



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 293 012**

(51) Int. Cl.:

**A23L 1/03** (2006.01)

**A21D 8/04** (2006.01)

**A23L 1/217** (2006.01)

**A23L 1/105** (2006.01)

**C12N 9/82** (2006.01)

**C12N 15/52** (2006.01)

(12)

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **03753343 .7**

(86) Fecha de presentación : **10.10.2003**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1553848**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **20.07.2005**

(54) Título: **Método para preparar un producto tratado con calor.**

(30) Prioridad: **11.10.2002 DK 2002 01547**

(73) Titular/es: **Novozymes A/S  
Krogshøjvej 36  
2880 Bagsværd, DK**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.03.2008**

(72) Inventor/es: **Budolfsen, Gitte;  
Jensen, Morten, Tovborg;  
Heldt-Hansen, Hans, Peter;  
Stringer, Mary, Ann y  
Lange, Lene**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.03.2008**

(74) Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método para preparar un producto tratado con calor.

**5 Campo de la invención**

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

**10 Antecedentes de la invención**

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

D. V. Zyzak *et al.* (J. Agric. Food Chem., 2003, 51, 4782-4787) presentó un mecanismo para la formación de acrilamida a partir de la reacción del aminoácido asparragina y un compuesto con carbonilo a temperaturas de cocción típicas.

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

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

**Resumen de la invención**

Según la invención, la formación de acrilamida durante el tratamiento con calor de materia prima comprendiendo hidrato de carbono, proteína y agua se reduce al tratar la materia prima con una enzima antes del tratamiento con calor. Por consiguiente, la invención provee un polipéptido que tiene actividad asparraginasa y que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos idéntica en un 90% a la SEC ID NO: 2 (opcionalmente truncada en los residuos 27-378, 30-378, 75-378 o 80-378). La invención también provee un polinucleótido que codifica el polipéptido y un método de preparación de un producto tratado con calor, que comprende las fases secuenciales de:

- 35** a) proveer una materia prima comprendiendo hidrato de carbono, proteína y agua
- b) tratar la materia prima con el polipéptido, y
- c) tratar con calor hasta alcanzar un contenido de agua final por debajo del 35% en peso.

**Descripción detallada de la invención**

*Materia prima y tratamiento enzimático*

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

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

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

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

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

# ES 2 293 012 T3

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

## *Tratamiento con calor*

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

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

## *Producto tratado con calor*

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

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

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

## *Enzima capaz de reaccionar con asparragina o glutamina (opcionalmente sustituidas) como sustrato*

35 La enzima es capaz de reaccionar con asparragina.

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

## *Asparraginasa*

45 La asparraginasa (EC 3.5.1.1) puede ser derivada de *Aspergillus oryzae*. Tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID NO: 2 (opcionalmente truncada en los residuos 27-378, 30-378, 75-378 o 80-378), o una secuencia que es al menos idéntica en el 90% (particularmente al menos 95%). Puede ser producida usando la información genética en SEC ID NO: 1 por ejemplo, como se describe en un ejemplo.

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

## *Alineamiento e identidad*

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

60 Para los objetivos de la presente invención, los alineamientos de secuencias y el cálculo de la puntuación de identidad se hicieron usando un alineamiento Needleman-Wunsch (es decir alineamiento global), útil para tanto el alineamiento de la proteína como de ADN. Las matrices de marcado por defecto BLOSUM50 y la matriz de identidad son usadas para los alineamientos de proteína y de ADN respectivamente. La penalización para el primer residuo en un hueco es -12 para proteínas y -16 para ADN, mientras la penalización para residuos adicionales en un hueco es -2 para proteínas y -4 para ADN. El alineamiento es del paquete FASTA versión v20u6 (W. R. Pearson y D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85:2444-2448, y W. R. Pearson (1990) "Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA", Métodos en Enzimología; 183:63-98).

