

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 489 440**

21 Número de solicitud: 201330898

51 Int. Cl.:

C12P 21/06 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

18.02.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

01.09.2014

Fecha de la concesión:

24.03.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

31.03.2015

62 Número y fecha presentación solicitud principal:

P 201330210 18.02.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (100.0%)
Plaza de San Diego, s/n
28801 Alcalá de Henares (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**ESTEVE GIL, Clara;
MARINA ALEGRE, María Luisa y
GARCÍA LÓPEZ, María Concepción**

74 Agente/Representante:

GUTIÉRREZ DE MESA, José Antonio

54 Título: **Procedimiento para la obtención de un extracto peptídico con capacidad antihipertensiva a partir de semillas de aceituna**

57 Resumen:

Procedimiento para obtener péptidos con capacidad antihipertensiva mediante digestión enzimática de las proteínas aisladas a partir de la semilla de aceituna. El método consiste en extraer las proteínas de la semilla de la aceituna utilizando un método desarrollado previamente, disolver el aislado de proteínas en un medio tamponado a pH ligeramente alcalino, digerir con la enzima termolisina, centrifugar y recoger el sobrenadante que contiene péptidos con capacidad antihipertensiva in vitro. Dicha actividad se evalúa mediante el ensayo de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ACE).

ES 2 489 440 B1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la obtención de un extracto peptídico con capacidad antihipertensiva a partir de semillas de aceituna.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento químico basado en el empleo de la enzima termolisina para obtener un extracto peptídico con propiedades antihipertensivas a partir de un asilado de proteínas de semilla de aceituna.

10 SECTOR DE LA TÉCNICA

Esta invención permite obtener sustancias con elevado valor añadido a partir de la semilla contenida en el hueso de la aceituna que constituye un residuo generado en el procesamiento de la aceituna. El interés de la invención está en el tratamiento de residuos industriales mediante la obtención de compuestos de alto valor biológico y en la aplicación de los péptidos bioactivos obtenidos. El tratamiento de residuos industriales y la obtención de compuestos de alto valor biológico es de interés para el sector químico y la industria manufacturera de aceituna de mesa y aceite de oliva mientras que, desde el punto de vista de la aplicación de los péptidos encontrados, esta invención iría dirigida al sector alimentario y farmacéutico.

20 ESTADO DE LA TÉCNICA

En los procesos de producción de aceitunas de mesa y aceite de oliva se produce un gran volumen de residuos, lo que constituye un problema medioambiental y económico. Concretamente, el hueso de la aceituna forma parte de este material residual que, en general, no se suele aprovechar. Sin embargo, la semilla contenida en el hueso de la aceituna presenta un alto contenido en proteínas, que llegan a representar el 20% del peso, y de donde podrían extraerse moléculas con alto valor añadido como los péptidos bioactivos [1, 2]. De hecho, numerosos estudios han demostrado los beneficios para la salud de algunos péptidos antihipertensivos obtenidos de hidrolizados proteicos de otras semillas como el girasol [3], la quinua [4] y el amaranto [5, 6], pero nunca para el caso de la semilla de la aceituna.

La hipertensión es un importante problema de salud pública en todo el mundo ya que afecta a un cuarto de la población mundial y es un factor de riesgo de accidentes cardiovasculares [7]. Existe en el mercado un gran número de antihipertensivos sintéticos. Sin embargo, estos compuestos sintéticos producir efectos secundarios como tos, alteraciones del gusto o erupciones cutáneas. Por esta razón, los péptidos antihipertensivos procedentes de alimentos o de plantas se han convertido en una interesante alternativa.

40 En esta patente se propone una alternativa para el aprovechamiento del material residual de la industria aceitunera y la obtención de péptidos antihipertensivos para su empleo en la industria farmacéutica y alimentaria.

45 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El procedimiento químico propuesto permite la obtención de un extracto peptídico con capacidad antihipertensiva a partir de semillas de aceituna.

50 El procedimiento requiere la extracción previa de las proteínas, siguiendo un método previamente optimizado, y su hidrólisis enzimática. La extracción de las proteínas contenidas en el hueso de la aceituna se realiza utilizando un tampón Tris-HCl a pH 7,5 que contiene dodecilsulfato sódico y ditiotreitól y precipitando las proteínas solubilizadas con acetona. Las proteínas aisladas se disuelven en un medio alcalino y se lleva a cabo la hidrólisis utilizando la enzima termolisina a una temperatura controlada y agitación. Una vez finalizada la digestión, se

inactiva la enzima y se separa por centrifugación el sobrenadante que contiene los péptidos con capacidad antihipertensiva.

