

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 075**

51 Int. Cl.:

A23L 1/015 (2006.01)

C02F 1/42 (2006.01)

C02F 1/44 (2006.01)

C02F 1/58 (2006.01)

C02F 1/74 (2006.01)

C12N 9/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08827336 .2**

96 Fecha de presentación: **12.08.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2187764**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.05.2010**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA INCREMENTAR LA ACTIVIDAD DE LA ASPARAGINASA EN UNA SOLUCIÓN.**

30 Prioridad:
13.08.2007 US 838153

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.01.2012

73 Titular/es:
**FRITO-LAY NORTH AMERICA, INC.
7701 LEGACY DRIVE
PLANO, TX 75024-4099, US**

72 Inventor/es:
**ELDER, Vincent, Allen;
KOH, Christopher, James y
HENSON, James, Keith**

74 Agente: **Curell Aguilá, Mireya**

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).

ES 2 373 075 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para incrementar la actividad de la asparaginasa en una solución.

5 Antecedentes de la invención

Campo técnico

10 La presente invención se refiere a un procedimiento para reducir la cantidad de acrilamida, un precursor de la acrilamida, en un producto alimenticio. Más particularmente, la presente invención se refiere al incremento de la estabilidad del enzima asparaginasa en una solución.

Descripción de la técnica relacionada

15 Tal como se expone en la patente US nº 7.037.540, se ha encontrado acrilamida en alimentos procesados térmicamente que contienen asparagina. El nivel de acrilamida formado en algunos productos alimenticios puede reducirse mediante la adición del enzima asparaginasa al producto alimenticio antes de su cocción.

20 La adición de enzimas reductores de la acrilamida, tales como la asparaginasa, a productos alimenticios a escala comercial, y no a escala de lote, presenta varias dificultades. Por ejemplo, el enzima asparaginasa debe ponerse en contacto con la asparagina libre para facilitar la hidrólisis de la misma. Debido a que el enzima típicamente se suministra en una forma relativamente concentrada, el enzima se mezcla idealmente y se diluye en una solución de base acuosa antes de poner en contacto el producto alimenticio con la solución de enzima. Por ejemplo, la puesta en contacto del producto alimenticio con la solución de enzima puede comprender la formación de una masa y la
25 mezcla de una solución de enzima con la masa.

Una manera conocida de cuantificar la actividad de un enzima es la expresión en términos de unidades. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria como catalizador para convertir un micromol de sustrato en un minuto. De esta manera, a partir del conocimiento de la concentración relativa de
30 sustrato o compuesto, tal como asparagina, en un producto alimenticio y de la cantidad del mismo puede calcularse el número de unidades de enzima, tal como asparaginasa, necesario para convertir el compuesto químico deseado, en este caso la asparagina, en un compuesto químico diferente.

35 Por motivos desconocidos anteriormente, incluso en el caso de que se utilicen dosis en exceso (es decir, una cantidad superior a la matemáticamente esperada necesaria para convertir toda la asparagina en el producto alimenticio) del enzima asparaginasa en un producto alimenticio, tal como puré de patatas o masa de maíz, con frecuencia todavía se observan unos niveles medibles de asparagina en la masa. Debido a que se desea reducir el nivel de acrilamida formado al procesar térmicamente determinados alimentos, resultaría deseable disponer de un sistema y procedimiento de maximización de la efectividad de un enzima utilizado para reducir los precursores de
40 acrilamida en productos alimenticios preparados a escala comercial.

El documento CN nº 1137064 da a conocer un procedimiento para preparar una solución acuosa rica en asparaginasa, incluyendo la fermentación en 4 etapas de carne magra y la esterilización.

45 El documento JP nº 6030782 describe un procedimiento para el tratamiento de aguas residuales.

Sumario de la invención

50 Un primer aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento para incrementar la actividad de la asparaginasa en una solución, siendo el procedimiento tal como se define en la reivindicación 1.

En algunas formas de realización, se elimina el cloro mediante intercambio iónico, ósmosis inversa, carbono activado y/o mediante burbujeo de aire. En algunas formas de realización, se utilizan aditivos tales como agentes reductores y secuestradores del cloro, para tratar el agua potable.
55

Un segundo aspecto de la presente invención proporciona un sistema según se define en la reivindicación 11.

Lo expuesto anteriormente, así como las características y ventajas adicionales de la presente invención, resultarán evidentes a partir de la descripción detallada proporcionada a continuación.
60

Breve descripción de los dibujos

Las nuevas características que se cree son típicas de la invención se establecen en las reivindicaciones adjuntas. Sin embargo, la invención misma, así como un modo preferido de utilización, y los objetivos y ventajas adicionales de la misma, se pondrán más claramente de manifiesto haciendo referencia a la descripción detallada siguiente de las formas de realización ilustrativas a partir de los dibujos adjuntos, en los que:
65

la figura 1a es una representación gráfica de la actividad enzimática residual tras diversos tratamientos del agua de bebida, y

- 5 la figura 1b es una representación gráfica de la actividad enzimática residual de diversas mezclas de agua salina.

Descripción detallada

10 En una forma de realización, la presente invención se refiere a cómo proporcionar una solución de base acuosa que incrementa la estabilidad de la asparaginasa y conserva la actividad de la asparaginasa. La actividad incrementada de la asparaginasa puede traducirse en una reducción más efectiva de la acrilamida en los productos alimenticios debido a que la asparagina es un precursor de la acrilamida. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "actividad enzimática" se expresa en unidades. Cada unidad de asparaginasa puede hidrolizar un micromol de asparagina en un minuto.

