

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 558**

51 Int. Cl.:

C07K 5/12	(2006.01)	A23L 33/18	(2006.01)
C07D 241/08	(2006.01)		
C07K 5/06	(2006.01)		
A23F 3/16	(2006.01)		
A61K 36/899	(2006.01)		
A61K 31/495	(2006.01)		
A61K 36/185	(2006.01)		
A61K 36/48	(2006.01)		
A23L 33/105	(2006.01)		
A23L 33/17	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2014 PCT/JP2014/065388**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.12.2014 WO14200000**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2014 E 14810329 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020 EP 3012264**

54 Título: **Extracto vegetal que contiene dicetopiperazina y método de producción del mismo**

30 Prioridad:

10.06.2013 JP 2013122259

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

03.09.2020

73 Titular/es:

**SUNTORY HOLDINGS LIMITED (100.0%)
1-40, Dojimahama 2-chome Kita-ku, Osaka-shi
Osaka 530-8203, JP**

72 Inventor/es:

**YAMAMOTO, KENJI;
BEPPU, YOSHINORI;
NAKAHARA, KOICHI;
SUZUKI, TOMONORI;
SHIMA, SOICHIRO y
MURAKAMI, YUKA**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 781 558 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

Extracto vegetal que contiene dicetopiperazina y método de producción del mismo

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un extracto vegetal que contiene una alta concentración de dicetopiperazina y a un método de producción del extracto.

10 Antecedentes de la técnica

A los "dipéptidos", que están compuestos por dos aminoácidos unidos entre sí, se les ha prestado atención como sustancias funcionales. Los dipéptidos pueden proporcionarse con propiedades físicas o funciones novedosas que no poseen los aminoácidos individuales y se espera que sean materiales con una serie de aplicaciones más amplias que las de los aminoácidos. En particular, las dicetopiperazinas, que son dipéptidos cíclicos, son conocidas por tener diversas actividades fisiológicas, tales como una acción antibacteriana o una acción antioxidante (Bibliografía no de patente 1 y 2) y una acción de mejora de la motivación por el aprendizaje (Literatura de patente 1), y se predice que las demandas de dicetopiperazinas aumentarán en los campos médico y farmacológico.

En general, una dicetopiperazina se produce, por ejemplo, mediante síntesis química (bibliografía no de patente 3) o un método enzimático (bibliografía no de patente 2 y 4). Además, se han propuesto un método de síntesis de un péptido cíclico que tiene una secuencia de aminoácidos arbitraria mediante reacciones de deshidratación y ciclación de un péptido lineal en agua de alta temperatura y alta presión, de una región supercrítica o subcrítica (bibliografía de patente 2) y un método de producción de un dipéptido cíclico mediante tratamiento térmico de un dipéptido lineal o un tripéptido lineal en un disolvente acuoso (bibliografía de patente 3 y 4).

El documento JP2011 136916 divulga extractos ácidos y bebidas que contienen 2,5-piperazinediona,3,6-bis(fenilmetil)-(3S,6S) para uso en bebidas.

PRASAD, C. *ET AL.*: "Could dietary proteins serve as cyclo(His-Pro) precursors?", *NEUROPEPTIDES*, vol. 19, n.º 1, mayo de 1991 (1991-05), páginas 17-21, divulgan que los compuestos de dicetopiperazina se producen mediante un tratamiento térmico y/o tratamiento enzimático de proteínas y péptidos, y que los compuestos de dicetopiperazina están contenidos en los hidrolizados de caseína y proteína de soja.

CN 101 461 441 A (UNIV ZHEJIANG GONGSHANG [CN]) 24 de junio de 2009 (24-06-2009) divulga un método de doble extracción de proteínas del té.

LISTADO DE CITAS BILIOGRÁFICAS**40 BIBLIOGRAFÍA DE PATENTE**

Bibliografía de patente 1: Publicación Nacional de Solicitud de Patente Internacional N.º 2012-517998
 Bibliografía de patente 2: Patente japonesa abierta a inspección pública N.º 2003-252896
 Bibliografía de patente 3: Patente coreana abierta a inspección pública N.º 10-2011-0120051
 Bibliografía de patente 4: Patente japonesa N.º 5456876
 Bibliografía de patente 5: Patente japonesa abierta a inspección pública N.º 2010-166911
 Bibliografía de patente 6: Publicación Nacional de Solicitud de Patente Internacional N.º 2012-517214

50 Bibliografía no de patente

Bibliografía no de patente 1: *Peptides*, 16(1), 151-164 (1995)
 Bibliografía no de patente 2: *Bioscience & Industry*, 60(7), 454-457 (2002)
 Bibliografía no de patente 3: *J. Comb. Chem.*, 3, 453-460 (2001)
 Bibliografía no de patente 4: *Chemistry Biology*, 8, 997-1010 (2001)
 Bibliografía no de patente 5: *Agr. Biol. Chem.*, 38(5), 927-932 (1974)

Sumario de la invención**60 Problema técnico**

Aunque, por lo tanto, se espera que las dicetopiperazinas muestren diversas actividades fisiológicas *in vivo*, casi no hay dicetopiperazinas de origen natural y alimentos que contengan altas concentraciones de dicetopiperazinas. Se sabe que las dicetopiperazinas de origen natural están presentes en los alimentos fermentados, tales como el jerez, el vino Shaoxing, la salsa de soja, el vino de arroz dulce para cocina y el vinagre (bibliografía no de patente 5), pero el contenido es significativamente bajo. Para tomar estos alimentos para obtener la funcionalidad de las dicetopiperazinas, se deben tomar cantidades considerablemente grandes de los alimentos. Por tanto, ninguno de

ellos es práctico. Además, se conocen bebidas de café que contienen ciclo(Pro-Phe) o ciclo(Pro-Leu) (bibliografía de patente 5), pero estas dicetopiperazinas son muy amargas y, por lo tanto, son difíciles de aplicar a otras bebidas.

Adicionalmente, se conocen composiciones que contienen cantidades relativamente grandes de dicetopiperazinas obtenidas de proteína animal, tales como el colágeno y la carne, (bibliografía de patente 4 y 6). Sin embargo, debido a su sabor, las composiciones que contienen estas dicetopiperazinas obtenidas de proteína animal no pueden mezclarse directamente con bebidas compuestas principalmente de extractos o jugos vegetales, tales como las bebidas de té, bebidas de café, bebidas de soja y zumos de frutas o refrescos, tales como agua con sabor, agua mineral y bebidas gaseosas.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un extracto que contenga una dicetopiperazina de origen natural y altamente segura a una alta concentración y que tenga buen sabor, y proporcionar un método de producción del extracto.

15 Solución del problema

Los presentes inventores, que han estudiado con esmero para resolver los problemas mencionados anteriormente, descubrieron que se puede producir un extracto vegetal que contiene una alta concentración de dicetopiperazina sometiendo a una planta que contiene proteína a un tratamiento de descomposición para generar péptidos vegetales y sometiendo los péptidos vegetales a un tratamiento a alta temperatura y alta presión en un líquido. Los inventores han confirmado que este extracto vegetal tiene un buen sabor y han llegado a la consumación de la presente invención.

La presente invención se refiere a los siguientes aspectos:

(1) Un extracto vegetal que contiene al menos uno de ciclo-alanil-glutamina, ciclo-alanil-alanina, ciclo-seril-tirosina, ciclo-glicil-leucina, ciclo-glicil-triptófano, ciclo-valil-valina, ciclo-triptofanil-tirosina, ciclo-leucil-triptófano y ciclo-fenilalanil-fenilalanina a una concentración de 10 µg/100 g/Bx o más; donde el extracto vegetal es un extracto de té, un extracto de soja, un extracto de malta o un extracto de sésamo, y

la cantidad total de dicetopiperazina (o dicetopiperazinas) por Bx es de 900 µg/100 g/Bx o más;

(2) El extracto vegetal de acuerdo con el aspecto (1), que es un extracto de té, un extracto de soja o un extracto de malta;

(3) Un método de producción de un extracto vegetal que contiene una alta concentración de dicetopiperazinas que incluyen cicloleucil-leucina y ciclo-leucil-fenilalanina, comprendiendo el método una etapa de someter a un péptido vegetal a un tratamiento a de 100 °C a 170 °C y 0,101 a 0,79 MPa durante 30 a 500 minutos en un líquido, donde el péptido vegetal es un péptido del té, un péptido de la soja, un péptido de la malta o un péptido del sésamo.

(4) El método de acuerdo con el aspecto (3), donde el péptido vegetal es un oligopéptido;

(5) El método de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos (3) o (4), donde el péptido vegetal se prepara sometiendo a una proteína de origen vegetal o a una planta que contiene proteína a un tratamiento de descomposición; donde la planta es una planta de té, una de soja, una de malta o una de sésamo.

(6) El método de acuerdo con el aspecto (5), donde el tratamiento de descomposición es tratamiento térmico o tratamiento enzimático; y

(7) El método de acuerdo con el aspecto (6), donde el tratamiento de descomposición es tratamiento enzimático y la enzima es una proteasa de tipo endoproteasa.

Efectos ventajosos de la invención

De acuerdo con la presente invención, puede producirse de manera simple un extracto vegetal que contiene una alta concentración de una dicetopiperazina de origen natural y altamente segura en una escala de producción en masa, sin precisar un proceso problemático o instalaciones complicadas.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra los resultados de la medición cuantitativa de la concentración de ciclo-fenilalanil-fenilalanina en un producto procesado de péptido vegetal preparado a partir de proteína de soja.

La Fig. 2 muestra los resultados de la medición cuantitativa de la concentración de ciclo-fenilalanil-fenilalanina en un producto procesado de péptido vegetal preparado a partir de proteína de arroz. Estos resultados no son parte de la presente invención.

La Fig. 3 muestra una relación entre el número de veces de preextracción y la tasa de eliminación del componente soluble.

Descripción de las realizaciones

(Péptido vegetal)

El extracto vegetal de la presente invención se puede producir sometiendo a los péptidos vegetales a un tratamiento a alta temperatura y alta presión en un líquido. En el presente documento, la expresión "péptido vegetal" se refiere a un péptido compuesto por varios aminoácidos unidos por despolimerización (formación de oligopéptidos) de una proteína de origen vegetal o de una planta que contiene proteína a través de un tratamiento de descomposición conocido (por ejemplo, tratamiento de descomposición con calor o presión, tratamiento de descomposición con un ácido o álcali, o tratamiento de descomposición con una enzima), a menos que se especifique otra cosa.

El péptido vegetal de la presente invención es un péptido del té, un péptido de la soja, un péptido de la malta o un péptido del sésamo. En el presente documento se divulgan también un péptido de la cebada, un péptido del trigo, un péptido de germen de trigo, un péptido del guisante o un péptido del arroz. Como se describe a continuación, el péptido vegetal puede prepararse a partir de una proteína de origen vegetal o de una planta que contiene proteína o puede ser un producto comercial. Los ejemplos del péptido vegetal disponible en el mercado incluyen péptidos de la soja, tales como HINUTE AM, HINUTE DC e HINUTE HK (todos fabricados por Fuji Oil Co., Ltd.); péptidos del arroz, tales como Oryza Peptide P60 (fabricado por Oryza Oil & Fat Chemical Co., Ltd.); péptidos del trigo, tales como el péptido de glutamina GP-1N y el péptido de glutamina GP-N (ambos fabricados por Nisshin Pharma Inc.); y péptidos del sésamo, tales como Péptido de Sésamo KM-20 (fabricado por KISCO Ltd.).

Los exámenes de los presentes inventores demuestran que el rendimiento de una mezcla de dicetopiperazinas varía dependiendo del tamaño de los péptidos. Los péptidos vegetales incluyen preferentemente una alta proporción de péptidos que tienen un peso molecular de 5000 o menos, más preferentemente un peso molecular de 3000 o menos, y de manera particular preferentemente un peso molecular de 1000 o menos. Además, dado que el uso de la soja, que tiene un alto índice de aminoácidos, permite la generación de múltiples tipos de dicetopiperazinas a una alta concentración, los péptidos de la soja son una de las realizaciones preferentes.

El péptido vegetal de la presente invención puede ser una mezcla de péptidos producida utilizando una proteína de origen vegetal o una planta que contiene proteína como materia prima. En concreto, los ejemplos de la mezcla de péptidos incluyen los producidos por el tratamiento de descomposición conocido (por ejemplo, tratamiento de descomposición con calor o presión, tratamiento de descomposición con un ácido o álcali, o tratamiento de descomposición con una enzima) de una materia prima: una proteína de origen vegetal, tal como proteína de la soja, proteína del suero, proteína de del germen de trigo, proteína del arroz o proteína de del sésamo; o una planta comestible que contiene proteína, tal como una hoja (por ejemplo, hojas de té verde), una semilla (por ejemplo, cebada, trigo, malta, sésamo o arroz), una judía (por ejemplo, soja, judía adzuki o soja negra), una patata (por ejemplo, batata o patata). Entre estas plantas que contienen proteínas, la soja, la malta y las hojas de té se usan preferentemente en la presente invención. En particular, se utilizan preferentemente la soja y las hojas de té, y se usan más preferentemente las hojas de té. El tratamiento de descomposición se aplica a la proteína de origen vegetal mencionada anteriormente o a la planta que contiene proteína como materia prima para preparar una mezcla de péptidos, que se usa como el péptido vegetal. Este tratamiento de descomposición se realiza bajo condiciones que permiten la generación de oligopéptidos. En concreto, el tratamiento de descomposición se realiza para aumentar la proporción de péptidos que tienen un peso molecular de 5000 o menos (preferentemente un peso molecular de 3000 o menos y más preferentemente un peso molecular de 1000 o menos).

El tratamiento de descomposición se realiza preferentemente con calor y/o una enzima debido a la facilidad (alta velocidad de reacción) de generación de un oligopéptido previsto y la facilidad de tratamiento en masa. En particular, se emplea preferentemente el tratamiento de descomposición con una enzima (en lo sucesivo en el presente documento denominado tratamiento enzimático).

El tratamiento de descomposición por calentamiento se realiza en un disolvente para evitar que la planta o la proteína se quemen. La cantidad de disolvente es normalmente de aproximadamente 10 a 100 partes en masa, preferentemente de aproximadamente 15 a 80 partes en masa, más preferentemente de aproximadamente 20 a 60 partes en masa, y de manera particular preferentemente de aproximadamente 20 a 40 partes en masa basado en 1 parte en masa de la planta. El disolvente es preferentemente, por ejemplo, agua, etanol o una mezcla de los mismos, y de manera particular preferentemente agua. El calentamiento puede realizarse bajo cualquier condición que permita la generación de péptidos. Los ejemplos de las condiciones de calentamiento incluyen calentamiento a 100 °C o más y adicionalmente a 125 °C o más durante 30 minutos a varias horas, preferentemente, aproximadamente 2 a 7 horas. Como equipo de tratamiento térmico, por ejemplo, se puede utilizar una olla a presión o una autoclave, dependiendo de las condiciones de calentamiento. Este tratamiento térmico puede realizarse de forma simultánea con la "etapa de tratamiento a alta temperatura y alta presión en un líquido" de la presente invención.

