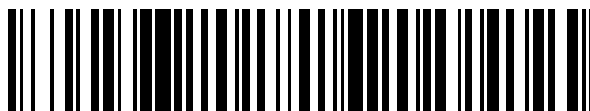


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 511 292**

51 Int. Cl.:

A23L 1/03 (2006.01)
A21D 8/04 (2006.01)
A23L 1/217 (2006.01)
A23L 1/105 (2006.01)
C12N 9/82 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2003 E 10178823 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 2294928**

54 Título: **Método de preparación de un producto tratado con calor**

30 Prioridad:

11.10.2002 DK 200201547

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.10.2014

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (100.0%)
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:

**LYNGLEV, GITTE BUDOLFSEN;
JENSEN, MORTEN TOVBORG;
HELDT-HANSEN, HANS PETER;
STRINGER, MARY y
LANGE, LENE**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 511 292 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

Método de preparación de un producto tratado con calor

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a un método para preparar un producto tratado con calor con un bajo contenido en agua a partir de materia prima comprendiendo hidrato de carbono, proteína y agua. También se refiere a una asparaginasa para usarla en el método

10

Antecedentes de la invención

[0002] E. Tareke et al. (J. Agric. Food Chem., 2002, 50, 4998-5006) informó que se forma acrilamida durante el calentamiento de alimentos ricos en almidón a altas temperaturas. La formación de acrilamida ha sido asignada a la reacción Maillard (D.S. Mottram et al., R.H. Stadler et al., Nature, 419, 3 Octubre 2002, 448-449).

15

[0003] Moltram et al. (Nature, vol. 419, páginas 448-449) expone cómo la acrilamida puede ser generada de componentes alimentarios durante el tratamiento con calor como resultado de la reacción Maillard entre aminoácidos y azúcares de reducción.

20

[0004] WO 00/39828 expone la reducción de la reacción Maillard en un producto alimentario con una oxidoreductasa.

[0005] WO 00/56762 expone etiquetas de secuencia expresada (EST) de *A. oryzae*.

25

[0006] Kim, K.-W.; Kamerud, J.Q.; Livingston, D.M.; Roon, R.J., (1988) Asparaginasa II de *Saccharomyces cerevisiae*. Caracterización del gen ASP3. J. Biol. Chem. 263:11948, expone la secuencia péptida de una asparaginasa extracelular.

Resumen de la invención

30

[0007] Según la invención, la formación de acrilamida durante el tratamiento con calor de materia prima comprendiendo hidrato de carbono, proteína y agua se reduce al tratar la materia prima con una enzima antes del tratamiento con calor. Por consiguiente, la invención provee un método de preparación de un producto tratado con calor, que comprende las fases secuenciales de:

35

- a) proveer una materia prima comprendiendo hidrato de carbono, proteína y agua
- b) tratar la materia prima con una asparaginasa y una oxidoreductasa capaz de reaccionar con un azúcar de reducción como sustrato, y
- c) tratar con calor hasta alcanzar un contenido de agua final por debajo del 35% en peso.

40

Descripción detallada de la invención

Materia prima y tratamiento enzimático

[0008] La materia prima comprende hidrato de carbono, proteína y agua, normalmente en cantidades de 10-90% o 20-50% de hidrato de carbono del peso total. El hidrato de carbono puede consistir principalmente en almidón, y puede incluir azúcares de reducción tales como glucosa, p. ej. añadido como jarabe de glucosa, miel o dextrosa seca. La proteína puede incluir aminoácidos libres tales como asparagina y glutamina (opcionalmente sustituidas).

45

[0009] La materia prima puede incluir tubérculos, patatas, granos, avena, cebada, maíz, trigo, frutos secos, frutas, fruta seca, bananas, sésamo, centeno y/o arroz.

50

[0010] La materia prima puede ser en forma de una masa comprendiendo ingredientes finamente divididos (p. ej. harina) con agua. El tratamiento enzimático puede ser hecho mezclando (amasando) la enzima en la masa y opcionalmente dejando que la enzima actúe. La enzima puede ser añadida en forma de una solución acuosa, un polvo, un granulado o polvo aglomerado. La masa puede ser conformada en formas deseadas, p. ej. formando hojas, cortándola y/o por extrusión.

55

[0011] La materia prima puede también estar en forma de piezas vegetales intactas, p. ej. rodajas u otras piezas de patata, fruta o bananas, frutos secos enteros, granos enteros etc. El tratamiento enzimático puede comprender sumergir las piezas de vegetal en una solución enzimática acuosa y opcionalmente aplicar infusión de vacío. Las piezas intactas pueden opcionalmente ser blanqueadas por inmersión en agua caliente, p. ej. a 70-100°C, bien antes o después del tratamiento enzimático.

60

[0012] La materia prima puede ser grano destinado a hacer un malteado, p. ej. malteado de cebada o trigo. El tratamiento enzimático del grano puede ser hecho antes, durante o después del malteado (germinación).

65

[0013] La materia prima antes del tratamiento térmico normalmente tiene un contenido de agua del 10-90% en peso y es normalmente poco ácido, p. ej. tiene un pH de 5-7.

Tratamiento con calor

[0014] El proceso de la invención implica un tratamiento con calor a alta temperatura hasta alcanzar un contenido de agua final (contenido de humedad) en el producto por debajo del 35% en peso, normalmente 1-20%; 1-10% o 2-5%. Durante el tratamiento térmico, la temperatura en la superficie del producto puede alcanzar 110-220°C, p. ej. 110-170°C o 120-160°C.

[0015] El tratamiento con calor puede implicar freír, particularmente freír profundamente en tri- y/o diglicéridos (aceite o grasa vegetal o animal, opcionalmente hidrogenada), p. ej. a temperaturas de 150-180°C. El tratamiento con calor puede también implicar cocción en aire caliente, p. ej. a 160-310°C o 200-250°C durante 2-10 minutos, o calentamiento sobre una plancha caliente. Además, el tratamiento con calor puede implicar el desecado de malta verde.

Producto tratado con calor

[0016] El proceso de la invención puede ser usado para producir un producto tratado con calor con bajo contenido de agua a partir de materia prima conteniendo hidrato de carbono y proteína, normalmente productos alimenticios amidáceos fritos o cocidos a temperaturas altas. El producto tratado con calor puede ser consumido directamente como un producto comestible o puede ser usado como ingrediente para un tratamiento adicional para preparar un producto comestible o potable.

[0017] Ejemplos de productos para ser consumidos directamente son productos de patata, patatas fritas (de aperitivo), patatas fritas, croquetas de patatas, patatas asadas, cereales de desayuno, tostadas, muesli, galletas, galletas saladas, productos para aperitivo, tortillas mejicanas de trigo, frutos secos asados, galletas de arroz ("senbei" japonés), barquillos, gofres, pasteles calientes, y panqueques.

[0018] La malta (p. ej. malta caramelizada o la llamada malta de chocolate) suele ser adicionalmente procesada macerándola y elaborándola para hacer cerveza.

Enzima capaz de reaccionar con asparragina

[0019] La enzima es asparragina.

[0020] La enzima se usa en una cantidad que es eficaz para reducir la cantidad de acrilamida en el producto final. La cantidad puede estar en el rango de 0,1-100 mg de proteína enzimática por kg de sustancia seca, particularmente 1-10 mg/kg. La asparraginasa puede ser añadida en una cantidad de 10-100 unidades por kg de sustancia seca donde una unidad liberará 1 micromol de amonio de L-asparraguina por min a pH 8,6 a 37°C.

Asparraginasa

[0021] La asparraginasa (EC 3.5.1.1) puede ser derivada de *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium graminearum*, o *Penicillium citrinum*. Tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID NO: 2 (opcionalmente truncada en los residuos 27-378, 30-378, 75-378 o 80-378), o una secuencia que es al menos idéntica en el 90% (particularmente al menos 95%). Puede ser producida usando la información genética en SEC ID NO: 1, 3, 5, 7, 9 u 11, por ejemplo, como se describe en un ejemplo.

[0022] Whitehead Institute, MIT Center for Genome Research, Fungal Genome Initiative ha publicado una edición 1 de *A. nidulans* y edición 1 de *F. graminearum* en Internet en <http://www-genome.wi.mit.edu/ftp/distribution/annotation/> bajo el proyecto de secuenciación de *Aspergillus* y el proyecto de secuenciación de *Fusarium graminearum*. Datos preliminares de la secuencia para *Aspergillus fumigatus* fueron publicados en sitio web de The Institute for Genomic Research en <http://www-genome.wi.mit.edu/ftp/distribution/annotation/>.

[0023] Los inventores insertaron el gen que codifica la asparraginasa de *A. oryzae* en *E. coli* y depositaron el clon según las condiciones del tratado de Budapest en el DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 b, D-38124 Braunschweig. El número de depósito fue DSM 15960, depositado el 6 Octubre 2003.

Alineamiento e identidad

[0024] La enzima y la secuencia de nucleótidos de la invención tienen homologías a las secuencias descritas en al menos 90% o al menos 95%, p. ej. al menos 98%.

[0025] Para los objetivos de la presente invención, los alineamientos de secuencias y el cálculo de la puntuación de identidad se hicieron usando un alineamiento Needleman-Wunsch (es decir alineamiento global), útil para tanto el alineamiento de la proteína como de ADN. Las matrices de marcado por defecto BLOSUM50 y la matriz de identidad

son usadas para los alineamientos de proteína y de ADN respectivamente. La penalización para el primer residuo en un hueco es -12 para proteínas y -16 para ADN, mientras la penalización para residuos adicionales en un hueco es -2 para proteínas y -4 para ADN. El alineamiento es del paquete FASTA versión v20u6 (W. R. Pearson y D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85:2444-2448, y W. R. Pearson (1990) "Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA", Methods in Enzymology; 183:63-98).

Oxidorreductasa capaz de reaccionar con un azúcar de reducción como sustrato.

[0026] El método de la invención puede comprender además tratar la materia prima con una oxidorreductasa capaz de reaccionar con un azúcar de reducción como sustrato. La oxidorreductasa puede ser una oxidasa o deshidrogenasa capaz de reaccionar con un azúcar de reducción como sustrato tal como glucosa y maltosa.

[0027] La oxidasa puede ser una glucosa oxidasa, una piranosa oxidasa, una hexosa oxidasa, una galactosa oxidasa (EC 1.1.3.9) o una hidrato de carbono oxidasa que tiene una actividad más alta en maltosa que en glucosa. La glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4) puede ser derivada de *Aspergillus Niger* p. ej. teniendo la secuencia de aminoácidos descrita en US 5094951. La hexosa oxidasa (EC 1.1.3.5) puede ser derivada de especies de algas tales como *Iridophycus flaccidum*, *Chondrus crispus* y *Euthora cristata*. La piranosa oxidasa puede ser derivada de hongos *Basidiomycete*, *Peniophora gigantean*, *Aphylllophorales*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Polyporus pinsitus*, *Bierkandera adusta* o *Phlebiopsis gigantean*. La hidrato de carbono oxidasa que tiene una actividad más alta en maltosa que en glucosa puede ser derivada de *Microdochium* o *Acremonium*, p. ej. de *M. nivale* (US 6165761), *A. strictum*, *A. fusidioides* o *A. potronii*.

[0028] La deshidrogenasa puede ser glucosa deshidrogenasa (EC 1.1.1.47, EC 1.1.99.10), galactosa deshidrogenasa (EC 1.1.1.48), D-aldohexosa deshidrogenasa (EC 1.1.1.118, EC 1.1.1.119), celobiosa deshidrogenasa (EC 1.1.5.1, p. ej. de *Humicola insolens*), fructosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.11, EC 1.1.1.124, EC 1.1.99.11), aldehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.3, EC 1.2.1.4, EC 1.2.1.5). Otro ejemplo es glucosa-fructosa oxidorreductasa (EC 1.1.99.28).

