

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 171**

51 Int. Cl.:

A23L 1/015 (2006.01)
A23L 1/217 (2006.01)
A21D 8/04 (2006.01)
A23L 1/01 (2006.01)
A23K 1/165 (2006.01)
A21D 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2005 E 11189278 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2013 EP 2436272**

54 Título: **Nuevo procedimiento para la preparación de alimentos que comprende el uso de una asparaginasa**

30 Prioridad:

26.02.2004 EP 04075628

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

03.02.2014

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**STREEKSTRA, HUGO y
EDENS, LUPPO**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 441 171 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nuevo procedimiento para la preparación de alimentos que comprende el uso de una asparaginasa

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un producto alimenticio que implica al menos una etapa de calentamiento. Se describen productos alimenticios obtenidos mediante un procedimiento de este tipo.

10 La acrilamida ha sido producida comercialmente durante un cierto número de años. Por lo tanto, su estado toxicológico está bien evaluado. La acrilamida se utiliza principalmente para la producción de poli(acrilamida), y este último compuesto se utiliza para diversas aplicaciones tales como la producción de agua potable, la estabilización del suelo, el tratamiento de aguas residuales industriales, la obtención de aceite y aplicaciones de laboratorio.

15 La acrilamida se considera como probablemente carcinogénica para animales y seres humanos. En 1991, el Comité Científico sobre Alimentos investigó la acrilamida monomérica en contacto con materiales alimenticios, y concluyó que la acrilamida es un carcinógeno genotóxico. Bergmark *et al.* (Chem. Res. Toxicol. 10, 78-84 (1997)) demostraron que la acrilamida es un componente en el humo del tabaco. Este fue el primer vínculo entre la formación de acrilamida y el calentamiento de material biológico. Recientemente, se publicó la aparición de acrilamida en un cierto número de alimentos fritos y preparados en el horno (Tareke *et al.*, Chem. Res. Toxicol. 13, 517-522, (2000)), provocando una preocupación mundial. La investigación ulterior reveló que cantidades considerables de acrilamida son detectables en una diversidad de alimentos comunes asados, fritos y preparados en el horno, y se demostró que la aparición de acrilamida en los alimentos era el resultado de un proceso de calentamiento.

25 El límite oficial para la contaminación por acrilamida en productos alimenticios en el Reino Unido ha sido establecido en 10 ppb (10 microgramos por kilogramo). Los valores reseñados en la bibliografía exceden de este valor en muchos productos, por ejemplo en cereales, productos hechos de harina, café, patatas fritas en forma de bastones ("French fries") y patatas fritas de bolsa.

30 Una relación entre la dosis administrada de acrilamida y la incidencia de tumores se encontró en ensayos en los que ratas – cuyo destino se siguió durante dos años – fueron alimentadas con acrilamida a través del agua potable (Friedman, H.L. *et al.*, Fundam. Appl. Pharmacol. 85: 154-168 (1986); Johnson *et al.*, Toxicol. Appl. Pharmacol. 85: 154-168 (1986)). Tareke *et al.* investigaron acrilamida ligada a hemoglobina en ratas – tal como N-(2-carbamoyl)etil-valina – en relación con una dieta con contenido en acrilamida. Al combinar estos datos, se calculó que una ingesta diaria de acrilamida de 1,6 µg/kg corresponde a un riesgo de cáncer de 7×10^{-3} para seres humanos por exposición a lo largo de la vida.

40 Se ha propuesto una vía para la formación de acrilamida a partir de aminoácidos y azúcares reductores (Moltram *et al.* Nature 419: 448. (2002)). De acuerdo con esta hipótesis, la acrilamida se forma durante la reacción de Maillard. Durante la cocción, fritura y asado, las reacciones de Maillard contribuyen fuertemente al color, olor y sabor del producto. Asociada con las reacciones de Maillard se encuentra la degradación de Strecker de aminoácidos, y se propuso una vía hacia la obtención de acrilamida. La formación de acrilamida se volvió detectable cuando la temperatura excedía de 120°C, y la tasa de formación más elevada se observó en torno a 170°C. Cuando estaban presentes tanto asparagina como glucosa, se observaron los valores más elevados de acrilamida, mientras que glutamina y ácido aspártico sólo dieron lugar a cantidades traza.

50 El hecho de que la acrilamida se forme principalmente a partir de asparagina y glucosa puede explicar los elevados niveles de acrilamida en productos de base vegetal cocinados en el horno, fritos o asados tales como pan, patatas asadas, patatas fritas en forma de bastones, café o patatas fritas de bolsa. Se sabe que varias materias primas vegetales contienen niveles sustanciales de asparagina. Asparagina es el aminoácido dominante en las patatas (940 mg/kg, correspondiente al 40% del contenido total en aminoácidos). En la harina de trigo, la asparagina está presente a un nivel de aproximadamente 167 mg/kg, correspondiente al 14% del contenido total en aminoácidos libres (Belitz y Grosch, en : Food Chemistry, Springer, Nueva York, 1999).

55 Por lo tanto, en interés de la salud pública existe una necesidad urgente de productos alimenticios que tengan niveles sustancialmente menores de acrilamida o, preferiblemente, estén desprovistos de la misma. En primera instancia, se han iniciado actividades de investigación con el fin de desvelar el mecanismo de la formación de acrilamida en productos alimenticios. Hasta la fecha, los resultados no han conducido todavía a una solución

satisfactoria del problema. Actualmente, las compañías de alimentos están investigando las posibilidades de evitar la formación de acrilamida reduciendo la temperatura de los procesos de cocción en horno y de asado. Sin embargo, este tipo de adaptaciones resultarán inherentemente en productos alimenticios con propiedades de sabor alteradas (menos productos Maillard) o con una composición alterada (mayor contenido en grasas).

