,5 microlitros de Protex 6L, por gramo de proteína lisozima presente. La incubación, se llevó a cabo durante 15 un transcurso de tiempo de 3 horas, a una temperatura de 60 °C, con un ajuste constante del valor pH, mediante la utilización de 1 M NaOH. Las incubaciones, proporcionaron unas soluciones ligeramente turbidas, sin ningunos precipitados los cuales fueran significativos. Después de haber procedido a la etapa de calentamiento, con objeto de inactivar la actividad de la subtilisina, se procedió a medir los valores de DH de varias incubaciones, en concordancia con el protocolo establecido en la sección de Materiales y Métodos. Como contraste a los resultados 20 obtenidos bajo unas condiciones fisiológicas (véase el Ejemplo 1), las condiciones alcalinas de incubación alcalina, mediante la utilización de subtilisina, dieron como resultado una hidrólisis completa de las lisozimas. La incubación a un valor pH de 7,0, dio como resultado un DH de 6,3, la incubación a un valor pH de 8,0, dio como resultado un DH de 11,2, y la incubación a un valor pH de 9,0, dio como resultado un DH de 16,4. Un análisis subsiguiente de SDS – PAGE de los productos de reacción, indicó el hecho consistente en que, la molécula de lisozima entera, se degradó, a saber, no sobrevivieron los fragmentos de un gran peso molecular, a la incubación con sutilisina. De una forma 25 adicional, el análisis de HPLC del hidrolizado, en una columna del tipo “Crownpak CR+ column” (Daicel) reveló el hecho consistente en que no tuvo lugar, una racemización significativa de los péptidos con contenido en triptófano, ni siquiera después de un calentamiento durante un prolongado transcurso de tiempo, a un valor pH de 9,0.

30 Ejemplo 3

Hidrolización de lisozima, mediante la utilización de Protex, e identidad de los péptidos formados.

35 Se procedió a ajustar una solución la cual contenía un porcentaje del 10 % (peso / peso) de lisozima pura, un valor de 8,2, mediante la utilización de NaOH, y ésta se calentó, a una temperatura de 52 °C. La hidrólisis, se inició mediante la adición de 25 microlitros de Protex / g, de la proteína presente. Mediante un régimen de agitación continua y manteniendo el pH constante a un valor de 8,2, se continuó con la hidrólisis, durante un transcurso de tiempo de 5,5 horas, para proporcionar una solución, de una aspecto casi claro, sin ningún precipitado que fuera visible. Después de haber procedido a llevar a cabo una etapa de calentamiento, con objeto de inactivar la actividad 40 del Protex, se procedió a extraer una muestra, con objeto de realizar el análisis de DH. El DH de la solución, resultó ser de un porcentaje de casi un 30 %. La solución tratada mediante calor, se sometió a proceso de ultrafiltración, sobre un filtro de 10 kDa, para proporcionar un líquido casi completamente claro. Este líquido claro, se utilizó para un análisis de LC / MS, para la distribución del peso molecular de los péptidos y para las proteínas las cuales se encontraran presentes, así como para la cromatografía de intercambio de iones.

45 Con objeto de conseguir una impresión sobre el peso molecular de los péptidos y de las proteínas las cuales se encuentren presentes, se procedió a someter el líquido claro, a una análisis del peso molecular, según se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos (véase la figura 3), indica, de una forma clara, el hecho de que, la mayoría de péptidos que incorporan a aminoácidos, con una cadena lateral aromática (a saber, triptófano, tirosina y fenilalanina), tienen un peso molecular el cual es inferior a los 500 kDa. En vista del alto peso 50 molecular de estos aminoácidos, la implicación, en la mayoría de estos pequeños péptidos es la consistente en, bien ya sea dipéptidos, o bien ya sea tripéptidos.

55 El análisis de LC / MS, se llevó a cabo en concordancia con el procedimiento el cual se encuentra descrito en la sección de Materiales y Métodos. Mediante la selección de estos péptidos, los cuales contienen un triptófano (“W”), pudieron detectarse los péptidos AW, GNW, WIR, NAW, WVA. VAW, AWR, SLGNW, y unas cantidades menores de

WW y de SRWW. El nivel de triptófano libre, en el hidrolizado, después de la incubación, se estableció para representar un porcentaje de menos de un % del total de triptófano presente (en la lisozima).

Puesto que, los di-péptidos y tripéptidos, se absorben rápida y fácilmente mediante los transportadores de péptidos en la pared del intestino, existe por lo tanto una pequeña duda, en cuanto al hecho consistente en que, los residuos de triptófano presentes en tales tipos de péptidos, se absorberán de una forma muy rápida, y conducirán a unos niveles incrementados de triptófano en el plasma, después de la ingesta oral del presente hidrolizado de lisozima.

Ejemplo 4

Incremento del contenido de triptófano en el hidrolizado.

La lisozima, incorpora una cantidad sorprendentemente alta de los residuos básicos de arginina y de lisina. De una forma adicional, la molécula de lisozima, incorpora un número significativo de los residuos ácidos de glutamato y de aspartato. Estos datos, se utilizaron con objeto de establecer una innovadora y elegante ruta de purificación, hacia los hidrolizados, la cual proporciona unos altos factores de relación o cocientes Trp / LNAA. Un requerimiento esencial para esta ruta o vía de purificación es, no obstante, el consistente en que, únicamente aparezca una cantidad muy pequeña de los residuos de triptófano, en los péptidos, los cuales contengan, así mismo, también, bien ya sea un residuo de arginina o de lisina, o bien ya sea un residuo de glutamato o de aspartato. Tal y como se muestra en el Ejemplo 3, la ruta específica de la hidrólisis la cual se utiliza aquí, en este ejemplo, proporciona únicamente pocos péptidos con contenido de triptófano, los cuales contienen un residuo de arginina, y ningún péptido que contenga un residuo de lisina, de glutamato o de aspartato. La teoría, predice el hecho consistente en que, a un valor pH de aprox. 3, puede obtenerse una diferencia máxima de carga entre los péptidos con un residuo o sin un residuo de glutamato o de aspartato. Puede lograrse una diferencia de carga máxima, entre los péptidos con un residuo de arginina o de lisina, a un valor pH de aprox. 5.

Con objeto de ilustrar la potencia selectiva de esta propuesta de procedimiento, se procedió a preparar un hidrolizado de lisozimas, en concordancia con el procedimiento el cual se encuentra especificado en el Ejemplo 3. A continuación, se procedió a ajustar el valor pH del hidrolizado, a un valor de pH de 3,1 mediante la utilización de ácido acético, y aprox. 0,5 gramos de proteína, se aplicaron sobre un volumen de 15 ml de un lecho de una columna de Sefarosa FF (Sephacrose FF, comercialmente disponible en el mercado, de procedencia de la firma Ge Healthcare, Digem, Bélgica), equilibrada con 20 mM de citrato sódico, a un valor pH de 3.1. Después de haber procedido a lavar la columna, con un volumen del tampón de citrato sódico, para retirar la mayoría de los péptidos los cuales incorporan un glutamato o un aspartato, el tampón de elución, se cambió a 20 mM de un tampón de citrato sódico, a un valor pH 5,1. Durante el proceso de lavado de la columna, con tres volúmenes de columna del último tampón, se eluyó una gran gama de péptidos con contenido en triptófano. En concordancia con el análisis de LC / MS, el dipéptido AW, se presentó en grandes cantidades, así como también los tripéptidos GNW, NAW, WVA, VAW, y una pequeña cantidad del pentapéptido SLGNW. El análisis de aminoácidos de las diversas fracciones de pH 5,1, mostraron el hecho consistente en que, el agrupamiento selectivo, proporcionaba una solución la cual tenía de un factor de relación o cociente molecular Trp / LNAA, correspondiente a un valor de 1,75, y un rendimiento productivo de triptófano, de por lo menos un porcentaje del 30 %. Un agrupamiento menos selectivo, proporcionó una solución con un factor de relación o cociente molecular Trp / LNAA, correspondiente a un valor de 0,4, y rendimiento productivo de triptófano, correspondiente a un porcentaje del 70 %. A continuación, se procedió a lavar la columna, con tres volúmenes de columna de 20 mM citrato sódico, a un valor pH de 7,1. En concordancia con los datos de LC / MS, esta etapa, eluyó los péptidos con contenido en arginina, WIR, AWIR y, de una forma sorprendente, el péptido WW. Un lavado final de la columna, con 1 M de NaOH, agua, 1 M de ácido acético, preparó la columna para una ejecución de una nueva serie.

Ejemplo 5

Síntesis química del dipéptido Ser – Trp.

Se procedió a sinterizar el péptido Ser-Trp, en concordancia con la tecnología estándar de los péptidos. En una primera etapa, se procedió a acoplar Z-Ser-OH, y TrpOMe, vía la metodología del anhídrido carbónico (véase, a dicho efecto, J. Am. Chem. Soc. 1967, 5012), para proporcionar el dipéptido protegido Ser-Trp-OMe. Con esta finalidad, se procedió a suspender Trp-OMe·HCl, en tetrahidrofurano (THF), y a continuación, se procedió a añadir N-metilmorfolina (NMM). Se procedió, a continuación, a agitar la mezcla, durante un transcurso de tiempo de una hora, y subsiguientemente, se procedió a añadir una solución de Z-Ser, en tetrahidrofurano / dimetilformamida (THD / DMF). A continuación, se procedió a añadir un segundo equivalente de NMN, y la mezcla, se enfrió a una temperatura de – 15°C. Subsiguientemente, se procedió a añadir cloroformiato de isobutilo, a una tasa tal, que, la temperatura interna, no excediera de un valor de – 15°C. A continuación, se procedió a agitar la mezcla, durante un transcurso de tiempo de 3 horas, y se dejó que la temperatura aumentara, a la temperatura ambiente, y el precipitado de NMM·HCl, se retiró mediante filtrado. El filtrado, se mantuvo a una temperatura de 4 °C, durante el transcurso de toda la noche, después de cuyo transcurso de tiempo, cualquier cantidad adicional de precipitado, se filtró, y el filtrado, se concentró, bajo la acción del vacío. Se procedió, a continuación, a purificar el residuo, mediante

cromatografía de columna (SiO₂, acetato de etilo / heptano). Las fracciones combinadas, se concentraron, éstas se lavaron con agua, para eliminar cualquier cantidad de DMF remanente, y se concentraron al vacío.