[0029] La oxidorreductasa se usa en una cantidad que es eficaz para reducir la cantidad de acrilamida en el producto final. Para la glucosa oxidasa, la cantidad puede estar en el rango de 50-20,000 (p. ej. 100-10,000 o 1,000-5,000) GODU/kg de sustancia seca en la materia prima. Una GODU es la cantidad de enzima que forma 1 µmol de peróxido de hidrógeno por minuto a 30°C, pH 5,6 (tampón de acetato) con glucosa 16,2 g/l (90 mM) como sustrato usando un período de incubación de 20 min. Para otras enzimas, la dosificación puede ser encontrada de forma similar analizando con el sustrato apropiado.

EJEMPLOS

Medios

DAP2C-1

[0030]

11g MgSO₄ · 7H₂O
1g KH₂PO₄
2g Ácido cítrico, monohidrato
30g maltodextrina
6g K₃PO₄ · 3H₂O
0,5g extracto de levadura
0,5ml solución de metales traza
1 ml Plurónico PE 6100 (BASF, Ludwigshafen, Alemania)

[0031] Los componentes son mezclados en un litro de agua destilada y repartidos en frascos, añadiendo 250 mg de CaCO₃ a cada porción de 150ml.

[0032] El medio es esterilizado en un autoclave. Tras el enfriamiento se añade lo siguiente a 1 litro de medio:

23 ml 50% p/v (NH₄)₂HPO₄, filtro esterilizado
33 ml 20% ácido láctico, filtro esterilizado

Solución de metales traza

[0033]

6,8g ZnCl₂
2,5g CuSO₄ · 5H₂O
0,24g NiCl₂ · 6H₂O
13,9g FeSO₄ · 7H₂O
8,45g MnSO₄ · H₂O
3g Ácido cítrico, monohidrato
Los componentes son mezclados en un litro de agua destilada.

Ensayo de actividad de asparraginasa

Soluciones concentradas

- 5 [0034] 50 mM tampón Tris, pH 8.6
189mM Solución de L-Asparraguina
1,5 M Ácido tricloroacético (ATC)
10 Reactivo de Nessler, Aldrich Stock No. 34,514-8 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo. USA)
Asparraginasa, Sigma Stock No. A4887 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo. USA)

Ensayo

15 Reacción enzimática:

- [0035] 500 micro-l tampón
100 micro-l Solución de L-asparaguina
20 350 micro-l agua
son mezclados y equilibrados a 37°C.
se añaden 100 micro-l de solución enzimática y las reacciones son incubadas a 37°C durante 30 minutos.

- [0036] Las reacciones son detenidas colocándolas en hielo y añadiendo 50 micro-l de 1,5M ATC.

- [0037] Las muestras son mezcladas y centrifugadas durante 2 minutos a 20,000 g

Medición de amonio libre:

- 30 [0038] Se mezclan 50 micro-l de la reacción enzimática con 100 micro-l de agua y 50 micro-l de reactivo de Nessler. La reacción es mezclada y la absorbencia es medida a 436nm después de 1 minuto.

Estándar:

- 35 [0039] El concentrado de asparraginasa (Sigma A4887) es diluido 0,2, 0,5, 1, 1,5, 2, y 2,5 U/ml.

Ejemplo 1: expresión de una asparraginasa de *Aspergillus oryzae* en *Aspergillus oryzae*

- 40 [0040] Se generaron bibliotecas de ADNc de ARNM de *Aspergillus oryzae*, se ordenaron y almacenaron en una base de datos de ordenador como se describe en WO 00/56762.

- [0041] Se comparó la secuencia péptida de asparraginasa de *Saccharomyces cerevisiae* (Kim,K.-W.; Kamerud,J.Q.; Livingston,D.M.; Roon,R.J., (1988) Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*. Characterization of the ASP3 gene. J. Biol. Chem. 263:11948), con traducciones de las secuencias de ADNc parcial de *Aspergillus oryzae* usando el programa TFASTXY, versión 3.2t07 (Pearson et al. Genomics (1997) 46:24-36). Se identificó una secuencia de *A. oryzae* traducida como teniendo una identidad del 52% para asparraginasa II de levadura a través de un recubrimiento de 165 aminoácidos. Se determinó la secuencia completa del inserto de ADNc del clon correspondiente (depositado como DSM 15960) y se presentó como SEC ID NO: 1, y el péptido traducido de esta secuencia, AoASP, es presentado como SEC ID NO: 2. Esta secuencia fue usada para designar cebadores para la amplificación PCR del gen de codificación AoASP de DSM 15960, con sitios de restricción apropiados añadidos a las extremidades del cebador para facilitar la subclonación del producto PCR (cebadores AoASP7 y AoASP8, SEC ID Nos: 14 y 15). La amplificación PCR fue realizada usando Extensor Hi-Fidelity PCR Master Mix (ABgene, Surrey, U.K.) siguiendo las instrucciones del fabricante y usando una temperatura de anelación de 55°C para los primeros 5 ciclos y 65°C para un ciclo adicional y un tiempo de extensión de 1,5 minutos.

- 55 [0042] El fragmento de PCR fue restringido con BamHI y HindIII y clonado en el vector de expresión *Aspergillus* pMStr57 usando técnicas estándares. El vector de expresión pMStr57 contiene los mismos elementos que pCaHj483 (WO 98/00529), con modificaciones menores hechas al promotor NA2 de *Aspergillus* como se describe para el vector pMT2188 en WO 01/12794, y tiene secuencias para la selección y propagación en *E. coli*, y selección y expresión en *Aspergillus*. Específicamente, la selección en *Aspergillus* es facilitada por el gen *amdS* de *Aspergillus nidulans*, que permite el uso de acetamida como única fuente de nitrógeno. La expresión en *Aspergillus* es mediada por un promotor (NA2) de amilasa II neutra modificada de *Aspergillus Niger* que es fusionado en la secuencia líder 5' del gen de codificación de triosa fosfato isomerasa (tpi) de *Aspergillus nidulans*, y el terminador del gen de codificación de amiloglucosidasa de *Aspergillus niger*. El gen de codificación de asparraginasa del constructo de expresión de *Aspergillus* resultante, pMStr90, fue secuenciado y la secuencia coincidía completamente con aquella determinada previamente para el inserto de DSM 15960.

[0043] La cepa de *Aspergillus oryzae* BECh2 (WO 00/39322) fue transformada con pMStr90 usando técnicas estándares (Christensen, T. et al., (1988), Biotechnology 6, 1419-1422). Los transformantes fueron cultivados en medio DAP2C-1 agitado a 200 rpm a 30°C y la expresión de AoASP fue controlada por SDS-PAGE y midiendo la actividad enzimática.

Ejemplo 2: Purificación de asparraginasa

[0044] El caldo de cultivo del ejemplo precedente fue centrifugado (20000 x g; 20 min) y los sobrenadantes fueron cuidadosamente decantados de los precipitados. Los sobrenadantes combinados fueron filtrados a través de una placa Seitz EKS para eliminar el resto de las células huéspedes de *Aspergillus*. El producto filtrado por EKS fue transferido a 10 mM tris/HCl, pH 8 en una columna sephadex G25 y aplicado a una columna Q sefarosa HP equilibrada en el mismo tampón. Después del lavado de la columna Q sefarosa HP extensivamente con el tampón de equilibrado, la asparraginasa fue eluida con un gradiente lineal de NaCl (0 --> 0,5M) en el mismo tampón. Se analizó la actividad de asparraginasa de las fracciones de la columna (usando el tampón Universal pH 6,0) y se agruparon las fracciones con actividad. Se añadió sulfato de amonio a la agrupación a 2,0M de concentración final y la agrupación fue aplicada a una columna Phenyl Toyopearl S equilibrada en 20 mM de ácido succínico; 2,0M (NH₄)₂SO₄, pH 6,0. Después del lavado de la columna de fenilo extensivamente con el tampón de equilibrado, la enzima fue eluida con un gradiente lineal (NH₄)₂SO₄ (2,0 --> 0M) en el mismo tampón. Se analizó de nuevo la actividad de la asparraginasa en las fracciones de la columna y se analizaron adicionalmente las fracciones activas por SDS-PAGE. Las fracciones que se juzgaron que sólo contenían la asparraginasa, fueron agrupadas como la preparación purificada y fue usada para una caracterización adicional. La asparraginasa purificada fue heterogéneamente glicosilada juzgado a partir del Gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie y, además, la secuenciación de N-terminal de la preparación reveló que la preparación contenía formas de asparraginasa diferentes, ya que se hallaron cuatro N-terminales diferentes empezando en los aminoácidos A₂₇, S₃₀, G₇₅ y A₈₀ respectivamente de la SEC ID NO: 2. No obstante, la secuenciación de N-terminal también indicó que la preparación purificada fue relativamente pura pues no se hallaron otras secuencias de N-terminal por el análisis.

Ejemplo 3: Propiedades de asparraginasa

[0045] La asparraginasa purificada del ejemplo precedente fue usada para la caracterización.

Ensayo de asparraginasa

[0046] Se usó un ensayo enzimático acoplado. La Asparraginasa fue incubada con asparragina y el amonio liberado fue determinado con un equipo de amonio de Boehringer Mannheim (cat. no. 1 112 732) basado en glutamato deshidrogenasa y oxidación de NADH a NAD⁺ (puede ser medida como una reducción en A₃₇₅). Por lo tanto la reducción en absorbencia a 375 nm fue tomada como una medida de actividad asparraginasa.

Sustrato de asparragina:	10mg/ml L-asparraguina (Sigma A-7094) fueron disueltos en tampones Universales y el pH fue ajustado a los valores de pH indicados con HCl o NaOH.
Temperatura:	controlada
Tampones universales:	100 mM ácido succínico; 100 mM HEPES; 100 mM CHES; 100 mM CABS; 1 mM CaCl ₂ , 150 mM KCl; 0,01% Tritón X-100 ajustados a valores de pH 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0, 11,0 y 12,0 con HCl o NaOH.
Reactivo de detención:	500 mM ATC (ácido tricloroacético).
Tampón de ensayo:	1,0M KH ₂ PO ₄ /NaOH, pH 7,5.
Reactivo de amonio A:	1 NADH pastilla + 1,0 ml botella 1 (contienen 2-oxoglutarato (segundo sustrato) y tampón) + 2,0 ml tampón de ensayo.
Reactivo de amonio B:	40 micro-l botella 3 (contienen glutamato deshidrogenasa) + 1460 micro-l tampón de ensayo.

[0047] Se colocaron 450 micro-l de sustrato de asparragina en hielo en un tubo de Eppendorf. Se añadieron 50 micro-l de una muestra de asparraginasa (diluida en 0.01 % Tritón X-100). El ensayo fue iniciado transfiriendo el tubo de Eppendorf a un termomezclador Eppendorf, que fue configurado a la temperatura de ensayo. El tubo fue incubado durante 15 minutos en el termomezclador Eppendorf a su velocidad de agitación máxima (1400 rpm). La incubación fue detenida transfiriendo el tubo de nuevo al baño de hielo y añadiendo 500 micro-l de reactivo de detención. El tubo fue sometido a movimiento vorticial y centrifugado brevemente en una centrífuga enfriada con hielo para precipitar las proteínas en el tubo. La cantidad de amonio liberado por la enzima fue medida por el procedimiento siguiente: se transfirieron 20 micro-l de sobrenadante a una placa de microtitulación; se añadieron 200 micro-l de reactivo de amonio A y se leyó A₃₇₅ (A₃₇₅ (inicial)). Luego se añadieron 50 micro-l de reactivo de amonio B y después de 10 minutos a temperatura ambiente la placa fue leída de nuevo (A₃₇₅ (final)). A₃₇₅ (inicial) - A₃₇₅ (final) fue una medida de actividad asparraginasa. Se incluyó un tampón ciego en el ensayo (en vez de enzima) y la reducción en A₃₇₅ en el tampón ciego fue restada de las muestras enzimáticas.

