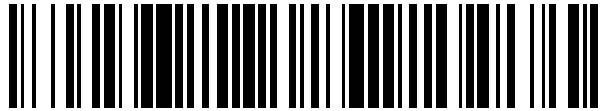


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 331 068**

51 Int. Cl.:

A23L 1/03 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2003 E 03785884 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **15.04.2015 EP 1571919**

54 Título: **Nuevo proceso de producción de alimentos**

30 Prioridad:

19.12.2002 EP 02102819

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

10.08.2015

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
HET OVERLOON 1
6411 TE HEERLEN, NL**

72 Inventor/es:

**PLOMP, PIETER, JAN, ARNOLDUS, MARIA;
BOER, DE, LEX;
ROOIJEN, VAN, RUTGER, JAN y
MEIMA, ROELF, BERNHARD**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 331 068 T5

DESCRIPCIÓN

Nuevo proceso de producción de alimentos

La presente invención se refiere a una nueva enzima y a secuencias de polinucleótidos de nueva identificación que comprenden genes que codifican la nueva enzima. La invención se refiere también a un proceso para la producción de un producto alimenticio que implica al menos un paso de calentamiento en el que se utiliza la nueva enzima.

La acrilamida ha sido producida comercialmente desde hace largo tiempo para una diversidad de aplicaciones técnicas y por consiguiente, sus antecedentes toxicológicos están bien evaluados. La acrilamida se utiliza para la producción de poli(acrilamida), y el último compuesto se aplica en la producción de agua potable, estabilización de suelos, tratamiento de aguas residuales industriales, la obtención de aceite y aplicaciones de laboratorio.

La acrilamida está considerada como probablemente cancerígena para animales y humanos. En 1991, el Comité Científico sobre la Alimentación ha investigado acrilamida monómera en contacto con materiales alimenticios y en su evaluación se llegó a la conclusión de que la acrilamida es un cancerígeno genotóxico. Bergmark *et al.* (Chem. Res. Toxicol., 10, 78-84 (1997)) demostraron que la acrilamida es también un componente del humo del tabaco y este fue el primer eslabón entre la formación de acrilamida y el calentamiento de los materiales biológicos. Recientemente, ha sido publicada la existencia de acrilamida en cierto número de alimentos y alimentos preparados en horno (Tareke *et al.* Chem. Res. Toxicol., 13, 517-522 (2000)) y esto ha dado como resultado una preocupación mundial. Investigaciones posteriores han revelado que cantidades considerables de acrilamida son detectables en una diversidad de alimentos comunes cocidos, fritos y preparados en horno, y se demostró que la existencia de acrilamida en los alimentos era resultado del proceso de cocción.

El límite oficial en el Reino Unido para la contaminación por acrilamida en productos alimenticios está establecido en 10 ppb (10 microgramos por kilogramo) y los valores presentados anteriormente exceden en mucho de este valor para una gran cantidad de productos, especialmente cereales, productos de pan y fritos de patata.

La relación entre la dosis administrada de acrilamida y la incidencia de tumores se observó en tests en animales en los cuales se alimentaron ratas con acrilamida a través del agua de bebida y cuya suerte fue seguida durante 2 años (Friedman, H.L. *et al.*, Fundam. Appl. Pharmacol. 85:154-168, M. (1986) y Johnson *et al.*, Toxicol. Appl. Pharmacol. 85:154-168 (1986)). Estudio de toxicidad crónica y oncogenicidad sobre acrilamida incorporada en el agua de bebida de 344 ratas Fischer.

Cuando se combinaron estos datos con los resultados recogidos en Tareke *et al.* en los cuales se estudió la acrilamida unida a hemoglobina-(N-(2-carbamoyl)valina) en función de una dieta que contenía acrilamida para ratas, se calculó que la absorción diaria de acrilamida es 1,6 µg acrilamida/kg, correspondiendo a un riesgo de cáncer de 7×10^{-3} para humanos por exposición a largo plazo.

Un camino para la formación de acrilamida a partir de aminoácidos y azúcares reductores como resultado de la reacción de Maillard ha sido propuesto por Mottram *et al.* Nature 419-448 (2002). De acuerdo con esta hipótesis, la acrilamida puede formarse durante la reacción de Maillard. Durante la cocción y el asado, la reacción de Maillard es principalmente responsable del color, olor y sabor. Una reacción asociada con la de Maillard es la degradación de Strecker de los aminoácidos y se propuso un camino para acrilamida. La formación de acrilamida se hacía detectable cuando la temperatura sobrepasaba 120°C, y la tasa de formación máxima se observaba aproximadamente a 170°C. Cuando estaban presentes asparagina y glucosa, pudieron observarse los niveles máximos de acrilamida, mientras que glutamina y ácido aspártico daban sólo como resultado cantidades traza. El hecho de que la acrilamida se forma principalmente a partir de asparagina y glucosa puede explicar los altos niveles de acrilamida en productos basados en plantas cocidas o asadas en horno, por ejemplo. Se sabe que varias materias primas vegetales contienen niveles sustanciales de asparagina. En las patatas, la asparagina es el aminoácido libre dominante (940 mg/kg, correspondiente al 40% del contenido total de aminoácidos) y en el trigo, la asparagina está presente a un nivel de aproximadamente 167 mg asparagina/kg harina, correspondiendo al 14% del conjunto total de aminoácidos libres (Belitz y Grosch en Food Chemistry – Springer, Nueva York, 1999).

Por consiguiente, en el interés de la salud pública, existe una necesidad urgente de productos alimenticios que tengan niveles sustancialmente menores de acrilamida o, preferiblemente, estén exentos de la misma. En el primer caso, se han iniciado actividades de investigación a fin de descifrar el mecanismo de la formación de acrilamida en los productos alimenticios. Hasta ahora, los resultados de las mismas no han conducido todavía a una solución satisfactoria del problema. En segundo lugar, las empresas alimentarias están investigando acerca de las posibilidades de evitar la formación de acrilamida por disminución de la temperatura de los procesos de cocción y asado en horno. Por supuesto, estas actuaciones darán inherentemente como resultado productos alimenticios con propiedades de sabor alteradas (menos productos de Maillard) y estas adaptaciones llevan consigo el riesgo de una contaminación microbiana incrementada, por ejemplo por Salmonella.

La presente invención proporciona un proceso para la producción de un producto alimenticio que implica al menos un paso de calentamiento, que comprende añadir una nueva asparaginasa como se define en otro aspecto de la invención a una forma intermedia de dicho producto alimenticio en dicho proceso de producción en el cual se añade asparaginasa antes de dicho paso de calentamiento en una cantidad que es eficaz para reducir el nivel de asparagina que está presente en dicha forma intermedia de dicho producto alimenticio, estando dicha asparagina implicada en la forma de acrilamida durante dicho paso de calentamiento.

Una forma intermedia de producto alimenticio se define en esta memoria como cualquier forma que aparece durante el proceso de producción antes de la obtención de la forma final del producto alimenticio. La forma intermedia puede comprender las materias primas individuales utilizadas y/o mezclas de las mismas y/o mezclas con aditivos y/o adyuvantes de proceso, o forma procesada subsiguientemente a partir de aquéllas. Por ejemplo, para el producto alimenticio pan, las formas intermedias comprenden por ejemplo trigo, harina de trigo, la mezcla inicial de la misma con otros ingredientes del pan tales como por ejemplo agua, sal, levadura y composiciones mejoradoras del pan, la masa mezclada, la masa batida, la masa leudada y la masa parcialmente cocida.

El producto alimenticio puede estar hecho de al menos una materia prima que es de origen vegetal, por ejemplo patata, tabaco, café, cacao, arroz, cereal, por ejemplo trigo, centeno, maíz común, maíz dulce, cebada, sémola, alforfón y avena. El término trigo, aquí y en lo sucesivo tiene por objeto abarcar todas las especies conocidas del género *Triticum*, por ejemplo *aestivum*, *durum* y/o *spelta*. Se incluyen también en el alcance de esta invención productos alimenticios hechos de más de una materia prima, por ejemplo productos alimenticios que comprenden a la vez trigo (harina) y patata.

Ejemplos de productos alimenticios en los cuales puede ser adecuado el proceso de acuerdo con la invención son cualesquiera productos basados en harina – por ejemplo pan, productos de repostería, pasteles, galletas saladas, donuts, torta de miel holandesa, galletas, pan de jengibre, torta de jengibre, y pan tostado - y cualesquiera productos basados en patata – por ejemplo patatas fritas a la francesa, *pommes frites* (sic), chips de patata, y croquetas.

Se sabe que las materias primas que se han citado arriba contienen cantidades sustanciales de aminoácidos que están implicados en la formación de acrilamida durante el paso de calentamiento del proceso de producción. Alternativamente, estos aminoácidos pueden originarse de otras fuentes distintas de las materias primas, v.g. a partir de hidrolizados de proteínas, tales como extractos de levadura, hidrolizado de soja, hidrolizado de caseína, y análogos, que se utilizan como aditivo en el proceso de producción de los alimentos. Un proceso de producción preferido es la cocción del pan y otros productos horneados de harina de trigo y/o harinas de otro origen cereal. Otro proceso de producción preferido es la freidura intensa de chips de patata a partir de rodajas de patata.

Pasos de calentamiento preferidos son aquéllos para los cuales al menos una parte del producto alimenticio intermedio, v.g. la superficie del producto alimenticio, se expone a temperaturas a las cuales se promueve la formación de acrilamida, v.g. 110°C o mayores, hasta 120°C o temperaturas más altas. El paso de calentamiento en el proceso de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo en hornos, por ejemplo a una temperatura entre 180 y 220°C, tal como para la cocción del pan y otros productos de panadería, o en aceite tal como la freidura de los chips de patata, por ejemplo a 160-190°C.

La enzima utilizada en el proceso de la invención es una enzima que modifica las cadenas laterales del amino-ácido asparagina que está implicado en la formación de acrilamida durante el paso de calentamiento del proceso de producción, con lo cual los productos de degradación de dicha asparagina no da lugar, o al menos lo hace en menor proporción, a la formación de acrilamida en comparación con la forma no degradada del aminoácido. La enzima puede añadirse como una preparación enzimática o producirse in situ por un microorganismo capaz de producir dicha enzima. Preferiblemente, la preparación enzimática se deriva de un microorganismo y se obtiene por procesos de fermentación conocidos en la técnica. El microorganismo puede ser una bacteria, un hongo o una levadura. El proceso comprende la adición de una nueva asparaginasa (EC 3.5.1.1) como se define en otro aspecto de la invención.

La asparaginasa puede obtenerse a partir de diversas fuentes, tales como por ejemplo a partir de plantas, animales y microorganismos, tales como por ejemplo especies de *Escherichia*, *Erwinia*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Aspergillus* y *Bacillus*. Un ejemplo de una cepa adecuada de *Escherichia* es *Escherichia coli*. Un ejemplo de una cepa adecuada de *Erwinia* es *Erwinia chrysanthemi*. Ejemplos de cepas adecuadas de *Streptomyces* son *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*. Ejemplos de cepas adecuadas de *Aspergillus* son *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus niger*. Ejemplos de cepas adecuadas de *Bacillus* son *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacilluslicheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus thuringiensis*. Un ejemplo de métodos adecuados para producir asparaginasa a partir de cepas de *Bacillus*, *Streptomyces*, *Escherichia* o *Pseudomonas* se describe en WO 03/083043. Sin embargo, WO 03/083043 no describe el uso de asparaginasa para reducir la cantidad de acrilamida en los alimentos como se describe en la

presente invención.

Preferiblemente se hace uso de organismos del grado alimentario, por ejemplo *Aspergillus niger* o *Bacillus subtilis*.

5 En un segundo aspecto, la invención proporciona secuencias de polinucleótidos de nueva identificación que comprenden genes que codifican una nueva asparaginasa que puede producirse por ejemplo a partir de *Aspergillus niger*. La nueva asparaginasa puede utilizarse en el proceso para producción de alimentos de la presente invención, por ejemplo en la producción de un producto horneado a partir de una masa.

Polinucleótidos

10 La invención proporciona también nuevos polinucleótidos que codifican nuevas enzimas asparaginasa. La presente invención proporciona polinucleótidos aislados que codifican una asparaginasa, denominada provisionalmente ASPA01, que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 3 o equivalentes funcionales de la misma que tienen actividad de asparaginasa y que son homólogos al menos en un 80% a SEQ ID NO: 3. La secuencia del gen codificante de ASPA01 se determinó por secuenciación de un clon genómico obtenido a partir de *Aspergillus niger*. La invención proporciona secuencias de polinucleótidos que
15 comprenden el gen codificante de la asparaginasa ASPA01 así como su secuencia de cDNA completa y su secuencia codificante. De acuerdo con ello, la invención se refiere a un polinucleótido aislado que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o equivalentes funcionales de las mismas, que son homólogos al menos en un 80% a SEQ ID NO: 1 ó 2, que codifica una asparaginasa.

