

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 859**

51 Int. Cl.:

C12P 21/02 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

A23J 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.02.2006 PCT/EP2006/060198**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.08.2006 WO06089921**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.02.2006 E 06708461 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 1851323**

54 Título: **Proceso enzimático para producir I-P-P a partir de caseína kappa**

30 Prioridad:

24.02.2005 EP 05101417

01.11.2005 EP 05110236

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.02.2017

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)

Het Overloon 1

6411 TE Heerlen , NL

72 Inventor/es:

**ROOS, DE, ANDRE LEONARDUS;
BROECKE, VAN DEN, PIETER MARINUS y
EDENS, LUPPO**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 599 859 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

Proceso enzimático para producir I-P-P a partir de caseína kappa

5 Ámbito de la presente invención

La presente invención se refiere a la producción enzimática de IPP a partir de glicomacropéptido de caseína kappa.

10 Antecedentes de la presente invención

10 La hipertensión es una enfermedad bastante común en las personas y tiene prevalencia como factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares, fallo renal y apoplejía. La disponibilidad de una larga serie de fármacos tales como bloqueadores de calcio, bloqueadores beta, diuréticos, bloqueadores alfa, antagonistas alfa centrales, antagonistas de angiotensina II e inhibidores de ECA ilustra que los mecanismos fisiológicos subyacentes a la hipertensión tienen múltiples aspectos.

15 Uno de los mecanismos fisiológicos de la hipertensión, en concreto el sistema renina- angiotensina, ha recibido mucha atención científica. En este mecanismo la angiotensina es secretada por el hígado y partida por la peptidasa renina para dar el decapeptido angiotensina I biológicamente inactivo. Cuando la angiotensina I pasa a través de los capilares pulmonares, otra peptidasa llamada enzima convertidor de angiotensina (en lo sucesivo citado como ECA) actúa sobre la angiotensina I eliminando los dos últimos residuos de angiotensina (His-Leu) para dar el octapéptido angiotensina II. El octapéptido angiotensina II tiene una gran actividad vasoconstrictora y por lo tanto aumenta la presión sanguínea. Como la inhibición del ECA rebaja los niveles de angiotensina II, evita la vasoconstricción y por consiguiente las presiones sanguíneas elevadas.

20 Además de escindir la angiotensina I, el ECA también puede hidrolizar la bradiquinina – un nonapéptido que interviene asimismo en la regulación de la presión sanguínea. En este último mecanismo la inhibición del ECA da lugar a mayores niveles de bradiquinina, que pueden promover la vasodilatación y también una presión sanguínea más baja. Así pues, la inhibición del ECA tiene efectos reductores de la presión sanguínea mediante al menos dos mecanismos independientes.

25 También es sabido que el octapéptido angiotensina II estimula la liberación de aldosterona por el córtex adrenal. El órgano diana de la aldosterona es el riñón, donde la aldosterona promueve un aumento de la reabsorción del sodio de los túbulos renales. La inhibición del ECA también disminuye la presión sanguínea por este tercer mecanismo, pero este caso reduciendo la reabsorción de sodio.

30 Gracias a sus múltiples efectos fisiológicos la inhibición de la actividad proteolítica del ECA es un modo efectivo de rebajar la presión sanguínea. Esta observación ha dado origen a una serie de productos farmacéuticos eficaces para reducir la presión sanguínea, tales como el captopril y el enalapril (Ondetti, M.A. y otros, 1977, Science, Washington DC, 196, 441-444).

35 Como la hipertensión es una enfermedad bastante común, sería conveniente contrarrestar este resultado indeseable del estilo de vida moderno con ingredientes naturales ligeramente activos que, sobre todo, pudieran incorporarse a productos alimenticios o bebidas de consumo regular. Como alternativa estos ingredientes naturales ligeramente activos se podrían incorporar a suplementos dietéticos. En las últimas décadas se ha averiguado que en la leche fermentada hay unos péptidos específicos capaces de inhibir el ECA e inducir descensos de presión sanguínea en sujetos hipertensos. Hoy en día numerosos ensayos in vitro y algunos experimentos con animales han demostrado los efectos inhibidores del ECA de distintos péptidos obtenidos de diversas fuentes proteicas. Aunque los ensayos in vitro de inhibición del ECA han revelado muchas secuencias peptídicas diferentes, debe hacerse hincapié en que los péptidos inhibidores del ECA tienen que circular por la sangre para poder ejercer un efecto in vivo. De ahí se deduce que, para ser inhibidores eficaces del ECA, los péptidos deben resistir la degradación por el sistema de digestión proteolítica gastrointestinal y permanecer intactos durante el subsiguiente transporte sobre la pared intestinal.

40 Un estudio de estructura-función de los diversos péptidos inhibidores del ECA ha sugerido que a menudo poseen una secuencia Pro-Pro, Ala-Pro o Ala-Hyp en su C terminal (Maruyama, S. y Suzuki, H., 1982; Agric Biol Chem., 46(5): 1393-1394). Este hallazgo se explica parcialmente por el hecho de que el ECA es una peptidil dipeptidasa (EC3.4.15.1) incapaz de partir enlaces peptídicos que incluyen prolina. Así, de los tripéptidos que tienen la estructura Xaa-Pro-Pro no se puede eliminar el dipéptido Pro-Pro, porque el enlace Xaa-Pro no puede escindirse. Por tanto es concebible que si están presentes en concentraciones relativamente altas, los tripéptidos que tienen la estructura Xaa-Pro-Pro inhibirán la actividad del ECA. Como no solo el ECA, sino casi todos los enzimas proteolíticos tienen dificultades para partir los enlaces Xaa-Pro o Pro-Pro, la idea de que la presencia de (múltiples) residuos de prolina en el extremo carboxiterminal de los péptidos produce moléculas relativamente resistentes a las proteasas es casi obvia. De modo similar, los péptidos que contienen hidroxiprolina (Hyp) en lugar de prolina son bastante resistentes a las proteasas. A partir de ahí se puede inferir que los péptidos que llevan uno o más residuos de (hidroxi)prolina en su extremo carboxiterminal tienen posibilidad de escapar a la degradación proteolítica en el tracto gastrointestinal. Estas conclusiones nos ayudarán a entender el notable efecto reductor in vivo de la presión sanguínea que tienen

los péptidos específicos de inhibición del ECA: no solo cumplen los requisitos estructurales para inhibir el ECA, sino que también resisten la degradación por el sistema de digestión proteolítica gastrointestinal y permanecen intactos durante el subsiguiente transporte sobre la pared intestinal.

5 Se ha referido que los tripéptidos Leu-Pro-Pro (JP 02036127), Val-Pro-Pro (EP 0 583 074) e Ile-Pro-Pro (J. Dairy Sci., 78: 777-783 1995) tienen una fuerte acción inhibitoria del ECA. Al principio todos los péptidos inhibidores del ECA se caracterizaron basándose en su efecto in vitro sobre la actividad del ECA y los tripéptidos Ile-Pro-Pro (en lo sucesivo citado como IPP), Val-Pro-Pro (en lo sucesivo citado como VPP) y Leu-Pro-Pro (en lo sucesivo citado como LPP) destacaron por su fuerte efecto inhibitorio del ECA, que daba bajos valores IC50. Posteriormente los supuestos efectos antihipertensivos de los tripéptidos VPP e IPP se pudieron confirmar en ratas espontáneamente hipertensas (Nakamura y otros, J. Dairy Sci., 78: 1253-1257 (1995)). En estos ensayos los tripéptidos inhibidores procedían de leche bovina fermentada por bacterias de ácido láctico. Durante la fermentación de la leche los péptidos deseables son producidos por proteinasas generadas por las bacterias de ácido láctico en crecimiento. Un inconveniente de este método de fermentación es que las bacterias de ácido láctico son organismos vivos para la cuales es difícil de controlar el tipo y la cantidad de enzimas excretados. Por lo tanto la producción de los péptidos inhibidores del ECA es difícilmente reproducible y también es improbable que se produzca la serie óptima de enzimas que asegure el máximo rendimiento de los péptidos requeridos. Además los tiempos de fermentación necesarios son relativamente largos, lo cual, junto con los bajos rendimientos, supone una estructura de costes desfavorable para los péptidos bioactivos. Por otra parte un producto fermentado es menos adecuado para incorporarlo directamente a alimentos sólidos, entre otros, y crea estrictas limitaciones organolépticas. En la patente US 6,428,812 se ha descrito la poca palatabilidad de tales productos lácteos fermentados y las numerosas dificultades de proceso encontradas para recuperar los péptidos inhibidores del ECA de estos caldos fermentados. A pesar de estas desventajas los productos lácteos fermentados han sido empleados en la práctica como vasodilatadores de administración oral. Los péptidos inhibidores del ECA se han concentrado por electrodiálisis, por diálisis con membranas de fibra hueca o por métodos cromatográficos a partir de los productos lácteos fermentados, con el fin de hacer posible su comercialización como suplementos dietéticos concentrados en forma de tabletas o de pastillas masticables.

Los inconvenientes de la vía de producción fermentativa arriba citados han sido reconocidos en las solicitudes de patente WO 01/68115 y EP 1 231 279, entre otras. En la segunda se describe un proceso puramente enzimático para recuperar los tripéptidos Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro de la caseína láctea. La solicitud de patente reivindica un método para producir estos tripéptidos por digestión de un material que contiene una caseína láctea mediante una proteinasa y una peptidasa, a través de un péptido intermedio. Cada una de estas incubaciones enzimáticas puede durar hasta 12 horas y tienen lugar en condiciones que favorecen el brote de contaminantes microbianos. El péptido intermedio se purifica preferiblemente antes de incubarlo con la peptidasa y solo pueden obtenerse concentraciones finales elevadas de péptidos inhibidores del ECA tras una etapa adicional de purificación cromatográfica del péptido intermedio.

La patente WO 2004/098309 A1 revela un producto de caseína hidrolizada que comprende tripéptidos IPP y/o VPP.

40 Janhiainen, Valio Foods & Functionals, vol. 1, 2003, 1-22, revela que los péptidos bioactivos en Evolus disminuyen la presión sanguínea de sujetos hipertensos.

Manso y otros, J. of Food Protection, vol. 66, 2003, 1686 – 1692, revelan la acción inhibitoria del enzima convertidor de angiotensina I que tienen los macropéptidos de caseína kappa bovina, ovina y caprina y sus hidrolizados trópticos. Silva y otros, International Dairy Review, vol. 15, 2005, 1-15, proporcionan un resumen de secuencias peptídicas antihipertensivas en las caseínas.

Resumen de la presente invención

50 Muchos péptidos e hidrolizados diferentes han sido relacionados en la literatura científica con efectos reductores de la presión sanguínea. Asimismo se conocen muchos mecanismos fisiológicos que intervienen en la regulación de la presión sanguínea. De acuerdo con la presente invención, los péptidos y los mecanismos fisiológicos involucrados se minimizan eligiendo un substrato proteico adecuado que tras la hidrólisis produzca una fracción peptídica en la cual haya IPP como principal componente reductor de la presión sanguínea. Hemos encontrado que para dicha fracción peptídica la caseína kappa y con mayor preferencia el glicomacropéptido (GMP) de caseína kappa es un punto de partida preferido. En la mezcla peptídica reductora de la presión sanguínea o en la fracción así generada el IPP, especialmente, juega un papel importante. Contrariamente a los procesos hidrolíticos del estado técnico previo, que producen mezclas de IPP, VPP y muchos otros péptidos potencialmente bioactivos, el proceso de la presente invención está dirigido a la producción de IPP, evitando por ejemplo la de VPP. Según la presente invención el GMP es el substrato proteico. El GMP se puede obtener de la caseína kappa tal como se describe abajo. La leche de vaca es el origen preferido de caseína kappa. También se puede usar leche de otros mamíferos, por ejemplo de cabras, si el GMP que forma parte de la molécula de caseína kappa incluye una secuencia -IPP-. Como no todas las caseínas kappa pueden ser escindidas por la quimosina bovina, la obtención del GMP puede requerir el uso de un enzima de coagulación más apropiado.

65

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un proceso enzimático que produzca selectivamente IPP a partir de GMP, incubando primero el GMP con una aminopeptidasa y a continuación, preferiblemente en condiciones en que la aminopeptidasa ya no sea activa, con una proteasa específica de prolina.

5 La presente invención también proporciona un proceso para elaborar un producto alimenticio, una bebida o un suplemento dietético que comprenda la producción de una composición de la presente invención o producida por el proceso de la presente invención y la incorporación de dicha composición a un producto alimenticio, a una bebida o a un suplemento dietético

10 Este producto alimenticio, bebida o suplemento dietético se elige del grupo constituido por margarinas, pastas para untar, mantequilla, productos lácteos o bebidas que contienen suero de leche, preferiblemente yogur o productos lácteos tales como yogur o leche.

Descripción detallada de la presente invención

15 La presente invención se refiere a un proceso en el cual el péptido IPP es generado con gran rendimiento a partir de la fracción GMP de la caseína kappa. Se emplea una endoproteasa específica de prolina en combinación con una aminopeptidasa adecuada. Primero se incuba la fracción que lleva el GMP con la aminopeptidasa, preferiblemente en condiciones casi neutras, por ejemplo de pH 5 a 8. Este método permite el uso de sustratos que contengan una secuencia -X-I-P-P-, en la cual X puede representar cualquier residuo de aminoácido. La molécula de GMP partida por su extremo N-terminal se incuba con la proteasa específica de prolina, preferiblemente después de inactivar la aminopeptidasa o en unas condiciones de pH en las cuales la aminopeptidasa no sea activa. La proteasa que corta por el extremo carboxiterminal de la prolina, como la endoproteasa específica de prolina, así como la actividad de la aminopeptidasa están preferiblemente libres de cualquier actividad contaminante de endoproteasa. La proteasa que corta por el extremo carboxiterminal de la prolina, como la endoproteasa específica de prolina, así como la actividad de la aminopeptidasa están preferiblemente libres de actividades contaminantes de carboxipeptidasa. La endoproteasa específica de prolina, libre de actividad contaminante de endoproteasa, es una preparación enzimática que tiene preferiblemente una relación de Prol Spec act/Endo superior a 1, con mayor preferencia superior a 100.

30 La actividad de aminopeptidasa que está exenta de actividad contaminante de endoproteasa es una preparación enzimática que tiene preferiblemente una relación de AP/Endo de al menos 0,1, con mayor preferencia de al menos 0,5 y sobre todo de 1.

35 La endoproteasa específica de prolina que está exenta de actividad contaminante de carboxil peptidasa es una preparación enzimática que tiene preferiblemente una relación de Pro Spec act/CPD de al menos 1, con mayor preferencia de al menos 10.