Actividad según pH, estabilidad según pH, y actividad según temperatura de asparraginasa

5

[0048] El ensayo de asparraginasa arriba fue usado para obtener la actividad según el perfil de pH, la estabilidad según el perfil de pH al igual que la actividad según el perfil de temperatura a pH 7,0. Para la estabilidad según el perfil de pH la asparraginasa fue diluida 7x en los tampones Universales e incubada durante 2 horas a 37°C. Tras la incubación las muestras de asparraginasa fueron transferidas a un pH neutro, antes de ensayar la actividad residual, por dilución en el tampón Universal a pH 7.

[0049] Los resultados para la actividad según el perfil de pH a 37°C fueron los siguientes, con respecto a la actividad residual después de 2 horas a pH 7,0 y 5°C:

pH	Asparraginasa
2	0,00
3	0,01
4	0,10
5	0,53
6	0,95
7	1,00
8	0,66
9	0,22
10	0,08
11	0,00

10

[0050] Los resultados para la estabilidad según el perfil de pH (actividad residual después de 2 horas a 37°C) fueron los siguientes:

pH	Asparraginasa
2,0	0,00
3,0	0,00
4,0	1,06
5,0	1,08
6,0	1,09
7,0	1,09
8,0	0,92
9,0	0,00
10,0	0,00
11,0	0,00
12,0	0,00
	1,00

15

[0051] Los resultados para el perfil de actividad según la temperatura (a pH 7,0) fueron los siguientes:

Temp (°C)	Asparraginasa
15	0,24
25	0,39
37	0,60
50	0,81
60	1,00
70	0,18

Otras características

[0052] El peso molecular relativo determinado por SDS-PAGE fue visto como una banda ancha (una mancha) a M_r = 40-65 kDa.

[0053] La secuenciación de N-terminal mostró cuatro terminales diferentes, correspondiendo a los residuos 27-37, 30-40, 75-85 y 80-91 de la SEC ID NO: 2; respectivamente.

Ejemplo 3: Clonación de asparraginasas de *Penicillium citrinum*

[0054] *Penicillium citrinum* fue hecha crecer en medio MEX-1 (Medio B en WO 98/38288) en matraces agitados a 150RPM a 26°C durante 3 y 4 días. El micelio fue cosechado, una biblioteca de ADNc fue construida, los ADNc que codificaban los péptidos segregados fueron seleccionados y secuenciados por métodos descritos en WO 03/044049. La comparación con secuencias conocidas por métodos descritos en WO 03/044049 indicó que la secuencia de Penicilina ZY132299 codificaron una asparraginasas. La secuencia completa del ADNc correspondiente fue determinado y se presenta como SEC ID N°: 11, y el péptido traducido de esta secuencia se presenta como SEC ID N°: 12.

Ejemplo 4: Efecto de asparraginasas en el contenido de acrilamida en patatas fritas

[0055] Se preparó asparraginasas de *A. oryzae* teniendo la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 2 y se purificó como en los Ejemplos 1-2 y se añadió en varias dosificaciones a patatas fritas hechas de 40 g de agua, 52,2 g de escamas de patata deshidratada, 5,8 g de almidón de patata y 2 g de sal.

[0056] La harina y los ingredientes secos fueron mezclados durante 30 seg. La sal y la enzima fueron disueltas en el agua, y la solución fue ajustada a 30°C. La solución fue añadida a la harina. La masa fue adicionalmente mezclada durante 15 min. La masa mezclada fue colocada en una bolsa de plástico cerrada y dejada reposar durante 15 min a temperatura ambiente.

[0057] La masa fue luego inicialmente comprimida durante 60 seg en una prensa para masa.

[0058] Se extendió la masa en hojas y se dobló en un rodillo para pasta hasta obtener masa de 5 x 10 mm. La masa fue luego pasada por un rodillo y dejada reposar durante 30 min en una bolsa de plástico a temperatura ambiente. Se extendió adicionalmente la masa en hojas con un espesor de hoja final de aprox 1.2 mm.

[0059] La hoja fue cortada en cuadrados de aprox 3 x 5 cm.

[0060] Las hojas fueron colocadas en un cesto de freír, colocadas en un baño de aceite y fritas durante 45 seg a 180°C. El cesto fue mantenido en un ángulo de 45° hasta que dejó de gotear. Se retiraron los productos del cesto y se dejaron enfriar en papel absorbente seco.

[0061] Las patatas fritas fueron homogenizadas y se analizó la acrilamida. Los resultados fueron los siguientes:

Dosificación de asparraginasas U/kg sustancia seca de patata	Acrilamida Micro-g por kg
0	5,200
100	4,600
500	3,100
1000	1,200
2000	150

[0062] Los resultados demuestran que el tratamiento de asparraginasas es eficaz para reducir el contenido de acrilamida en patatas fritas, que la reducción de acrilamida depende claramente de la dosificación y que el contenido de acrilamida puede ser reducido a un nivel muy bajo.

Ejemplo 5: Efecto de varias enzimas en el contenido de acrilamida en patatas fritas

[0063] Se prepararon patatas fritas como sigue con adición de sistemas enzimáticos que son capaces de reaccionar en asparragina, como se indica abajo.

Receta:

[0064]	Agua corriente	40 g
	Escamas de patata deshidratada	52,2 g
	Almidón de patata	5,8 g
	Sal	2 g

Procedimiento de elaboración de la masa:

- 5 [0065] Se mezclaron las escamas de patata y almidón de patata durante 30 seg en un mezclador a velocidad 5. La sal y la enzima son disueltas en el agua. La solución es ajustada a 30°C +/- 1 °C. Se para el mezclador y se añade toda la solución de sal/enzima a la harina. La masa es adicionalmente mezclada durante 15 min.
- 10 [0066] Se coloca la masa en una bolsa de plástico, se cierra la bolsa y se deja reposar la masa durante 15 min a temperatura ambiente.
- [0067] La masa es luego inicialmente comprimida durante 60 seg en una prensa para masa.
- 15 [0068] La masa es extendida en hojas y plegada en una máquina de rodillo de pasta hasta obtener masa de aprox. 5 x10 mm. La masa es luego pasada alrededor de un rodillo y la masa es dejada reposar durante 30 min en una bolsa de plástico a temperatura ambiente. La masa es adicionalmente preparada en hojas con un espesor de hoja final de aprox 1,2 mm.
- [0069] Se corta la hoja en cuadrados de aprox 3 x 5 cm.
- 20 [0070] Las hojas son colocadas en un cesto de freír, colocadas en el baño de aceite y fritas durante 60 seg a 180°C. Se sujeta el cesto en un ángulo de 45° y se deja drenar el producto hasta que el aceite deje de gotear. Se retiran los productos del cesto y se dejan enfriar en papel absorbente seco.
- 25 [0071] Los resultados del análisis de acrilamida fueron los siguientes:

Enzima	Dosificación de enzima por kg de sustancia seca de patata	Acrilamida Micro-g por kg
Ninguna (control)	0	4,100
Asparaginasa de <i>Erwinia Chrysanthemi</i> A-2925	1000 U/kg	150
Glutaminasa (producto de Daiwa)	50 mg proteína enzimática/kg	1,800
Aminoacidoxidasa de <i>Trichoderma harzianum</i> descrito en WO 9425574.	50 mg de proteína enzimática/kg	1,300
Lacasa de <i>Myceliophthora thermophila</i> + peroxidasa de <i>Coprinus</i>	5000 LAMU/kg + 75 mg de proteína enzimática/kg	2,000

[0072] Los resultados demuestran que todos los sistemas de enzima evaluados son eficaces para reducir el contenido de acrilamida de patatas fritas.

30 Listado de secuencias

[0073]

<110> Novozymes A/S

35 <120> Método para preparar un producto comestible

<130> 10347-WO

<160> 15

40

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1303

45

<212> ADN

<213> *Aspergillus oryzae*

<220>

<221> CDS

50

<222> (49)..(1182)

<400> 1

ccacgcgtcc gattccctac tcagagcccc gagcaaccaa gcagcagt atg ggt gtc	57
Met Gly Val 1	
aat ttc aaa gtt ctt gcc ctg tcg gcc tta gct act att agc cat gct	105
Asn Phe Lys Val Leu Ala Leu Ser Ala Leu Ala Thr Ile Ser His Ala 5 10 15	
tcg cct ctc cta tat cct cga gcc aca gac tcg aac gtc acc tat gtg	153
Ser Pro Leu Leu Tyr Pro Arg Ala Thr Asp Ser Asn Val Thr Tyr Val 20 25 30 35	
ttc acc aac ccc aat ggc ctg aac ttt act cag atg aac acc acc ctg	201
Phe Thr Asn Pro Asn Gly Leu Asn Phe Thr Gln Met Asn Thr Thr Leu 40 45 50	
cca aac gtc act atc ttc gcg aca ggc ggc aca atc gcg ggc tcc agc	249
Pro Asn Val Thr Ile Phe Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly Ser Ser 55 60 65	
gcc gac aac acc gca aca aca ggt tac aaa gcc ggt gca gtc ggc atc	297
Ala Asp Asn Thr Ala Thr Thr Gly Tyr Lys Ala Gly Ala Val Gly Ile 70 75 80	
cag aca ctg atc gac gcg gtc ccg gaa atg cta aac gtt gcc aac gtc	345
Gln Thr Leu Ile Asp Ala Val Pro Glu Met Leu Asn Val Ala Asn Val 85 90 95	
gct ggc gtg caa gta acc aat gtc ggc agc cca gac atc acc tcc gac	393
Ala Gly Val Gln Val Thr Asn Val Gly Ser Pro Asp Ile Thr Ser Asp 100 105 110 115	
att ctc ctg cgt ctc tcc aaa cag atc aac gag gtg gtc tgc aac gac	441
Ile Leu Leu Arg Leu Ser Lys Gln Ile Asn Glu Val Val Cys Asn Asp 120 125 130	
ccc acc atg gcc ggt gca gtg gtc acc cac ggc acc gac acg ctc gaa	489
Pro Thr Met Ala Gly Ala Val Val Thr His Gly Thr Asp Thr Leu Glu 135 140 145	
gaa tcc gcc ttc ttc ctc gac gcc acg gtc aac tgt cgc aag ccc gtg	537
Glu Ser Ala Phe Phe Leu Asp Ala Thr Val Asn Cys Arg Lys Pro Val 150 155 160	
gtc atc gtc ggc gcc atg cgc cct tca acc gcc atc tcg gct gac ggc	585
Val Ile Val Gly Ala Met Arg Pro Ser Thr Ala Ile Ser Ala Asp Gly	

165	170	175	
ccc ctc aac ctc ctg caa tcc gtc acc gtc gcc gcg agc ccc aag gcc Pro Leu Asn Leu Leu Gln Ser Val Thr Val Ala Ala Ser Pro Lys Ala 180 185 190 195			633
cga gac cgc ggc gcc ctg att gtc atg aac gac cgc atc gta tcc gcc Arg Asp Arg Gly Ala Leu Ile Val Met Asn Asp Arg Ile Val Ser Ala 200 205 210			681
ttc tac gcc tcc aag acg aac gcc aac acc gtc gat aca ttc aag gcc Phe Tyr Ala Ser Lys Thr Asn Ala Asn Thr Val Asp Thr Phe Lys Ala 215 220 225			729
atc gaa atg ggt aac ctg ggc gag gtc gtc tcc aac aaa ccc tac ttc Ile Glu Met Gly Asn Leu Gly Glu Val Val Ser Asn Lys Pro Tyr Phe 230 235 240			777
ttc tac ccc cca gtc aag cca aca ggc aag acg gaa gta gat atc cgg Phe Tyr Pro Pro Val Lys Pro Thr Gly Lys Thr Glu Val Asp Ile Arg 245 250 255			825
aac atc acc tcc atc ccc aga gtc gac atc ctc tac tca tac gaa gac Asn Ile Thr Ser Ile Pro Arg Val Asp Ile Leu Tyr Ser Tyr Glu Asp 260 265 270			873
atg cac aat gac acc ctt tac tcc gcc atc gac aac ggc gca aag ggc Met His Asn Asp Thr Leu Tyr Ser Ala Ile Asp Asn Gly Ala Lys Gly 280 285 290			921
atc gtt atc gcc ggc tcc ggc tcc ggc tcc gtc tcc acc ccc ttc agc Ile Val Ile Ala Gly Ser Gly Ser Gly Ser Val Ser Thr Pro Phe Ser 295 300 305			969
gcc gcc atg gaa gac atc aca acc aaa cac aac atc ccc atc gta gcc Ala Ala Met Glu Asp Ile Thr Thr Lys His Asn Ile Pro Ile Val Ala 310 315 320			1017
agc acg cgc acc gga aac ggg gag gtc ccg tcc tcc gcc gag tcg agc Ser Thr Arg Thr Gly Asn Gly Glu Val Pro Ser Ser Ala Glu Ser Ser 325 330 335			1065
cag atc gca agc ggg tat ttg aac ccc gca aag tca cgc gtt ttg ctt Gln Ile Ala Ser Gly Tyr Leu Asn Pro Ala Lys Ser Arg Val Leu Leu 340 345 350 355			1113
ggc ttg ttg ctt gcc cag ggg aag agt att gag gaa atg agg gcg gtt Gly Leu Leu Leu Ala Gln Gly Lys Ser Ile Glu Glu Met Arg Ala Val 360 365 370			1161
ttt gag cgg att ggg gtt gct tgattttttt ttcttttctg cttgggtcttt Phe Glu Arg Ile Gly Val Ala 375			1212
gtttaggggtt ggggtttgtg tattatagat taaggattta tggatgggat ggataataga ttatagatta tagattaagt atcgattatg g			1272 1303