# ES 2 293 012 T3

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

El método de la invención puede comprender además tratar la materia prima con una oxidorreductasa capaz de reaccionar con un azúcar de reducción como sustrato. La oxidorreductasa puede ser una oxidasa o dehidrogenasa 5 capaz de reaccionar con un azúcar de reducción como sustrato tal como glucosa y maltosa.

La oxidasa puede ser una glucosa oxidasa, una piranosa oxidasa, una hexosa oxidasa, una galactosa oxidasa (EC 1.1.3.9) o una hidrato de carbono oxidasa que tiene una actividad más alta en maltosa que en glucosa. La glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4) puede ser derivada de *Aspergillus Niger* p. ej. teniendo la secuencia de aminoácidos descrita 10 en US 5094951. La hexosa oxidasa (EC 1.1.3.5) puede ser derivada de especies de algas tales como *Iridophycus flaccidum*, *Chondrus crispus* y *Euthora cristata*. La piranosa oxidasa puede ser derivada de *Basidiomycete fungi*, *Peniophora gigantean*, *Aphyllophorales*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Polyporus pinsitus*, *Bierkandera adusta* o *Phlebiopsis gigantean*. La hidrato de carbono oxidasa que tiene una actividad más alta en maltosa que en glucosa 15 puede ser derivada de *Microdochium* o *Acremonium*, p. ej. de *M. nivale* (US 6165761), *A. strictum*, *A. fusidoides* o *A. potronii*.

La dehidrogenasa puede ser glucosa dehidrogenasa (EC 1.1.1.47, EC 1.1.99.10), galactosa deshidrogenasa (EC 1.1.1.48), D-aldohexosa dehidrogenasa (EC 1.1.1.118, EC 1.1.1.119), celobiosa dehidrogenasa (EC 1.1.5.1, p. ej. de *Humicola insolens*), fructosa dehidrogenasa (EC 1.1.99.11, EC 1.1.1.124, EC 1.1.99.11), aldehído deshidrogenasa 20 (EC 1.2.1.3, EC 1.2.1.4, EC 1.2.1.5). Otro ejemplo es glucosa-fructosa oxidorreductasa (EC 1.1.99.28).

La oxidorreductasa se usa en una cantidad que es eficaz para reducir la cantidad de acrilamida en el producto final. Para la glucosa oxidasa, la cantidad puede estar en el rango de 50-20,000 (p. ej. 100-10,000 o 1,000-5,000) GODU/kg de sustancia seca en la materia prima. Una GODU es la cantidad de enzima que forma 1  $\mu\text{mol}$  de peróxido 25 de hidrógeno por minuto a 30°C, pH 5,6 (tampón de acetato) con glucosa 16,2 g/l (90 mM) como sustrato usando un período de incubación de 20 min. Para otras enzimas, la dosificación puede ser encontrada de forma similar analizando con el sustrato apropiado.

## Ejemplos

### 30 Medios

#### DAP2C-1

35            11 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O  
              1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
              2 g Ácido cítrico, monohidrato  
40            30 g maltodextrina  
              6 g K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O  
              0,5 g extracto de levadura  
45            0,5 ml solución de metales traza  
              1 ml Plurónico PE 6100 (BASF, Ludwigshafen, Alemania)  
50            Los componentes son mezclados en un litro de agua destilada y repartidos en frascos, añadiendo 250 mg de CaCO<sub>3</sub> a cada porción de 150 ml.

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

23 ml 50% p/v (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>, filtro esterilizado  
33 ml 20% ácido láctico, filtro esterilizado

60

### Solución de metales traza

65            6,8 g ZnCl<sub>2</sub>  
              2,5 g CUSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O  
              0,24 g NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O

# ES 2 293 012 T3

13,9 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

8,45 g MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O

5 3 g Ácido cítrico, monohidrato

Los componentes son mezclados en un litro de agua destilada.