20 De modo más particular, la invención se refiere a un polinucleótido aislado que puede hibridarse en condiciones de severidad alta, al complemento de un polinucleótido de acuerdo con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, y que es homólogo al menos en un 80% a un polinucleótido de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. Ventajosamente, tales polinucleótidos pueden obtenerse a partir de hongos filamentosos, en particular de *Aspergillus niger*. Más específicamente, la invención se refiere a un polinucleótido aislado que tiene una secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

25 La invención se refiere también a un polinucleótido aislado que codifica al menos un dominio funcional que tiene actividad de asparaginasa de una asparaginasa que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 3 o variantes funcionales de la misma que tienen actividad de asparaginasa y que son al menos homólogos en un 80% a SEQ ID NO: 3.

30 Como se utiliza en esta memoria, los términos "gen" y "gen recombinante" se refieren a moléculas de ácido nucleico que pueden aislarse a partir de DNA cromosómico, que incluyen un marco de lectura abierto que codifica una proteína, v.g., una asparaginasa de *A. niger*. Un gen puede incluir secuencias codificantes, secuencias no codificantes, intrones y secuencias reguladoras. Además, un gen hace referencia a una molécula de ácido nucleico aislada como se define en esta memoria.

35 Una molécula de ácido nucleico de la presente invención, tal como una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o un equivalente funcional de la misma, que es homólogo al menos en un 80% a SEQ ID NO: 1 ó 2, puede aislarse utilizando técnicas estándar de biología molecular y la información de secuencias que se proporciona en esta memoria. Por ejemplo, utilizando la totalidad o una parte de la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 o la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 como sonda de hibridación, pueden aislarse moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención utilizando técnicas
40 estándar de hibridación y clonación (v.g., como se describe en Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989).

45 Además, una molécula de ácido nucleico que abarca la totalidad o una porción de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 puede ser aislada por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando iniciadores oligonucleotídicos sintéticos diseñados sobre la base de la información de secuencias contenida en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

Un ácido nucleico de la invención puede amplificarse utilizando cDNA, mRNA o alternativamente, DNA genómico, como molde e iniciadores oligonucleotídicos apropiados de acuerdo con técnicas estándar de amplificación por PCR. El ácido nucleico así amplificado puede clonarse en un vector apropiado y caracterizarse por análisis de secuencia de DNA.

50 Adicionalmente, los oligonucleótidos correspondientes a o hibridables a secuencias de nucleótidos de acuerdo con la invención pueden prepararse por técnicas de síntesis estándar, v.g., utilizando un sintetizador automático de DNA.

En una realización preferida, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 2. La secuencia de SEQ ID NO: 2 corresponde a la región

codificante del cDNA de ASPA01 de *A. niger*. Este cDNA comprende secuencias que codifican el polipéptido ASPA01 de *A. niger* de acuerdo con SEQ ID NO: 3.

5 En otra realización preferida, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención comprende una molécula de ácido nucleico que es un complemento de la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o un equivalente funcional de estas secuencias de nucleótidos.

Una molécula de ácido nucleico que es complementaria a otra secuencia de nucleótidos es una que es suficientemente complementaria a la otra secuencia de nucleótidos tal que la misma puede hibridarse a la otra secuencia de nucleótidos formando con ello un dúplex estable.

10 Un aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican un polipéptido de la invención o un equivalente funcional del mismo tal como un fragmento o dominio biológicamente activo, así como moléculas de ácido nucleico suficientes para utilizar como sondas de hibridación a fin de identificar moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido de la invención y fragmentos de tales moléculas de ácido nucleico adecuados para uso como iniciadores PCR para la amplificación o mutación de moléculas de ácido nucleico.

15 Un "polinucleótido aislado" o "ácido nucleico aislado" es un DNA o RNA que no está inmediatamente contiguo a las dos secuencias codificantes con las que está inmediatamente contiguo (una en el extremo 5' y una en el extremo 3') en el genoma existente naturalmente del organismo del que se deriva. Así, en una realización, un ácido nucleico aislado incluye algo o la totalidad de las secuencias no codificantes 5' (v.g., promotoras) que están inmediatamente contiguas a la secuencia codificante. El término incluye por tanto, por ejemplo, un DNA recombinante que está incorporado en un vector, en un plásmido o virus de replicación autónoma, o en el DNA genómico de un procarionte o eucarionte, o que existe como una molécula separada (v.g., un fragmento de cDNA o de DNA genómico producido por PCR o tratamiento con endonucleasas de restricción) independientemente de otras secuencias. El mismo incluye también un DNA recombinante que forma parte de un gen híbrido que codifica un polipéptido adicional que está sustancialmente exento de material celular, material viral, o medio de cultivo (cuando se produce por técnicas de DNA recombinante), o precursores químicos u otros productos químicos (cuando se sintetiza químicamente). Además, un "fragmento de ácido nucleico aislado" es un fragmento de ácido nucleico que no existe naturalmente como fragmento y no podría encontrarse en estado natural.

20 Como se utilizan en esta memoria, debe entenderse que los términos "polinucleótido" o "molécula de ácido nucleico" incluyen moléculas de DNA (v.g., cDNA o DNA genómico) y moléculas de RNA (v.g., mRNA) y análogos del DNA o RNA generado utilizando análogos de nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferiblemente es DNA bicatenario. El ácido nucleico puede sintetizarse utilizando análogos o derivados de oligonucleótidos (v.g., nucleótidos de inosina o fosforotioato). Tales oligonucleótidos pueden utilizarse, por ejemplo, para preparar ácidos nucleicos que tienen capacidades alteradas de apareamiento de bases o resistencia incrementada a las nucleasas.

35 Otra realización de la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que es antisentido con respecto a una molécula de ácido nucleico ASPA01, v.g., la cadena codificante de una molécula de ácido nucleico de ASPA01. Se incluyen también dentro del alcance de la invención las cadenas complementarias de las moléculas de ácido nucleico descritas en esta memoria.

Errores de secuenciación

40 La información de secuencia que se proporciona en esta memoria no debería interpretarse tan estrechamente como para requerir la inclusión de bases identificadas erróneamente. Las secuencias específicas descritas en esta memoria pueden utilizarse fácilmente para aislar el gen completo a partir de hongos filamentosos, en particular *A. niger*, que pueden someterse a su vez fácilmente a análisis ulteriores de la secuencia identificando con ello los errores de secuenciación.

45 A no ser que se indique otra cosa, todas las secuencias de nucleótidos determinadas por secuenciación de una molécula de DNA en esta memoria se determinaron utilizando un secuenciador automático de DNA y todas las secuencias de aminoácidos de polipéptidos codificados por moléculas de DNA determinadas en esta memoria se predijeron por traducción de una secuencia de DNA determinada como anteriormente. Por esta razón, como es conocido en la técnica para cualquier secuencia de DNA determinada por este método automático, cualquier secuencia de nucleótidos determinada en esta memoria puede contener algunos errores. Las secuencias de nucleótidos determinadas por automatización son por regla general idénticas al menos aproximadamente en un 90%, más típicamente al menos aproximadamente en un 95% hasta al menos aproximadamente 99,9% a la secuencia de nucleótidos real de la molécula de DNA secuenciada. La secuencia real puede determinarse más precisamente por otros enfoques que incluyen métodos de secuenciación manual de DNA bien conocidos en la técnica. Como se conoce también en la técnica, una simple inserción o delección en una decena de nucleótidos determinada comparada con la secuencia real causará un desplazamiento de marco en la traducción de la secuencia de nucleótidos, con lo que la secuencia de aminoácidos predicha codificada por una secuencia de nucleótidos determinada será completamente diferente de la secuencia de aminoácidos codificada realmente por la

molécula de DNA secuenciada, comenzando en el punto de dicha inserción o deleción.

La persona experta en la técnica es capaz de identificar tales bases identificadas erróneamente y conoce el modo de corregir dichos errores.

Fragmentos, sondas e iniciadores de ácido nucleico

5 Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención puede comprender únicamente una porción o un fragmento de la secuencia de ácido nucleico que se muestra en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, por ejemplo un fragmento que puede utilizarse como sonda o iniciador, o un fragmento que codifica una porción de una proteína ASPA01. La secuencia de nucleótidos determinada a partir de la clonación del gen de ASPA01 y cDNA permite la
10 generación de sondas e iniciadores diseñados para uso en la identificación y/o clonación de otros miembros de la familia ASPA01, así como homólogos de ASPA01 de otras especies. La sonda/iniciador comprende por lo general un oligonucleótido sustancialmente purificado que comprende típicamente una región de la secuencia de nucleótidos que se hibrida preferiblemente en condiciones de severidad alta a al menos aproximadamente 12 ó 15, con preferencia aproximadamente 18 ó 20, de modo preferible aproximadamente 22 ó 25, y de modo más preferible aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, ó 75 o más nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos representada en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o de un equivalente funcional de la misma.
15

Sondas basadas en las secuencias de nucleótidos ASPA01 pueden utilizarse para detectar transcritos o secuencias genómicas de ASPA01 que codifican las mismas proteínas o proteínas homólogas por ejemplo en otros organismos. En realizaciones preferidas, la sonda comprende adicionalmente un grupo marcador unido a ella, v.g., el grupo marcador puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un cofactor enzimático.
20 Dichas sondas pueden utilizarse también como parte de un kit de test de diagnóstico para identificar células que expresan una proteína ASPA01.

Identidad & homología

Los términos "homología" o "porcentaje de identidad" se utilizan intercambiamente en esta memoria. Para el propósito de esta invención, se define aquí que a fin de determinar el porcentaje de identidad de dos
25 secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias se alinean para propósitos de comparación óptima (v.g., pueden introducirse lagunas en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico para alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o ácido nucleico). Se comparan luego los residuos de aminoácidos o nucleótidos en posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de
30 aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en dicha posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones (es decir posiciones superpuestas) x 100). Preferiblemente, las dos secuencias tienen la misma longitud.

Las personas expertas son sabedoras del hecho de que están disponibles varios programas de ordenador diferentes para determinar la homología entre dos secuencias. Por ejemplo, una comparación de secuencias y determinación de identidad de secuencia entre dos secuencias puede realizarse utilizando un algoritmo matemático. En una realización preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)) que ha sido incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), utilizando una matriz Blossom
40 62 o una matriz PAM250, y un peso de laguna de 16, 14, 12, 10, 8, 6, ó 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, ó 6. La persona experta apreciará que todos estos diferentes parámetros proporcionarán resultados ligeramente diferentes pero que el porcentaje global de identidad de dos secuencias no se ve alterado significativamente cuando se utilizan diferentes algoritmos.

En otra realización adicional, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina utilizando el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), utilizando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de laguna de 40, 50, 60, 70, u 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, ó 6. En otra realización, el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos se determina utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)) que ha sido incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) (disponible en: <http://vega.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi>) utilizando una tabla de residuos de peso
50 PAM120, una penalidad por longitud de laguna de 12 y una penalidad por laguna de 4.

Las secuencias de ácido nucleico y proteínas de la presente invención pueden utilizarse adicionalmente como "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda contra bases de datos públicas a fin de, por ejemplo, identificar otros miembros de familia o secuencias afines. Tales búsquedas pueden realizarse utilizando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Las búsquedas de
55 nucleótidos BLAST pueden realizarse con el programa NBLAST, registro = 100, longitud de palabra = 12 a fin de obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de ASPA01 de la invención. Las búsquedas de proteínas BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, registro = 50, longitud de palabra = 3 a

fin de obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína ASPA01 de la invención. Para obtener alineaciones con lagunas para propósitos de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul, et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25 (17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (v.g., XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Hibridación

Como se utiliza en esta memoria, el término "hibridación" tiene por objeto describir condiciones para hibridación y lavado en las cuales secuencias de nucleótidos de al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 40% (sic), al menos aproximadamente 70%, más preferiblemente al menos aproximadamente 80%, de modo aún más preferible al menos aproximadamente 85% a 90%, de modo más preferible al menos 95% homólogas unas a otras se mantienen típicamente hibridadas unas a otras.

Un ejemplo preferido no limitante de tales condiciones de hibridación son hibridación en 6X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido por uno o más lavados en 1 X SSC, 0,1% SDS a 50°C, preferiblemente a 55°C, más preferiblemente a 60°C y aún más preferiblemente a 65°C.

Condiciones de severidad alta incluyen, por ejemplo, hibridación a 68°C de 5 x SSC/5x solución de Denhardt/1% SDS y lavado en 0,2x SSC/0,1% SDS a la temperatura ambiente. Alternativamente, el lavado puede realizarse a 42°C.

