



(19)



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**

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

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

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

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

(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. Stadler *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.

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:

- 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*

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).

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

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

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.

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).

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

#### *Tratamiento con calor*

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.

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

#### *Producto tratado con calor*

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 amiláceos 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.

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

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*

La enzima es capaz de reaccionar con asparragina.

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-asparragina por min a pH 8,6 a 37°C.

#### *Asparraginasa*

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.

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*

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%.

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 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 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*, *Aphyllorphorales*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Polyporus pinsitus*, *Bierkandera adusta* o *Phlebiopsis gigantean*. La hidrato de carbono oxidasa que tiene una actividad más alta en maltosa que en glucosa puede ser derivada de *Microdochium* o *Acremonium*, p. ej. de *M. nivale* (US 6165761), *A. strictum*, *A. fusidioides* o *A. potronii*.

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 (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  $\mu$ mol de peróxido de hidrógeno por minuto a 30°C, pH 5,6 (tampón de acetato) con glucosa 16,2 g/l (90 mM) como sustrato usando un período de incubación de 20 min. Para otras enzimas, la dosificación puede ser encontrada de forma similar analizando con el sustrato apropiado.

### **Ejemplos**

#### *Medios*

##### *DAP2C-1*

11 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

2 g Ácido cítrico, monohidrato

30 g maltodextrina

6 g  $\text{K}_3\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

0,5 g extracto de levadura

0,5 ml solución de metales traza

1 ml Plurónico PE 6100 (BASF, Ludwigshafen, Alemania)

Los componentes son mezclados en un litro de agua destilada y repartidos en frascos, añadiendo 250 mg de  $\text{CaCO}_3$  a cada porción de 150 ml.

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

23 ml 50% p/v  $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ , filtro esterilizado

33 ml 20% ácido láctico, filtro esterilizado

##### *Solución de metales traza*

6,8 g  $\text{ZnCl}_2$

2,5 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

0,24 g  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

## ES 2 293 012 T3

13,9 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

8,45 g  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

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-asparaguina

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 oiyzae*, se ordenaron y almacenaron en una base de datos de ordenador como se describe en WO 00/56762.

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

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

El fragmento de PCR fue restringido con *Bam*HI y *Hind*III y clonado en el vector de expresión *Aspergillus* pMStr57 usando técnicas estándares. El vector de expresión pMStr57 contiene los mismos elementos que pCaHj483 (WO 98/00529), con modificaciones menores hechas al promotor NA2 de *Aspergillus* como se describe para el vector pMT2188 en WO 01/12794, y tiene secuencias para la selección y propagación en *E. coli*, y selección y expresión en *Aspergillus*. Específicamente, la selección en *Aspergillus* es facilitada por el gen *amdS* de *Aspergillus nidulans*, que permite el uso de acetamida como única fuente de nitrógeno. La expresión en *Aspergillus* es mediada por un promotor (NA2) de amilasa II neutra modificada de *Aspergillus Niger* que es 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 previamente para el inserto de DSM 15960.

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.

## Ejemplo 2

### Purificación de asparraginasa

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

## Ejemplo 3

### Propiedades de asparraginasa

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

### Ensayo de asparraginasa

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 absorbencia a 375 nm fue tomada como una medida de actividad asparraginasa.

## ES 2 293 012 T3

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

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

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

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
15	0,24
25	0,39
37	0,60
50	0,81
60	1,00
70	0,18

### *Otras características*

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

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*

#### *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.

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.

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

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.

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

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.

## ES 2 293 012 T3

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

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

### Ejemplo 5

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

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

#### *Receta*

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

#### *Procedimiento de elaboración de la masa*

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.

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.

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.

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 sujeta el cesto en un ángulo de 45° y se deja drenar el producto hasta que el aceite deje de gotear. Se retiran los productos del cesto y se dejan enfriar en papel absorbente seco.