5 La solicitud de patente WO04/030468 en tramitación proporciona un método para evitar la formación de acrilamida mediante el tratamiento de una forma intermedia de un producto alimenticio con una enzima que disgrega los aminoácidos implicados en la formación de acrilamida. Sin embargo, en casos particulares, este método puede ser difícil de aplicar. Por ejemplo, la forma de compuesto intermedio puede contener un alto nivel de este tipo de aminoácidos, como es el caso para el contenido en asparagina de productos derivados de la patata. Niveles altos de este tipo pueden requerir tiempos de procesamiento que sean demasiado prolongados, y la calidad del producto puede verse comprometida por una amplia modificación de los componentes principales. También, si la forma intermedia es una fracción macroscópica o corte de un alimento sólido o semi-sólido, puede ser imposible exponer el suministro completo del o de los aminoácidos relevantes a la enzima.

15 Sorprendentemente, los autores de la invención han encontrado que no es necesario eliminar ni convertir la totalidad del o de los aminoácidos relevantes, sino que es suficiente con hacerlo en una capa fina en la superficie del producto. La separación o conversión de estos aminoácidos se obtiene preferiblemente mediante la adición de una enzima adecuada.

20 Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de un producto alimenticio, que comprende:

- añadir una enzima a la superficie de una forma intermedia del producto alimenticio,
- y calentar al menos una parte del producto alimenticio intermedio hasta una temperatura de 25 100°C o superior,

en donde la enzima es capaz de modificar un aminoácido presente en la forma intermedia del producto alimenticio, aminoácido que está implicado en la formación de acrilamida en ausencia de la enzima durante el calentamiento del producto alimenticio intermedio, en donde la enzima es una asparaginasa obtenida a partir de un microorganismo seleccionado del grupo que consiste en especies de *Escherichia*, *Erwinia*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Aspergillus* y *Bacillus*, en donde la forma intermedia del producto alimenticio comprende parte de plantas comestibles intactas, y en donde el tiempo de procesamiento para permitir que actúe la enzima antes de que se caliente el alimento es de a lo sumo 1 hora.

30 En general, el calentamiento del al menos parte del producto alimenticio intermedio tiene lugar después de la adición de la enzima.

35 Se utiliza una enzima que es capaz de modificar una cadena lateral del aminoácido asparagina.

40 Ventajosamente, la enzima se añade en una cantidad suficiente para modificar un aminoácido hasta un grado tal que durante la etapa de calentamiento subsiguiente se forme 50% menos, preferiblemente 70% menos, o más preferiblemente 90% menos de acrilamida en comparación con un producto alimenticio en el que no se ha añadido enzima alguna a la forma intermedia.

45 De acuerdo con la invención, una enzima adecuada se aplica al exterior del intermedio del producto alimenticio. Preferiblemente, el exterior del intermedio del producto alimenticio representa la superficie a la que se aplica el calor de la etapa de calentamiento. Los autores de la invención también han encontrado que la difusión de la enzima adecuada desde el exterior del intermedio del producto alimenticio al interior es suficiente para reducir los niveles del o de los aminoácidos relevantes en la capa exterior, reduciéndose eficazmente con ello la cantidad de acrilamida formada tras el calentamiento.

50 El término "alimento" se define para incluir tanto alimentos para el consumo humano como alimentos para el consumo animal. Por lo tanto, el término, "alimento" debería considerarse que significa "alimento, alimento para mascotas o pienso" a lo largo de este documento.

55 El espesor de la capa externa de un producto alimenticio depende del producto alimenticio, de su preparación y de su aplicación. En general, la capa externa es de un espesor de 3 mm, preferiblemente a lo sumo 2 mm y lo más preferiblemente de a lo sumo 1 mm de espesor.

La aplicación de una enzima adecuada al exterior de un intermedio de producto alimenticio tiene un cierto número de ventajas frente a la técnica existente. Los tiempos de procesamiento son más cortos, dado que la enzima ha de difundirse solamente a través de una capa fina y no a través de todo el producto. Se necesita menos enzima, ya que se ha de separar una menor cantidad de aminoácidos, lo que resulta en una ventaja de costes. La calidad del producto es mayor, debido a que los aminoácidos en el interior no se ven afectados. Finalmente, la presente invención se puede utilizar en alimentos sólidos y semi-sólidos.

El documento WO 2004/032648 es una publicación bajo el Art. 54(3-4) CPE, que describe un método para preparar un producto tratado térmicamente con un bajo contenido en agua a partir de una materia prima que comprende hidratos de carbono, proteínas y agua.

El documento WO 2004/026043 es una publicación bajo el Art. 54(3-4) CPE que describe un método para la reducción de acrilamida en productos alimenticios. Dicho método pertenece a añadir una enzima reductora de asparagina a un material alimenticio y calentar el material alimenticio para formar el producto acabado.

Zyzak DV *et al.*, "Acrylamide formation mechanism in heated foods", Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 51, páginas 4782-4787, presenta un mecanismo para la formación de acrilamida y describe la separación de asparagina con asparaginasa en un producto de patata machacada tratado en microondas.