40 La actividad de aminopeptidasa que está exenta de actividad contaminante de carboxil peptidasa es una preparación enzimática que tiene preferiblemente una relación de AP/CPD de al menos 0,1, con mayor preferencia de al menos 0,3. Las relaciones arriba citadas se determinan del modo descrito en el ejemplo 5.

45 Preferiblemente al menos el 20%, con mayor preferencia al menos el 40% o con aún mayor preferencia al menos el 60% y sobre todo al menos el 70% de las secuencias -I-P-P- presentes en la secuencia proteica se convierte en el péptido IPP. La proteasa específica de prolina es capaz preferiblemente de hidrolizar moléculas grandes de proteína como el propio sustrato proteico. El proceso según la presente invención tiene en general un tiempo de incubación inferior a 24 horas, preferiblemente inferior a 10 horas y con mayor preferencia inferior a 4 horas. La temperatura de incubación es en general superior a 30°C, preferiblemente superior a 40°C y con mayor preferencia superior a 50°C.

50 En el estado técnico anterior los tripéptidos IPP, VPP y LPP han sido descritos como inhibidores efectivos del ECA. Como puede juzgarse por las secuencias de aminoácido conocidas, las proteínas de suero de leche bovina no llevan las secuencias de aminoácidos correspondientes a cualquiera de estos tres tripéptidos inhibidores del ECA. Por lo tanto los péptidos IPP, VPP y LPP no se pueden aislar de las proteínas de suero de leche. Sin embargo estos péptidos sí se encuentran en la fracción caseínica de la leche bovina. Por ejemplo, la caseína beta comprende la secuencia -I-P-P- (74-76), la -V-P-P- (84-86) y también la -L-P-P- (151-153). Por otra parte la caseína kappa también incluye una secuencia -I-P-P-, pero no las otras dos. La secuencia -I-P-P- presente en la caseína kappa se halla en la posición 109-110, esto es, en el extremo carboxiterminal a unos pocos aminoácidos del único sitio de corte Phe (105)-Met (106) de la caseína kappa por quimosina. Así, en la caseína kappa, la secuencia IPP se encuentra en la parte GMP de esta molécula. Los presentes inventores han averiguado que la entidad IPP derivada de la caseína kappa de la leche cuajada enzimáticamente se puede encontrar en el suero de queso y en la parte de caseína que precipita al cuajar la leche con ácido.

60 Aunque la caseína kappa no es ponderalmente una fracción importante de la caseína, los presentes inventores han observado que desde un punto de vista molecular su presencia es muy importante. Por ejemplo, la caseína beta está presente en una concentración de casi 400 milimoles por metro cúbico de leche y la caseína kappa en una concentración de 180 milimoles por metro cúbico de leche. El GMP también constituye una fracción importante del

suero de queso. Mientras la concentración de proteínas séricas combinadas es de 320 milimoles por metro cúbico, el GMP está presente en una concentración de 400 milimoles por metro cúbico de suero de queso.

5 Sorprendentemente el GMP es fácil de obtener. El GMP se puede liberar selectivamente de caseínas precipitadas con ácido mediante un tratamiento enzimático con quimosina en condiciones escogidas de pH. Aunque aislar GMP del suero de queso es más difícil, se conocen procesos industriales en los cuales se obtienen fracciones de suero de queso enriquecidas en GMP. Estas fracciones enriquecidas en GMP, comercialmente disponibles, obtenidas por medio de estos procesos conocidos suelen utilizarse para varias aplicaciones nutracéuticas.

10 En la presente solicitud describimos el empleo del GMP como material de partida para obtener el IPP reductor de la presión sanguínea en un estado altamente purificado.

15 La fracción proteica de la leche lleva normalmente una fracción micelar de caseína y una fracción solubilizada de proteína de suero de leche. Entre las proteínas de suero de leche la beta-lactoglobulina y la alfa-lactoalbúmina son cuantitativamente las más importantes. Entre las proteínas de caseína predominan cuantitativamente las caseínas alfa y beta, que son bastante hidrófobas. Las micelas de caseína se mantienen en solución mediante la caseína kappa. Una parte hidrófila de la caseína kappa, el llamado glicomacropéptido (GMP), sobresale de la superficie de la micela estabilizando las caseínas hidrófobas en la solución acuosa.

20 Según un número de procesos industriales bien establecidos la fracción de caseína se puede aislar de la leche, p.ej. para elaborar queso. En uno de estos procesos la leche se acidifica para precipitar selectivamente la fracción de caseína de la leche. El producto precipitado con ácido incluye todas las caseínas, es decir las caseínas alfa, beta, kappa y gamma. La fracción de la leche acidificada no precipitada se denomina "suero de leche". En otro proceso la leche se incuba con un enzima coagulante de la leche, por ejemplo con quimosina de ternero ("cuajo"). La quimosina es una proteasa que corta muy selectivamente el enlace peptídico Phe (105)-Met (106) de la caseína kappa. En esta reacción se escinde la parte de GMP hidrófila de la caseína kappa y como resultado la fracción micelar de caseína se agrega y precipita inmediatamente. En este caso la fracción de caseína precipitada se denomina "cuajada". Como la parte de GMP de la caseína kappa está escindida, en este proceso enzimático el fragmento hidrófilo de GMP permanece en solución junto con las diversas proteínas séricas que constituyen el llamado "suero de queso" o "suero dulce".

35 Hay varias publicaciones que reivindican los beneficios fisiológicos de consumir fracciones de leche enriquecida con GMP. Además existen numerosas publicaciones que describen vías rentables para aislar las fracciones de suero de queso enriquecido con GMP. Por ejemplo, en la patente EP 1037537 se describe el empleo de la ultrafiltración y en la patente US 6787158 el uso de una resina aniónica.

40 El hidrolizado de GMP se puede usar como agente reductor de la presión sanguínea. Hemos encontrado que el nivel relativamente alto de IPP y de otros péptidos que tienen una prolina carboxiterminal en el GMP pueden relacionarse con un efecto reductor de la presión sanguínea.

45 Se entiende por hidrolizado el producto resultante de la hidrólisis del substrato proteico (hidrolizado de proteínas o proteína hidrolizada), siendo el hidrolizado soluble la fracción disuelta (en agua) del hidrolizado de proteínas que aquí también se describe como composición peptídica soluble o composición que lleva péptidos solubles, o como una mezcla de un hidrolizado de proteínas y un hidrolizado soluble.

50 Tal como se define aquí, un "péptido" u "oligopéptido" es una cadena de al menos dos aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos. Los términos "péptido" y "oligopéptido" se consideran sinónimos (como se admite generalmente) y cada término se puede usar indistintamente según lo requiera el contexto. "Polipéptido" o "proteína" se define aquí como una cadena que comprende más de 30 residuos de aminoácido. Todas las fórmulas o secuencias de (oligo)-péptidos y polipéptidos se escriben aquí de izquierda a derecha, desde el extremo aminoterminal hasta el extremo carboxiterminal, de acuerdo con la práctica corriente. El código de una letra empleado aquí para los aminoácidos es comúnmente conocido dentro de la especialidad y se puede encontrar en Sambrook y otros (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

55 Los péptidos opioides son péptidos que se puede unir a receptores opiáceos.

60 Los programas de la IUMB internacionalmente admitidos para la clasificación y nomenclatura de todos los enzimas incluyen las proteasas. El texto actualizado de la IUMB para los números EC de las proteasas se puede ver en la página de internet:

65 <http://www.chem.gmw.ac.uk/iubmb/enzima/EC3/4/11/>. En este sistema los enzimas se definen por el hecho de catalizar una sola reacción, lo cual tiene como consecuencia importante que varias proteínas diferentes sean descritas como el mismo enzima y que una proteína que cataliza más de una reacción sea tratada como más de un enzima. El sistema clasifica las proteasas en endo- y exoproteasas. Las endoproteasas son aquellos enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos internos; las exoproteasas hidrolizan enlaces peptídicos adyacentes a un grupo

α -amino terminal (“aminopeptidasas”) o un enlace peptídico entre el grupo terminal carboxilo y el penúltimo aminoácido (“carboxipeptidasas”). Las endoproteasas se dividen en subclases, basándose en el mecanismo catalítico. Hay subclases de serina endoproteasas (EC 3.4.21), cisteína endoproteasas (EC 3.4.22), aspártico endoproteasas (EC 3.4.23), metaloendoproteasas (EC 3.4.24) y treonina endoproteasas (EC 3.4.25).

Las aminopeptidasas figuran en la clase 3.4.11. La subclasificación está basada en la eficiencia relativa con la que se escinden los 20 distintos aminoácidos. Se puede distinguir entre aminopeptidasas de especificidad reducida y amplia. Las aminopeptidasas pueden eliminar secuencialmente un solo aminoácido amino-terminal de substratos proteicos y peptídicos. Las aminopeptidasas de especificidad reducida muestran una fuerte preferencia por el tipo de residuo de aminoácido en la posición P1 que se libera del substrato peptídico. Las aminopeptidasas de especificidad amplia son capaces de liberar una serie de aminoácidos diferentes en las posiciones N-terminal o P1 (de acuerdo con la nomenclatura de Schechter: Schechter, I. And Berger, A. 1967. Biochem Biophys Res Commun 27:157-162). Las carboxipeptidasas pueden eliminar secuencialmente aminoácidos individuales carboxiterminales de substratos proteicos y peptídicos. De manera comparable a las endoproteasas, las carboxipeptidasas se dividen en subclases basándose en el mecanismo de catálisis. Las carboxipeptidasas de tipo serina están en la clase EC 3.4.16, las metalocarboxipeptidasas en la clase EC 3.4.17 y las carboxipeptidasas de tipo cisteína en la clase EC 3.4.18. En el caso de las proteasas, la lista de EC tiene el valor de proporcionar una terminología estándar para los varios tipos de actividad de proteasa y especialmente para asignar un número de identificación único y un nombre recomendado a cada proteasa.

La parte de GMP de la molécula de caseína kappa es un polipéptido cuya longitud es de 64 residuos de aminoácido. Si se recupera cuantitativamente todo el IPP, una preparación de GMP puro puede dar una concentración de IPP de casi un 5% (p/p), sin contaminaciones significativas de VPP o LPP. En la presente solicitud describimos varios procesos proteolíticos para aislar el tripéptido IPP del GMP, opcionalmente en una sola etapa de incubación con elevados rendimientos. Por lo tanto, según el proceso de la presente invención, se puede obtener una composición que contenga IPP, en la cual la concentración de IPP sea suficientemente elevada para utilizarla directamente o tras una etapa sencilla de purificación, es decir sin necesidad de un proceso de purificación complejo y costoso como la separación o purificación cromatográfica.

Según el proceso proteolítico, la molécula de GMP aislada se incuba primero con una aminopeptidasa para eliminar los aminoácidos N-terminales (Met y Ala) del GMP que preceden a la secuencia de IPP en el GMP. Solo después de esta incubación se incorpora a la mezcla reactiva la proteasa específica de prolina para liberar el péptido IPP. Es preferible que la aminopeptidasa no siga activa durante o tras la incubación con la proteasa específica de prolina. Hemos encontrado que este método proporciona mayores rendimientos de IPP, además no deja ningún regusto y apenas contribuye a la suma de aminoácidos libres presentes en el producto final. Asimismo el IPP está presente en una proporción elevada respecto a otros péptidos, especialmente respecto a los tripéptidos. El IPP preparado puede seguir separándose de los péptidos más grandes. Como las aminopeptidasas pueden eliminar secuencialmente aminoácidos del extremo N-terminal de los péptidos, se requiere una actividad enzimática aminopeptidolítica capaz de liberar eficientemente los residuos de metionina (“M”) y alanina (“A”) que preceden a la secuencia de IPP. Se encontró que los enlaces peptídicos I-P y P-P presentes en los tripéptidos IPP resistían la división enzimática y que después de incubar una molécula intacta de GMP dicha actividad aminopeptidolítica partía el extremo N-terminal de la molécula de GMP para empezar con la secuencia IPP.

Una preparación enzimática comercial que tiene la deseada actividad de aminopeptidasa es la Corolasa LAP (AB Enzimas). La Corolasa LAP representa una actividad de leucina aminopeptidasa relativamente pura, clonada y sobreexpresada procedente de *Aspergillus*. Como esta preparación no tiene actividades endoproteolíticas y carboxipeptidolíticas inespecíficas se evita la división indeseada de la molécula de substrato GMP. Otra aminopeptidasa clonada y sobreexpresada con una especificidad relativamente amplia es la aminopeptidasa de *A. niger* (SEQ ID 171 de la patente WO 02/068623).

Por último hemos notado que el GMP también se usa ventajosamente en procesos donde se produce IPP por una vía fermentativa. Tal como se ilustra en los ejemplos, la incubación del GMP con lactobacilos específicos produce IPP sin generar los regustos característicos de las fermentaciones de leche entera.

Todos los aspectos mencionados arriba son de especial importancia porque permiten obtener un producto altamente estandarizado sin características indeseables de bioactividad, sabor u olor. Un producto altamente estandarizado de este tipo se puede incorporar sin etapas subsiguientes de purificación a diversas elaboraciones alimenticias o a productos dietéticos concentrados como tabletas o pastillas masticables. Se pueden obtener productos altamente estandarizados con concentraciones aún mayores de IPP, p.ej. para producir tabletas o pastillas masticables más pequeñas, eliminando selectivamente péptidos distintos del IPP. Esta eliminación de los péptidos que no tienen una actividad reductora importante de la presión sanguínea se puede llevar a cabo, p.ej., precipitando estos péptidos no activos y a continuación realizando una etapa de (ultra)filtración o decantación. Pero según otro procedimiento los ingredientes bioactivos se pueden concentrar aún más mediante una purificación posterior en la cual se aprovecha el carácter muy hidrófobo del péptido IPP. Estos métodos de purificación comprenden la nanofiltración, la extracción con butanol, por ejemplo, seguida de evaporación/precipitación o la puesta en contacto del hidrolizado acidificado resultante con aglomerantes como carbón activo o resinas cromatográficas de la serie Amberlite XAD (Rohm) por

ejemplo. También se pueden emplear resinas de butil-sefaraosa como las que suministra por ejemplo Pharmacia. Los péptidos reductores de la presión sanguínea se pueden desorber de dichos materiales con disolventes orgánicos como mezclas de metanol/etanol o con propanol. Asimismo se puede usar la extracción supercrítica con CO₂ o N₂O para obtener péptidos bioactivos altamente purificados.