El profesional experto conocerá qué condiciones deben aplicarse para condiciones de hibridación severas y muy severas. Orientaciones adicionales concernientes a tales condiciones están disponibles fácilmente en la técnica, por ejemplo, en Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; y Ausubel et al. (eds.), 1995, *Current Protocols in Molecular Biology*, (John Wiley & Sons, N.Y.).

Por supuesto, un polinucleótido que se hibrida únicamente a una secuencia poli(A) (tal como el tracto poli(A) del terminal 3' de mRNAs) o a un tramo complementario de residuos T (o U) no estaría incluido en un polinucleótido de la invención utilizado para hibridarse específicamente a una porción de un ácido nucleico de la invención, dado que un polinucleótido de este tipo se hibridaría a cualquier molécula de ácido nucleico que contuviera un tramo poli(A) o el complemento del mismo (v.g., prácticamente cualquier clon de cDNA bicatenario).

Obtención de DNA de longitud total de otros organismos

En un enfoque típico, pueden cribarse bibliotecas de cDNA construidas a partir de otros organismos, v.g. hongos filamentosos, en particular de la especie *Aspergillus*.

Por ejemplo, pueden cribarse cepas de *Aspergillus* respecto a polinucleótidos ASPA01 homólogos por análisis mediante transferencia Northern. Después de la detección de transcritos homólogos a los polinucleótidos de acuerdo con la invención, pueden construirse bibliotecas de cDNA a partir de RNA aislado de la cepa apropiada, utilizando métodos estándar bien conocidas por los expertos en la técnica. Alternativamente, puede cribarse una biblioteca de DNA genómico total utilizando una sonda hibridable a un polinucleótido ASPA01 de acuerdo con la invención.

Pueden aislarse secuencias de genes homólogas, por ejemplo, por realización de PCR utilizando dos conjuntos de iniciadores oligonucleotídicos degenerados diseñadas sobre la base de las secuencias de nucleótidos que se exponen en esta memoria.

El molde para la reacción puede ser cDNA obtenido por transcripción inversa de mRNA preparado a partir de cepas que se sabe o se sospecha expresan un polinucleótido de acuerdo con la invención. El producto PCR puede subclonarse y secuenciarse a fin de asegurar que las secuencias amplificadas representan las secuencias de una nueva secuencia de ácido nucleico ASPA01, o un equivalente funcional de la misma.

El fragmento PCR puede utilizarse luego para aislar un clon de cDNA de longitud total por una diversidad de métodos conocidos. Por ejemplo, el fragmento amplificado puede marcarse y utilizarse para cribar una biblioteca de cDNA de bacteriófago o cósmido. Alternativamente, el fragmento marcado puede utilizarse para cribar una biblioteca genómica.

Puede utilizarse también la tecnología PCR para aislar secuencias de cDNA de longitud total a partir de otros organismos. Por ejemplo, puede aislarse RNA, siguiendo procedimientos estándar, a partir de una fuente celular o tisular apropiada. Puede realizarse una reacción de transcripción inversa sobre el RNA utilizando un iniciador oligonucleotídico específico para el extremo más próximo a 5' del fragmento amplificado para cebado de la síntesis de la primera cadena.

Pueden añadirse luego "colas" (v.g., con guaninas) al híbrido RNA/DNA resultante utilizando una reacción

estándar de transferasa terminal, el híbrido puede digerirse después con RNasa H, y finalmente puede cebarse la síntesis de la segunda cadena (v.g., con un iniciador poli-C). De este modo, pueden aislarse fácilmente secuencias de cDNA aguas arriba del fragmento amplificado. Para una revisión de estrategias de clonación útiles, véase v.g., Sambrook et al., supra; y Ausubel et al., supra.

- 5 Si un fragmento de DNA homólogo codifica o no una proteína ASPA01 funcional, puede comprobarse fácilmente por métodos conocidos en la técnica.

Vectores

Otro aspecto de la invención se refiere a vectores, preferiblemente vectores de expresión, que contienen un ácido nucleico que codifica una proteína ASPA01 o un equivalente funcional de la misma. La invención se refiere a un vector que comprende una secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la invención. La invención se refiere en particular a un vector en el cual dicha secuencia de polinucleótidos está enlazada operativamente con las secuencias reguladoras adecuadas para la expresión de dicha secuencia de polinucleótidos en una célula hospedadora adecuada, preferiblemente en donde dicha célula hospedadora adecuada es un hongo filamentoso. La invención se refiere también a un método para producir dicha secuencia de polinucleótidos o dicho vector, que comprende los pasos de cultivar una célula hospedadora transformada con dicho polinucleótido o dicho vector y aislar dicho polinucleótido o dicho método de dicha célula hospedadora.

Como se utiliza en esta memoria, el término "vector" hace referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico con el que se ha enlazado. Un tipo de vector es un "plásmido", que hace referencia a un bucle circular de DNA bicatenario al cual pueden estar ligados segmentos de DNA adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, con el cual pueden estar ligados segmentos adicionales de DNA al genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora en la cual se introducen (v.g. vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (v.g. vectores de mamífero no episómicos) se integran en el genoma de una célula hospedadora después de introducción en la célula hospedadora, y de este modo se replican junto con el genoma del hospedador. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales están enlazados operativamente. A dichos vectores se hace referencia en esta memoria como "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de DNA recombinante se encuentran a menudo en la forma de plásmidos. Los términos "plásmido" y "vector" pueden utilizarse de modo intercambiable en esta memoria dado que el plásmido es la forma de vector más comúnmente utilizada. No obstante, la invención tiene por objeto incluir dichas otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (v.g. retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados deficientes en replicación), que desempeñan funciones equivalentes.

Los vectores de expresión recombinantes de la invención comprenden un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para expresión del ácido nucleico en una célula hospedadora, lo que significa que el vector de expresión recombinante incluye una o más secuencias reguladoras, seleccionadas sobre la base de las células hospedadoras a utilizar para la expresión, que está(n) enlazada(s) operativamente a la secuencia de ácido nucleico a expresar. Dentro de un vector de expresión recombinante, "enlazado operativamente" tiene por objeto significar que la secuencia de nucleótidos de interés está enlazada a la o las secuencias reguladoras de una manera que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (v.g., en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula hospedadora cuando el vector se introduce en la célula hospedadora). El término "secuencia reguladora" tiene por objeto incluir promotores, intensificadores y otros elementos de control de la expresión (v.g., señal de poliadenilación). Secuencias reguladoras de este tipo se describen, por ejemplo, en Goeddel: *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células hospedadoras y aquellas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos sólo en una cierta célula hospedadora (v.g. secuencias reguladoras específicas de tejido). Se apreciará por los expertos en la técnica que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora a transformar, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Los vectores de expresión de la invención pueden introducirse en células hospedadoras para producir de este modo proteínas o péptidos, codificados por ácidos nucleicos como se describe en esta memoria (v.g. proteínas ASPA01, formas mutantes de proteínas ASPA01, fragmentos, variantes o equivalentes funcionales de los mismos, etc.).

Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden diseñarse para expresión de proteínas ASPA01 en células procariotas o eucariotas. Por ejemplo, pueden expresarse proteínas ASPA01 en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (utilizando vectores de expresión de baculovirus), células de levadura o células de mamífero. Células hospedadoras adecuadas se discuten adicionalmente en Goeddel: *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Alternativamente, el vector de expresión recombinante puede transcribirse y traducirse *in vitro*, por ejemplo utilizando secuencias reguladoras del promotor T7 y polimerasa T7.

Vectores de expresión útiles en la presente invención incluyen vectores derivados de cromosomas,

episomas y virus, v.g., vectores derivados de plásmidos bacterianos, bacteriófago, episoma de levadura, elementos cromosómicos de levadura, virus tales como baculovirus, papovavirus, virus vaccinia, adenovirus, poxvirus de las aves, virus de la pseudorrabia y retrovirus, y vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales como los derivados de elementos genéticos de plásmidos y bacteriófagos, tales como cósmidos y fagémidos.

5 La inserción de DNA debería estar enlazada operativamente a un promotor apropiado, tal como el promotor PL del fago lambda, los promotores de *E. coli* lac, trp y tac, los promotores temprano y tardío de SV40 y promotores de LTRs retrovirales, para nombrar sólo unos pocos. Otros promotores adecuados serán conocidos por las personas expertas. En una realización específica, se prefieren promotores que sean capaces de dirigir un alto nivel de expresión de asparaginasas en hongos filamentosos. Vectores de este tipo se conocen en la técnica. Los
10 constructos de expresión pueden contener sitios para iniciación y terminación de la transcripción, y, en la región transcrita, un sitio de fijación de ribosoma para la traducción. La porción codificante de los transcritos maduros expresados por los constructos incluirá una AUG de iniciación de la traducción al comienzo y un codón de terminación situado adecuadamente al final del polipéptido a traducir.

15 El DNA vector puede introducirse en células procariotas o eucariotas por técnicas convencionales de transformación o transfección. Como se utilizan en esta memoria, los términos "transformación" y "transfección" tienen por objeto hacer referencia a una diversidad de métodos reconocidos en la técnica para introducir ácido nucleico extraño (v.g., DNA) en una célula hospedadora, con inclusión de co-precipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transducción, infección, lipofección, transfección mediada por lípidos catiónicos o electroporación. Métodos adecuados para transformar o transfectar células
20 hospedadoras pueden encontrarse en Sambrook, et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989*), Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology* (1986) y otros manuales de laboratorio.

25 Para transfección estable de células de mamífero, es sabido que, dependiendo del vector de expresión y la técnica de transfección utilizada, sólo una pequeña fracción de células puede integrar el DNA extraño en su genoma. Con objeto de identificar y seleccionar estos integrantes, se introduce generalmente un gen que codifica un marcador seleccionable (v.g., resistencia a antibióticos) en las células hospedadoras junto con el gen de interés. Marcadores seleccionables preferidos incluyen aquéllos que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. Ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable puede introducirse en una célula hospedadora en el mismo vector que el que codifica una proteína ASPA01 o puede introducirse en un vector
30 separado. Las células transfectadas establemente con el ácido nucleico introducido pueden identificarse por selección de fármacos (v.g. las células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán).

La expresión de proteínas en procariotas se realiza a menudo en *E. coli* con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de las proteínas.

35 Como se ha indicado, los vectores de expresión contendrán preferiblemente marcadores seleccionables. Tales marcadores incluyen dihidrofolato-reductasa o resistencia a la neomicina para cultivo de células eucariotas y resistencia a tetraciclina o ampicilina para el cultivo en *E. coli* y otras bacterias. Ejemplos representativos de hospedadores adecuados incluyen células bacterianas, tales como *E. coli*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tales como levadura; células de insecto tales como *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*; células
40 animales tales como CHO, COS y melanoma de Bowes; y células de plantas. Medios de cultivo y condiciones apropiadas para las células hospedadoras arriba descritas se conocen en la técnica.

45 Entre los vectores preferidos para uso en bacterias se encuentran pQE70, pQE60 y pQE-9, disponibles de Qiagen; vectores pBS, vectores Phagescript, vectores Bluescript, pNH8A, pNH16A, pNH18A, pNH46A, disponibles de Stratagene; y ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 disponibles de Pharmacia. Entre los vectores eucariotas preferidos se encuentran PWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pZT1 y pSG disponibles de Stratagene; y pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles de Pharmacia. Otros vectores adecuados serán fácilmente evidentes para el profesional experto.

50 Entre los promotores bacterianos conocidos para uso en la presente invención se incluyen los promotores lacI y lacZ de *E. coli*, los promotores T3 y T7, el promotor gpt, los promotores lambda PR y PL y el promotor trp, el promotor HSV de timidina-quinasa, los promotores temprano y tardío de SV40, los promotores de LTRs retrovirales, tales como los del virus del sarcoma de Rous ("RSV"), y promotores de metalotioneína, tales como el promotor metalotioneína-I de ratón.

55 La transcripción del DNA que codifica los polipéptidos de la presente invención por eucariotas superiores puede aumentarse por inserción de una secuencia intensificadora en el vector. Los intensificadores son elementos de DNA con acción cis, por regla general de aproximadamente 10 a 300 pb que actúan para aumentar la actividad transcripcional de un promotor en un tipo de célula hospedadora dado. Ejemplos de intensificadores incluyen el intensificador de SV40, que está localizado en el lado posterior del origen de replicación en pb 100 a 270, el

intensificador del promotor temprano de citomegalovirus, el intensificador de polioma en el lado tardío del origen de replicación, e intensificadores de adenovirus.