## 10 *Ensayo de actividad de asparraginasa*

### *Soluciones concentradas*

15 50 mM tampón Tris, pH 8.6

189 mM Solución de L-Asparraguina

1,5 M Ácido tricloroacético (ATC)

20 Reactivo de Nessler, Aldrich Stock No. 34,514-8 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo. USA)

Asparraginasa, Sigma Stock No. A4887 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo. USA)

## 25 *Ensayo*

### *Reacción enzimática*

30 500 micro-l tampón

100 micro-l Solución de L-asparraguina

350 micro-l agua

35 son mezclados y equilibrados a 37°C.

se añaden 100 micro-l de solución enzimática y las reacciones son incubadas a 37°C durante 30 minutos.

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

Las muestras son mezcladas y centrifugadas durante 2 minutos a 20,000 g.

## 45 *Medición de amonio libre*

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

50

### *Estándar*

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

55

### Ejemplo 1

#### *Expresión de una asparraginasa de Aspergillus oryzae en Aspergillus oryzae*

60 Se generaron bibliotecas de ADNc de ARNm de *Aspergillus oryzae*, se ordenaron y almacenaron en una base de datos de ordenador como se describe en WO 00/56762.

65 Se comparó la secuencia péptida de asparraginasa de *Saccharomyces cerevisiae* (Kim, K.-W.; Kamerud, J.Q.; Livingston, D.M.; Roon, R.J., (1988) Asparraginasa II de *Saccharomyces cerevisiae*. Caracterización del gen ASP3. *J. Biol. Chem.* 263:11948), con traducciones de las secuencias de ADNc parcial de *Aspergillus oryzae* usando el programa TFASTXY , versión 3.2t07 (Pearson *et al.* Genomics (1997) 46:24-36). Se identificó una secuencia de *A. oryzae* traducida como teniendo una identidad del 52% para asparraginasa de levadura a través de un recubrimiento de 165 aminoácidos. Se determinó la secuencia completa del inserto de ADNc del clon correspondiente (depositado como

## ES 2 293 012 T3

DSM 15960) y se presentó como SEC ID NO: 1, y el péptido traducido de esta secuencia, AoASP, es presentado como SEC ID NO: 2. Esta secuencia fue usada para designar cebadores para la amplificación PCR del gen de codificación AoASP de DSM 15960, con sitios de restricción apropiados añadidos a las extremidades del cebador para facilitar la subclonación del producto PCR (cebadores AoASP7 y AoASP8, SEC ID Nos: 14 y 15). La amplificación PCR 5 fue realizada usando Extensor Hi-Fidelity PCR Master Mix (ABgene, Surrey, U.K.) siguiendo las instrucciones del fabricante y usando una temperatura de anelación de 55°C para los primeros 5 ciclos y 65°C para un ciclo adicional y un tiempo de extensión de 1,5 minutos.

10 El fragmento de PCR fue restringido con *BamHI* y *HindIII* y clonado en el vector de expresión *Aspergillus* pMStr57 usando técnicas estándares. El vector de expresión pMStr57 contiene los mismos elementos que pCaHj483 (WO 98/00529), con modificaciones menores hechas al promotor NA2 de *Aspergillus* como se describe para el vector pMT2188 en WO 01/12794, y tiene secuencias para la selección y propagación en *E. coli*, y selección y expresión 15 en *Aspergillus*. Específicamente, la selección en *Aspergillus* es facilitada por el gen *amdS* de *Aspergillus nidulans*, que permite el uso de acetamida como única fuente de nitrógeno. La expresión en *Aspergillus* es mediada por un promotor (NA2) de amilasa II neutra modificada de *Aspergillus Niger* que es fundido en la secuencia líder 5' del gen de codificación de triosa fosfato isomerasa (tpi) de *Aspergillus nidulans*, y el terminador del gen de codificación de amiloglucosidasa de *Aspergillus Niger*. El gen de codificación de asparraginasa del constructo de expresión de *Aspergillus* resultante, pMStr90, fue secuenciado y la secuencia coincidía completamente con aquella determinada 20 previamente para el inserto de DSM 15960.