La presente invención proporciona un procedimiento para la producción de un producto alimenticio que implica al menos una etapa de calentamiento, que comprende añadir una enzima adecuada a una forma intermedia de dicho producto alimenticio antes de dicha etapa de calentamiento, en que dicha enzima reduce eficazmente el nivel de aminoácidos implicados en la formación de acrilamida durante dicha etapa de calentamiento, y en que dicha enzima se introduce en la superficie de dicha forma intermedia, y/o dicha etapa de calentamiento se aplica a la superficie a la que se ha aplicado dicha enzima, en donde la enzima es una asparaginasa obtenida de un microorganismo seleccionado del grupo que consiste en especies de *Escherichia*, *Erwinia*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Aspergillus* y *Bacillus*, en donde la forma intermedia del producto alimenticio comprende parte de plantas comestibles intactas, y en donde el tiempo de procesamiento para permitir que actúe la enzima antes de que se caliente el alimento es de a lo sumo 1 hora.

Una forma intermedia del producto alimenticio se define en esta memoria como cualquier forma que se produce durante el proceso de producción que preferiblemente tiene ya la forma y el tamaño del producto alimenticio que se somete a la o las etapas de calentamiento. En otro sentido, es característico de la forma intermedia del producto alimenticio que sus superficies específicas sean sustancialmente las mismas que las superficies específicas de la forma del producto alimenticio que se somete a la o las etapas de calentamiento, a pesar de que es admisible que se formen superficies específicas adicionales después de la introducción de la enzima, por ejemplo mediante corte, siempre que la nueva superficie específica constituya una fracción relativamente secundaria de la superficie total, preferiblemente menor que el 20% de la superficie total, más preferiblemente menor que el 15% de la superficie total y lo más preferiblemente menor que el 10% de la superficie total.

La forma intermedia no comprende necesariamente todas las materias primas individuales y/o aditivos y/o auxiliares de procesamiento. Por ejemplo, para el producto alimenticio patatas fritas en forma de bastones, la forma intermedia comprende las rodajas de patata cruda cortadas, las rodajas de patata cocinadas y las rodajas de patata después de una primera etapa de fritura industrial (pero antes de las subsiguientes etapas de fritura). El que, cuando, o si se añaden otros componentes tales como aliños, aderezos u otros aditivos no es relevante con respecto a la presente invención.

La forma intermedia a la que se aplica la enzima no tiene que ser sometida directamente a la etapa de calentamiento – pueden tener lugar etapas de procesamiento adicionales entre la adición de la enzima y la etapa de calentamiento.

El producto alimenticio puede prepararse a partir de al menos una materia prima que es de origen vegetal, por ejemplo tubérculos tales como patata, boniato o mandioca; legumbres tales como guisantes o habas de soja; plantas aromáticas tales como tabaco, café o cacao; nueces; o cereales tales como trigo, centeno, grano, maíz, cebada, avena a medio moler, trigo sarraceno, arroz o avena. En el alcance de esta invención están incluidos también productos alimenticios producidos a partir de más de una materia prima, por ejemplo productos alimenticios que comprenden tanto grano como patata.

Una clase de productos alimenticios en los que puede ser adecuado el procedimiento de acuerdo con la invención está formada por productos que comprenden partes de vegetales comestibles intactas, cortes o rodajas de las mismas. Ejemplos de esta clase de productos fritos preparados a partir de tubérculos de plantas tales como

patatas fritas en forma de bastones (“pommes frites”, “chips”) o patatas fritas de bolsa, preparadas a partir de frutos tales como virutas de plátano o de manzana, o preparadas a partir de vegetales en tallo tales como virutas de espárragos.

5 Se sabe que las materias primas como las citadas anteriormente contienen cantidades sustanciales de aminoácidos que están implicados en la formación de acrilamida durante la etapa de calentamiento del proceso de producción. Alternativamente, estos aminoácidos pueden proceder de otras fuentes que no sean las materias primas, p. ej. a partir de hidrolizados de proteínas tales como extractos de levadura, extractos de carne, hidrolizado de soja, hidrolizado de caseína y similares, o capas o guarniciones tales como queso, productos de soja semi-sólidos o migas de pan, que se pueden utilizar como un aditivo en el proceso de producción de los alimentos.

10 Un proceso de producción preferido es la fritura en aceite abundante de cortes o rodajas de partes comestibles de una planta, por ejemplo de rodajas finas de patata para preparar patatas fritas de bolsa, o de cortes de patata gruesos para preparar patatas fritas en forma de bastones.

15 Etapas de calentamiento preferidas son aquellas a las que una parte del producto alimenticio intermedio, en particular la superficie del producto alimenticio, queda expuesta a temperaturas a las que se fomenta la formación de acrilamida, por ejemplo 100°C o superiores, preferiblemente 105°C o superiores, lo más preferiblemente 120°C o superiores, o temperaturas de hasta 250°C. La etapa de calentamiento en el proceso de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo en hornos, por ejemplo a una temperatura entre 150-250°C, tal como la para la cocción de pan y otros productos farináceos, o en aceite tal como la fritura de patatas fritas en forma de bastones, patatas fritas de bolsa o tofu, por ejemplo a 150-200°C.

20 La enzima utilizada en el proceso de la invención es una enzima capaz de modificar las cadenas laterales de aminoácidos que están implicados en la formación de acrilamida durante la etapa de calentamiento del proceso de producción, de manera que durante esta etapa de calentamiento se forma menos acrilamida que sin el tratamiento con esta enzima. Por “enzima” se quiere dar a entender “una enzima” así como “una combinación de más de una enzima”. La enzima es capaz de modificar la cadena lateral de al menos el aminoácido asparagina. La enzima es capaz de modificar el aminoácido asparagina cuando la asparagina está presente como el aminoácido libre, o cuando está unida a otras moléculas tales como en péptidos, proteínas, lipoproteínas o glicoproteínas.