5 Para secreción de la proteína traducida en el lumen del retículo endoplásmico, en el espacio periplásmico o en el ambiente extracelular, puede incorporarse una señal de secreción apropiada en el polipéptido expresado. Las señales pueden ser endógenas al polipéptido o pueden ser señales heterólogas.

10 El polipéptido puede expresarse en una forma modificada y puede incluir no sólo señales de secreción sino también regiones funcionales heterólogas adicionales. Así, por ejemplo, puede añadirse una región de aminoácidos adicionales, particularmente aminoácidos cargados, al término N del polipéptido para mejorar la estabilidad y persistencia en la célula hospedadora, durante la purificación o durante la manipulación y el almacenamiento subsiguientes. Asimismo, pueden añadirse restos peptídicos al polipéptido para facilitar la purificación.

Polipéptidos de acuerdo con la invención

15 La invención proporciona una asparaginasa aislada con una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 o equivalentes funcionales de la misma que tienen actividad de asparaginasa y que son homólogos al menos en un 80% a SEQ ID NO: 3. Preferiblemente, la asparaginasa aislada puede obtenerse de *Aspergillus niger*. La invención proporciona también asparaginasa aislada que puede obtenerse por expresión de un polinucleótido de acuerdo con la invención o un vector de acuerdo con la invención en una célula hospedadora apropiada, v.g. *Aspergillus niger*. La invención proporciona adicionalmente una asparaginasa recombinante que comprende un dominio funcional que tiene actividad de asparaginasa de cualquiera de las asparaginasas de acuerdo con la invención.

20 La invención proporciona un polipéptido aislado que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 3, una secuencia de aminoácidos que puede obtenerse por expresión del polinucleótido de SEQ ID NO: 1 en un hospedador apropiado, así como una secuencia de aminoácidos que puede obtenerse por expresión de las secuencias de polinucleótidos de SEQ ID NO: 2 en un hospedador apropiado. Asimismo, un péptido o polipéptido que comprende un equivalente funcional de los polipéptidos anteriores y que tiene al menos 80% de homología con dicho péptido o polipéptido está comprendido dentro de la presente invención. Los polipéptidos anteriores están comprendidos colectivamente en el término "polipéptidos de acuerdo con la invención".

25 Los términos "péptido" y "oligopéptido" se consideran sinónimos (como se reconoce comúnmente) y cada término puede utilizarse intercambiamente cuando el contexto lo requiera para indicar una cadena de al menos dos aminoácidos acoplados por enlaces peptídicos. El término "polipéptido" se utiliza en esta memoria para cadenas que contienen más de 7 residuos de aminoácidos. Todas las fórmulas o secuencias de oligopéptidos y polipéptidos se escriben en esta memoria de izquierda a derecha y en la dirección del término amino al término carboxi. El código de una sola letra de aminoácidos utilizado en esta memoria es conocido comúnmente en la técnica y puede encontrarse en Sambrook, et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989*).

30 Por polipéptido o proteína "aislado(a)" se entiende un polipéptido proteína separado de su ambiente nativo. Por ejemplo, los polipéptidos y proteínas producidos recombinantemente expresados en células hospedadoras se consideran aislados para el propósito de la invención al igual que los polipéptidos nativos o recombinantes que han sido purificados sustancialmente por cualquier técnica adecuada tal como, por ejemplo, el método de purificación en un solo paso descrito en Smith y Johnson, Gene 67: 31-40 (1988).

35 La asparaginasa ASPA01 de acuerdo con la invención puede separarse y purificarse a partir de cultivos de células recombinantes por métodos bien conocidos que incluyen precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio de aniones o cationes, cromatografía con fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía con hidroxilapatito y cromatografía con lectinas. Muy preferiblemente, se emplea para purificación cromatografía líquida de alta resolución ("HPLC").

40 Los polipéptidos de la presente invención incluyen productos purificados naturalmente, productos de procedimientos de síntesis química, y productos producidos por técnicas recombinantes a partir de un hospedador procarionta o eucariota, con inclusión, por ejemplo, de células bacterianas, de levadura, de plantas superiores, de insectos y de mamíferos. Dependiendo del hospedador empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente invención pueden estar glicosilados o no glicosilados. Adicionalmente, los polipéptidos de la invención pueden incluir también un residuo metionina inicial modificado, en algunos casos como resultado de procesos mediados por el hospedador.

Fragmentos de proteínas

La invención caracteriza también fragmentos biológicamente activos de los polipéptidos de acuerdo con la invención.

Fragmentos biológicamente activos de un polipéptido de la invención incluyen polipéptidos que comprenden

secuencias de aminoácidos suficientemente idénticas a o derivadas de la secuencia de aminoácidos de la proteína ASPA01 (v.g. la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3), que incluyen menos aminoácidos que la proteína de longitud total, y exhiben al menos una actividad biológica de la proteína de longitud total correspondiente. Típicamente, fragmentos biológicamente activos comprenden un dominio o motivo que tiene al menos una actividad de la proteína ASPA01.

Un fragmento biológicamente activo de una proteína de la invención puede ser un polipéptido que tiene por ejemplo, una longitud de 10, 25, 50, 100 o más aminoácidos. Además, otras porciones biológicamente activas, en las cuales están delecionadas otras regiones de la proteína, pueden prepararse por técnicas recombinantes y evaluarse por una o más de las actividades biológicas de la forma nativa de un polipéptido de la invención.

La invención caracteriza también fragmentos de ácido nucleico que codifican los fragmentos biológicamente activos anteriores de la proteína ASPA01.

Equivalentes funcionales

Los términos "equivalentes funcionales" y "variantes funcionales" se utilizan de modo intercambiable en esta memoria. Equivalentes funcionales de DNA de ASPA01 son fragmentos de DNA aislados que codifican un polipéptido que exhibe una función particular de la asparaginasa ASPA01 de *A. niger* como se define en esta memoria. Un equivalente funcional de un polipéptido ASPA01 de acuerdo con la invención es un polipéptido que exhibe al menos una función de una asparaginasa de *A. niger* como se define en esta memoria. Los equivalentes funcionales abarcan por consiguiente también fragmentos biológicamente activos.

Los equivalentes funcionales de proteínas o polipéptidos pueden contener únicamente sustituciones conservadoras de uno o más aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos no esenciales. De acuerdo con ello, un aminoácido no esencial es un residuo que puede estar alterado en SEQ ID NO: 3 sin alterar sustancialmente la función biológica. Por ejemplo, residuos de aminoácidos que están conservados entre las proteínas ASPA01 de la presente invención, se predice que son particularmente inadecuados para alteración. Adicionalmente, los aminoácidos conservados entre las proteínas ASPA01 de acuerdo con la presente invención y otras asparaginasas no es probable que sean adecuados para la alteración.

El término "sustitución conservadora" tiene por objeto significar una sustitución en la cual el residuo de aminoácidos está reemplazado por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Estas familias se conocen en la técnica e incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (v.g. lisina, arginina e histidina), cadenas laterales ácidas (v.g. ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (v.g., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (v.g., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas en β (v.g., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (v.g., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

Equivalentes funcionales de ácidos nucleicos pueden contener típicamente mutaciones silenciosas o mutaciones que no alteran la función biológica del polipéptido codificado. De acuerdo con ello, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas ASPA01 que contienen cambios en residuos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica particular. Tales proteínas ASPA01 difieren en secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, pero retienen al menos una actividad biológica. La molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína, en donde la proteína comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga de al menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más homóloga a la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 3.

Por ejemplo, orientación concerniente al modo de realizar sustituciones de aminoácidos fenotípicamente silenciosas se proporciona en Bowie, J.U. et al., Science 247: 1306-1310 (1990) en donde los autores indican que existen dos enfoques principales para estudiar la tolerancia al cambio de una secuencia de aminoácidos. El primer método está basado en el proceso de evolución, en el cual las mutaciones son aceptadas o rechazadas por selección natural. El segundo enfoque utiliza ingeniería genética para introducir cambios de aminoácidos en posiciones específicas de un gen clonado y selecciona o criba para identificar secuencias que mantienen la funcionalidad. Como exponen los autores, estos estudios han revelado que las proteínas son sorprendentemente tolerantes a las sustituciones de aminoácidos. Los autores indican adicionalmente qué cambios serán probablemente permisivos en una cierta posición de la proteína. Por ejemplo, la mayoría de los residuos de aminoácidos ocultos requieren cadenas laterales no polares, mientras que pocas características de las cadenas laterales superficiales se conservan generalmente. Otras sustituciones fenotípicamente silenciosas de este tipo se describen en Bowie, et al., supra, y las referencias citadas en dicho lugar.

Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína ASPA01 homóloga a la proteína de acuerdo con SEQ ID NO: 3 puede crearse por introducción de una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en las secuencias de nucleótidos codificantes de acuerdo con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, de tal modo que se introducen una o más sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos en la proteína codificada. Tales mutaciones pueden introducirse por técnicas estándar, tales como mutagénesis orientada o

mutagénesis mediada por PCR.

El término "equivalentes funcionales" abarca también ortólogos de la proteína ASPA01 de *A. niger*. Los ortólogos de la proteína ASPA01 de *A. niger* son proteínas que pueden aislarse de otras cepas o especies y poseen una actividad biológica similar o idéntica. Tales ortólogos pueden ser identificados fácilmente dado que comprenden una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente homóloga a SEQ ID NO: 3.

Como se define en esta memoria, el término "sustancialmente homólogo" se refiere a una primera secuencia de aminoácidos o nucleótidos que contiene un número suficiente o mínimo de aminoácidos o nucleótidos idénticos o equivalentes (v.g., con cadena lateral similar) a una segunda secuencia de aminoácidos o nucleótidos de tal modo que la primera y la segunda secuencias de aminoácidos o nucleótidos tienen un dominio común. Por ejemplo, secuencias de aminoácidos o nucleótidos que contienen un dominio común que tiene aproximadamente 80%, preferiblemente 85%, más preferiblemente 90%, aún más preferiblemente 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad o más se definen en esta memoria como suficientemente idénticas.

Asimismo, los ácidos nucleicos que codifican otros miembros de la familia ASPA01, que tienen por tanto una secuencia de nucleótidos que difiere de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, están dentro del alcance de la invención. Además, ácidos nucleicos que codifican proteínas ASPA01 de especies diferentes que tienen por tanto una secuencia de nucleótidos que difiere de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 están dentro del alcance de la invención.

Moléculas de ácido nucleico correspondientes a variantes (v.g. variantes alélicas naturales) y homólogos del DNA de ASPA01 de la invención pueden aislarse basándose en su homología con los ácidos nucleicos de ASPA01 descritos en esta memoria, utilizando los cDNAs descritos en esta memoria o un fragmento adecuado de los mismos, como una sonda de hibridación de acuerdo con técnicas estándar de hibridación, preferiblemente en condiciones de hibridación altamente severas.

Además de variantes alélicas existentes naturalmente de la secuencia ASPA01, las personas expertas reconocerán que pueden introducirse cambios por mutación en las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 conduciendo con ello a cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína ASPA01 sin alterar sustancialmente la función de la proteína ASPA01.

En otro aspecto de la invención, se proporcionan proteínas ASPA01 mejoradas. Las proteínas ASPA01 mejoradas son proteínas en las cuales al menos una actividad biológica está mejorada. Tales proteínas pueden obtenerse por introducción aleatoria de mutaciones a lo largo de la totalidad o una parte de la secuencia codificante de ASPA01, por ejemplo por mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden expresarse recombinantemente y cribarse respecto a actividad biológica. Por ejemplo, la técnica proporciona ensayos estándar para medir la actividad enzimática de las asparaginasa, y por tanto pueden seleccionarse fácilmente proteínas mejoradas.

En una realización preferida, la proteína ASPA01 tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 3. En otra realización, el polipéptido ASPA01 es sustancialmente homólogo a la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 3 y retiene al menos una actividad biológica de un polipéptido de acuerdo con SEQ ID NO: 3, pero difiere en secuencia de aminoácidos debido a variación natural o mutagénesis como se ha descrito arriba.

En una realización preferida adicional, la proteína ASPA01 tiene una secuencia de aminoácidos codificada por un fragmento de ácido nucleico aislado capaz de hibridarse a un ácido nucleico de acuerdo con el complemento de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, en condiciones de hibridación de alta severidad y en donde dicho polinucleótido aislado tiene una homología de al menos 80% con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

De acuerdo con ello, la proteína ASPA01 es una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 40%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más homóloga a la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 3 y retiene al menos una actividad funcional del polipéptido de acuerdo con SEQ ID NO: 3.