15 En una forma de realización, el producto alimenticio en el que se desea reducir el nivel de acrilamida formada durante el procesamiento térmico se forma a partir de una masa. La expresión "refrigerio fabricado" se refiere a un alimento de refrigerio que utiliza como ingrediente de partida algo diferente del material de partida feculento original y no alterado. Por ejemplo, los refrigerios fabricados comprenden patatas fritas fabricadas que utilizan un producto de patata deshidratado como material de partida, y las patatas de maíz que utilizan harina de masa como su material de partida. Debe apreciarse en la presente memoria que el producto de patata deshidratado puede ser harina de patata, copos de patata, gránulos de patata u otras formas en las que se encuentren presentes patatas deshidratadas. En la utilización de cualquiera de dichas expresiones en la presente solicitud, debe apreciar que está comprendida la totalidad de dichas variaciones. Únicamente a título de ejemplo no limitativo, los ejemplos de 25 "alimentos fabricados" a las que puede añadirse una solución de asparaginasas comprenden tortillas, patatas de maíz, patatas fritas preparadas a partir de copos de patata y/o puré de patata fresco, patatas multicereales, maíz inflado, trigo inflado, arroz inflado, tostas, panadería (tales como harinas de centeno, trigo, avena, patata, blanco, de grano integral y mixtos), rosquillas de pan salado ("pretzels") blandas y duras, pastelitos, galletas, tostadas, tortitas de maíz, tortitas de harina, pan pita, cruasanes, pasta de hojaldre, madalenas, bizcochos de chocolate y nueces ("brownies"), pasteles, rosquillas ("bagels"), donuts, cereales, refrigerios extruidos, productos de granola, harinas, 30 harina de maíz, masa, copos de patata, polenta, mezclas para empanado y productos de bollería, masas refrigeradas y congeladas, alimentos reconstituidos, alimentos procesados y congelados, empanado de carnes y vegetales, patatas doradas, puré de patatas, crepes, panqueques, gofres, masa de pizza, manteca de cacahuete, alimentos que contienen nueces picadas y procesadas, gelatinas, rellenos, pasta de fruta, puré de verduras, bebidas 35 alcohólicas tales como cervezas y ales, cacao, cacao en polvo, chocolate, chocolate caliente, queso, alimentos animales tales como pienso para perros y gatos, y cualquier otro producto alimenticio humano o animal que se someta a laminado o extrusión o que se prepare a partir de una masa o mezcla de ingredientes.

40 La utilización de la expresión "alimentos fabricados" en la presente memoria comprende refrigerios fabricados tal como se ha definido anteriormente. La utilización de la expresión "productos alimenticios" en la presente memoria comprende todos los refrigerios fabricados y alimentos fabricados tal como se ha definido anteriormente.

45 Tal como se hace referencia en la presente memoria, los alimentos procesados térmicamente comprenden alimentos que pueden tratarse con una solución de asparaginasa, a título de ejemplo no limitativo, todos los alimentos presentados anteriormente como ejemplos de refrigerios fabricados y alimentos fabricados, así como patatas fritas, patatas en rodajas, rodajas de boniato, otros materiales de tubérculos o raíces, vegetales cocinados, incluyendo espárragos, cebollas y tomates cocinados, granos de café, semillas de cacao, carnes cocinadas, frutas y verduras deshidratadas, piensos animales procesados por calor, tabaco, té, nueces tostadas o cocinadas, semillas de soja, melazas, salsas tales como la salsa barbacoa, rodajas de plátano macho, rodajas de manzana, plátanos 50 fritos y otras frutas cocinadas.

Según algunas de dichas formas de realización, los ingredientes deseados para preparar la masa se mezclan entre sí con agua y también se mezcla la cantidad deseada de asparaginasa con agua tratada con el fin de preparar la solución de asparaginasa. A continuación, puede añadirse a la masa la solución de asparaginasa. En una forma de 55 realización, se mezcla una solución de asparaginasa directamente con los ingredientes deseados, preparando una masa. A continuación, la masa puede prepararse en un producto alimenticio procesado térmicamente.

60 En unas instalaciones comerciales, el agua utilizada para formar la masa y la solución de asparaginasa es el agua de la que puede disponerse con facilidad en las instalaciones, que es típicamente agua potable suministrada al usuario final por el suministrador municipal de agua de la localidad. Tal como se utiliza en la presente memoria, "agua potable" se refiere al agua suministrada por un suministrador de agua potable, y comprende de manera no limitativa agua de un suministrador municipal de agua. Prácticamente todos los suministradores municipales de agua de los Estados Unidos añaden suficiente cloro al agua potable de manera que el agua potable presenta un cloro residual al llegar al grifo del cliente. Muchas empresas municipales de abastecimiento de agua añaden cloramina al 65 agua potable debido a que la cloramina es más estable que el cloro. Tal como se utiliza en la presente memoria, se define cloro como las formas oxidantes del cloro e incluye, aunque sin limitación, cloramina e hipocloritos. De

manera similar, las formas no oxidantes del ion cloro, tales como las proporcionadas por el ácido clorhídrico (HCl) y el cloruro sódico (NaCl) no están comprendidas en la definición.

Se ha descubierto que determinadas características del agua potable, por ejemplo la presencia de cloro, reducen la actividad del enzima asparaginasa hasta un punto en el que no resulta útil en un contexto comercial para la producción de alimentos. Tal como se utiliza en la presente memoria, "actividad enzimática residual" (expresado en %) se refiere a la actividad enzimática de un control dividida por la actividad enzimática de una muestra, y proporciona una medida relativa de la actividad enzimática bajo diversas condiciones experimentales. Se han identificado asimismo unos procedimientos y unos sistemas para mitigar el efecto del agua potable sobre la actividad enzimática y conservar la actividad enzimática residual de la asparaginasa de manera que pueda resultar útil en un contexto comercial. Los ejemplos siguientes son ilustrativos de lo anteriormente expuesto.

Ejemplo 1

Se formaron cuatro soluciones a partir de alícuotas, presentando cada alícuota una actividad asparaginasa (Novozymes A/S) igual inicial añadida, y cada alícuota, diluida con agua destilada o agua potable de manera que cada solución presente un volumen total de aproximadamente 50 ml. El agua potable para las soluciones nº 3 y 4 era agua potable suministrada por la empresa municipal de abastecimiento del norte de Texas a Plano, TX, USA. Los tipos de agua utilizados en cada solución se describen en la Tabla 1a, a continuación.

Tabla 1a. Tipos de agua utilizados para preparar una solución de asparaginasa.