25 La enzima utilizada en el proceso de la invención pertenece a la categoría de enzimas EC 3.5.1 (enzimas que actúan sobre los enlaces carbono-nitrógeno, distintos a los enlaces peptídicos), particularmente a la categoría de enzimas asparaginasa (EC 3.5.1.1)).

30 Preferiblemente, la preparación de la enzima utilizada en el proceso de la invención se deriva de un microorganismo y se obtiene mediante procesos de fermentación conocidos en la técnica.

35 La asparaginasa se puede obtener de diversas fuentes, por ejemplo de plantas, de animales o de microorganismos tales como especies de *Escherichia*, *Erwinia*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Aspergillus* y *Bacillus*. Un ejemplo de una cepa de *Escherichia* adecuada es *Escherichia coli*. Un ejemplo de una cepa de *Erwinia* adecuada es *Erwinia crysanthemii*. Ejemplos de cepas de *Streptomyces* adecuadas son *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*. Ejemplos de cepas de *Aspergillus* adecuadas son *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus niger*. Ejemplos de cepas de *Bacillus* adecuadas son *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*,
45 *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, o *Bacillus subtilis*. Un ejemplo de métodos adecuados para obtener asparaginasa a partir de cepas de *Bacillus*, *Streptomyces*, *Escherichia* o *Pseudomonas* se describe en el documento WO03/083043. Sin embargo, el documento WO03/083043 no describe el uso de asparaginasa para disminuir la cantidad de acrilamida en los alimentos según se describe en la presente invención. Enzimas glutaminasa están
50 comercialmente disponibles de las compañías Daiwa Kasei KK y Amano.

Preferiblemente, la enzima se obtiene a partir de organismos de calidad alimenticia, por ejemplo *Aspergillus niger* o *Bacillus subtilis*.

55 Preferiblemente, la enzima se proporciona en una forma líquida para permitir una dispersión fácil sobre la superficie del producto, pero también son posibles formas en polvo secas. Independientemente de la formulación de la enzima, se pueden aplicar cualesquiera aditivos y estabilizadores conocidos como útiles en la técnica para mejorar y/o mantener la actividad de la enzima. Cuando la enzima está contenida en una forma líquida, ésta se

puede aplicar al producto por cualquier método concebible, por ejemplo mediante empapamiento o pulverización.

Después de la aplicación de la enzima al producto, se requiere un determinado tiempo de procesamiento para permitir que la enzima actúe antes de calentar el alimento, debido a que se ha de obtener una reducción sustancial de los aminoácidos capaces de generar acrilamida, y debido a que la etapa de calentamiento inactivará generalmente la enzima. El tiempo de procesamiento supondrá a lo sumo 1 hora. En general, se pueden alcanzar tiempos de procesamiento de al menos 5 minutos. Preferiblemente, el tiempo de procesamiento oscila entre 10 minutos, más preferiblemente entre 15 minutos y, lo más preferiblemente entre 20 minutos y 1 hora. Ha de entenderse que cuanto más enzima se añada, bastará con un tiempo de procesamiento más corto para que la enzima alcance el efecto deseado, y viceversa.

El producto alimenticio difiere del alimento obtenido mediante el proceso de acuerdo con el documento WO04/030468 en el siguiente aspecto: el producto alimenticio obtenido en el procedimiento de acuerdo con la invención comprende una baja cantidad de acrilamida, pero también una elevada cantidad de asparagina o glutamina. En contraposición, el alimento obtenido de acuerdo con el proceso descrito en esta técnica anterior también contiene una cantidad significativamente disminuida de asparagina o glutamina. Esto no es deseable desde un punto de vista nutricional. En el procedimiento de acuerdo con la invención, al menos el 50% de la cantidad de asparagina o glutamina queda retenido en el producto alimenticio obtenible mediante el procedimiento. Preferiblemente, está presente incluso el 60% de la cantidad original de asparagina o glutamina, incluso más preferiblemente más del 70%, y lo más preferiblemente más del 80%.

MATERIALES Y MÉTODOS

Medición de acrilamida

Pre-tratamiento de la muestra

600 mg de muestra secada y homogeneizada se extrajeron utilizando 5 ml de agua miliQ. Al extracto se añadió 1 µg de ¹³C₃ acrilamida estándar interna en disolución (CIL). Después de 10 minutos de centrifugación (6000 rpm), 3 ml de la capa superior se dispusieron sobre una columna Extreluut-3BT (Merck). Utilizando 15 ml de acetato de etilo, la acrilamida se eluyó a partir de la columna. El acetato de etilo se evaporó bajo una suave corriente de nitrógeno para reducir el volumen hasta aproximadamente 0,5 ml.

Condiciones cromatográficas

La disolución en acetato de etilo se analizó utilizando la cromatografía de gases. La separación se obtuvo utilizando una columna CP-Wax 57 (Varian) (longitud 25 m, diámetro interno 0,32 mm, película 1,2 µm) y helio en calidad de gas portador con un caudal constante de 5,4 ml/min. Se realizó una inyección de 3 µl sin división. La temperatura del horno se mantuvo en 50°C durante 1 minuto, después de lo cual la temperatura se elevó hasta 30°C/min hasta 220°C. Después de 12 minutos a temperatura constante de 220°C, el horno se enfrió y se estabilizó antes de la inyección siguiente.