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

### 25 Ejemplo 2

#### *Purificación de asparraginasa*

30 El caldo de cultivo del ejemplo precedente fue centrifugado (20000 x g; 20 min) y los sobrenadantes fueron cuidadosamente decantados de los precipitados. Los sobrenadantes combinados fueron filtrados a través de una placa Seitz EKS para eliminar el resto de las células huéspedes de *Aspergillus*. El producto filtrado por EKS fue transferido a 10 mM tris/HCl, pH 8 en una columna sephadex G25 y aplicado a una columna Q sefarosa HP equilibrada en el mismo tampón. Después del lavado de la columna Q sefarosa HP extensivamente con el tampón de equilibrado, la 35 asparraginasa fue eluida con un gradiente lineal de NaCl (0 → 0,5 M) en el mismo tampón. Se analizó la actividad de asparraginasa de las fracciones de la columna (usando el tampón Universal pH 6,0) y se agruparon las fracciones con actividad. Se añadió sulfato de amonio a la agrupación a 2,0 M de concentración final y la agrupación fue aplicada a una columna Phenyl Toyopearl S equilibrada en 20 mM de ácido succínico; 2,0 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 6,0. Después del lavado de la columna de fenilo extensivamente con el tampón de equilibrado, la enzima fue eluida con un gradiente 40 lineal (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2,0 → OM) en el mismo tampón. Se analizó de nuevo la actividad de la asparraginasa en las fracciones de la columna y se analizaron adicionalmente las fracciones activas por SDS-PAGE. Las fracciones que 45 se juzgaron que sólo contenía la asparraginasa, fueron agrupadas como la preparación purificada y fue usada para una caracterización adicional. La asparraginasa purificada fue heteroégenamente glicosilada juzgado a partir del Gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie y, además, la secuenciación de N-terminal de la preparación reveló que la preparación contenía formas de asparraginasa diferentes, ya que se hallaron cuatro N-terminales diferentes empezando en los aminoácidos A27, S30, G75 y A80 respectivamente de la SEC ID NO: 2. No obstante, la secuenciación de N-terminal también indicó que la preparación purificada fue relativamente pura pues no se hallaron otras secuencias de N-terminal por el análisis.

### 50 Ejemplo 3

#### *Propiedades de asparraginasa*

55 La asparraginasa purificada del ejemplo precedente fue usada para la caracterización.

#### *Ensayo de asparraginasa*

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

## ES 2 293 012 T3

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

35 Se colocaron 450 micro-l de sustrato de asparragina en hielo en un tubo de Eppendorf. Se añadieron 50 micro-l de una muestra de asparraginasa (diluida en 0,01% Tritón X-100). El ensayo fue iniciado transfiriendo el tubo de Eppendorf a un termomezclador Eppendorf, que fue configurado a la temperatura de ensayo. El tubo fue incubado durante 15 minutos en el termomezclador Eppendorf a su velocidad de agitación máxima (1400 rpm). La incubación fue detenida transfiriendo el tubo de nuevo al baño de hielo y añadiendo 500 micro-l de reactivo de detención. El tubo 40 fue sometido a movimiento vortical y centrifugado brevemente en una centrífuga enfriada con hielo para precipitar las proteínas en el tubo. La cantidad de amonio liberado por la enzima fue medida por el procedimiento siguiente: se transfirieron 20 micro-l de sobrenadante a una placa de microtitulación; se añadieron 200 micro-l de reactivo de amonio A y se leyó A375 (A375 (inicial)). Luego se añadieron 50 micro-l de reactivo de amonio B y después de 10 minutos a temperatura ambiente la placa fue leída de nuevo (A375 (final)). A375 (inicial) - A375 (final) fue una 45 medida de actividad asparraginasa. Se incluyó un tampón ciego en el ensayo (en vez de enzima) y la reducción en A375 en el tampón ciego fue restada de las muestras enzimáticas.