5 La evaluación de la capacidad antihipertensiva del extracto peptídico obtenido mediante la digestión con la enzima termolisina de las proteínas contenidas en la semilla de aceitunas de la variedad Arbequina daba como resultado un valor de IC_{50} (concentración necesaria de péptido para inhibir al 50% la enzima convertidora de la angiotensina, ACE) de $0,029 \pm 0,009$ mg/mL. La obtención de un valor tan bajo de IC_{50} demuestra que el hidrolizado obtenido constituye una interesante fuente de péptidos con propiedad antihipertensiva.

10 A través de este procedimiento se describe una alternativa de aprovechamiento de un material residual como son los huesos de aceituna y que hasta ahora no se realizaba. Teniendo en cuenta que la semilla de la aceituna constituye un residuo industrial procedente de los procesos de fabricación de aceitunas de mesa y de aceite de oliva y que su contenido en proteínas es elevado, este procedimiento supone una alternativa muy valiosa para el aprovechamiento de este residuo.

15 Por último, el procedimiento objeto de la invención es sencillo, económico, rápido y seguro, ya que utiliza instrumentación básica y una enzima comercial de uso extendido en las industrias alimentaria y farmacéutica.

MODO DE REALIZACIÓN

Obtención del aislado de proteína de la semilla de aceituna

25 Para la obtención del aislado proteico de la semilla de la aceituna se emplea un método optimizado previamente [8]. Brevemente, el hueso de la aceituna se deja secar a temperatura ambiente y se extrae del mismo la semilla mediante fractura utilizando procedimientos mecánicos. Una vez extraída la semilla de la aceituna esta se tritura en un molinillo. Las proteínas de la semilla se extraen empleando un medio de extracción formado por un tampón Tris-HCl 125 mM (pH 7,5) que contiene dodecilsulfato de sodio y ditiotreitól. En estas condiciones las proteínas pasan a la disolución acuosa y el residuo sólido se elimina mediante centrifugación. Se recupera el sobrenadante y se le añade acetona previamente enfriada para precipitar las proteínas. El aislado proteico se recoge por centrifugación de la muestra y se deja secar a temperatura ambiente.

Obtención del hidrolizado de proteínas de la semilla de aceituna

40 La hidrólisis del extracto proteico obtenido a partir de la semilla de aceituna se lleva a cabo empleando la enzima proteolítica termolisina. Para ello, el aislado proteico de la semilla de aceituna se disuelve en una disolución reguladora adecuada, como puede ser un tampón fosfato a baja concentración, a un pH comprendido entre 7,0 y 9,0. Se recomienda una concentración de a enzima termolisina de 0,01-0,5 g enzima/g proteína. La reacción de hidrólisis se lleva a cabo a temperaturas comprendidas entre 40-60 °C durante un tiempo suficientemente elevado como para que la digestión sea completa (superior a 1 h). Seguidamente se realiza la inactivación de la enzima, que se sugiere que se lleve a cabo calentando las muestras a una temperatura superior a 100 °C. A continuación, se centrifugan las muestras para precipitar las posibles proteínas remanentes. La capacidad antihipertensiva del extracto peptídico obtenido se evalúa a continuación.

Evaluación de la capacidad antihipertensiva

50 Para evaluar la *capacidad antihipertensiva* del hidrolizado obtenido con la enzima termolisina se mide la extensión con la que una sustancia es capaz de inhibir la actividad de la enzima