La detección se realizó utilizando espectrometría de masas por ionización química en línea en el modo de ion positivo, con metano en calidad de gas de ionización. Los iones característicos m/z 72 (acrilamida) y m/z 75 (¹³C₃ acrilamida) se monitorizaron para la cuantificación.

Equipo utilizado

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

Medición de la actividad de asparaginasa

La actividad de asparaginasa se midió de acuerdo con Shirfrin et al. (Shirfrin, S, Parrott, C.L. y Luborsky, S.W. (1974), Journal of Biological Chemistry 249, 1445-1340). El principio de este ensayo enzimático es la determinación del NH₃ liberado como resultado de la actividad de asparaginasa.

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

Disolución A: ácido cítrico 0,1 M + Na₂HPO₄·2H₂O 0,2 M, pH = 5,5

Disolución B: L-asparagina 0,189 M (Sigma)
 Disolución C: (NH₄)₂SO₄ 0,006 M (Merck)
 Disolución D: ácido tricloroacético al 25% (v/v) (Merck)
 Disolución E: reactivo de color de amoníaco (Aldrich)

Las disoluciones para las mediciones de la actividad de asparaginasa han de ser preparadas recientemente. En la Tabla 1 se resumen las disoluciones utilizadas para la curva de calibración (CP = punto de calibración).

Tabla 1 Programa de disoluciones de calibración

Disolución añadida (ml)	CP1	CP2	CP3	CP4	Ensayo de enzima de referencia	Ensayo de enzima
A	1	1	1	1	1	1
B	0	0	0	0	0,2	0,2
C	0	0,25	0,5	1	0	0
Agua desionizada	1,1	0,85	0,6	0,1	0,8	0,8
Volumen de reacción Cantidad limitadora de la velocidad de la disolución enzimática	0	0	0	0	0	0,1

Disoluciones de acuerdo con la Tabla 1 se invirtieron inmediatamente y se incubaron a 37°C mediante inversión. Después de 30 minutos, la reacción se terminó mediante la adición de 0,1 ml de disolución D. Para el ensayo de la enzima de referencia, se añadieron subsiguientemente 0,1 ml de disolución enzimática. Las disoluciones se mezclaron y centrifugaron inmediatamente para separar cualquier precipitado. 0,2 ml de los sobrenadantes se pipetearon en tubos que contenían 4,3 ml de agua desionizada y 0,5 ml de disolución E. Estas mezclas se combinaron inmediatamente y al cabo de 1 minuto se midió la A^{438 nm} para las muestras de calibración, referencias y ensayos:

La curva de calibración se preparó como sigue:

$$\Delta \text{ punto de calibración } A^{438 \text{ nm}} = \text{ punto de calibración } A^{438 \text{ nm}} - \text{ punto de calibración } 1 A^{438 \text{ nm}}$$

Una curva patrón se preparó representando el $\Delta A^{438 \text{ nm}}$ del patrón frente a la concentración de amoníaco (NH₃). La actividad de la enzima se calculó como sigue:

$$\Delta \text{ ensayo de enzima } A^{438 \text{ nm}} = \text{ ensayo } A^{438 \text{ nm}} - \text{ referencia del ensayo } A^{438 \text{ nm}}$$

Los μmoles de NH₃ liberados se determinaron utilizando la curva patrón:

$$\text{Unidades / ml} = \frac{\mu\text{moles liberados } NH_3 \times V_s}{V_i \times t_i \times V_e}$$

en que:

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

V_i = volumen de la disolución de reacción utilizado para la segunda reacción para determinar NH₃; 0,2 ml

t_i = tiempo de incubación en minutos; 30

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

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

Una unidad de actividad de asparaginasa se define como 1 μmol de NH₃ que es liberado a partir de L-asparagina por minuto, a pH 5,5 a 37°C, a menos que se establezca de otro modo. Preferiblemente, la actividad de asparaginasa se determina al valor de pH de la aplicación pretendida.

Materiales

La asparaginasa se obtuvo de *Escherichia coli* (Sigma, con una actividad específica de 285 unidades/mg) o *Aspergillus niger* (véanse los ejemplos para detalles de fermentación).

- 5 Medio CSL que consistía en: 100 g/l de sólidos de maceración de maíz (Roquette), 1 g/l de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g/l de glucosa $\cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,25 g/l de Basildon (antiespumante). Los ingredientes se disolvieron en agua desmineralizada y el pH se ajustó hasta pH = 5,8 con NaOH o H_2SO_4 ; matraces de 100 ml con deflectores y bola de espuma se llenaron con 20 ml de caldo de fermentación y se esterilizaron durante 20 minutos a 120°C, después de lo cual se añadieron a cada uno de los matraces 200 μl de una disolución que contenía 5000 UI/ml de penicilina y 5 mg/ml de estreptomina después de enfriar hasta la temperatura ambiente.

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

20 EJEMPLO 1

Fermentación de *Aspergillus niger*

- 25 La asparagina, codificada por la secuencia de nucleótidos proporcionada en la solicitud de patente PCT/EP03/14553 en tramitación, se obtuvo construyendo plásmidos de expresión que contenían la secuencia de ADN, transformando una cepa de *A. niger* con este plásmido y haciendo crecer a las cepas de *Aspergillus niger* de la siguiente manera.