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

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

## ES 2 293 012 T3

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

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

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

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

## ES 2 293 012 T3

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

	Temp (°C)	Asparraginasa
5	15	0,24
10	25	0,39
15	37	0,60
20	50	0,81
	60	1,00
	70	0,18

### 25    *Otras características*

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

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

### Ejemplo 4

#### 35    *Efecto de asparraginasa en el contenido de acrilamida en patatas fritas*

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

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

45    La masa fue luego inicialmente comprimida durante 60 seg en una prensa para masa.

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

55    La hoja fue cortada en cuadrados de aprox 3 x 5 cm.

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

65

## ES 2 293 012 T3

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

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

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

25

### Ejemplo 5

#### *Efecto de varias enzimas en el contenido de acrilamida en patatas fritas*

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

#### 35 Receta

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

#### 45 Procedimiento de elaboración de la masa

Se mezclaron las escamas de patata y almidón de patata durante 30 seg en un mezclador a velocidad 5. La sal y la enzima son disueltas en el agua. La solución es ajustada a 30°C +/- 1°C. Se para el mezclador y se añade toda la solución de sal/enzima a la harina. La masa es adicionalmente mezclada durante 15 min.

50 Se coloca la masa en una bolsa de plástico, se cierra la bolsa y se deja reposar la masa durante 15 min a temperatura ambiente.

La masa es luego inicialmente comprimida durante 60 seg en una prensa para masa.

55 La masa es extendida en hojas y plegada en una máquina de rodillo de pasta hasta obtener masa de aprox. 5 x 10 mm. La masa es luego pasada alrededor de un rodillo y la masa es dejada reposar durante 30 min en una bolsa de plástico a temperatura ambiente. La masa es adicionalmente preparada en hojas con un espesor de hoja final de aprox 1,2 mm.

60 Se corta la hoja en cuadrados de aprox 3 x 5 cm.

Las hojas son colocadas en un cesto de freír, colocadas en el baño de aceite y fritas durante 60 seg a 180°C. Se sujetó el cesto en un ángulo de 45° y se dejó drenar el producto hasta que el aceite dejó de gotear. Se retiran los productos del cesto y se dejan enfriar en papel absorbente seco.

65

# ES 2 293 012 T3

Los resultados del análisis de acrilamida fueron los siguientes:

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

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

## Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante fue recopilada exclusivamente para la información del lector y no forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.

## Documentos de patente citados en la descripción

- |                            |                     |
|----------------------------|---------------------|
| WO 0056762 A [0004] [0037] | WO 9800529 A [0039] |
| US 5094951 A [0025]        | WO 0112794 A [0039] |
| US 6165761 A [0025]        | WO 0039322 A [0040] |

## Literatura que no son patentes citada en la descripción

E. TABEKE *et al.* *J. Agric. Food Chem.*, 2002, vol. 50, 4998-5006 [0002]

D.S. MOTTRAM; R.H. STADTLER *et al.* *Nature*, 2002, vol. 419, 448-449 [0002]

D. V. ZYZAK *et al.* *J. Agric. Food Chem.*, 2003, vol. 51, 4782-4787 [0003]

**KIM, K.-W; KAMERUD, J.Q; LIVINGSTON, D.M; ROON, R.J.** Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*, 1988, *J. Biol. Chem.*, vol. 263, 11948- [0005]

**PEARSON; D. J. LIPMAN** Improved Tools for Biological Sequence Analysis. *PNAS*, 1988, vol. 85, 2444-2448 [0023]

W. R. **PEARSON** Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA. *Methods in Enzymology*, 1990, vol. 183, 63-98 [0023]

**KIM, K.-W; KAMERUD, J.Q; LIVINGSTON, D.M; ROON, R.J.** Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*. Characterization of the ASP3 gene. *J. Biol. Chem.*, 1988, vol. 263, 11948- [0038]