En la producción de péptidos vegetales mediante el tratamiento enzimático, la enzima utilizada es una enzima proteolítica (proteasa) y es preferentemente una proteasa que tiene una alta actividad de descomposición de tipo endoproteasa. La proteasa se clasifica en líneas generales en tres categorías: proteasa alcalina, proteasa neutra y proteasa ácida, basándose en la diferencia del pH óptimo para la acción. Además, el origen de una proteasa es de origen vegetal, un origen animal o un origen microbiano. La enzima puede tener cualquier origen y pH óptimo que no provoque influencias desventajosas, tales como una baja eficacia de descomposición o un mal sabor del extracto de descomposición resultante.

Los ejemplos de proteasa bacteriana que se puede utilizar en la presente invención incluyen Proteasa N, Proteasa NL, Proteasa S y Proleather (R) FG-F (todos fabricados por Amano Enzyme Inc.); Protina NY, Protina P, Deskina, Depirays, Protina A y Thermoase (R) (todas fabricadas por Daiwa Fine Chemicals Co., Ltd.); Bioplase (R) XL-416F, Bioplase (R) SP-4FG y Bioplase (R) SP-15FG (todos fabricados por Nagase ChemteX Corporation); Orientase (R) 90N, Nucleicina (R), Orientase (R) 10NL y Orientase (R) 22BF (todos fabricados por HBI Enzymes Inc.); Aloase (R) AP-10 (fabricado por Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd.); Protamex (R), Neutrase (R) y Alcalase (R) (todas fabricadas por Novozymes Japan Ltd.); COROLASE N, COROLASE 7089, VERON W y VERON P (todos fabricados por AB Enzymes); Enchiron NBS (fabricado por Rakuto Kasei Industrial Co., Ltd.); y Alkali Protease GL440, Purafect (R) 4000L, Proteasa 899 y Protex 6L (todas fabricados por Genencor Kyowa Co., Ltd.). Los ejemplos de proteasa de aspergilo que se puede utilizar en la presente invención incluyen Proteasa N, Proteasa M, Proteasa P, Umamizyme, Peptidasa R, Newlase (R) A y Newlase (R) F (todas fabricadas por Amano Enzyme Inc.); Sumizyme (R) AP, Sumizyme (R) LP, Sumizyme (R) MP, Sumizyme (R) FP y Sumizyme (R) LPL (todas fabricadas por Shinnihon Chemicals Corporation); Protina (R) FN (fabricadas por Daiwa Fine Chemicals Co., Ltd.); Denapsin 2P, Denazyme (R) AP y XP-415 (todas fabricadas por Nagase ChemteX Corporation); Orientase (R) 20A, Orientase (R) ONS y Tetrase (R) S (todas fabricadas por HBI Enzymes Inc.); Molsin (R) F, PD Enzyme, IP Enzyme y AO-Protease (todas fabricadas por Kikkoman Corporation); Sakanase (fabricado por Kaken Pharma Co., Ltd.); Pantidase (R) YP-SS, Pantidase (R) NP-2 y Pantidase (R) P (todas fabricadas por Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd.); Flavourzyme (R) (fabricado por Novozymes Japan Ltd.); Kokulase (R) SS y Kokulase (R) P (ambas fabricadas por Mitsui Lifetech Co., Ltd.); y VERON PS y COROLASE PN-L (ambas fabricadas por AB Enzymes). Los ejemplos de otras proteasas que pueden utilizarse en la presente invención incluyen las proteasas de actinomicetos (por ejemplo, Actinase (R) AS y Actinase (R) AF (ambas fabricadas por Kaken Pharma Co., Ltd.); y Tasinase (R) (fabricado por Genencor Kyowa Co., Ltd.); proteasas de origen vegetal (por ejemplo, Papaína W-40 (fabricada por Amano Enzyme Inc.), papaína purificada de calidad alimentaria (fabricada por Nagase ChemteX Corporation)); y pepsina y tripsina animales.

Entre las proteasas mencionadas anteriormente, desde el punto de vista de la eficacia de descomposición y el sabor de la solución que contiene péptidos resultante, la proteasa es preferentemente una proteasa bacteriana, más preferentemente una proteasa neutra obtenida de *Bacillus subtilis* o una proteasa obtenida de *Bacillus amyloliquefaciens* o *Bacillus stearothermophilus*, y de manera particular preferentemente una proteasa neutra obtenida de *Bacillus subtilis*.

Dicha proteasa se utiliza en una cantidad dentro de un intervalo del 0,1 % al 20 % en peso, preferentemente del 1 % al 15 % en peso, más preferentemente del 3 a 10 % en peso, basado en la cantidad de la proteína de origen vegetal o de la planta que contiene proteína. Una cantidad menor que el intervalo mencionado anteriormente no puede proporcionar el efecto de aumento del rendimiento de la generación de péptidos, mientras que una cantidad mayor que el intervalo mencionado anteriormente no puede lograr un aumento considerable del rendimiento de la generación de péptidos, lo cual es desventajoso en costos. En el tratamiento enzimático, se añade agua a una proteína de origen vegetal o una planta para permitir que la enzima actúe sobre la proteína o planta humedecida. La cantidad de agua a añadir es normalmente de aproximadamente 10 a 50 partes en masa, más preferentemente de aproximadamente 10 a 30 partes en masa, y de manera particular preferentemente de aproximadamente 10 a 20 partes en masa basado, basado en 1 parte en masa de la proteína o planta seca.

Las condiciones para el tratamiento enzimático mediante una proteasa pueden determinarse en vista de las condiciones óptimas para la proteasa y normalmente son de 20 °C a 70 °C (preferentemente 30 °C a 60 °C y más preferentemente 40 °C a 60 °C) durante aproximadamente 30 min a 24 horas (preferentemente 1 a 12 horas y más preferentemente 1 a 6 horas).

Dado que los sitios de acción de las enzimas sobre la proteína como sustrato son distintos según los tipos de enzimas, la composición de la mezcla de dicetopiperazinas preparada por la presente invención puede variarse. Por consiguiente, la enzima se puede seleccionar en vista de la composición de una mezcla de dicetopiperazinas deseada. Se pueden utilizar dos o más enzimas en combinación.

Cuando una planta se utiliza para péptidos vegetales, el pretratamiento para reducir la cantidad de proteína soluble en agua contenida en la planta se realiza preferentemente antes de la etapa de generación de péptidos mediante el tratamiento de descomposición descrito anteriormente. Los exámenes de los presentes inventores demuestran que la reducción de la proteína soluble en agua por adelantado aumenta considerablemente el rendimiento de péptidos generados por el tratamiento de descomposición o el rendimiento de dicetopiperazinas generadas por el tratamiento térmico de la presente invención. Los ejemplos del pretratamiento para eliminar la proteína soluble en agua incluyen un método en el que la proteína soluble en agua se eluye calentando una planta en un líquido, se realiza la separación sólido-líquido para recoger el sólido (planta) y el sólido se descompone, y un método en el que una planta se somete a un tratamiento de extracción con un disolvente acuoso, tal como agua, y el residuo de extracción se descompone (en lo sucesivo en el presente documento estos métodos se denominan en conjunto "preextracción"). En la preextracción, se sumerge una planta en un disolvente de extracción cuyo peso es preferentemente de aproximadamente 15 veces o más, más preferentemente de aproximadamente 15 a 150 veces, el peso de la planta y el componente soluble, tal como la proteína soluble en agua, contenido en la planta, se eluye.

En este caso, el disolvente de extracción se puede calentar de antemano. Como alternativa, se sumerge una planta en un disolvente de extracción y el disolvente se puede calentar para la extracción. El disolvente de extracción es preferentemente agua pura y puede ser agua pura que contenga de forma apropiada un disolvente orgánico, tal como etanol. El disolvente de extracción puede contener minerales para ajustar de forma apropiada la dureza del mismo.

La preextracción puede realizarse a cualquier temperatura de extracción y generalmente se realiza a aproximadamente 50 °C a 100 °C, preferentemente de aproximadamente 60 °C a 95 °C, y más preferentemente de aproximadamente 70 °C a 90 °C. El tiempo de extracción es de aproximadamente 1 min a 24 horas, preferentemente de aproximadamente 3 min a 20 horas. Las condiciones de extracción, tales como la temperatura y el tiempo de extracción, se ajustan de modo que la tasa de eliminación del componente soluble en el residuo de extracción resultante sea del 60 % o más, preferentemente el 70% o más, más preferentemente el 80 % o más, más preferentemente el 90 % o más y de manera particular preferentemente el 95 % o más. La tasa de eliminación del componente soluble significa la proporción relativa del sólido recogido con la solución de extracción cuando la cantidad máxima del componente soluble que se puede eliminar se define como el 100 %, y es el valor calculado por la expresión: "(la cantidad (cantidad total: g) de solución obtenida por preextracción x su Brix [Bx])/(la cantidad máxima (g) del componente soluble que se puede eliminar x su Brix [Bx]) x 100 (%)". A lo largo de la memoria descriptiva, "la cantidad máxima del componente soluble que se puede eliminar" se indica convenientemente por "la cantidad de la solución obtenida repitiendo, diez veces, la extracción con agua hirviendo de una cantidad de 30 veces el peso de la planta durante 10 min". A lo largo de la memoria descriptiva, el término "Bx" se puede medir con una escala de Bx disponible en el mercado.

La preextracción de una planta puede realizarse una o varias veces. El extracto obtenido mediante preextracción se puede desechar o se puede utilizar añadiéndolo a un alimento o bebida. Por ejemplo, el extracto mezclado con un extracto vegetal que contiene una dicetopiperazina preparada por la presente invención se puede añadir a un alimento o bebida.

(Tratamiento térmico)

En el método de producción de la presente invención, las dicetopiperazinas se generan sometiendo tales péptidos vegetales a un tratamiento a alta temperatura y alta presión en un líquido. El líquido para el tratamiento a alta temperatura y alta presión es preferentemente agua pura y puede ser agua pura que contiene de forma apropiada un disolvente orgánico, tal como etanol. El disolvente de extracción puede contener minerales para ajustar de forma apropiada la dureza del mismo. El líquido para el tratamiento térmico se concentra o diluye opcionalmente para tener un Brix (Bx) de aproximadamente 0,1 a 50.

A lo largo de la memoria descriptiva, la expresión "alta temperatura y alta presión" se refiere a una temperatura de 100 °C o más, y una presión que supera la presión atmosférica. Como aparato de extracción de alta temperatura y alta presión, por ejemplo, se puede utilizar un aparato de extracción resistente a la presión, una olla a presión o una autoclave, dependiendo de las condiciones.

La temperatura de alta temperatura y alta presión es de 100 °C a 170 °C, preferentemente de 110 °C a 150 °C, y de forma particular preferentemente 120 °C a 140 °C. En el caso de utilizar un aparato de extracción resistente a la presión como aparato de calentamiento, esta temperatura es la temperatura de salida medida de la columna de extracción. En el caso de utilizar una autoclave como aparato de calentamiento, esta temperatura es la temperatura medida en el centro del recipiente a presión. La presión es de 0,101 a 0,79 MPa y preferentemente de 0,101 a 0,48 MPa. El tiempo de calentamiento es de aproximadamente 30 a 500 minutos y preferentemente de aproximadamente 60 a 300 minutos.

Otras condiciones óptimas para el tratamiento térmico están dentro de un intervalo de tiempo y temperatura rodeados por los siguientes sistemas de coordenadas (i) a (vi), en que el tiempo (min) se representa en el eje horizontal y la temperatura (°C) en el eje vertical.

(i) (170 °C, 30 min), (ii) (150 °C, 30 min), (iii) (115 °C, 180 min), (iv) (105 °C, 480 min), (v) (135 °C, 480 min) y (vi) (150 °C, 180 min).

Después del tratamiento a alta temperatura y alta presión en un líquido, la fracción líquida se recoge realizando opcionalmente separación sólido-líquido para obtener un extracto vegetal que contiene una alta concentración de las dicetopiperazinas de la presente invención. La separación sólido-líquido se logra por filtración y/o centrifugación.

Aunque la composición de las dicetopiperazinas en el extracto vegetal resultante que contiene una alta concentración de las dicetopiperazinas varía dependiendo del origen (el tipo de planta como materia prima) de los péptidos vegetales y del tipo de enzima, el tratamiento a alta temperatura y alta presión de los péptidos vegetales de la presente invención en un líquido puede aumentar la cantidad de al menos una dicetopiperazina seleccionada del grupo que consiste en cicloalanil-glutamina (Número de registro CAS: 268221-76-7; Ciclo(Ala-Gln)), ciclo-histidil-treonina (número de registro CAS: 53109-32-3; Ciclo(His-Pro)), ciclo-alanil-alanina (número de registro CAS: 5845-

61-4; Ciclo(Ala-Ala)), ciclo-glicil-prolina (número de registro CAS: 3705-27-9; Ciclo(Gly-Pro)), ciclo-seril-tirosina (número de registro CAS: 21754-31-4; Ciclo(Ser-Tyr)), ciclo-prolil-treonina (número de registro CAS: 227777-31-3; Ciclo(Pro-Thr)), ciclo-histidil-fenilalanina (número de registro CAS: 56586-95-9; Ciclo(His-Phe)), ciclo-alanil-prolina (número de registro CAS: 65556-33-4; Ciclo(Ala-Pro)), ciclo-fenilalanil-serina (número de registro CAS: 35591-00-5; Ciclo(Phe-Ser)), ciclo-glicil-leucina (número de registro CAS: 5845-67-0; Ciclo(Gly-Leu)), ciclo-glicil-fenilalanina (número de registro CAS: 10125-07-2; Ciclo(Gly-Phe)), ciclo-propil-prolina (Ciclo(Pro-Pro)), ciclo-glicil-triptófano (Ciclo(Gly-Trp)), ciclo-aspartil-fenilalanina (número de registro CAS: 5262-10-2; Ciclo(Asp-Phe)), ciclo-valil-prolina (Ciclo(Val-Pro)), ciclo-prolil-tirosina (Ciclo(Pro-Tyr)), ciclo-metionil-prolina (Ciclo(Met-Pro)), ciclo-metionil-metionina (Ciclo(Met-Met)), ciclo-valilvalina (Ciclo(Val-Val)), ciclo-leucil-prolina (número de registro CAS: 2873-36-1; Ciclo(Leu-Pro)), ciclo-triptofaniltirosina (Ciclo(Trp-Tyr)), ciclo-fenilalanil-prolina (número de registro CAS: 3705-26-8; Ciclo(Phe-Pro)), ciclo-leuciltriptófano (número de registro CAS: 15136-34-2; Ciclo(Leu-Trp)), ciclo-fenilalanil-triptófano (número de registro CAS: 82597-82-8; Ciclo(Phe-Trp)), ciclo-leucil-fenilalanina (número de registro CAS: 7280-77-5; Ciclo(Leu-Phe)), cicloleucil-leucina (número de registro CAS: 952-45-4; Ciclo(Leu-Leu)) y ciclo-fenilalanil-fenilalanina (Número de registro CAS: 2862-51-3; Ciclo(Phe-Phe)).

