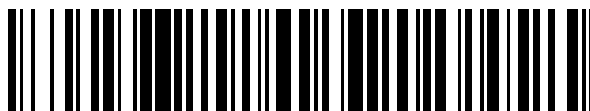


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 480 542**

51 Int. Cl.:

C12N 15/55 (2006.01)

C12N 9/82 (2006.01)

A21D 8/04 (2006.01)

A23L 1/015 (2006.01)

A23L 1/217 (2006.01)

A23L 1/305 (2006.01)

A23F 5/02 (2006.01)

A23F 5/16 (2006.01)

A23F 5/22 (2006.01)

A23G 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2008** **E 08773420 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014** **EP 2193198**

54 Título: **Asparaginasa estable frente al calor para la reducción de acrilamida en productos alimenticios o estimulantes**

30 Prioridad:

13.06.2007 DE 102007027825

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

28.07.2014

73 Titular/es:

C-LECTA GMBH (100.0%)
Perlickstrasse 5
04103 Leipzig , DE

72 Inventor/es:

GREINER-STOEFFELE, THOMAS y
STRUHALLA, MARC

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 480 542 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

Asparaginasa estable frente al calor para la reducción de acrilamida en productos alimenticios o estimulantes

- 5 La invención se refiere al uso de una amidohidrolasa para el tratamiento de un producto alimenticio o de un estimulante.

10 Los productos alimenticios que contienen hidratos de carbono se consumen desde hace milenios por los seres humanos en todo el mundo. Los productos alimenticios de este tipo pueden obtenerse actualmente en las más diversas formas, por ejemplo en forma de pan crujiente, pan tostado, galletas, galletas saladas, pan para tostar, cereales para el desayuno, bizcochos, chips de patata, chips de tortilla, patatas fritas, galletas de arroz, etc.

15 Durante el procesamiento, preparación o tratamiento de productos alimenticios que contienen hidratos de carbono, en particular durante procesos de calentamiento, tal como es el caso por ejemplo en el cocido, asado, tostado, asado a la parrilla o al freír, se produce con frecuencia acrilamida, que se enriquece en consecuencia en estos productos alimenticios. Un fenómeno similar se observa también durante el tratamiento de estimulantes, tales como por ejemplo durante la preparación de café.

20 En abril de 2002 se publicaron por las autoridades suecas para la seguridad alimentaria por primera vez resultados de ensayos para determinar la carga de acrilamida de productos alimenticios. En el mismo año, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó un informe que discute, entre otras cosas, los riesgos para la salud que pueden ir acompañados de una elevada carga de acrilamida en productos alimenticios (FAO/WHO: "Health Implications of Acrylamide in Food", Geneva, 2002).

25 La acrilamida es una sustancia que ataca directamente a la herencia genética humana (ADN). Así mismo la acrilamida se convierte por enzimas hepáticas en glicidamida, a la que se atribuye un efecto genotóxico. La acrilamida así como también la glicidamida forman compuestos con aminoácidos y bases nucleicas y pueden por lo tanto modificar la estructura y la función de por ejemplo el ADN y la hemoglobina. En conjunto, la acrilamida se clasifica por los expertos como cancerígena, de alteración de la herencia genética, venenosa, irritante, sensibilizante y perjudicial para la reproducción.

30 La sustancia de partida más importante para la generación de la acrilamida en productos alimenticios es el aminoácido asparagina, que aparece de manera ubicua en productos alimenticios tales como por ejemplo patatas, arroz y cereales, pero también en café, frutos secos en concentraciones más o menos elevadas. Si el producto alimenticio/estimulante contiene también, además de asparagina, azúcar, tal como por ejemplo fructosa o glucosa, entonces se promueve aún más la formación de acrilamida a altas temperaturas.

40 Los procedimientos de tratamiento para productos alimenticios o estimulantes, que incluyen etapas de tratamiento previo para la reducción del contenido en acrilamida, se conocen ya por el estado de la técnica (véanse por ejemplo los documentos US 7.037.040, US 2004/81724 o US 2005/ 202153). Por el estado de la técnica se conocen también procedimientos en los que para el tratamiento previo se utilizan enzimas, en particular asparaginasa (véanse por ejemplo los documentos WO 2006/128843, WO 2008/110513 o WO 2004/032648). Estas etapas de tratamiento previo, que facilitarán la eliminación, inactivación y/o la extracción de asparagina a partir de los productos alimenticios o estimulantes que van a tratarse, son en parte muy costosas y/o requieren mucho tiempo.