5 En una segunda etapa, se procedió a llevar a cabo la hidrólisis enzimática de Z-Sr-Trp-OMe, mediante la utilización de Alcalasa 2.5 L DX (véase, a dicho efecto, *Int. J. Peptide Res.*, 1990, 52), y una subsiguiente hidrogenólisis catalítica, proporcionando el péptido deseado, con un sólido de tonalidad de color blanquecina. Con esta finalidad, se procedió a disolver el Z-Ser-Trp-OMe, en tBuOH, y agua, y después, se procedió a añadir Alcalasa 2.5 L DX (comercialmente disponible en el mercado, de procedencia de la firma Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca). La mezcla, se agitó, hasta que (casi) la totalidad del material de partida, se hubo consumido. Se procedió, a continuación, a concentrar la mezcla, bajo la acción del vacío, y se recogió el residuo, en agua, de un valor pH de 7. Subsiguientemente, se procedió a extraer la mezcla acuosa, con acetato de etilo, con objeto de retirar cualquier material de partida remanente y, a continuación, se procedió a acidificar la fase acuosa. El producto deseado, a saber, X-Ser-Trp-OH, se aisló mediante extracción, con acetato de etilo; el extracto, se secó sobre sulfato de sodio, y éste se concentró, bajo la acción del vacío.

15 En una tercera etapa, se obtuvo el dipéptido Ser-Trp-OH. Con esta finalidad se procedió a disolver el Z-Ser-Trp-OH en MeOH y agua (a un valor de relación de 1 : 1). Se procedió, a continuación, a añadir Pd / C, y la mezcla, se agitó, bajo una atmósfera de hidrógeno de valor positivo (5 bar). Después de haberse completado la reacción, el catalizador, más la mayoría del producto, se retiró mediante filtrado, y el filtrado, se desechó. A continuación, se procedió a lavar el filtro, de una forma considerable (a fondo), con agua milli Q, y el filtrado, se concentró, bajo la acción del vacío, proporcionando el péptido Ser-Trp-OH, como un sólido de una tonalidad de color blanquecina. La purificación adicional, se llevó a cabo procediendo a agitar el producto, en una mezcla de acetona – agua, y el aislamiento del péptido, mediante filtrado. Esta operación, proporcionó un producto estable, para el consumo oral.

25 Ejemplo 6

Efectos de diferentes fuentes de triptófano en los factores de relación o cocientes de Trp / LNAA, en el plasma, y en el estado de ánimo, en voluntarios sanos.

30 La finalidad del presente estudio, era la consistente en investigar, en voluntarios sanos, los perfiles (de los factores de relación o cocientes) de Trp / LNAA en el plasma, y en el estado de ánimo, después del consumo de diferentes preparaciones con contenido en triptófano. Se procedió a someter a tests de ensayo, las siguientes preparaciones:

- 35 - alfa-lactoalbúmina intacta (véase la sección de Materiales y Métodos)
- caseinato hidrolizado (DH > 20 %; véase la sección de Materiales y Métodos)
- un hidrolizado de lisozima enriquecida con Trp, con un alto factor de relación o cociente Trp / LNAA (véase el Ejemplo 4)
- un dipéptido SW, sintético (Ejemplo 5)
- 40 - L-triptófano libre (véase la sección de Materiales y Métodos).

45 En el estudio, participaron diez y ocho estudiantes sanos (9 estudiantes varones (hombres) y 9 estudiantes femeninos (mujeres): con una edad comprendida entre 18 – 30 años). Los criterios de exclusión, para la participación, eran los consistentes en una enfermedad común, un historial con una enfermedad psiquiátrica o con una enfermedad médica, el uso de una medicación o de fármacos o drogas, el consumo de alcohol, (< 2 unidades / día), enfermedades metabólicas, hormonales o intestinales, y dietas o hábitos que desvían los hábitos de la comida (evaluados mediante cuestionarios sobre la salud y sobre el estilo de vida). Los sujetos los cuales participaron en el experimento, se encontraban en el rango normal del índice de masa corporal (BMI – [de sus siglas en idioma inglés, correspondientes a Body-Mass Index] -), correspondiente a un valor, expresado en Kg / m², comprendido dentro de unos márgenes de 20 – 25), y los sujetos femeninos (las mujeres), se adaptaron para la contracepción. Las mujeres, participaron durante su fase folicular media-tardía (días 4 – 10), mientras que, las mujeres las cuales que utilizaban contracepción, participaron cuando éstas habían utilizado efectivamente la píldora anticonceptiva. Los participantes, eran personas no fumadoras, y éstas no utilizaron ningún tipo de alcohol, ni antes del estudio ni durante el transcurso de éste. Todos los sujetos participantes en el experimento, firmaron el formulario de consentimiento y fueron informados sobre su contenido. Este estudio, se llevó a cabo en concordancia con los principios de la EC (Comisión Europea) de la buena práctica clínica (GCP - [de sus siglas en idioma inglés, correspondientes a Good Clinical Practice] -), adoptada por la 52^a Asamblea general de la WMA (Asociación Médica Mundial – [de sus siglas en idioma inglés, correspondientes a World Medical Association] -), Edimburgo, Escocia, Octubre del año 2000.

60 Los sujetos se instruyeron con objeto de ayunar durante el transcurso de toda la noche; únicamente se permitía la ingesta de agua o de té, sin azúcar. Durante las cinco sesiones experimentales de mañanas, los sujetos, visitaron el laboratorio, con objeto de efectuar un control de seguimiento de las concentraciones de Trp / LNAA en el plasma, y el estado del estado de ánimo, a continuación de la ingesta de una bebida con un contenido de diferentes concentraciones de Trp ó de LNAA. Se procedió a compensar (contrarrestar) el orden de presentación de las diversas bebidas, y los cuatro días experimentales, se separaron mediante por período de tiempo de una semana.

65 En cada mañana experimental, se proporcionaron 312 ml de bebidas, las cuales contenían diferentes concentraciones de triptófano (Trp) ó de LNAA (véase la Tabla 2). Todas las bebidas, contenían 0,10 g de

edulcorante (acetosulfamo), y éstas de filtraron con agua corriente, con objeto de alcanzar 312 ml. Un asistente de la investigación, ciego en cuanto a lo referente a las condiciones dietéticas, condujo la administración de las diferentes bebidas.

5 Tabla 2: Composición de proteínas / aminoácidos de las bebidas utilizadas

Fuente de proteínas	Hidrolizado de proteínas	Alfa-lac intacta	Lisozima mejorada con Trp	Ser - Trp	L-Trp libre
Código utilizado	REF	ALAC	WEPS	SYN	TRP
Gramos	20	15	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	∞	∞

Se procedió a recolectar muestras de sangre, por duplicado, antes de la ingestión, y 15, 30, 60, 90, 120, 180 y 210 minutos después de la ingestión, en tubos de Vacutainer de 5 ml de capacidad útil, los cuales contenían heparina sódica, y a continuación, éstos se centrifugaron, a una velocidad angular de 5000 r. p. m., durante un transcurso de tiempo de 5 minutos, a una temperatura de 4 °C. Los sobrenadantes resultantes, se mezclaron con ácido sulfasalícílico (4 mg / 100 microlitros), y éstos se almacenaron directamente a una temperatura de - 80 °C, hasta la realización del análisis. Se procedió a llevar a cabo el análisis de los aminoácidos en el plasma, mediante HPLC, utilizando, para ello, 2 -3 µm de una columna Bischof Spherisorb ODS II, de la forma descrita por parte de Eijk et al (J. Chromatogr. 1993:620: 143 – 148). Se procedió a calcular los factores de relación Trp / LNAA en el plasma, procediendo a dividir la concentración molar de triptófano en el plasma, por la suma de las concentraciones molares, en el plasma,, de los grandes aminoácidos neutros valina, isoleucina, leucina, tirosina, y fenilalanina. El análisis estadístico, tuvo lugar mediante mediciones repetitivas de análisis de varianza de multivariantes y de univariante (de una sola variante) (MANOVA y ANOVA), utilizando el Modelo Lineal General (GLM: SPSS 12,0, para Windows). Todas las estadísticas, se evaluaron a un nivel de significancia de P = 0,05.

Valores de Trp / LNAA en el plasma

Un primer análisis de varianza con mediciones repetitivas, con Condición y Tiempo, como factores intra-sujetos en el factor de relación Trp / LNAA en el plasma, reveló un efecto significativo principal de Tiempo y Condición, y una significativa interacción Condición x Tiempo. Los incrementos significativos más altos, en el factor de relación Trp / LNAA, en el plasma, se encontraron (véase la figura 1), después de proporcionar el SYN" (con un incremento de un porcentaje del 263 %, después de un transcurso de tiempo 60 minutos) y el "WEPS" (con un incremento de un porcentaje del 255 %, después de un transcurso de tiempo de 90 minutos). El incremento en Trp / LNAA, después de estos dos productos, fue significativamente más rápido, y más alto, que después de la ingesta de bien ya sea el "TRP" (con un incremento en un porcentaje de un 191 %, después de un transcurso de tiempo de 120 minutos), o de bien ya sea el "ALAC" (con un incremento en un porcentaje del 76 %, después de un transcurso de tiempo de 120 minutos). Después del consumo del "REF", hubo un significativo descenso en Trp / LNAA, iniciándose a los 60 minutos, y continuando hasta los 120 minutos (en un porcentaje de - 27 %).