<210> 2

<211> 378

<212> PRT

<213> *Aspergillus oryzae*

<400> 2

Met Gly Val Asn Phe Lys Val Leu Ala Leu Ser Ala Leu Ala Thr Ile
 1 5 10 15
 Ser His Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Pro Arg Ala Thr Asp Ser Asn Val
 20 25 30
 Thr Tyr Val Phe Thr Asn Pro Asn Gly Leu Asn Phe Thr Gln Met Asn
 35 40 45
 Thr Thr Leu Pro Asn Val Thr Ile Phe Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala
 50 55 60
 Gly Ser Ser Ala Asp Asn Thr Ala Thr Thr Gly Tyr Lys Ala Gly Ala
 65 70 75 80
 Val Gly Ile Gln Thr Leu Ile Asp Ala Val Pro Glu Met Leu Asn Val
 85 90 95
 Ala Asn Val Ala Gly Val Gln Val Thr Asn Val Gly Ser Pro Asp Ile
 100 105 110
 Thr Ser Asp Ile Leu Leu Arg Leu Ser Lys Gln Ile Asn Glu Val Val
 115 120 125
 Cys Asn Asp Pro Thr Met Ala Gly Ala Val Val Thr His Gly Thr Asp
 130 135 140
 Thr Leu Glu Glu Ser Ala Phe Phe Leu Asp Ala Thr Val Asn Cys Arg
 145 150 155 160
 Lys Pro Val Val Ile Val Gly Ala Met Arg Pro Ser Thr Ala Ile Ser
 165 170 175
 Ala Asp Gly Pro Leu Asn Leu Leu Gln Ser Val Thr Val Ala Ala Ser
 180 185 190
 Pro Lys Ala Arg Asp Arg Gly Ala Leu Ile Val Met Asn Asp Arg Ile
 195 200 205
 Val Ser Ala Phe Tyr Ala Ser Lys Thr Asn Ala Asn Thr Val Asp Thr
 210 215 220
 Phe Lys Ala Ile Glu Met Gly Asn Leu Gly Glu Val Val Ser Asn Lys
 225 230 235 240
 Pro Tyr Phe Phe Tyr Pro Pro Val Lys Pro Thr Gly Lys Thr Glu Val
 245 250 255
 Asp Ile Arg Asn Ile Thr Ser Ile Pro Arg Val Asp Ile Leu Tyr Ser
 260 265 270
 Tyr Glu Asp Met His Asn Asp Thr Leu Tyr Ser Ala Ile Asp Asn Gly
 275 280 285

ES 2 511 292 T3

Ala Lys Gly Ile Val Ile Ala Gly Ser Gly Ser Gly Ser Val Ser Thr
 290 295 300
 Pro Phe Ser Ala Ala Met Glu Asp Ile Thr Thr Lys His Asn Ile Pro
 305 310 315 320
 Ile Val Ala Ser Thr Arg Thr Gly Asn Gly Glu Val Pro Ser Ser Ala
 325 330 335
 Glu Ser Ser Gln Ile Ala Ser Gly Tyr Leu Asn Pro Ala Lys Ser Arg
 340 345 350
 Val Leu Leu Gly Leu Leu Leu Ala Gln Gly Lys Ser Ile Glu Glu Met
 355 360 365
 Arg Ala Val Phe Glu Arg Ile Gly Val Ala
 370 375

<210> 3
 <211> 1400
 <212> ADN
 <213> Aspergillus nidulans

<220>
 <221> CDS
 <222> (89)..(269)

<220>
 <221> CDS
 <222> (347)..(1299)

<400> 3

ccctttatga cggccgaaag atggatatgc tactatacag attcagcctt cttgcctttg	60
ggagagcgtt tgatactata cgcaaata atg ggt ctc cgt gtc aaa gcc ctt	112
Met Gly Leu Arg Val Lys Ala Leu	
1 5	
gca gtg gca gct ctg gct acc ctc agc cag gcc tcg ccg gtc cta tac	160
Ala Val Ala Ala Leu Ala Thr Leu Ser Gln Ala Ser Pro Val Leu Tyr	
10 15 20	
act cgc gag gac act acc tcc aac aca acc tac gcc ttt acc aac agc	208
Thr Arg Glu Asp Thr Thr Ser Asn Thr Thr Tyr Ala Phe Thr Asn Ser	
25 30 35 40	
aac ggg ctg aac ttc acc cag atg aac acc aca ctt cct aat gta acc	256
Asn Gly Leu Asn Phe Thr Gln Met Asn Thr Thr Leu Pro Asn Val Thr	
45 50 55	
atc ttc gca aca g gatatgaccgt cccttcactt tcccatctct ttccaacccc	309
Ile Phe Ala Thr	
60	
cttcagcaaa cagcaaacta aacaatagca acaacag gc ggc aca atc gcc ggc	363
Gly Gly Thr Ile Ala Gly	
65	
tcg gcc gcc tct aac act gca aca aca ggc tac cag gcg ggc gcc ctc	411
Ser Ala Ala Ser Asn Thr Ala Thr Thr Gly Tyr Gln Ala Gly Ala Leu	
70 75 80	

gga atc cag acc ctc atc gac gcc gtc ccc gaa atg ctc tcc gtc gcc Gly Ile Gln Thr Leu Ile Asp Ala Val Pro Glu Met Leu Ser Val Ala 85 90 95	459
aac atc gcc gcc gtg cag atc tcc aac gtc ggt agc cca gac gtc acc Asn Ile Ala Gly Val Gln Ile Ser Asn Val Gly Ser Pro Asp Val Thr 100 105 110	507
tcc acc atc ctg cta gag atg gcg cac cgt ctc aac aaa gtt gtc tgc Ser Thr Ile Leu Leu Glu Met Ala His Arg Leu Asn Lys Val Val Cys 115 120 125 130	555
gag gac cca tcc atg gct gcc gca gtc gtc acc cac gcc act gac acc Glu Asp Pro Ser Met Ala Gly Ala Val Val Thr His Gly Thr Asp Thr 135 140 145	603
ctt gag gaa acg gcc ttc ttc ctc gac gca aca gtc aac tgc ggg aag Leu Glu Glu Thr Ala Phe Phe Leu Asp Ala Thr Val Asn Cys Gly Lys 150 155 160	651
cct att gtc atc gtg gcc gcc atg cgg ccc gca aca ttc atc tct gcc Pro Ile Val Ile Val Gly Ala Met Arg Pro Ala Thr Phe Ile Ser Ala 165 170 175	699
gat ggg ccc tat aat ctc ctg cag gcc gtt act gtc gcg agc acg aaa Asp Gly Pro Tyr Asn Leu Leu Gln Ala Val Thr Val Ala Ser Thr Lys 180 185 190	747
gag gca agg aac agg gcc gcg atg gtc gtc atg aac gac cgc atc gcc Glu Ala Arg Asn Arg Gly Ala Met Val Val Met Asn Asp Arg Ile Ala 195 200 205 210	795
tcc gct tac tac gtg tcc aag aca aac gcc aat acg atg gat aca ttc Ser Ala Tyr Tyr Val Ser Lys Thr Asn Ala Asn Thr Met Asp Thr Phe 215 220 225	843
aag gct gtg gaa atg ggg tac ctg ggt gcc att atc tcg aac act ccg Lys Ala Val Glu Met Gly Tyr Leu Gly Ala Ile Ile Ser Asn Thr Pro 230 235 240	891
ttc ttc tat tac ccg gcc gtg cag cca agt ggg aag acg act gtc gat Phe Phe Tyr Tyr Pro Ala Val Gln Pro Ser Gly Lys Thr Thr Val Asp 245 250 255	939
gtg tcc aac gtc acc tcc atc ccg cgc gtc gac atc ctc tac tcc ttc Val Ser Asn Val Thr Ser Ile Pro Arg Val Asp Ile Leu Tyr Ser Phe 260 265 270	987
cag gac atg aca aac gac acg ctc tac tca agc att gag aac gcc gcg Gln Asp Met Thr Asn Asp Thr Leu Tyr Ser Ser Ile Glu Asn Gly Ala 275 280 285 290	1035
aag gcc gtt gtt atc gca gga tct ggt gct ggg agt gtc gat acc gcc Lys Gly Val Val Ile Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ser Val Asp Thr Ala 295 300 305	1083
ttc tcg acg gct att gat gat att atc agc aac cag gga gtt ccg atc Phe Ser Thr Ala Ile Asp Asp Ile Ile Ser Asn Gln Gly Val Pro Ile 310 315 320	1131
gtg cag agt act agg aca gga aac gga gag gtc ccg tat tcg gct gag Val Gln Ser Thr Arg Thr Gly Asn Gly Glu Val Pro Tyr 335 330	1179
ggg ggt att tcg agc ggg ttc ctg aac cca gct aag tcg agg att ttg Gly Gly Ile Ser Ser Gly Phe Leu Asn Pro Ala Lys Ser Arg Ile Leu 340 345 350	1227
ttg gga ttg ctg ttg gcc cag gga ggg aag gcc act gaa gaa att agg	1275

ES 2 511 292 T3

```

Leu Gly Leu Leu Leu Ala Gln Gly Gly Lys Gly Thr Glu Glu Ile Arg
355          360          365          370
gcg gtg ttt ggg aag gtt gct gtt tgattcccga ctgcccaggg cttatgatgt 1329
Ala Val Phe Gly Lys Val Ala Val
375

gatttgatga gatatggtat aataatccgt atatatccag tagatatcat ggaagatgat 1389
gaatagctgc c 1400