Solución nº	Tipo de agua
1	Agua destilada
2	Agua destilada
3	Agua potable procedente de la empresa municipal de abastecimiento de agua del Norte de Texas a Plano, TX, USA
4	Agua potable procedente de la empresa municipal de abastecimiento de agua del Norte de Texas a Plano, TX, USA, mezclada con ácido clorhídrico 0,1 M añadido hasta alcanzar un pH de 6

Se calentó cada una de las soluciones nº 2 a 4 a aproximadamente 35°C durante aproximadamente 40 minutos antes de medir la actividad enzimática y el pH utilizando la solución nº 1 como control para la comparación de la actividad enzimática residual. Se refrigeró la solución nº 1 durante aproximadamente 40 minutos a una temperatura de aproximadamente 10°C.

Se muestran los valores medidos en la Tabla 1b, a continuación:

Tabla 1b. Actividad enzimática residual de agua destilada y agua potable.

Solución nº	pH de la solución	Actividad relativa
1	6,93	100%
2	7,00	103%
3	8,22	38%
4	7,55	48%

Debe indicarse que los resultados de ensayo de actividad enzimática y de actividad enzimática residual se obtuvieron utilizando el procedimiento de ensayo descrito al final de la presente exposición. En comparación con la solución nº 1 (control), la solución nº 2 no perdió actividad enzimática. La solución nº 3 era ligeramente alcalina, con un pH de aproximadamente 8,22, y el enzima asparaginasa perdió aproximadamente 62% de su actividad tras aproximadamente 40 minutos a aproximadamente 35°C. La adición de ácido clorhídrico diluido al agua potable (solución nº 4) redujo el pH hasta aproximadamente 7,55, y la asparaginasa perdió aproximadamente 52% de su actividad tras aproximadamente 40 minutos de calentamiento a aproximadamente 35°C. En consecuencia, aparentemente la basicidad de la solución nº 3 es responsable de cierta pérdida de actividad enzimática. Se reconoce generalmente que el pH presenta un impacto sobre la actividad de la asparaginasa y que la actividad de la asparaginasa es superior si el pH es de entre aproximadamente 4 y aproximadamente 7.

Ejemplo 2

Se prepararon cuatro soluciones a partir de alícuotas, presentando cada alícuota una actividad de la asparaginasa inicial igual (Novozymes A/S), y cada alícuota, diluida con agua desionizada o agua potable de manera que cada solución presentase un volumen total de aproximadamente 50 ml. Se describen los tipos de agua utilizados en cada solución en la Tabla 2a, a continuación:

Tabla 2a. Soluciones de asparaginasa preparadas a partir de agua procedente de diferentes empresas de abastecimiento.

Sol. nº	Tipo de agua
1	Agua desionizada (control)
2	Agua potable procedente de la empresa municipal de abastecimiento de agua del norte de Texas en Plano, TX, USA
3	Agua potable de abastecimiento a los residentes de Duncanville, TX, USA
4	Agua utilizada en un procedimiento de fabricación de alimentos en Mexicali, México

- 5 Se calentó cada una de las soluciones nº 2 a 4 a aproximadamente 35°C durante aproximadamente 40 minutos antes de medir los niveles de cloro, dureza del agua, pH y actividad enzimática. El control no se sometió a calentamiento. Se muestran los valores medidos en la Tabla 2b, a continuación.

Tabla 2b. Actividad enzimática residual y química del agua de tres soluciones de agua potable diferentes

10

Solución nº	Cloro libre (mg/l)	Cloro total (mg/l)	Dureza total (mg/l)	pH	Actividad
1	0	0	0	6,89	100%
2	1,0	1,0	232	7,47	9%
3	0,02	0,02	90	7,87	85%
4	0,02	0,06	28	8,00	89%

Estos datos demuestran claramente el impacto negativo que presenta el cloro sobre la actividad enzimática residual. Por ejemplo, la solución nº 1 (control) no presentaba cloro y presentaba la actividad enzimática residual más alta. La solución nº 2 presentaba el nivel más bajo de actividad enzimática residual y el nivel más alto de cloro libre y dureza total.

15

La solución nº 3 presentaba una concentración relativamente baja de cloro libre y un nivel de dureza moderado, con una actividad residual superior al 80%. La solución nº 4 presentaba una concentración de cloro libre similar a la de la solución nº 3 y un nivel de dureza inferior, resultando en una actividad residual ligeramente más alta. La Tabla 2b demuestra que la actividad enzimática residual de la asparaginasa es inversamente proporcional al nivel de cloro.

20

Ejemplo 3

Se prepararon cuatro soluciones a partir de alícuotas, presentando cada alícuota una actividad inicial igual de asparaginasa (Novozymes A/S), y diluyendo cada alícuota con agua desionizada o agua potable de manera que cada solución presentase un volumen total de aproximadamente 50 ml. Los tipos de agua de cada muestra son presentados en la Tabla 3a, a continuación.

25

Tabla 3a. Tipos de agua clorada utilizados para preparar una solución de asparaginasa.

30

Sol. nº	Tipo de agua
1	Agua desionizada (control)
2	Agua desionizada + suficiente hipoclorito para proporcionar 12 ppm de cloro
3	Agua potable de la empresa municipal de abastecimiento de agua del norte de Texas en Plano, TX, USA
4	Agua potable de la empresa municipal de abastecimiento de agua del norte de Texas en Plano, TX, USA, filtrada tres veces a través de un filtro BRITA

Cada una de las soluciones nº 2 a 4 se calentó a aproximadamente 35°C durante 40 minutos antes de medir el nivel de cloro libre, la dureza total, el pH y la actividad enzimática residual.

- 35 Los valores medidos se muestran en la Tabla 3b, a continuación:

Tabla 3b. Actividad enzimática residual de soluciones que presentan diversos niveles de cloro.

Solución nº	Cloro libre (mg/l)	Dureza total (mg/l)	pH	Actividad
1	0	-	4,81	100%
2	No medido	-	5,87	4%
3	No medido	228	7,10	21%
4	0	20	4,99	102%

Tal como indica la Tabla 3b, anteriormente, la adición de cloro a agua desionizada tal como muestra la solución nº 2, o la presencia de cloro en el agua potable tal como muestra la solución nº 3, reduce claramente la actividad residual del enzima asparaginasa. Además, la eliminación o la ausencia de cloro resulta claramente en una actividad incrementada del enzima, tal como demuestra el nivel de actividad residual del enzima en el agua desionizada de la solución nº 1 y tal como demuestra la actividad enzimática residual en agua filtrada por BRITA en la solución nº 4. El nivel de cloro para la solución nº 2 no se midió debido a que se había añadido cloro en forma de hipoclorito sódico a la solución. Además, en el caso del agua potable, es conocido que el nivel relativo de cloro en la solución nº 3 es similar a los niveles en agua potable.