Equivalentes funcionales de una proteína de acuerdo con la invención pueden identificarse también v.g. por cribado de bibliotecas de mutantes combinatorias, v.g. mutantes de truncación, de la proteína de la invención en cuanto a actividad de asparaginasa. En una realización, se genera una biblioteca diversificada de variantes por mutagénesis combinatoria al nivel de ácidos nucleicos. Una biblioteca diversificada de variantes puede producirse, por ejemplo, por ligación enzimática de una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias de genes de tal modo que una serie degenerada de secuencias proteínicas potenciales puede expresarse como polipéptidos individuales. Existe una diversidad de métodos que pueden utilizarse para producir bibliotecas de variantes potenciales de los polipéptidos de la invención a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerada. Métodos para síntesis de oligonucleótidos degenerados se conocen en la técnica (véase, v.g., Narang (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al. (1984) Science 198:1056; Ike et al. (1983)

Nucleic Acids Res. 11:477).

Adicionalmente, pueden utilizarse bibliotecas o fragmentos de la secuencia codificante de un polipéptido de la invención para generar una población diversificada de polipéptidos para cribado de una selección de variantes subsiguiente. Por ejemplo, una biblioteca de fragmentos de secuencias codificantes puede generarse por tratamiento de un fragmento PCR bicatenario de la secuencia codificante de interés con una nucleasa en condiciones en las cuales se produce mellado sólo aproximadamente una vez por molécula, desnaturalización del DNA bicatenario, renaturalización del DNA para formar DNA bicatenario que puede incluir pares sentido/antisentido de productos mellados diferentes, separación de porciones monocatenarias de los dúplex nuevamente formados por tratamiento con nucleasa S1, y ligación de la biblioteca de fragmentos resultante en un vector de expresión. Por este método, puede derivarse una biblioteca de expresión que codifica fragmentos N-terminales e internos de diversos tamaños de la proteína de interés.

Se conocen en la técnica varios métodos para cribado de productos génicos de bibliotecas combinatorias producidas por mutaciones puntuales de truncación, y para cribado de bibliotecas de cDNA en cuanto a productos génicos que tengan una propiedad seleccionada. Las técnicas utilizadas más ampliamente, que son adecuadas para análisis de alta potencia, para cribado de grandes bibliotecas de genes, incluyen típicamente clonación de la biblioteca de genes en vectores de expresión replicables, transformación de células apropiadas con la biblioteca de vectores resultante, y expresión de los genes combinatorios en condiciones en las cuales la detección de un actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. La mutagénesis recurrente de conjunto (REM), una técnica que mejora la frecuencia de mutantes funcionales en las bibliotecas, puede utilizarse en combinación con los ensayos de cribado para identificar variantes de una proteína de la invención (Arkin y Yourvan (1992) Proc. Natl. Acad. Sci.USA 89:7811-7815; Delgrave et al. (1993) Protein Engineering 6(3):327-331).

Además de la secuencia del gen ASPA01 que se muestra en SEQ ID NO: 1, será evidente por una persona experta en la técnica que polimorfismos de secuencias de DNA que pueden conducir a cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína ASPA01 pueden existir dentro de una población dada. Tales polimorfismos genéticos pueden existir en células de poblaciones diferentes o dentro de una población debido a variación alélica natural. Las variantes alélicas pueden incluir también equivalentes funcionales.

Los fragmentos de un polinucleótido de acuerdo con la invención pueden comprender también polinucleótidos que no codifiquen polipéptidos funcionales. Tales polinucleótidos pueden funcionar como sondas o iniciadores para una reacción PCR.

Los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención, con indiferencia de si codifican polipéptidos funcionales o no funcionales, pueden utilizarse como sondas de hibridación o iniciadores para reacción en cadena de polimerasa (PCR). Los usos de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención que no codifican un polipéptido que tiene una actividad de ASPA01 incluyen, inter alia, (1) aislamiento del gen codificante de la proteína ASPA01, o variantes alélicas de la misma a partir de una biblioteca de cDNA, v.g. de otros organismos distintos de *A. niger*; (2) hibridación in situ (v.g. FISH) a extensiones cromosómicas en metafase para proporcionar localización cromosómica precisa del gen ASPA01 como se describe en Verma et al., Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, Nueva York (1988); (3) análisis por transferencia Northern para detectar la expresión de mRNA de ASPA01 en tejidos y/o células específicas, y (4) sondas e iniciadores que pueden utilizarse como herramienta de diagnóstico para analizar la presencia de un ácido nucleico hibridable a la sonda ASPA01 en una muestra biológica (v.g. tejido) dada.

La invención abarca también un método de obtención de un equivalente funcional de un gen o cDNA de ASPA01. Dicho método implica la obtención de una sonda marcada que incluye un ácido nucleico aislado que codifica la totalidad o una porción de la secuencia de acuerdo con SEQ ID NO: 3 o una variante de la misma; cribado de una biblioteca de fragmentos de ácido nucleico con la sonda marcada en condiciones que permiten hibridación de la sonda a fragmentos de ácido nucleico en la biblioteca, formando de este modo dúplex de ácido nucleico, y preparación de la secuencia de gen de longitud total a partir de los fragmentos de ácido nucleico en cualquier dúplex marcado para obtener un gen afín al gen de ASPA01.

Un ácido nucleico ASPA01 de la invención es al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más homólogo a una secuencia de ácido nucleico representada en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o el complemento de las mismas.

Un polipéptido ASPA01 de la invención es al menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más homólogo a la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 3.

Células hospedadoras

En otra realización, la invención caracteriza células, v.g., células hospedadoras transformadas o células hospedadoras recombinantes que contienen un ácido nucleico abarcado por la invención. La invención caracteriza una célula hospedadora recombinante, en la cual o en un antepasado de la cual se ha introducido, por medio de

técnicas de DNA recombinante, un polinucleótido de acuerdo con la invención o un vector de acuerdo con la invención. En una realización, dicha célula hospedadora expresa un polipéptido de acuerdo con la invención.

La invención se refiere también a un método para fabricar una asparaginasa de acuerdo con la invención que comprende los pasos de transformar una célula hospedadora adecuada con un polinucleótido aislado de acuerdo con la invención o un vector de acuerdo con la invención, cultivar dicha célula en condiciones que permitan la expresión de dicho polinucleótido y, opcionalmente, purificar el polipéptido codificado a partir de dicha célula o medio de cultivo.

Una "célula transformada" o "célula recombinante" es una célula en la cual (o en un antepasado de la cual) se ha introducido, por medio de técnicas de DNA recombinante, un ácido nucleico de acuerdo con la invención. Se incluyen tanto células procariotas como eucariotas, v.g., bacterias, hongos, levaduras y análogos, siendo especialmente preferidas células de hongos filamentosos, en particular *Aspergillus niger*.

Puede seleccionarse una célula hospedadora que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico de una manera específica deseada. Tales modificaciones (v.g., glicosilación) y procesamientos (v.g., escisión) de los productos proteínicos pueden facilitar el funcionamiento óptimo de la proteína.

Diversas células hospedadoras tienen mecanismos característicos y específicos para procesamiento y modificación posteriores a la traducción de proteínas y productos génicos. Líneas de células o sistemas hospedadores apropiados familiares para los expertos en la técnica de la biología molecular y/o microbiología pueden seleccionarse para asegurar la modificación y el procesamiento deseados y correctos de la proteína extraña expresada. A este fin, pueden utilizarse células hospedadoras eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, glicosilación, y fosforilación del producto génico. Tales células hospedadoras son bien conocidas en la técnica.

Células hospedadoras incluyen también, pero sin carácter limitante, líneas de células de mamífero tales como CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38, y líneas de células del plexo coroideo.

Si se desea, los polipéptidos de acuerdo con la invención pueden ser producidos por una línea de células transfectada de manera estable. Cierta número de vectores adecuados para transfección estable de células de mamífero están disponibles al público, y métodos para construcción de tales líneas de células son también conocidos públicamente, v.g., en Ausubel et al. (supra).

El proceso de acuerdo con la invención puede utilizarse para obtener una disminución en el contenido de acrilamida del producto alimenticio producido, preferiblemente más de un 50%, de modo más preferible más de 20%, de modo aún más preferible 10% y de modo muy preferible más de 5% comparado con un producto alimenticio obtenido por el proceso convencional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Medida de acrilamida

Pretratamiento de la muestra

Se extraen 600 mg de muestra seca y homogeneizada utilizando 5 ml de agua MiliQ. Se añade al extracto 1 µg de acrilamida estándar interna $^{13}\text{C}_3$ en solución (CIL). Después de 10 minutos de centrifugación (6.000 rpm), se introducen 3 ml de la capa superior en una columna Extreluut-3BT (Merck). Utilizando 15 ml de acetato de etilo, se eluye la acrilamida de la columna. Se evapora el acetato de etilo en una corriente suave de nitrógeno hasta aproximadamente 0,5 ml.

Condiciones cromatográficas

La solución de acetato de etilo se analiza utilizando cromatografía de gases. Se obtiene la separación utilizando una columna CP-Wax 57 (Varian) (longitud 25 m, diámetro interior 0,32 mm, película 1,2 µm) y helio como gas portador con un flujo constante de 5,4 ml/min. Se realiza una inyección sin división de 3 µl. Se mantiene la temperatura del horno a 50°C durante 1 minuto, después de lo cual se aumenta la temperatura a razón de 30°C/min hasta 220°C. Después de 12 minutos a temperatura constante de 220°C, se enfría el horno y se estabiliza antes de la próxima inyección. La detección se realiza utilizando espectrometría de masas con ionización química en línea en modo de iones positivos, utilizando metano como gas de ionización. Los iones característicos de m/z 72 (acrilamida) y m/z 75 (acrilamida $^{13}\text{C}_3$) se monitorizan para cuantificación.

Equipo Utilizado

GC: HP6890 (Hewlet Packard)
 MSD (detector de masas selectivo): HP5973 (Hewlet Packard)

5 Medida de la actividad de asparaginasa

La actividad de asparaginasa se midió de acuerdo con Shirfrin et al. (Shirfrin, S. Parrott, C.L., y Luborsky, S.W. (1974), Journal of Biological Chemistry 249, 1445-1340).

El antecedente de este ensayo enzimático está basado en la determinación del NH₃ liberado como resultado de la actividad de asparaginasa.

10 Con objeto de medir el NH₃ liberado, se siguió el programa de pipeteado siguiente:

Solución A: ácido cítrico 0,1 M + Na₂HPO₄·2 H₂O 0,2 M pH 5.5

Solución B: L-asparagina 0,189 M (Sigma)

Solución C: (NH₄)₂SO₄ 0,006 M (Merck)

Solución D: ácido tricloroacético 25% (v/v) (Merck)

15 Solución E: Reactivo de Color para Amoníaco (Aldrich)

Para medidas de la actividad de asparaginasa, las soluciones tienen que ser preparadas recientemente.

En la Tabla 1 se resumen las soluciones utilizadas para la curva de calibración (CP = punto de calibración).

Tabla 1 Programa de soluciones de calibración

Solución añadida (ml)	CP 1	CP 2	CP 3	CP 4	Test de la enzima de referencia	Test de la enzima
A	1	1	1	1	1	1
B	0	0	0	0	0,2	0,2
C	0	0,25	0,5	1	0	0
Agua desionizada	1,1	0,85	0,6	0,1	0,8	0,8
Volumen de cantidad limitante de la velocidad de reacción de la solución enzimática	0	0	0	0	0	0,1

20 Las soluciones de acuerdo con la Tabla 1 se invirtieron inmediatamente y se incubaron a 37°C por inversión. Después de 30 minutos, se terminó la reacción por adición de 0,1 ml de solución D. Para el test enzimático de referencia se añadieron después 0,1 ml de solución de enzima. Las soluciones se mezclaron inmediatamente y se centrifugaron para eliminar cualquier precipitado. Se pipetearon 0,2 ml de los sobrenadantes a tubos que contenían 4,3 ml de agua desionizada y 0,5 ml de solución E. Estas mixturas se mezclaron inmediatamente y después de 1 minuto se midió la A a 436 nm para las muestras de calibración, referencias y tests.

La curva de calibración se construyó como sigue:

30 Punto de calibración ΔA 436 nm = Punto de calibración A 436 nm – Punto de calibración A 436 nm 1 (sic). Se prepara una curva estándar representando el valor Δ A 436 nm del estándar frente a la concentración de amoníaco (NH₃).