45 De este modo, por ejemplo los procedimientos para el tratamiento de granos de café comprenden en cada caso costosas etapas de secado, vaporización o humidificación. Mediante etapas de tratamiento previo de este tipo se abrirán los poros de los granos de café, para poder extraer, reducir o inactivar mejor a continuación la asparaginasa contenida en los granos de café.

50 Durante un secado se calientan los granos de café a temperaturas por debajo de aproximadamente 50 °C para, a continuación, remojarlos en disoluciones de inactivación de asparagina, tales como por ejemplo lactato de calcio o citrato de calcio.

55 Durante una vaporización/humidificación se pulverizan los granos de café con vapor atmosférico o a baja presión o con agua, absorbiéndose la humedad por los granos. Después de esto se tratan los granos, en una etapa separada, habitualmente con disoluciones de inactivación de asparagina.

60 Todas estas etapas de tratamiento previo expuestas anteriormente, costosas, y que requieren mucho tiempo llevan directa o indirectamente a costes elevados, dado que prolongan el proceso de tratamiento global y lo encarecen también en consecuencia.

65 Por lo tanto, la invención se basa en el objetivo de mejorar los procedimientos de tratamiento conocidos por el estado de la técnica de productos alimenticios o estimulantes. Mediante mejoras de este tipo se simplificarán en particular etapas de tratamiento previo para la reducción del contenido en asparagina o acrilamida en productos

alimenticios o estimulantes, para configurar el procedimiento de tratamiento global para que sea más corto y más económico.

Este objetivo se resuelve mediante el objeto de las reivindicaciones.

5 Se descubrió sorprendentemente que los productos alimenticios o estimulantes pueden tratarse con el uso de una amidohidrolasa, que después de una duración de incubación de 20 min a 70 °C presenta una actividad residual de al menos el 75 %.

10 La invención se refiere al uso de una amidohidrolasa, preferentemente asparaginasa, que después de una duración de incubación de 20 min a 70 °C presenta una actividad residual de al menos el 75 % y un valor óptimo de temperatura en el intervalo de 70 a 120 °C, para el tratamiento de un producto alimenticio o de un estimulante, preferentemente para la disminución del contenido en asparagina en el producto alimenticio o estimulante mediante incubación del producto alimenticio o del estimulante con la amidohidrolasa a una temperatura de incubación de al menos 70 °C, siendo la amidohidrolasa una asparaginasa, cuya secuencia de aminoácidos presenta una homología de al menos el 50 % con respecto a la secuencia de aminoácidos <SEQ ID NO: 2>. Mediante la disminución del contenido en asparagina se disminuye preferentemente también el contenido en acrilamida en el producto alimenticio o estimulante, dado que la asparagina es un *precursor* de acrilamida, cuando el producto alimenticio o estimulante se somete a un tratamiento térmico posterior.

20 La figura 1 muestra la recta de calibración de la determinación de iones amonio por medio de reactivo de Nessler. eje x: cantidad de NH₄ por 40 µl, eje y: densidad óptica (DO) a 436 nm. El coeficiente de correlación R² asciende 0,9979.

25 La figura 2 muestra la actividad enzimática de la asparaginasa I de *Pyrococcus furiosus* a diferentes temperaturas de incubación. rA: actividad relativa (en %), T [°C]: temperatura en grados Celsius.

30 La figura 3 muestra la estabilidad frente a la temperatura de la asparaginasa I de *Pyrococcus furiosus* a una temperatura de 95 °C. rA: actividad relativa (en %), min: tiempo en minutos. A partir de la gráfica puede apreciarse que la asparaginasa a 95 °C después de una duración de incubación de 60 minutos presenta una actividad relativa o actividad residual de aproximadamente el 100 %.

35 La figura 4 muestra la estabilidad frente a la temperatura de la asparaginasa I de *Pyrococcus furiosus* a una temperatura de 99 °C. rA: actividad relativa (en %), min: tiempo en minutos. A partir de la gráfica puede apreciarse que la asparaginasa a 99 °C después de una duración de incubación de 60 minutos presenta una actividad relativa o actividad residual de aproximadamente el 70 %.