Ejemplo 4

El objetivo del presente ensayo consistía en analizar el efecto del cloro sobre la actividad enzimática mediante la adición de la cantidad de cloro presente en el agua potable a agua desionizada, que no presenta cloro, con el fin de determinar los efectos del cloro sobre la actividad de la asparaginasa.

Se prepararon cuatro soluciones a partir de alícuotas, presentando cada alícuota una actividad inicial igual de asparaginasa (Novozymes A/S) y se diluyó cada alícuota con agua desionizada o agua potable de manera que cada solución presentase un volumen total de aproximadamente 50 ml. Los tipos de agua de cada muestra son presentados en la Tabla 4a, a continuación.

Tabla 4a. Tipos de agua clorada utilizados para preparar una solución de asparaginasa.

Solución nº	Tipo de agua
1 (control)	Agua desionizada
2	Agua desionizada acidificada con suficiente hipoclorito sódico para resultar en agua que presentaba 1,2 ppm de cloro y suficiente ácido clorhídrico para resultar en un pH ácido
3	Agua desionizada acidificada con suficiente hipoclorito sódico para resultar en agua que presenta 0,2 ppm de cloro y suficiente ácido clorhídrico para resultar en un pH ácido
4	Agua potable procedente de la empresa municipal de abastecimiento de agua del norte de Texas en Plano, TX, USA

Se calentó cada una de las soluciones nº 2 a 4 a aproximadamente 35°C durante 40 minutos antes de medir el cloro, el pH y la actividad enzimática residual. La solución nº 1 no se sometió a calentamiento. Los valores medidos se muestran en la Tabla 4b, a continuación:

Tabla 4b. Actividad enzimática residual de soluciones que presentaban diversos niveles de cloro.

Solución nº	Cloro libre (mg/l)	Cloro total (mg/l)	pH	Actividad
1	--	--	4,85	100
2	1,2	1,2	4,69	3
3	0,1	0,2	4,62	108
4	0,8	1,1	6,84	14

Los datos en la Tabla 4b, anteriormente, demuestran que, en el caso de que se añada cloro sólo al agua, se reduce sustancialmente la actividad residual de asparaginasa. Sin embargo, a niveles relativamente bajos, el cloro presentaba un menor impacto sobre la actividad enzimática residual.

Ejemplo 5

Se prepararon cinco soluciones para determinar los efectos potenciales de la modificación del agua potable sobre la actividad residual de asparaginasa. Se preparó cada solución a partir de alícuotas, presentando cada alícuota una actividad inicial igual de asparaginasa (Novozymes A/S), y cada alícuota se diluyó con agua desionizada o con agua potable de manera que cada solución presentase un volumen total de aproximadamente 50 ml. Se añadió ácido cítrico para que las soluciones fuesen ligeramente ácidas. Los tipos de agua utilizados en cada solución se describen en la Tabla 5a, a continuación:

Tabla 5a. Modificaciones del agua potable

Solución nº	Tipo de agua
1 (control)	Agua desionizada
2	Agua potable procedente de la empresa municipal de abastecimiento del norte de Texas en Plano, TX, USA.
3	Agua potable acidificada procedente de la empresa municipal de abastecimiento del norte de Texas en Plano, TX, USA, con suficiente ácido cítrico para presentar 100 ppm de ácido cítrico.
4	Agua potable procedente de la empresa municipal de abastecimiento de agua del norte de Texas en Plano, TX, USA, con suficiente ácido cítrico para presentar 100 ppm de ácido cítrico y 950 ppm de EDTA.
5	Agua potable acidificada procedente de la empresa municipal de abastecimiento del norte de Texas en Plano, TX, USA, con suficiente ácido cítrico para presentar 100 ppm de ácido cítrico y con suficiente tiosulfato para presentar 10 ppm de tiosulfato sódico.

- 5 Se calentó cada una de las soluciones nº 2 a 5 a aproximadamente 35°C durante 40 minutos antes de medir el cloro libre, el cloro total, el pH y la actividad enzimática residual. La solución nº 1 no se sometió a calentamiento. Los valores medidos se muestran en la Tabla 5b, a continuación:

Tabla 5b. Actividad enzimática residual de diversas soluciones de agua potable tratada.

Solución nº	Cloro libre (mg/l)	Cloro total (mg/l)	pH	Actividad
1	0	0	--	100%
2	0,2	1,2	7,53	12%
3	0,4	0,8	5,81	32%
4	1,0	1,0	6,45	100%
5	0,1	0,4	5,65	86%

- 10 La figura 1a es una representación gráfica de la actividad enzimática residual tras diversos tratamientos del agua potable. La actividad enzimática se encuentra representada por las columnas en el gráfico de columnas y la concentración de cloro total se encuentra representada por la línea (150). Tal como ponen de manifiesto los datos, el tiosulfato (añadido a un nivel aproximadamente 5 veces superior a la concentración de cloro en el agua potable) redujo la concentración de cloro e incrementó la actividad enzimática hasta el 86% (140). El agua potable, que presenta una concentración de cloro total de 1,2 ppm, presentaba una actividad residual relativamente baja, de sólo 12% (110). El ácido cítrico redujo el nivel de cloro en el agua potable e incrementó la actividad enzimática hasta el 32% (120).
- 15
- 20 La actividad enzimática (130) en el agua potable con EDTA era equivalente a la actividad enzimática del agua desionizada (100), pero el EDTA sólo redujo ligeramente el cloro total. Sin restringirse a ninguna teoría en particular, los solicitantes creen que el EDTA podría envolver, y de esta manera proteger, al enzima frente al cloro, o que el EDTA podría bloquear el cloro. Por ejemplo, todavía se observa cloro al someterlo a ensayo, aunque la reacción, una reacción reversible entre EDTA y cloro, podría evitar que el cloro se oxidase, o reaccionase de otro modo, con la asparaginasa. De esta manera, el EDTA aparentemente inactiva el cloro. En consecuencia, en una forma de realización, pueden añadirse aditivos que inhiben que el cloro reduzca la actividad de la asparaginasa y/o que inactive el cloro.
- 25