**PEARSON** *et al. Genomics*, 1997, vol. 46, 24-36 [0038]

**CHRISTENSEN, T** *et al. Biotechnology*, 1988, vol. 6, 1419-1422 [0040]

**REIVINDICACIONES**

- 5        1. Polipéptido teniendo actividad asparraginasa y teniendo una secuencia de aminoácidos que es al menos idéntica en el 90% a la SEC ID NO: 2 (opcionalmente truncada en los residuos 27-378, 30-378, 75-378 ó 80-378).
- 10      2. Polipéptido según la reivindicación 1 con una secuencia de aminoácidos que es al menos idéntica en el 95% a la SEC ID No: 2 (opcionalmente truncada en los residuos 27- 378, 30-378, 75-378 ó 80-378).
- 15      3. Polinucleótido que codifica el polipéptido de la reivindicación precedente.
- 20      4. Polinucleótido que codifica una asparraginasa y que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos idéntica en el 90% a las secuencias de codificación de la SEC ID NO: 1.
- 25      5. Método para preparar un producto tratado con calor, que comprende las fases secuenciales de:
- a) proveer una materia prima que comprende hidrato de carbono, proteína y agua
  - b) tratar la materia prima con un polipéptido según cualquier reivindicación 1 ó 2, y
  - c) tratar con calor hasta alcanzar un contenido de agua final por debajo del 35% en peso.
- 30      6. Método según la reivindicación 5 que además comprende tratar la materia prima con una oxidorreductasa capaz de reaccionar con un azúcar de reducción como sustrato.
- 35      7. Método según la reivindicación 6 donde la oxidorreductasa capaz de reaccionar con un azúcar de reducción como sustrato es una glucosa oxidasa una piranosa oxidasa una hexosa oxidasa una galactosa oxidasa (EC 1.1.3.9) o un hidrato de carbono oxidasa teniendo una actividad más alta en maltosa que en glucosa.
- 40      8. Método de cualquiera de las reivindicaciones 5-7 donde la materia prima está en forma de masa y el tratamiento enzimático comprende mezclar la enzima en la masa y opcionalmente mantenerla.
- 45      9. Método de cualquiera de las reivindicaciones 5-8 donde la materia prima comprende piezas de vegetal intactas y el tratamiento enzimático comprende sumergir las piezas de vegetal en una solución acuosa de la enzima.
- 50      10. Método de cualquiera de reivindicaciones 5-9 donde la materia prima comprende un producto de patata.