En particular, la presente invención es ventajosa para la producción de un extracto vegetal que contiene una alta concentración de dicetopiperazinas que incluyen Ciclo(Leu-Leu) y Ciclo (Leu-Phe) en concentraciones relativamente altas. La presente invención también es ventajosa para la producción de un extracto vegetal que contiene una alta concentración de Ciclo(Phe-Phe).

Una dicetopiperazina natural de origen vegetal que contiene una alta concentración de una dicetopiperazina específica puede producirse selectivamente a partir de un extracto vegetal que contiene una alta concentración de la dicetopiperazina de la presente invención mediante un tratamiento de purificación conocido. Por consiguiente, desde un punto de vista, la presente invención se refiere a un método para la producción de un extracto vegetal que contiene una alta concentración de dicetopiperazinas que incluyen Ciclo(Leu-Leu) y Ciclo(Phe-Phe) y, desde otro punto de vista, la presente invención se refiere a un método para la producción de una dicetopiperazina específica (por ejemplo, Ciclo(Ala-Ala), Ciclo(Leu-Phe), Ciclo(Leu-Leu) o Ciclo(Phe-Phe)).

(Extracto vegetal)

A lo largo de la memoria descriptiva, el término "extracto" se refiere a un extracto líquido, y un "extracto vegetal" de la presente invención se refiere a un extracto líquido preparado por tratamiento de extracción de una planta o su producto procesado.

La presente invención puede proporcionar un extracto vegetal que contiene al menos uno de Ciclo(Ala-Gln), Ciclo(Ala-Ala), Ciclo(Ser-Tyr), Ciclo(Gly-Trp), Ciclo(Val-Val), Ciclo(Trp-Tyr), Ciclo (Leu-Trp) y Ciclo (Phe-Phe) en una cantidad por Bx de 10 µg/100 g/Bx o más.

La presente invención proporciona un extracto vegetal que contiene dicetopiperazinas en una cantidad total de 900 µg/100 g o más, preferentemente 1000 µg/100 g o más, más preferentemente 2000 µg/100 g o más, y de manera particular preferentemente 5000 µg/100 g o más. A lo largo de la memoria descriptiva, a menos que se indique otra cosa, la cantidad total de dicetopiperazinas se refiere a la suma de las cantidades de Ciclo(Ala-Gln), Ciclo (His-Pro), Ciclo (Ala-Ala), Ciclo (Gly-Pro), Ciclo (Ser-Tyr), Ciclo (Pro-Thr), Ciclo (His-Phe), Ciclo (Ala-Pro), Ciclo (Phe-Ser), Ciclo (Gly-Leu), Ciclo (Gly-Phe), Ciclo (Pro-Pro), Ciclo (Gly-Trp), Ciclo (Asp-Phe), Ciclo (Val-Pro), Ciclo (Pro-Tyr), Ciclo (Met-Pro), Ciclo (Met-Met), Ciclo (Val-Val), Ciclo (Leu-Pro), Ciclo (Trp-Tyr), Ciclo (Phe-Pro), Ciclo (Leu-Trp), Ciclo (Phe-Trp), Ciclo (Leu-Phe), Ciclo (Leu-Leu) y Ciclo (Phe-Phe).

En general, dado que un extracto que tiene un alto Bx contiene diversas sustancias (por ejemplo, sustancias amargas) procedentes de la materia prima en una alta concentración, el extracto en sí mismo es inadecuado como bebida, y la adición del extracto a una bebida también es inadecuada debido a la influencia en el sabor o la sensación en la lengua. Por consiguiente, con respecto a la adición a una bebida, se prefiere un Bx más bajo. La presente invención puede proporcionar un extracto vegetal que contiene una gran cantidad de dicetopiperazinas de sustancias fisiológicamente activas y que tiene un bajo Bx, es decir, un extracto vegetal que tiene una alta relación del contenido de dicetopiperazinas con respecto al Bx. En concreto, se proporciona un extracto vegetal que tiene una relación de la cantidad total (unidad: µg/100 g) de las dicetopiperazinas mencionadas anteriormente con respecto al Brix (Bx) de 900 (µg/100 g/Bx) o más, preferentemente 1000 (µg/100 g/Bx) o más, más preferentemente 2000 (µg/100 g/Bx), y más preferentemente 5000 (µg/100 g/Bx). El límite superior de la cantidad de dicetopiperazinas en un extracto no está particularmente limitado y puede determinarse apropiadamente a la luz de la solubilidad de las dicetopiperazinas y habitualmente es de aproximadamente 1000 mg/100 g o menos, preferentemente de aproximadamente 500 mg/100 g o menos, y más preferentemente de aproximadamente 200 mg/100 g o menos.

En el caso de un extracto vegetal preparado aplicando el método de producción de la presente invención a una planta como materia prima, la generación de subproductos es baja, dado que no se realiza fermentación. Además, la preextracción reduce la cantidad del componente soluble para proporcionar un extracto vegetal que tiene un sabor característico de amargor significativamente bajo.

Dicho extracto vegetal tiene un buen sabor y también un excelente aspecto sin, por ejemplo, precipitación y turbidez y, por lo tanto, pueden utilizarse directamente como extracto o para condimentos, bebidas y otros productos alimenticios sin realizar un protratamiento específico. El extracto vegetal de la presente invención contiene un gran contenido de dicetopiperazinas, pero tiene un bajo Bx relativo. Por consiguiente, la cantidad a añadir a un alimento o bebida (en particular, una bebida) puede ser baja, lo cual es una ventaja para aumentar el grado de libertad en el diseño de una comida o bebida. En particular, la extracción vegetal se puede mezclar directamente con una bebida compuesta principalmente por un extracto o zumo de una planta, tal como una bebida de té, bebida de café, bebida de soja o zumo de fruta o refresco, tal como agua con sabor, agua mineral o una bebida gaseosa. Por ejemplo, una bebida mezclada con un extracto vegetal de la presente invención de manera que la cantidad total de dicetopiperazinas sea de 10 µg/100 g o más, preferentemente 20 µg/100 g o más, más preferentemente 40 µg/100 g o más, y más preferentemente 60 µg/100 g o más, puede tener buen sabor sin amargor.

El extracto vegetal preparado por la presente invención puede someterse a, por ejemplo, tratamiento de clarificación dependiendo de la forma del alimento o bebida a la que se agrega el extracto vegetal. En tal caso, el extracto vegetal tiene la ventaja de que la clarificación se puede realizar fácilmente, dado que, por ejemplo, el extracto no contiene aceite e incluye fibras.

Los ejemplos de una forma preferente del extracto vegetal de la presente invención incluyen extractos de té, extractos de soja o extractos de malta. A continuación se describirán estos extractos en detalle.

(Extracto de té)

A lo largo de la memoria descriptiva, la expresión "extracto de té" se refiere a un extracto de té preparado por tratamiento de extracción de hojas de té. Las hojas de té de la materia prima de extracción son partes bebibles por extracción de una planta de té (nombre científico: *Camellia sinensis*), tales como hojas y tallos de hojas de té. Además, las hojas de té pueden estar en cualquier forma, tal como una macrófila o forma en polvo. El tiempo de cosecha de las hojas de té puede ser en cualquier momento y se selecciona adecuadamente para obtener el sabor deseado.

El extracto vegetal (extracto de té) que contiene una alta concentración de dicetopiperazinas preparadas por la presente invención se caracteriza por el proceso de producción sin realizar fermentación para inhibir la generación de subproductos y obtener un buen sabor. Desde el punto de vista de este sabor, las hojas de té son preferentemente de té no fermentado al vapor (té verde), tal como sencha, bancha, houjicha, gyokuro, kabusecha y té dulce, o té kamairi sin fermentar, tal como ureshinocha, aoyagicha, o una variedad de té chino.

Los presentes inventores midieron las concentraciones de dicetopiperazinas en extractos de té preparados extrayendo hojas de té disponibles en el mercado. Los resultados demuestran que el té fermentado contiene una cantidad significativamente baja (aproximadamente 0 a 200 µg/100 g/Bx) de las dicetopiperazinas y que el té verde no contiene sustancialmente las dicetopiperazinas (véase la Tabla 1, el método de medición es el mismo que el mostrado en el Ejemplo 1).

[Tabla 1]

TR (min)	Concentración de dicetopiperazinas (ppm/Bx)	Té verde	Goishicha	Té Pu-erh 1	Té Pu-erh 2
3,6	Ala-Gln	0,0	0,0	0,0	0,0
3,7	His-Pro	0,0	0,2	0,0	0,0
4,4	Ala-Ala	0,0	0,0	0,0	0,0
5,6	Gly-Pro	0,0	0,1	0,1	0,1
5,8	Ser-Tyr	0,0	0,0	0,0	0,0
5,8	Pro-Thr	0,0	0,6	0,2	0,1
6,5	His-Phe	0,0	0,0	0,0	0,0
6,7	Ala-Pro	0,0	0,2	0,3	0,2
7,4	Phe-Ser	0,0	0,0	0,0	0,0
7,8	Gly-Leu	0,0	0,0	0,0	0,0
8,1	Gly-Phe	0,0	0,0	0,0	0,0
8,6	Pro-Pro	0,0	0,1	0,1	0,1
8,6	Gly-Trp	0,0	0,0	0,0	0,0
8,9	Asp-Phe	0,0	0,0	0,0	0,0
9,2	Val-Pro	0,0	0,1	0,2	0,2
9,4	Pro-Tyr	0,0	0,1	0,1	0,1
9,6	Met-Pro	0,0	0,0	0,0	0,0
10,2	Met-Met	0,0	0,0	0,0	0,0
10,2	Val-Val	0,0	0,0	0,0	0,0
10,7	Leu-Pro	0,0	0,2	0,1	0,1

(continuación)

TR (min)	Concentración de dicetopiperazinas (ppm/Bx)	Té verde	Goishicha	Té Pu-erh 1	Té Pu-erh 2
10,5	Trp-Tyr	0,0	0,0	0,0	0,0
11,0	Phe-Pro	0,0	0,1	0,1	0,1
11,2	Leu-Trp	0,0	0,0	0,0	0,0
11,8	Phe-Trp	0,0	0,0	0,0	0,0
12,3	Leu-Phe	0,0	0,0	0,0	0,0
12,4	Leu-Leu/Ile-Ile	0,0	0,0	0,0	0,0
12,6	Phe-Phe	0,0	0,0	0,0	0,0
	Concentración total (ppm/Bx)	0,0	1,9	1,2	0,8
	Concentración total por unidad de Bx ($\mu\text{g}/100 \text{ g/Bx}$)	0	193	119	82

Por el contrario, el extracto de té de la presente invención contiene al menos uno de Ciclo(Ala-Gln), Ciclo(Ala-Ala), Ciclo(Ser-Tyr), Ciclo(Gly-Trp), Ciclo(Val-Val), Ciclo(Trp-Tyr), Ciclo(Leu-Trp) y Ciclo(Phe-Phe) de las dicetopiperazinas, que no están contenidos en tés convencionales, a una concentración de 10 $\mu\text{g}/100 \text{ g/Bx}$ o más.

Como alternativa, el extracto de té de la presente invención contiene cada uno de Ciclo (Ala-Gln), Ciclo (His-Pro), Ciclo (Ala-Ala), Ciclo (Gly-Pro), Ciclo (Ser-Tyr), Ciclo (Pro-Thr), Ciclo (His-Phe), Ciclo (Ala-Pro), Ciclo (Phe-Ser), Ciclo (Gly-Leu), Ciclo (Gly-Phe), Ciclo (Pro-Pro), Ciclo (Asp-Phe), Ciclo (Val-Pro), Ciclo (Pro-Tyr), Ciclo (Met-Pro), Ciclo (Leu-Pro), Ciclo (Phe-Pro), Ciclo (Leu-Phe) y Ciclo (Leu-Leu) a una concentración de 0,1 ppm/Bx (10 $\mu\text{g}/100 \text{ g/Bx}$ o más. El extracto de té contiene preferentemente cada una de las dicetopiperazinas mencionadas anteriormente a una concentración de 0,2 ppm/Bx o más, más preferentemente de 0,3 ppm/Bx o más, más preferentemente de 0,4 ppm/Bx o más, y de manera particular preferentemente de 0,5 ppm/Bx o más. Adicionalmente, el extracto de té puede contener cada uno de Ciclo(Gly-Trp), Ciclo(Val-Val), Ciclo(Trp-Tyr), Ciclo(Leu-Trp), Ciclo(Phe-Trp) y Ciclo(Phe-Phe) a una concentración de 0,1 ppm/Bx (10 $\mu\text{g}/100 \text{ g/Bx}$ o más, preferentemente de 0,2 ppm/Bx o más, y más preferentemente de 0,3 ppm/Bx o más.

Las dicetopiperazinas que se sabe que tienen un fuerte amargor son Ciclo(Leu-Pro) y Ciclo(Phe-Pro) de las dicetopiperazinas contenidas en las bebidas de café (véase la Patente japonesa abierta a inspección pública N.º 2010-166911) y Ciclo(Leu-Trp) de un tratamiento de descomposición producto de la caseína (Protein Research Foundation, Peptide Institute, Inc., N.º 2, 1974). El extracto de té de la presente invención contiene estas dicetopiperazinas que tienen un fuerte amargor, pero el extracto en sí no tiene sustancialmente amargor. Una solución acuosa que contiene Ciclo(Leu-Pro), Ciclo(Phe-Pro) y Ciclo(Leu-Trp) en las mismas concentraciones que las del extracto de té tiene un fuerte amargor. Por lo tanto, se sugiere que otras dicetopiperazinas y componentes procedentes del té presentes en el extracto de té reduzcan de forma aditiva o sinérgica el amargor de Ciclo(Leu-Pro), Ciclo(Phe-Pro) y Ciclo(Leu-Trp). En particular, un extracto de té que tiene una relación [(B)/(A)] de la cantidad total (B) de las dicetopiperazinas que tienen amargor, Ciclo(Leu-Pro), Ciclo(Phe-Pro) y Ciclo(Leu-Trp), con respecto la cantidad total (A) de Ciclo(Leu-Leu) y Ciclo(Leu-Phe) de 1,0 o menos (preferentemente 0,8 o menos, más preferentemente 0,6 o menos, y de forma particular preferentemente 0,4 o menos) es un extracto que contiene dicetopiperazinas que no tiene ningún sabor tal como el amargor y se puede añadir directamente a los alimentos y bebidas (en particular, a bebidas).