Ejemplo 6

- 30 Se prepararon cinco soluciones para determinar los efectos potenciales de los constituyentes de agua dura habitualmente presentes en el agua potable. Se preparó cada solución a partir de alícuotas, presentando cada alícuota una actividad inicial igual de asparaginasa (Novozymes A/S), y cada alícuota se diluyó con agua desionizada o con agua potable de manera que cada solución presentase un volumen total de aproximadamente 50 ml. Se añadió sal a cada solución salina para alcanzar una concentración salina de 5 mM (5 milimolar), que es aproximadamente el doble de la concentración de carbonato cálcico presente en agua potable procedente de Plano, TX. Por ejemplo, en referencia a la Tabla 3b, anteriormente, la dureza total de la solución nº 3 (agua potable procedente de Plano) era 228 mg/l, que corresponde a aproximadamente 2,28 mM. Los diversos tipos de sales utilizadas en cada solución se describen en la Tabla 6a siguiente:
- 35
- 40

Tabla 6a. Sales añadidas al agua desionizada.

Solución nº	Tipo de agua
1	Agua desionizada
2	Agua desionizada + Cloruro sódico
3	Agua desionizada + Cloruro cálcico
4	Agua desionizada + Nitrato de magnesio
5	Agua desionizada + Bicarbonato sódico

Se calentó cada una de las soluciones nº 2 a 5 a aproximadamente 35°C durante 40 minutos antes de medir la actividad enzimática residual. Los valores medidos se muestran en la Tabla 6b, a continuación:

5 Tabla 6b. Actividad enzimática residual de diversas mezclas de sal y agua.

Solución	Actividad
1	100%
2	99%
3	101%
4	96%
5	102%

10 La figura 1b es una representación gráfica de la actividad enzimática residual de diversas mezclas de sal y agua y gráficamente muestran los resultados de la Tabla 6b, anteriormente. La sal añadida no presentó ningún efecto aparente sobre la estabilidad enzimática. En consecuencia, se cree que el cloro es responsable de la mayor parte de la pérdida de la actividad de la asparaginasa.

15 Ejemplo 7

Se diluyeron igualmente con agua desionizada (celda 1) y con agua corriente (celda 2) dos alícuotas que presentaban una actividad inicial igual de asparaginasa, con el fin de preparar una primera solución de asparaginasa y una segunda solución de asparaginasa. Se mantuvo cada solución durante 30 minutos a temperatura ambiente y después se añadió cada solución de asparaginasa a masa de maíz. Se midió la asparagina en la masa 5 minutos y 10 minutos después de la adición del enzima a la masa y se muestran los valores medidos en la Tabla 7, a continuación.

Tabla 7. Nivel de asparagina en masa de maíz utilizando enzima mezclado con agua potable y agua desionizada.

Tipo de agua utilizado para la dilución del enzima	Muestra de masa	Asparagina (ppm)
Agua desionizada	5 minutos después de la adición de la primera solución de asparaginasa	3,6
Agua desionizada	10 minutos después de la adición de la primera solución de asparaginasa	2,9
Agua potable procedente de la empresa municipal de abastecimiento del norte de Texas en Plano, TX, USA	5 minutos después de la adición de la segunda solución de asparaginasa	37,2
Agua potable procedente de la empresa municipal de abastecimiento del norte de Texas en Plano, TX, USA	10 minutos después de la adición de la segunda solución de asparaginasa	24,2

25 El nivel de asparagina en la masa de maíz presentado en la Tabla 7, anteriormente, demuestra que el nivel resultante de asparagina es altamente dependiente de la solución de asparaginasa diluida subyacente. En la forma de realización mostrada anteriormente, la diferencia de nivel era de aproximadamente un orden de magnitud del nivel de asparagina en la masa de maíz tras el tratamiento con agua desionizada frente al tratamiento con agua potable.

30 Los datos presentados anteriormente indican claramente que el nivel de cloro activo debe reducirse para maximizar la actividad residual de la asparaginasa. Debido a que el agua desionizada y el agua destilada son caras, la presente invención proporciona un modo de maximizar la actividad enzimática residual mediante la eliminación y/o inactivación selectiva del cloro del agua potable o de otra fuente de agua.

35 Puede utilizarse cualquier procedimiento conocido en la técnica que pueda reducir la concentración de componentes reductores de la actividad enzimática en el agua potable, incluyendo, aunque sin limitación, el tratamiento del agua potable para reducir la concentración del componente reductor de la actividad mediante filtración del agua potable a través de carbono activado, un burbujeador de aire (para volatilizar el cloro), sistemas de ósmosis inversa y/o resinas de intercambio iónico. También puede tratarse el agua potable mediante la mezcla de agua potable con agua desionizada o agua destilada en cantidades suficientes para reducir la concentración de los componentes reductores de la actividad para preparar una solución enzimática estable.

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, un "secuestrador" es cualquier aditivo que conserve la actividad enzimática mediante la reacción con el cloro. En consecuencia, pueden añadirse al agua potable secuestradores de

componentes reductores de enzima. Por ejemplo, en una forma de realización, se añade tiosulfato, un secuestrador de cloro, al agua potable. Además, pueden utilizarse otros aditivos para inactivar el cloro. Por ejemplo, debido a que el cloro es un agente oxidante fuerte, también pueden añadirse agentes reductores al agua potable para reaccionar con el cloro. Los agentes reductores es conocido en la química de la oxidación-reducción que son compuestos donadores de electrones y los agentes oxidantes es conocido que son aceptores de electrones. En consecuencia, en una forma de realización, pueden añadirse uno o más agentes reductores (por ejemplo donadores de electrones) a una fuente de agua potable con el fin de inactivar o neutralizar el cloro. Los ejemplos de agentes reductores comprenden de manera no limitativa cloruro estannoso dihidrato, sulfito sódico, metabisulfito sódico, ácido ascórbico, derivados del ácido ascórbico, ácido isoascórbico (ácido eritórbito), sales de derivados del ácido ascórbico, hierro, cinc, iones ferrosos y combinaciones de los mismos.