55

60

65

# ES 2 293 012 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110>	Novozymes A/S	
5	<120>	Método de Preparación de un Producto Comestible
	<130>	10347-WO
	<160>	15
10	<170>	Versión PatentIn 3.2
	<210>	1
	<211>	1303
	<212>	ADN
15	<213>	<i>Aspergillus oryzae</i>
	<220>	
	<221>	CDS
	<222>	(49)..(1182)
20	<400>	1
	ccacgcgtcc gattccctac tcagagcccc gagcaaccaa gcagcagt atg ggt gtc	57
25		Met Gly Val 1
	aat ttc aaa gtt ctt gcc ctg tcg gcc tta gct act att agc cat gct	105
	Asn Phe Lys Val Leu Ala Leu Ser Ala Leu Ala Thr Ile Ser His Ala	
	5 10 15	
30	tcg cct ctc cta tat cct cga gcc aca gac tcg aac gtc acc tat gtg	153
	Ser Pro Leu Leu Tyr Pro Arg Ala Thr Asp Ser Asn Val Thr Tyr Val	
	20 25 30 35	
35	ttc acc aac ccc aat gpc ctg aac ttt act cag atg aac acc acc ctg	201
	Phe Thr Asn Pro Asn Gly Leu Asn Phe Thr Gln Met Asn Thr Thr Leu	
	40 45 50	
40	cca aac gtc act atc ttc gcg aca ggc aca atc gcg ggc tcc agc	249
	Pro Asn Val Thr Ile Phe Ala Thr Gly Thr Ile Ala Gly Ser Ser	
	55 60 65	
	gcc gac aac acc gca aca aca ggt tac aaa gcc ggt gca gtc ggc atc	297
	Ala Asp Asn Thr Ala Thr Gly Tyr Lys Ala Gly Ala Val Gly Ile	
	70 75 80	
45	cag aca ctg atc gac gcg gtc ccg gaa atg cta aac gtt gcc aac gtc	345
	Gln Thr Leu Ile Asp Ala Val Pro Glu Met Leu Asn Val Ala Asn Val	
	85 90 95	
50	gct ggc gtg caa gta acc aat gtc ggc agc cca gac atc acc tcc gac	393
	Ala Gly Val Gln Val Thr Asn Val Gly Ser Pro Asp Ile Thr Ser Asp	
	100 105 110 115	
	att ctc ctg cgt ctc tcc aaa cag atc aac gag gtg gtc tgc aac gac	441
	Ile Leu Leu Arg Leu Ser Lys Gln Ile Asn Glu Val Val Cys Asn Asp	
	120 125 130	
55	ccc acc atg gcc ggt gca gtg gtc acc cac ggc acc gac acg ctc gaa	489
	Pro Thr Met Ala Gly Ala Val Val Thr His Gly Thr Asp Thr Leu Glu	
	135 140 145	
60	gaa tcc gcc ttc ttc ctc gac gcc acg gtc aac tgt cgc tag ccc gtg	537
	Glu Ser Ala Phe Phe Leu Asp Ala Thr Val Asn Cys Arg Lys Pro Val	
	150 155 160	
	gtc atc gtc ggc gcc atg cgc cct tca acc gcc atc tcg gct gac ggc	585

## ES 2 293 012 T3

	val Ile Val Gly Ala Met Arg Pro Ser Thr Ala Ile Ser Ala Asp Gly	
165	170	175
5	ccc ctc aac ctc ctg caa tcc gtc acc gtc gec gcg agc ccc aag gcc Pro Leu Asn Leu Leu Gln Ser Val Thr Val Ala Ala Ser Pro Lys Ala	633
180	185	190
10	cga gac cgc gpc gcc ctg att gtc atg aac gac cgc atc gta tcc gcc Arg Asp Arg Gly Ala Leu Ile Val Met Asn Asp Arg Ile Val Ser Ala	681
200	205	210
15	tcc tac gcc tcc aag acg aac gcc aac acc gtc gat aca ttc aag gcc Phe Tyr Ala Ser Lys Thr Asn Ala Asn Thr Val Asp Thr Phe Lys Ala	729
215	220	225
20	atc gaa atg ggt aac ctg ggc gag gtc gtc tcc aac aaa ccc tac ttc Ile Glu Met Gly Asn Leu Gly Glu Val Val Ser Asn Lys Pro Tyr Phe	777
230	235	240
25	ttc tac ccc cca gtc aag cca aca ggc aag acg gaa gta gat atc cgg Phe Tyr Pro Pro Val Lys Pro Thr Gly Lys Thr Glu Val Asp Ile Arg	825
245	250	255
20	aac atc acc tcc atc ccc aga gtc gac atc ctc tac tca tac gaa gac Asn Ile Thr Ser Ile Pro Arg Val Asp Ile Leu Tyr Ser Tyr Glu Asp	873
260	265	270
25	atg cac aat gac acc ctt tac tcc gcc atc gac aac ggc gca aag ggc Met His Asn Asp Thr Leu Tyr Ser Ala Ile Asp Asn Gly Ala Lys Gly	921
280	285	290
30	atc gtt atc gcc ggc tcc ggc tcc ggc tcc gtc tcc acc ccc tt:c agc Ile Val Ile Ala Gly Ser Gly Ser Gly Ser Val Ser Thr Pro Phe Ser	969
295	300	305
35	gcc gcc atg gaa gac atc aca acc aza cac aac atc ccc atc gta gcc Ala Ala Met Glu Asp Ile Thr Thr Lys His Asn Ile Pro Ile Val Ala	1017
310	315	320
40	agc acg cgc acc gga aac ggg gag gtc ccg tcc tcc gcc gag tcg agc Ser Thr Arg Thr Gly Asn Gly Glu Val Pro Ser Ser Ala Glu Ser Ser	1065
325	330	335
40	cag atc gca agc ggg tat ttg aac ccc gca aag tca cgc gtt ttg ctt Gln Ile Ala Ser Gly Tyr Leu Asn Pro Ala Lys Ser Arg Val Leu Leu	1113
340	345	350
45	ggc ttg ttg ctt gcc cag ggg aag agt att gag gaa atg agg gcg gtt Gly Leu Leu Leu Ala Gln Gly Lys Ser Ile Glu Glu Met Arg Ala Val	1161
360	365	370
50	ttt gag cgg att ggg gtt gct tgatTTTTT tCTTTTCTG cttggTCTTT Phe Glu Arg Ile Gly Val Ala	1212
375		
55	gttttagggtt ggggttttgttattatagat taaggattta tggatggat ggataataga	1272
	ttatagatta tagattaagt atcgattatg g	1303