La cantidad total de dicetopiperazinas por Bx en el extracto de té es de 900 $\mu\text{g}/100 \text{ g/Bx}$ o más, preferentemente de 900 a 30000 $\mu\text{g}/100 \text{ g/Bx}$, más preferentemente de 2000 a 25000 $\mu\text{g}/100 \text{ g/Bx}$, y de manera particular preferentemente de 5000 a 20000 $\mu\text{g}/100 \text{ g/Bx}$. Dicho intervalo de concentraciones es ventajoso para producir un alimento o bebida provisto de las funciones (tales como la actividad fisiológica) de las dicetopiperazinas.

Dicho extracto de té puede producirse convenientemente descomponiendo proteínas en las hojas de té para preparar péptidos del té y sometiendo los péptidos del té a tratamiento a alta temperatura y alta presión. Las hojas de té contienen proteína de forma abundante, en aproximadamente un 25 % (Food Composition Table, 5ª ed.). Por consiguiente, se puede esperar obtener péptidos del té mediante el tratamiento de descomposición de la proteína de las hojas de té con una enzima, tal como una proteasa, pero la acción de las proteasas en las hojas de té no puede proporcionar una gran cantidad de péptidos del té. Dado que el 80 % o más de todas las proteínas en las hojas de té son proteínas insolubles, es preferible preparar péptidos del té haciendo actuar eficazmente una enzima proteolítica sobre la proteína contenida en las hojas de té. En concreto, la proteína soluble en agua se elimina de las hojas de té mediante un pretratamiento y una enzima proteolítica, tal como una proteasa, se deja actuar sobre el residuo de extracción resultante para preparar péptidos del té. Es decir, el extracto de té de la presente invención que contiene una alta concentración de dicetopiperazinas se puede producir convenientemente descomponiendo de forma eficaz proteína insoluble en agua realizando de forma secuencial las siguientes etapas:

- (a) extracción de hojas de té con agua y recolección del residuo de extracción;
- (b) hacer actuar una proteasa de tipo endoproteasa sobre el residuo de extracción en presencia de agua, para

descomponer la proteína de las hojas de té para preparar una solución que contenga péptidos del té;

(c) someter la solución que contiene péptidos del té a un tratamiento a alta temperatura y alta presión para preparar una solución de reacción; y

(d) someter la solución de reacción a un tratamiento de separación sólido-líquido para recoger una solución que contenga dicetopiperazinas, o

(a) extracción de hojas de té con agua y recolección del residuo de extracción;

(b) hacer actuar una proteasa de tipo endoproteasa sobre el residuo de extracción en presencia de agua, para descomponer la proteína de las hojas de té para preparar una solución que contenga péptidos del té;

(d') someter la solución que contiene péptidos del té a un tratamiento de separación sólido-líquido para recoger una solución que contenga péptidos del té; y

(C') someter la solución que contiene péptidos del té a un tratamiento a alta temperatura y alta presión para preparar una solución de reacción que contenga dicetopiperazinas.

Las condiciones para cada etapa son las descritas anteriormente. En la preextracción en la etapa (a), también puede utilizarse un residuo de extracción, tal como las hojas de té utilizadas obtenidas mediante el tratamiento de extracción en, por ejemplo, la producción de bebidas de té. Convencionalmente, las proteínas del té insolubles en agua de las hojas de té no se han utilizado como fuente de nutrientes. Por ejemplo, la mayoría de las más de 22000 toneladas de residuos de extracción generados en la producción de bebidas de té verde en Japón se han descartado como recursos no utilizados, pero el método descrito anteriormente para producir un extracto de té también es útil para la utilización eficaz de tales hojas de té usadas que tradicionalmente se han descartado.

Este método puede producir un extracto de té que contiene una alta concentración de Ciclo(Leu-Leu), Ciclo(Leu-Phe) y Ciclo(Ala-Ala). En concreto, el extracto contiene el 10 % (en peso) o más de Ciclo(Leu-Leu), el 10 % o más de Ciclo(Leu-Phe) y el 7 % o más de ciclo (Ala-Ala), basado en la cantidad total de dicetopiperazinas en el extracto de té. Cuando estos contenidos en peso se expresan en cantidades, el extracto de té contiene cada una de estas dicetopiperazinas a una concentración de 5,0 ppm/Bx (500 µg/100 g/Bx) o más, preferentemente de 8,0 ppm/Bx o más, y más preferentemente de 10,0 ppm/Bx o más. El límite superior de la misma es de aproximadamente 50,0 ppm/Bx o menos, preferentemente de aproximadamente 40,0 ppm/Bx o más, más preferentemente de aproximadamente 35,0 ppm/Bx o más, y más preferentemente de 30,0 ppm/Bx o más.

Además, se encontró que las concentraciones de Ciclo(Leu-Leu), Ciclo(Leu-Phe) y Ciclo (Phe-Phe) aumentan notablemente repitiendo la extracción con agua (preextracción) de las hojas de té en la etapa (a) más de una vez. Por consiguiente, este método también es ventajoso para la producción de Ciclo(Phe-Phe). Los presentes inventores confirmaron que un extracto de té que contiene 3,0 ppm/Bx o más de Ciclo(Phe-Phe) preparado mediante este método tiene una acción de mejora de la motivación por el aprendizaje.

Por otra parte, se sabe que una dicetopiperazina que tiene un grupo funcional hidrófobo potencia la hidrofobicidad al ser circularizado, en un nivel más alto que el del péptido lineal. Los resultados de una prueba de conservación acelerada (55 °C, 2 semanas) del extracto de té descrito anteriormente demuestran que Ciclo(Phe-Phe), que es un componente que tiene la mayor hidrofobicidad, se retiene de forma estable. Por consiguiente, el extracto de té de la presente invención también es útil como un extracto que contiene Ciclo(Phe-Phe). El contenido de Ciclo(Phe-Phe) en el extracto de té se ajusta preferentemente a 10 µg/100 g/Bx o más, 20 µg/100 g/Bx o más, o 30 µg/100 g/Bx o más.

(Extracto de soja)

A lo largo de la memoria descriptiva, la expresión "extracto de soja" se refiere a una solución preparada añadiendo agua a la soja y realizando un tratamiento de extracción o un tratamiento de molienda. La soja (nombre científico: *Glycine max*) como materia prima puede ser de cualquier especie y puede producirse en cualquier área. También se puede usar soja en una etapa de procesamiento, tal como soja triturada. El extracto de soja en la presente memoria descriptiva abarca una solución preparada añadiendo agua a un producto de descomposición de proteínas de la soja, por cuestiones de conveniencia.

Se dice que las proteínas representan aproximadamente el 30 % de la soja. Dado que las proteínas de la soja no incluyen una gran cantidad de proteína insoluble en agua, a diferencia de la proteína del té, el pretratamiento para eliminar la proteína soluble en agua no es esencial y puede realizarse de manera opcional. Cuando no se realiza el pretratamiento para eliminar la proteína soluble en agua, puede producirse un extracto vegetal (extracto de soja) que contiene una alta concentración de dicetopiperazinas de forma más conveniente mediante una reacción de un solo recipiente.

Los presentes inventores midieron las concentraciones de dicetopiperazinas en péptidos de la soja en vista de que a los péptidos de la soja (polvo) disponibles en el mercado se les ha aplicado calor a aproximadamente 180 °C a 220 °C durante el secado por pulverización. Los resultados demuestran que en los péptidos de la soja disponibles en el mercado está presente una cantidad significativamente baja (aproximadamente 650 µg/100 g/Bx) de dicetopiperazinas (ver Tabla 2).

Por el contrario, el extracto de soja de la presente invención contiene al menos uno de Ciclo(Ala-Gln), Ciclo(Ala-Ala), Ciclo(Ser-Tyr), Ciclo(Gly-Trp), Ciclo(Val-Val), Ciclo(Trp-Tyr), Ciclo(Leu-Trp) y Ciclo(Phe-Phe) de las dicetopiperazinas, que no están contenidas en productos convencionales de descomposición de proteínas de soja (péptidos de soja), en una concentración por Bx de 10 µg/100 g/Bx o más.

5 Además, el extracto de soja de la presente invención contiene cada uno de Ciclo (Ala-Gln), Ciclo (His-Pro), Ciclo (Ala-Ala), Ciclo (Gly-Pro), Ciclo (Ser-Tyr), Ciclo (Pro-Thr), Ciclo (His-Phe), Ciclo (Ala-Pro), Ciclo (Phe-Ser), Ciclo (Gly-Leu), Ciclo (Gly-Phe), Ciclo (Gly-Trp), Ciclo (Asp-Phe), Ciclo (Val-Pro), Ciclo (Pro-Tyr), Ciclo (Met-Pro), Ciclo (Val-Val), Ciclo (Leu-Pro), Ciclo (Trp-Tyr), Ciclo (Phe-Pro), Ciclo (Leu-Trp), Ciclo (Leu-Phe), Ciclo (Leu-Leu) y Ciclo (Phe-Phe) a una concentración de 0,1 ppm/Bx (10 µg/100 g/Bx o más. El extracto de soja contiene preferentemente cada una de las dicetopiperazinas mencionadas anteriormente a una concentración de 0,5 ppm/Bx o más, más preferentemente de 0,7 ppm/Bx o más, más preferentemente de 0,9 ppm/Bx o más, de manera particular preferentemente de 1,0 ppm/Bx o más, y de manera particular preferentemente de 1,2 ppm/Bx o más. Adicionalmente, el extracto de soja puede contener cada uno de Ciclo(Pro-Pro) y Ciclo(Phe-Trp) a una concentración de 0,1 ppm/Bx (10 µg/100 g/Bx) o más, preferentemente de 0,2 ppm/Bx o más, y más preferentemente de 0,3 ppm/Bx o más.

20 Este extracto de soja (en particular, un extracto preparado utilizando soja o su producto molido como materia prima) contiene Ciclo(Leu-Pro), Ciclo(Phe-Pro) y Ciclo(Leu-Trp), que se conocen como dicetopiperazinas que tienen un fuerte amargor, pero el extracto ha reducido el amargor. Una solución acuosa que contiene Ciclo(Leu-Pro) y Ciclo(Phe-Pro) en las mismas concentraciones que las del extracto de soja tiene un fuerte amargor. Por lo tanto, se sugiere que otras dicetopiperazinas y componentes procedentes de la soja presentes en el extracto de soja reduzcan de forma aditiva o sinérgica el amargor de Ciclo(Leu-Pro), Ciclo(Phe-Pro) y Ciclo(Leu-Trp). En particular, un extracto de soja que tiene una relación [(B)/(A)] de la cantidad total (B) de las dicetopiperazinas que tienen amargor, Ciclo(Leu-Pro), Ciclo(Phe-Pro) y Ciclo(Leu-Trp), con respecto la cantidad total (A) de Ciclo(Leu-Leu) y Ciclo(Leu-Phe) de 1,0 o menos (preferentemente 0,8 o menos, más preferentemente 0,6 o menos, y de forma particular preferentemente 0,5 o menos) es un extracto que contiene dicetopiperazina que tiene un amargor significativamente reducido y puede mezclarse ventajosamente con alimentos y bebidas (en particular, con bebidas).

30 La cantidad total de dicetopiperazinas por Bx en el extracto de soja es de 900 µg/100 g/Bx o más, preferentemente de 900 a 30000 µg/100 g/Bx, más preferentemente de 2000 a 25000 µg/100 g/Bx, y de manera particular preferentemente de 5000 a 20000 µg/100 g/Bx. Dicho intervalo de concentraciones es ventajoso para producir un alimento o bebida provisto de las funciones (tales como la actividad fisiológica) de las dicetopiperazinas.

35 El extracto de soja de la presente invención que contiene una alta concentración de dicetopiperazinas se puede producir realizando secuencialmente las siguientes etapas:

(x) hace actuar una proteasa de tipo endoproteasa sobre la soja o un producto de descomposición de proteínas de soja en presencia de agua, para preparar una solución que contiene péptidos de la soja;

40 (y) someter la solución que contiene péptidos de soja a un tratamiento a alta temperatura y alta presión para preparar una solución de reacción; y

(z) someter la solución de reacción a un tratamiento de separación sólido-líquido para recoger una solución que contenga dicetopiperazinas.

45 Como en la producción del extracto de té, se puede intercambiar el orden de las etapas (y) y (z). Además, antes de la etapa (x), se puede realizar una etapa (w) para eliminar la proteína soluble en agua. En el caso de utilizar péptidos de la soja que incluyen una gran cantidad de di- o tripéptidos como materia prima, la etapa (x) se realiza: (x') añadiendo agua a los péptidos de la soja, que incluyen una gran cantidad de di- o tripéptidos, para preparar una solución que contenga los péptidos de la soja.

50 Las condiciones de otras etapas son las mismas que las descritas anteriormente.

Este método puede producir un extracto de soja que contiene una alta concentración de Ciclo(Leu-Leu), Ciclo(Leu-Phe), Ciclo(Ser-Tyr) y Ciclo(Pro-Thr). En concreto, el extracto contiene el 8 % (en peso) o más de Ciclo(Leu-Leu), el 8 % o más de Ciclo(Leu-Phe) y el 6 % o más de Ciclo(Ser-Tyr), basado en la cantidad total de dicetopiperazinas en el extracto de soja. El extracto de soja contiene cada una de estas dicetopiperazinas a una concentración de 5,0 ppm/Bx (500 µg/100 g/Bx) o más, preferentemente de 6,0 ppm/Bx o más, y más preferentemente de 7,0 ppm/Bx o más. En particular, se puede preparar un extracto de soja que contiene cada uno de Ciclo(Leu-Leu) y Ciclo(Leu-Phe) a 10,0 ppm/Bx o más, preferentemente 12,0 ppm/Bx o más. El límite superior de la misma es de aproximadamente 50,0 ppm/Bx o menos, preferentemente de aproximadamente 40,0 ppm/Bx o más, más preferentemente de aproximadamente 35,0 ppm/Bx o más, y más preferentemente de 30,0 ppm/Bx o más.

65 Además, este método puede proporcionar un extracto de soja que contenga 3,0 ppm/Bx o más, preferentemente 4,0 ppm/Bx o más, de Ciclo(Phe-Phe), que no está incluido en los péptidos de soja y, por lo tanto, también es ventajoso para producir Ciclo(Phe-Phe) (véanse los ejemplos descritos a continuación). Por otra parte, Se ha confirmado que Ciclo(Phe-Phe), que es un componente altamente hidrófobo, queda retenido de forma estable en

este extracto de soja.

(Extracto de malta)

5 A lo largo de la memoria descriptiva, el término "extracto de malta" se refiere a un extracto preparado por tratamiento de extracción de la malta o su producto molido. La malta de soja (malta) como materia prima puede ser de cualquier especie y puede producirse en cualquier área. En particular, se usa preferentemente la malta de cebada, que son semillas germinadas de cebada. Es práctico y eficaz utilizar una fracción que contenga una gran cantidad de proteína separada de la malta de cebada mediante la eliminación de la piel. La fracción que contiene una gran cantidad de proteína se puede obtener, por ejemplo, raspando gradualmente la superficie de la malta para eliminar la cáscara y luego recolectando una fracción que contiene una gran cantidad de proteína, tal como la capa de aleurona y el endospermo, mediante raspado. Como alternativa, como se realizó para el extracto de té, se puede utilizar un residuo de extracción después de la preextracción. Los ejemplos del residuo de extracción incluyen el bagazo de malta generado en la producción de cerveza.