- ACE [9]. Esta enzima cataliza la reacción de conversión de hipuril-histidil-leucina (HHL) en ácido hipúrico (HA). Para llevar a cabo el ensayo se prepara una disolución que contiene la enzima ACE en una concentración 0,05 U/mL y el HHL en una concentración 1,25 mg/mL en tampón HEPES 50 mM con NaCl 300 mM. La reacción se lleva a cabo mezclando 20 μ L de la disolución de enzima ACE con 10 μ L de la disolución de HHL, 35 μ L de tampón HEPES 50 mM en NaCl 300 mM y 5 μ L de muestra o tampón, en el caso del control. Después de la incubación a 37 °C en un baño de agua se para la reacción añadiendo 100 μ L de acetonitrilo (ACN) (-20°C).
- La separación y cuantificación de HHL y HA se realiza en un equipo de cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) capilar con detección UV empleando una columna cromatográfica C18. Las condiciones cromatográficas son: flujo, 20 μ L/min; fases móviles A (ácido acético (AA) al 0,5% (v/v) en agua) y B (AA al 0,5% (v/v) en ACN); gradiente, 5-100% B en 7 min; v_i , 1 μ L; temperatura, 25 °C; detección UV a 228 nm. El tratamiento de datos se realiza empleando el programa informático DataAnalysis.

La inhibición de la enzima ACE se calcula mediante la ecuación:

$$\text{Inhibición de ACE (\%)} = \frac{c_0 - c}{c_0} \times 100$$

- donde c_0 representa la concentración de HA cuando no hay inhibición de la enzima ACE, y c es la concentración de HA en presencia del inhibidor de ACE. La actividad inhibidora de los hidrolizados se evalúa mediante el cálculo del valor IC_{50} , que es la concentración requerida de una cierta sustancia para inhibir al 50% la actividad de la enzima ACE. Este valor se da en unidades de concentración de péptido en μ g péptido/mL y se calcula mediante regresión lineal del % de inhibición de la enzima ACE frente a la concentración de péptido. Para la variedad de aceituna Arbequina se obtuvo un valor de IC_{50} de $0,029 \pm 0,009$ mg/mL, lo que demuestra las propiedades antihipertensivas del hidrolizado obtenido.

30 APLICACIÓN INDUSTRIAL

- A los fabricantes de las industrias alimentaria y farmacéutica les interesa que existan procedimientos químicos rápidos, económicos y sencillos que permitan la obtención de hidrolizados peptídicos con propiedades bioactivas que puedan añadir a sus productos comerciales. El novedoso empleo de la semilla de la aceituna como fuente de péptidos antihipertensivos ofrece una fuente barata de compuestos de alto valor biológico resolviéndose a la vez un problema de aprovechamiento de los residuos producidos durante la fabricación de aceituna de mesa y aceite de oliva.

40

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Rodríguez, G.; Lama, A.; Rodríguez, R.; Jiménez, A.; Guillén, R., Fernández-Bolaños, J.; *Bioresource Technology* **2008**, 99, 5261-5269.
- 45 [2] Martín-García, A. I.; Moumen, A.; Ruíz, D. R. Y.; Alcaide, E. M. *Animal Feed Science and Technology* **2003**, 107, 61-74.
- [3] Megías, C.; Yust, M. D.; Pedroche, J.; Lquari, H.; Girón-Calle, J.; Aláiz, M.; Millán, F.; Vioque, J.; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, 52, 1928-1932.
- [4] Aluko, R. E.; Monu, E.; *Journal of Food Science* **2003**, 68, 1254-1258.
- 50 [5] Fritz, M.; Vecchi, B.; Rinaldi, G.; Añón, M. C.; *Food Chemistry* **2011**, 126, 878-884.