- 30 Esporas recientes (10^6 - 10^7) de cepas de *A. niger* se inocularon en 20 ml de medio CSL (matraz de 100 ml, deflector) y se hicieron crecer durante 20-24 horas a 34°C y 170 rpm. Después de la inoculación de 5-10 ml de pre-cultivo de CSL en 100 ml de medio CSM (matraz de 500 ml, deflector), las cepas se hicieron crecer a 34°C y 170 rpm durante 3-5 días.

- 35 Los sobrenadantes exentos de células se obtuvieron mediante centrifugación en tubos Greiner de 50 ml (30 minutos, 5000 rpm, 4°C) y todas las etapas subsiguientes se realizaron en hielo. Los sobrenadantes se pre-filtraron sobre un filtro de microfibras de vidrio GF/A de Whatman (150 mm Ø) para separar las partículas mayores, se ajustaron a pH = 5 con KOH 4N (si es necesario) y se filtraron con succión en condiciones estériles a través de un filtro de 0,2 μm (parte superior del frasco) para separar el material fúngico. Las fracciones sobrenadantes se almacenaron a 4°C (o -20°C).

40 EJEMPLO 2

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

- 45 **Etapa 1 – Preparación de ultra-filtrados**

- 50 Fracciones de sobrenadante de los cultivos según se obtienen en el Ejemplo 1 se ultra-filtraron para obtener una mayor concentración de enzima y para separar los contaminantes de bajo peso molecular que pudieran interferir con las determinaciones de la actividad enzimática y los ensayos de aplicación. Ultra-filtraciones de 300 ml de sobrenadante se realizaron en un sistema Millipore Labscale TFF equipado con un filtro con un corte de 10 kDa.

- 55 Dependiendo de su color y volumen, las muestras se lavaron 3-5 veces con 10-30 ml de agua desmineralizada fría. Los volúmenes finales de las disoluciones enzimáticas eran 10-30 ml, y a estas disoluciones se las alude ulteriormente como “ultra-filtrados”.

Etapa 2 – Determinación de la concentración de asparaginasa mediante A^{280} y HPSEC

La concentración de la asparaginasa de *Aspergillus niger* en el ultra-filtrado se calculó a partir de la extinción a 280 nm (A^{280}) atribuible a la asparaginasa y el coeficiente de extinción molar calculado de la asparaginasa. La medición de la A^{280} se realizó en un espectrofotómetro Uvikon XL Secomam (Beun de Ronde, Abcoude, Holanda).

- 5 El coeficiente de extinción molar de una enzima a 280 nm se puede calcular a partir del número de residuos de tirosina, triptófano y cisteína por molécula de enzima (S. C. Gill y P.H. von Hippel, Anal. Biochem. 182, 319-326 (1989)). Los coeficientes de extinción molar de estos aminoácidos a 280 nm son 1280, 5690 y 120 $M^{-1}.cm^{-1}$, respectivamente. El número de residuos de tirosina, triptófano y cisteína en la asparaginasa de *Aspergillus niger* de la invención se puede deducir a partir de las secuencias de proteínas según se proporciona en la solicitud de patente PCT/EP/03/14553 en tramitación. El coeficiente de extinción calculado de la asparaginasa de *Aspergillus niger* se da en la Tabla 2.

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

Nº de aminoácidos			P.M. calculado	Coeficiente de extinción calculado a 280 nm	
Trp	Tyr	Cys	(Da)	$M^{-1}.cm^{-1}$	$/mg/ml)^{-1}.cm^{-1}$
0	9	2	39584	11760	0,3

- 15 La extinción del ultra-filtrado a 280 nm (A^{280}) que es atribuible a la asparaginasa depende de la pureza de la muestra de enzima. Esta pureza se determinó utilizando HPSEC (cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución) con una columna TSK SW-XL (300*7,8 mm; intervalo de PM 10-300 kDa). La elución se realizó con un tampón fosfato de sodio 25 mM (pH = 6,0) a un caudal de 1 ml/min. El volumen de inyección era 5-100 μ l. La absorbancia se monitorizó a 280 nm.

- 20 La A^{280} en el ultra-filtrado atribuible a la asparaginasa de la invención se obtuvo a partir de la relación de la superficie pico del pico de la asparaginasa en el cromatograma y la superficie total de los picos que absorben a 280 nm. La concentración de asparaginasa en el ultra-filtrado se calculó luego multiplicando la A^{280} del ultra-filtrado por esta relación, y dividiendo por 0,3 (el coeficiente de extinción calculado). La disolución contenía 40 mg de proteína/ml.

Etapa 3 – Determinación de la actividad de asparaginasa

- 30 La disolución de asparaginasa de *Aspergillus niger* mostraba una actividad de 40.000 U/ml a pH 5,5. Por lo tanto, se puede calcular una actividad específica de 1000 unidades/mg de proteína tomando en consideración el contenido en proteína de 40 mg/ml.