El aumento en un porcentaje del 255 %, en Trp / LNAA, según se encuentra con el "WEPS", excede, de una forma considerable, los porcentajes del 50 – 70 %, tal y como se ha encontrado previamente, con la alfa-lactoalbúmina intacta (Markus et al, 2000; Booi et al., 2006), y todos los anteriormente reportados incrementos de 20 – 45 %, con otros productos alimenticios, tales como los hidratos de carbono (Markus, 2003). Mientras que, una variación de un porcentaje del 40 – 55 %, en Trp / LNAA en el plasma, según se cree, es suficiente como para cambiar los niveles de Trp y la síntesis de 5-HT, y la liberación en el cerebro (Markus et al., 2000), este aumento en porcentaje del 255 %, según se espera, provocará un aumento mucho más grande en el Trp y 5-HT disponibles en el cerebro, y así, por lo tanto, éste puede también dar como resultado una mayor liberación de 5-HT funcionalmente activo, en el cerebro.

Perfil de los estados de ánimo (POMS – [de sus siglas en idioma inglés, correspondientes a Profil of Mood States] -).

Se procedió a medir los cambios en el estado de ánimo de los diversos participantes, mediante la utilización de una versión de papel y lápiz, de la versión abreviada de Dutsch, del cuestionario sobre el Perfil de los Estados de ánimo (Profile of Mood States questionnaire, según Wald and Mellenbergh, Ned Tijdschr Psychol. 1990: 45: 86 – 90), como una escala de VAS (escala análoga visual – [VAS, de sus iniciales en idioma inglés, correspondientes a Visual Analog Scale] -), la cual abarca un rango comprendido dentro de unos márgenes que van desde una "fuerte discrepancia", hasta una "fuerte aceptación". El perfil de estado de ánimo (POMS), comprende cinco diferentes subescalas, para el estado de ánimo; comprendidos dentro de una gama, la cual va desde la furia o ira, la depresión la fatiga, y la tensión, los cuales se refieren a un estado de ánimo negativo, hasta el vigor, el cual concierne a un estado de ánimo positivo.

Mediciones repetitivas en análisis de variancia con Condición y Tiempo, como factores intra-sujetos, en las puntuaciones o calificaciones del estado de ánimo, revelaron un efecto significativo del Tiempo, y una significativa interacción de Condición x Tiempo; indicando el hecho consistente en que, los cambios en el estado de ánimo, a través del tiempo, difieren de una forma significativa, entre las condiciones. Se encontraron unas mejoras comparables del estado de ánimo, 60 minutos después de la ingesta de "WEPS", y "TRP", pero únicamente con WEPS, el estado de ánimo, aumentó de una forma adicional, hasta los 210 minutos después de la ingesta, si se comparara con el TRP. Como contraste de ello, no se encontraron ningunos cambios, después de la ingesta de "REF" y de "ALAC". La ausencia de un efecto sobre el estado de ánimo, después de la ingesta de la alfa-lactoalbúmina, es comparable con los estudios previos, los cuales muestran unos ligeros beneficios en el estado de ánimo, después de la ingesta de la alfa-lactoalbúmina, y únicamente en los sujetos vulnerables al estrés, bajo una exposición aguda al estrés (véase, a dicho efecto, Markus, 2003). Si bien el estado de ánimo parecía también mejorar, después de la ingesta de "SYN", este efecto, no era significativo, en la configuración de este experimento.

Estos presentes resultados, sugieren el hecho consistente en que, un gran incremento correspondiente a un porcentaje del 255 %, en el valor de Trp / LNAA en el plasma, puede ser suficiente para un estado de ánimo mejorado, en sujetos no vulnerables al estrés. En base a descubrimientos previos, se espera el hecho consistente en que, estos efectos beneficiosos del hidrolizado de lisozima mejorada con Trp, en el estado de ánimo, será incluso mayor, en sujetos vulnerables al estrés, bajo una condiciones de alto estrés mental (Markus, 2003). Contrariamente a nuestras expectativas, no existían unas mejoras significativas, en el estado de ánimo, después de la ingesta del dipéptido sintético. Estos inesperados resultados, pueden ser atribuibles a la presente configuración experimental, o a las diferencias en la biodisponibilidad del triptófano, procedente de estas diversas fuentes.

Tabla 3: Cambios en las concentraciones de aminoácidos ($\mu\text{mol} / \text{l}$), en el plasma, a través tiempo, después de la ingestión de hidrolizado de caseína ("REF"), alfa-lactoalbúmina ("ALAC") o hidrolizado de lisozima, mejorado con Trp ("WEPS").

		Tiempo (minutos)						
Aminoácido	Condición	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	0,06	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 4: Cambios en las concentraciones de aminoácidos ($\mu\text{mol} / \text{l}$) en el plasma, a través del tiempo, después de la ingestión de L-Trp libre ("TRP"), o del dipéptido sintético SW ("SYN")

5

		Tempo (minutos)						
Aminoácido	Condición	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

Ejemplo 7

Hidrólisis de lisozimas a gran escala

10

En los procedimientos de hidrólisis de lisozimas a gran escala, de una forma esencial, se siguió el procedimiento el cual se encuentra éste descrito en el Ejemplo 3, con únicamente algunas modificaciones menores. Se procedió a calentar una solución, la cual contenía un porcentaje del 7,3 % (peso / peso), de lisozima pura, a una temperatura de 65 °C, después de lo cual, se procedió a ajustar el pH, a un valor de 8,2, mediante la utilización de NaOH. La hidrólisis, se inició, mediante la adición de 25 microlitros de Protex 6 L / g de materia seca. Bajo un régimen de agitación continua y manteniendo el pH a un valor de 8,2, y la temperatura, a un valor de 53 °C, se continuó con la hidrólisis, durante un transcurso de tiempo de 2 horas. A continuación, se procedió a aumentar el pH a un valor de 9,0, y se continuó con el régimen de agitación, durante un transcurso de tiempo adicional de 3,5 horas, para proporcionar una solución con algún precipitado. Subsiguientemente, se procedió a bajar el pH de la solución, a un valor de 4,5 y, la solución, se enfrió, a una temperatura por debajo de los 4 °C. Con objeto de obtener un producto completamente calor, se procedió a filtrar el líquido, sobre un filtro de tipo Z 2000 (Pall), y a continuación, se eliminó el exceso de agua y de sal, vía filtración. A continuación, se procedió a someter el concentrado, a un tratamiento de UHT, durante un transcurso de tiempo de 7 segundos, a una temperatura de 120 °C, éste se evaporó y, finalmente, se secó mediante proyección pulverizada (spray), con objeto de obtener el hidrolizado de lisozima, en una forma seca. El producto de esta forma obtenido, tenía un factor de relación o cociente molar Trp / LNAA de aprox. 0,19.

15

20

25

Ejemplo 8

Preparación de una bebida la cual incorpora el hidrolizado de lisozima

30

La receta (fórmula) la cual se ilustra a continuación, ilustra la preparación de una bebida a base de fresas, exenta de grasa, con contenido de hidrolizado de lisozima. Para llevar a cabo la preparación de esta receta, se procedió a añadir, a 10 gramos de hidrolizado de lisozima en polvo (preparado en concordancia con el Ejemplo 7), 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 saborizante (aroma) de fresas (Buteressence, Zaadam, Países Bajos). Esta mezcla de materias en polvo, se disolvió rápida y fácilmente, en 1 litro de agua, para obtener una bebida lista para beberse, con un alto, con una alto factor de relación Trp / LNAA y Tyr / BCAA. Esta mezcla en polvo, es apropiada para, por ejemplo, el llenado de saquitos o bolsitas. Pueden producirse productos líquidos envasados, mediante la utilización de diversas tecnologías, las cuales son bien conocidas en el arte especializado de la técnica.

35

40

Ejemplo 9

Efectos del hidrolizado de lisozima en el comportamiento post-estrés, en voluntarios susceptibles al estrés, y en voluntarios sanos resistentes al estrés

45

La finalidad del presente estudio, era el consistente en comparar los efectos del hidrolizado de lisozima preparado en concordancia con el procedimiento el cual se encuentra descrito en el Ejemplo 7, con un placebo (hidrolizado de caseína; véase el Ejemplo 6), en término de los niveles de Trp / LNAA en el plasma, y sus consecuencias, en las tareas rendimiento post-estrés. Los tests de ensayo de rendimiento utilizados, se conocen como abordando los aspectos de la “vigilancia” y del “control motor de la observación” de los individuos.

En el presente estudio, participaron cuarenta individuos, de los cuales, veinte eran hombres, y veinte eran mujeres. En base a un cuestionario previo al estudio, la mitad de este grupo, se clasificó como siendo resistente al estrés y, la otra mitad, se clasificó como susceptible al estrés. Los criterios de inclusión, y los criterios de exclusión, para los individuos en cuestión, así como la conducción general del estudio, eran los mismos, según se encuentran éstos descritos en el Ejemplo 6. En la Figura 4, se proporciona un diagrama de flujo del diseño, y en la Figura 5, se proporciona un esquema de un estudio típico de un día.