5 En la patente EP 1 231 279 se describe un proceso puramente enzimático para recuperar los tripéptidos VPP e IPP de la caseína láctea. La solicitud reivindica un método para producir tripéptidos digiriendo un material que contiene una caseína láctea con una proteinasa y una peptidasa mediante un llamado "péptido intermedio" elegido del grupo formado por un péptido que lleva una secuencia -V-P-P- pero ninguna otra Pro aparte de las de esta secuencia, así como un péptido que lleva una secuencia -I-P-P- pero ninguna otra Pro aparte de las de esta secuencia. Tal como se describe en los ejemplos de la patente EP 1 231 279, el método incluye un proceso de dos etapas. Primero se producen los péptidos intermedios que contienen VPP o IPP. Esto se realiza incubando caseína con una proteinasa adecuada, según uno de los ejemplos a 37°C durante un periodo de 12 horas. Luego la proteinasa usada se inactiva calentando este primer hidrolizado a 100°C durante 3 minutos y después de enfriar se agrega otra preparación enzimática (de hecho una preparación con actividad exoproteolítica). Tras otras 12 horas de incubación a 37°C con esta otra preparación enzimática se puede demostrar la presencia de los tripéptidos VPP e IPP. Para lograr unos rendimientos superiores de estos péptidos inhibidores del ECA, la patente EP 1 231 279 también propone purificar y concentrar el péptido intermedio antes de exponerlo a la actividad exoproteolítica. La patente EP 1 231 279 sugiere asimismo que después de obtener el péptido intermedio y antes de ponerlo en contacto con la peptidasa se pueden efectuar opcionalmente varias operaciones en el procedimiento, como por ejemplo la eliminación de la proteína no reaccionada, p.ej. por centrifugación a 5000 hasta 20000 rpm durante 3 a 10 minutos. De este modo se obtiene la mezcla compleja de los tripéptidos deseados en un proceso enzimático de dos etapas bastante difícil de manejar industrialmente. Como cada una de las incubaciones enzimáticas puede durar hasta 12 horas a pH 4,5 a 7,0 y a una temperatura de 25 hasta 50°C, es evidente que este procedimiento tampoco es aceptable desde un punto de vista microbiológico. Estos largos tiempos de incubación, en combinación con una baja temperatura de incubación, de 25 hasta 50°C, pueden producir fácilmente infecciones en la solución que contiene las proteínas.

En comparación con los métodos descritos en la patente EP 1 231 279 resulta evidente la elegancia de las etapas especificadas en el presente proceso. En primer lugar la presente solicitud de patente describe el empleo de solo un fragmento GMP de la caseína kappa. Como resultado solo se libera IPP y no se generan muchos otros péptidos conocidos, potencialmente muy amargos, que lleva la caseína. En segundo lugar la incubación según la presente invención, en la cual el fragmento GMP de la caseína se incuba primero con una aminopeptidasa pura y después con la proteasa específica de prolina, difiere esencialmente de la ruta descrita en la patente EP 1 231 279 y además libera IPP con gran eficiencia y con mínimos niveles de péptidos contaminantes y aminoácidos libres. La incubación preferida se inicia con una aminopeptidasa (una "peptidasa" de acuerdo con la patente EP 1 231 279) en vez de una proteinasa y no produce ningún "péptido intermedio". En la etapa siguiente se usa una endoproteasa en vez de una proteinasa y tampoco se forma ningún "péptido intermedio".

A pesar de todos los inconvenientes mencionados de los productos del estado técnico anterior, los productos lácteos fermentados se han aplicado en la práctica como vasodestructor de administración oral. Los péptidos inhibidores del ECA también se han concentrado por electrodiálisis, por diálisis con membranas de fibra hueca o por métodos cromatográficos a partir de productos lácteos fermentados, a fin de permitir su comercialización como suplementos dietéticos concentrados en forma de tabletas o pastillas masticables. Tal como se usa aquí, el término nutracéutico denota utilidad, tanto en el sector de aplicación nutricional como en el farmacéutico. Por lo tanto las composiciones nutracéuticas se pueden emplear como suplemento de alimentos y bebidas, y como formulaciones farmacéuticas o medicamentos de aplicación enteral o parenteral, que pueden ser formulaciones sólidas tales como cápsulas o tabletas o formulaciones líquidas tales como soluciones o suspensiones. Como se deduce de lo anterior, el término composición nutracéutica también incluye alimentos y bebidas que llevan la presente composición de péptidos y opcionalmente carbohidratos, así como composiciones suplementarias, por ejemplo suplementos dietéticos, que contienen los antedichos ingredientes activos.

Tal como se emplea aquí, el término suplemento dietético denota un producto de ingestión oral que contiene un "ingrediente dietético" pensado para suplementar la dieta. Los "ingredientes dietéticos" de estos productos pueden incluir: vitaminas, minerales, hierbas u otros vegetales, aminoácidos, y sustancias tales como enzimas, tejidos orgánicos, glandulares, y metabolitos. Los suplementos dietéticos también pueden ser extractos o concentrados, y pueden hallarse en muchas formas, como por ejemplo tabletas, cápsulas, perlas, cápsulas de gelatina, líquidos o polvos. También pueden encontrarse en otras formas, como por ejemplo una barra, pero en tal caso la información que aparece en la etiqueta del suplemento dietético no presentará el producto como un alimento corriente o como un artículo exclusivo de una comida o dieta.

Se puede incorporar un suplemento multivitamínico y mineral a las composiciones nutracéuticas para obtener una cantidad adecuada de algún nutriente esencial ausente en algunas dietas. El suplemento multivitamínico y mineral también puede servir para prevenir enfermedades y proteger contra pérdidas y deficiencias nutricionales debidas a modelos de estilo de vida y patrones dietéticos usuales, inadecuados, que se han observado a veces en la diabetes. El estrés oxidativo también se ha relacionado con el desarrollo de resistencia a la insulina. Las especies reactivas del oxígeno pueden afectar a la absorción de glucosa estimulada por la insulina, alterando la cascada señalizadora

del receptor de insulina. El control del estrés oxidativo con antioxidantes tales como el α -tocoferol (vitamina E) y el ácido ascórbico (vitamina C) puede ser valioso en el tratamiento de la diabetes. Por consiguiente se puede añadir un suplemento multivitamínico a las sustancias activas arriba mencionadas para mantener una nutrición equilibrada.

- 5 Además la composición peptídica se puede combinar con minerales como el magnesio (Mg^{2+}), el calcio (Ca^{2+}) y/o el potasio (K^+) para mejorar la salud.

La composición nutracéutica puede contener las composiciones peptídicas. El IPP está presente en la composición en una proporción tal que aporte una dosis diaria aproximada de 0,001 g por kg de peso corporal hasta 1 g por kg de peso corporal del sujeto al cual debe administrarse. Un producto alimenticio o bebida contiene adecuadamente unos 0,05 g hasta 50 g de IPP por ración. Un producto alimenticio o bebida contiene adecuadamente unos 0,1 g hasta 100 g de hidrolizados proteicos por ración. Si la composición nutracéutica es una formulación farmacéutica, ésta puede contener composiciones peptídicas en una proporción aproximada de 0,01 g hasta 5 g por dosis unitaria, es decir por cápsula o tableta, o de aproximadamente 0,7 g hasta 210 g por dosis diaria de una formulación líquida.

15 Un producto alimenticio o bebida contiene adecuadamente unos 0,5 g hasta 200 g de carbohidratos por ración.

Intervalos de dosificación (para una persona de 70 kg)

- 20 IPP: 0,005-70 g/día (ambos)
 Hidrolizados proteicos: 0,07-210 g/día
 Proteínas no hidrolizadas: 0,07-210 g/día
 Carbohidratos: 0,1-490 g/día

25 Los "agentes beneficiosos para la salud" son sustancias que proporcionan un provecho saludable, es decir, que tienen un efecto positivo en un aspecto de la salud o que ayudan a mantener un aspecto de buena salud cuando se ingieren; estos efectos saludables son la prevención de la obesidad, el control del peso corporal y la conservación de la salud cardiovascular. "Beneficio saludable" significa tener un efecto positivo en un aspecto de la salud o ayudar a mantener un aspecto de buena salud.

30 Los "productos alimenticios funcionales" se definen como productos alimenticios (incluyendo bebidas para evitar dudas) adecuados para el consumo humano en los cuales la composición peptídica se usa como ingrediente en una proporción efectiva, a fin de obtener un beneficio saludable importante para el consumidor del producto alimenticio.

35 Tal como se emplea aquí, el término "comprende" no tiene el significado de limitarse a unos elementos enumerados sucesivamente, sino más bien el de englobar elementos no especificados de mayor o menor importancia funcional. En otras palabras, la relación de etapas, elementos u opciones no tiene por qué ser exhaustiva. Dondequiera que se usen las palabras "incluye" o "tiene", el significado de estos términos es equivalente al de "comprende" tal como se ha definido arriba.

40 El péptido IPP, eficaz para rebajar la presión sanguínea, tiene dos residuos de prolina en el extremo carboxiterminal del péptido. Como es sabido que los enlaces peptídicos con residuos prolilo son resistentes a la escisión proteolítica, la presencia de dos residuos de prolina en los péptidos reductores de la presión sanguínea dará a dichos péptidos una mayor resistencia a la degradación proteolítica. Este aspecto incrementa la probabilidad de que el tripéptido relevante escape a la hidrólisis total durante la incubación con preparaciones enzimáticas complejas. Análogamente es probable que el IPP subsista a la digestión gastrointestinal y por lo tanto que estos péptidos tengan una mayor probabilidad de llegar intactos al torrente sanguíneo. Para obtener péptidos que lleven en su extremo carboxiterminal al menos un residuo de prolina, pero preferiblemente varios, el uso de una proteasa capaz de cortar por el extremo carboxiterminal de los residuos de prolina ofrece una opción interesante. Las denominadas prolil oligopeptidasas (EC 3.4.21.26) tienen la posibilidad única de escindir preferentemente los péptidos por el extremo carboxílico de los residuos de prolina y con menor eficiencia por el extremo carboxílico de alanina. En todas las proteasas específicas de prolina adecuadamente caracterizadas, aisladas de fuentes mamíferas así como de fuentes microbianas, se ha identificado un solo dominio de peptidasa que excluye péptidos grandes del sitio activo del enzima. En efecto estos enzimas son incapaces de degradar polipéptidos que contengan más de unos 30 residuos de aminoácido, y por tanto estos enzimas se designan ahora como "prolil oligopeptidasas" (Fulop y otros: Cell, vol. 94, 161-170, 24 de julio de 1998). Por consiguiente estas prolil oligopeptidasas requieren una prehidrólisis amplia con otras endoproteasas antes de que puedan ejercer su acción hidrolítica. No obstante, tal como se describe en la patente WO 02/45523, la combinación de una prolil oligopeptidasa con una de dichas endoproteasas sigue produciendo unos hidrolizados caracterizados por una proporción significativamente incrementada de péptidos con un residuo carboxiterminal de prolina. Por ello estos hidrolizados forman un excelente punto de partida para aislar péptidos con efecto inhibitor del ECA in vitro y mejor resistencia a la degradación proteolítica gastrointestinal. A pesar de estos beneficios potenciales no tenemos conocimiento de ninguna solicitud que especifique el uso de proteasas específicas de prolina para la recuperación de los péptidos reductores de la presión sanguínea y menos aún para la producción selectiva de IPP.

65 La patente WO 02/45524 describe una proteasa específica de prolina que puede obtenerse de *Aspergillus niger*. El enzima derivado de *A. niger* corta preferentemente por el extremo carboxiterminal de prolina, pero también lo puede

hacer por el extremo carboxiterminal de hidroxiprolina y, con menor eficiencia, por el extremo carboxílico de alanina. La patente WO 02/45524 también revela que no existe ninguna homología clara entre este enzima derivado de *A. niger* y las prolil oligopeptidasas conocidas, procedentes de otras fuentes microbianas o mamíferas. Al contrario que las prolil oligopeptidasas conocidas, el enzima de *A. niger* tiene un valor óptimo de pH ácido. Aunque las prolil oligopeptidasas conocidas y el enzima derivado de *A. niger* se conocen como serina proteasas, en el ejemplo 1 demostramos que el enzima de *A. niger* pertenece a una subfamilia completamente diferente. El enzima de *A. niger* secretado parece ser un miembro de la familia S28 de serina peptidasas, más que de la familia S9 en la cual se ha agrupado la mayoría de prolil oligopeptidasas citosólicas (Rawlings, N.D. y Barrett, A.J.; Biochim. Biophys. Acta 1298 (1996) 1-3).

En el ejemplo 2 mostramos los valores óptimos de pH y temperatura de la endoproteasa específica de prolina derivada de *A. niger* en comparación con una oligopeptidasa específica de prolina obtenida del microorganismo *Flavobacterium meningosepticum*. Las soluciones acuosas que llevan proteínas son muy susceptibles de infecciones microbianas, sobre todo si se mantienen durante muchas horas a valores de pH superiores a 5,0 y a temperaturas de 50 grados o inferiores, especialmente por toxinas microbianas que pueden generarse durante dichas etapas prolongadas de incubación y que probablemente sobreviven a etapas sucesivas de calentamiento y constituyen una amenaza potencial para los procesos de calidad alimentaria. A diferencia de las condiciones descritas en la patente EP 1 231 279, el proceso según la presente invención utiliza preferiblemente una temperatura de incubación por encima de 50°C. En combinación con el proceso enzimático de una etapa en que el enzima se incuba durante un periodo inferior a 24 horas, preferiblemente inferior a 8 horas, con mayor preferencia inferior a 4 horas, el proceso según la presente invención ofrece la ventaja de una mejor estabilidad microbiológica.

En el ejemplo 3 demostramos que la preparación enzimática derivada de *A. niger*, tal como se usa en el proceso de la presente invención, muestra una especificidad muy estrecha para el sustrato, lo cual significa la ausencia de cualquier otra actividad endoproteolítica importante que no vaya dirigida hacia los enlaces peptídicos que incluyen residuos de prolina o alanina. En el ejemplo 4 de la presente solicitud demostramos que el enzima de *Aspergillus* no es una oligopeptidasa, sino una auténtica endopeptidasa capaz de hidrolizar proteínas intactas, grandes péptidos, así como moléculas peptídicas más pequeñas, sin necesidad de una endoproteasa auxiliar. Este hallazgo nuevo y sorprendente nos permite prescindir del uso de una endoproteasa auxiliar, de tal manera que se pueden generar hidrolizados con unos elevados contenidos, sin precedentes, de péptidos con un residuo carboxiterminal de prolina. Además es preferible prescindir de una endoproteasa auxiliar, a fin de generar un número muy limitado de péptidos al hidrolizar polipéptidos u oligopéptidos. Como resultado se obtienen mezclas peptídicas bastante simples que se caracterizan por el hecho de que la mayoría de los péptidos presentes tienen un residuo carboxiterminal de prolina.