EJEMPLO 3

- 35 **Preparación de patatas fritas en forma de bastones, y la influencia de la asparaginasa de *Aspergillus niger* sobre el nivel de acrilamida**

- 40 Patatas (variedad Bintje; [muestra: *material de partida*]) se mondaron con un mondador (Glastra) y se cortaron en tiras (Slitmaster) de 50x10x10 mm. Se desecharon cortes que se encontraban fuera de tamaño. A partir de estas patatas cortadas se seleccionaron, por disolución, aprox. 1600 g de patatas fritas en forma de bastones. Las patatas fritas en forma de bastones se blanquearon (2 min a 80°C + 20 min a 65°C) y se enfriaron en agua fría (1 min). En este momento, se tomó una muestra del blanco [muestra: *después del blanqueo*]. Después de enfriar, las patatas fritas en forma de bastones se sumergieron en una de las siguientes disoluciones en 4,5 L de agua del grifo de 35°C:

Tabla 3.1: Tratamiento de la muestra durante precipitación de patatas fritas servidas calientes

<u>Código</u>	<u>Tratamiento</u>	<u>Tiempo de tratamiento</u>	<u>Disolución en 4,5 L de agua del grifo</u>
1	en blanco	10 min	SAPP ($Na_2H_2P_2O_7$) al 0,5%, pH = 5
50 2	11500 U/L	10 min	SAPP al 0,5%, 11,25 ml de disolución de asparaginasa
3	4600 U/L	10 min	SAPP al 0,5%, 4,5 ml de disolución de asparaginasa
4	1800 U/L	10 min	SAPP al 0,5%, 1,8 ml de disolución de asparaginasa

La disolución de asparaginasa utilizada tenía una concentración de 4600 U/ml. Ha de reconocerse que la dosificación exacta de la enzima no es un número relevante, ya que se ve influenciada por la relación entre las patatas y el volumen de la disolución de empapamiento en este método particular de aplicación. Por motivos de conveniencia, se utilizó un volumen más bien grande y, por lo tanto, se requerían dosificaciones de enzima volumétricas más bien grandes.

Subsiguientemente, las patatas fritas para servir en caliente se secaron a 70°C hasta producirse una pérdida de peso de 13-15% y un frito parcial en aceite (grasa de palma líquida, Rodi) durante 1 min a 180°C en una freidora comercial de una tanda de 35 litros (ANBO). Las patatas fritas en forma de bastones, parcialmente fritas, se enfriaron (20 min a 3°C), congelaron (20 min a -30°C) en un equipo Pool y se almacenaron durante una noche a -20°C [muestra: *parcialmente fritas*]. Al día siguiente, 750 g de patatas fritas en forma de bastones congeladas se acabaron de freír durante 3 min a 180°C, en una freidora comercial de una tanda de 35 litros (ANBO) y se hicieron fotografías.

Después, se midió el color (véase más adelante) y se tomó una muestra al azar de 20 patatas [muestra: *frita por completo entera*]. Una muestra extra se congeló ligeramente y la corteza se separó del núcleo [muestra: *corteza frita acabada y núcleo frito acabado*]. Todas las muestras se congelaron rápidamente con nitrógeno líquido, se mantuvieron congeladas y subsiguientemente se liofilizaron. Se midió la masa de las muestras después de la congelación con nitrógeno líquido y después de la liofilización con el fin de obtener una indicación sobre el contenido en materia seca.

La Tabla 3.2 muestra los resultados del contenido en materia seca de las muestras, basado en la masa antes y después de la liofilización.

Tabla 3.2: Materia seca de diferentes muestras de material de patata y patatas fritas servidas calientes

Código	Tratamiento	Muestra	Materia seca (%)
	Patata pelada	material de partida	23,4%
	en blanco antes de tratamiento con enzima	después del blanqueo	18,5%
30	1	en blanco, 10 min, sin enzima	parcialmente frita 31,6%
			frita acabada entera 45,1%
			corteza frita acabada 63,0%
			núcleo frito acabado 27,4%
35	2	10 min, 11,5 ml de enzima en 4,5 L	parcialmente frita 32,1%
			frita acabada entera 47,5%
			corteza frita acabada 66,6%
			núcleo frito acabado 27,6%
40	3	10 min, 4,5 ml de enzima en 4,5 L	parcialmente frita 30,4%
			frita acabada entera 45,1%
			corteza frita acabada 65,9%
			núcleo frito acabado 26,2%
45	4	10 min, 1,8 ml de enzima en 4,5 L	parcialmente frita 29,6%
			frita acabada entera 43,3%
			corteza frita acabada 64,4%
			núcleo frito acabado 25,5%

Es claro que el tratamiento enzimático no influía significativamente en el contenido en materia seca de las diversas muestras.

El color de las patatas fritas en forma de bastones (fritas acabadas) se determinó con el Ensayo del Color de las Patatas (Ferguson, BMA, Holanda). El FCT (siglas inglesas del Ensayo del Color de las Patatas) se calibró con el verificador de color Gretag Macbeth Color Rendition Chart. Se tomaron 20 tiras al azar de una tanda frita y se colocaron en una placa azul. El color se determinó mediante análisis de imágenes por ordenador de cada una de las tiras individuales y se clasificó a partir de la tabla de color de la USDA con la escala '000', '00', '0', '1', '2', '3' y '4'. Basado en la medición de las tiras individuales, se calculó el índice de color (fritura) (KLI). La escala del KLI abarca de 0 a 6, en que 0 es amarillo pálido y 6 es pardo oscuro. Patatas fritas en forma de bastones con un valor

KLI > 4 son consideradas demasiado oscuras.

La Tabla 3.3 muestra los resultados del índice de color, determinado mediante FCT. No existía influencia sistemática alguna del tratamiento enzimático sobre el desarrollo del color. Con este método de medición, las muestras 2, 3 y 4 no eran significativamente diferentes de la muestra 1. La inspección visual de las muestras no proporcionó diferencia en el aspecto visual de las muestras.