```

```

<210> 4
<211> 378
<212> PRT
<213> Aspergillus nidulans

<400> 4

```

Met Gly Leu Arg Val Lys Ala Leu Ala Val Ala Ala Leu Ala Thr Leu
1 5 10 15

Ser Gln Ala Ser Pro Val Leu Tyr Thr Arg Glu Asp Thr Thr Ser Asn
20 25 30

Thr Thr Tyr Ala Phe Thr Asn Ser Asn Gly Leu Asn Phe Thr Gln Met
35 40 45

Asn Thr Thr Leu Pro Asn Val Thr Ile Phe Ala Thr Gly Gly Thr Ile
50 55 60

Ala Gly Ser Ala Ala Ser Asn Thr Ala Thr Thr Gly Tyr Gln Ala Gly
65 70 75 80

Ala Leu Gly Ile Gln Thr Leu Ile Asp Ala Val Pro Glu Met Leu Ser
85 90 95

Val Ala Asn Ile Ala Gly Val Gln Ile Ser Asn Val Gly Ser Pro Asp
100 105 110

Val Thr Ser Thr Ile Leu Leu Glu Met Ala His Arg Leu Asn Lys Val
115 120 125

Val Cys Glu Asp Pro Ser Met Ala Gly Ala Val Val Thr His Gly Thr
130 135 140

Asp Thr Leu Glu Glu Thr Ala Phe Phe Leu Asp Ala Thr Val Asn Cys
145 150 155 160

Gly Lys Pro Ile Val Ile Val Gly Ala Met Arg Pro Ala Thr Phe Ile
165 170 175

Ser Ala Asp Gly Pro Tyr Asn Leu Leu Gln Ala Val Thr Val Ala Ser
180 185 190

Thr Lys Glu Ala Arg Asn Arg Gly Ala Met Val Val Met Asn Asp Arg
195 200 205

ES 2 511 292 T3

Ile Ala Ser Ala Tyr Tyr Val Ser Lys Thr Asn Ala Asn Thr Met Asp
 210 215 220
 Thr Phe Lys Ala Val Glu Met Gly Tyr Leu Gly Ala Ile Ile Ser Asn
 225 230 235 240
 Thr Pro Phe Phe Tyr Tyr Pro Ala Val Gln Pro Ser Gly Lys Thr Thr
 245 250 255
 Val Asp Val Ser Asn Val Thr Ser Ile Pro Arg Val Asp Ile Leu Tyr
 260 265 270
 Ser Phe Gln Asp Met Thr Asn Asp Thr Leu Tyr Ser Ser Ile Glu Asn
 275 280 285
 Gly Ala Lys Gly Val Val Ile Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ser Val Asp
 290 295 300
 Thr Ala Phe Ser Thr Ala Ile Asp Asp Ile Ile Ser Asn Gln Gly Val
 305 310 315 320
 Pro Ile Val Gln Ser Thr Arg Thr Gly Asn Gly Glu Val Pro Tyr Ser
 325 330 335
 Ala Glu Gly Gly Ile Ser Ser Gly Phe Leu Asn Pro Ala Lys Ser Arg
 340 345 350
 Ile Leu Leu Gly Leu Leu Leu Ala Gln Gly Gly Lys Gly Thr Glu Glu
 355 360 365
 Ile Arg Ala Val Phe Gly Lys Val Ala Val
 370 375

<210> 5
 <211> 1330
 <212> ADN
 <213> Aspergillus fumigatus

<220>
 <221> CDS
 <222> (93)..(978)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1056)..(1291)

<400> 5

gccctacgat actttgttga tacggttggc tggcgtgtac agcgatttca ctcctcgaa	60
agcagagcag ttgcctcgt cagatcgcaa ag atg acc aaa ctc agc ttc aaa	113
Met Thr Lys Leu Ser Phe Lys	
1 5	
atc atc aca ctc gcg gct atg ata gcc gtt ggg aat gcc tct ccg ttt	161
Ile Ile Thr Leu Ala Ala Met Ile Ala Val Gly Asn Ala Ser Pro Phe	

10					15					20						
gtc Val	tac Tyr 25	ccc Pro	cga Arg	gca Ala	acc Thr	agc Ser 30	cca Pro	aac Asn	agt Ser	aca Thr	tat Tyr 35	gtc Val	ttc Phe	acc Thr	aac Asn	209
tcg Ser 40	cat His	ggc Gly	ttg Leu	aac Asn	ttc Phe 45	acc Thr	cag Gln	atg Met	aac Asn	acg Thr 50	acg Thr	ctc Leu	cct Pro	aat Asn	gtc Val 55	257
acc Thr	atc Ile	ctc Leu	gca Ala	acc Thr 60	ggc Gly	ggg Gly	acc Thr	att Ile	gcc Ala 65	ggc Gly	tcc Ser	agc Ser	aac Asn 70	gac Asp	aac Asn	305
acc Thr	gcc Ala	aca Thr	aca Thr 75	ggc Gly	tac Tyr	acg Thr	gcc Ala	ggc Gly 80	gcg Ala	atc Ile	ggc Gly	atc Ile	cag Gln 85	cag Gln	ctc Leu	353
atg Met	gat Asp	ggc Ala 90	gtc Val	cct Pro	gag Glu	atg Met	cta Leu 95	gac Asp	gtt Val	gct Ala	aac Asn	gtg Val 100	gcc Ala	ggc Gly	atc Ile	401
cag Gln	gtc Val 105	ggc Ala	aat Asn	gtc Val	ggc Gly	agc Ser 110	ccc Pro	gac Asp	gtg Val	acg Thr	tct Ser 115	tcc Ser	ctt Leu	ctg Leu	ctc Leu	449
cac His 120	atg Met	ggc Ala	agg Arg	acc Thr	atc Ile 125	aac Asn	gag Glu	gtc Val	gtc Val	tgc Cys 130	gac Asp	gac Asp	ccc Pro	acc Thr	atg Met 135	497
agc Ser	ggc Gly	ggc Ala	gtc Val	atc Ile 140	acg Thr	cac His	ggc Gly	acc Thr	gac Asp 145	acg Thr	ctc Leu	gag Glu	gag Glu	acg Thr 150	ggc Ala	545
ttc Phe	ttc Phe	ctc Leu	gac Asp 155	gct Ala	aca Thr	gtc Val	aac Asn	tgc Cys 160	ggc Gly	aag Lys	ccc Pro	atc Ile	gtc Val 165	gtc Val	gtc Val	593
ggc Gly	gcc Ala	atg Met 170	cgg Arg	ccc Pro	gca Ala	acc Thr	gcc Ala 175	atc Ile	tcc Ser	gcc Ala	gac Asp	ggc Gly 180	ccg Pro	ttc Phe	aac Asn	641
ctc Leu	ctc Leu 185	cag Gln	ggc Ala	gtg Val	acc Thr	gtc Val 190	gcc Ala	gcg Ala	cac His	ccc Pro	act Thr 195	gcg Ala	cgc Arg	aac Asn	cgt Arg	689
ggg Gly 200	gcg Ala	ctg Leu	gtc Val	gtc Val	atg Met 205	aac Asn	gac Asp	cgc Arg	att Ile	gtg Val 210	tcc Ser	gcg Ala	tac Tyr	tac Tyr	gtc Val 215	737
tcc Ser	aag Lys	aca Thr	aac Asn	ggc Ala 220	aac Asn	acc Thr	atg Met	gac Asp	acc Thr 225	ttc Phe	aag Lys	gcc Ala	gtc Val	gag Glu 230	atg Met	785
ggc Gly	aac Asn	ctc Leu	ggc Gly 235	ggc Ala	atc Ile	atc Ile	tcc Ser	aac Asn 240	aag Lys	ccg Pro	tac Tyr	ttc Phe	ttt Phe 245	tac Tyr	ccg Pro	833
ccc Pro	gtc Val	atg Met 250	ccc Pro	acc Thr	ggg Gly	aag Lys	acc Thr 255	act Thr	ttc Phe	gac Asp	gtg Val	cgc Arg 260	aac Asn	gtc Val	ggc Ala	881
tcc Ser	atc Ile 265	ccc Pro	aga Arg	gtc Val	gac Asp	atc Ile 270	ctc Leu	tac Tyr	tgc Ser	tac Tyr	cag Gln 275	gat Asp	atg Met	caa Gln	aac Asn	929
gat Asp 280	acg Thr	ctc Leu	tac Tyr	gac Asp	ggc Ala 285	gtc Val	gac Asp	aac Asn	ggc Gly	gcg Ala 290	aaa Lys	ggc Gly	atc Ile	gtc Val	gta Val 295	978

<210> 6
<211> 374
<212> PRT
<213> *Aspergillus fumigatus*
<400> 6

Met Thr Lys Leu Ser Phe Lys Ile Ile Thr Leu Ala Ala Met Ile Ala
1 5 10 15

Val Gly Asn Ala Ser Pro Phe Val Tyr Pro Arg Ala Thr Ser Pro Asn
20 25 30

Ser Thr Tyr Val Phe Thr Asn Ser His Gly Leu Asn Phe Thr Gln Met
35 40 45

Asn Thr Thr Leu Pro Asn Val Thr Ile Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile
50 55 60

Ala Gly Ser Ser Asn Asp Asn Thr Ala Thr Thr Gly Tyr Thr Ala Gly
65 70 75 80

Ala Ile Gly Ile Gln Gln Leu Met Asp Ala Val Pro Glu Met Leu Asp
85 90 95

Val Ala Asn Val Ala Gly Ile Gln Val Ala Asn Val Gly Ser Pro Asp
100 105 110

Val Thr Ser Ser Leu Leu Leu His Met Ala Arg Thr Ile Asn Glu Val
115 120 125

Val Cys Asp Asp Pro Thr Met Ser Gly Ala Val Ile Thr His Gly Thr
130 135 140

Asp Thr Leu Glu Glu Thr Ala Phe Phe Leu Asp Ala Thr Val Asn Cys
 145 150 155 160
 Gly Lys Pro Ile Val Val Val Gly Ala Met Arg Pro Ala Thr Ala Ile
 165 170 175
 Ser Ala Asp Gly Pro Phe Asn Leu Leu Gln Ala Val Thr Val Ala Ala
 180 185 190
 His Pro Thr Ala Arg Asn Arg Gly Ala Leu Val Val Met Asn Asp Arg
 195 200 205
 Ile Val Ser Ala Tyr Tyr Val Ser Lys Thr Asn Ala Asn Thr Met Asp
 210 215 220
 Thr Phe Lys Ala Val Glu Met Gly Asn Leu Gly Ala Ile Ile Ser Asn
 225 230 235 240
 Lys Pro Tyr Phe Phe Tyr Pro Pro Val Met Pro Thr Gly Lys Thr Thr
 245 250 255
 Phe Asp Val Arg Asn Val Ala Ser Ile Pro Arg Val Asp Ile Leu Tyr
 260 265 270
 Ser Tyr Gln Asp Met Gln Asn Asp Thr Leu Tyr Asp Ala Val Asp Asn
 275 280 285
 Gly Ala Lys Gly Ile Val Val Arg Ser Val Ser Ser Gly Tyr Tyr Asp
 290 295 300
 Ala Ile Asp Asp Ile Ala Ser Thr His Ser Leu Pro Val Val Leu Ser
 305 310 315 320
 Thr Arg Thr Gly Asn Gly Glu Val Ala Ile Thr Asp Ser Glu Thr Thr
 325 330 335
 Ile Glu Ser Gly Phe Leu Asn Pro Gln Lys Ala Arg Ile Leu Leu Gly
 340 345 350
 Leu Leu Leu Ala Glu Asp Lys Gly Phe Lys Glu Ile Lys Glu Ala Phe
 355 360 365
 Ala Lys Asn Gly Val Ala
 370

<210> 7
 <211> 1260
 <212> ADN
 <213> Fusarium graminearum

<220>
 <221> CDS
 <222> (105)..(1217)