15 Un extracto vegetal (extracto de malta) que contiene una alta concentración de dicetopiperazinas puede producirse de forma más conveniente mediante una reacción de un solo recipiente utilizando una fracción que contiene una gran cantidad de proteína como materia prima.

20 El extracto de malta de la presente invención contiene al menos uno de Ciclo(Ala-Gln), Ciclo(Ala-Ala), Ciclo(Ser-Tyr), Ciclo(Gly-Trp), Ciclo(Val-Val), Ciclo(Trp-Tyr), Ciclo(Leu-Trp) y Ciclo(Phe-Phe), que son dicetopiperazinas que han sido convencionalmente difíciles de extraer, a una concentración de 10 µg/100 g/Bx o más.

25 Además, el extracto de malta de la presente invención contiene cada uno de Ciclo (Ala-Gln), Ciclo (His-Pro), Ciclo (Ala-Ala), Ciclo (Gly-Pro), Ciclo (Ser-Tyr), Ciclo (Pro-Thr), Ciclo (His-Phe), Ciclo (Ala-Pro), Ciclo (Phe-Ser), Ciclo (Gly-Leu), Ciclo (Gly-Phe), Ciclo (Gly-Trp), Ciclo (Asp-Phe), Ciclo (Val-Pro), Ciclo (Pro-Tyr), Ciclo (Met-Pro), Ciclo (Val-Val), Ciclo (Leu-Pro), Ciclo (Trp-Tyr), Ciclo (Phe-Pro), Ciclo (Leu-Trp), Ciclo (Leu-Phe), Ciclo (Leu-Leu) y Ciclo (Phe-Phe) a una concentración de 0,1 ppm/Bx (50 µg/100 g/Bx o más. El extracto de malta contiene preferentemente cada una de las dicetopiperazinas mencionadas anteriormente a una concentración de 0,3 ppm/Bx o más, más preferentemente de 0,4 ppm/Bx o más, más preferentemente de 0,5 ppm/Bx o más, y de manera particular preferentemente de 0,6 ppm/Bx o más.

30 Este extracto de malta contiene Ciclo(Leu-Pro), Ciclo(Phe-Pro) y Ciclo(Leu-Trp), que se conocen como dicetopiperazinas que tienen un fuerte amargor, pero el extracto ha reducido el amargor. En particular, un extracto de malta que tiene una relación [(B)/(A)] de la cantidad total (B) de las dicetopiperazinas que tienen amargor, Ciclo(Leu-Pro), Ciclo(Phe-Pro) y Ciclo(Leu-Trp), con respecto a la cantidad total (A) de Ciclo(Leu-Leu) y Ciclo(Leu-Phe) de 1,0 o menos (preferentemente 0,8 o menos) es un extracto que contiene dicetopiperazina que tiene un amargor significativamente reducido y puede mezclarse ventajosamente con alimentos y bebidas (en particular, con bebidas).

40 La cantidad total de dicetopiperazinas por Bx en el extracto de malta es de 900 µg/100 g/Bx o más, preferentemente de 900 a 30000 µg/100 g/Bx, más preferentemente de 2000 a 25000 µg/100 g/Bx, y de manera particular preferentemente de 5000 a 20000 µg/100 g/Bx. Dicho intervalo de concentraciones es ventajoso para producir un alimento o bebida provisto de las funciones (tales como la actividad fisiológica) de las dicetopiperazinas.

45 El extracto de malta de la presente invención que contiene una alta concentración de dicetopiperazinas se puede producir realizando secuencialmente las siguientes etapas:

50 (x) hace actuar una proteasa de tipo endoproteasa sobre la malta o un producto de descomposición de proteínas de malta en presencia de agua, para preparar una solución que contiene péptidos de la malta;

(y) someter la solución que contiene péptidos de malta a un tratamiento a alta temperatura y alta presión para preparar una solución de reacción; y

(z) someter la solución de reacción a un tratamiento de separación sólido-líquido para recoger una solución que contenga dicetopiperazinas.

55 Como en la producción del extracto de té, se puede intercambiar el orden de las etapas (y) y (z). Además, antes de la etapa (x), se puede realizar una etapa (w) para eliminar la proteína soluble en agua. Las condiciones de otras etapas son las mismas que las descritas anteriormente.

60 Este método puede producir un extracto de malta que contiene una alta concentración de Ciclo(Leu-Leu), Ciclo(Leu-Phe) y Ciclo(Ala-Ala). En concreto, el extracto de malta contiene cada una de estas dicetopiperazinas a una concentración de 5,0 ppm/Bx (500 µg/100 g/Bx) o más, preferentemente de 6,0 ppm/Bx o más, y más preferentemente de 7,0 ppm/Bx o más. El límite superior de la misma es de aproximadamente 50,0 ppm/Bx o menos, preferentemente de aproximadamente 40,0 ppm/Bx o más, más preferentemente de aproximadamente 30,0 ppm/Bx o más, y más preferentemente de 20,0 ppm/Bx o más.

65

Además, este método puede proporcionar un extracto de malta que contenga 1,0 ppm/Bx o más, preferentemente 2,0 ppm/Bx o más, y más preferentemente 3,0 ppm/Bx o más de Ciclo(Phe-Phe) y, por lo tanto, también es ventajoso para producir Ciclo(Phe-Phe).

5 Ejemplos

La presente invención se describirá a continuación basándose en los Ejemplos, pero no se limita a los siguientes Ejemplos. A lo largo de la memoria descriptiva, a menos que se indique otra cosa, las concentraciones son en peso, y los intervalos de valores numéricos incluyen cada uno sus valores extremos.

(Ejemplo 1) Producción de dicetopiperazina a partir de péptido vegetal

Se utilizaron como péptidos vegetales péptidos de la soja y péptidos del sésamo, y se sometieron a tratamiento a alta temperatura y alta presión en líquidos para producir extractos vegetales que contienen altas concentraciones de dicetopiperazinas. En concreto, se añadieron 15 ml de agua destilada a 3 g de péptidos de soja (HINUTE AM, fabricado por Fuji Oil Co., Ltd.) o péptidos de sésamo (KM-20, fabricado por KISCO Ltd.) y la mezcla se colocó en una autoclave (fabricado por Tomy Seiko Co., Ltd.) y se sometió a un tratamiento a alta temperatura y alta presión a 135 °C y 0,31 MPa durante 3 horas. Además, como Ejemplo comparativo, se utilizaron los mismos péptidos para preparar un extracto sin someterlo al tratamiento a alta temperatura y alta presión. Después del tratamiento, se diluyeron 50 veces 10 ml de cada solución, se sometieron a un tratamiento de membrana y luego aplicaron a LC-MS/MS para determinar la concentración de cada dicetopiperazina. Los detalles de las condiciones del análisis fueron los que se muestran a continuación. Además, se midió el Brix (Bx) de cada extracto vegetal conteniendo una alta concentración de dicetopiperazinas con un refractómetro digital RX-5000a (fabricado por ATAGO Co., Ltd.), y se calculó la relación de la cantidad total (unidad: µg/100 g) de dicetopiperazinas con respecto al Brix (Bx).

[Fórmula 1]

(Condiciones de análisis de la LC-MS/MS)

Aparato de LC: SHIMADZU UFLC XR
 Columna: Agilent technologies Zorbax SB-AQ 1,8 µm 2,1 x 150 mm
 Temperatura de la columna: 40 °C
 Fase móvil: A: ácido fórmico al 0,1 %, B: análisis de gradiente de metanol
 Caudal: relación de alimentación de 0,2 ml/min
 Cantidad de inyección: 2 µl
 Detector: AB Sciex 4000 Q TRAP (R) - nebulización Turbo (ESI) - Control programado de reacciones múltiples (CRM)
 Posición de la boquilla: parte superior: 4 mm, lateral: 7 mm
 Ventana de detección de CRM: 40 s, Tiempo de exploración diana: 0,5 s
 Análisis [modo positivo] en CRM programado
 Condición de la fuente de iones: CUR 20,0, CAD 6, IS 5500, TEM 700, GS1 70, GS2 70

La Tabla 2 muestra los resultados (a lo largo de la memoria descriptiva, Ciclo(Leu-Leu) denota la suma de Ciclo(Leu-Leu) y Ciclo(Ile-Ne)). Se demostró que los extractos vegetales que contienen una alta concentración de dicetopiperazinas se pueden producir convenientemente mediante el tratamiento a alta temperatura y alta presión en un líquido de acuerdo con la presente invención. Además, se sugirió que es posible aumentar la cantidad de al menos una dicetopiperazina seleccionada del grupo que consiste en Ciclo (Ala-Gln), Ciclo (His-Pro), Ciclo (Ala-Ala), Ciclo (Gly-Pro), Ciclo (Ser-Tyr), Ciclo (Pro-Thr), Ciclo (His-Phe), Ciclo (Ala-Pro), Ciclo (Phe-Ser), Ciclo (Gly-Leu), Ciclo (Gly-Phe), Ciclo (Pro-Pro), Ciclo (Gly-Trp), Ciclo (Asp-Phe), Ciclo (Val-Pro), Ciclo (Pro-Tyr), Ciclo (Met-Pro), Ciclo (Met-Met), Ciclo (Val-Val), Ciclo (Leu-Pro), Ciclo (Trp-Tyr), Ciclo (Phe-Pro), Ciclo (Leu-Trp), Ciclo (Phe-Trp), Ciclo (Leu-Phe), Ciclo (Leu-Leu) y Ciclo (Phe-Phe). En particular, Ciclo(Leu-Leu) y Ciclo (Leu-Phe) estaban contenidos en altas concentraciones. En el extracto vegetal que las contiene a una alta concentración el contenido de estas dicetopiperazinas fue del 21,5 %.

[Tabla 2]

TR (min)	Concentración de dicetopiperazinas (ppm/Bx)	Péptido de soja		Péptido de sésamo
		La presente invención 1	Producto comparativo	La presente invención 2
3,6	Ciclo(Ala-Gln)	6,8	0,0	3,0
3,7	Ciclo(His-Pro)	6,7	0,9	1,8
4,4	Ciclo(Ala-Ala)	6,1	0,0	2,8
5,6	Ciclo(Gly-Pro)	5,3	0,0	0,3
5,8	Ciclo(Ser-Tyr)	11,7	0,0	1,3
5,8	Ciclo(Pro-Thr)	8,1	0,5	2,6
6,5	Ciclo(His-Phe)	6,1	0,1	3,3

(conitnuacion)

TR (min)	Concentración de dicetopiperazinas (ppm/Bx)	Péptido de soja		Péptido de sésamo
		La presente invención 1	Producto comparativo	La presente invención 2
6,7	Ciclo(Ala-Pro)	6,9	0,8	2,1
7,4	Ciclo(Phe-Ser)	4,3	0,1	1,3
7,8	Ciclo(Gly-Leu)	4,5	0,0	4,4
8,1	Ciclo(Gly-Phe)	6,1	0,1	6,7
8,6	Ciclo(Pro-Pro)	0,4	0,0	0,1
8,6	Ciclo(Gly-Trp)	1,5	0,0	0,0
8,9	Ciclo(Asp-Phe)	6,6	0,2	6,8
9,2	Ciclo(Val-Pro)	5,8	0,5	0,4
9,4	Ciclo(Pro-Tyr)	3,2	0,2	0,3
9,6	Ciclo(Met-Pro)	2,7	0,5	0,1
10,2	Ciclo(Met-Met)t	0,2	0,1	2,0
10,2	Ciclo(Val-Val)	1,7	0,0	0,4
10,7	Ciclo(Leu-Pro)	6,9	1,1	1,5
10,5	Ciclo(Trp-Tyr)	1,0	0,0	0,3
11,0	Ciclo(Phe-Pro)	8,1	0,4	0,0
11,2	Ciclo(Leu-Trp)	2,7	0,0	4,2
11,8	Ciclo(Phe-Trp)	0,3	0,1	3,9
12,3	Ciclo(Leu-Phe)	14,5	0,3	5,5
12,4	Ciclo(Leu-Leu)	17,9	0,4	6,8
12,6	Ciclo(Phe-Phe)	4,3	0,0	2,8
	Concentración total (ppm/Bx)	150,7	6,5	64,6
	Concentración total por unidad Bx (µg/ 100 g/Bx)	15067	652	6460

(Ejemplo 2) Producción de Ciclo(Phe-Phe) a partir de péptido vegetal

5 Los péptidos vegetales utilizados fueron los siguientes:

1) péptidos de soja "HINUTE AM" (fabricado por Fuji Oil Co., Ltd.): di y tripéptidos: al 67 %, peso molecular promedio: 500

10 2) péptidos de soja "HINUTE DC" (fabricado por Fuji Oil Co., Ltd.): longitud de la cadena: 3 a 7, peso molecular promedio: 1000

3) péptidos de soja "HINUTE HK" (fabricado por Fuji Oil Co., Ltd.)

4) péptidos del arroz "Péptido de Oryza" (fabricado por Oryza Oil & Fat Chemical Co., Ltd.): tripéptidos: 40 % al 50%

15 5) péptidos de trigo "Péptido de glutamina GP-1N" (fabricado por Nisshin Pharma Inc.): peso molecular: 5000 a 10000

6) péptidos de trigo "Péptido de glutamina GP-N" (fabricado por Nisshin Pharma Inc.): peso molecular: 5000 a 10000

20 A 3 g de los péptidos de cada planta se añadieron 15 ml de agua destilada, y la mezcla se colocó en una autoclave (fabricado por Tomy Seiko Co., Ltd.) y se sometió a un tratamiento a alta temperatura y alta presión a 132 °C y 0,29 MPa durante 2 horas. Después del tratamiento, 10 ml de cada solución se sometieron a extracción en fase sólida con OASIS MAX (fabricado por Waters Corporation). El extracto en fase sólida resultante se concentró a presión reducida y luego se disolvió en 100 µl de DMSO. Utilizando 10 µl de la solución, la concentración de ciclo-fenilalanil-fenilalanina se determinó por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

25 La Tabla 3 muestra los resultados. El grado de generación de ciclo-fenilalanil-fenilalanina varió dependiendo del tipo de péptidos. Los péptidos de soja generaron una alta concentración de ciclo-fenilalanil-fenilalanina en comparación con los casos de uso de péptidos de arroz y péptidos de trigo. Esto sugirió que es preferible utilizar péptidos de soja, que incluyen péptidos que tienen un peso molecular de 5000 o menos (en particular, un peso molecular de 1000 o menos) en una alta proporción. La comparación de distintos péptidos de soja sugirió que es preferible utilizar oligopéptidos que tengan un peso molecular más bajo y que contengan una gran cantidad de di- y tripéptidos como materia prima.