40 La figura 5 muestra la reducción del contenido en acrilamida después de la tostación de dos tipos de café mediante tratamiento previo de los granos de café en bruto con la asparaginasa de acuerdo con la invención de acuerdo con el Ejemplo 4 a 80 °C. Blanco 1 y Muestra 1 - tipo de café arábica-mezcla, Blanco 2 y Muestra 2 - tipo de café arábica de Brasil.

45 Las amidohidrolasas pertenecen a la familia de enzimas de las hidrolasas. Las amidohidrolasas se caracterizan porque escinden/hidrolizan grupos amida. Están reunidas bajo los números EC EC 3.5.1 y 3.5.2. (*Enzyme Commission number*, de acuerdo con la definición del *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB)).

50 La secuencia de ADN y de polipéptidos de la asparaginasa I de *Pyrococcus furiosus* se conocen ya, por ejemplo a partir de la base de datos del Instituto Europeo de Bioinformática del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (véase EMBL-EBI, *Pyrococcus furiosus* DSM 3638, número de acceso AE010296).

55 Por la expresión “actividad residual” en el sentido de la descripción ha de entenderse la actividad enzimática específica / volumétrica, que presenta una enzima después de una duración de incubación determinada a una temperatura determinada, en comparación con la actividad específica/volumétrica original en el intervalo de su valor óptimo de temperatura, en condiciones de reacción por lo demás idénticas (pH, sustrato, etc.). A este respecto, por la actividad específica/volumétrica de una enzima en el sentido de la descripción ha de entenderse una cantidad determinada de un sustrato que ha reaccionado (en µmoles) por tiempo (en min) por cantidad de enzima (en mg o ml). La actividad residual de una enzima resulta de la actividad específica/volumétrica de la enzima después de la duración de incubación mencionada anteriormente dividida entre la actividad específica/volumétrica original, expresado en porcentaje (%). La actividad específica de una enzima se indica en este sentido preferentemente en U/mg, la actividad volumétrica de una enzima se indica preferentemente en U/ml. Como alternativa la actividad específica/volumétrica de una enzima, en el sentido de la descripción, puede estar indicada en catal/mg o catal/ml.

65 La expresión “eficacia enzimática”, que se denomina en ocasiones también como “eficacia catalítica” o “eficiencia catalítica”, es en general conocida por el experto y se refiere a la velocidad de conversión de una enzima y se expresa habitualmente a través de los cocientes de K_{kat}/K_M , correspondiendo k_{kat} a la constante catalítica (también

denominada *turnover number*) y el valor K_M a cada concentración de sustrato, a la que la velocidad de reacción se encuentra a la mitad de su valor máximo. La eficacia enzimática de una enzima puede indicarse como alternativa también mediante la actividad específica (μmoles de sustrato que ha reaccionado $\times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$; véase anteriormente) o la actividad volumétrica (μmoles de sustrato que ha reaccionado $\times \text{ml}^{-1} \times \text{min}^{-1}$; véase anteriormente). En relación con la eficacia enzimática puede remitirse a la bibliografía general tal como por ejemplo Voet y col. "Biochemie", 1992, VCH-Verlag, capítulo 13, páginas 331-332.

En formas de realización preferidas A_1 - A_7 a F_1 - F_7 la amidohidrolasa usada de acuerdo con la invención en las condiciones indicadas en la siguiente tabla presenta una actividad residual de preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, de la manera más preferente al menos el 90 %:

Nº	Duración	Temperatura (°C)					
		A	B	C	D	E	F
1	5 min	50	60	70	80	90	100
2	10 min	50	60	70	80	90	100
3	20 min	50	60	70	80	90	100
4	30 min	50	60	70	80	90	100
5	40 min	50	60	70	80	90	100
6	50 min	50	60	70	80	90	100
7	60 min	50	60	70	80	90	100

En la tabla anterior significa por ejemplo forma de realización C_6 , que la amidohidrolasa después de al menos 50 minutos a 70 °C presenta una actividad residual de al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, de la manera más preferente al menos el 90 %. En una forma de realización especialmente preferida la amidohidrolasa en las condiciones expuestas anteriormente presenta una actividad residual en el intervalo de preferentemente el 75 - 100 %, más preferentemente el 75 - 90 %.