Se calculó la actividad enzimática como sigue:

Test enzimático ΔA 436 nm = Test A 436 nm – Test de referencia A 436 nm

Se determinan los μmoles de NH₃ liberado utilizando la curva estándar:

35 Unidades /ml =
$$\frac{\mu\text{moles liberados NH}_3 \times V_s}{V_t \times t_i \times V_e}$$

en donde,

V_s = volumen de solución de reacción (en el programa + 0,1 ml solución D); 2,2 ml

V_i = volumen de la solución de reacción utilizado para la segunda reacción a fin de determinar el NH_3 ; 0,2 ml

T_i = tiempo de información en minutos; 30

5 V_e = volumen de muestra de la enzima a testar; 0,1

$$\text{Actividad específica de la enzima} = \frac{\text{Unidades/ml enzima}}{\text{mg proteína/ml enzima}}$$

10 Una unidad de actividad de asparaginasa se define como 1 μmol de NH_3 que es liberado a partir de L-asparagina por minuto a pH 5,5 a 37°C, a no ser que se indique otra cosa. La masa tiene un pH de aproximadamente 5,5, por lo que se prefiere este pH en la medida. Sin embargo, para otros sustratos con un valor de pH diferente, se utiliza preferiblemente este pH diferente en la determinación de la actividad de asparaginasa.

15 Las cantidades en ppm se basan en la cantidad de harina, a no ser que se indique otra cosa.

Materiales

Se obtuvo la asparaginasa de *Escherichia coli* (Sigma, con una actividad específica de 285 unidades/mg) *Erwinia chrysanthemi* (Sigma, con una actividad específica de 100 unidades/mg), *Bacillus subtilis* o *Aspergillus niger* (véanse los ejemplos para detalles de la fermentación).

20 El medio CSL estaba constituido por (en cantidad por litro): 100 g de Sólidos de Maceración de Maíz (Roquette), 1 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g glucosa $\cdot \text{H}_2\text{O}$ y 0,25 g Basildon (antiespumante). Los ingredientes se disolvieron en agua desmineralizada y el pH se ajustó a pH 5,8 con NaOH o H_2SO_4 ; matraces de 100 ml con placa de separación y bola de espuma se llenaron con 20 ml de caldo de fermentación y se esterilizaron durante 20 minutos a 120°C, después de lo cual se añadieron a cada matraz 200 μl de una solución que contenía 5000 UI/ml de penicilina y 5 mg/ml de estreptomina, después de enfriar a la temperatura ambiente.

25 El medio CSM estaba constituido por (en cantidad por litro): 150 g maltosa $\cdot \text{H}_2\text{O}$, 60 g Soytone (peptona), 1 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 15 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,08 g Tween 80, 0,02 g Basildon (antiespumante), 20 g MES, 1 g L-arginina. Los ingredientes se disolvieron en agua desmineralizada y el pH se ajustó a pH 6,2 con NaOH o H_2SO_4 ; matraces de 500 ml provistos de placa de separación y bola de espuma se llenaron con 100 ml de caldo de fermentación y se esterilizaron durante 20 minutos a 120°C, después de lo cual se añadió a cada matraz 1 ml de una solución que contenía 5000 UI/ml de penicilina y 5 mg/ml de estreptomina, después de enfriar a la temperatura ambiente.

EJEMPLO 1

Fermentación de *Aspergillus niger*

35 La asparaginasa codificada por la secuencia de nucleótidos como se proporciona en esta memoria se obtuvo por construcción de plásmidos de expresión que contenían la secuencia de DNA, transformación de una cepa de *A. niger* con este plásmido y cultivo de las cepas de *Aspergillus niger* de la manera siguiente.

40 Se inocularon esporas recientes (10^6 - 10^7) de cepas de *A. niger* en 20 ml de medio CSL (matraz de 100 ml, placa de separación) y se cultivaron durante 20-24 horas a 34°C y 170 rpm. Después de inoculación de 5-10 ml de precultivo de CSL en 100 ml de medio CSM (matraz de 500 ml, placa de separación), se fermentaron las cepas a 34°C y 170 rpm durante 3-5 días.

45 Se obtuvieron sobrenadantes exentos de células por centrifugación en tubos Greiner de 50 ml (30 minutos, 5000 rpm, 4°C), y todos los pasos subsiguientes se realizaron en hielo. Los sobrenadantes se filtraron previamente sobre un filtro de microfibras de vidrio Whatman GF/A (150 mm \varnothing) para eliminar las partículas más gruesas, se ajustaron a pH 5 con KOH 4 N (en caso necesario) y se filtraron en condiciones estériles sobre un filtro de 0,2 μm ("bottle-top") con succión a fin de eliminar el material fúngico. Los sobrenadantes se guardaron a 4°C (o a -20°C).

Medida del contenido de asparaginasa de *Aspergillus niger* en el ultra-filtrado y actividad de asparaginasa

Paso 1 - Preparación de ultrafiltrados

Los sobrenadantes de los cultivos obtenidos en el Ejemplo 1, se sometieron a ultrafiltración para obtener

una concentración mayor de enzima y eliminar los contaminantes de baja molecularidad que podían interferir con las determinaciones de la actividad enzimática y los tests de horneado. Las ultrafiltraciones de 300 ml de sobrenadante se realizaron en un sistema Millipore Labscale TFF equipado con un filtro que tenía un punto de corte de 10 kDa.

5 Dependiendo de su color y volumen, las muestras se lavaron 3-5 veces con 10-30 ml de agua desmineralizada fría. Los volúmenes finales de las soluciones enzimáticas eran 10-30 ml, y se hace referencia a los mismos ulteriormente como "ultrafiltrados".

Paso 2 – Determinación de la concentración de asparaginasa por A280 y HPSEC

10 La concentración de la asparaginasa de *Aspergillus niger* en el ultrafiltrado se calculó a partir de la extinción a 280 nm (A280) atribuible a la asparaginasa y el coeficiente de extinción molecular calculado de la asparaginasa. La medida de la A280 se realizó en un espectrofotómetro Uvikon XL Secomam (Beun de Ronde, Abcoude, Países Bajos).

15 El coeficiente de extinción molar de una enzima puede calcularse a partir del número de residuos tirosina, triptófano y cisteína por molécula de enzima (S.C. Gill y P.H. von Hippel, Anal. Biochem. 182, 319-326 (1989)). Los coeficientes de extinción molar de estos aminoácidos son 1280, 5690 y 120 M⁻¹.cm⁻¹, respectivamente. El número de residuos tirosina, triptófano y cisteína en la asparaginasa de *Aspergillus niger* de la invención puede deducirse de las secuencias proteínicas que se dan en SEQ ID NO: 3. El coeficiente de extinción calculado de la asparaginasa de *Aspergillus niger* de la invención se da en la Tabla 2.

Tabla 2. Coeficiente de extinción de la asparaginasa de *A. niger*

Enzima	SEQ ID NO:	# Aminoácidos			M.V. calculado (Da)	Coeficiente de extinción calculado a 280 nm	
		Trp	Tyr	Cys		M ⁻¹ .cm ⁻¹	(1 mg/ml) ⁻¹ .cm ⁻¹
Asparaginasa	3	0	9	2	39584	11760	0,3

20 La extinción del ultrafiltrado a 280 nm (A280) que es atribuible a la asparaginasa depende de la pureza de la muestra de enzima. Esta pureza se determinó utilizando HPSEC (Cromatografía de Alta Resolución con Exclusión de Tamaños) con una columna TSK SW-XL (300*7,8 mm; intervalo de MW 10-300 kDa). El tapón de elución consistía en tampón de fosfato de sodio 25 mM de pH 6,0 y se utilizó a un caudal de 1 ml/min. Se inyectaron muestras de 5-100 µl. Se midió la absorbancia a 280 nm.

25 La A280 en el ultrafiltrado atribuible a la asparaginasa de la invención se obtuvo a partir de la relación de la superficie de pico del pico de asparaginasa respectivo en el cromatograma y la superficie total de los picos que absorbían a 280 nm. La concentración de la asparaginasa en el ultrafiltrado se calculó luego multiplicando la A280 del ultrafiltrado por la relación arriba descrita y dividiendo por 0,3 (el coeficiente de extinción calculado) para cada asparaginasa. La solución contenía 40 mg proteína/ml.

30 Paso 3 – Determinación de la actividad de asparaginasa

La solución de asparaginasa de *Aspergillus niger* exhibía una actividad de 40.000 U/ml a pH 5,5. Por consiguiente, puede calcularse una actividad específica de 1.000 unidades/mg de proteína teniendo en cuenta el contenido de proteína de 40 mg/ml.

EJEMPLO 2

35 pH óptimo de la asparaginasa de *Aspergillus niger*

En este ejemplo se midió la actividad a diversos valores de pH. Para mantener constante el valor de pH y corregir por el efecto del tampón, se realizaron varias medidas de la actividad de asparaginasa para los mismos valores de pH en tampones diferentes.

Se utilizaron tres tampones diferentes para medir la actividad de asparaginasa en el intervalo de pH de 5 a

9:

1. tampón ácido cítrico/fosfato (pH 5-6,2);
2. tampón de fosfato (pH 8,5-7,6), y
3. tampón Tris (pH 7,2-8,9).

5 La concentración de sustrato era asparagina 17,2 mM. En la Tabla 3 se representa la actividad de asparaginasa frente al pH para la asparaginasa obtenida de *A. niger*.

Tabla 3. Actividad de la asparaginasa de *Aspergillus niger* para diversos valores de pH medida en tampones adecuados. Las concentraciones finales en el ensayo enzimático para los tampones de ácido cítrico, fosfato y Tris(hidroximetil)aminometano son respectivamente 0,05, 0,1 y 0,025 M.

Valor de pH	Actividad de asparaginasa (expresada en U/ml)		
	Tampón ácido cítrico/fosfato	Tampón de fosfato	Tampón Tris
5,0	45700	-	-
5,2	38000	-	-
5,4	40600	-	-
5,6	30500	-	-
5,8	26800	24200	-
6,0	31900	23000	-
6,2	23900	21800	-
6,8	-	14400	-
7,2	-	8600	11300
7,6	-	-	8700
8,0	-	-	6400
8,4	-	-	4200
8,9	-	-	2600

10

Como se observa por los datos, esta asparaginasa de *Aspergillus niger* es muy adecuada para aplicaciones de horneado, dado que la enzima exhibe una actividad enzimática relativamente alta para el valor de pH de la masa, que es aproximadamente 5,5.

EJEMPLO 3

15 **Valores K_M y V_{max} para las asparaginastas de *Escherichia coli* y *Aspergillus niger***

Se realizó la determinación de K_M y V_{max} a pH 5,5 y a 37°C, por medida de la actividad de asparaginasa de las asparaginastas de *Escherichia coli* o *Aspergillus niger*, respectivamente. En la Tabla 4 se resumen los resultados de estas medidas.

Tabla 4. K_M y V_{max} de las asparaginastas de *Escherichia coli* o *Aspergillus niger*

Origen de la asparaginasa	V_{max} (U/mg)	K_M (mM)
<i>E. coli</i>	300 +/- 30	1,4 +/- 0,6
<i>A. niger</i>	1100 +/- 40	2,4 +/- 0,3

20

La asparaginasa de *A. niger* exhibe una actividad significativamente mayor que la asparaginasa de *E. coli*.

EJEMPLO 4

Preparación de pan de tipo barra y efecto de la asparaginasa de *Erwinia*, *Escherichia coli* y *Aspergillus niger* sobre el nivel de acrilamida en la corteza y la miga

25 Se preparó una masa a partir de 2000 g de harina (100%), 1040 ml de agua (57%), 44 g de levadura Konings reciente, 40 g de sal (5%), 136 mg de ácido ascórbico (68 ppm) y las cantidades indicadas de asparaginasa de *Erwinia* (Sigma) o *Aspergillus niger* de acuerdo con la invención. Se mezclaron los ingredientes para formar una

5 masa por medio de un mezclador espiral Diosna SP12, (2 minutos a la velocidad 1, seguidos por un tiempo de mezcla a la velocidad 2 hasta que se alcanza un aporte total de energía de 85 wh). Después de esto, se testó la masa total respecto a desprendimiento de burbujas en durante 15 minutos a 32°C. Subsiguientemente, se redondearon a mano piezas de masa de 350 g y se sometieron al test de desprendimiento de burbujas durante 15 minutos a 32°C. A continuación, las piezas de masa se redondearon y se moldearon, seguidos por un test final de desprendimiento de burbujas 75 minutos. Después de dicho test, se practicaron incisiones a lo largo de la superficie superior de las piezas de masa con una profundidad de 1 cm. Se tomó una muestra de la masa inmediatamente antes de la horneado para determinar el contenido de acrilamida. Las piezas de masa se cocieron en un horno a 240°C durante 30 minutos.

10 Después de ello, se tomaron muestras de la corteza (los 2 mm exteriores) y se analizaron respecto a acrilamida como se ha descrito arriba. La corteza se tomó del lado superior del pan de barra, y se seleccionó aquella parte de la corteza que exhibía un color pardo medio, no demasiado oscura y no demasiado blanca. Para la determinación de acrilamida, se muestra el valor medio de 2 medidas de una hogaza y dos hogazas para cada condición, en las Tablas 5, 6 y 7 a continuación.