35

[Tabla 3]

Concentración de dicetopiperazinas (µg/ml)	Péptido de soja			Péptido de arroz	Péptido de trigo	
	HINUTE AM	HINUTE DC	HINUTE HK	Péptido Oryza	Péptido de glutamina GP-1N	Péptido de glutamina GP-N
Phe-Phe	38,4	25,8	15,1	3,2	0,59	0,33
Bx	20,66	20,10	19,42			
Concentración total por unidad de Bx (µg/100 g/Bx)	186	128	78			

(Ejemplo 3) Producción de dicetopiperazina a partir de proteína de origen vegetal

- 5 Se utilizó como materia prima una proteína de origen vegetal sometida a un tratamiento de descomposición con una enzima. La proteína de origen vegetal utilizada fue proteína de soja (Prolina 900 (fabricada por Fuji Oil Co., Ltd.)) y proteína de arroz (Oryza Protin P70 (fabricada por Oryza Oil & Fat Chemical Co., Ltd.)), y se añadieron 300 mg de cada proteína a 15 ml de agua destilada. A cada mezcla, se añadieron 15 mg de cualquiera de enzima A (ProteAX), enzima B (Newlase F3G: proteasa ácida (endopeptidasa) obtenida de *Rhizopus niveus*), enzima C (Papaína W-40: proteasa obtenida de *Carica papaya*), enzima D (proteasa A "Amano" SD: proteasa obtenida de *Aspergillus* sp.), enzima E (proteasa M "Amano" SD: proteasa obtenida de *Aspergillus* sp.), enzima F (proteasa P "Amano" 3SD: obtenida de *Aspergillus* sp.), enzima G (Promelaína F: proteasa de *Ananas comosus*), enzima H (Peptidasa R), enzima I (Thermoase PC10F: proteasa (endopeptidasa) obtenida de *Bacillus stearothermophilus*), enzima J (Protina SD-NY10: proteasa obtenida de *Bacillus* sp.) y enzima K (Protina SD-AY10: proteasa obtenida de *Bacillus* sp. (todas fabricados por Amano Enzyme Inc.)), y la mezcla resultante se agitó y se mezcló a 37 °C durante 2 horas. Esta solución tratada con enzima se sometió a tratamiento térmico sin realizar separación sólido-líquido. El tratamiento térmico fue un tratamiento a alta temperatura y alta presión a 132 °C durante 2 horas en una autoclave (fabricado por Tomy Seiko Co., Ltd.). Además, se trataron de forma similar proteína de soja y proteína de arroz no tratadas con ninguna enzima. Después del tratamiento, 10 ml de cada solución se sometieron a extracción en fase sólida con OASIS MAX (fabricado por Waters Corporation). El extracto en fase sólida resultante se concentró a presión reducida y luego se disolvió en 100 µl de DMSO. Utilizando 10 µl de la solución, la concentración de ciclo-fenilalanil-fenilalanina se determinó por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

- 25 La Fig. 1 muestra los resultados en el caso de utilizar la proteína de soja, y la Fig. 2 muestra los resultados en el caso de utilizar la proteína de arroz. La proteína no sometida a un tratamiento de descomposición con una enzima (no tratada) también generó la dicetopiperazina por tratamiento térmico. Se demostró que el grado de generación de ciclo-fenilalanil-fenilalanina variaba dependiendo del tipo de enzima y que había una tendencia a que se generara una mayor cantidad de dicetopiperazina mediante el uso de la proteasa obtenida de *Bacillus* sp.

- 30 (Ejemplo 4) Producción (1) de dicetopiperazina a partir de la planta

- 35 Como planta, se utilizaron hojas de té de primera calidad (especies: Yabukita, contenido total de nitrógeno: 6,3 %) producidas en Kagoshima-ken. Las hojas de té se sometieron en primer lugar a un pretratamiento (preextracción, tres veces) para reducir la cantidad de proteína soluble en agua. Es decir, se añadieron 200 g de agua hirviendo a 10 g de las hojas de té, y la mezcla se agitó de manera apropiada durante 5 min para la extracción. Después de la finalización de la extracción, la mezcla se filtró a través de un filtro de malla de 140 para recoger el residuo de extracción (hojas de té usadas). Sobre las hojas de té usadas se vertieron 200 g de agua hirviendo, y se realizó extracción durante 5 min. Las hojas de té usadas se recogieron y se sometieron al tratamiento de extracción nuevamente, y se recogieron las hojas de té usadas.

- 40 Después de la preextracción las hojas de té (hojas de té usadas) se sometieron a un tratamiento de descomposición con una enzima. Se vertieron en las hojas de té usadas (toda la cantidad) 200 g de agua caliente a 50 °C y se añadió a eso 1 g de proteasa (nombre comercial: Protina NY100, fabricado por Daiwa Fine Chemicals Co., Ltd.). La mezcla se hizo reaccionar en un baño de agua de 55 °C durante 3 horas con agitación con una barra de agitación (300 rpm) y luego se mantuvo a 95 °C durante 30 min para inactivar la enzima.

- 50 Esta solución tratada con enzima se sometió a tratamiento térmico en forma de una mezcla líquida de hojas de té sin realizar una separación sólido-líquido. El tratamiento térmico se realizó a alta temperatura y alta presión a 135 °C durante 3 horas en una autoclave (fabricado por Tomy Seiko Co., Ltd.). Después del tratamiento la solución se filtró a través de un filtro de malla de 140 para obtener un extracto de té (extracto A). Este extracto de té (extracto A) (Bx: 0,99) se analizó en cuanto a las dicetopiperazinas como en el Ejemplo 1.

- 55 La Tabla 4 muestra los resultados. Se demostró que un extracto de té que incluye una alta concentración de un extracto vegetal que contiene una alta concentración de dicetopiperazinas se puede producir convenientemente sometiendo hojas de té (hojas de té usadas) a un tratamiento a alta temperatura y alta presión en un líquido.

Además, se sugirió que es posible aumentar la cantidad de al menos una dicetopiperazina seleccionada del grupo que consiste en Ciclo (Ala-Gln), Ciclo (His-Pro), Ciclo (Ala-Ala), Ciclo (Gly-Pro), Ciclo (Ser-Tyr), Ciclo (Pro-Thr), Ciclo (His-Phe), Ciclo (Ala-Pro), Ciclo (Phe-Ser), Ciclo (Gly-Leu), Ciclo (Gly-Phe), Ciclo (Pro-Pro), Ciclo (Gly-Trp), Ciclo (Asp-Phe), Ciclo (Val-Pro), Ciclo (Pro-Tyr), Ciclo (Met-Pro), Ciclo (Met-Met), Ciclo (Val-Val), Ciclo (Leu-Pro), Ciclo (Trp-Tyr), Ciclo (Phe-Pro), Ciclo (Leu-Trp), Ciclo (Phe-Trp), Ciclo (Leu-Phe), Ciclo (Leu-Leu) y Ciclo (Phe-Phe). En particular, la ciclo-leucil leucina y la ciclo-leucil-fenilalanina estaban contenidas en altas concentraciones. En el extracto vegetal que las contiene a una alta concentración el contenido de estas dicetopiperazinas fue del 27,2 %. En la evaluación sensorial del gusto, este extracto de té era sustancialmente insípido e inodoro.

10

[Tabla 4]

Concentración de dicetopiperazinas (ppm/Bx)	Extracto A
Ciclo(Ala-Gln)	6,7
Ciclo(His-Pro)	3,5
Ciclo(Ala-Ala)	11,3
Ciclo(Gly-Pro)	3,3
Ciclo(Ser-Tyr)	8,9
Ciclo(Pro-Thr)	6,9
Ciclo(His-Phe)	4,0
Ciclo(Ala-Pro)	3,2
Ciclo(Phe-Ser)	7,1
Ciclo(Gly-Leu)	9,0
Ciclo(Gly-Phe)	5,3
Ciclo(Pro-Pro)	1,7
Ciclo(Gly-Trp)	2,4
Ciclo(Asp-Phe)	7,1
Ciclo(Val-Pro)	2,9
Ciclo(Pro-Tyr)	1,8
Ciclo(Met-Pro)	0,9
Ciclo(Met-Met)	0,5
Ciclo(Val-Val)	1,1
Ciclo(Leu-Pro)	6,8
Ciclo(Trp-Tyr)	1,3
Ciclo(Phe-Pro)	1,3
Ciclo(Leu-Trp)	2,2
Ciclo(Phe-Trp)	0,8
Ciclo(Leu-Phe)	17,5
Ciclo(Leu-Leu)	21,5
Ciclo(Phe-Phe)	4,2
Concentración total (ppm/Bx)	143,3
Concentración total por unidad de Bx (µg/100 g/Bx)	14326

(Ejemplo 5) Producción (2) de dicetopiperazina a partir de la planta

Se utilizaron como plantas soja hervida en agua y malta disponibles en el mercado. La soja hervida en agua y la malta se sometieron a preextracción, tres veces, con agua hirviendo en una cantidad de 20 veces el peso seco de la planta (soja), como en el Ejemplo 4, y luego se sometieron a un tratamiento enzimático y a un tratamiento a alta temperatura y alta presión en un líquido, como en el Ejemplo 3, para preparar un extracto de soja (extracto B) y un extracto de malta (extracto C). Se supuso que el peso seco de la soja representaba el 36,5 % de la cantidad total de soja hervida en agua, basándose en los datos de Food Composition Table, 5ª ed. El Bx del extracto B y el extracto C se ajustó a 1, y luego cada extracto se analizó en cuanto a las dicetopiperazinas como en el Ejemplo 1. La Tabla 5 muestra los resultados. Se demostró que los extractos vegetales que contienen altas concentraciones de dicetopiperazinas también se pueden producir convenientemente a partir de soja y malta.

[Tabla 5]

Concentración de dicetopiperazinas (ppm/Bx)	Extracto B	Extracto C
Ciclo(Ala-Gln)	5,0	3,2
Ciclo(His-Pro)	3,2	2,0
Ciclo(Ala-Ala)	6,1	8,6
Ciclo(Gly-Pro)	3,0	2,2
Ciclo(Ser-Tyr)	9,4	3,6

25

(continuación)

Concentración de dicetopiperazinas (ppm/Bx)	Extracto B	Extracto C
Ciclo(Pro-Thr)	6,8	4,0
Ciclo(His-Phe)	3,7	2,2
Ciclo(Ala-Pro)	1,9	2,2
Ciclo(Phe-Ser)	2,8	2,2
Ciclo(Gly-Leu)	4,5	4,1
Ciclo(Gly-Phe)	5,4	2,7
Ciclo(Pro-Pro)	0,3	0,3
Ciclo(Gly-Trp)	1,1	0,6
Ciclo(Asp-Phe)	8,7	4,7
Ciclo(Val-Pro)	1,2	1,7
Ciclo(Pro-Tyr)	1,3	1,4
Ciclo(Met-Pro)	0,3	0,3
Ciclo(Met-Met)t	0,3	0,4
Ciclo(Val-Val)	1,4	0,7
Ciclo(Leu-Pro)	2,9	6,4
Ciclo(Trp-Tyr)	0,5	0,6
Ciclo(Phe-Pro)	3,3	3,3
Ciclo(Leu-Trp)	2,7	1,9
Ciclo(Phe-Trp)	0,6	0,3
Ciclo(Leu-Phe)	19,6	7,7
Ciclo(Leu-Leu)	24,2	9,5
Ciclo(Phe-Phe)	5,2	2,3
Concentración total (ppm/Bx)	125,5	79,4
Concentración total por unidad de Bx (µg/100 g/Bx)	12553	7936

(Ejemplo 6) Producción (3) de dicetopiperazina a partir de la planta

- 5 Se utilizaron como planta las mismas hojas de té que las del Ejemplo 4, y se examinó la influencia de la preextracción, del tratamiento enzimático y del tratamiento térmico sobre ellas. Las muestras se muestran en la Tabla 6. Las muestras de las muestras 5 y 6 muestran que la etapa de generación de oligopéptidos a partir de una planta y la etapa de generación de dipéptidos a través de ciclación de oligopéptidos mediante tratamiento a alta temperatura y alta presión en un líquido se realizaron simultáneamente mediante tratamiento térmico. La preextracción se realizó como en el Ejemplo 4, excepto que el número de veces fue de dos. El tratamiento enzimático se realizó como en el Ejemplo 4, excepto que la temperatura de reacción fue de 50 °C. El tratamiento térmico también se realizó como en el Ejemplo 4, excepto que el tiempo de calentamiento se cambió a 8 horas. Los extractos de té resultantes (muestras N.º 1 a 8) se analizaron mediante LC-MS/MS como en el Ejemplo 1.

15 [Tabla 6]

Muestra n.º	Preextracción	Etapas (a)	Etapas (b)
1	No realizada	No realizada	Sin tratamiento térmico
2	Realizada		
3	No realizada	Sin tratamiento enzimático	
4	Realizada		
5	No realizada	Sin tratamiento enzimático, con tratamiento térmico (135 °C, 8 h)	
6	Realizada		
7	No realizada	Sin tratamiento enzimático	Con tratamiento térmico (135 °C, 8 h)
8	Realizada		

La Tabla 7 muestra los resultados. Se reveló que las dicetopiperazinas no se generan si no se realiza el tratamiento a alta temperatura y alta presión en un líquido (muestras N.º 1 a 4). Además, la comparación de las muestras de las muestras N.º 5 a 8 proporcionó los siguientes hallazgos:

- 20 El pretratamiento (tratamiento de extracción) aumenta la concentración de dicetopiperazinas en el extracto de té resultante; y

- 25 Aunque los oligopéptidos pueden prepararse mediante cualquiera de tratamiento térmico y tratamiento enzimático, el tratamiento enzimático fue más eficaz y eficiente.

Se preparó un extracto vegetal (extracto de té) que contiene una cantidad total considerablemente grande de

dicetopiperazinas por Bx, tal como 900 µg/100 g/Bx o más, realizando de forma apropiada la preextracción, el tratamiento térmico y el tratamiento enzimático. Esto sugiere que la presente invención es ventajosa para un extracto vegetal que contiene una alta concentración de dicetopiperazinas y para la producción del mismo. Además, se sugirió que puede prepararse un extracto vegetal (extracto de té) que contiene cada uno de Ciclo (Ala-Gln), Ciclo (His-Pro), Ciclo (Ala-Ala), Ciclo (Gly-Pro), Ciclo (Ser-Tyr), Ciclo (Pro-Thr), Ciclo (His-Phe), Ciclo (Ala-Pro), Ciclo (Phe-Ser), Ciclo (Gly-Leu), Ciclo (Gly-Phe), Ciclo (Pro-Pro), Ciclo (Asp-Phe), Ciclo (Val-Pro), Ciclo (Pro-Tyr), Ciclo (Met-Pro), Ciclo (Leu-Pro), Ciclo (Phe-Pro), Ciclo (Leu-Phe) y Ciclo (Leu-Leu) a una concentración de 10 µg/100 g/Bx o más. Se sugirió que la presente invención también es útil para la producción de una o más de estas dicetopiperazinas.