En las mañanas experimentales, los sujetos, llegaron al estudio en ayunas. Una vez llegados, a éstos se les proporcionaba, bien ya sea una bebida la cual contenía el hidrolizado de lisozima, o bien el placebo, a saber, una bebida, la cual contenía el hidrolizado de caseína. La composición de la bebida de ensayo, y la bebida con el placebo, se encuentran descritas en la Tabla 5.

Tabla 5: Composición de las bebidas utilizadas

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

Noventa minutos después del consumo de las bebidas de 300 ml, se procedió a extraer una muestra de sangre, con objeto de valorar los factores de relación Trp / LNAA (véase, a dicho efecto, el Ejemplo 6). Subsiguientemente, se procedió a exponer bien ya sea el grupo de sujetos resistentes al estrés, o bien ya fuere el grupo de sujetos propensos al estrés, a tests de ensayo de rendimiento seguido de la exposición a un estrés. Este estrés, consistía en una tarea o tasca aritmética, la cual debía llevarse a cabo bajo una estimulación del ruido. Los sujetos se condujeron a la convicción de que, la presencia o ausencia del ruido, dependía de su rendimiento en el test de ensayo. En realidad, las tareas aritméticas, se habían manipulado de tal forma que, la totalidad de los sujetos, fallaban en cada intento. Esta configuración, se conoce como induciendo el estrés fisiológico, y ésta se percibe como siendo altamente incontrolable (véase, a dicho efecto, 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, - Respuesta cardiovascular y de la catecolamina al estrés experimental: efectos del esfuerzo mental y capacidad de control -. Psychoneuroendocrinology (Pisiconeuroendocrinología), 23, 1 – 17). Después de la tarea o tasca aritmética, se procedió a repetir el primer ensayo de rendimiento, con objeto de cuantificar el efecto del estrés en el rendimiento, bajo la influencia de los factores de relación Trp / LNAA en sangre, en la fuerza.

Los tests de ensayo de rendimiento, los cuales se llevaron a cabo, eran los consistentes en el “Mackworth Clock test” (Test de ensayo de reloj, de Mackworth (Mackworth, N (1948) The breakdown of vigilance during prolonged visual search, - La interrupción de la vigilancia, durante una prolongada inspección visual -. Quart J. Exp. Psych. 1 – 6 – 21), y el test consistente en “Critical Tracking Task (la Tarea del Seguimiento Crítico) (Jex HR et al., (1966) A "critical" tracking task for man-machine research related to the operator's effective delay time, - Una tarea de seguimiento “crítico”, para la investigación hombre – máquina, relacionada con el tiempo de retardo efectivo del operador -. Nasa Contract Rep NASA CR.:1 - 105).

El test de ensayo del reloj de Mackworth, se trata de un test de ensayo, el cual se usa de una forma extensa, para mejorar la “vigilancia”, el estado de alerta y la concentración, durante un período de tiempo sostenido. En la realización de este test de ensayo, los sujetos, se sientan delante de una pantalla de una computadora u ordenador, en la cual se exhibe una ordenación circular de 60 puntos, los cuales simulan las marcas de los segundos de un reloj. Los puntos en cuestión, se iluminan durante un breve transcurso de tiempo, en un movimiento de rotación en el sentido del reloj, a una tasa de uno por 500 ms. De una forma usual, el movimiento de rotación, avanza mediante un salto individual (un punto). Se les informó a los sujetos sobre el hecho de que, raramente, y a intervalos irregulares, la diana, avanza con un doble salto (dos puntos), saltándose uno de los puntos, en la secuencia normal. Este hecho provocaría el que, los sujetos, apretaran un botón, tan rápido como sea posible. En el test de ensayo de una duración de 45 minutos, se encontraban presentes un total de treinta ocasiones de este tipo. En cada período de tiempo sucesivo de 15 minutos, acontecían diez ocasiones, con unos intervalos de tiempo comprendido dentro de unos márgenes que iban desde los 8 segundos hasta los 7,2 minutos.

La tarea de seguimiento crítico, se utiliza como una tarea del rendimiento motor perceptual, el cual mide la capacidad para controlar una señal de error mostrada, en una tarea compensatoria de coordinación motor perceptual, de primer orden. Durante el transcurso de la realización de esta tarea, los sujetos, tienen que controlar un cursor inestable, sobre una pantalla del ordenador o computadora, mediante la utilización de un "joystick" (mando de videojuego) sensible. Los errores, aparecerán como desviaciones horizontales del cursor, a partir del punto medio, sobre una escala lineal horizontal. Los sujetos, tienen que intentar mantener el cursor inestable, en el centro del eje, para reducir las desviaciones, volviéndolas a cero, procediendo a marcar, de una continua, movimientos compensatorios del joystick o mando de videojuego. La frecuencia de las desviaciones del cursor, se incrementa como una función estocástica, lineal, del tiempo, y así, por lo tanto, se requiere, al sujeto, a realizar movimientos compensatorios, con una frecuencia progresivamente más alta. Así mismo, también, las respuestas compensatorias del sujeto, se incrementan, en cuanto a lo referente a la frecuencia, con una demora o desfase incrementante de la fase (se añade una respuesta al error, en lugar de substraerse del error) y, así por consiguiente, se pierde el control. La frecuencia mediante la cual los sujetos pierden el control, es la frecuencia crítica. El test de ensayo, se llevó a cabo un número de cinco veces; la frecuencia crítica media, se calculó sin la más baja y la más alta puntuación o calificación, como la variable dependiente de este test de ensayo.

Los factores de relación o cociente Trp / LNAA en el plasma, los cuales se determinaron 90 minutos después del consumo, de las bebidas, revelaron un significativo efecto ($P < 0,001$) en los cambios de factor de relación o cociente Trp / LNAA, en el plasma, a través de las condiciones experimentales, de la forma en las que éstas se aplican. La ingestión del hidrolizado de lisozima ("Trp - hydr"), incrementaba el valor de Trp / LNAA, en el plasma, a $0,25 \mu\text{mol} / \text{l}$. La ingestión del hidrolizado de caseína ("plc"), incrementaba el factor de relación o cociente Trp / LNAA, a un valor de $0,08 \mu\text{mol} / \text{l}$ (Figura 6). Los valores de cada uno de los aminoácidos relevantes, se proporcionan en la Tabla 6.

Tabla 6: Concentraciones de aminoácidos ($\mu\text{mol} / \text{l}$) a continuación de la ingestión del placebo ("plc") o del 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 proteína, el rendimiento de ambos grupos de individuos, sometidos al Test de Ensayo del Reloj de Mackworth, se encontraba deteriorado o disminuido, de una forma significativa, mediante la exposición al estrés. Sin embargo, no obstante, la ingestión del hidrolizado de lisozima rico en Trp, prevenía o evitaba tal tipo de rendimiento deteriorado o disminuido, en el grupo resistente al estrés. De una forma bastante sorprendente, el hidrolizado rico en Trp, no prevenía o evitaba tal tipo de rendimiento deteriorado o disminuido, en el grupo propenso al estrés. Los gráficos obtenidos, se encuentran gráficamente representados en la Figura 7.

En la Tarea de Seguimiento Crítico, el valor de λ_{CT} , indica el nivel final de complejidad el cual se ha alcanzado por parte de los sujetos. Cuanto mayor es el valor de λ_{CT} , mayor es el control. Los datos obtenidos en presente experimento, muestran el hecho consistente en que, después de la exposición al estrés, el valor de λ_{CT} , era significativamente más alto, cuando se había consumido el hidrolizado rico en Trp. Entre los individuos resistentes al estrés, pudo puntuarse una calificación correspondiente a un incremento porcentual del 16 %. Con elación al tratamiento con el placebo. Es también bastante sorprendente, así mismo, también, en este test de ensayo, el hecho consistente en que, los valores de λ_{CT} , en el grupo propenso al estrés, no mostraban unas diferencias significativas, entre el hidrolizado rico en Trp y el placebo.

Ejemplo 10

Resistencia a la proteasa de la lisozima y la alfa-lactoalbúmina

Conjuntamente con la beta-lactoalbúmina, la alfa-lactoalbúmina, forma el constituyente proteínico principal del suero láctico. Debido a su alto factor de relación o cociente Trp / LNAA, la fracciones aisladas de alfa-lactoalbúmina, así como los hidrolizados de alfa-lactoalbúmina, han ganado popularidad, para mejorar los niveles de triptófano en el plasma. A pesar del hecho consistente en que, ambas, la alfa-lactoalbúmina y la lisozima de huevo de gallina, tienen unos factores de relación o cocientes Trp / LNAA inusualmente altos, no obstante, en otros aspectos, estas dos moléculas, son bastante diferentes. En concordancia con la presente solicitud de patente, una molécula resistente a la pepsina, con un alto factor de relación o cociente Trp / LNAA, es esencial, para mantener unos altos factores de relación o cocientes Trp / LNAA en el plasma, a largo plazo. Aquí, en este documento de solicitud de patente, nosotros, los solicitantes, demostramos el hecho consistente en que, de una forma distinta a la lisozima de huevo de gallina, la alfa-lactoalbúmina, no es resistente a la pepsina. Este hecho, se ilustró en el experimento el cual se facilita a continuación. Con objeto de imitar las condiciones en el estómago humano, se procedió incubar soluciones al 5 % (peso / peso) de lisozima y de proteína de suero láctico (Bipro de la firma Davisco), con pepsina (pepsina de Sigma / lisozima de proteínas de suero láctico, a un factor de relación del 1%), durante un transcurso de tiempo de 2 horas, a

una temperatura de 37 °C, a un valor pH de 4, en un tampón de Mc Ilvane (0,2 M ácido cítrico más Na₂HPO₄). Después de haber procedido a la incubación de ambas soluciones, éstas se calentaron, durante un transcurso de tiempo de 5 minutos, a una temperatura de 80 °C, con objeto de terminar la reacción y, pequeñas muestras, se sometieron a SDS – PAGE (véase, a dicho efecto, la sección de Materiales y Métodos), para someter a test de ensayo, las diversas moléculas tratadas con pepsina.