En el ejemplo 5 describimos las preparaciones enzimáticas utilizadas teniendo en cuenta si la actividad desplegada es endoproteolítica, aminopeptidolítica o carboxipeptidolítica. Así como la endoproteasa específica de prolina tiene actividades secundarias inapreciables, las preparaciones de Sumizyme FP y Flavourzyme forman una fuente rica en muchos tipos diferentes de enzimas.

En el ejemplo 6 describimos una ruta alternativa para aislar el GMP, esto es, a partir de caseinato comercialmente disponible. Usando la endoproteasa específica de prolina también recuperamos IPP del GMP aislado de este modo. El hecho de que el enzima derivado de *A. niger* no tenga una actividad importante de aminopeptidasa (véase el ejemplo 5) sugiere fuertemente que el IPP formado se libera de la secuencia -A107-1108-P109-P110- presente en la caseína kappa. Presuntamente el enlace peptídico carboxiterminal del IPP es escindido por la actividad principal de la prolil endoproteasa derivada de *A. niger*, mientras que la escisión del enlace Ala-Ile precedente es debida a su actividad secundaria específica de Ala. La ventaja de esta ruta es que, tras la separación selectiva del GMP, la fracción restante de caseinato se puede utilizar para otras aplicaciones.

En el ejemplo 7 demostramos que tanto la endoproteasa específica de prolina como la preparación compleja de Sumizyme FP se pueden utilizar para liberar IPP del GMP obtenido comercialmente. Esta composición comprende preferiblemente entre 0,1 y 100 mg/g de IPP (referido a materia seca y a proteína), con mayor preferencia entre 1 y 50 mg/g de IPP (referido a materia seca y a proteína) y sobre todo entre 2 y 35 mg/g de IPP (referido a materia seca y a proteína). Asimismo hemos encontrado que la hidrólisis del GMP da lugar a una composición que contiene el tripéptido IPP y el tetrapéptido TSTP en proporciones casi idénticas, en caso de emplear endoproteasa específica de prolina. Por tanto aquí también se revela una composición que comprende IPP y TSTP, en la cual la relación molar de IPP:TSTP está comprendida entre 1,5 y 0,5, preferiblemente entre 1,3 y 0,7, y con mayor preferencia entre 1,2 y 0,8. Esta composición contiene preferiblemente entre 0,1 y 100 mg/g de IPP (referido a materia seca y a proteína), con mayor preferencia entre 1 y 50 mg/g de IPP (referido a materia seca y a proteína) y sobre todo entre 2 y 35 mg/g de IPP (referido a materia seca y a proteína).

En el ejemplo 8 demostramos las ventajas organolépticas del uso de un hidrolizado del GMP.

En el ejemplo 9 ilustramos que el uso del GMP también permite preparar productos que contienen IPP, empleando un método de fermentación.

Por consiguiente la presente invención tiene varias ventajas respecto al estado técnico anterior. Los más importante es que el proceso según la presente invención produce una menor variedad de péptidos solubles en agua y que entre estos péptidos solubles en agua el IPP se encuentra en mayores proporciones. Esto tiene especial importancia en el caso de que se necesite una concentración elevada de IPP para un producto de gusto insípido. De acuerdo con el presente proceso, al menos un 20%, con mayor preferencia al menos un 30% y sobre todo al menos un 40% de una secuencia -A-I-P-P existente en una proteína se convierte en IPP.

Después de la hidrólisis la solución se puede calentar. Opcionalmente se puede modificar el pH de la solución o bien se puede mezclar la solución con disolventes.

Según un aspecto de la presente invención, los péptidos solubles, incluyendo el IPP, que se forman durante la hidrólisis de la fuente proteica son separados y opcionalmente secados. Por ejemplo, después de una decantación, filtración o centrifugación a baja velocidad para eliminar el precipitado resultante, los sobrenadantes que contienen los péptidos solubles biológicamente activos se pueden recuperar, por ejemplo, por ósmosis inversa o evaporación, opcionalmente combinada con una etapa de filtración adicional y seguida de una etapa de secado por pulverización, a fin de disponer de una ruta económica para obtener una pasta o un producto en polvo con una gran bioactividad y una buena solubilidad en agua. Al digerir un substrato proteico adecuado, tal como el GMP, con una endoproteasa específica de prolina se obtiene un polvo blanco e inodoro con una alta concentración de IPP y un grado de hidrólisis sorprendentemente bajo.

En aplicaciones nutraceuticas y en aplicaciones de productos alimenticios y bebidas, los hidrolizados de la presente invención tienen un uso ventajoso. Un hidrolizado proteico, un hidrolizado soluble, así como una mezcla de ellos se puede usar para una aplicación nutraceutica o de productos alimenticios o bebidas. El hidrolizado soluble se usa preferiblemente en un producto nutraceutico, en un producto alimenticio o en una bebida, por el alto contenido de péptidos activo que lleva.

Si se diluye apropiadamente a la concentración correcta de tripéptidos, se obtiene un material de partida versátil con una excelente palatabilidad, que sirve para conferir propiedades reductoras de la presión atmosférica a toda clase de productos alimenticios y bebidas.

La mezcla peptídica obtenida antes o después de una etapa adicional de purificación, cromatográfica por ejemplo, se puede incorporar a productos alimenticios ampliamente consumidos de manera usual. Como ejemplos de tales productos cabe citar las margarinas, los patés, diversos productos lácteos como mantequilla o yogures o las bebidas que contienen leche o suero de leche, productos de repostería tales como pasteles y galletas, alimentos líquidos tales como las sopas y también caramelos, edulcorantes y terrones de azúcar. Gracias al gusto tan insípido de los hidrolizados que llevan IPP es posible incorporarlos a todo tipo de bebidas, incluyendo agua de mesa embotellada, refrescos, bebidas deportivas, zumos de fruta, limonadas y té instantáneos y cafés.

Una bebida deportiva es aquella que supuestamente rehidrata a los atletas y también restablece electrolitos, azúcar y otros nutrientes. Las bebidas deportivas son usualmente isotónicas, lo cual significa que contienen las mismas proporciones de nutrientes que hay en el cuerpo humano. (Fuente: http://en.wikipedia.org/wiki/Sports_drink).

Las bebidas energéticas son aquellas que contienen estimulantes (legales), vitaminas (especialmente vitaminas B) y minerales, con el propósito de aportar al consumidor un impulso de energía. Los ingredientes comunes incluyen cafeína, guaraná (cafeína de la planta de Guaraná), taurina, varias formas de ginseng, maltodextrina, inositol, carnitina, creatina, glucuronolactona y ginkgo biloba. Algunas pueden contener altos niveles de azúcar o glucosa. Muchas de estas bebidas están aromatizadas y/o coloreadas. (Fuente: http://en.wikipedia.org/wiki/Energy_drink).

Un refresco es una bebida que no contiene alcohol, en contraposición a las bebidas alcohólicas. En general el término se emplea solamente para las bebidas frías. El chocolate caliente, el té y el café no se consideran refrescos. Originalmente el término se refería solo a las bebidas carbonatadas y aún suele emplearse de este modo. (Fuente: http://en.wikipedia.org/wiki/Soft_drink).

Aunque estas composiciones suelen administrarse a seres humanos también se pueden administrar a animales, preferiblemente mamíferos, para aliviar la hipertensión. Además la elevada concentración de péptido reductor de la presión sanguínea en los productos así obtenidos hace que sean muy útiles para su incorporación a suplementos dietéticos en forma de píldoras, tabletas, soluciones muy concentradas, pastas o polvos. Son de especial interés los suplementos dietéticos de liberación lenta que aseguran una cesión continua de los péptidos. Los péptidos pueden formularse en forma de polvo seco, por ejemplo en píldoras, tabletas, gránulos, sobres o cápsulas. Alternativamente la mezcla peptídica se puede formular en forma líquida, por ejemplo en jarabes o cápsulas. Las composiciones que contienen los enzimas y se utilizan para las diversas formulaciones también pueden llevar al menos un compuesto del grupo formado por vehículos, adyuvantes, excipientes, estabilizantes, tampones o diluyentes fisiológicamente aceptables, cuya terminología se usa en su sentido ordinario refiriéndose a sustancias auxiliares para al envasado, suministro, absorción, estabilización o, en caso de adyuvantes, para aumentar el efecto fisiológico. La información básica relevante de los diversos compuestos utilizables en combinación con la mezcla peptídica en polvo puede encontrarse en "Pharmaceutical Dosage Forms", segunda edición, volúmenes 1, 2 y 3, ISBN 0-8247-8044-2 Marcel

Dekker, Inc. o en bien Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª edición, Williams & Wilkins, PA, USA. Para la administración oral se emplean preferiblemente tabletas y cápsulas que contienen un aglutinante adecuado, p.ej. gelatina o polivinil pirrolidona, un relleno idóneo, p.ej. lactosa o almidón, un lubricante apropiado, p.ej. estearato magnésico, y opcionalmente otros aditivos.

5 Un tipo de aplicación oral relativamente nuevo es el uso de varios tipos de cápsulas de gelatina o de tabletas a base de gelatina.

10 Se prepara un hidrolizado exento de fenilalanina, triptófano y tirosina. Utilizando el GMP como proteína de partida se obtiene un hidrolizado que carece de fenilalanina, triptófano y tirosina, lo cual lo hace seguro para personas con fenilcetonuria (FCU).

15 Vista la importancia de los péptidos naturales para combatir la hipertensión, la presente ruta, nueva y rentable, constituye un punto de partida atractivo para obtener productos alimenticios moderadamente hipotensivos o incluso productos veterinarios. Como la presente ruta incluye una etapa de purificación sorprendentemente simple, también se amplían las posibilidades de disponer de suplementos dietéticos concentrados para rebajar la presión sanguínea.

20 El proceso según la presente invención se puede realizar utilizando cualquier oligo- o endoproteasa específica de prolina. Por oligopeptidasas específicas de prolina conforme a la presente invención se entienden los enzimas que pertenecen a la clase EC 3.4.21.26. La endoproteasa específica de prolina usada según la presente invención se refiere a una endoproteasa específica de prolina que pertenecen a la familia S28 de las serina proteasas ((Handbook of Proteolytic Enzymes; Barrett A. J.; Rawlings N.D.; Woessner J.F., Eds.; Academic Press, London, UK, 1998, 369-415) o, con mayor preferencia, al polipéptido citado en las reivindicaciones 1-5, 11 y 13 de la patente WO 02/45524. Por consiguiente esta endoproteasa específica de prolina es un polipéptido que posee una actividad endoproteolítica

25 específica de prolina y está seleccionado del grupo formado por:

(a) un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos tiene al menos un 40% de identidad con los aminoácidos 1 a 526 de la SEQ ID NO:2 o con un fragmento de ella;

30 (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que bajo condiciones poco estrictas se hibrida con (i) la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:1 o con un fragmento de la misma que es al menos un 80% o 90% idéntica a lo largo de 60 nucleótidos, preferiblemente a lo largo de 100 nucleótidos, con mayor preferencia a lo largo de 200 nucleótidos, o bien con (ii) una secuencia de ácido nucleico complementaria de la SEQ ID NO:1. Las secuencias SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 se indican en la patente WO 02/45524. El polipéptido se encuentra preferiblemente en forma aislada.

35

El polipéptido empleado preferentemente según la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 50%, preferiblemente al menos un 60%, preferiblemente al menos un 65%, preferiblemente al menos un 70%, con mayor preferencia al menos un 80%, con todavía mayor preferencia al menos un 90%, con mucha mayor preferencia al menos un 95% y con la máxima preferencia al menos un 97% idéntica con los aminoácidos 1 a 526 de la SEQ ID NO:2 o que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.

40

Preferiblemente el polipéptido es codificado por un polinucleótido que se hibrida en condiciones poco estrictas, más preferiblemente en condiciones medio estrictas y sobre todo en condiciones muy estrictas con (i) la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:1 o con un fragmento de la misma, o con (ii) una secuencia de ácido nucleico que es complementaria de la SEQ ID NO:1.

45

El término "capaz de hibridarse" significa que el polinucleótido diana de la presente invención se puede hibridar con el ácido nucleico utilizado como sonda (por ejemplo la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ. ID NO: 1, o con un fragmento de ella o con el complemento de SEQ ID NO: 1), a un nivel significativamente superior al ruido de fondo. Se revelan unos polinucleótidos que codifican la endoproteasa específica de prolina, así como secuencias de nucleótidos complementarias de ella. La secuencia nucleotídica puede ser ARN o ADN, incluyendo ADN genómico, ADN sintético o ADNc. Preferiblemente la secuencia nucleotídica es ADN y con mayor preferencia una secuencia de ADN genómico. Un polinucleótido incluye normalmente una secuencia contigua de nucleótidos capaz de hibridarse en condiciones selectivas con la secuencia codificadora de SEQ ID NO: 1 o con el complemento de dicha secuencia

50

55 codificadora. Tales nucleótidos se pueden sintetizar por métodos bien conocidos del estado técnico.

Un polinucleótido apto para el proceso de la presente invención se puede hibridar con la secuencia codificadora de SEQ ID NO: 1, o con el complemento de dicha secuencia codificadora, a un nivel significativamente superior al ruido de fondo. Puede haber hibridación inespecífica debido, por ejemplo, a la presencia de otros ADNc en una biblioteca de ADNc. El nivel de la señal generada por la interacción entre un polinucleótido y la secuencia codificadora de SEQ ID NO: 1 o el complemento de dicha secuencia codificadora es típicamente al menos 10 veces, preferiblemente al menos 20 veces, con mayor preferencia al menos 50 veces y con aún mayor preferencia al menos 100 veces tan intenso como el de las interacciones entre otros polinucleótidos y la secuencia codificadora de SEQ ID NO: 1. La intensidad de la interacción se puede medir, por ejemplo, marcando radiactivamente la sonda, por ejemplo con P32. Normalmente se puede conseguir una hibridación selectiva en condiciones poco estrictas (cloruro sódico 0,3 M y citrato sódico 0,03 M a 40°C aproximadamente), medio estrictas (por ejemplo cloruro sódico 0,3 M y citrato sódico

60

65

0,03 M a 50°C aproximadamente) y muy estrictas (por ejemplo cloruro sódico 0,3 M y citrato sódico 0,03 M a 60°C aproximadamente).

5 El paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT, que puede utilizarse para calcular la identidad (empleado por ejemplo con sus ajustes por defecto).