- 5
- [6] Silvia-Sánchez, V.; de la Rosa, A. P. B.; León-Galván, M. F.; de Lumen, B. O.; de León-Rodríguez, A.; de Mejía, E. G.; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, 56, 1233-1240.
 - [7] Kearney, P. M.; Whelton, M.; Reynolds, K.; Muntner, P.; Whelton, P. K.; He, J.; *Lancet* **2004**, 365, 217-223.
 - [8] Esteve, C.; Del Río, C.; Marina, M. L.; García, M. C.; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, 58, 8176-8182.
 - [9] Puchalska, P.; Marina, M. L.; García, M. C.; *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* Doi: 10.1080/10408398.2012.664829.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la obtención de un extracto peptídico con capacidad antihipertensiva a partir de semillas de aceituna **caracterizado** por las etapas de aislamiento de las proteínas de la semilla, digestión enzimática de las mismas y centrifugación.
- 10 2. Procedimiento para la obtención de un extracto peptídico con capacidad antihipertensiva, según las reivindicaciones 1, **caracterizado** porque las proteínas aisladas se disuelven en una disolución reguladora a pHs entre 7,0 y 9,0.
- 15 3. Procedimiento para la obtención de un extracto peptídico con capacidad antihipertensiva, según las reivindicaciones 1, **caracterizado** porque la digestión enzimática de las proteínas se realiza utilizando la enzima proteolítica termolisina.
- 20 4. Procedimiento para la obtención de un extracto peptídico con capacidad antihipertensiva, según las reivindicación 3, **caracterizado** porque la digestión enzimática de las proteínas requiere una concentración de enzima termolisina comprendida entre 0,01 y 0,5 g enzima/g proteína.
- 25 5. Procedimiento para la obtención de un extracto peptídico con capacidad antihipertensiva, según las reivindicación 3, **caracterizado** porque la digestión enzimática de las proteínas tiene lugar a temperaturas comprendidas entre 40 y 60°C.
- 30 6. Procedimiento para la obtención de un extracto peptídico con capacidad antihipertensiva, según la reivindicación 3, **caracterizado** porque la digestión enzimática de las proteínas se realiza en un tiempo suficiente que asegure el máximo grado de hidrólisis (tiempo de digestión superior a 1 h).
- 35 7. Procedimiento para la obtención de un extracto peptídico con capacidad antihipertensiva, según la reivindicación 3, **caracterizado** porque finalizada la digestión es necesario la inactivación de la enzima.
8. Procedimiento para la obtención de un extracto peptídico con capacidad antihipertensiva, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque se centrifuga la muestra digerida para separar el sobrenadante que contiene péptidos con capacidad antihipertensiva.



- ②① N.º solicitud: 201330898
②② Fecha de presentación de la solicitud: 18.02.2013
②③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12P21/06** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	ZHENBAO, Z. et al. "Production and characterization of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from apricot (<i>Prunus armeniaca</i> L.) kernel protein hydrolysate". EUROPEAN FOOD RESEARCH AND TECHNOLOGY. Mayo 2010, Vol. 231, N° 1, páginas 13-19, todo el documento.	1-8
Y	UDENIGWE, C.C. et al. "Antioxidant and angiotensin converting enzyme-inhibitory properties of flaxseed protein-derived high Fisher ratio peptide mixture". JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY. 28.04.2010. Vol. 58, n° 8, páginas 4762-4768, todo el documento.	1-8
Y	LI, H. et al. "Blood pressure lowering effect of a pea protein hydrolysate in hypertensive rats and humans". JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY. 28.09.2011. Vol. 59, n° 18, páginas 9854-9860, todo el documento.	1-8
A	WANG, W. et al. "Characterization of seed storage proteins and their synthesis during seed development in <i>Olea europaea</i> ". 2001. INT. J. DEV. BIOL. Vol. 45, N° S1, páginas S63-S64, todo el documento.	1-8
A	ZEB, A. et al. "Olive (<i>Olea europaea</i> L.) seeds, from chemistry to health benefits. NUTS AND SEEDS IN HEALTH AND DISEASE PREVENTION. 2011. Edited by: Victor R. Preedy, Ronald Ross Watson and Vinood B. Patel. ISBN: 978-0-12-375688-6. 2011. Elsevier Inc. Páginas 847-853, todo el documento.	1-8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
30.10.2013

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.10.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-8	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-8	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

Consideraciones:

La invención consiste en un procedimiento de obtención de un extracto peptídico que tiene propiedades antihipertensivas, a partir de semillas de aceituna. El contenido de las semillas de aceituna se somete a hidrólisis con la enzima Termolisina y los péptidos originados, se recuperan en el sobrenadante después de someter la solución de hidrólisis a centrifugación. El extracto obtenido, presenta actividad antihipertensiva.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ZHENBAO, Z. et al. "Production and characterization of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from apricot (<i>Prunus armeniaca</i> L.) kernel protein hydrolysate". EUROPEAN FOOD RESEARCH AND TECHNOLOGY. Mayo 2010, Vol. 231, Nº 1, páginas 13-19.	
D02	UDENIGWE, C.C. et al. "Antioxidant and angiotensin converting enzyme-inhibitory properties of flaxseed protein-derived high Fisher ratio peptide mixture". JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY. 28.04.2010. Vol. 58, nº 8, páginas 4762-4768.	
D03	LI, H. et al. "Blood pressure lowering effect of a pea protein hydrolysate in hypertensive rats and humans". JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY. 28.09. 2011. Vol. 59, nº 18, páginas 9854-9860.	
D04	WANG, W. et al. "Characterization of seed storage proteins and their synthesis during seed development in <i>olea europaea</i> ". 2001. INT. J. DEV. BIOL. Vol. 45, Nº S1, páginas S63-S64.	
D05	ZEB, A. et al. "Olive (<i>Olea europaea</i> L.) seeds, from chemistry to health benefits. NUTS AND SEEDS IN HEALTH AND DISEASE PREVENTION. 2011. Edited by: Victor R. Preedy, Ronald Ross Watson and Vinood B. Patel. ISBN: 978-0-12-375688-6. 2011. Elsevier Inc. Páginas 847-853.	