En una forma de realización, la presente invención reduce la concentración de cloro total hasta un nivel comprendido entre aproximadamente 0 y un nivel inferior a aproximadamente 0,5 ppm y preferentemente hasta un nivel comprendido entre 0 y aproximadamente 0,1 ppm.

En una forma de realización, la asparaginasa puede mezclarse a continuación con el agua tratada para preparar una solución de asparaginasa estable y después la solución de asparaginasa puede mezclarse con el producto alimenticio. En una forma de realización, el agua potable se ha tratado suficientemente y se consigue una solución estable de enzima o asparaginasa en el caso de que la actividad enzimática residual sea de por lo menos aproximadamente 80% y más preferentemente de por lo menos aproximadamente 90% por lo menos 30 minutos y más preferentemente por lo menos aproximadamente 4 horas tras la adición del enzima al agua potable tratada. En una forma de realización, la actividad enzimática residual es por lo menos aproximadamente 90% durante el tiempo necesario para mezclar una solución de asparaginasa en una masa.

A partir de la presente exposición, el experto en la materia podrá determinar y proporcionar la composición acuosa necesaria que resulte en la actividad enzimática residual deseada.

Los productos alimenticios a los que puede añadirse la solución de asparaginasa comprenden de manera no limitativa masas, suspensiones y otros productos consumibles en los que se desea reducir el nivel de acrilamida. Por ejemplo, en una forma de realización, se añade la solución de asparaginasa a una suspensión de patata preparada a partir de copos de patata. En una forma de realización, la suspensión de patata se prepara mediante la adición de la solución de asparaginasa a copos de patata. En una forma de realización, la solución de asparaginasa se utiliza para añadir a agua y se añade a una composición farinácea para preparar una masa. En una forma de realización, la solución de asparaginasa se añade a masa de maíz.

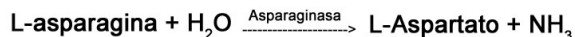
En una forma de realización, la presente invención comprende un sistema para proporcionar una solución estable de asparaginasa que puede añadirse a un ingrediente alimentario que presenta asparagina. En una forma de realización, el sistema comprende un sistema de tratamiento para tratar el agua. El sistema de tratamiento puede eliminar componentes tales como el cloro mediante un procedimiento de carbono activado o mediante otros procedimientos de eliminación indicados anteriormente, y/o el sistema de tratamiento puede proporcionar aditivos que comprenden de manera no limitativa agentes reductores, secuestradores de cloro o EDTA, que incrementan la actividad de la asparaginasa hasta un nivel que es superior que en el caso de que no se haya añadido el aditivo. A continuación, el agua tratada puede dirigirse a un tanque de mezcla en el que la asparaginasa puede diluirse en el mismo para preparar una solución de asparaginasa estable. A continuación, la solución de asparaginasa puede dosificarse o, de otro modo, añadirse a una masa utilizada para preparar un alimento fabricado, o procesado térmicamente tal como se ha indicado anteriormente. A continuación, la masa puede procesarse adicionalmente (por ejemplo formarse mediante extrusión y laminado y procesarse térmicamente) tal como es bien conocido de la técnica. El experto en la materia, a partir de la presente exposición apreciará que la presente invención puede utilizarse en cualquier caso en el que se desee una solución de asparaginasa para reducir el nivel de acrilamida en un producto alimenticio.

En una forma de realización, la invención comprende un sistema que comprende una fuente de agua potable y una fuente de asparaginasa, un sistema de tratamiento que puede hacerse funcionar para incrementar la actividad de la asparaginasa en el agua tratada hasta un nivel superior al alcanzado en el caso de que no se hubiese realizado el tratamiento, y un sistema de administración que puede hacerse funcionar para mezclar el agua potable tratado y asparaginasa. En una forma de realización, el sistema de administración comprende un tanque de mezcla que recibe agua tratada del sistema de tratamiento y asparaginasa.

El procedimiento de ensayo utilizado para determinar la actividad de la asparaginasa para los Ejemplos en la presente solicitud se muestra a continuación:

I. Antecedentes. El procedimiento SIGMA para la actividad de la asparaginasa utilizó un tampón Tris a pH 8,6 (catálogo Sigma nº A-4887). Debido a que la asparaginasa de grado alimentario presenta una actividad baja a pH 8,6, se modificó el pH del ensayo a pH 7,0 utilizando MOPS (ácido 3-morfolinopropanosulfónico).

II. Principio.



III. Condiciones: T=37°C, pH=7,0, A₄₃₆, paso de luz=1 cm

IV. Procedimiento: determinación de la tasa de parada espectrofotométrica

V. Reactivos

a. MOPS sal sódica 100 mM (ácido 3-morfolinopropanosulfónico). Dosificación de 2,09 gramos de MOPS (Sigma nº M5162). Disolución en aproximadamente 60 ml de agua DI a temperatura ambiente. Adición de hidróxido sódico para ajustar el pH a 7,0. Enrasado a 100 ml con agua DI. Almacenamiento en una nevera cuando no se utilice.

b. Solución de L-asparagina 189 mM. Dosificación de 0,25 gramos de L-asparagina anhidra y disolución en 10 ml de agua DI. Almacenamiento en la nevera cuando no se utilice. Tras refrigerar, sonicación para disolver los cristales de asparagina previamente a la utilización.

c. Solución estándar de sulfato amónico 6 mM ((NH₄)₂SO₄ estándar). Dosificación de 0,079 gramos de sulfato amónico en una balanza analítica y registro del peso a una precisión de 0,0001 g. Disolución y enrasado hasta el volumen de 100 ml utilizando agua DI. Almacenamiento en la nevera cuando no se utilice.

d. Ácido tricloroacético 1,5 M (TCA). Dosificación de 2,45 gramos de ácido tricloroacético. Disolución y enrasado a 10 ml con agua DI.

e. Reactivo de color amónico. Kit de ensayo para elevadas concentraciones de nitrógeno amónico, nesslerización, LaMotte nº de código 3642-SC, nº de cat. de VWR 34186-1914. El reactivo nº 2 contiene mercurio.

f. Solución de enzima asparaginasa: inmediatamente antes de la utilización, preparar una solución que contiene 2,0 a 4,0 unidades/ml de asparaginasa a temperatura ambiente en agua desionizada. En el caso de que el enzima se encuentre congelado, descongelar por completo en agua tibia antes de extraer una alícuota para la dilución. Para concentraciones de enzima típicas, pueden diluirse 0,1 ml de solución de enzima hasta 50 ml.