En el caso de la amidohidrolasa utilizada se trata de una asparaginasa. Por una asparaginasa en el sentido de la descripción se entiende una enzima que cataliza la hidrólisis de asparagina para dar aspartato y amonio. En una forma de realización preferida se trata de una asparaginasa del tipo I, en otra forma de realización preferida se trata de una asparaginasa del tipo II.

Preferentemente la amidohidrolasa, es decir la asparaginasa, es termoactiva.

"Termoactivas" en el sentido de la descripción son aquellas amidohidrolasas, es decir asparaginastas, cuyo valor óptimo de temperatura se encuentra por encima de 50 °C.

El término "valor óptimo de temperatura" es conocido en general por el experto y se refiere al intervalo de temperatura, en el que una enzima presenta su eficacia enzimática máxima. En este contexto puede remitirse a la bibliografía pertinente, tal como por ejemplo Voet y col. "Biochemie", 1992, VCH-Verlag, capítulo 13, página 331; I.H. Segel, *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*, Wiley Interscience, 1993; y A.G. Marangoni, *Enzyme Kinetics: A Modern Approach*, Wiley Interscience, 2002.

Preferentemente, en el sentido de la descripción por el valor óptimo de temperatura ha de entenderse el intervalo de temperatura en el que la amidohidrolasa usada de acuerdo con la invención presenta al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 % de la eficacia enzimática máxima, en condiciones de reacción por lo demás constantes.

El valor óptimo de temperatura de la amidohidrolasa, es decir de la asparaginasa, se encuentra en el intervalo de 70 a 120 °C, más preferentemente en el intervalo de 75 a 110 °C, aún más preferentemente en el intervalo de 80 a 100 °C y de la manera más preferente en el intervalo de 85 a 95 °C.

Por lo tanto, preferentemente las amidohidrolasas utilizadas de acuerdo con la invención, es decir las asparaginastas, no son sólo termoestables (es decir resisten a un tratamiento térmico con respecto a su actividad enzimática), sino que son adicionalmente termoactivas (es decir sólo muestran su actividad enzimática completa a temperatura elevada).

Por el estado de la técnica no se conoce hasta el momento ningún procedimiento en el que se utilice una asparaginasa termoactiva para el tratamiento de productos alimenticios o estimulantes para la reducción del contenido en acrilamida.

En una forma de realización preferida la amidohidrolasa, es decir asparaginasa, a una temperatura de preferentemente 60 a 120 °C, más preferentemente de 65 a 110 °C, aún más preferentemente de 70 a 100 °C, de la manera más preferente de 75 a 100 °C y en particular de 80 a 90 °C presenta una actividad específica de preferentemente al menos 100, más preferentemente al menos 200, aún más preferentemente al menos 300, aún

más preferentemente al menos 500, de la manera más preferente al menos 800 y en particular al menos 1000 unidades/mg, estando definida 1 unidad como la cantidad de amidohidrolasa que libera 1,0 μmol de amoníaco por minuto a partir de L-asparagina a la temperatura de reacción correspondiente y un valor de pH de 8,6 (Tris-HCl 50 mM, ajuste de pH a 25 °C).

Se descubrió sorprendentemente que las asparaginasa termoactivas presentan ventajas considerables con respecto a otras asparaginasa. De este modo, con ayuda de asparaginasa termoactivas puede llevarse a cabo la escisión de la asparagina a temperaturas comparativamente altas, mediante lo cual se consigue una compatibilidad con procesos en los que altas temperaturas, en particular procesos de retención a altas temperaturas, desempeñan en todo caso un papel. Así mismo la realización de la escisión de la asparagina a altas temperaturas permite una mayor velocidad de reacción.

Durante el tratamiento enzimático de granos de café es por ejemplo necesario dejar que los granos de café verdes se hinchen con agua, antes de que puedan tratarse con enzima. Para poder tostar los granos de café entonces a continuación, éstos deben secarse de nuevo previamente. El tratamiento enzimático de café requiere por lo tanto, entre otras cosas, las siguientes etapas: a) humedecer; b) tratamiento enzimático en estado humedecido; c) secar; d) tostar.

Los procedimientos industriales habituales para la descafeinización o para garantizar el "aroma suave" comprenden ya en todo caso las etapas de procedimiento mencionadas anteriormente a), c) y d).