<400> 7

ctgcgatcgc agaggaggag cagtcttttt cttctcgttc tttacctccc cctctctcta	60
tctccagtct ctccaagtgt tgtgccctct tgtgttagcc cagc atg tgc ccc tct	116
Met Ser Pro Ser	1
ttc cac tcc cta ctc gct atc gca acc ctt gca ggc tca gct gcc ctt	164
Phe His Ser Leu Leu Ala Ile Ala Thr Leu Ala Gly Ser Ala Ala Leu	5 10 15 20
gca tcc ccg atc ccg gag cca gaa aca ccg cag ctt atc ccc cgg gct	212
Ala Ser Pro Ile Pro Glu Pro Glu Thr Pro Gln Leu Ile Pro Arg Ala	25 30 35
gtt ggt gac ttt gag tgc ttc aac gct agt ctt ccc aac atc acc atc	260
Val Gly Asp Phe Glu Cys Phe Asn Ala Ser Leu Pro Asn Ile Thr Ile	40 45 50
ttc gcg act ggt ggt acc atc gct ggt tct gct ggt tct gcc gat cag	308
Phe Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly Ser Ala Gly Ser Ala Asp Gln	55 60 65
act acg ggt tac cag gct ggt gca ttg ggt atc caa gcg ttg atc gac	356
Thr Thr Gly Tyr Gln Ala Gly Ala Leu Gly Ile Gln Ala Leu Ile Asp	70 75 80
gct gtc ccg caa ctc tgc aac gtc tcc aac gtc agg ggt gtg cag atc	404
Ala Val Pro Gln Leu Cys Asn Val Ser Asn Val Arg Gly Val Gln Ile	85 90 95 100
gcc aac gtt gat agc ggc gat gta aac tct act atc ctg acc act ttg	452
Ala Asn Val Asp Ser Gly Asp Val Asn Ser Thr Ile Leu Thr Thr Leu	105 110 115
gcg cat cgc atc cag act gat ctt gac aac cct cac atc caa ggt gtt	500
Ala His Arg Ile Gln Thr Asp Leu Asp Asn Pro His Ile Gln Gly Val	120 125 130
gtc gtc acc cat ggc aca gac act ctc gag gag tct tca ttt ttc ctc	548
Val Val Thr His Gly Thr Asp Thr Leu Glu Glu Ser Ser Phe Phe Leu	135 140 145
gat ctc act gtc caa agt gaa aag cct gtt gtt atg gtt gga tcc atg	596
Asp Leu Thr Val Gln Ser Glu Lys Pro Val Val Met Val Gly Ser Met	150 155 160
cgt cct gcc act gcc atc agc gct gat ggt ccc atc aac ctc ctg tct	644
Arg Pro Ala Thr Ala Ile Ser Ala Asp Gly Pro Ile Asn Leu Leu Ser	165 170 175 180
gct gtt cga ttg gca ggt agc aag agt gcc aag ggt cgc ggt aca atg	692
Ala Val Arg Leu Ala Gly Ser Lys Ser Ala Lys Gly Arg Gly Thr Met	185 190 195
att gta ctc aac gac aag atc gct tct gca cgc tac acc gtt aaa tcc	740
Ile Val Leu Asn Asp Lys Ile Ala Ser Ala Arg Tyr Thr Val Lys Ser	200 205 210
cac gcc aat gct gtc cag act ttc att gcc gaa gat caa ggt tat ctt	788
His Ala Asn Ala Val Gln Thr Phe Ile Ala Glu Asp Gln Gly Tyr Leu	215 220 225
ggt gcc ttt gaa aac att cag ccc gtc ttc tgg tac cct gct agt cga	836
Gly Ala Phe Glu Asn Ile Gln Pro Val Phe Trp Tyr Pro Ala Ser Arg	230 235 240

cca	cta	ggt	cac	cac	tat	ttc	aac	att	agt	gct	agc	tca	cct	aag	aag	884
Pro	Leu	Gly	His	His	Tyr	Phe	Asn	Ile	Ser	Ala	Ser	Ser	Pro	Lys	Lys	
245					250					255					260	
gct	ctt	cct	cag	ggt	gac	ggt	ttg	tac	ggc	cac	caa	gaa	gcg	gac	ccc	932
Ala	Leu	Pro	Gln	Val	Asp	Val	Leu	Tyr	Gly	His	Gln	Glu	Ala	Asp	Pro	
				265					270					275		
gag	ctt	ttc	caa	gct	gct	gtc	gat	agc	ggc	gcc	cag	ggc	att	ggt	ctc	980
Glu	Leu	Phe	Gln	Ala	Ala	Val	Asp	Ser	Gly	Ala	Gln	Gly	Ile	Val	Leu	
			280					285					290			
gct	ggt	ctt	ggc	gct	gga	ggc	tgg	cct	gac	gaa	gct	gct	gat	gag	atc	1028
Ala	Gly	Leu	Gly	Ala	Gly	Gly	Trp	Pro	Asp	Glu	Ala	Ala	Asp	Glu	Ile	
		295					300					305				
aag	aag	gtc	ttg	aac	gag	act	aac	att	cct	gtt	gtt	gtc	agc	cgt	cgt	1076
Lys	Lys	Val	Leu	Asn	Glu	Thr	Asn	Ile	Pro	Val	Val	Val	Ser	Arg	Arg	
	310					315					320					
act	gct	tgg	ggt	tac	ggt	gga	gag	agg	cct	ttc	ggt	atc	ggt	gct	ggg	1124
Thr	Ala	Trp	Gly	Tyr	Val	Gly	Glu	Arg	Pro	Phe	Gly	Ile	Gly	Ala	Gly	
325					330					335					340	
tac	ttg	aac	cct	tcc	aag	gcc	aga	atc	caa	ctg	caa	ctt	gcg	ctt	gag	1172
Tyr	Leu	Asn	Pro	Ser	Lys	Ala	Arg	Ile	Gln	Leu	Gln	Leu	Ala	Leu	Glu	
				345					350					355		
aag	aag	ctt	tct	gtg	gag	gag	atc	caa	gac	ata	ttc	gag	tat	ggt		1217
Lys	Lys	Leu	Ser	Val	Glu	Glu	Ile	Gln	Asp	Ile	Phe	Glu	Tyr	Val		
			360					365					370			
tgattggaag	aggattttga	aatgaatcaa	tgatatatga	tta												1260

<210> 8

<211> 371

<212> PRT

<213> Fusarium graminearum

<400> 8

ES 2 511 292 T3

Met Ser Pro Ser Phe His Ser Leu Leu Ala Ile Ala Thr Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Ser Ala Ala Leu Ala Ser Pro Ile Pro Glu Pro Glu Thr Pro Gln Leu
 20 25 30
 Ile Pro Arg Ala Val Gly Asp Phe Glu Cys Phe Asn Ala Ser Leu Pro
 35 40 45
 Asn Ile Thr Ile Phe Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly Ser Ala Gly
 50 55 60
 Ser Ala Asp Gln Thr Thr Gly Tyr Gln Ala Gly Ala Leu Gly Ile Gln
 65 70 75 80
 Ala Leu Ile Asp Ala Val Pro Gln Leu Cys Asn Val Ser Asn Val Arg
 85 90 95
 Gly Val Gln Ile Ala Asn Val Asp Ser Gly Asp Val Asn Ser Thr Ile
 100 105 110

Leu Thr Thr Leu Ala His Arg Ile Gln Thr Asp Leu Asp Asn Pro His
 115 120 125
 Ile Gln Gly Val Val Val Thr His Gly Thr Asp Thr Leu Glu Glu Ser
 130 135 140
 Ser Phe Phe Leu Asp Leu Thr Val Gln Ser Glu Lys Pro Val Val Met
 145 150 155 160
 Val Gly Ser Met Arg Pro Ala Thr Ala Ile Ser Ala Asp Gly Pro Ile
 165 170 175
 Asn Leu Leu Ser Ala Val Arg Leu Ala Gly Ser Lys Ser Ala Lys Gly
 180 185 190
 Arg Gly Thr Met Ile Val Leu Asn Asp Lys Ile Ala Ser Ala Arg Tyr
 195 200 205
 Thr Val Lys Ser His Ala Asn Ala Val Gln Thr Phe Ile Ala Glu Asp
 210 215 220
 Gln Gly Tyr Leu Gly Ala Phe Glu Asn Ile Gln Pro Val Phe Trp Tyr
 225 230 235 240
 Pro Ala Ser Arg Pro Leu Gly His His Tyr Phe Asn Ile Ser Ala Ser
 245 250 255
 Ser Pro Lys Lys Ala Leu Pro Gln Val Asp Val Leu Tyr Gly His Gln
 260 265 270
 Glu Ala Asp Pro Glu Leu Phe Gln Ala Ala Val Asp Ser Gly Ala Gln
 275 280 285
 Gly Ile Val Leu Ala Gly Leu Gly Ala Gly Gly Trp Pro Asp Glu Ala
 290 295 300
 Ala Asp Glu Ile Lys Lys Val Leu Asn Glu Thr Asn Ile Pro Val Val
 305 310 315 320
 Val Ser Arg Arg Thr Ala Trp Gly Tyr Val Gly Glu Arg Pro Phe Gly
 325 330 335
 Ile Gly Ala Gly Tyr Leu Asn Pro Ser Lys Ala Arg Ile Gln Leu Gln
 340 345 350
 Leu Ala Leu Glu Lys Lys Leu Ser Val Glu Glu Ile Gln Asp Ile Phe
 355 360 365
 Glu Tyr Val
 370

<210> 9
 <211> 1470
 <212> DNA

<213> Fusarium graminearum

<220>

<221> CDS

<222> (77)..(1429)

<400> 9

5

aggacaagcg tccatgaagc ataactacgc tacattgcct ttagctacag ttgatctata	60
gatatcagtc tacatc atg atg ccc agc gtc aga aga ttt cac ggc cag act	112
Met Met Pro Ser Val Arg Arg Phe His Gly Gln Thr	
1 5 10	
atg gtc gcc gcc gct cct tct att tgc tca ggg cct gca gca tcg tcc	160
Met Val Ala Ala Ala Pro Ser Ile Cys Ser Gly Pro Ala Ala Ser Ser	
15 20 25	
acc atc aag atg gct tca tgc tca gct tgc tgg acg act tat ctg tgg	208
Thr Ile Lys Met Ala Ser Ser Ser Ala Ser Trp Thr Thr Tyr Leu Trp	
30 35 40	
cgg ctt atc cta gct gtg ctg gct cct tca acg gcc ctg ctg cct ttt	256
Arg Leu Ile Leu Ala Val Leu Ala Pro Ser Thr Ala Leu Leu Pro Phe	
45 50 55 60	
ggt gcg tgg gtt gtt tgc gtc tgg gga tct cct gtc ctc gac cta cac	304
Gly Ala Trp Val Val Ser Val Trp Gly Ser Pro Val Leu Asp Leu His	
65 70 75	
gtc caa cct cac ttc tgc gtt caa caa aaa gcg cca ata cag acg ggc	352
Val Gln Pro His Phe Ser Val Gln Gln Lys Ala Pro Ile Gln Thr Gly	
80 85 90	
atc cct ttc gaa att tgc acc acc tca gga ttc aac tgc ttc aat ccc	400
Ile Pro Phe Glu Ile Ser Thr Thr Ser Gly Phe Asn Cys Phe Asn Pro	
95 100 105	
aat ctt ccc aac gtc act att tat gcc acc gga ggt act att gct ggc	448
Asn Leu Pro Asn Val Thr Ile Tyr Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly	
110 115 120	
tcc gca agc tgc gct gat cag acc acg gga tac cgg tca gct gcg tta	496
Ser Ala Ser Ser Ala Asp Gln Thr Thr Gly Tyr Arg Ser Ala Ala Leu	
125 130 135 140	
gga gtt gat tct ctc att gat gca gta ccc caa ttg tgc aat gta gcc	544
Gly Val Asp Ser Leu Ile Asp Ala Val Pro Gln Leu Cys Asn Val Ala	
145 150 155	
aat gtg aga ggt gtc cag ttt gcc aac acg gac agc ata gac atg agc	592
Asn Val Arg Gly Val Gln Phe Ala Asn Thr Asp Ser Ile Asp Met Ser	
160 165 170	
tgc gcc atg ttg agg act ttg gcg aag cag atc cag aat gat ctg gac	640
Ser Ala Met Leu Arg Thr Leu Ala Lys Gln Ile Gln Asn Asp Leu Asp	
175 180 185	
agt ccg ttt act caa ggc gca gtt gtg acg cac gga act gat act ctg	688
Ser Pro Phe Thr Gln Gly Ala Val Val Thr His Gly Thr Asp Thr Leu	
190 195 200	
gat gaa tct gcc ttc ttt ctg gat ctt act atc cag agc gac aag ccc	736
Asp Glu Ser Ala Phe Phe Leu Asp Leu Thr Ile Gln Ser Asp Lys Pro	
205 210 215 220	