Los algoritmos PILEUP y BLAST N también se pueden utilizar para calcular la identidad de las secuencias o para alinearlas (como identificar secuencias equivalentes o correspondientes, por ejemplo con sus ajustes por defecto).

10 El programa informático para efectuar los análisis BLAST es asequible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo consiste primero en identificar pares de secuencias de alta puntuación (HSPs) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia problema que igualan o satisfacen cierta puntuación T umbral de valoración positiva cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T hace referencia al valor umbral de la palabra vecina. Estas coincidencias iniciales de palabras vecinas sirven de germen para iniciar búsquedas de HSPs que contengan estas palabras. Las coincidencias de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia mientras pueda incrementarse la puntuación acumulada de la alineación. Las extensiones de dichas coincidencias en cada dirección cesan cuando: la puntuación acumulada de la alineación cae una cantidad X por debajo de su valor máximo alcanzado; la puntuación baja cero o por debajo de cero, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos con puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquiera de las dos secuencias. Los parámetros W , T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLAST usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, unas alineaciones de la matriz de puntuación BLOSUM62 (B) de 50, una probabilidad (E) de 10, $M = 5$, $N = 4$ y una comparación de ambas cadenas.

25 El algoritmo BLAST efectúa un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias. Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad mínima total ($P(N)$), que indica la probabilidad de una coincidencia al azar entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Por ejemplo, una secuencia se considera similar a otra si la probabilidad mínima total al comparar la primera secuencia con la segunda es aproximadamente inferior a 1, preferiblemente inferior a 0,1, con mayor preferencia inferior a 0,01 y sobre todo inferior a 0,001.

30 Las cepas del género *Aspergillus* tienen estatus de calidad alimentaria y es sabido que los enzimas derivados de estos microorganismos proceden de una fuente de calidad alimentaria libre de toda sospecha. Según otra forma de ejecución preferida, el enzima utilizable en el proceso reivindicado es un enzima secretado por su célula productora más que un enzima no secretado, del tipo denominado citosólico. De este modo los enzimas se pueden recuperar del cultivo celular en un estado casi puro, sin costosas etapas de purificación. El enzima tiene preferiblemente una gran afinidad hacia su sustrato en las condiciones predominantes de pH y temperatura.

Descripción de las figuras

40 Figura 1: curvas de actividad de la oligopeptidasa específica de prolina procedente de *F. meningosepticum* y de la endoproteasa específica de prolina procedente de *A. niger* medida sobre el sustrato fluorescente Z-Gly-Pro-AMC en diversas condiciones de pH. La fluorescencia se midió después de 30 minutos a 37°C.

Figura 2: perfil de especificidad de la prolil endoproteasa derivada de *A. niger*.

45 Figura 3: SDS-PAGE de ovoalbúmina intacta y un péptido 27-mero sintético tras la incubación con endoproteasa específica de prolina procedente de *A. niger* purificada cromatográficamente.

Materiales y métodos

50 Los caseínatos sódico y potásico comestibles en espray (88%) se obtuvieron de DMV International, Holanda. El GMP se obtuvo de Aria, Dinamarca (Lacprodan CGMP-10, lot # P340205). Los péptidos cromogénicos sintéticos se obtuvieron de Pepscan Systems B.V., Holanda, o de Bachem, Suiza. El Flavourzyme 1000L Batch HPN00218 se obtuvo de Novozymes (Dinamarca), el Sumizyme FP de Shin Nihon (Japón) y la Corolasa LAP Ch.: 4123 de AB Enzymes (UK).

55 Endoproteasa específica de prolina procedente de *A. niger*

La sobreproducción de endoproteasa específica de prolina derivada de *Aspergillus niger* se logró del modo descrito en la patente WO 02/45524. La actividad del enzima se comprobó sobre el péptido sintético Z-Gly-Pro-pNA a 37°C en un tampón de citrato/fosfato disódico a pH 4,6. El producto de la reacción se controló espectrofotométricamente a 60 405 nM. Una unidad se define como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de p-nitroanilida por minuto en estas condiciones de ensayo, con una concentración de sustrato de 0,37 mM de Z-Gly-Pro-pNA.

Purificación cromatográfica de la endoproteasa derivada de *A. niger*

65 El caldo de cultivo obtenido de una cepa de *A. niger* sobreproductora se usó para la purificación cromatográfica de la proteasa, a fin de eliminar cualquier actividad endo- y exoproteolítica contaminante. A tal fin, primero se centrifugó el

caldo de fermentación para eliminar la mayor parte de la masa fúngica y el sobrenadante se pasó luego a través de varios filtros de tamaño de poro decreciente para separar todos los fragmentos celulares. Por último el ultrafiltrado obtenido se diluyó diez veces en acetato sódico, 20 milimoles/litro, pH 5,1 y se aplicó a una columna de Q-Sefarosa FF. Las proteínas se eluyeron en gradiente, desde 0 hasta 0,4 moles/litro de NaCl en 20 milimoles/litro de acetato sódico a pH 5,1. Las fracciones correspondientes a los picos que revelaron actividad de escisión del Z-Gly-Pro-pNA se recogieron y agruparon siguiendo el protocolo descrito en el World Journal of Microbiology & Biotechnology 11, 209 - 212 (1995), pero en unas condiciones de ensayo ligeramente modificadas. Teniendo en cuenta el pH ácido óptimo para la endoproteasa específica de prolina derivada de *A. niger*, el ensayo enzimático se realizó a pH 4,6 en un tampón de citrato/fosfato a 37°C. Después de agrupar y concentrar las fracciones activas se obtuvo por último una preparación que mostraba solamente una banda en la SDS-PAGE y un pico en la HP-SEC. Otros análisis por cromatografía de interacción hidrófoba confirmaron la pureza de la preparación enzimática resultante.

Determinación de nitrógeno por Kjeldahl

El nitrógeno Kjeldahl total se midió mediante análisis por inyección en flujo. Usando un sistema de inyección en flujo Tecator FIASTAR 5000 equipado con un TKN Method Cassette 5000-040, un ordenador Pentium 4 con el programa SOFIA y un cargador automático de muestras Tecator 5027 se cuantificó a 590 nm el amoníaco desprendido de las soluciones que contenían proteínas. En el tubo digestor se introduce una cantidad de muestra correspondiente al rango dinámico del método (0,5-20 mg N/l) junto con ácido sulfúrico al 97% y una tableta catalizadora Kjeltab, y se somete a un programa de digestión de 30 minutos a 200°C, seguido de 90 minutos a 360°C. Tras la inyección en el sistema FIASTAR 5000 se mide el pico de nitrógeno, de cuya magnitud se puede deducir la cantidad de proteína.

Análisis de aminoácidos

Se disolvió en ácido diluido una muestra del material proteico pesada con exactitud y los precipitados se separaron por centrifugación en una centrifuga Eppendorf. El análisis de los aminoácidos se llevó a cabo en el sobrenadante claro, según el método PicoTag especificado en el manual del operador del Sistema de análisis de aminoácidos de Waters (Milford MA, USA). Para ello se obtuvo una muestra adecuada del líquido, la cual se secó y se sometió a una hidrólisis ácida en fase vapor, y después se transformó por reacción química empleando isotiocianato de fenilo. Los diversos aminoácidos derivados resultantes se cuantificaron por métodos de HPLC y se sumaron para calcular el nivel total de aminoácidos libres, incluyendo la Ile transformada, en la muestra pesada. Los aminoácidos Cys y Trp no están incluidos en los datos obtenidos de este análisis.

Análisis por LC/MS/MS

Se utilizó un HPLC con un espectrómetro de masas dotado de trampa de iones (Thermoquest®, Breda, Holanda) acoplado a una bomba P4000 (Thermoquest®, Breda, Holanda) para cuantificar los péptidos de interés, entre ellos los tripéptidos IPP, LPP y VPP, en los hidrolizados enzimáticos de proteínas producidos por la mezcla enzimática de la presente invención. Los péptidos resultantes se separaron empleando una columna Inertsil 3 ODS 3, de 3 mm, 150*2,1 mm (Varian Belgium, Bélgica) en combinación con un gradiente de 0,1% de ácido fórmico en agua Milli Q (Millipore, Bedford, MA, USA; solución A) y 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo (solución B) para la elución. El gradiente empezó con 100% de solución A y se mantuvo así durante 5 minutos, luego se fue añadiendo linealmente solución B hasta un 5% en 10 minutos y después se incrementó también linealmente hasta un 45% de solución B en 30 minutos, a continuación se volvió a las condiciones iniciales y se mantuvo así durante 15 minutos para estabilizar. El volumen inyectado fue de 50 microlitros, el caudal de 200 microlitros por minuto y la temperatura de la columna se mantuvieron a 55°C. La concentración de proteína en la muestra inyectada fue de aprox. 50 microgramos/mililitro.

Se obtuvo información detallada de cada péptido mediante MS/MS dedicada para los péptidos de interés, utilizando una energía de colisión óptima de aproximadamente el 30%. La cuantificación se lleva a cabo en modo LC/MS/MS usando ionización positiva por electrospray con un patrón de IPP marcado con C₁₃ + N₁₅ y una línea de calibración también con un patrón interno marcado para corregir el efecto matriz. La identificación se efectúa mediante el tiempo de retención, el ión precursor y la proporción de iones fragmentados característicos.

El tripéptido LPP (M = 325,2) se usó para ajustar la sensibilidad óptima en modo MS y la fragmentación óptima en modo MS/MS, con una infusión constante de 5 mg/ml, dando como resultado una molécula protonada en modo MS y una energía de colisión óptima de aproximadamente el 30% en modo MS/MS, y generando una serie de iones B e Y.

Antes de la LC/MS/MS los hidrolizados enzimáticos de proteínas se centrifugaron a temperatura ambiente y a 13000 rpm durante 10 minutos, se pasaron por un filtro de 0,22 µm y el sobrenadante se diluyó 1:100 con agua Milli Q.

El grado de hidrólisis (GH) obtenido durante la incubación con las diversas mezclas proteolíticas se controló por medio de un ensayo rápido OPA (JFS, vol. 66, nº 5, 2001).

Ejemplo 1

El enzima obtenido de *A. niger* representa una nueva clase de enzimas específicos de prolina.

De toda la secuencia codificadora de la endoproteasa específica de prolina derivada de *A. niger*, proporcionada en la patente WO 02/45524, se puede determinar una secuencia proteica de 526 aminoácidos. La novedad del enzima fue confirmada por búsquedas BLAST de bases de datos tales como SwissProt, PIR y trEMBL. Para sorpresa nuestra no se pudo detectar ninguna homología clara entre el enzima de *A. niger* y las prolil oligopeptidasas conocidas. Sin embargo una inspección más rigurosa de la secuencia de aminoácidos reveló una pequeña pero significativa homología con las Pro-X carboxipeptidasas (EC3.4.16.2), las dipeptidil aminopeptidasas I (EC3.4.14.2) y la serina proteasa específica del timo. Todos estos enzimas se han asignado a la familia S28 de serina peptidasas (Handbook of Proteolytic Enzymes; Barrett A. J.; Rawlings N.D.; Woessner J.F., Eds.; Academic Press, Londres, UK, 1998, 369-415). La configuración GxSYxG alrededor del sitio activo de serina también se conserva entre estos enzimas y la endoproteasa derivada de *A. niger*. Además los miembros de la familia S28 tienen un valor ácido de pH óptimo, una especificidad para cortar por el extremo carboxiterminal de los residuos de prolina y son sintetizados con una secuencia señalizadora y propéptida igual que la endoproteasa específica de prolina derivada de *A. niger*. El tamaño del enzima de *A. niger* es también similar al de los miembros de la familia S28. Por consiguiente la endoproteasa específica de prolina derivada de *A. niger* parece ser un miembro de la familia S28 de las serina proteasas más que de la familia S9, en la cual se ha agrupado la mayoría de prolil oligopeptidasas citosólicas, incluyendo el enzima obtenido de *Flavobacterium meningosepticum*. Sobre la base de estas características estructurales y fisiológicas hemos concluido que el enzima de *A. niger* pertenece a la familia S28 más que a la familia S9 de serina proteasas. Otra característica que diferencia el enzima derivado de *A. niger* de las prolil oligopeptidasas pertenecientes a la familia S9 es el hecho de que, contrariamente a las prolil oligopeptidasas citosólicas pertenecientes a esta última familia, el enzima de *A. niger* es secretado en el medio de cultivo. Este es el primer informe sobre el aislamiento y la caracterización de un miembro de la familia S28 a partir de un eucariota inferior.

Ejemplo 2

Espectros de pH para la actividad de la endoproteasa específica de prolina de *A. niger* y la oligopeptidasa de *F. meningosepticum*.

Para demostrar la diferencia de valores óptimos de pH que hay entre la endoproteasa específica de prolina derivada de *Aspergillus* y la oligopeptidasa específica de prolina derivada de *Flavobacterium meningosepticum* medimos sus actividades en varias condiciones de pH. La endoproteasa derivada de *Aspergillus* se obtuvo del modo descrito en el apartado Materiales y métodos. La oligopeptidasa derivada de *Flavobacterium* se adquirió de ICN Biomedicals (35 unidades/mg; nº de cat. 32082; Ohio, US).

Para establecer los espectros de pH de actividad de los dos enzimas se prepararon tampones con distintos valores de pH. Se prepararon tampones de pH 2,0 hasta 7,0 utilizando 0,1 moles/l de citrato, tampones de pH 6,0 hasta 9,0 utilizando 0,1 moles/l de tris y tampones de pH 8,0 hasta 12,0 utilizando 0,2 mol/l de glicina. Los valores requeridos de pH se ajustaron usando HCl o NaOH. Como sustrato para ambos enzimas se empleó el péptido cromogénico sintético Z-Gly-Pro-AMC (Bachem, Suiza). En cada pocillo (placas Costar nº 3631) se introdujeron 85 uL de tampón, 10 uL de solución enzimática y 5 uL del sustrato (Z-Gly-Pro-AMC 4 mM en metanol al 60%). La concentración final del enzima derivado de *A. niger* fue de 32 ug/ml (3,2 miliunidades/ml), la concentración final del enzima derivado de *F. meningosepticum* fue de 0,21 ug/ml (7,4 miliunidades/ml). Después de mezclar se dejó reaccionar durante 30 minutos a 37°C y luego se midió la fluorescencia en un lector de placas multipocillo CytoFluor de PerSeptive Biosciences. Los datos correspondientes se muestran en la figura 1. También se estableció la temperatura óptima de la prolil endoproteasa. Para ello, la preparación del enzima purificado se incubó en Na-acetato 0,1 moles/l que contenía 0,02 moles/l de CaCl₂ a pH 5,0 durante 2 horas a diferentes temperaturas, usando Caseine Resorufine (Roche versión 3) como sustrato, y se cuantificó la actividad enzimática midiéndola a 574 nm. De acuerdo con los resultados obtenidos, el valor óptimo de temperatura para la endoproteasa específica de prolina derivada de *A. niger* es de 50°C aproximadamente.