Para la etapa de secado c) deben calentarse los granos de café hasta una temperatura suficiente, dado de lo contrario que el agua no puede eliminarse de forma eficaz. El calentamiento y el humedecimiento de los granos de café tiene lugar preferentemente con vapor de agua caliente (>100 °C). La etapa de secado posterior c) discurre entonces a 70-80 °C.

Si la amidohidrolasa utilizada tuviera un valor óptimo de temperatura de por ejemplo únicamente 50 °C, entonces esto sería muy desfavorable, dado que se enfría en primer lugar para el tratamiento enzimático hasta 50 °C y a continuación debería calentarse de nuevo para el secado.

Por el contrario, con ayuda de las asparaginasa termoactivas preferidas de acuerdo con la invención, no es necesario enfriamiento alguno, lo que representa una ventaja particular de la invención.

Una ventaja adicional en el caso del uso de asparaginasa termoactivas puede observarse en que debido a la temperatura elevada se aumenta también la difusión de la asparagina que va a hidrolizarse, lo que repercute en una eficiencia mejorada del procedimiento de acuerdo con la invención.

El procedimiento de acuerdo con la invención permite, manteniendo las etapas de proceso de procedimientos habituales para el tratamiento de un producto alimenticio o de un estimulante, conseguir un tratamiento con ayuda de una amidohidrolasa, es decir sin cambios serios de los desarrollos del procedimiento. Preferentemente, el tratamiento enzimático puede llevarse a cabo durante una etapa de proceso en la que el producto alimenticio o el estimulante estén expuestos en todo caso a una temperatura elevada.

En una forma de realización preferida adicional la amidohidrolasa, es decir la asparaginasa, a una temperatura de preferentemente 60 a 120 °C, más preferentemente de 65 a 110 °C, aún más preferentemente de 70 a 100 °C, de la manera más preferente de 75 a 100 °C y en particular 80-90 °C, presenta una actividad volumétrica de preferentemente al menos 50, más preferentemente al menos 100, aún más preferentemente al menos 300, aún más preferentemente al menos 500, de la manera más preferente al menos 800 y en particular al menos 1000 unidades/ml, estando definida 1 unidad como la cantidad de amidohidrolasa que libera 1,0 μmol de amoníaco por minuto a partir de L-asparagina a la temperatura de reacción correspondiente y un valor de pH de 8,6 (Tris-HCl 50 mM, ajuste de pH a 25 °C).

En una forma de realización preferida la amidohidrolasa, es decir la asparaginasa, presenta un valor óptimo de pH en el intervalo de preferentemente pH 1 a pH 14, más preferentemente en el intervalo de pH 3 a pH 12, aún más preferentemente en el intervalo de pH 5 a pH 11, de la manera más preferente en el intervalo de pH 7 a pH 10 y en particular en el intervalo de pH 8 a pH 9. La expresión "valor óptimo de pH" es en general conocido por el experto y se refiere al intervalo de pH en el que una enzima presenta su eficacia enzimática máxima. En este contexto puede remitirse a la bibliografía pertinente, tal como por ejemplo Voet y col. "Biochemie", 1992, VCH-Verlag, capítulo 13, página 331. Preferentemente, en el sentido de la descripción por el valor óptimo de pH ha de entenderse el intervalo de pH en el que la amidohidrolasa usada de acuerdo con la invención presenta al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 % de la eficacia enzimática máxima, en condiciones de reacción por lo demás constantes.

Se descubrió sorprendentemente que pueden proporcionarse amidohidrolasas, es decir asparaginasa, que son activas a lo largo de un intervalo de pH muy amplio. En el intervalo de pH 5 - pH 10 estas amidohidrolasas, es decir asparaginasa, presentan preferentemente una actividad de al menos el 10 % de la actividad máxima. De esta manera se hace posible el uso de estas enzimas en distintos procesos con intervalos de pH muy diferentes.

También es posible un uso en procesos en los que el valor de pH en el proceso experimenta fuertes oscilaciones. También son posibles en particular procesos en los que aparecen valores de pH de 5 a 10. En el caso del tratamiento de granos de café verdes con agua corriente, pueden aparecer a modo de ejemplo valores de pH muy bajos de - 5.