15 *Tabla 5. Efecto de varios tipos de asparaginasas sobre la formación de acrilamida en el pan*

	Origen de la Asparaginasa	Asparaginasa (ppm)	Acrilamida (ppb) en la corteza
Hogaza 1		0	74
Hogaza 2	Erwinia	1,75	51
Hogaza 3	E. col!	1,00	60
Hogaza 4	A. niger	0,20	60

Por la tabla anterior puede deducirse la conclusión de que el uso de varios tipos de asparaginasas, con inclusión de la nueva ASPA01 tiene un efecto de disminución de la cantidad de acrilamida formada en la corteza.

Tabla 6. Efecto de la cantidad de asparaginasa de Erwinia sobre la formación de acrilamida

	Asparaginasa (ppm)	Acrilamida (ppb) en la corteza
Masa	0	< 30
Hogaza 1	0	74
Hogaza 5	0,0875	66
Hogaza 6	0,25	59
Hogaza 2	1,75	51

20 Por la tabla anterior puede llegarse a la conclusión de que el aumento de la cantidad de asparaginasa reduce la cantidad de acrilamida formada en la corteza.

EJEMPLO 5

Efecto de la asparaginasa sobre el nivel de acrilamida en panes de barra con asparagina añadida

25 Se prepararon masa, hogazas y muestras de la misma manera que en el Ejemplo 4, añadiendo L-asparagina (Sigma) a la masa en el mismo paso en que se añadía la asparaginasa, en las cantidades indicadas en la Tabla 7. Se determinó la acrilamida en las muestras resultantes, cuyos resultados se pueden encontrar a continuación.

Tabla 7. El efecto de la adición suplementaria de asparagina sobre la formación de acrilamida en la corteza

	L-asparagina añadida (ppm)	Origen de la asparaginasa	Asparaginasa (ppm)	Acrilamida (ppb) en la corteza
Hogaza 1	0	-	0	74
Hogaza 7	600	-	0	1265
Hogaza 8	600	Erwinia	0.2	482
Hogaza 9	600	A. niger	2	159
Hogaza 10	600	A. niger	5	105
Hogaza 11	600	A. niger	10	80
Hogaza 12	1500	-	0	5095
Hogaza 13	1500	Erwinia	0.5	3790

Por la Tabla 7 puede llegarse a la conclusión de que la adición del aminoácido asparagina al pan aumenta significativamente el contenido de acrilamida en la corteza del pan. Esto puede sin embargo reducirse de nuevo con el uso de asparaginasa.

EJEMPLO 6

Efecto de diversos parámetros sobre el nivel de acrilamida en la corteza

Se preparó una masa a partir de 2000 g de harina de trigo entera (100%) (Linde®-Meneba, Holanda) o harina blanca normal (Kolibri®-Meneba, Holanda), 1140 ml de agua (57%), 47 g de Koningsgist® reciente, 40 g de sal (1,75%), 136 mg de ácido ascórbico (34 ppm) y las cantidades indicadas de L-asparagina (Sigma) y asparaginasa ASPA01 obtenida de *Aspergillus niger*. Se mezclaron los ingredientes para dar una masa con ayuda de un mezclador espiral Diosna SP12, (2 minutos a la velocidad 1, seguidos por un tiempo de mezcla a la velocidad 2 hasta que se alcanza un consumo total de energía de 85 wh). Después de esto, la masa completa se sometió al test de desprendimiento de burbujas durante 15 minutos a 32°C. Subsiguientemente, se redondearon piezas de la masa de 350 g a mano y se sometieron al test de desprendimiento de burbujas de gas durante 15 minutos a 32°C. A continuación, las piezas de masa se redondearon y se moldearon, seguido por un test final de desprendimiento de burbujas de gas de 90 minutos. Después del test de desprendimiento de burbujas de gas, se practicaron incisiones a lo largo de la superficie superior de las masas con una profundidad de 1 cm. Las piezas de masa se cocieron en un

Se utilizaron tres procesos de horneado

1. 30 minutos a 240°C

2. 20 minutos a 300°C

3. 20 minutos a 320°C

Después del horneado, se tomaron muestras de la corteza del pan como se indica en el Ejemplo 4. Los resultados del análisis de acrilamida de las muestras se dan a continuación. La cantidad de acrilamida en la masa se midió inmediatamente antes que tuviera lugar el horneado. Cada cifra es un valor medio de dos medidas de una hogaza y para cada condición.

Tabla 8. El efecto del proceso de horneado sobre la cantidad de acrilamida formada en la corteza de pan basado en harina normal, sin adición de asparagina ni asparaginasa

Número de hogaza	Proceso de horneado	Acrilamida en la corteza (ppb)
1	1	74
14	2	85
15	3	175

De la Tabla 8 puede deducirse que la formación de acrilamida depende del proceso de horneado aplicado. En un proceso de horneado caliente y breve, la formación de acrilamida en la corteza es significativamente mayor

que cuando el horneado se efectúa a una temperatura inferior. El proceso de horneado 3 dio como resultado una hogaza muy oscura. Por esta razón, no se realizaron experimentos ulteriores para esta condición de horneado.

Tabla 9. El efecto del tipo de harina sobre el nivel de acrilamida en la corteza del pan, para el proceso de horneado 1, sin adición de asparagina ni asparaginasa

Número de hogaza	Tipo de harina	Acrilamida en la corteza (ppb)
1	Normal	74
16	Trigo entero	227

5

Por la Tabla 9 está claro que el tipo de harina tiene efecto sobre la cantidad de acrilamida formada.

Tabla 10. El efecto del azúcar sobre el nivel de acrilamida en la corteza del pan basado en harina normal y el efecto de una cantidad incrementada de acrilamida sobre la eficiencia de la asparaginasa de *A. niger*.

Número de hogaza	Proceso de horneado	Sacarosa añadida (g/kg harina)	Asparagina añadida (ppm)	Asparaginasa de <i>Aspergillus niger</i> (ppm)	Acrilamida en la corteza (ppb)
1	1	0	0	0	74
17	1	250	0	0	220
18	1	250	0	5	110
19	1	250	600	0	847
20	1	250	600	5	97
14	2	0	0	0	85
21	2	250	0	0	161
22	2	250	0	5	120
23	2	250	600	0	1001
24	2	250	600	5	132

10 La presencia de azúcar estimulaba la formación de acrilamida. Si se añadía adicionalmente asparagina, este efecto era mayor aún. Cuando se añadió asparaginasa de *Aspergillus niger* a este sistema de masa rica en azúcar, el nivel de acrilamida en la corteza del pan se reducía significativamente. Sorprendentemente, para las hogazas relativamente ricas en acrilamida, la reducción de acrilamida es mucho mayor si bien se utiliza la misma cantidad de asparaginasa procedente de *Aspergillus niger*.

15 EJEMPLO 7

Preparación de torta de miel holandesa

La preparación de torta de miel holandesa tuvo lugar en dos fases. En la primera fase se preparó una premezcla batida como sigue: se añadieron 4 kg de Koekzoet® (Atlanta Dethmers B.V., Groningen-Holanda) y 500 g de torta de miel holandesa fragmentada a 2 litros de agua y se calentaron hasta que se alcanzó una temperatura de 116°C. Se añadieron 5 kg de harina de centeno y se mezcló el todo hasta que la mezcla batida era lisa. A continuación, se enfrió la masa y se guardó a la temperatura ambiente durante 1-2 días.

20 Por cada 2750 gramos de esta premezcla batida se añadieron los ingredientes siguientes: 500 gramos de Koekzoet®, 27,5 g de especias de cocina para miel holandesa tamizadas, 22 g de polvo de horneado Karam® tamizado, 16,5 g de polvo de horneado Vulkan® (todos ellos de Atlanta Dethmers). Adicionalmente, se añadieron 25 diversas cantidades de asparaginasa de *Aspergillus niger*, con una actividad enzimática de 40.000 U/ml. La actividad enzimática se midió de acuerdo con el Ejemplo 1, a pH 5,5).

Esta mezcla se mezcló a 104 rpm durante 6 minutos en un mezclador Diosna tipo SD12 (Diosna, Dierks &

Söhne, Osnabrück-Alemania). Se pesan 3250 g de mezcla batida, se humedecen exteriormente y se extienden en una bandeja de pasteles. A continuación, se incubó la mezcla batida a 30°C durante 105 minutos. Después de ello, se horneó la mezcla batida a 180°C durante 60 minutos. Muestras de la capa exterior y el lado interior ("miga") de la torta de miel holandesa se analizaron en cuanto a la presencia de acrilamida.

5 Después del horneado, se tomaron muestras de la corteza (los 2 mm exteriores) y la miga (desde el centro de la torta), y se analizaron en cuanto a acrilamida como se ha descrito arriba. Para la muestra de corteza, la corteza se tomó del lado superior de la torta, seleccionando aquella parte de la corteza que exhibía un color intermedio.

Tabla 11. El contenido de acrilamida y el efecto de diversas dosificaciones de *Aspergillus niger* en la corteza y la miga de la torta de miel holandesa.

Asparaginasa añadida (mg)	Acrilamida en la muestra (ppb)		Reducción de acrilamida (%)*	
	Corteza	Miga	Corteza	Miga
Referencia	1077	3411		
40	75	172	93	95
100	85	158	92	95
200	74	156	93	95

10

* la reducción de acrilamida se calculó por la fórmula siguiente:

$$\text{Reducción de acrilamida} = \frac{\text{contenido de acrilamida en asparaginasa} - \text{torta tratada}}{\text{contenido de acrilamida de la referencia}} \times 100\%$$

15

Como se muestra en este ejemplo, la adición de asparaginasa de *Aspergillus niger* reducía el contenido de acrilamida a 5% en comparación con las tortas de miel holandesa que no se habían tratado. Adicionalmente, es sorprendente que en la torta de miel holandesa se encuentre un nivel elevado de acrilamida en la miga. En todos los experimentos realizados con pan, la cantidad de acrilamida en la miga era inferior al límite de detección del análisis de acrilamida (< 30 ppb), aun cuando se añadieran asparagina o azúcar.

20

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DSM IP Assets B.V.

<120> NUEVO PROCESO DE PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS

<130> 21401WO

<160> 3

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 3223

<212> DNA

<213> Aspergillus niger

<400> 1

tggggggaac	ttgcatctga	gagcatcata	ctagtacta	ctactactac	tacttgccga	60
tgaataaaca	tcctgcttgt	actacgcata	gccgtcttgc	tgacatggag	atatattttg	120
ggctccgaga	gttttgatag	cagtagccaa	ttaactagta	gatgctagta	ctactctagt	180
aatttggggg	cgaatggtga	atccagctca	tgccaattga	catctggaga	tctccacgag	240
acaacgagat	aagatgaaat	attgctgtca	tgggtgataa	ctagatgctt	cgagaaggat	300
tcttgaggat	tgccctcatcg	catgggataa	tatcacccctc	gggtggacct	tcccggctgt	360
tggggcttat	cgtggaagag	tcaccccgga	tatcgggtggg	ccaagccctt	tatcaatcat	420
catcctatca	gtttccaccc	acaagatagc	ctatggacc	tgattccctt	ctagccacag	480
agactagtac	tagtctatca	tgtcgactcc	atgtggagaa	accctgataa	gaccatgtgg	540
aggaggagat	agcaagcctc	cacagaaaca	atatcatctc	cacctgcaat	caoggttggg	600
ttccgaatac	acccgcccgc	tggcaagcac	atgggtata	aaatgctgaa	accaggcaag	660
atgaattgga	agagaagcca	gcagagacca	tcgcatccgt	cttcatcatg	cctctcaagc	720
cgattctcct	gtctgccctg	gccagtctcg	cctcggcctc	tccgctgctc	tactcgcgga	780
ccaccaatga	aacctctcgtc	ttcaccaatg	ccaatggcct	caacttcacc	cagatgaaca	840
ccaccctgcc	gaacgtgacc	attttcgcaa	cggttaggtg	gaccgagtat	acctcaggtg	900
gtgcgaccga	tāgftaaccg	caactcacag	gtggtaccat	cgcgggctcc	gattccagct	960
caaccgccac	gaccggctac	acctccggag	cagtcggggg	cctgtccctc	atcgatgcgg	1020
tgccatccat	gctggatgtg	gccaatgttg	ccggcgtcca	ggtggccaac	gtgggaagcg	1080
aggatatcac	ctctgacatc	ctgatttcca	tgtccaagaa	gctgaaccgc	gttgatgtg	1140
aggaccggac	catggccggg	gctgtcatca	cccacggcac	cgacaccctc	gaggagactg	1200
ccttcttctc	ggacgccact	gtcaactgtg	gcaagccaat	tgtcatcgtg	ggtgccatgc	1260
gccatccac	ggccatctca	gctgacgggc	ccttcaatct	gctcgaagcc	gtgacgggtg	1320
ctgcctccac	gtcggcgcgc	gatcgcgggtg	ccatggtggt	catgaacgat	cgcatgacct	1380
cggcctacta	tgtgaccaag	accaatgcc	acactatgga	caccttcaag	gccatggaga	1440
tgggtacct	tggcgagatg	atctccaaca	cccctttctt	cttctaccg	cccgtaagc	1500
caaccggtaa	ggtggccttt	gacatcacca	acgtgactga	gatcccccg	gtggacattc	1560
tgtttctta	tgaggacatg	cacaacgaca	ccctctacaa	cgccatctcc	agtggtgccc	1620
agggaattgt	ggtgagtgtg	atctccttga	tctctctcta	taaaacttgg	aatggacgct	1680
gatgagaata	gattgcccgg	gctggtgctg	gaggcgtcac	aacctccttc	aatgaggcta	1740
tcgaggatgt	catcaaccgt	ttggagatcc	ctgtcgtgca	gagtatgogc	acagtcaatg	1800
gggaagtgcc	actgtcagac	gtgagcagcg	acaccgccac	ccacatcgcc	agtggatacc	1860
taaacccgca	gaagtcccgc	atctgtttg	gattgctgct	atcccagggg	aagaatatca	1920
ccgaaatcgc	tgacgtgttt	gctctgggca	cggatgcgta	ggtgtcgata	gaaccattgt	1980
atataataat	gaccggatat	tatgatcatg	atagattgca	atagaaagtg	actggataca	2040
catcagcaaa	ggataccgag	ttttgccctc	aggcgttcgt	agaaaaagtg	tatcctactg	2100
aagatcatga	atcatgtctt	atcttctggc	cccctcgtat	ccaggggtgt	ggacatgcag	2160
ggtgctttgc	gtctgaagga	tccgagatca	aattgacacg	agccagagtc	tgatacatcc	2220
ataatagtgg	gtatatttga	agtcatttga	tagtccttgt	ttgtgtcggg	caattggggt	2280