Adicionalmente, se generó Ciclo(Phe-Phe) realizando un pretratamiento o un tratamiento enzimático. Esto sugirió que la presente invención puede proporcionar un extracto vegetal (extracto de té) que contiene Ciclo(Phe-Phe) con un contenido por Bx de 10 µg/100 g/Bx o más. Se retuvo en el extracto (en una solución acuosa) Ciclo(Phe-Phe) altamente hidrófoba de forma estable.

La evaluación de las muestras de las muestras N.º 5 a 8 en cuanto al sabor demostró que los extractos en sí mismos no tienen ningún sabor, tal como amargor. Se prepararon soluciones acuosas conteniendo uno o los tres de Ciclo(Leu-Pro), Ciclo(Phe-Pro) y Ciclo(Leu-Trp) a las mismas concentraciones que las de las muestras de la muestra N.º 5 y se evaluaron en cuanto al sabor. Dado que en estas soluciones el amargor se sintió de forma significativa, se sugirió que la presencia de dicetopiperazinas en un extracto de té reduce el amargor.

[Tabla 7]

Concentración de dicetopiperazinas (ppm/Bx)	N.º 1	N.º 2	N.º 3	N.º 4	N.º 5	N.º 6	N.º 7	N.º 8
Ciclo(Ala-Gln)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,3	1,9	6,6
Ciclo(His-Pro)	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	2,7	1,3	3,4
Ciclo(Ala-Ala)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	1,4	5,8	11,9
Ciclo(Gly-Pro)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	1,9	1,5	3,2
Ciclo(Ser-Tyr)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,6	3,5	8,7
Ciclo(Pro-Thr)	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	3,1	3,2	6,9
Ciclo(His-Phe)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,4	1,3	3,9
Ciclo(Ala-Pro)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	2,0	1,7	3,2
Ciclo(Phe-Ser)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,7	3,4	7,4
Ciclo(Gly-Leu)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,6	3,9	9,6
Ciclo(Gly-Phe)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,5	1,8	5,4
Ciclo(Pro-Pro)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	2,2	0,8	1,7
Ciclo(Gly-Trp)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,6	2,4
Ciclo(Asp-Phe)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,3	1,7	6,4
Ciclo(Val-Pro)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	1,5	1,3	3,0
Ciclo(Pro-Tyr)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,9	0,8	1,8
Ciclo(Met-Pro)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,6	0,3	0,9
Ciclo(Met-Met)t	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,5
Ciclo(Val-Val)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	1,1
Ciclo(Leu-Pro)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	2,4	3,4	6,7
Ciclo(Trp-Tyr)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	1,3
Ciclo(Phe-Pro)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,9	0,6	1,3
Ciclo(Leu-Trp)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	2,2
Ciclo(Phe-Trp)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,8
Ciclo(Leu-Phe)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,4	4,1	16,5
Ciclo(Leu-Leu)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,4	6,2	20,9
Ciclo(Phe-Phe)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,6	3,9
Concentración total (ppm/Bx)	0,0	0,0	0,0	0,0	9,1	24,0	51,1	141,6
Concentración total por unidad de Bx (µg/100 g/Bx)	0	0	0	0	905	2402	5114	14157

(Ejemplo 7) Producción (4) de dicetopiperazina a partir de la planta

Dado que la utilidad de la preextracción se confirmó en el Ejemplo 6, se examinó el número de veces de preextracción. Se utilizaron como planta hojas de té de primera calidad (especies: Yabukita, contenido total de nitrógeno: 6,3 %) producidas en Kagoshima-ken. Para lograr una mayor concentración de dicetopiperazinas, se investigó el número óptimo de veces de preextracción. La preextracción se realizó mediante el siguiente procedimiento. Es decir, se añadieron 200 g de agua hirviendo a 10 g de hojas de té, y la mezcla se agitó de manera apropiada durante 5 min para la extracción. Después de la finalización de la extracción, la mezcla se filtró a través de

un filtro de malla de 140 y se desechó el extracto. En el nivel de realización de la preextracción dos veces o más, se añadieron nuevamente 200 g de agua hirviendo a las hojas de té usadas recogidas por filtración, y se repitió el mismo procedimiento. A las hojas de té usadas (cantidad inicial: 10 g) así sometidas al pretratamiento de cero a tres veces, se les vertieron 200 g de agua caliente a 50 °C y se añadió a eso 1 g de una enzima proteasa (Amano Enzyme Inc., Protin NY100). La mezcla se hizo reaccionar en un baño de agua de 50 °C durante 3 horas con agitación con una barra de agitación (300 rpm) y luego se mantuvo a 95 °C durante 30 min para inactivar la enzima. La mezcla líquida de hojas de té resultante se colocó en una autoclave (Tomy Seiko Co., Ltd.) y se sometió a un tratamiento a alta temperatura y alta presión a 135 °C durante 8 horas, y la solución resultante se filtró a través de un filtro de malla de 140 para preparar un extracto de té. Se midió el Bx de cada uno de los extractos resultantes, y se midió cuantitativamente la concentración de dicetopiperazinas mediante LC-MS/MS como en el Ejemplo 1.

La Tabla 8 muestra los resultados. La cantidad de dicetopiperazinas generadas aumentó con el número de veces de preextracción. La Fig. 3 muestra una relación entre el número de veces de preextracción y la tasa de eliminación del componente soluble. La tasa de eliminación del componente soluble se calculó mediante la expresión: "(la cantidad (cantidad total: g) de solución obtenida por preextracción x su Brix [Bx])/(la cantidad (g) de solución obtenida repitiendo diez veces la extracción de una planta con agua hirviendo en una cantidad de 30 veces el peso de la planta durante 10 min x su Brix [Bx]) x 100 (%)". Se reveló que el 95 % o más del componente soluble se puede eliminar repitiendo la preextracción tres veces.

20

[Tabla 8]

Concentración de dicetopiperazinas (ppm/Bx)	El número de veces de preextracción			
	cero	una vez	dos veces	tres veces
Ciclo(Ala-Gln)	1,9	5,0	6,6	6,7
Ciclo(His-Pro)	1,3	2,8	3,4	3,5
Ciclo(Ala-Ala)	5,8	9,6	11,9	11,3
Ciclo(Gly-Pro)	1,5	2,7	3,2	3,3
Ciclo(Ser-Tyr)	3,5	7,0	8,7	8,9
Ciclo(Pro-Thr)	3,2	5,8	6,9	6,9
Ciclo(His-Phe)	1,3	3,0	3,9	4,0
Ciclo(Ala-Pro)	1,7	2,7	3,2	3,2
Ciclo(Phe-Ser)	3,4	6,7	7,4	7,1
Ciclo(Gly-Leu)	3,9	8,6	9,6	9,0
Ciclo(Gly-Phe)	1,8	4,5	5,4	5,3
Ciclo(Pro-Pro)	0,8	1,5	1,7	1,7
Ciclo(Gly-Trp)	0,6	1,8	2,4	2,4
Ciclo(Asp-Phe)	1,7	5,2	6,4	7,1
Ciclo(Val-Pro)	1,3	2,4	3,0	2,9
Ciclo(Pro-Tyr)	0,8	1,5	1,8	1,8
Ciclo(Met-Pro)	0,3	0,7	0,9	0,9
Ciclo(Met-Met)t	0,1	0,0	0,5	0,5
Ciclo(Val-Val)	0,3	0,8	1,1	1,1
Ciclo(Leu-Pro)	3,4	6,0	6,7	6,8
Ciclo(Trp-Tyr)	0.3 0.9 1.3 1.3			
Ciclo(Phe-Pro)	0,6	1,1	1,3	1,3
Ciclo(Leu-Trp)	0,6	1,7	2,2	2,2
Ciclo(Phe-Trp)	0,2	0,6	0,8	0,8
Ciclo(Leu-Phe)	4,1	12,2	16,5	17,5
Ciclo(Leu-Leu)	6,2	16,9	20,9	21,5
Ciclo(Phe-Phe)	0,6	2,6	3,9	4,2
Concentración total (ppm/Bx)	51,1	114,4	141,6	143,3
Concentración total por unidad de Bx (µg/100 g/Bx)	5114	11437	14157	14326

(Ejemplo 8) Producción (5) de dicetopiperazina a partir de la planta

Dado que la utilidad del tratamiento enzimático se confirmó en el Ejemplo 6, se examinó el tipo de enzima. Las enzimas examinadas fueron los siguientes nueve tipos:

- <Muestra N.º 9> Protina NY100: proteasa (endopeptidasa) obtenida de *Bacillus amyloliquefaciens*,
- <Muestra N.º 10> Thermoase 160: proteasa termorresistente (endopeptidasa) obtenida de *Bacillus stearothermophilus*,
- <Muestra N.º 11> Thermoase PC10F: proteasa (endopeptidasa) obtenida de *Bacillus stearothermophilus*,

30

- <Muestra N.º 12> ProteAX: proteasa neutra obtenida de *Aspergillus oryzae*,
 <Muestra N.º 13> proteasa M: proteasa neutra obtenida de *Ananas comosus*,
 <Muestra N.º 14> proteasa P: proteasa alaclina obtenida de *Aspergillus melleus*,
 <Muestra N.º 15> proteasa A: proteasa neutra obtenida de *Aspergillus oryzae*,
 <Muestra N.º 16> Peptidasa R: proteasa neutra obtenida de *Rhizopus oryzae* y
 <Muestra N.º 17> Newlase F3G: proteasa ácida (endopeptidasa) procedente de *Rhizopus niveus*.

Como planta, se utilizaron hojas de té de primera calidad (especies: Yabukita, contenido total de nitrógeno: 6,3 %) producidas en Kagoshima-ken. Cada una de las hojas de té usadas se preparó a partir de 10 g de las hojas de té realizando preextracción tres veces como en el Ejemplo 6, se vertieron a eso 200 g de agua caliente a 55 °C (70 °C para Thermoase 160 y Thermoase PC10F), y luego se añadió a eso 1 g de una enzima. La mezcla se hizo reaccionar en un baño de agua de 55 °C (70 °C para Thermoase 160 y Thermoase PC10F) durante 3 horas con agitación con una barra de agitación (300 rpm) y luego se mantuvo a 95 °C durante 30 min para inactivar la enzima. La mezcla líquida de hojas de té resultante se colocó en una autoclave (Tomy Seiko Co., Ltd.) y se sometió a un tratamiento a alta temperatura y alta presión a 135 °C durante 8 horas, y la solución resultante se filtró a través de un filtro de malla de 140 para preparar un extracto de té. Se midió el Bx de cada uno de los extractos resultantes, y se midió cuantitativamente la concentración de dicetopiperazinas mediante LC-MS/MS como en el Ejemplo 1.

La Tabla 9 muestra los resultados. Se demostró que la concentración de dicetopiperazinas aumenta significativamente mediante el uso de una enzima bacteriana que tiene una alta actividad endopeptidasa. Entre las enzimas bacterianas, cuando se utilizó proteasa neutra obtenida de *Bacillus subtilis* y proteasa obtenida de *Bacillus stearothermophilus*, la cantidad de dicetopiperazinas generada aumentó particularmente.

[Tabla 9]

Concentración de dicetopiperazinas (ppm/Bx)	N.º 9	N.º 10	N.º 11	N.º 12	N.º 13	N.º 14	N.º 15	N.º 16	N.º 17
Ciclo (Ala-Gln)	6,7	7,0	3,8	2,1	1,3	1,6	1,9	1,3	0,8
Ciclo(His-Pro)	3,5	2,4	2,6	3,2	5,4	4,8	2,5	4,2	1,6
Ciclo(Ala-Ala)	11,3	9,8	7,5	3,8	2,3	2,7	4,1	2,1	1,4
Ciclo(Gly-Pro)	3,3	2,2	1,9	1,2	3,5	2,6	2,4	2,8	1,6
Ciclo(Ser-Tyr)	8,9	5,7	3,5	1,6	0,7	1,3	1,2	0,8	0,4
Ciclo(Pro-Thr)	6,9	5,3	3,8	4,0	7,4	6,8	5,2	6,1	3,7
Ciclo(His-Phe)	4,0	4,5	3,9	0,5	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3
Ciclo(Ala-Pro)	3,2	3,2	1,9	2,0	3,4	2,7	2,6	2,9	1,6
Ciclo(Phe-Ser)	7,1	5,3	4,9	1,5	0,8	1,2	0,9	0,9	0,7
Ciclo(Gly-Leu)	9,0	19,0	10,5	1,3	1,0	1,0	1,3	0,9	0,7
Ciclo(Gly-Phe)	5,3	5,7	5,8	0,8	0,8	1,0	0,6	0,7	0,5
Ciclo(Pro-Pro)	1,7	1,9	1,4	0,7	1,8	1,9	0,6	1,7	0,8
Ciclo(Gly-Trp)	2,4	2,0	0,8	0,4	0,5	0,5	0,7	0,5	0,2
Ciclo(Asp-Phe)	7,1	8,3	6,4	0,6	0,8	1,0	0,7	0,9	0,7
Ciclo(Val-Pro)	2,9	1,5	1,4	2,0	3,7	3,3	2,6	3,0	1,6
Ciclo (Pro-Tyr)	1,8	1,2	1,2	1,3	3,5	2,8	2,3	2,7	1,1
Ciclo(Met-Pro)	0,9	0,5	0,5	0,7	1,4	0,8	1,3	1,0	0,0
Ciclo (Met-Met)t	0,5	0,5	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ciclo (Val-Val)	1,1	1,4	0,7	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1
Ciclo(Leu-Pro)	6,8	4,5	2,5	3,1	6,9	5,5	5,4	5,1	1,9
Ciclo(Trp-Tyr)	1,3	1,5	0,6	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0
Ciclo(Phe-Pro)	1,3	1,0	0,9	1,2	3,2	2,0	2,4	2,4	0,9
Ciclo(Leu-Trp)	2,2	3,4	2,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Ciclo(Phe-Trp)	0,8	0,9	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ciclo(Leu-Phe)	17,5	4,1	10,2	1,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3
Ciclo(Leu-Leu)	21,5	8,9	10,8	2,6	0,2	0,4	0,8	0,3	1,1
Ciclo(Phe-Phe)	4,2	0,8	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
Concentración total (ppm/Bx)	143,3	112,4	92,9	36,1	49,1	44,7	40,0	40,9	21,9
Concentración total por unidad de Bx (µg/100 g/Bx)	14326	11242	9286	3607	4909	4471	4001	4086	2193

(Ejemplo 9) Producción (6) de dicetopiperazina a partir de la planta

Se produjeron extractos de té como en el Ejemplo 4, excepto que las concentraciones de la enzima (Protina NY100)

se cambiaron del 0 % al 20 % basándose en la cantidad de hojas de té. Los extractos de té resultantes se sometieron a evaluación sensorial, y los contenidos de los 17 tipos de dicetopiperazinas mostrados en la Tabla 10 se midieron mediante LC-MS/MS como en el Ejemplo 1 y se determinó la cantidad total de los mismos.