La figura 9, ilustra claramente el hecho consistente en que, la cantidad de lisozima de huevo de gallina, no se disminuye de una forma significativa, mediante la incubación con pepsina, bajo unas condiciones de un valor pH ácido. De entre las proteínas de suero láctico consistentes en la beta-lactoglobulina y la alfa-lactoglobulina, la beta-lactoglobulina, permanece ampliamente intacta, pero la alfa-lactoalbúmina, se degrada de una forma casi completa. La implicación de este hecho, es el consistente en que, la lisozima, así como también la beta-lactoglobulina, son “resistentes a la proteasa”, en concordancia con el test de ensayo el cual se encuentra especificado en la sección de Materiales y Métodos, y en que, la alfa-lactoglobulina, no es “resistente a la proteasa”. Este descubrimiento, ilustra el hecho consistente en que, de una forma distinta a la lisozima, no se califica como una fuente apropiada de triptófano unido a un polipéptido. A pesar del hecho consistente en que, la beta-lactoglobulina, es bastante resistente a la degradación por la pepsina, la molécula, no presenta un donante apropiado de triptófano, debido a un bajo factor de relación o cociente Trp / LNAA (0,04).

Ejemplo 11

Prolongación de los altos niveles de Trp / LNAA, procediendo a combinar hidrolizados de lisozima, con la molécula intacta

Con objeto de demostrar la ventaja de una combinación de la composición de triptófano unido a un péptido, y de triptófano unido a un polipéptido, se procedió a llevar a cabo un estudio, el cual involucraba a 15 individuos sanos. Los criterios de exclusión, eran: las enfermedades crónicas y corrientes, a la discreción del investigador; un historial de trastornos o desórdenes psiquiátricos; el uso de inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina (SSRI – [de sus iniciales en idioma inglés, correspondientes a Selective serotonin reuptake inhibitors] -), el uso de suplementos los cuales tienen como diana el sistema nervioso central, tales como los consistentes en los suplementos los cuales contienen triptófano, efedrina, o la hierba de San Juan; la alergia a los huevos; el abuso de las drogas o de los fármacos; la participación en cualquier otro estudio el cual involucre a productos de investigación o a productos comercialmente disponibles en el mercado, de una forma concomitante o simultánea; la intolerancia a los edulcorantes artificiales; cualquier (historial de) enfermedad gastrointestinal, la cual pueda interferir con la función gastrointestinal, a la discreción del investigador; el uso de una medicación la cual tenga como objetivo el tracto gastrointestinal, tales como los antiácidos. Finalmente, en el caso de las mujeres, el embarazo o el uso de un método contraceptivo no médicamente aceptado, es así mismo, también, un criterio de exclusión. La totalidad de los sujetos los cuales participaban en el experimento, firmaron un formulario informativo de consentimiento.

Procedimiento

El estudio, se llevó a cabo en concordancia con un diseño cruzado, doble ciego, aleatorio, con un período de lavado o enjuague, entre la ingesta de diferentes tratamientos, correspondiente a una duración de por lo menos tres días.

Durante el transcurso de tres sesiones experimentales matinales, los sujetos, visitaron el laboratorio, con objeto de controlar sus concentraciones de Trp / LNAA, en el plasma, seguido de la ingesta de una bebida, la cual contenía bien ya sea 6 gramos de lisozima intacta, bien ya sea 6 gramos de hidrolizados de lisozima, o bien ya sea 6 gramos de un mezcla de hidrolizado y de producto intacto. Las bebidas en cuestión, se presentaron como productos estériles, en botellas, provistas de pajitas. La lisozima intacta, se obtuvo en el mercado, con la marca Delvozyme G. El hidrolizado, se preparó de la forma la cual se encuentra descrita en el Ejemplo 7, y la mezcla incorporaba unas cantidades correspondientes a un porcentaje 30 % molar de Trp, como hidrolizado, y de un porcentaje del 70 % molar de Trp, como lisozima intacta. La totalidad de las bebidas, contenían una cantidad de 6 gramos de proteína derivada de la lisozima, 0,10 g de edulcorante (acesulfamo), y éstas se llenaron con agua corriente, con objeto de alcanzar una cantidad total de 300 ml de bebida. Un asistente de investigación, ciego en cuanto a lo referente a las condiciones dietética, condujo la administración de las diferentes bebidas.

Los sujetos, visitaron el lugar, entre las 8 horas y las 9 horas de la mañana, habiendo ayunado durante un transcurso de tiempo de por lo menos 8 horas. Se procedió a insertar una cánula flexible para las extracciones de sangre, en su antebrazo no dominante. Después de haber procedido a la ingestión de una de las tres bebidas, se tomaron muestras de sangre, antes (t = 0) y a t = 15, 30, 60, 90, 120, 180, 210 y 240 minutos después de la ingestión, para medir los factores de relación o cocientes Trp / LNAA en el plasma. La ingesta de cualquier alimento, o de bebidas, diferentes del agua, estaba prohibida, durante el transcurso de estos 240 minutos.

Mediciones en el plasma

Se procedió a recolectar una cantidad de aprox. 5 ml de sangre, en un tubo de sangre con heparina-litio, procediendo a su agitación (manual), y poniéndolo inmediatamente en hielo. A continuación, se procedió a centrifugar la muestra, y 750 μ l de plasma, se mezclaron con 5-SSA (4 mg / 100 ml de plasma).

5 Estas soluciones, se centrifugaron, durante un transcurso de tiempo de 5 minutos, a una velocidad angular de 13.000 r. p. m, y se procedió a añadir, a 20 μ l de sobrenadante, 40 μ l de patrón estándar interno (160 mg de ácido alfa-amino-adípico, en 2 litros de 1,2 mM HCl). Se procedió, a continuación, a añadir 50 μ l de tampón borato (incluidos en un equipo a modo de kit del tipo Waters AccQ, Tag, con el n° de referencia 186003836), 40 μ l de 0,4 M NaOH, y 20 μ l de reactivo (incluidos en un equipo a modo de kit del tipo Waters AccQ, Tag, con el n° de referencia 186003836), y se procedió a su mezclado, procediendo a su calentamiento, durante un transcurso de tiempo de 10 minutos, a una temperatura de 55 °C. Subsiguientemente, se procedió a inyectar una cantidad de 1 μ l, en la columna, y a continuación, se procedió al análisis, de la forma descrita por parte de van Eijk et al (J. Chromatogr. 1993 : 620: 143 – 148).

15 Resultados

El factor de relación o cociente (ratio) Trp / LNAA, en el plasma, como variable en el tiempo, en los tres diferentes tratamientos, se encuentran representados en la Figura 10. La totalidad de estos tres tratamientos, produjeron un incremento en el factor de relación o cociente (ratio) Trp / LNAA. El más rápido (en un transcurso de tiempo de 15 minutos) y más pronunciado incremento, se obtuvo a continuación del consumo de hidrolizado de lisozima. La lisozima intacta, produjo un incremento mucho más lento del factor de relación o ratio (cociente) Trp / LNAA, pero, así mismo, también, el descenso del factor de relación o cociente (ratio) Trp / LNA, a través del tiempo, era mucho más lento. La mezcla de lisozima intacta e hidrolizada, produjo un resultado inmediato.

25 En un análisis de “mediciones repetidas”, la totalidad de los tres tratamientos, muestran un tratamiento significativo diferente, mediante la interacción del tiempo ($P < 0,001$), indicando el hecho consistente en que, la totalidad de las tres curvas, tienen unas formas significativas diferentes. Es muy significativo, el hecho consistente en que, la totalidad de los tres productos, producen, exactamente, los mismos valores de “área bajo la curva”, indicando ello el hecho de que, ambos, el hidrolizado de lisozima y la lisozima intacta, se han digerido y se han captado por la sangre y se han en ésta, de una forma completa.

30 Ejemplo 12

35 La combinación del hidrolizado de lisozima con la lisozima intacta, mejora el sabor del producto final

Después de haber procedido a mezclar el hidrolizado de lisozima con la molécula intacta, se notó un cambio considerable en la impresión del sabor del producto final. Se procedió a preparar concentraciones de hidrolizado y de molécula intacta, en 4 gramos / 200 ml de agua, con los siguientes factores de relación:

- 40 - 100 % de hidrolizado de lisozima
- 70 % de hidrolizado de lisozima – 30 % de Lisozima
- 50 % de hidrolizado de lisozima – 50 % de Lisozima
- 30 % de hidrolizado de lisozima – 70 % de Lisozima

45 En la totalidad de estas tres combinaciones, las concentraciones molares finales, eran exactamente las mismas. El hidrolizado, se preparó de la forma la cual se encuentra descrita en el Ejemplo 7, y para la lisozima intacta, se utilizó el producto granulado Delvozime G.