Ejemplo 3

Especificidad de la endoproteasa específica de prolina derivada de *A. niger*.

Se ensayaron muestras de enzimas, tanto crudos como purificados cromatográficamente, obtenidos de una cepa de *A. niger* que contenía múltiples copias del casete de expresión (véase patente WO 02/45524), en comparación con una colección de sustratos peptídicos cromogénicos para establecer la especificidad de la endoproteasa codificada. La actividad endoproteolítica del enzima se comprobó sobre un sustrato de AAXpNA. Los sustratos de "pNA" (p-nitroanilida) producen cambios de color cuando el enlace peptídico X-pNA está escindido; "X" representa diferentes residuos de aminoácidos naturales. Las soluciones madre de los sustratos de AAXpNA (150 mmoles/l) se diluyeron 100x en tampón de acetato 0,1 M de pH 4,0 que contenía CaCl₂ 20 mM. Las mediciones cinéticas de 10 minutos a 40°C en un lector TECAN Genios MTP (Salzburg, Viena) a 405 nm registraron unos aumentos de densidad óptica que por procesamiento de datos en Excel dieron el gráfico representado en la figura 2. Del resultado es evidente que la endoproteasa procedente de *A. niger* tiene una gran especificidad para los enlaces peptídicos de prolilo y una actividad secundaria hacia los enlaces de alanina. Las preparaciones crudas y las purificadas cromatográficamente mostraron curvas de actividad similares. Se pudo demostrar que la contaminación de la endoproteasa procedente de

A. niger con aminopeptidasas, carboxipeptidasas o endoproteasas no específicas de prolina era insignificante (véase el ejemplo 5).

Ejemplo 4

5 La endoproteasa específica de prolina derivada de *A. niger* puede hidrolizar proteínas grandes y péptidos pequeños y por tanto es una verdadera endoproteasa.

10 Debido a una característica estructural específica, las prolil oligopeptidasas pertenecientes a la familia S9 no pueden digerir péptidos de tamaño superior a 30 aminoácidos. Esta limitación es una clara desventaja para un enzima que supuestamente hidroliza distintas proteínas del modo más rápido y eficiente posible. Para ver si la endoproteasa específica de prolina derivada de *A. niger* revela las mismas limitaciones respecto al tamaño molecular del sustrato, hemos incubado la prolil endopeptidasa purificada cromatográficamente derivada de *A. niger* con un péptido sintético pequeño y con la molécula grande de ovoalbúmina y hemos analizado por SDS-PAGE los productos resultantes de la hidrólisis.

20 Como péptido sintético se usó un 27-mero con la secuencia NH₂-FRASDNRVIDPGKVETLTIRRLHIPR-COOH, que fue un obsequio de la compañía Pepsan (Lelystad, Holanda). Como puede verse en su secuencia de aminoácidos, este péptido contiene 2 residuos de prolina, uno en medio y el otro cerca del extremo carboxiterminal del péptido.

25 La molécula intacta de ovoalbúmina (Pierce Imject, viales que contienen 20 mg de material liofilizado) está formada por 385 aminoácidos y tiene un peso molecular de 42.750 Da. Esta molécula contiene 14 residuos de prolina, uno de los cuales está situado junto al último extremo C-terminal de la molécula y no es escindible por una endoproteasa específica de prolina. La ovoalbúmina y el oligopéptido se incubaron por separado a 50°C con la endoproteasa específica de prolina derivada de *A. niger*. Se tomaron muestras a varios intervalos de tiempo y luego se analizaron por SDS-PAGE.

30 Una endoproteasa específica de prolina procedente de *A. niger* purificada cromatográficamente, con una actividad de 4,5 unidades/ml, se diluyó 100 veces con un tampón de acetato 0,1 M de pH 4 que contenía CaCl₂ 20 mM. La ovoalbúmina se disolvió en tampón de acetato de pH 4 a una concentración de 1 mg/ml (22 µM). El péptido 27-mero se disolvió en el mismo tampón hasta una concentración de 0,48 mg/ml (152 µM). La molaridad de la ovoalbúmina y de la solución del péptido 27-mero se escogió de manera que ambas soluciones contuvieran la misma molaridad de residuos de prolina escindibles. La ovoalbúmina contiene 13 sitios potenciales de escisión de prolina, mientras que el péptido 27-mero solo tiene dos. Se incubaron 0,5 ml de cada solución de sustrato con 10 µl (0,45 miliU) de la solución enzimática en un termomezclador Eppendorf a 50°C. A varios intervalos de tiempo se tomaron muestras de 10 µl de la mezcla incubada y se conservaron a 20°C hasta el análisis por SDS-PAGE. Todos los materiales usados para la SDS-PAGE y la tinción se adquirieron de Invitrogen. Las muestras se prepararon con tampón SDS según las instrucciones del fabricante y se separaron sobre geles de Bis-Tris al 12%, usando el sistema de tampón MES-SDS según las instrucciones del fabricante. La tinción se realizó con el colorante Simply Blue Safe (Collodial Coomassie G250).

45 Como puede verse en la figura 3, el enzima derivado de *Aspergillus* escinde una banda discreta de unos 35 a 36 kD de la ovoalbúmina en las primeras 4,75 horas de incubación (calle 3). Los periodos de incubación más largos dan como resultado una nueva descomposición en productos más pequeños de distintos pesos moleculares (calle 7).

50 El péptido 27-mero también resulta descompuesto, tal como se deduce por las varias bandas débiles en las calles 4, 6 y 8 en comparación con la calle 2. La desviación muy pequeña del peso molecular del producto (compárense las calles 9 y 8) se debe muy probablemente a la escisión del residuo de arginina en el extremo carboxílico del péptido. La diferencia es de unos 200 D (medida mediante el programa Alphamager en un sistema Alphamager 2000) y la arginina tiene un PM de 174. Esta pequeña desviación de peso molecular es probablemente el primer paso en la descomposición del péptido.

55 La posterior descomposición del producto solo puede apreciarse por el descenso de intensidad de la banda sobre el gel de SDS. Los productos de esta descomposición adicional no son visibles, porque en el gel no es posible la tinción de componentes de PM aproximadamente igual a 1000 con el colorante Coomassie Brilliant Blue. A partir de este experimento se puede concluir que, a diferencia de las prolil oligopeptidasas pertenecientes a la familia S9, la endoproteasa específica de prolina derivada de *A. niger* no tiene ninguna preferencia especial por la escisión de péptidos de pequeño tamaño sobre proteínas mucho más grandes. Por consiguiente el enzima derivado de *A. niger* representa una verdadera endoproteasa y es un enzima preferido para hidrolizar diferentes tipos de proteínas.

Ejemplo 5

65 Cuantificación de actividades enzimáticas deseables y contaminantes durante la producción de péptidos reductores de la presión sanguínea.

Se puede obtener IPP bastante puro en un proceso de una sola etapa recuperando IPP de GMP. La fracción que contiene IPP se puede obtener a partir de GMP mediante varias preparaciones enzimáticas diferentes. Por ejemplo, incubando GMP con una endoproteasa pura específica de prolina o con una endoproteasa pura específica de prolina más una aminopeptidasa pura, o con una oligopeptidasa pura específica de prolina en combinación con trazas de otra endopeptidasa pura tal como una subtilisina o una metaloproteasa (con el fin de partir el GMP en fragmentos más pequeños formando unos substratos mejorados para la oligopeptidasa), o con una aminopeptidasa pura en combinación con una tripeptidil aminopeptidasa específica de prolina (como la existente en la preparación comercial "Umamizyme" de Amano, Japón), o con preparaciones enzimáticas complejas que contienen diferentes tipos de actividades proteolíticas. En este ejemplo se ensayaron las diversas actividades proteolíticas de tres preparaciones enzimáticas comerciales: Flavourzyme 1000L lote HPN00218 (Novozymes), Sumizyme FP (Shin Nihon, Japón) y Corolasa LAP Ch.: 4123 (AB Enzymes, UK). Tanto Flavourzyme como Sumizyme FP son preparaciones enzimáticas complejas conocidas que contienen diversas actividades enzimáticas aminopeptidolíticas además de actividades endoproteolíticas y carboxipeptidolíticas no específicas. La Corolasa LAP comporta una actividad de aminopeptidasa de leucina relativamente pura, clonada y sobreexpresada, procedente de *Aspergillus*.

Esencialmente pura significa que en las condiciones de incubación empleadas la actividad de las endoproteasas contaminantes, así como de las carboxipeptidasas o aminopeptidasas contaminantes, es mínima o preferiblemente inexistente. El siguiente procedimiento de ensayo fue planeado para cuantificar estas actividades contaminantes de las endo-, amino- y carboxipeptidasas.

La base del procedimiento de ensayo está formada por una colección de varios péptidos cromogénicos selectivos. Como solo las oligo- y endoproteasas específicas de prolina pueden liberar pNA del péptido Z-AAAP-pNA, se usó este péptido concreto para cuantificar la deseada actividad endoproteolítica específica de prolina. Como hay muchas endoproteasas que pueden liberar pNA de los péptidos Z-AAAP-pNA y Z-AAAR-pNA, se usaron estos dos péptidos para cuantificar la actividad contaminante endoproteolítica no específica de prolina. Como la conversión de los péptidos QNIPP y VVVPP presentes en la molécula de beta-caseína a IPP y VPP respectivamente requiere unas aminopeptidasas que puedan eliminar eficientemente residuos de Gln y Val, se usaron los péptidos Q-pNA y V-pNA para cuantificar las deseadas actividades de aminopeptidasa. Como existen muchas carboxipeptidasas que pueden liberar residuos de Phe y Arg de los péptidos, se escogieron péptidos que contenían estos residuos para cuantificar actividades contaminantes de carboxipeptidasa. Sin embargo no se dispone de grupos cromogénicos adecuados para medir las actividades de carboxipeptidasa, por lo cual hubo que desarrollar un método alternativo usando los péptidos sintéticos Z-AF y Z-AR. Este método alternativo se ofrece más abajo. En todos los péptidos sintéticos empleados "Z" representa benciloxicarbonilo y "pNA" el cromóforo para-nitroanilida. Todos los péptidos cromogénicos se obtuvieron de Pepscan (Lelystad, Holanda). Los péptidos Z-AF y Z-AR se compraron a Bachem (Suiza). Todas las incubaciones se efectuaron a 40°C. Las preparaciones enzimáticas diluidas se recalcularon para la concentración del producto comercial.

Medición de las actividades de aminopeptidasa

Se diluyeron 80 veces en tampón BisTris 0,1 M de pH 6 unas soluciones madre de 150 mmoles/l de V-pNA y Q- pNA en DMSO 100% para preparar una solución de 3,75 mmoles/l de substrato de V-pNA+ Q-pNA que contenía V-pNA y Q- pNA en relación 1:1. Se pipeteó un alícuota de 200 µl de esta solución de substrato de aminopeptidasa en pocillos separados de una placa de microvaloración (MTP). La MTP se preincubaba a 40°C en un Tecan Genios MTP (Salzburg, Viena) dirigido por el programa Magellan4. La reacción se inició añadiendo 50 µl de la solución enzimática apropiada, de manera que las incubaciones tuvieron lugar a una concentración de substrato igual a 3 mM. Se usó típicamente una dilución 1:50 de las muestras enzimáticas líquidas Flavourzyme, Corolasa LAP y endoproteasa específica de prolina. Del producto seco Sumizyme FP se usó una solución al 1%.

El color amarillo desarrollado como resultado de la escisión del enlace aminoácido-pNA y medido a 405 nm por el Tecan Genios MTP fue seguido de al menos 20 ciclos cinéticos (aproximadamente 10 minutos). El programa generó los datos como DO₄₀₅/min.

Medición de la actividad de la endoproteasa específica de prolina

Esta medición se realizó básicamente del mismo modo que en el ensayo de aminopeptidasa, pero en este caso se empleó Z-AAAPpNA como único substrato a una concentración final de 3 mmoles/l. Este substrato se solubilizó calentando a 50-55°C una suspensión en tampón de pH 6, con lo cual se obtuvo una solución transparente a la temperatura ambiente. Las mediciones se efectuaron a 40°C.

Se empleó típicamente una dilución 1:50 de las muestras enzimáticas líquidas Flavourzyme y Corolase LAP. El Sumizyme FP se usó en una solución al 1%. La endoproteasa específica de prolina se usó típicamente una dilución 1:5000.

El programa generó los datos como DO₄₀₅/min.

Medición de las actividades contaminantes de endoproteasa no específica de prolina

Esta medición también se realizó básicamente del modo descrito en el ensayo de aminopeptidasa, pero en este experimento se emplearon como sustrato Z-AAAF-pNA y Z-AAAR-pNA en relación 1:1 y a una concentración final de 3 mmoles/l. El sustrato Z-AAAF-pNA resultó ser poco soluble a pH 6, según las condiciones del ensayo, pero una prueba de incubación con subtilisina dio como resultado una rápida solubilización del sustrato paralelamente a la liberación de pNA. Las mediciones se efectuaron a 40°C. No obstante, para compensar esta baja solubilidad el lector de MTP se programó con agitación entre los ciclos cinéticos.

10 El programa generó de nuevo los datos como DO_{405}/min .

Medición de las actividades contaminantes de carboxipeptidasa

15 Como no se dispone de péptidos cromogénicos sensibles para medir actividades de carboxipeptidasa, se usó un método basado en un protocolo de Boehringer para cuantificar carboxipeptidasa C.

20 Dos soluciones madre de 150 mmoles/l de Z-A-F y Z-A-R en etanol se diluyeron 80 veces en un tampón BisTris de 0,1 moles/l y pH 6 para preparar una solución de 3,75 mmoles/l de sustrato Z-A-F + Z-A-R que contenía Z-A-F y Z-A-R en relación 1:1. Luego se pipetearon 200 μl de la solución de sustrato en un vial eppendorf y se preincubaron a 40°C. La reacción se inició añadiendo 50 μl de una dilución enzimática apropiada. Se usó típicamente una dilución 1:50 de Flavourzyme y Corolase LAP y de la endoproteasa específica de prolina. Para el Sumizym FP se usó una solución al 1%. Transcurridos 5 minutos se paró la reacción añadiendo 250 μl de reactivo de ninhidrina. El reactivo de ninhidrina se preparó con 400 mg de ninhidrina (Merck) y 60 mg hidrindantina disueltos en 15 ml de DMSO, a los que se agregaron 5 ml de tampón de acetato de litio de 4,0 moles/l a pH 5,2. El tampón de acetato de litio de 4,0 moles/l se preparó disolviendo LiOH (Sigma) y ajustando el pH a 5,2 con ácido acético glacial (Merck).