VI. Procedimiento:

a. Fijar el bloque calefactor para los viales a 37°C.

b. Utilizar una micropipeta regulable para transferir los reactivos siguientes a los viales (ml):

Reactivo	Ensayo	Blanco de enzima	Estándar 1	Estándar 2	Estándar 3	Blanco de reactivo
A (tampón)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
B (L-ASN)	0,10	0,10	---	---	---	---
C (estándar de amonio)	---	---	0,25	0,50	1,00	---
Agua DI	0,90	0,90	0,85	0,60	0,10	1,10
F (solución de enzima)	0,10	---	---	---	---	---

c. Tapar viales e introducir en el bloque calefactor a 37°C. Iniciar la agitación del bloque calefactor.

d. Sacar los viales del bloque calefactor tras 30 minutos. Destapar los viales, añadir inmediatamente reactivo TCA y mezclar. A continuación, añadir reactivo F (solución de enzima) al blanco de enzima. Para las soluciones de ensayo de enzima, el tiempo entre la extracción de los viales del bloque calefactor y la adición del TCA debe ser el mínimo tiempo posible. Tras la adición del TCA, el tiempo transcurrido antes de la medición del amonio no resulta crítico. Para los blancos y los estándares, el tiempo entre la extracción del bloque calefactor y la adición del TCA no resulta crítico.

Reactivo	Ensayo	Blanco de enzima	Estándar 1	Estándar 2	Estándar 3	Blanco de reactivo
D (TCA)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
F (solución de enzima)	---	0,10	---	---	---	---

e. Pipetear 0,20 ml de cada solución a las probetas o viales. Adición de 4,30 ml de agua desionizada, 4 gotas de reactivo nº 1 de LaMotte y 0,50 ml de nº 2 de LaMotte. Mezcla de la solución y dejar a temperatura ambiente durante 10 a 20 minutos antes de leer la absorbancia a 436 nm en una celda de 1 cm. Fijar el cero del espectrofotómetro con agua DI.

VII. Cálculo de los resultados.

f. Se calcula la actividad del enzima a partir de una curva de calibración para el amonio ($\mu\text{moles}/0,2 \text{ ml}$).

g. Descripción de las etapas de cálculo.

i. Cálculo de la concentración de la solución estándar de sulfato amónico:

$$\text{mM} = (0,0809 \text{ g}) \cdot (1.000 \text{ mM/M}) \cdot (2 \text{ NH}_3/\text{NH}_4\text{SO}_4) / ((132,14 \text{ g/mol}) \cdot (0,1 \text{ l})) = 12,24 \text{ mM} = \text{mmoles/l} = \mu\text{moles/ml}$$

en la que 0,0809 gramos es el peso de sulfato amónico para el estándar.

ii. Cálculo de μmoles de NH_3 en estándares de 2,2 ml:

$$\mu\text{moles de NH}_3 \text{ en } 2,2 \text{ ml} = (\mu\text{moles de NH}_3/\text{ml de solución estándar}) \cdot (\text{ml de estándar})$$

iii. Cálculo de μmoles de $\text{NH}_3/0,2 \text{ ml}$:

$$\mu\text{moles de NH}_3/0,2 \text{ ml} = (\mu\text{moles de NH}_3 \text{ en } 2,2 \text{ ml}) \cdot (0,2 \text{ ml}) / (2,2 \text{ ml})$$

iv. Cálculo de la curva de regresión con:

$$x = A_{436}$$

$$y = \mu\text{moles de NH}_3/0,2 \text{ ml}$$

v. A partir de la curva de calibración se calculan los μmoles de $\text{NH}_3/0,2 \text{ ml}$:

$$\mu\text{moles de NH}_3/0,2 \text{ ml} = (\text{pendiente}) \cdot (A_{436}) + \text{Valor de corte con eje y}$$

vi. Se calcula la actividad de la solución de enzima diluido utilizando la fórmula siguiente:

$$\text{Unidades/ml de enzima} = (\mu\text{moles de NH}_3 \text{ liberados}) \cdot (2,20) / (0,2 \cdot 30 \cdot 0,1) \text{ en la que:}$$

2,20 ml = volumen de la etapa 1 (la etapa 1 es la solución de ensayo de enzima)

0,2 ml = volumen de la etapa 1 utilizado en la etapa 2 (la etapa 2 es el desarrollo del color)

30 minutos = tiempo del ensayo en minutos

0,1 ml = volumen de enzima utilizado

vii. El factor de dilución es 50 ml dividido por el volumen de enzima concentrado diluido hasta 50 ml.

viii. Concentración de solución de enzima antes de la dilución = (unidades/ml de solución diluida) \cdot (factor de dilución)