50 Mientras que, el sabor del hidrolizado, como tal, es ligeramente amargo, la adición del producto no hidrolizado, enmascaraba esta nota amarga, y la compensaba, con la impresión de un persistente y duradero ligero sabor dulce. Un jurado para el test de ensayo, expertos en cuanto a la definición de sabores, y experimentado, prefería las mezclas de hidrolizado / lisozima intacta, con respecto al hidrolizado puro.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un procedimiento para producir una composición que contiene triptófano, la cual comprende el proceder a reunir:
- 5 - una composición de triptófano unido a un péptido, la cual, de una forma preferible, es soluble en agua, y la cual tiene un factor de relación Trp / LNAA, correspondiente a un valor de más de 0,1, de una forma preferible, de más de 0,15 y / o triptófano libre; y
- 10 - una composición de triptófano unido a un polipéptido, la cual, de una forma preferible, es soluble en agua, y la cual tiene un factor de relación Trp / LNAA, correspondiente a un valor de más de 0,15.
- 2.- Un procedimiento, según la reivindicación 1, en donde, el péptido que contiene triptófano, se obtiene procediendo a hidrolizar lisozima o alfa-lactoalbúmina, de una forma preferible, lisozima, de forma preferible, lisozima de huevo de gallina, con objeto de preparar un hidrolizado, el cual tenga un DH (grado de hidrólisis) correspondiente a un valor situado entre 5 y 45, y de una forma opcional, fraccionando, enriqueciendo o purificando el hidrolizado.
- 15 3.- Un procedimiento, según la reivindicación 1 ó 2, en donde, la composición, comprende AW (como dipéptido) o GNW (como tripéptido), de una forma preferible, AW y GNW.
- 20 4.- Un procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde, el triptófano unido a un polipéptido, es lisozima.
- 5.- Una composición, la cual comprende triptófano, en donde, un porcentaje del 10 al 90%, de una forma preferible, un porcentaje del 20 al 80% del triptófano, se encuentra presente como triptófano unido a un péptido, y / o triptófano libre, y un porcentaje del 10 al 90 %, de una forma preferible, del 20 al 80 % del triptófano, se encuentra presente como triptófano unido a un polipéptido.
- 25 6.- Una composición según la reivindicación 5, en donde, un porcentaje de más de un 30 % molar, de una forma preferible, un porcentaje de más de un 40 % molar, de una forma más preferible, un porcentaje de más de un 50 % molar, de una forma incluso más preferible, un porcentaje de más de un 60 % molar, de una forma todavía más preferible, un porcentaje de más de un 70 % molar, y de una forma mayormente preferible, un porcentaje de más de un 80 % molar, del triptófano unido a un péptido, se encuentra presente en forma de di- ó tripéptido.
- 30 7.- Una composición según la reivindicación 5 ó 6, en donde, un porcentaje de más de un 30 % molar, de una forma preferible, un porcentaje de más de un 40 % molar, de una forma más preferible, un porcentaje de más de un 50 % molar, de una forma incluso más preferible, un porcentaje de más de un 60 % molar, de una forma todavía más preferible, un porcentaje de más de un 70 % molar, y de una forma mayormente preferible, un porcentaje de más de un 80 % molar, del triptófano unido a un polipéptido, se encuentra presente en forma de proteína intacta, la cual, de una forma preferible, es lisozima.
- 35 8.- Una composición, según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, la cual comprende por lo menos un péptido el cual contiene triptófano, el cual, de una forma preferible, es soluble en agua, o en donde, la fracción de triptófano unido a un péptido, la cual, de una forma preferible, es soluble en agua, tiene un factor de relación o ratio (cociente) Trp / LNA, correspondiente a un valor de por lo menos 0,10, de una forma preferible, de por lo menos 0,15, y de una forma preferible, de un valor situado entre 0,15 y 1,8.
- 40 9.- Una composición, según una cualquiera de la reivindicaciones 5 a 8, la comprende AW (como dipéptido) o GNW (como tripéptido), de una forma preferible, AW y GNW.
- 45 10.- Una composición, según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, la cual comprende por lo menos un péptido que contiene triptófano, de forma preferible, por lo menos dos diferentes péptidos que contienen triptófano, seleccionado(s) de entre di- ó tripéptidos, en donde, el (los) péptido(s) que contiene(n) triptófano, seleccionado(s) de entre di- ó tripéptidos, se encuentra(n) presente(s) (cada uno de ellos), en una cantidad correspondiente a por lo menos un porcentaje del 5 % molar, de la cantidad total de di- y tripéptidos.
- 50 11.- Una composición, según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, la cual comprende la fracción soluble en agua de un hidrolizado de lisozima, de una forma preferible, un hidrolizado de huevo de gallina.
- 55 12.- Una composición, según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, la cual es susceptible de poderse obtener mediante el procedimiento de la reivindicación 1 ó 2.
- 60 13.- Una composición, según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12 ó lisozima, para su uso como un nutracéutico, de una forma preferible, un medicamento, o el uso de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, ó lisozima como nutracéutico, de una forma preferible, un medicamento, o el uso de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, ó lisozima, en la preparación de un nutracéutico, de una forma preferible, un medicamento, de una forma preferible, en donde, el nutracéutico, de una forma preferible, un medicamento, se usa para prevenir o tratar la mejora del estado de ánimo, la cognición, el apetito, el
- 65

estado de alerta, la vigilancia, el inicio y la calidad del sueño, los efectos ansiolíticos, la depresión, el control de la reacción afectiva, el apetito o el comportamiento sexual, o éste se utiliza como un ingrediente, en la preparación de un producto alimenticio, o de un suplemento alimenticio o dietético.

- 5 14.- Uso de una composición, según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, ó lisozima, para incrementar el factor de relación o ratio (cociente) Trp / LNAA en el plasma, durante un transcurso de tiempo comprendido entre los 15 minutos y los 240 minutos, de un forma preferible, comprendido entre los 30 minutos y los 240 minutos, en comparación con el factor de relación o ratio Trp / LNAA, inmediatamente antes de la ingesta de la composición en concordancia con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, ó lisozima, o sin la ingesta de la composición en
- 10 concordancia con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, o lisozima.