gtg gtc gtg aca ggc tca atg cgc ccg gca act gct atc agc gca gat	784
Val Val Val Thr Gly Ser Met Arg Pro Ala Thr Ala Ile Ser Ala Asp	
225 230 235	
gga cca atg aat ctt ttg tca tcc gtg aca ttg gca gca gca gcg agt	832
Gly Pro Met Asn Leu Leu Ser Ser Val Thr Leu Ala Ala Ala Ser	
240 245 250	
gct cga ggc aga gga gtg atg att gcc atg aat gat cgc att gga tct	880
Ala Arg Gly Arg Gly Val Met Ile Ala Met Asn Asp Arg Ile Gly Ser	
255 260 265	
gct cgt ttt acg acc aaa gtc aac gcc aac cat ttg gac gcc ttc caa	928
Ala Arg Phe Thr Thr Lys Val Asn Ala Asn His Leu Asp Ala Phe Gln	
270 275 280	
gcc cct gac agt ggc atg ctg gga aca ttc gtc aac gtt cag cca gtg	976
Ala Pro Asp Ser Gly Met Leu Gly Thr Phe Val Asn Val Gln Pro Val	
285 290 295 300	
ttt ttc tat ccg cca tca cga cct ctt ggc cac cgt cat ttt gat ctg	1024
Phe Phe Tyr Pro Pro Ser Arg Pro Leu Gly His Arg His Phe Asp Leu	
305 310 315	
cgg ccc atc acc aac aac ggc cgc cgg ttc gga cgc tct aca gcc ccc	1072
Arg Pro Ile Thr Asn Asn Gly Arg Arg Phe Gly Arg Ser Thr Ala Pro	
320 325 330	
gga gca gga tca tca gca cta ccc cag gtg gac gtg ctc tac gct tac	1120
Gly Ala Gly Ser Ser Ala Leu Pro Gln Val Asp Val Leu Tyr Ala Tyr	
335 340 345	
cag gag ctc agc gtg ggc atg ttc cag gcg gcc atc gac ctt gga gcg	1168
Gln Glu Leu Ser Val Gly Met Phe Gln Ala Ala Ile Asp Leu Gly Ala	
350 355 360	
cag ggc atc gtt cta gcg gga atg ggc gct gga ttc tgg acg tcc aaa	1216
Gln Gly Ile Val Leu Ala Gly Met Gly Ala Gly Phe Trp Thr Ser Lys	
365 370 375 380	
ggt acc gag gag att cgg cgt atc gtc cac gag acc gat att ccc gtg	1264
Gly Thr Glu Glu Ile Arg Arg Ile Val His Glu Thr Asp Ile Pro Val	
385 390 395	
ata gtg agc cga aga ccg gaa ggc ggc ttc gtc gga cca tgt gag gca	1312
Ile Val Ser Arg Arg Pro Glu Gly Gly Phe Val Gly Pro Cys Glu Ala	
400 405 410	
gga atc ggc gcg ggc ttt ttg aat ccg caa aag gcg agg atc cag ctc	1360
Gly Ile Gly Ala Gly Phe Leu Asn Pro Gln Lys Ala Arg Ile Gln Leu	
415 420 425	
caa ctg gcc ctg gag acc aag atg gac aat gat gcc atc aaa gcc ctg	1408
Gln Leu Ala Leu Glu Thr Lys Met Asp Asn Asp Ala Ile Lys Ala Leu	
430 435 440	
ttt gag cat tcc gga gtg cac taaagggaca aaaaagatcg aggttacagc	1459
Phe Glu His Ser Gly Val His	
445 450	
agcaacacca c	1470

<210> 10

<211> 451

<212> PRT

<213> Fusarium graminearum

<400> 10

Met Met Pro Ser Val Arg Arg Phe His Gly Gln Thr Met Val Ala Ala
 1 5 10 15
 Ala Pro Ser Ile Cys Ser Gly Pro Ala Ala Ser Ser Thr Ile Lys Met
 20 25 30
 Ala Ser Ser Ser Ala Ser Trp Thr Thr Tyr Leu Trp Arg Leu Ile Leu
 35 40 45
 Ala Val Leu Ala Pro Ser Thr Ala Leu Leu Pro Phe Gly Ala Trp Val
 50 55 60
 Val Ser Val Trp Gly Ser Pro Val Leu Asp Leu His Val Gln Pro His
 65 70 75 80
 Phe Ser Val Gln Gln Lys Ala Pro Ile Gln Thr Gly Ile Pro Phe Glu
 85 90 95
 Ile Ser Thr Thr Ser Gly Phe Asn Cys Phe Asn Pro Asn Leu Pro Asn
 100 105 110
 Val Thr Ile Tyr Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly Ser Ala Ser Ser
 115 120 125
 Ala Asp Gln Thr Thr Gly Tyr Arg Ser Ala Ala Leu Gly Val Asp Ser
 130 135 140
 Leu Ile Asp Ala Val Pro Gln Leu Cys Asn Val Ala Asn Val Arg Gly
 145 150 155 160
 Val Gln Phe Ala Asn Thr Asp Ser Ile Asp Met Ser Ser Ala Met Leu
 165 170 175
 Arg Thr Leu Ala Lys Gln Ile Gln Asn Asp Leu Asp Ser Pro Phe Thr
 180 185 190
 Gln Gly Ala Val Val Thr His Gly Thr Asp Thr Leu Asp Glu Ser Ala
 195 200 205
 Phe Phe Leu Asp Leu Thr Ile Gln Ser Asp Lys Pro Val Val Val Thr
 210 215 220
 Gly Ser Met Arg Pro Ala Thr Ala Ile Ser Ala Asp Gly Pro Met Asn
 225 230 235 240
 Leu Leu Ser Ser Val Thr Leu Ala Ala Ala Ala Ser Ala Arg Gly Arg
 245 250 255
 Gly Val Met Ile Ala Met Asn Asp Arg Ile Gly Ser Ala Arg Phe Thr
 260 265 270

Thr Lys Val Asn Ala Asn His Leu Asp Ala Phe Gln Ala Pro Asp Ser
275 280 285

Gly Met Leu Gly Thr Phe Val Asn Val Gln Pro Val Phe Phe Tyr Pro
290 295 300

Pro Ser Arg Pro Leu Gly His Arg His Phe Asp Leu Arg Pro Ile Thr
305 310 315 320

Asn Asn Gly Arg Arg Phe Gly Arg Ser Thr Ala Pro Gly Ala Gly Ser
325 330 335

Ser Ala Leu Pro Gln Val Asp Val Leu Tyr Ala Tyr Gln Glu Leu Ser
340 345 350

Val Gly Met Phe Gln Ala Ala Ile Asp Leu Gly Ala Gln Gly Ile Val
355 360 365

Leu Ala Gly Met Gly Ala Gly Phe Trp Thr Ser Lys Gly Thr Glu Glu
370 375 380

Ile Arg Arg Ile Val His Glu Thr Asp Ile Pro Val Ile Val Ser Arg
385 390 395 400

Arg Pro Glu Gly Gly Phe Val Gly Pro Cys Glu Ala Gly Ile Gly Ala
405 410 415

Gly Phe Leu Asn Pro Gln Lys Ala Arg Ile Gln Leu Gln Leu Ala Leu
420 425 430

Glu Thr Lys Met Asp Asn Asp Ala Ile Lys Ala Leu Phe Glu His Ser
435 440 445

Gly Val His
450

<210> 11
<211> 1236
<212> DNA
<213> Penicillium citrinum

<220>
<221> CDS
<222> (16)..(1152)

<400> 11

ES 2 511 292 T3

acatattgaa acaat atg aga ctt cta ttt aat act ctg gct gtc tca gca	51
Met Arg Leu Leu Phe Asn Thr Leu Ala Val Ser Ala	
1 5 10	
cta gct gct acg agt tat gcc tct ccc atc att cat tcc cgg gcc tcc	99
Leu Ala Ala Thr Ser Tyr Ala Ser Pro Ile Ile His Ser Arg Ala Ser	
15 20 25	
aac acg tcc tat acc aac tct aat ggg ctg aaa ttt aac cat ttc gac	147

Asn	Thr	Ser	Tyr	Thr	Asn	Ser	Asn	Gly	Leu	Lys	Phe	Asn	His	Phe	Asp	
30						35					40					
gct	tct	ctt	cca	aat	gtg	act	tig	ctg	gca	act	ggt	gga	act	att	gcc	195
Ala	Ser	Leu	Pro	Asn	Val	Thr	Leu	Leu	Ala	Thr	Gly	Gly	Thr	Ile	Ala	
45					50					55					60	
ggt	aca	agc	gat	gac	aag	act	gct	acg	gca	gga	tat	gaa	tcc	ggg	gct	243
Gly	Thr	Ser	Asp	Asp	Lys	Thr	Ala	Thr	Ala	Gly	Tyr	Glu	Ser	Gly	Ala	
				65					70					75		
tta	ggg	ata	aat	aag	att	ctt	tcc	ggc	atc	cca	gaa	gtt	tat	gac	att	291
Leu	Gly	Ile	Asn	Lys	Ile	Leu	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Val	Tyr	Asp	Ile	
			80					85					90			
gcc	aac	gtc	aat	gcg	gta	cag	ttt	gac	aat	gtc	aac	agc	ggc	gat	gtc	339
Ala	Asn	Val	Asn	Ala	Val	Gln	Phe	Asp	Asn	Val	Asn	Ser	Gly	Asp	Val	
		95					100					105				
tct	yca	tct	ctc	tta	ctg	aac	atg	aca	cat	acc	ctt	caa	aag	acc	gtt	387
Ser	Xaa	Ser	Leu	Leu	Leu	Asn	Met	Thr	His	Thr	Leu	Gln	Lys	Thr	Val	
	110					115					120					
tgt	gat	gac	cct	acg	ata	tct	ggc	gcc	gtc	atc	acc	cat	ggc	acc	gat	435
Cys	Asp	Asp	Pro	Thr	Ile	Ser	Gly	Ala	Val	Ile	Thr	His	Gly	Thr	Asp	
125					130					135					140	
acc	ctg	gaa	gaa	tct	gcc	ttc	ttc	atc	gat	gca	aca	gtc	aac	tgc	ggc	483
Thr	Leu	Glu	Glu	Ser	Ala	Phe	Phe	Ile	Asp	Ala	Thr	Val	Asn	Cys	Gly	
				145					150					155		
aag	ccg	att	gtg	ttc	gtt	ggc	tca	atg	cga	cct	tcc	acc	gca	atc	tct	531
Lys	Pro	Ile	Val	Phe	Val	Gly	Ser	Met	Arg	Pro	Ser	Thr	Ala	Ile	Ser	
			160					165					170			
gcc	gat	ggc	cct	atg	aat	tig	ctc	cag	gga	gtg	act	gtg	gcc	gct	gac	579
Ala	Asp	Gly	Pro	Met	Asn	Leu	Leu	Gln	Gly	Val	Thr	Val	Ala	Ala	Asp	
		175					180					185				
aaa	cag	gct	aag	aac	cgc	gga	gca	cta	gtc	gtg	ctg	aat	gac	cgc	att	627
Lys	Gln	Ala	Lys	Asn	Arg	Gly	Ala	Leu	Val	Val	Leu	Asn	Asp	Arg	Ile	
	190					195					200					
gtc	tct	gct	ttc	ttc	gct	aca	aag	aca	aat	gcg	aat	aca	atg	gac	act	675
Val	Ser	Ala	Phe	Phe	Ala	Thr	Lys	Thr	Asn	Ala	Asn	Thr	Met	Asp	Thr	
205					210					215					220	
ttc	aag	gct	tat	gaa	caa	ggc	agt	ctt	ggc	atg	att	gtt	tca	aac	aag	723
Phe	Lys	Ala	Tyr	Glu	Gln	Gly	Ser	Leu	Gly	Met	Ile	Val	Ser	Asn	Lys	
				225					230					235		
ccc	tac	ttc	tat	tat	ccg	gca	gtc	gag	cca	aac	gcg	aag	cac	gtt	gtt	771
Pro	Tyr	Phe	Tyr	Tyr	Pro	Ala	Val	Glu	Pro	Asn	Ala	Lys	His	Val	Val	
			240					245					250			
cat	ctt	gac	gac	gtg	gat	gcg	atc	ccc	cgt	gtg	gat	att	ctc	tac	gct	819
His	Leu	Asp	Asp	Val	Asp	Ala	Ile	Pro	Arg	Val	Asp	Ile	Leu	Tyr	Ala	
		255					260					265				
tac	gag	gac	atg	cat	agc	gac	tcc	ctt	cac	agt	gct	atc	aaa	aat	gga	867
Tyr	Glu	Asp	Met	His	Ser	Asp	Ser	Leu	His	Ser	Ala	Ile	Lys	Asn	Gly	
	270					275					280					
gcc	aag	ggc	atc	gtg	gtc	gcc	ggc	gag	ggc	gca	ggt	ggt	atc	tcc	acg	915
Ala	Lys	Gly	Ile	Val	Val	Ala	Gly	Glu	Gly	Ala	Gly	Gly	Ile	Ser	Thr	
285					290					295					300	
gac	ttt	agt	gat	acc	atc	gat	gag	att	gca	tcc	aag	cat	cag	att	ccc	963
Asp	Phe	Ser	Asp	Thr	Ile	Asp	Glu	Ile	Ala	Ser	Lys	His	Gln	Ile	Pro	