ES 2 331 068 T5

```

agctagggcc tggcttggtg gcataatcgtt ggactaatag atggtagttc aattaccgac 2340
gggactgtct cccgccatta ttctcacaat tcttatcagc acattttccc tgtcgcgctt 2400
ggatctgcaa tatttatttc cctcgtcatc acattcccac gaaaagacca tccagacatc 2460
ttgctcggta ttctggaccg taagactgtt ttgaaaggca aatgtaaagc gtgattggtc 2520
gacgtcaagc ctgaccaatc tagtaagctg gtcttacttt ggggtgtagac ggaggtatta 2580
ggtagtatta aggagctag ttcgcctgca ttaccacca ggcgaggcac gccactgctg 2640
atcaggcgcg aatggaacg aagtgcgagg tccacttaac atgatgcgcy cggatactaa 2700
ggcgaccaag accctggatt gatcgtatg attcgcggaa ccccgcgggt tcttcacggc 2760
tttcgataac gcaggattgg atcctcccag cctcgtctct gcaagtggga ccctgaaggg 2820
ctctcctgca cgtcattact cagacactcc catcttttgc ttatttgcaa tgaatcttat 2880
gggctgaccc tcagctcggc gtgggatgcc tgaatcgttg gtgaaagtct atttgagcaa 2940
tcctagcctg ctggtagagg cggatgatta taataatcaa agcaccctat cgtaaggatg 3000
aaggcttgtc cctggtcaac catcactctg gttattgact agttgtggtt gggagacagc 3060
tgaagccat tgtcggtaat cgtccccaaa gaatctgccc ctgcatcatg gagtcaggaa 3120
agaccgggtt tcgcacggtc gcagaaccgc atccaacag tctagttaga ggaggggtag 3180
ggatactcat ccgtctattg tgtatatctg caacgactaa tgt 3223

```

```

<210> 2
<211> 1137
<212> DNA
<213> Aspergillus niger

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1137)

```

```

<400> 2
atg cct ctc aag ccg att ctc ctg tct gcc ctg gcc agt ctc gcc tcg 48
Met Pro Leu Lys Pro Ile Leu Leu Ser Ala Leu Ala Ser Leu Ala Ser
1 5 10 15
gcc tct ccg ctg ctc tac tcg cgg acc acc aat gaa acc ttc gtc ttc 96
Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Ser Arg Thr Thr Asn Glu Thr Phe Val Phe
20 25 30
acc aat gcc aat ggc ctc aac ttc acc cag atg aac acc acc ctg ccg 144
Thr Asn Ala Asn Gly Leu Asn Phe Thr Gln Met Asn Thr Thr Leu Pro
35 40 45
aac gtg acc att ttc gca acg ggt ggt acc atc gcg ggc tcc gat tcc 192
Asn Val Thr Ile Phe Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly Ser Asp Ser
50 55 60
agc tca acc gcc acg acc ggc tac acc tcc gga gca gtc ggg gtc ctg 240
Ser Ser Thr Ala Thr Thr Gly Tyr Thr Ser Gly Ala Val Gly Val Leu
65 70 75 80
tcc ctc atc gat gcg gtg cca tcc atg ctg gat gtg gcc aat gtt gcc 288
Ser Leu Ile Asp Ala Val Pro Ser Met Leu Asp Val Ala Asn Val Ala
85 90 95
ggc gtc cag gtg gcc aac gtg gga agc gag gat atc acc tct gac atc 336
Gly Val Gln Val Ala Asn Val Gly Ser Glu Asp Ile Thr Ser Asp Ile
100 105 110
ctg att tcc atg tcc aag aag ctg aac cgc gtt gta tgt gag gac ccg 384
Leu Ile Ser Met Ser Lys Lys Leu Asn Arg Val Val Cys Glu Asp Pro
115 120 125
acc atg gcc ggt gct gtc atc acc cac ggc acc gac acc ctc gag gag 432
Thr Met Ala Gly Ala Val Ile Thr His Gly Thr Asp Thr Leu Glu Glu
130 135 140
act gcc ttc ttc ctg gac gcc act gtc aac tgt ggc aag cca att gtc 480
Thr Ala Phe Phe Leu Asp Ala Thr Val Asn Cys Gly Lys Pro Ile Val

```


ES 2 331 068 T5

Asn Val Thr Ile Phe Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly Ser Asp Ser
 50 55 60
 Ser Ser Thr Ala Thr Thr Gly Tyr Thr Ser Gly Ala Val Gly Val Leu
 65 70 75
 Ser Leu Ile Asp Ala Val Pro Ser Met Leu Asp Val Ala Asn Val Ala
 85 90 95
 Gly Val Gln Val Ala Asn Val Gly Ser Glu Asp Ile Thr Ser Asp Ile
 100 105 110
 Leu Ile Ser Met Ser Lys Lys Leu Asn Arg Val Val Cys Glu Asp Pro
 115 120 125
 Thr Met Ala Gly Ala Val Ile Thr His Gly Thr Asp Thr Leu Glu Glu
 130 135 140
 Thr Ala Phe Phe Leu Asp Ala Thr Val Asn Cys Gly Lys Pro Ile Val
 145 150 155 160
 Ile Val Gly Ala Met Arg Pro Ser Thr Ala Ile Ser Ala Asp Gly Pro
 165 170 175
 Phe Asn Leu Leu Glu Ala Val Thr Val Ala Ala Ser Thr Ser Ala Arg
 180 185 190
 Asp Arg Gly Ala Met Val Val Met Asn Asp Arg Ile Ala Ser Ala Tyr
 195 200 205
 Tyr Val Thr Lys Thr Asn Ala Asn Thr Met Asp Thr Phe Lys Ala Met
 210 215 220
 Glu Met Gly Tyr Leu Gly Glu Met Ile Ser Asn Thr Pro Phe Phe Phe
 225 230 235 240
 Tyr Pro Pro Val Lys Pro Thr Gly Lys Val Ala Phe Asp Ile Thr Asn
 245 250 255
 Val Thr Glu Ile Pro Arg Val Asp Ile Leu Phe Ser Tyr Glu Asp Met
 260 265 270
 His Asn Asp Thr Leu Tyr Asn Ala Ile Ser Ser Gly Ala Gln Gly Ile
 275 280 285
 Val Ile Ala Gly Ala Gly Ala Gly Gly Val Thr Thr Ser Phe Asn Glu
 290 295 300
 Ala Ile Glu Asp Val Ile Asn Arg Leu Glu Ile Pro Val Val Gln Ser
 305 310 315 320
 Met Arg Thr Val Asn Gly Glu Val Pro Leu Ser Asp Val Ser Ser Asp
 325 330 335
 Thr Ala Thr His Ile Ala Ser Gly Tyr Leu Asn Pro Gln Lys Ser Arg
 340 345 350
 Ile Leu Leu Gly Leu Leu Leu Ser Gln Gly Lys Asn Ile Thr Glu Ile
 355 360 365
 Ala Asp Val Phe Ala Leu Gly Thr Asp Ala
 370 375

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polinucleótido aislado que codifica una asparaginasa hibridable en condiciones de alta severidad al complemento de un polinucleótido de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 y que es homólogo al menos en un 80% a un polinucleótido de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
- 2- Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 1 que puede obtenerse a partir de un hongo filamentoso.
3. Un polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 2 que puede obtenerse a partir de *Aspergillus niger*.
- 10 4. Un polinucleótido aislado que codifica una asparaginasa que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o equivalentes funcionales de la misma, que tienen la actividad de asparaginasa y que son homólogos al menos en un 80% a SEQ ID NO: 3.
5. Un polinucleótido aislado que codifica al menos un dominio funcional que tiene actividad de asparaginasa de una asparaginasa que comprende una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 o equivalentes funcionales de la misma, que tiene actividad de asparaginasa y que es al menos homólogo en un 80% a SEQ ID NO: 3.
- 15 6. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o equivalentes funcionales de la misma que es al menos 80% homólogo a SEQ ID NO: 1 ó 2, que codifica una asparaginasa.
7. Un polinucleótido aislado constituido por SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
8. Un vector que comprende una secuencia de polinucleótidos de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7.
- 20 9. Un vector de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicha secuencia de polinucleótidos de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7 está enlazado operativamente con secuencias reguladoras adecuadas para la expresión de dicha secuencia de polinucleótidos en una célula hospedadora adecuada.
10. Un vector de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicha célula hospedadora adecuada es un hongo filamentoso.
- 25 11. Un método para fabricar un polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o un vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-10 que comprende los pasos de cultivar una célula hospedadora transformada con dicho polinucleótido o dicho vector y aislar dicho polinucleótido o dicho vector de dicha célula hospedadora.
- 30 12. Una asparaginasa aislada con una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 o equivalentes funcionales de la misma que tiene(n) actividad de asparaginasa y que es/son al menos 80% homólogos a SEQ ID NO: 3.
13. Una asparaginasa aislada de acuerdo con la reivindicación 12, que puede obtenerse a partir de *Aspergillus niger*.
14. Una asparaginasa aislada que puede obtenerse por expresión de un polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o un vector de acuerdo con la reivindicaciones 8-10 en una célula hospedadora adecuada, v.g. *Aspergillus niger*.
- 35 15. Asparaginasa recombinante que comprende un dominio funcional que tiene actividad de asparaginasa de una cualquiera de las asparaginasas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12-14.
16. Un método para fabricar una asparaginasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12-15 que comprende los pasos de transformar una célula hospedadora adecuada con un polinucleótido aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o un vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, cultivar dicha célula en condiciones que permitan la expresión de dicho polinucleótido, y opcionalmente purificar el polipéptido codificado a partir de dicha célula o medio de cultivo.
- 40 17. Una célula hospedadora recombinante en la cual o en un antepasado de la cual se ha introducido, por medio de técnicas de DNA recombinante, un polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o un vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-10.
- 45 18. Una célula hospedadora recombinante de acuerdo con la reivindicación 17 que expresa un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12-15.
19. Proceso para la producción de un producto alimenticio que implica al menos un paso de calentamiento, que comprende añadir una asparaginasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12-15 a una forma

intermedia de dicho producto alimenticio en dicho proceso de producción, en el cual la asparaginasa se añade antes de dicho paso de calentamiento en una cantidad que es eficaz para reducir el nivel de asparagina que está presente en dicha forma intermedia de dicho producto alimenticio, estando implicada la asparagina en la formación de acrilamida durante dicho paso de calentamiento.

5 20. Proceso de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el producto alimenticio está hecho de al menos una materia prima de origen vegetal.

21. Proceso de acuerdo con la reivindicación 20, en donde la materia prima de la planta es harina de cereales, preferiblemente harina de trigo o patata.