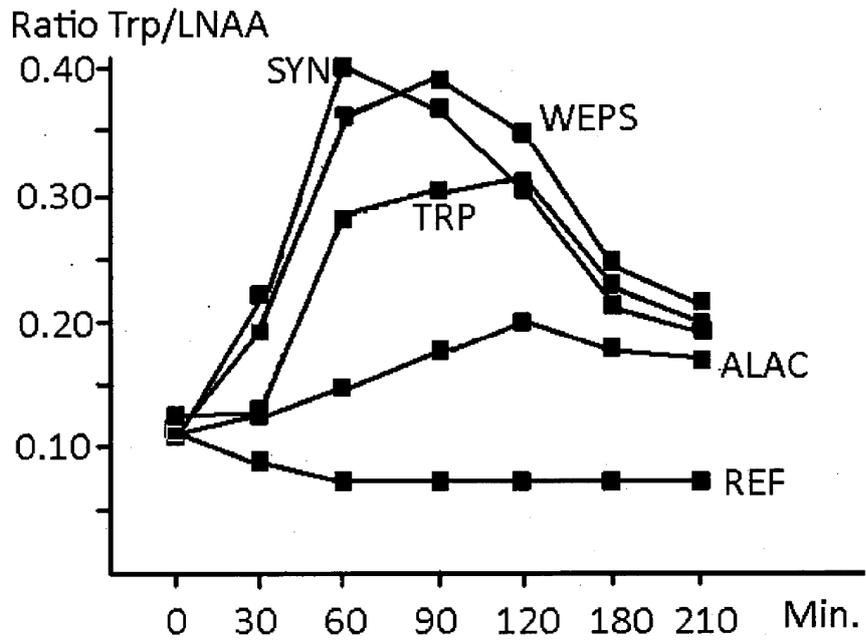


Figura 1

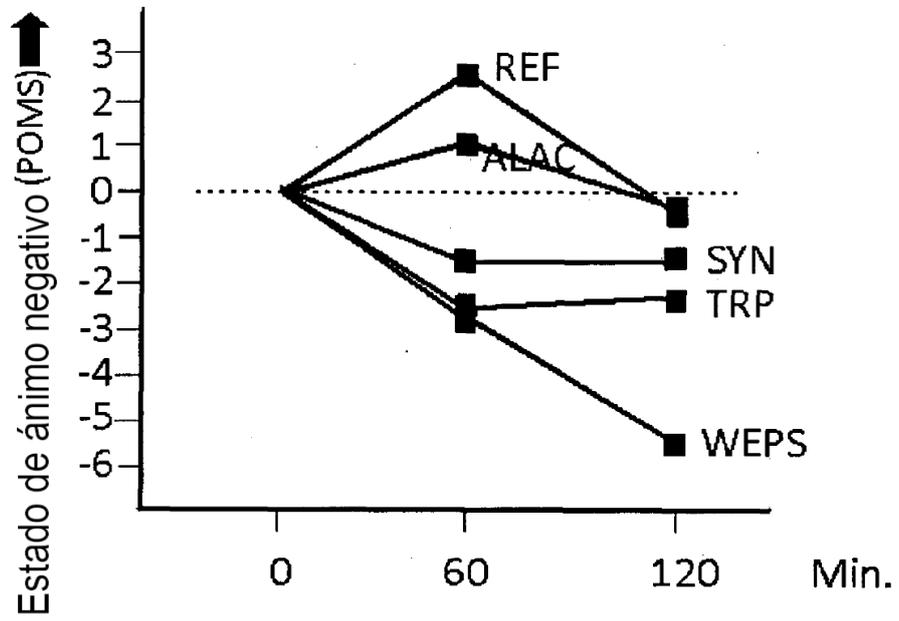


Figura 2

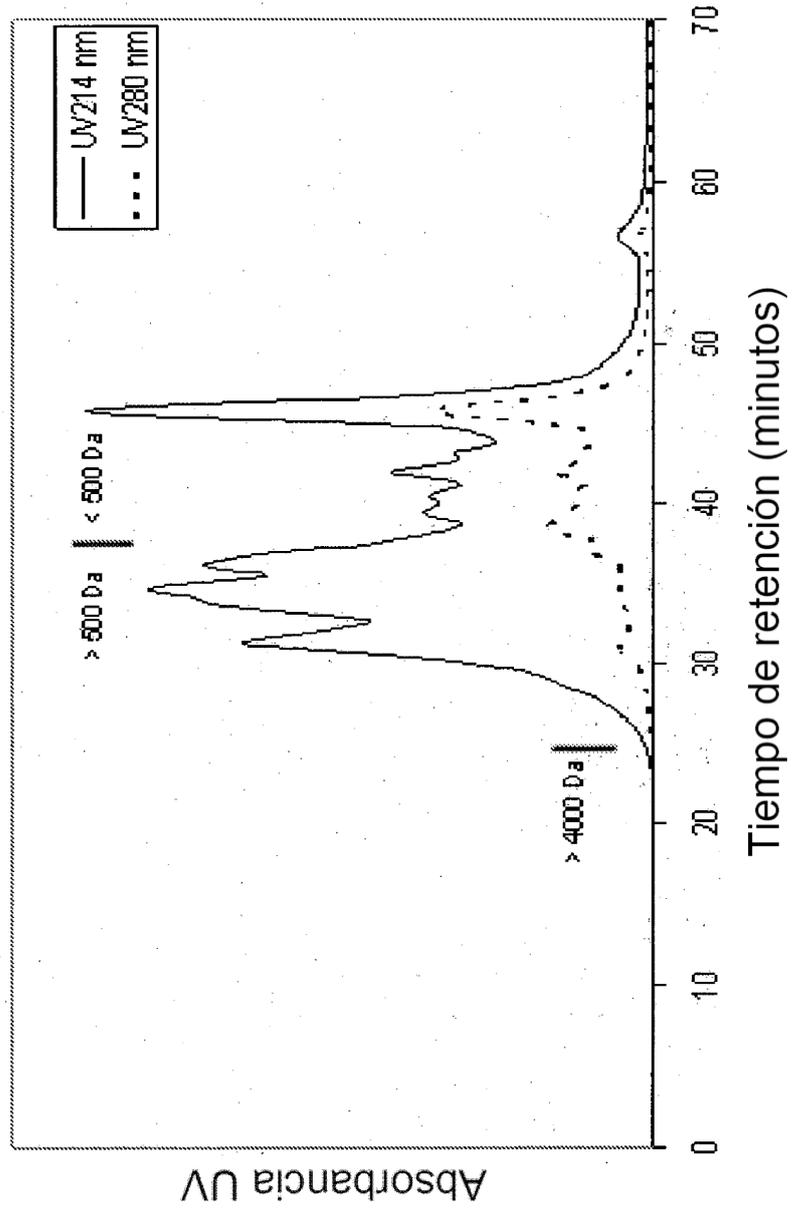


Figura 3

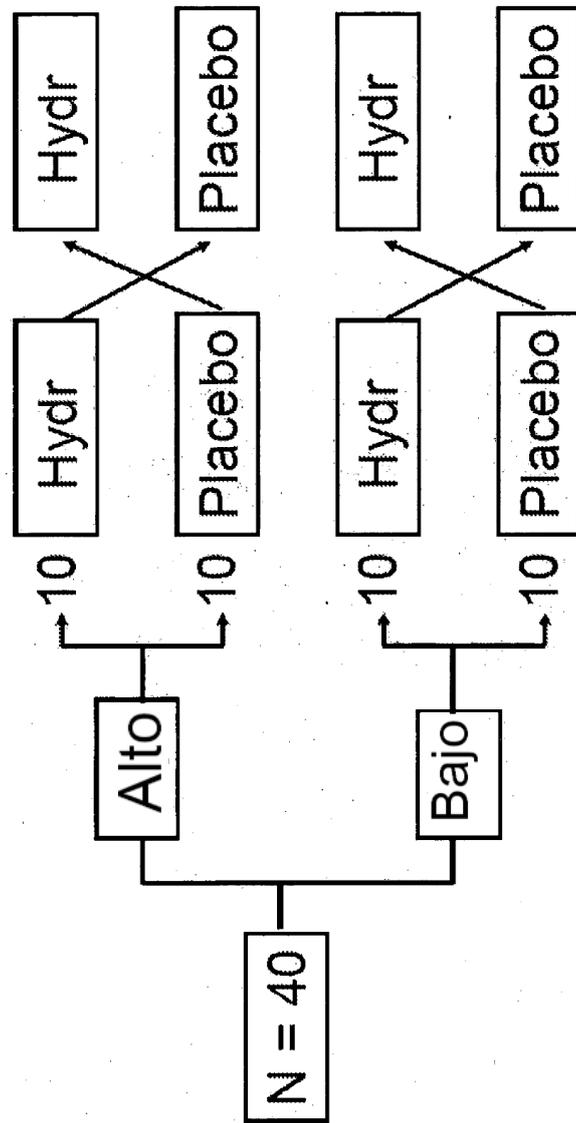


Figura 4

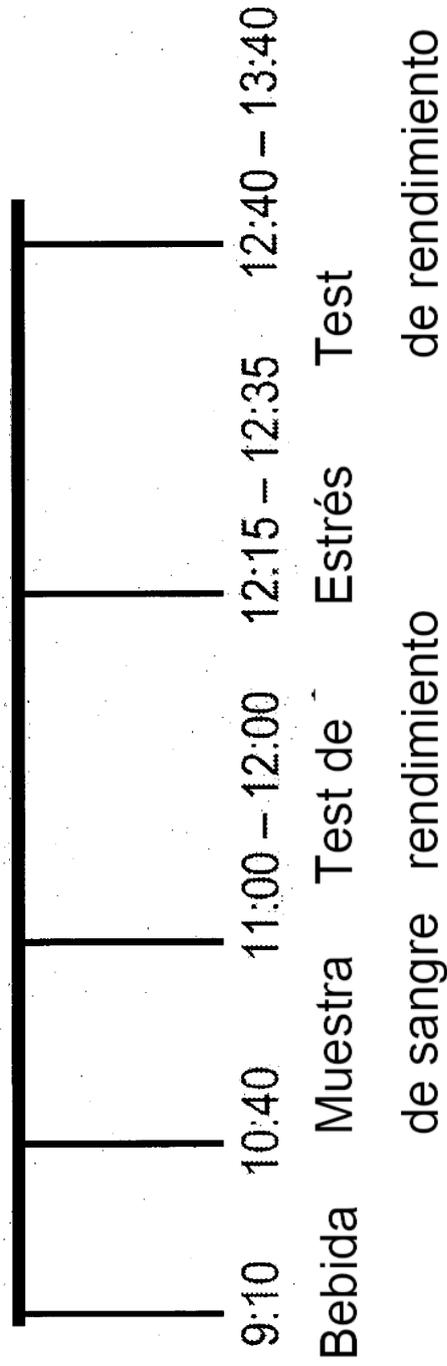


Figura 5