En una forma de realización preferida la amidohidrolasa de acuerdo con la invención, es decir asparaginasa, a lo largo de todo el intervalo de pH de 5-10, presenta una actividad de al menos el 10 %, más preferentemente al menos el 15 %, aún más preferentemente al menos el 20 %, de la manera más preferente al menos el 25 % y en particular al menos el 30 % en comparación con la actividad máxima, es decir con respecto a la actividad máxima al valor de pH óptimo en condiciones por lo demás idénticas, preferentemente a concentración y temperatura óptima.

La amidohidrolasa usada de acuerdo con la invención, es decir asparaginasa, es preferentemente estable en almacenamiento. En formas de realización preferidas G₁-G₁₇ a K₁-K₁₇ la amidohidrolasa en las condiciones indicadas en la siguiente tabla presenta una actividad residual de al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 85 %, aún más preferentemente al menos el 90 % y en particular al menos el 95 %:

	Duración de almacenamiento	Intervalo de temperatura (°C)				
		G	H	I	J	K
1	5 días	25	15	10	8	5
2	10 días	25	15	10	8	5
3	15 días	25	15	10	8	5
4	20 días	25	15	10	8	5
5	25 días	25	15	10	8	5
6	30 días	25	15	10	8	5
7	60 días	25	15	10	8	5
8	90 días	25	15	10	8	5
9	120 días	25	15	10	8	5
10	150 días	25	15	10	8	5
11	180 días	25	15	10	8	5
12	210 días	25	15	10	8	5
13	240 días	25	15	10	8	5
14	270 días	25	15	10	8	5
15	300 días	25	15	10	8	5
16	330 días	25	15	10	8	5
17	360 días	25	15	10	8	5

En la tabla anterior significa por ejemplo forma de realización I₅, que la amidohidrolasa después de un almacenamiento durante 25 días a 10 °C presenta una actividad residual de al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 85 %, aún más preferentemente al menos el 90 % y en particular al menos el 95 %. En una forma de realización especialmente preferida, la amidohidrolasa usada de acuerdo con la invención durante un almacenamiento a 4 °C a lo largo de un periodo de tiempo de 30 días presenta una actividad residual de al menos el 80 %.

El grupo de las amidohidrolasas comprende entre otras cosas la familia de enzimas de las asparaginasa (EC 3.5.1.1), que catalizan la hidrólisis de asparagina para dar aspartato y amoníaco. En el caso de la amidohidrolasa usada de acuerdo con la invención se trata de una asparaginasa.

Se conoce en general que las asparaginasa pueden convertir tanto asparagina (forma L y D) como también glutamina (forma L y D).

En vista de esta promiscuidad de sustrato de asparaginasa, la asparaginasa utilizada de acuerdo con la invención hidroliza L-asparagina preferentemente más rápido que L-glutamina y/u opcionalmente más rápido que D-asparagina.

Preferentemente la relación de los valores de K_M (en cada caso en mM) de L-asparagina : L-glutamina se encuentra en el intervalo de 1:10 a 1:400, más preferentemente en el intervalo de 1:20 a 1:200, aún más preferentemente en el intervalo de 1:30 a 1:100, de la manera más preferente en el intervalo de 1:40 a 1:80.

En una forma de realización preferida, la asparaginasa utilizada de acuerdo con la invención prefiere L-asparagina más que L-glutamina y/o más que D-asparagina. Preferentemente la relación de los valores K_M (en cada caso en mM) de L-asparagina : L-glutamina se encuentra en el intervalo de 1:1 a 1:400, más preferentemente en el intervalo de 1:5 a 1:100, aún más preferentemente en el intervalo de 1:10 a 1:50.

Las amidohidrolasas o asparaginasas pueden ser termolábiles o termoestables. Las asparaginasas termoestables se conocen ya por el estado de la técnica (véase por ejemplo Li y col., Anal. Chem. 2002, 74, pág. 3336-3341, documento US 5.719.056 o Agathi y col., Mol. Cell. Biochem. 2001, 216, pág. 93-101). Sin embargo, indicaciones con respecto a su uso en procesos de la preparación o el tratamiento de productos alimenticios o estimulantes no pueden deducirse de estos documentos.

Por los términos “amidohidrolasa termoestable” o “asparaginasa termoestable” en el sentido de la descripción ha de entenderse preferentemente una amidohidrolasa o asparaginasa, que después de una duración de incubación de 5 min a 50 °C presenta una actividad residual de al menos el 75 %.