## 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</i> A-2925	1000 U/kg	150
Glutaminasa (producto de Daiwa)	50 mg proteína enzimática/kg	1,800
Aminoacidoxidasas de <i>Trichoderma harzianum</i> descrito en WO 9425574.	50 mg de proteína enzimática/kg	1,300
Lacasa de <i>Myceliophthora thermophila</i> + peroxidasa de <i>Coprinus</i>	5000 LAMU/kg + 75 mg de proteína enzimática/kg	2,000

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).
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).
- 10 3. Polinucleótido que codifica el polipéptido de la reivindicación precedente.
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.
- 15 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
  - 20 c) tratar con calor hasta alcanzar un contenido de agua final por debajo del 35% en peso.
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.
- 25 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.
- 30 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.
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.
- 35 10. Método de cualquiera de reivindicaciones 5-9 donde la materia prima comprende un producto de patata.

# ES 2 293 012 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Novozymes A/S

<120> Método de Preparación de un Producto Comestible

<130> 10347-WO

<160> 15

<170> Versión PatentIn 3.2

<210> 1

<211> 1303

<212> ADN

<213> *Aspergillus oryzae*

<220>

<221> CDS

<222> (49)..(1182)

<400> 1

```

ccacgcgtcc gattccctac tcagagcccc gagcaaccaa gcagcagt atg ggt gtc      57
                                     Met Gly Val
                                     1

aat ttc aaa gtt ctt gcc ctg tgg gcc tta gct act att agc cat gct      105
Asn Phe Lys Val Leu Ala Leu Ser Ala Leu Ala Thr Ile Ser His Ala
5 10 15

tcg cct ctc cta tat cct cga gcc aca gac tgg aac gtc acc tat gtc      153
Ser Pro Leu Leu Tyr Pro Arg Ala Thr Asp Ser Asn Val Thr Tyr Val
20 25 30 35

ttc acc aac ccc aat ggc ctg aac ttt act cag atg aac acc acc ctg      201
Phe Thr Asn Pro Asn Gly Leu Asn Phe Thr Gln Met Asn Thr Thr Leu
40 45 50

cca aac gtc act atc ttc gcg aca ggc ggc aca atc gcg ggc tcc agc      249
Pro Asn Val Thr Ile Phe Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly Ser Ser
55 60 65

gcc gac aac acc gca aca aca ggt tac aaa gcc ggt gca gtc ggc atc      297
Ala Asp Asn Thr Ala Thr Thr Gly Tyr Lys Ala Gly Ala Val Gly Ile
70 75 80

cag aca ctg atc gac gcg gtc cgg gaa atg cta aac gtt gcc aac gtc      345
Gln Thr Leu Ile Asp Ala Val Pro Glu Met Leu Asn Val Ala Asn Val
85 90 95

gct ggc gtc 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 gtc gtc tgc aac gac      441
Ile Leu Leu Arg Leu Ser Lys Gln Ile Asn Glu Val Val Cys Asn Asp
120 125 130

ccc acc atg gcc ggt gca gtc gtc acc cac ggc acc gac acg ctc gaa      489
Pro Thr Met Ala Gly Ala Val Val Thr His Gly Thr Asp Thr Leu Glu
135 140 145

gaa tcc gcc ttc ttc ctc gac gcc acg gtc aac tgt cgc aag ccc gtc      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 tgg 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	gcc	gcg	agc	ccc	aag	gcc	633