Aunque la invención ha sido expuesta particularmente y se ha descrito haciendo referencia a varias formas de realización, el experto en la materia apreciará que pueden llevarse a cabo otros diversos enfoques para la conservación de la actividad residual de la asparaginasa en solución sin apartarse del alcance de la presente invención, según se define en las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para incrementar la actividad de la asparaginasa en una solución, comprendiendo dicho procedimiento las etapas que consisten en:
- a) tratar un agua potable para preparar un agua tratada, en el que dicha agua tratada comprende además una concentración de cloro inferior a aproximadamente 0,5 ppm; y
- 10 b) mezclar la asparaginasa con dicha agua tratada para preparar una solución de asparaginasa.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende tratar el agua potable con un ácido.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende tratar el agua potable utilizando el carbono activado.
- 15 4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha agua tratada en la etapa a) se trata utilizando una resina de intercambio iónico.
5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha agua tratada en la etapa a) se trata utilizando la ósmosis inversa.
- 20 6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha agua tratada se trata mediante burbujeo de aire.
7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha solución de asparaginasa comprende una actividad residual de por lo menos aproximadamente 80%, en el que opcionalmente la actividad residual es de por lo menos aproximadamente 80% durante por lo menos aproximadamente 30 minutos después de la adición de la asparaginasa al agua potable.
- 25 8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha agua tratada se trata con un agente reductor, en el que opcionalmente dicho agente reductor comprende uno o más agentes seleccionados de entre cloruro estanoso dihidrato, sulfito sódico, metabisulfito sódico, ácido ascórbico, derivados de ácido ascórbico, ácido isoascórbico (ácido eritórbito), sales de derivados de ácido ascórbico, hierro, cinc, iones ferrosos y combinaciones de los mismos.
- 30 9. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha agua tratada comprende un pH inferior a aproximadamente 8,0.
- 35 10. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha agua potable se trata con un aditivo suficiente para reducir el nivel final del cloro a un nivel que es inferior al de si no se ha añadido el aditivo en el que opcionalmente dicha agua tratada se trata con un secuestrador de cloro, o en el que opcionalmente dicho aditivo comprende tiosulfato.
- 40 11. Sistema que comprende:
- una fuente de agua potable;
- 45 una fuente de asparaginasa;
- un sistema de tratamiento que puede hacerse funcionar para tratar el agua potable antes de la mezcla con la asparaginasa; y
- 50 un sistema de suministro que puede hacerse funcionar para mezclar el agua potable tratada y la asparaginasa.
12. Sistema según la reivindicación 11, en el que dicho sistema de tratamiento elimina el cloro o inactiva el cloro.

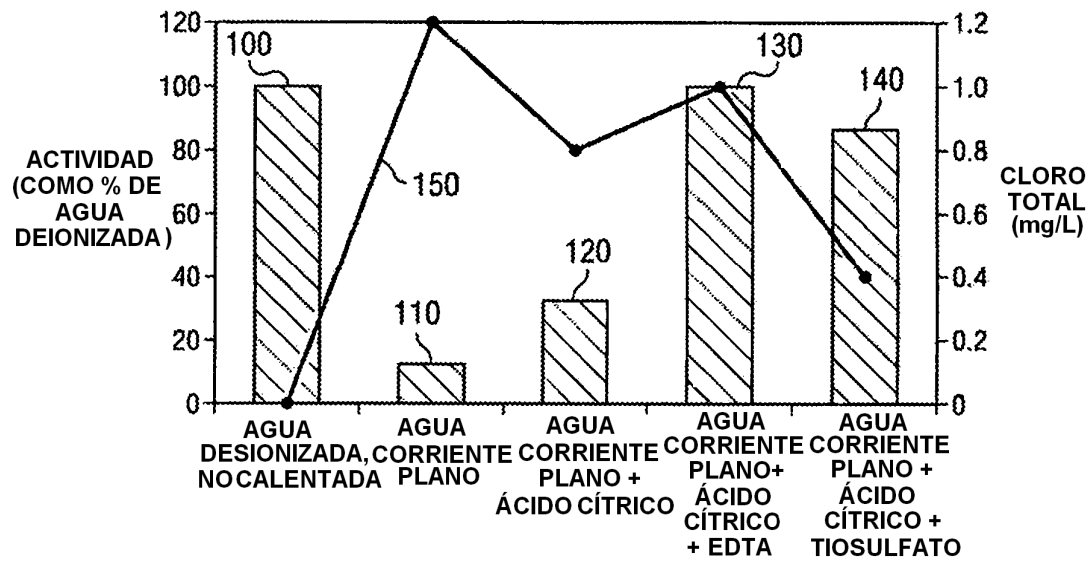


FIG. 1A

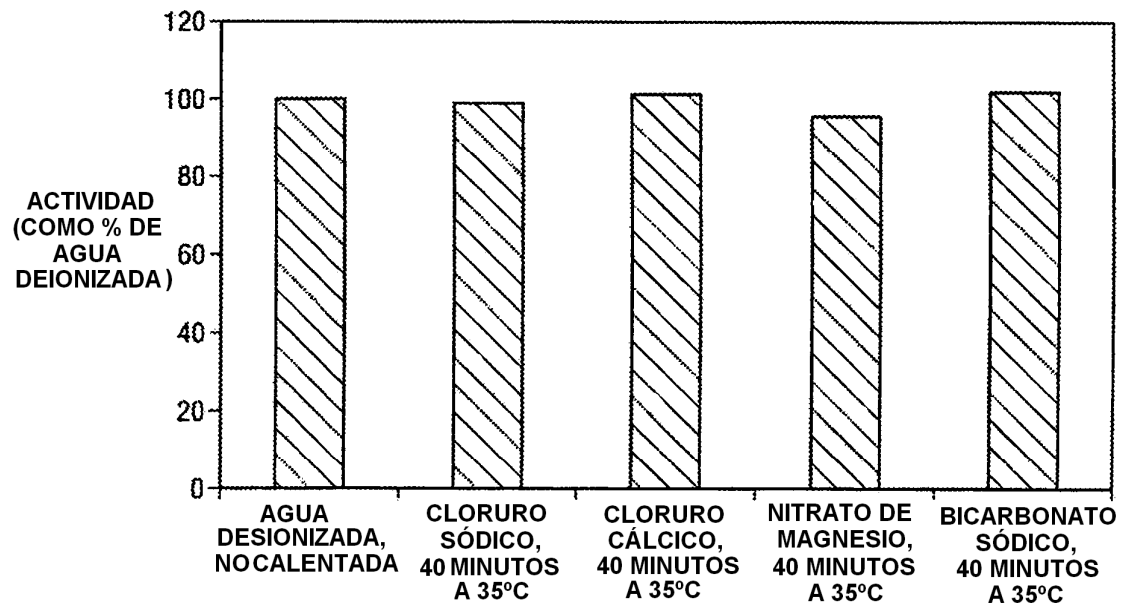


FIG. 1B