Preferentemente en el caso de la asparaginasa se trata de una asparaginasa de *Archaeoglobus* sp. (por ejemplo *Archaeoglobus fulgidus*), *Thermus* sp. (por ejemplo *Thermus thermophilus*), *Pyrococcus* sp. (por ejemplo *Pyrococcus abyssi*), *Thermococcus* sp. (por ejemplo *Thermococcus kodakarensis*), *Metanothermobacter* sp. (por ejemplo *Metanothermobacter thermautotrophicus*) o de una asparaginasa de otros euriarqueotas o de la asparaginasa I de *Pyrococcus furiosus*.

En una forma de realización preferida la asparaginasa está codificada por una secuencia de nucleótidos, que presenta una homología de preferentemente al menos el 60 %, más preferentemente al menos el 80 %, aún más preferentemente al menos el 90 %, aún más preferentemente al menos el 95 %, de la manera más preferente al menos el 99 % y en particular al menos el 99,9 % con respecto a la secuencia de nucleótidos <SEQ ID NO: 1>. La homología se determina en este sentido preferentemente con ayuda del algoritmo según Smith & Waterman (J Mol Biol., 1981, 147(1), 195-7), con el uso de la matriz BLOSUM62 y valores de 11.0 para la apertura de un hueco, o 1.0 para la ampliación de un hueco.

En particular se prefiere que la asparaginasa usada de acuerdo con la invención esté codificada por la secuencia de nucleótidos <SEQ ID NO: 1>.

La secuencia de aminoácidos de la asparaginasa presenta una homología (identidad de secuencia) de al menos el 50 %, más preferentemente al menos el 75 %, aún más preferentemente al menos el 80 %, aún más preferentemente al menos el 90 %, aún más preferentemente al menos el 95 %, de la manera más preferente al menos el 99 % y en particular al menos el 99,9 % con respecto a la secuencia de aminoácidos <SEQ ID NO: 2>. La homología se determina en este sentido preferentemente con ayuda del algoritmo según Smith & Waterman (J Mol Biol., 1981, 147(1), 195-7), con el uso de la matriz BLOSUM62 y valores de 11.0 para la apertura de un hueco, o 1.0 para la ampliación de un hueco.

En otra forma de realización especialmente preferida, la asparaginasa usada de acuerdo con la invención presenta la secuencia de aminoácidos <SEQ ID NO: 2>.

Procedimientos de preparación/tratamiento de productos alimenticios o estimulantes que contienen hidratos de carbono preferentemente presentan, tal como ya se expuso anteriormente, con frecuencia etapas de tratamiento previo para la reducción del contenido en acrilamida en estos productos alimenticios o estimulantes. Por lo tanto se prefiere que el uso de acuerdo con la invención de la amidohidrolasa durante el tratamiento, en particular en el contexto de un tratamiento previo, sirva para la hidrólisis de asparagina para dar ácido aspártico.

Por la expresión “producto alimenticio que contiene hidratos de carbono” pueden entenderse en el sentido de la descripción preferentemente productos alimenticios cuyo contenido en hidratos de carbono asciende preferentemente al menos al 0,1 % en peso, más preferentemente al menos al 1 % en peso, aún más preferentemente al menos al 5 % en peso, aún más preferentemente al menos al 10 % en peso, de la manera más preferente al menos al 20 % en peso, y en particular al menos al 30 % en peso, con respecto al peso total del producto alimenticio.

Así mismo se prefiere que el uso de acuerdo con la invención de una amidohidrolasa durante el tratamiento, en particular en el contexto de un tratamiento previo, sirva para la disminución del contenido en asparagina y/o acrilamida en el producto alimenticio o el estimulante.

Mediante un uso de acuerdo con la invención de este tipo de una amidohidrolasa tiene lugar preferentemente una disminución del contenido en asparagina, para que el producto alimenticio o el estimulante en el caso de un tratamiento posterior térmico presenten un contenido en acrilamida disminuido.

Por la expresión “tratamiento posterior térmico” pueden entenderse en el sentido de la descripción preferentemente los procesos que conllevan un calentamiento del producto alimenticio o estimulante. Tratamientos posteriores térmicos habituales comprenden un calentamiento, tostación, asado a la parrilla, hervido, cocción, horneado, vaporización, freír y similares.