- 5 La Tabla 10 muestra los resultados. Se sugirió que la concentración de la enzima debería estar dentro de un intervalo del 1 % al 20 % en peso basado en la cantidad de materia prima vegetal, preferentemente del 3 % al 15 % en peso y más preferentemente del 4 % al 10 % en peso. Además, en todos los extractos de té, dado que el extracto de té en sí no tiene sustancialmente ningún sabor, se consideró que estos extractos eran extractos que se pueden utilizar añadiéndolos a alimentos y bebidas. En particular, los extractos de té sometidos a combinaciones de
- 10 preextracción, tratamiento enzimático y tratamiento térmico tenían un excelente sabor.

[Tabla 10]

TR (min)	Concentración de dicetopiperazinas (ppm)	Concentración de enzima							
		0,5 %	1 %	2 %	3 %	5 %	10 %	15 %	20 %
4,4	Ciclo (Ala-Gln)	14,1	16,5	20,3	20,7	23,6	26,4	26,2	28,2
5,6	Ciclo(His-Pro)	2,3	2,4	2,9	3,1	3,5	4,0	3,8	4,2
6,7	Ciclo(Ala-Ala)	2,0	2,2	2,6	2,7	3,1	3,5	3,5	3,7
7,4	Ciclo(Gly-Pro)	5,6	5,9	7,5	7,3	8,6	9,9	10,0	10,5
7,8	Ciclo(Ser-Tyr)	10,0	11,2	13,7	13,6	14,5	15,0	13,8	13,1
8,1	Ciclo(Pro-Thr)	6,7	7,5	9,7	9,9	11,4	12,1	11,1	10,7
8,6	Ciclo(His-Phe)	0,7	0,7	0,9	0,9	1,0	1,1	1,1	1,1
9,2	Ciclo(Ala-Pro)	0,7	0,7	1,0	1,0	1,3	1,6	1,7	1,9
9,6	Ciclo(Phe-Ser)	0,4	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,7	0,8
10,2	Ciclo(Gly-Leu)	0,1	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3
10,2	Ciclo(Gly-Phe)	1,0	1,3	1,7	1,7	2,0	2,2	2,2	2,2
10,7	Ciclo(Pro-Pro)	1,4	1,6	2,1	2,2	2,7	3,4	3,6	4,0
11	Ciclo(Gly-Trp)	1,3	1,4	1,7	1,6	1,8	2,0	2,0	2,2
12,3	Ciclo(Asp-Phe)	18,9	22,1	28,3	28,4	32,1	33,3	30,3	28,4
12,4	Ciclo(Val-Pro)	11,7	12,9	15,2	14,8	16,2	15,4	13,3	12,2
12,6	Ciclo(Pro-Tyr)	2,2	2,8	4,1	4,6	5,8	7,4	7,2	7,2
	Concentración total (ppm)	79,2	89,9	112,4	113,2	128,8	138,6	130,9	130,5
	Bx	0,56	0,63	0,79	0,82	0,99	1,25	1,39	1,57
	Concentración total por unidad de Bx (µg/100 g/Bx)	14146	14267	14231	13803	13010	11088	9416	8310

(Ejemplo 10) Producción (7) de dicetopiperazina a partir de la planta

- 15 Se produjeron extractos de té como en el Ejemplo 4, excepto que se cambiaron las condiciones para el tratamiento a alta temperatura y alta presión. En concreto, se utilizaron como planta las mismas hojas de té que las del Ejemplo 4, en la misma cantidad. Las hojas de té (hojas de té usadas) se prepararon repitiendo la preextracción con agua tres veces en una cantidad de 30 veces, en lugar de 20 veces, la cantidad de planta y se sometieron a un tratamiento
- 20 enzimático como en el Ejemplo 4 y al tratamiento térmico con el mismo equipo de tratamiento térmico que en el Ejemplo 4, en las diversas condiciones de calentamiento que se muestran en la Tabla 11. Los extractos de té resultantes se analizaron en cuanto a las dicetopiperazinas en los extractos, como en el Ejemplo 1.

- 25 La Tabla 11 muestra los resultados. Se sugirió que la generación de dicetopiperazinas necesita calentamiento a 100 °C o más (preferentemente a 115 °C o más y más preferentemente a 125 °C o más) durante un tiempo de calentamiento de aproximadamente 30 min a 10 horas y preferentemente de aproximadamente 2 a 8 horas.

[Tabla 11]

Concentración de dicetopiperazinas (ppm/Bx)	Condición de tratamiento térmico				
	95 °C 30 min	105 °C 3 h	115 °C 3 h	125 °C 3 h	135 °C 3 h
Ciclo(Ala-Gln)	0,0	0,8	1,3	2,4	7,6
Ciclo(His-Pro)	0,0	0,5	1,0	1,6	2,2
Ciclo(Ala-Ala)	0,0	3,2	5,8	9,7	19,8
Ciclo(Gly-Pro)	0,0	0,3	0,9	1,6	3,5
Ciclo(Ser-Tyr)	0,0	0,6	1,3	3,0	5,9
Ciclo(Pro-Thr)	0,2	0,9	1,8	3,2	5,5

(continuación)

Concentración de dicetopiperazinas (ppm/Bx)	Condición de tratamiento térmico				
	95 °C 30 min	105 °C 3 h	115 °C 3 h	125 °C 3 h	135 °C 3 h
Ciclo(His-Phe)	0,0	0,9	1,7	2,5	2,1
Ciclo(Ala-Pro)	0,0	0,8	1,2	2,0	4,9
Ciclo(Phe-Ser)	0,1	1,4	1,8	2,7	6,9
Ciclo(Gly-Leu)	0,0	1,8	4,0	6,3	10,7
Ciclo(Gly-Phe)	0,1	1,7	3,1	5,7	9,2
Ciclo(Pro-Pro)	0,0	0,1	0,3	0,6	1,6
Ciclo(Gly-Trp)	0,0	0,5	0,8	1,5	3,0
Ciclo(Asp-Phe)	0,2	3,1	5,3	9,4	15,5
Ciclo(Val-Pro)	0,1	0,4	0,6	0,9	2,1
Ciclo(Pro-Tyr)	0,0	0,2	0,3	0,5	1,4
Ciclo(Ala-Gln)	0,0	0,0	0,1	0,3	0,7
Ciclo(His-Pro)	0,0	0,2	0,3	0,4	0,8
Ciclo(Ala-Ala)	0,0	0,1	0,2	0,4	1,6
Ciclo(Gly-Pro)	0,3	1,9	3,0	4,2	6,3
Ciclo(Ser-Tyr)	0,0	0,3	0,6	1,1	2,2
Ciclo(Pro-Thr)	0,0	0,0	0,3	0,7	1,4
Ciclo(His-Phe)	0,0	0,5	1,2	2,4	2,7
Ciclo(Ala-Pro)	0,0	0,2	0,1	0,7	1,7
Ciclo(Phe-Ser)	0,1	1,9	4,7	9,7	14,4
Ciclo(Gly-Leu)	0,2	2,4	5,7	12,0	17,7
Ciclo(Gly-Phe)	0,0	0,7	1,5	2,4	6,0
Concentración total (ppm/Bx)	1,3	25,5	48,9	87,8	157,5
Concentración total por unidad de Bx (µg/100 g/Bx)	130	2555	4890	8781	15748

(Ejemplo 11) Producción de alimentos o bebidas que contienen dicetopiperazina

- 5 El extracto de té A producido en el Ejemplo 4 y/o agua en una cantidad total de 50 g como se muestra en la Tabla 12 se añadieron a 450 g de una bebida de té verde PET disponible en el mercado para preparar bebidas de té que contienen dicetopiperazina en una cantidad total de 500 g. Estas bebidas de té se sometieron a una evaluación sensorial del sabor. La evaluación se realizó principalmente para el amargor y se juzgó por preferencia general basándose en cinco criterios: muy buen sabor (⊙), buen sabor (O), sabor bebible (Δ), sabor ligeramente difícil de beber (x) y sabor muy difícil de beber (xx).

15 La Tabla 12 muestra los resultados. Se confirmó que todas las bebidas de té, cada una en una cantidad de 500 g, que incluían de 0 a 50 g del extracto de té A conteniendo la mezcla de dicetopiperazina del Ejemplo 4, tenían buen sabor. Esto sugiere que el extracto de té preparado por la presente invención es un material altamente versátil para mezclar en el diseño del sabor de las bebidas.

[Tabla 12]

	Cantidad de mezcla				Cantidad total de dicetopiperazinas (µg/500 g)	Resultado de la evaluación sensorial
	Bebida de té verde PET (g)	Extracto de té (g)	Agua (g)	Cantidad total (g)		
1	450	0	50	500	0	⊙
2	450	5	45	500	57	⊙
3	450	10	40	500	115	⊙
4	450	20	30	500	229	⊙
5	450	30	20	500	344	⊙
6	450	50	0	500	574	O

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un extracto vegetal que comprende al menos uno de ciclo-alanil-glutamina, ciclo-alanil-alanina, ciclo-seril-tirosina, ciclo-glicil-leucina, ciclo-glicil-triptófano, ciclo-valil-valina, ciclo-triptofanil-tirosina, ciclo-leucil-triptófano y ciclo-fenilalanil-fenilalanina a una concentración de 10 µg/100 g/Bx o más, donde el extracto vegetal es un extracto de té, un extracto de soja, un extracto de malta o un extracto de sésamo y la cantidad total de dicetopiperazina (o dicetopiperazinas) por Bx es de 900 µg/100 g/Bx o más.
- 10 2. El extracto vegetal de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que es un extracto de té, un extracto de soja o un extracto de malta.
- 15 3. Un método de producción de un extracto vegetal que contiene una alta concentración de dicetopiperazinas que incluyen ciclo-leucil-leucina y ciclo-leucil-fenilalanina, comprendiendo el método una etapa de someter a un péptido vegetal a un tratamiento a de 100 °C a 170 °C y 0,101 a 0,79 MPa durante 30 a 500 minutos en un líquido, donde el péptido vegetal es un péptido del té, un péptido de la soja, un péptido de la malta o un péptido del sésamo.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, donde el péptido vegetal es un oligopéptido.
- 20 5. El método de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, donde el péptido vegetal se prepara sometiendo a una proteína de origen vegetal o a una planta que contiene proteína a un tratamiento de descomposición, donde la planta es una planta de té, una de soja, una de malta o una de sésamo.
- 25 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, donde el tratamiento de descomposición es tratamiento térmico o tratamiento enzimático.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, donde el tratamiento de descomposición es tratamiento enzimático y la enzima es una proteasa de tipo endoproteasa.

Fig. 1

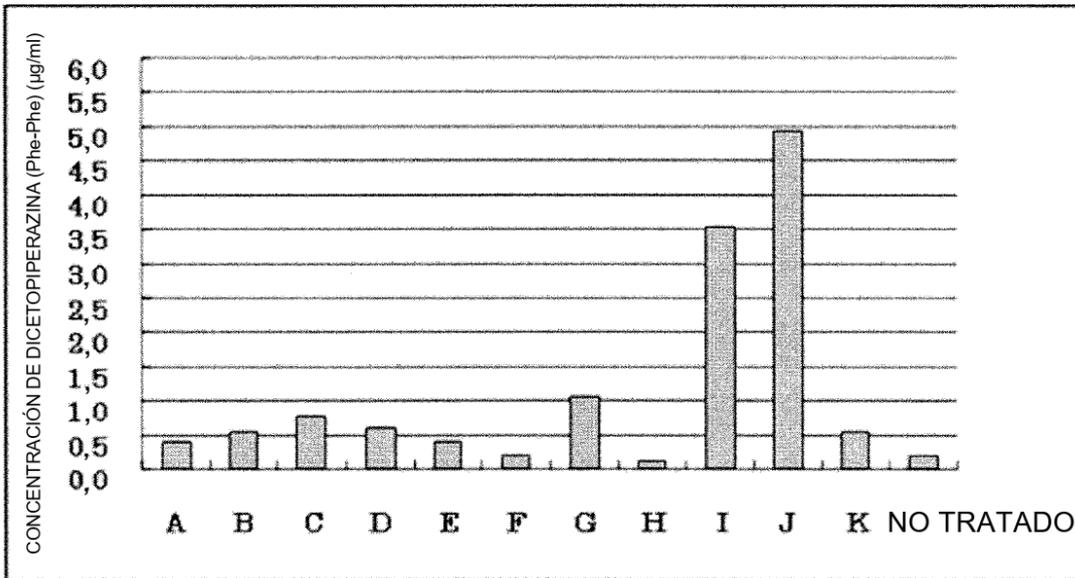


Fig. 2

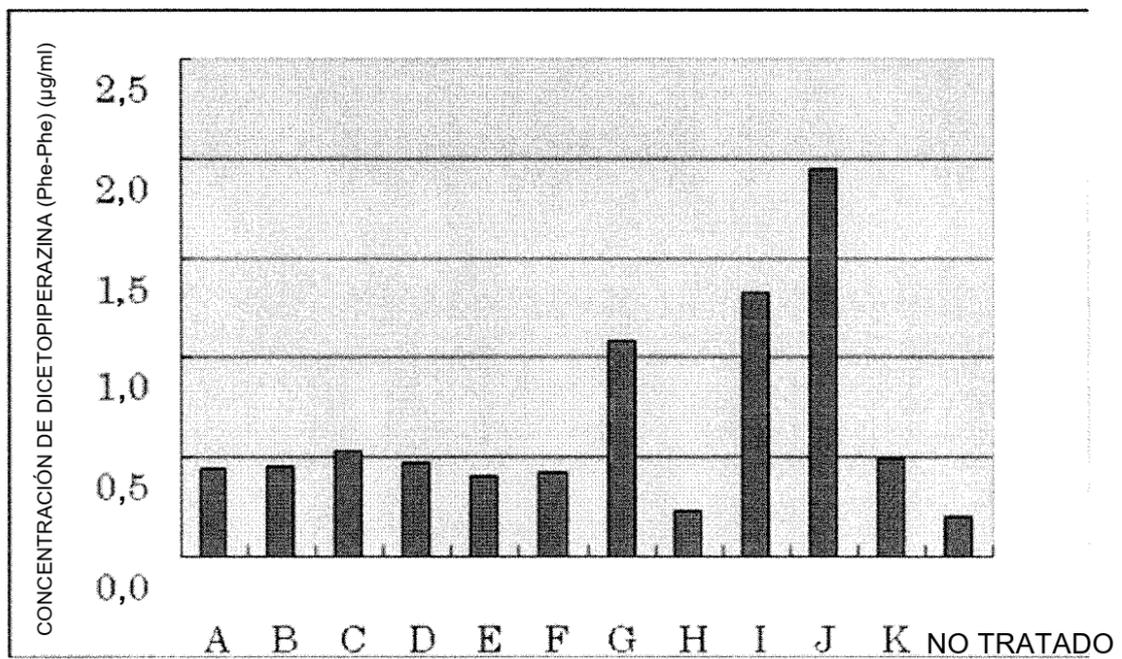


Fig. 3