	Pro	Leu	Asn	Leu	Leu	Gln	Ser	Val	Thr	Val	Ala	Ala	Ser	Pro	Lys	Ala	
	180					185					190					195	
10	cga	gac	cgc	ggc	gcc	ctg	att	gtc	atg	aac	gac	cgc	atc	gta	tcc	gcc	681
	Arg	Asp	Arg	Gly	Ala	Leu	Ile	Val	Met	Asn	Asp	Arg	Ile	Val	Ser	Ala	
					200					205					210		
15	ttc	tac	gcc	tcc	aag	acg	aac	gcc	aac	acc	gtc	gat	aca	ttc	aag	gcc	729
	Phe	Tyr	Ala	Ser	Lys	Thr	Asn	Ala	Asn	Thr	Val	Asp	Thr	Phe	Lys	Ala	
				215					220					225			
20	atc	gaa	atg	ggt	aac	ctg	ggc	gag	gtc	gtc	tcc	aac	aaa	ccc	tac	ttc	777
	Ile	Glu	Met	Gly	Asn	Leu	Gly	Glu	Val	Val	Ser	Asn	Lys	Pro	Tyr	Phe	
			230					235					240				
25	ttc	tac	ccc	cca	gtc	aag	cca	aca	ggc	aag	acg	gaa	gta	gat	atc	cgg	825
	Phe	Tyr	Pro	Pro	Val	Lys	Pro	Thr	Gly	Lys	Thr	Glu	Val	Asp	Ile	Arg	
			245				250					255					
30	aac	atc	acc	tcc	atc	ccc	aga	gtc	gac	atc	ctc	tac	tca	tac	gaa	gac	873
	Asn	Ile	Thr	Ser	Ile	Pro	Arg	Val	Asp	Ile	Leu	Tyr	Ser	Tyr	Glu	Asp	
						260					270					275	
35	atg	cac	aat	gac	acc	ctt	tac	tcc	gcc	atc	gac	aac	ggc	gca	aag	ggc	921
	Met	His	Asn	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ser	Ala	Ile	Asp	Asn	Gly	Ala	Lys	Gly	
					280					285					290		
40	atc	gtt	atc	gcc	ggc	tcc	ggc	tcc	ggc	tcc	gtc	tcc	acc	ccc	ttc	agc	969
	Ile	Val	Ile	Ala	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Val	Ser	Thr	Pro	Phe	Ser	
				295					300					305			
45	gcc	gcc	atg	gaa	gac	atc	aca	acc	aaa	cac	aac	atc	ccc	atc	gta	gcc	1017
	Ala	Ala	Met	Glu	Asp	Ile	Thr	Thr	Lys	His	Asn	Ile	Pro	Ile	Val	Ala	
			310					315					320				
50	agc	acg	cgc	acc	gga	aac	ggg	gag	gtg	ccg	tcc	tcc	gcc	gag	tcg	agc	1065
	Ser	Thr	Arg	Thr	Gly	Asn	Gly	Glu	Val	Pro	Ser	Ser	Ala	Glu	Ser	Ser	
			325				330					335					
55	cag	atc	gca	agc	ggg	tat	ttg	aac	ccc	gca	aag	tca	cgc	gtt	ttg	ctt	1113
	Gln	Ile	Ala	Ser	Gly	Tyr	Leu	Asn	Pro	Ala	Lys	Ser	Arg	Val	Leu	Leu	
					340		345				350					355	
60	ggc	ttg	ttg	ctt	gcc	cag	ggg	aag	agt	att	gag	gaa	atg	agg	gcg	gtt	1161
	Gly	Leu	Leu	Leu	Ala	Gln	Gly	Lys	Ser	Ile	Glu	Glu	Met	Arg	Ala	Val	
					360					365					370		
65	ttt	gag	cgg	att	ggg	gtt	gct	tgattttttt	ttctttttctg	cttggtcttt							1212
	Phe	Glu	Arg	Ile	Gly	Val	Ala										
				375													
70	gtttagggtt	ggggtttgtg	tattatagat	taaggattta	tggatgggat	ggataataga											1272
75	ttatagatta	tagattaagt	atcgattatg	g													1303

<210> 2

<211> 378

60 <212> PRT

<213> *Aspergillus oryzae*

<400> 2

65

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 20	Pro	Leu	Leu Tyr 25	Pro Arg Ala Thr Asp Ser Asn Val 30
10	Thr	Tyr	Val 35	Phe	Thr	Asn	Pro Asn Gly Leu Asn Phe Thr Gln Met Asn 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	
	Phe	Lys	Ala	Ile	Glu	Met	Gly Asn Leu Gly Glu Val Val Ser Asn Lys 225 230 235 240	
	Pro	Tyr	Phe	Phe	Tyr	Pro	Pro Val Lys Pro Thr Gly Lys Thr Glu Val 245 250 255	
	Asp	Ile	Arg	Asn	Ile	Thr	Ser Ile Pro Arg Val Asp Ile Leu Tyr Ser 260 265 270	
	Tyr	Glu	Asp	Met	His	Asn	Asp Thr Leu Tyr Ser Ala Ile Asp Asn Gly	

# 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			