30 Después de parar la reacción, cada muestra se calentó a 95°C durante 15 minutos para facilitar la formación de color y a continuación se diluyó 10 veces con etanol puro. El color formado se midió a 578 nm en un espectrofotómetro Uvikon. Se prepararon blancos del mismo modo que las muestras de actividad, pero invirtiendo la adición de reactivo de ninhidrina y enzima. Con el fin de cuantificar la cantidad de aminoácidos libres generados por la carboxipeptidasa se usó el aminoácido L-fenilalanina para crear una curva de calibración. De la misma manera que las muestras se trataron unas soluciones en tampón de pH 6 que contenían 0,1875, 0,375, 0,75, 1,5 y 3,0 mmoles/l de L-fenilalanina (Sigma), es decir 250 μl en un vial. Con los valores de DO_{578} obtenidos se construyó una curva en Excel. Usando esta curva se calcularon las concentraciones de los aminoácidos libres presentes en las muestras que contenían los sustratos Z-A-F y Z-A-R. A partir de los valores resultantes se calculó la actividad de carboxipeptidasa en micromoles por minuto respecto a la cantidad de enzima ensayada.

Cálculo de las actividades relativas

40 A fin de determinar la idoneidad de las distintas preparaciones enzimáticas para el proceso de la presente invención se calcularon los cocientes de las actividades enzimáticas relevantes. En los ensayos basados en el lector de MTP las actividades enzimáticas se caracterizan por la liberación de pNA a lo largo del tiempo, es decir como ADO_{405}/min . Los cocientes de las actividades enzimáticas obtenidos por el lector de MTP se calcularon dividiendo simplemente los valores de ADO_{405}/min resultantes por cantidades idénticas de enzima.

45 Sin embargo en el caso del ensayo de carboxipeptidasa se genera una DO que no se puede comparar directamente con la ADO/min resultante de los ensayos basados en MTP-pNA. En este caso la DO se convirtió primero a μmoles de aminoácido liberados por minuto ($\mu\text{moles}/\text{min}$). Luego la ADO/min de pNA liberada se convirtió a $\mu\text{moles}/\text{min}$. Para ello se generó una curva de calibración en el lector de MTP con las mediciones de diluciones de pNA (Sigma) a 0,25, 0,125, 0,0625, 0,0312 y 0,015 mmoles/l y 250 μl por pocillo. Con los datos obtenidos se construyó una curva de calibración en Excel. A partir de esta curva de calibración la ADO/min se convirtió en $\mu\text{moles}/\text{min}$, de manera que las mediciones basadas en pNA se pudieran comparar con las mediciones basadas en ninhidrina.

55 Sobre la base de los datos generados en los ensayos arriba referidos se caracterizaron las distintas preparaciones enzimáticas. En la columna "Actividad esp. de prol." de la tabla 1 se muestran los datos de las actividades oligo- o endoproteolíticas específicas de prolina presentes en cada preparación enzimática tal como había sido suministrada. Los datos de las actividades de aminopeptidasa deseadas (AP/Act. esp. prol.) y de las actividades contaminantes de carboxipeptidasa (CPD/Act. esp. prol.) y endoproteolíticas (Endo/Act. esp. prol.) están indicadas respecto a las actividades específicas de prolina presentes. La actividad deseada de aminopeptidasa respecto a la actividad contaminante de carboxipeptidasa presente en cada preparación está indicada como (AP/CPD).

65 Es evidente que ninguna de las preparaciones enzimáticas comerciales ensayadas tiene alguna actividad importante oligo- o endoproteolítica específica de prolina. Además todas las preparaciones enzimáticas comerciales ensayadas tienen actividades de carboxipeptidasa y endoproteolíticas. La preparación enzimática C1 consiste en una mezcla de 4 unidades de endoproteasa específica de prolina más 130 microlitros de Corolasa LAP comercial, para ser aplicada por gramo de sustrato proteico presente, que produce unos elevados rendimientos de los péptidos IPP, VPP y LPP

inhibidores del ECA gracias a sus niveles muy reducidos de actividades de carboxipeptidasa y endoproteolíticas contaminantes.

Tabla 1:

	Actividad esp. prol.*	CPD/Act. esp. prol.	AP/Act. esp. prol.	Endo/Act. esp. prol.	AP/CPD
Sumizyme	0,004	21,7	1,2	1,7	0,06
Flavourzyme	0,0007	253,5	25,6	35,5	0,10
Corolasa LAP	0,0				0,74
Esp. prol. <i>A. niger</i>	100	0,005	0,00001	0,000004	0,00
C1	75	0,001	0,00031	0,000391	0,25

* El Sumizyme se midió en solución al 1%, el Flavourzyme y la Corolasa LAP en dilución 1:50. La actividad específica de prolina obtenida de *A. niger* se midió en dilución 1:5000 y la de la C1 en dilución 1:3773. Después se calcularon los datos para la actividad presente en el producto suministrado.

5 Sobre la base de su alto contenido de actividades de amino- y carboxipeptidasa cabe esperar que las incubaciones del GMP con las mezclas enzimáticas complejas Sumizyme FP y Flavourzyme generen altos niveles de aminoácidos libres. Es de esperar que estos aminoácidos libres impartan un regusto caldoso como resultado de un incremento de reacciones de Maillard. Además la presencia de actividades endoproteolíticas no específicas de prolina o alanina en estas preparaciones enzimáticas producirá la solubilización de otros péptidos quizás bioactivos en el producto final, desdibujando el efecto reductor puro de la presión sanguínea del IPP. Para minimizar todas estas reacciones secundarias no deseadas es preferible combinar una proteasa específica de prolina esencialmente pura con una aminopeptidasa esencialmente pura. Se prefiere sobre todo el uso único de una endoproteasa específica de prolina esencialmente pura

15 **Ejemplo 6**

Separación de GMP e IPP del caseinato

20 El GMP comercialmente disponible se obtiene de suero de queso. En este proceso se incuba leche con quimosina para liberar el GMP de la parte hidrosoluble de la caseína kappa. Como resultado precipita el caseinato formando la cuajada y la parte del GMP va a parar al suero de queso, de donde se puede aislar por varios procesos diferentes. En este ejemplo describimos una vía alternativa para aislar el GMP, esto es, su separación del caseinato disponible en el comercio. La ventaja de esta vía es que tras la separación selectiva del GMP, la fracción restante de caseinato se puede utilizar para otras aplicaciones. En el proceso de la presente invención la leche (descremada) se acidifica según métodos conocidos del sector para precipitar selectivamente la fracción de caseína. La fracción precipitada incluye todas las caseínas, es decir las caseínas alfa, beta, kappa (con la parte de GMP) y gamma. Esta cuajada de caseína formada se separa de la fracción de "suero de queso" y se lava para eliminar los componentes restantes del suero y los iones que genera el proceso de acidificación. Una vez deshidratada, la cuajada de caseína se redissuelve por neutralización, usando por ejemplo KOH, para obtener el "caseinato" relevante.

30 Una solución al 10% (p/v) de caseinato potásico (de pH 6,4 aprox.) se incubó a 31°C durante 1 hora con quimosina de ternero para liberar la parte del GMP de la caseína kappa. En este caso se utilizó 2.2 IMCU Maxiren (DSM Food Specialities, Delft, Holanda) por gramo de caseinato. La solución resultante se sometió a una o varias etapas de filtración para separar la parte disuelta de GMP, de bajo peso molecular, de la fracción de molecular peso elevado que contenía las caseínas y la quimosina. El filtrado que contenía el GMP se acidificó a pH 4,5 y se le añadió la endoproteasa específica de prolina derivada de *A. niger* a una concentración de 4 unidades por gramo de proteína presente. La temperatura se subió hasta 55°C para maximizar la actividad del enzima y se siguió incubando durante 3 horas. Después la solución resultante se concentró por evaporación y se calentó durante 5 minutos a 95°C para inactivar la endoproteasa específica de prolina. Por último el concentrado caliente se sometió a ultrafiltración para separar lo máximo posible las proteínas precipitadas y se secó por pulverización. Según los análisis de LC/MS/MS del material secado por pulverización, la concentración de IPP determinada cuantitativamente fue de 0,6 miligramos de IPP por gramo de caseinato como material de partida.

45 **Ejemplo 7**

Liberación de IPP del GMP en una sola etapa de incubación

50 Se llevó a cabo una serie de incubaciones para demostrar que la endoproteasa específica de prolina derivada de *A. niger* y el Sumizyme FP son adecuados para liberar del GMP el tripéptido IPP reductor de la presión sanguínea. En este ensayo se utilizó una preparación de GMP comercialmente disponible Lacprodan CGMP-10, lot # P340205 de Arla, Dinamarca). De acuerdo con sus especificaciones el polvo obtenido lleva aproximadamente 85% de proteína con un contenido aproximado de GMP del 80% (de la proteína presente), es decir, 1 gramo de Lacprodan CGMP-10 en polvo contiene aproximadamente $0,85 \times 0,8 = 0,7$ gramos de GMP puro.

55

El GMP se disolvió en agua desmineralizada (50 gramos de GMP en 450 ml). El pH de esta solución es 6,7. De esta solución se llevaron 135 ml hasta pH 4 con HCl 4 N y se añadió agua para llegar a un volumen de 150 ml y a una concentración de GMP del 10% de sólidos. De la solución de pH 6,7 se llevaron 45 ml a pH 6 con HCl 4 N y 90 ml a pH 8 con KOH 4 N. Se añadió más agua a ambas soluciones para llegar a una concentración de GMP del 10% de sólidos. En la incubación con la endoproteasa específica de prolina se seleccionó el pH 4 porque representa el valor óptimo para este enzima. Como el Sumizyme FP es una mezcla de diversas endoproteasas, aminopeptidasas y carboxipeptidasas, todas ellas con sus valores óptimos de pH, esta incubación se realizó en diferentes condiciones de pH.

Con estas tres soluciones ajustadas a varios valores de pH se llevaron a cabo las incubaciones con los diferentes enzimas, tal como se muestra en la tabla. La endoproteasa específica de prolina se empleó a una concentración de 0,4 U/ml (~ 4,2 U/g de proteína) y el Sumizyme FP a una concentración final de 1 mg/ml (~ 10,4 mg/g de proteína). Todas las incubaciones se hicieron en tubos cónicos Greiner de 50 ml en un baño de agua puesto a 40°C durante 6 horas, con agitación suave. Después de las incubaciones, las muestras se conservaron congeladas a -20°C hasta el análisis por LC/MS/MS. Los datos obtenidos en este último análisis están indicados en la tabla y fueron medidos mediante el uso de soluciones de referencia de IPP, VPP y LPP.

Tabla 2: esquema de incubación de soluciones de GMP con MaxiPro y Sumizyme FP

Nº de incubación	ml de solución de GMP al 10%	ml de solución enzimática esp. de prol. a 10 unidades/ml	ml de solución de Sumizyme FP a 25 mg/ml	pH de la mezcla de incubación
1	48	-		6,7
2	48	2		4
3	48	-	2	4
4	48	-	2	6
5	48	-	2	8

Tabla 3: producción de péptidos tras la incubación enzimática con las diversas soluciones de GMP

Nº de incubación	IPP		VPP		LPP	
	microg/ml	microg/g	microg/ml	microg/g	microg/ml	microg/g
1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2	1657	2367	nd		nd	
3	41	59	3	4	6	9
4	389	556	36	51	nd	
5	570	814	44	63	nd	

microg/ml = microgramo del tripéptido relevante por ml de solución de GMP al 10%
microg/g = microgramo del tripéptido relevante por gramo de proteína GMP
nd = no detectable

De los resultados obtenidos es evidente que la incubación con la endoproteasa específica de prolina da un producto que contiene IPP libre de los péptidos VPP y LPP. La cantidad de IPP liberado en esta incubación no optimizada representa aprox. el 50% del fragmento de IPP presente en el GMP.

Lo más importante es que las incubaciones con el enzima complejo Sumizyme FP también producen la formación de IPP a partir de GMP. Según nuestros datos más eficientemente a pH 8. El hecho de que los rendimientos de IPP con Sumizyme FP sean menores que en la incubación con la endoproteasa específica de prolina refleja meramente un estado de subdosificación del enzima Sumizyme FP en este ensayo. De modo totalmente sorprendente el Sumizyme FP no solo generó IPP, sino también VPP y LPP a partir del material de Lacprodan. Como los tripéptidos VPP y LPP solo existen en la secuencia de aminoácidos de la caseína beta, su presencia ilustra claramente el hecho de que el material de GMP obtenido está contaminado con caseína beta.

Ejemplo 8

Para demostrar las ventajas organolépticas de un hidrolizado que contenga IPP, obtenido a partir de GMP, se realizó un ensayo de cata. En este experimento se incubaron tres substratos distintos, GMP, caseinato potásico y leche descremada, con la endoproteasa específica de prolina de *A. niger*. Usando este enzima puro solo se pudo escindir el IPP presente en la molécula de caseína kappa (véase la patente WO 2006/005757). Todas las tres incubaciones contenían la misma concentración de proteína del 3,5% (p/p) y la misma cantidad de enzima, es decir 4 unidades/gramo de proteína. Para evitar la precipitación de las caseínas, el pH de las soluciones se ajustó a 6,2. La incubación se dejó proseguir durante 3 horas y luego se terminó mediante un breve tratamiento térmico.

En los tres hidrolizados hubo un precipitado importante. Después de centrifugar para eliminar estos precipitados, los sobrenadantes transparentes (que contenían IPP) fueron catados por un panel entrenado formado por 5 personas. Los miembros del panel fueron entrenados con disoluciones de sulfato de quinina a las concentraciones siguientes:

15 mg/l de sulfato de quinina > amargor de intensidad = 1; 20 mg/l de sulfato de quinina > amargor de intensidad = 2; 30 mg/l de sulfato de quinina > amargor de intensidad = 3 y 50 mg/l de sulfato de quinina > amargor de intensidad = 4. El panel puntuó el amargor de cada hidrolizado en una escala de 0 (no amargo) a 4 (muy amargo). Antes de iniciar la sesión de cata se dio a cada panelista una muestra de referencia de 15 mg/l de sulfato de quinina, a la cual se asignó un valor de amargor de intensidad = 1. El hidrolizado de caseína fue calificado de muy amargo, es decir con el valor 4, por todos los miembros del panel de cata. El hidrolizado de leche descremada también fue valorado como amargo por todos los miembros del panel, con una puntuación de 3. Al catar el hidrolizado de GMP el panel dio unánimemente una puntuación de 1. Teniendo en cuenta que del hidrolizado de GMP también cabe esperar la mayor concentración de IPP, los sorprendentes beneficios del proceso según la presente invención quedan claramente demostrados.