	305	310	315	
	att atc ctg agc cac aga acc gtg aac gga gaa gtt cct act gct gat			1011
	Ile Ile Leu Ser His Arg Thr Val Asn Gly Glu Val Pro Thr Ala Asp			
		320	325	330
	att acg ggt gat agc gcg aag act cgc att gca agt ggc atg tat aac			1059
	Ile Thr Gly Asp Ser Ala Lys Thr Arg Ile Ala Ser Gly Met Tyr Asn			
		335	340	345
	ccc cag cag gcg cgc gtc ttg ctt gga cta ttg ctc gca gaa ggc aag			1107
	Pro Gln Gln Ala Arg Val Leu Leu Gly Leu Leu Leu Ala Glu Gly Lys			
		350	355	360
	aag ttt gag gat att cga act atc ttc gga aaa gct act gtt gcc			1152
	Lys Phe Glu Asp Ile Arg Thr Ile Phe Gly Lys Ala Thr Val Ala			
		365	370	375
	tagaccacg tcatatatta tgccatact tgggaacact tgaaactgat agactaaatt			1212
	aattatattg tcgtttgttg ccgg			1236

<210> 12
 <211> 379
 <212> PRT
 <213> Penicillium citrinum

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (110)..(110)
 <223> El "xaa" en el lugar 110 representa Pro, o Ser.

<400> 12

Met Arg Leu Leu Phe Asn Thr Leu Ala Val Ser Ala Leu Ala Ala Thr
1 5 10 15
Ser Tyr Ala Ser Pro Ile Ile His Ser Arg Ala Ser Asn Thr Ser Tyr
20 25 30
Thr Asn Ser Asn Gly Leu Lys Phe Asn His Phe Asp Ala Ser Leu Pro
35 40 45
Asn Val Thr Leu Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly Thr Ser Asp
50 55 60
Asp Lys Thr Ala Thr Ala Gly Tyr Glu Ser Gly Ala Leu Gly Ile Asn
65 70 75 80
Lys Ile Leu Ser Gly Ile Pro Glu Val Tyr Asp Ile Ala Asn Val Asn
85 90 95
Ala Val Gln Phe Asp Asn Val Asn Ser Gly Asp Val Ser Xaa Ser Leu
100 105 110
Leu Leu Asn Met Thr His Thr Leu Gln Lys Thr Val Cys Asp Asp Pro
115 120 125
Thr Ile Ser Gly Ala Val Ile Thr His Gly Thr Asp Thr Leu Glu Glu
130 135 140

Ser Ala Phe Phe Ile Asp Ala Thr Val Asn Cys Gly Lys Pro Ile Val
 145 150 155 160
 Phe Val Gly Ser Met Arg Pro Ser Thr Ala Ile Ser Ala Asp Gly Pro
 165 170 175
 Met Asn Leu Leu Gln Gly Val Thr Val Ala Ala Asp Lys Gln Ala Lys
 180 185 190
 Asn Arg Gly Ala Leu Val Val Leu Asn Asp Arg Ile Val Ser Ala Phe
 195 200 205
 Phe Ala Thr Lys Thr Asn Ala Asn Thr Met Asp Thr Phe Lys Ala Tyr
 210 215 220
 Glu Gln Gly Ser Leu Gly Met Ile Val Ser Asn Lys Pro Tyr Phe Tyr
 225 230 235 240
 Tyr Pro Ala Val Glu Pro Asn Ala Lys His Val Val His Leu Asp Asp
 245 250 255
 Val Asp Ala Ile Pro Arg Val Asp Ile Leu Tyr Ala Tyr Glu Asp Met
 260 265 270
 His Ser Asp Ser Leu His Ser Ala Ile Lys Asn Gly Ala Lys Gly Ile
 275 280 285
 Val Val Ala Gly Glu Gly Ala Gly Gly Ile Ser Thr Asp Phe Ser Asp
 290 295 300
 Thr Ile Asp Glu Ile Ala Ser Lys His Gln Ile Pro Ile Ile Leu Ser
 305 310 315 320
 His Arg Thr Val Asn Gly Glu Val Pro Thr Ala Asp Ile Thr Gly Asp
 325 330 335
 Ser Ala Lys Thr Arg Ile Ala Ser Gly Met Tyr Asn Pro Gln Gln Ala
 340 345 350
 Arg Val Leu Leu Gly Leu Leu Leu Ala Glu Gly Lys Lys Phe Glu Asp
 355 360 365
 Ile Arg Thr Ile Phe Gly Lys Ala Thr Val Ala
 370 375

<210> 13

<211> 362

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 13

Met Arg Ser Leu Asn Thr Leu Leu Leu Ser Leu Phe Val Ala Met Ser
 1 5 10 15
 Ser Gly Ala Pro Leu Leu Lys Ile Arg Glu Glu Lys Asn Ser Ser Leu
 20 25 30
 Pro Ser Ile Lys Ile Phe Gly Thr Gly Gly Thr Ile Ala Ser Lys Gly
 35 40 45
 Ser Thr Ser Ala Thr Thr Ala Gly Tyr Ser Val Gly Leu Thr Val Asn
 50 55 60
 Asp Leu Ile Glu Ala Val Pro Ser Leu Ala Glu Lys Ala Asn Leu Asp
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Val Ser Asn Val Gly Ser Asn Ser Leu Asn Tyr Thr His
 85 90 95
 Leu Ile Pro Leu Tyr His Gly Ile Ser Glu Ala Leu Ala Ser Asp Asp
 100 105 110
 Tyr Ala Gly Ala Val Val Thr His Gly Thr Asp Thr Met Glu Glu Thr
 115 120 125
 Ala Phe Phe Leu Asp Leu Thr Ile Asn Ser Glu Lys Pro Val Cys Ile
 130 135 140
 Ala Gly Ala Met Arg Pro Ala Thr Ala Thr Ser Ala Asp Gly Pro Met
 145 150 155 160
 Asn Leu Tyr Gln Ala Val Ser Ile Ala Ala Ser Glu Lys Ser Leu Gly
 165 170 175
 Arg Gly Thr Met Ile Thr Leu Asn Asp Arg Ile Ala Ser Gly Phe Trp
 180 185 190
 Thr Thr Lys Met Asn Ala Asn Ser Leu Asp Thr Phe Arg Ala Asp Glu
 195 200 205
 Gln Gly Tyr Leu Gly Tyr Phe Ser Asn Asp Asp Val Glu Phe Tyr Tyr
 210 215 220
 Pro Pro Val Lys Pro Asn Gly Trp Gln Phe Phe Asp Ile Ser Asn Leu
 225 230 235 240
 Thr Asp Pro Ser Glu Ile Pro Glu Val Ile Ile Leu Tyr Ser Tyr Gln
 245 250 255
 Gly Leu Asn Pro Glu Leu Ile Val Lys Ala Val Lys Asp Leu Gly Ala
 260 265 270
 Lys Gly Ile Val Leu Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ser Trp Thr Ala Thr

ES 2 511 292 T3

275	280	285
Gly Ser Ile Val Asn Glu Gln Leu Tyr Glu Glu Tyr Gly Ile Pro Ile		
290	295	300
Val His Ser Arg Arg Thr Ala Asp Gly Thr Val Pro Pro Asp Asp Ala		
305	310	315
Pro Glu Tyr Ala Ile Gly Ser Gly Tyr Leu Asn Pro Gln Lys Ser Arg		
325	330	335
Ile Leu Leu Gln Leu Cys Leu Tyr Ser Gly Tyr Gly Met Asp Gln Ile		
340	345	350
Arg Ser Val Phe Ser Gly Val Tyr Gly Gly		
355	360	

<210> 14
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador AoASP7

<400> 14
 caaggatcca gcagtatggg tgtcaatttc 30

<210> 15
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador AoASP8

<400> 15
 atcaagcttc tattatccat cccatcca 28

REIVINDICACIONES

1. Método para preparar un producto tratado con calor, que comprende las fases secuenciales de:
 - a) proveer una materia prima que comprende hidrato de carbono, proteína y agua
 - b) tratar la materia prima con una asparraginasa y una oxidorreductasa capaz de reaccionar con un azúcar de reducción como sustrato, y
 - c) tratar con calor hasta alcanzar un contenido de agua final por debajo del 35% en peso.
2. Método según la reivindicación 1 en el que, durante el tratamiento con calor, la temperatura en la superficie del producto alcanza 110-220°C.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la asparraginasa tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90% idéntica a la SEC ID N°: 2 (opcionalmente truncada en los residuos 27-378, 30-378, 75-378 o 80-378), 4, 6, 8, 10, 12 o 13.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la oxidorreductasa capaz de reaccionar con un azúcar de reducción como sustrato es una glucosa oxidasa una piranosa oxidasa una hexosa oxidasa una galactosa oxidasa (EC 1.1.3.9) o un hidrato de carbono oxidasa teniendo una actividad más alta en maltosa que en glucosa.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la oxidorreductasa capaz de reaccionar con un azúcar de reducción como un sustrato es una glucosa deshidrogenasa (EC 1.1.1.47, EC 1.1.99.10), una galactosa deshidrogenasa (EC 1.1.1.48), una D-aldohexosa deshidrogenasa (EC 1.1.1.118, EC 1.1.1.119), una celobiosa deshidrogenasa (EC 1.1.5.1, por ejemplo de Humicola insolens), una fructosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.11, EC 1.1.1.124, EC 1.1.99.11), una aldehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.3, EC 1.2.1.4, EC 1.2.1.5) o una glucosa-fructosa oxidorreductasa (EC 1.1.99.28).
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la materia prima está en forma de masa y el tratamiento enzimático comprende mezclar la enzima en la masa y opcionalmente mantenerla.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la materia prima comprende piezas de vegetal intactas.
8. Método según la reivindicación 7 donde las piezas de vegetal intactas son piezas de patata.
9. Método según la reivindicación 8 donde el tratamiento enzimático comprende inmersión de las piezas de patata en una solución acuosa de la enzima.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7-9 donde las piezas intactas se blanquean por inmersión en agua caliente, por ejemplo a 70-100°C, bien antes o después del tratamiento enzimático.
11. Método según la reivindicación 10, donde las piezas vegetales intactas se blanquean por inmersión en agua caliente, por ejemplo a 70- 100°C, antes del tratamiento enzimático.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la materia prima comprende un producto de patata.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el producto tratado con calor es seleccionado entre un producto de patata, patatas fritas, patatas fritas de bolsa, patatas fritas, patatas picadas fritas, patatas asadas, cereales de desayuno, pan tostado, muesli, galletas, galletas saladas, aperitivos, tortillas de maíz, frutos secos tostados, galletas saladas de arroz, "senbei" japonés, obleas, gofres, pasteles calientes, y panqueques.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el producto tratado con calor es un producto de patata.
15. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el producto tratado con calor es patatas fritas.