El documento D01, describe la producción de extractos de péptidos de bajo peso molecular obtenidos por hidrólisis de las proteínas de semillas de albaricoques con seis proteasas diferentes. Los extractos peptídicos obtenidos presentaban actividad antihipertensiva. La mayor actividad antihipertensiva la presentaron los extractos obtenidos después de hidrólisis con las enzimas Alcalasa y Proleather.

El documento D02, describe la producción de extractos de péptidos de bajo peso molecular obtenidos por hidrólisis de las proteínas de semillas de lino. La hidrólisis se realiza con termolisina seguida de pronasa y se obtiene un extracto peptídico que tiene actividad antioxidante e inhibidora de ACE (angiotensin converting enzyme).

El documento D03, describe la producción de un extracto de péptidos, obtenidos por hidrólisis con termolisina de las proteínas de guisante. Se obtiene un extracto peptídico que tiene actividad antihipertensiva.

El documento D04, describe las proteínas de almacenamiento de las semillas de aceituna. Se identifican las dos proteínas mayoritarias presentes en las semillas denominadas Solea I y II, que presentan alta homología con las proteínas 11S.

El documento D05, describe los beneficios para la salud de los aceites contenidos en los frutos y semillas del olivo.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**NOVEDAD**

Reivindicaciones 1-8

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que describa péptidos con propiedades medicinales relacionados con las proteínas contenidas en las semillas de aceituna. El procedimiento de hidrólisis enzimática con Termolisina de las proteínas de semillas de aceituna que da lugar a un extracto peptídico que presenta propiedades antihipertensivas, es nuevo y por tanto las reivindicaciones 1-8 de la presente solicitud, cumplen los requisitos de novedad del Artículo 6 de la Ley de Patentes 11/1986.

ACTIVIDAD INVENTIVA

Reivindicaciones 1-8

La búsqueda de productos derivados de proteínas contenidas en los alimentos que presentan características farmacológicas que mejoran el estado general de los consumidores (nutracéuticos), está ampliamente descrita en el estado de la técnica. Se han descrito péptidos activos obtenidos por hidrólisis tanto de proteínas animales (carne, pescado, proteínas de la leche) como vegetales (albaricoques, garbanzos, semillas de lino, guisantes), ver documentos D01-D03. Los extractos peptídicos obtenidos por hidrólisis, presentan actividad que puede ser antioxidante, antihipertensiva, reductora de los niveles de colesterol, etc. y en cambio, las proteínas de las que derivan, no presentan dicha actividad. Es fundamental recurrir al procedimiento de hidrólisis para generar los péptidos activos.

Se ha observado analizando los documentos del estado de la técnica D01-D03, que los investigadores que buscan péptidos con actividad antioxidante y antihipertensiva, suelen utilizar como enzimas hidrolíticas Alcalasa y Termolisina. La Alcalasa es una proteasa de amplia especificidad por los enlaces peptídicos pero con preferencia por los aminoácidos hidrofóbicos; la Termolisina hidroliza los enlaces de aminoácidos hidrofóbicos como F, Y, L, I y V. Aunque no se ha descrito en el estado de la técnica que las proteínas de las semillas de aceituna producen por hidrólisis, péptidos que pueden ser utilizados como nutracéuticos, el experto en la materia que desease identificarlos, intentaría en primer lugar aplicar al extracto de proteína total, los métodos de hidrólisis enzimática descritos en los documentos D01-D03 con una expectativa razonable de éxito; por ello se considera que dichas reivindicaciones 1-8, carecen de actividad inventiva y no cumplen el requisito del Artículo 8 de la Ley de Patentes 11/1986.