Ejemplo 9

Liberación de IPP del GMP por fermentación

En la patente US 6,428,812 se ha descrito la pobre palatabilidad de los productos de leche fermentada y las muchas dificultades encontradas durante la recuperación de péptidos inhibidores del ECA a partir de caldos fermentados. En este ejemplo demostramos que la molécula de GMP también es un sustrato adecuado para la producción de IPP por fermentación.

En este estudio se usaron dos cepas de lactobacilos, el *Lactobacillus acidophilus* LAFTI[®] L10 y el *Lactobacillus casei* LAFTI[®] L26 (DSM Food Specialties, Australia). Ambas cepas se cultivaron en frascos anaeróbicos bajo atmósfera de CO₂ + N₂ (AnaeroGen[®], Oxoid) a 37°C en caldo MRS (Oxoid) durante 24 h. Los precultivos resultantes se inocularon luego en un caldo de fermentación "a" o en un caldo de fermentación "ay". El caldo de fermentación "a" contenía: Tween 80 (1 ml/l), K₂HPO₄ (2 g/l), NaAc (3 g/l), (NH₄)₃Citrate (2 g/l), MgSO₄·7 H₂O (0,2 g/l), MnSO₄·4 H₂O (0,05 g/l), glucosa (20 g/l), GMP (Lacprodan, Aria; 22 g/l). El caldo de fermentación "ay" contenía además extracto de levadura (4,0 g/l). Los caldos de fermentación "a" y "ay" recién inoculados se incubaron otras 24 horas en las condiciones arriba descritas. Luego se centrifugaron estos caldos de fermentación y los sobrenadantes se analizaron por LC/MS para determinar la presencia de los tripéptidos IPP, LPP y VPP. Como ilustra la tabla 4 la presencia de IPP solo se pudo detectar en las incubaciones con la cepa L10 a un nivel de 0,3 mg/l. No hubo presencia de LPP ni de VPP. La cata de las muestras 1 y 5 no reveló ningún gusto significativo.

Tabla 4: liberación de IPP del GMP por fermentación

Tubo	Caldo de fermentación	Cepa	Producción de IPP
1	a	L10	sí
2	ay	L10	sí
3	a	L26	no detectado
4	ay	L26	no detectado
5	a	control sin inóculo	no detectado

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proceso para producir IPP (Ile-Pro-Pro) a partir de GMP (glicomacropéptido de caseína kappa) que consiste en incubar primero el GMP con una aminopeptidasa y a continuación con una proteasa específica de prolina.
2. Proceso según la reivindicación 1, en el cual la proteasa específica de prolina es una endoproteasa específica de prolina.
- 10 3. Proceso según la reivindicación 1 o 2, en el cual la aminopeptidasa no está activa cuando se añade la proteasa específica de prolina.
4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual los péptidos solubles, incluyendo el IPP, que se forman durante la hidrólisis de la fuente proteica se separan y opcionalmente se secan.
- 15 5. Proceso para preparar un producto alimenticio, una bebida o un suplemento dietético, que consiste en
(a) producir una composición que comprende IPP mediante un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y
(b) incorporar dicha composición que contiene IPP a un producto alimenticio, a una bebida o a un suplemento dietético.
- 20 6. Proceso según la reivindicación 5 que también incluye una etapa (c) para separar los péptidos solubles de la proteína hidrolizada.
- 25 7. Proceso según la reivindicación 6, en el cual la etapa (c) tiene lugar después de la etapa (a) y antes de la etapa (b).
- 30 8. Proceso según la reivindicación 5, en el cual el producto alimenticio, la bebida o el suplemento dietético se elige del grupo formado por margarinas, pastas para untar, mantequilla, productos lácteos o bebidas que contienen suero de leche, yogur o leche.

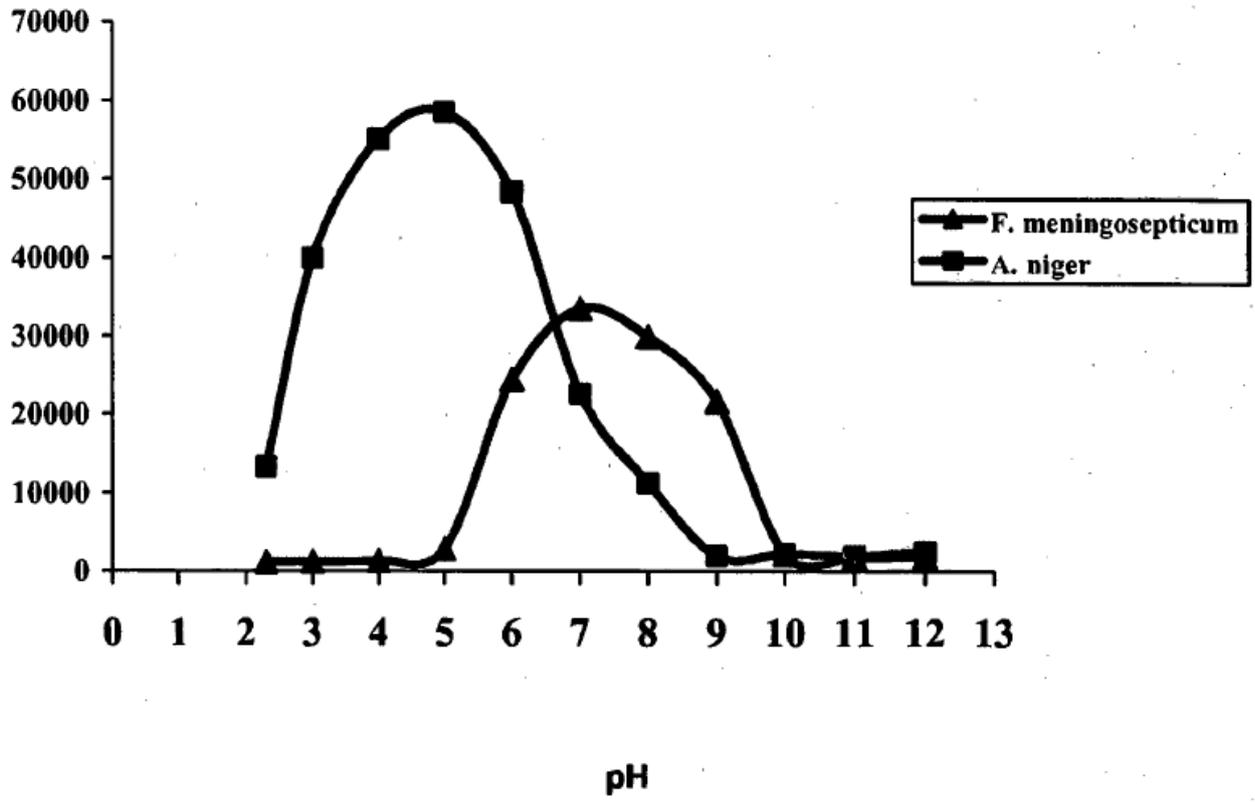


Fig. 1

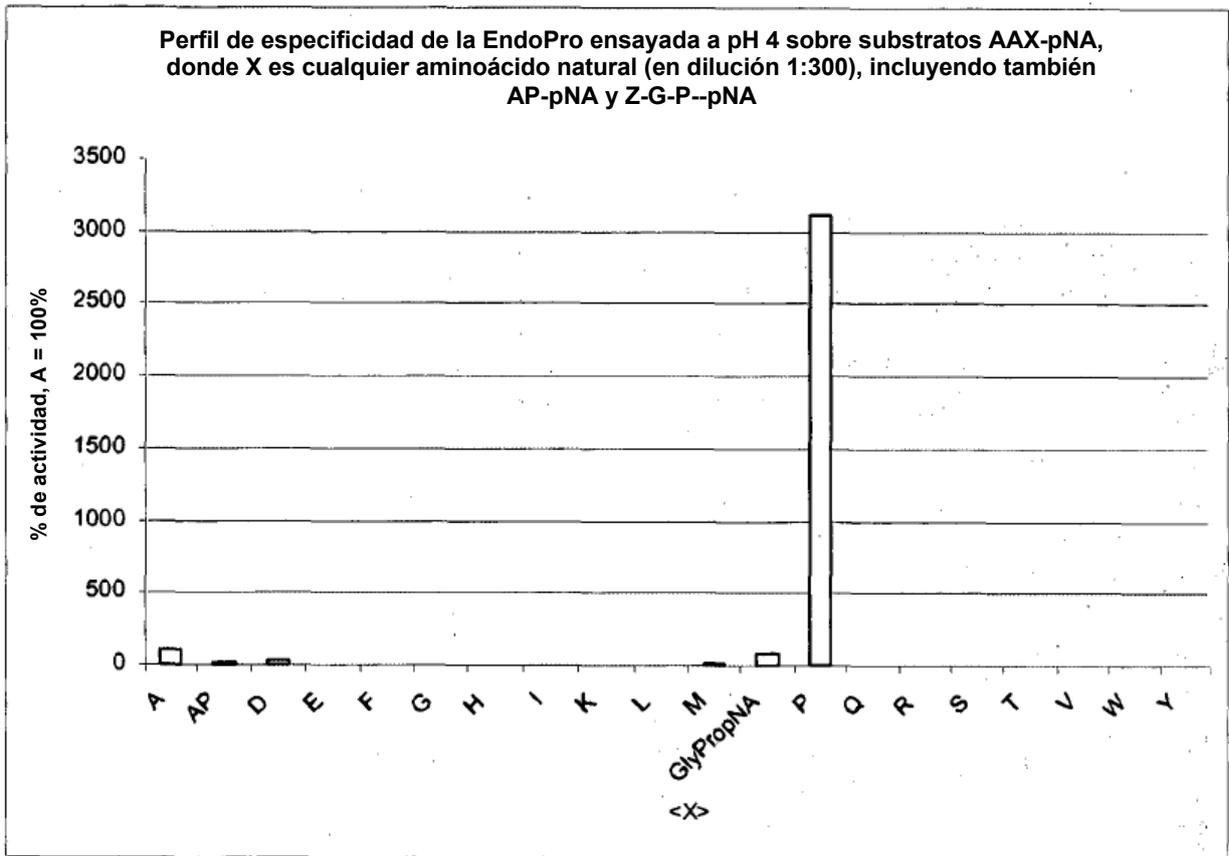


Fig. 2

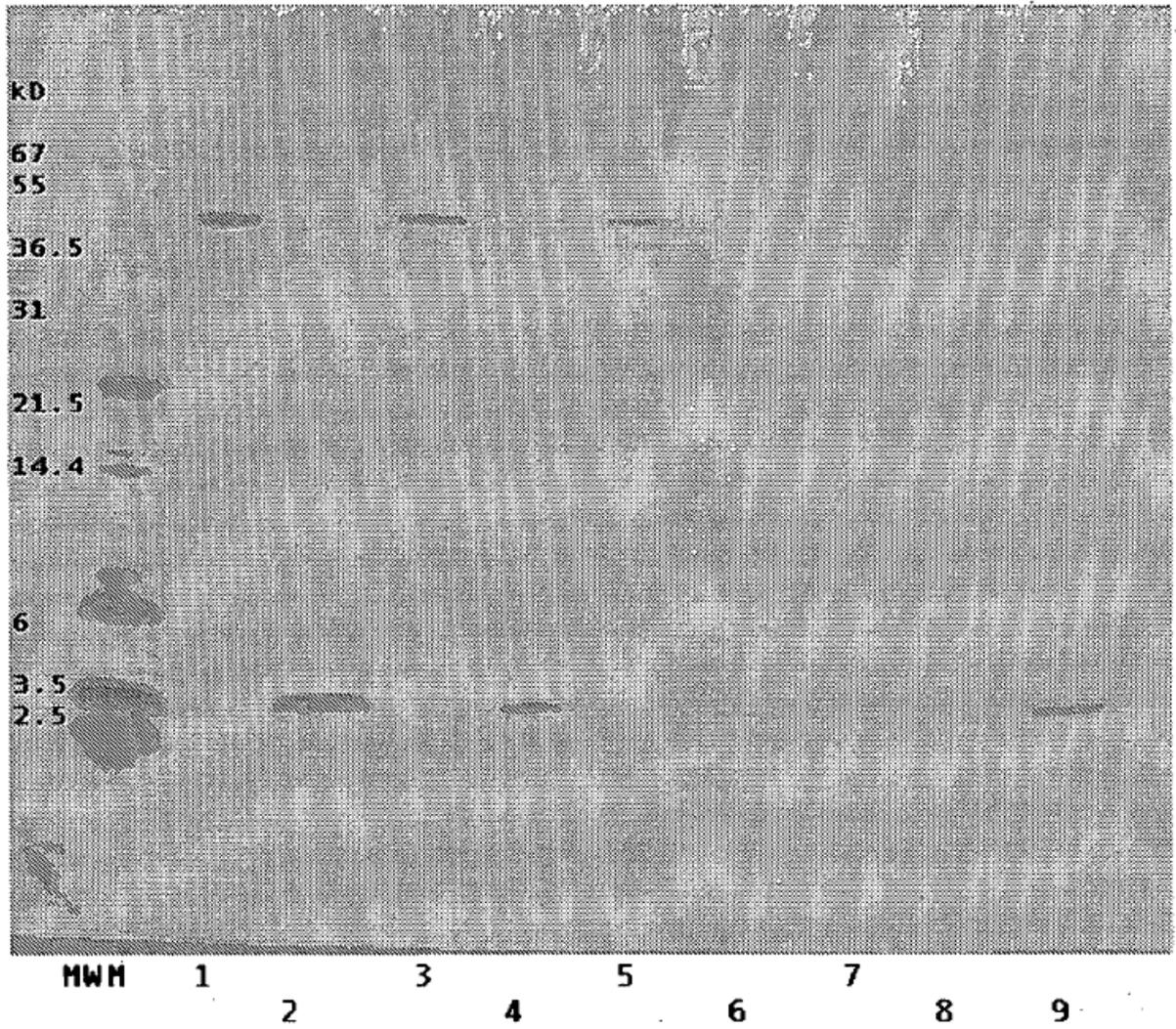


Fig. 3