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 378

&lt;212&gt; PRT

<213> *Aspergillus oryzae*

&lt;400&gt; 2

Met Gly Val Asn Phe Lys Val Leu Ala Leu Ser Ala Leu Ala Thr Ile

## ES 2 293 012 T3

1

5

10

15

5 Ser His Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Pro Arg Ala Thr Asp Ser Asn Val  
 20 25 30

10 Thr Tyr Val Phe Thr Asn Pro Asn Gly Leu Asn Phe Thr Gln Met Asn  
 35 40 45

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

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

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

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

35 Thr Ser Asp Ile Leu Leu Arg Leu Ser Lys Gln Ile Asn Glu Val Val  
 115 120 125

40 Cys Asn Asp Pro Thr Met Ala Gly Ala Val Val Thr His Gly Thr Asp  
 130 135 140

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

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

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

60 Pro Lys Ala Arg Asp Arg Gly Ala Leu Ile Val Met Asn Asp Arg Ile  
 195 200 205

65 Val Ser Ala Phe Tyr Ala Ser Lys Thr Asn Ala Asn Thr Val Asp Thr  
 210 215 220

70 Phe Lys Ala Ile Glu Met Gly Asn Leu Gly Glu Val Val Ser Asn Lys  
 225 230 235 240

75 Pro Tyr Phe Phe Tyr Pro Pro Val Lys Pro Thr Gly Lys Thr Glu Val  
 245 250 255

80 Asp Ile Arg Asn Ile Thr Ser Ile Pro Arg Val Asp Ile Leu Tyr Ser  
 260 265 270

85 Tyr Glu Asp Met His Asn Asp Thr Leu Tyr Ser Ala Ile Asp Asn Gly

ES 2 293 012 T3

275

280

285

5 Ala Lys Gly Ile Val Ile Ala Gly Ser Gly Ser Gly Ser Val Ser Thr  
290 295 300

10 Pro Phe Ser Ala Ala Met Glu Asp Ile Thr Thr Lys His Asn Ile Pro  
305 310 315 320

15 Ile Val Ala Ser Thr Arg Thr Gly Asn Gly Glu Val Pro Ser Ser Ala  
325 330 335

20 Glu Ser Ser Gln Ile Ala Ser Gly Tyr Leu Asn Pro Ala Lys Ser Arg  
340 345 350

25 Val Leu Leu Gly Leu Leu Leu Ala Gln Gly Lys Ser Ile Glu Glu Met  
355 360 365

30 Arg Ala Val Phe Glu Arg Ile Gly Val Ala  
370 375

35

40

45

50

55

60

65