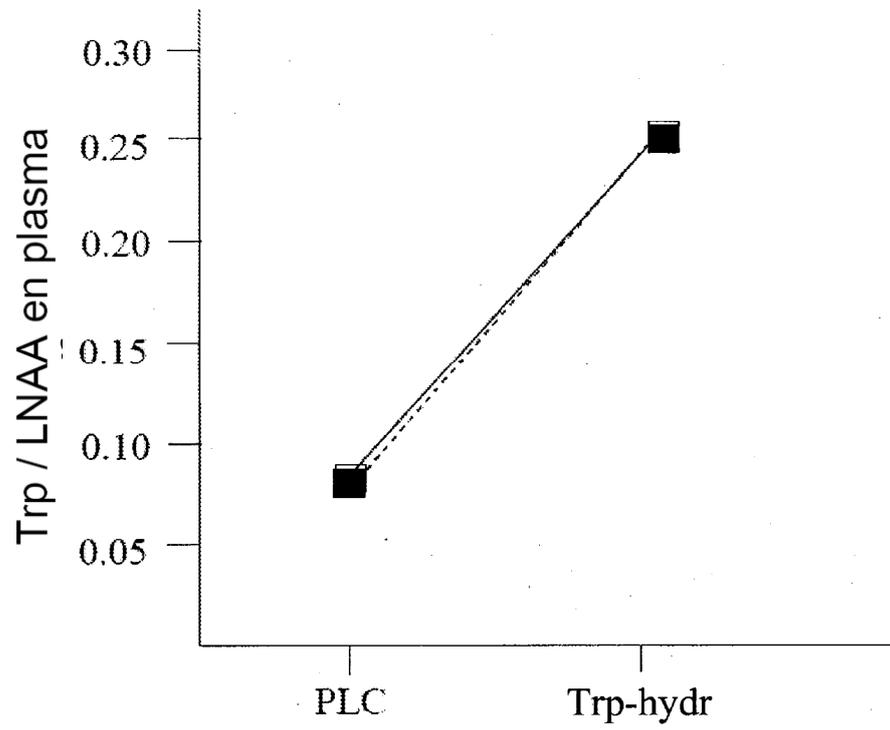


Figura 6

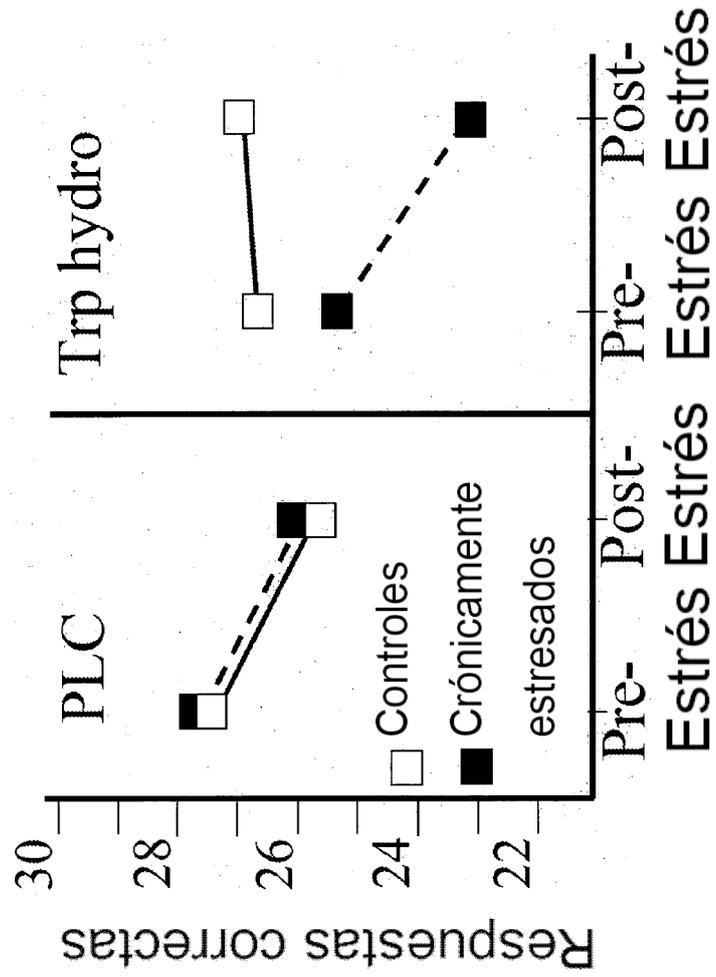


Figura 7

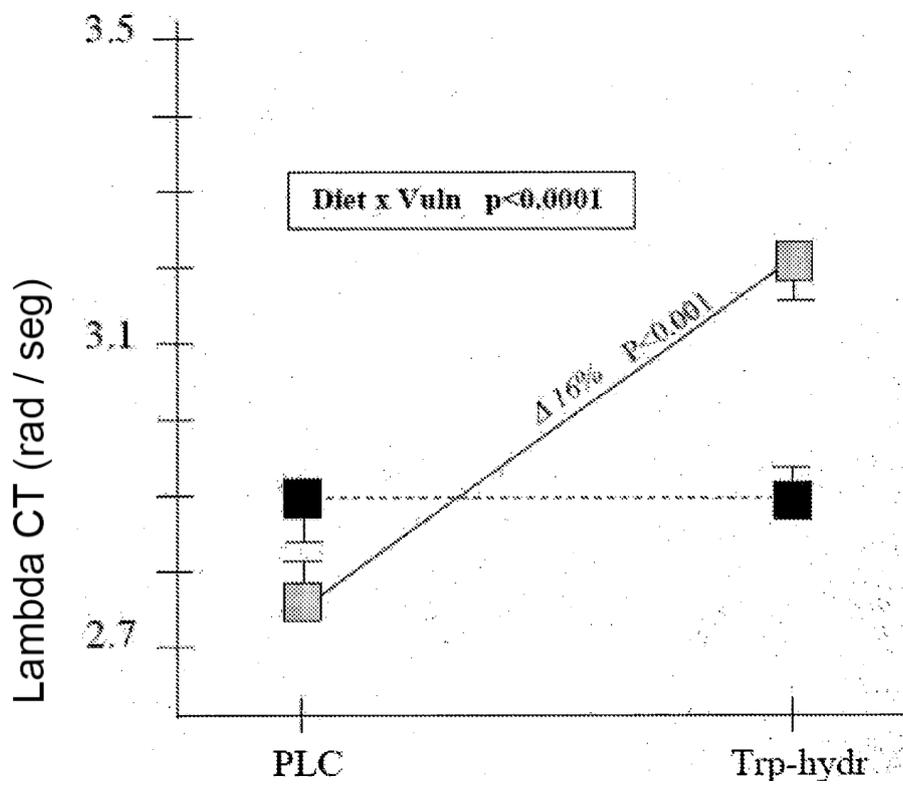


Figura 8

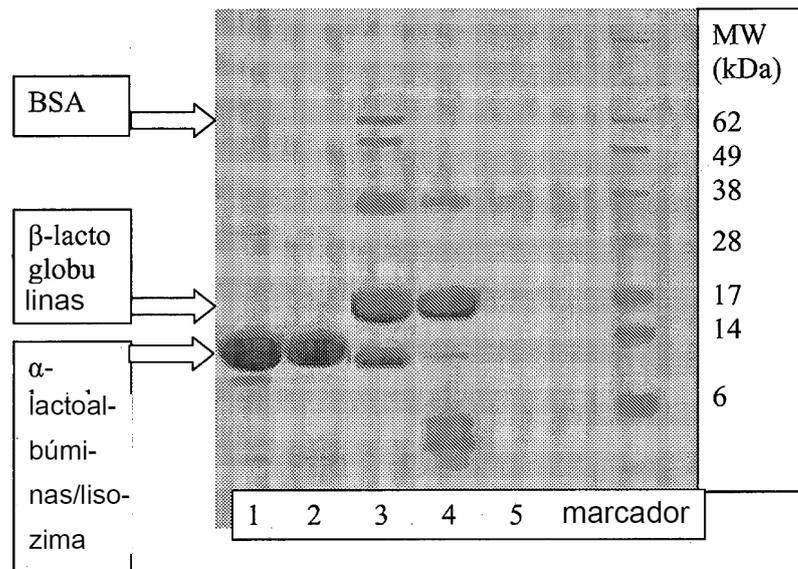


Figura 9

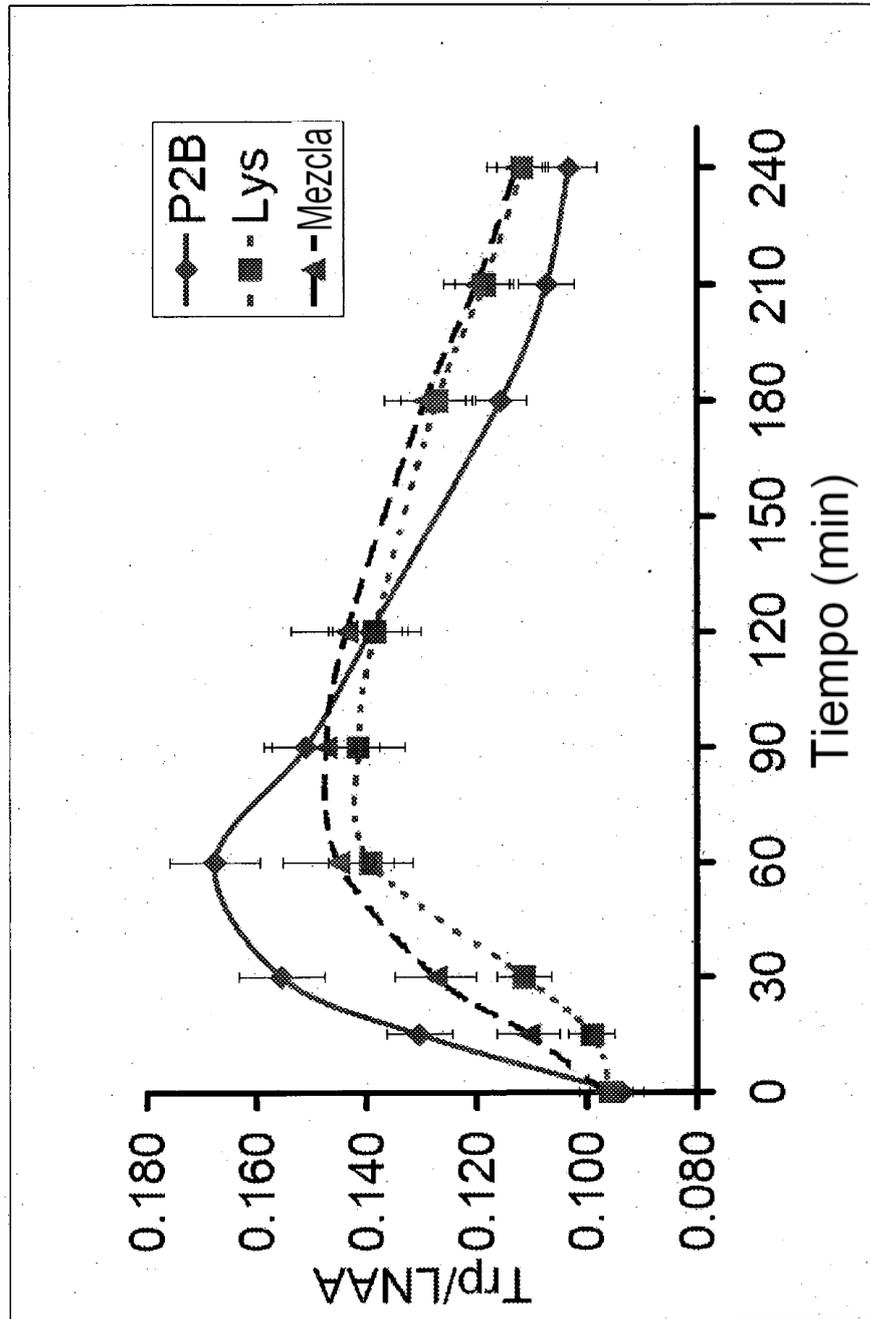


Figura 10