Tabla 3.3 Índice de color (KLI) determinado con el FCT

Código	Tratamiento	FCT
1	en blanco, 10 min, sin enzima	2,50
2	10 min, 11,5 ml de enzima en 4,5 L	2,35
3	10 min, 4,5 ml de enzima en 4,5 L	2,35
4	10 min, 1,8 ml de enzima en 4,5 L	2,30

Las muestras liofilizadas se analizaron en cuanto a su contenido de los aminoácidos, asparagina, aspartato, glutamina y glutamato, utilizando HPLC, y para acrilamida utilizando el método descrito anteriormente.

Se encontró que los niveles de los aminoácidos se habían reducido mediante la etapa de blanqueo. Además de ello, las concentraciones de estos aminoácidos también eran menores en las muestras con corteza que en el núcleo de los productos fritos acabados. De hecho, las concentraciones de aminoácidos en el núcleo eran esencialmente las mismas que en la patata cruda. En contraposición, el tratamiento con asparaginasa mostró una conversión dependiente de la dosis de asparagina en aspartato en las muestras con corteza.

Tabla 3.4: Niveles de aminoácidos y acrilamida en la corteza de patatas fritas en forma de bastones fritos acabadas

Código	Tratamiento	asparagina	aspartato	acrilamida
1	en blanco, 10 min, sin enzima	+++	+	+++
2	10 min, 11,5 ml de enzima en 4,5 L	+/-	++	+/-
3	10 min, 4,5 ml de enzima en 4,5 L	+	++	+
4	10 min, 1,8 ml de enzima en 4,5 L	++	+	++

Por lo tanto, utilizando la asparaginasa, se ha manifestado posible obtener patatas fritas en forma de bastones con una concentración muy baja de asparaginasa en su corteza, dando como resultado niveles mucho menores de acrilamida, al tiempo que mantienen un elevado nivel de aminoácidos de una composición virtualmente inalterada en su interior.

Puede concluirse que el uso de asparaginasa en la disolución de empapamiento disminuye la cantidad de acrilamida formada en la corteza de patatas fritas en forma de bastones durante un proceso de fritura con aceite abundante subsiguiente.

Se ha encontrado que el contenido en aminoácidos del interior de una patata frita en forma de bastón no se veía significativamente afectado por el tratamiento completo de blanqueo, inmersión, fritura parcial, congelación y fritura de acabado. Por lo tanto, se puede concluir que si se fuera a medir en patatas fritas no fraccionadas, cualquier cambio observado en los niveles de estos aminoácidos ha de ser debido a cambios en la composición de las secciones externas que van a formar la corteza después del proceso de fritura. Por lo tanto, reducciones en los niveles de asparagina o glutamina que excedan de 30% cuando se miden en la patata frita intacta deben ser considerados como altamente significativos y suficientes para el fin de prevenir la formación de acrilamida en el subsiguiente proceso de fritura.

REIVINDICACIONES

- 1.- Procedimiento para la producción de un producto alimenticio, que comprende:
- añadir una enzima a la superficie de una forma intermedia del producto alimenticio,
 - y calentar al menos una parte del producto alimenticio intermedio hasta una temperatura de 100°C o superior,
- en donde la enzima es capaz de modificar un aminoácido presente en la forma intermedia del producto alimenticio, aminoácido que está implicado en la formación de acrilamida en ausencia de la enzima durante el calentamiento del producto alimenticio intermedio, en donde la enzima es una asparaginasa obtenida a partir de un microorganismo seleccionado del grupo que consiste en especies de *Escherichia*, *Erwinia*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Aspergillus* y *Bacillus*, en donde la forma intermedia del producto alimenticio comprende parte de plantas comestibles intactas, y en donde el tiempo de procesamiento para permitir que actúe la enzima antes de que se caliente el alimento es de a lo sumo 1 hora.
- 2.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el tiempo de procesamiento para permitir que la enzima actúe antes de calentar el alimento es de al menos 5 minutos.
- 3.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que la forma intermedia del producto alimenticio comprende cortes o rodajas de partes de plantas comestibles intactas.
- 4.- Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la enzima se añade en una cantidad suficiente para modificar un aminoácido hasta tal grado que durante la subsiguiente etapa de calentamiento se forme un 50% menos, preferiblemente 70% menos, o más preferiblemente 90% menos de acrilamida, en comparación con un producto alimenticio en el que no se ha añadido enzima alguna a la forma intermedia.
- 5.- Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el calentamiento del producto alimenticio intermedio tiene lugar aplicando calor desde el exterior.
- 6.- Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el producto alimenticio es un producto frito hecho a partir de tubérculos de plantas, de frutos o de vegetales en tallo.
- 7.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el producto alimenticio es patatas fritas en forma de bastones, patatas fritas, patatas fritas de bolsa, virutas de patatas, virutas de plátano o manzana o virutas de espárrago.
- 8.- Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el proceso comprende freír en aceite abundante los cortes o rodajas de partes comestibles de una planta.
- 9.- Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el producto alimenticio se prepara a partir de al menos una materia prima vegetal.
- 10.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el al menos un material vegetal se selecciona del grupo que consiste en tubérculos, legumbres, plantas aromáticas, nueces y cereales, preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en patata, boniato, mandioca, guisantes, habas de soja, tabaco, café, cacao, trigo, centeno, grano, maíz, cebada, avena a medio moler, trigo sarraceno, arroz o avena.
- 11.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9 ó 10, en el que la materia prima vegetal se deriva de cereales o patata.
- 12.- Uso de una asparaginasa en un procedimiento para la producción de un producto alimenticio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11.