De manera especialmente preferida la amidohidrolasa utilizada de acuerdo con la invención durante procesos de preparación o tratamiento de productos alimenticios que contienen hidratos de carbono, tales como por ejemplo

arroz, artículos de panadería y de pastelería, aperitivos, mezclas preparadas, frutos secos, piensos para animales, etc. o estimulantes, tales como café o cacao. Los productos alimenticios y/o estimulantes de este tipo se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en pan crujiente, pan tostado, galletas, galletas saladas, pan para tostar, barquillos, magdalenas, rosquillas, cruasanes, brownies, cereales para el desayuno, bizcochos, chips de patata, chips de tortilla, chips de maíz, crackers, nueces, patatas fritas, galletas de arroz, polenta, cuscús, tortitas, mezclas preparadas, mezclas para pasteles, mezclas para bizcochos, mezclas para pan, picatostes, pienso para perros, pienso para gatos, granos de café, granos de cacao.

De manera especialmente preferente se trata de granos de café. Especies de granos de café preferidas son *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, *Coffea liberica* y *Coffea robusta*.

En una forma de realización especialmente preferida el tratamiento de un estimulante comprende una descafeinización y/o un lavado de granos de café, en el que se utiliza la amidohidrolasa de acuerdo con la invención.

En una forma de realización así mismo especialmente preferida, el tratamiento de un estimulante comprende una hidrólisis de granos de café, que se combina con el uso de la amidohidrolasa de acuerdo con la invención, preferentemente asparaginasa. Los granos de café, en el transcurso de la preparación, se someten a una descafeinización o para el refinado del sabor a un tratamiento con vapor de agua. En este sentido se calientan intensamente los granos y se ponen en contacto con agua. En este caso se ha comprobado que es especialmente ventajoso el uso de una amidohidrolasa termoactiva para la reducción de la concentración de asparagina en los granos de café verdes. El uso de enzimas a temperaturas de más de 70 °C permite una compatibilidad completa con procedimientos establecidos y además velocidades de reacción muy altas, lo que acorta considerablemente los tiempos de proceso.

Mediante el uso de acuerdo con la invención de una amidohidrolasa, es decir de una asparaginasa, que presenta las propiedades descritas anteriormente, resultan numerosas ventajas sorprendentes, que se explican por medio de cuatro ejemplos ilustrativos. Un experto reconoce que los ejemplos de este tipo no han de interpretarse en ningún modo de manera limitativa, dado que la amidohidrolasa de acuerdo con la invención es adecuada para un uso en una pluralidad de procedimientos de tratamiento de productos alimenticios o estimulantes.

De este modo, habitualmente durante el tratamiento de chips de patata se tratan previamente con asparaginasa las patatas, antes de cocinarse con vapor, es decir las patatas se cortan en láminas y la asparaginasa puede o bien pulverizarse o bien sumergirse las láminas de patatas en una disolución que contiene asparaginasa. La duración de un tratamiento de asparaginasa convencional, de este tipo, puede ser a este respecto en parte considerable (hasta varias horas), dado que debido al valor óptimo de temperatura de la enzima (habitualmente 37 °C, véase por ejemplo el documento US 7.037.540, Ejemplo 5) la temperatura de tratamiento debe ascender como máximo a 37 °C y la disgregación de asparagina discurre lentamente de manera correspondiente.

Mediante las propiedades termoestables de la amidohidrolasa usada de acuerdo con la invención pueden someterse las láminas de patata a temperaturas elevadas a un tratamiento de asparaginasa, es decir la reducción de asparagina tiene lugar más rápidamente, entre otras cosas, dado que la solubilidad de la asparagina aumenta a temperaturas más altas. En parte, el tratamiento de asparagina, debido a las propiedades termoestables de la enzima puede tener lugar incluso al mismo tiempo durante la cocción de las patatas con vapor. La asparaginasa puede pulverizarse en este sentido por ejemplo previamente sobre las láminas de patata.

Una desactivación de la amidohidrolasa tiene lugar de manera convencional mediante un tratamiento posterior térmico, es decir friendo las láminas de patata. Por lo tanto no resultan preocupaciones en cuanto a la salud con respecto al uso de estas amidohidrolasas termoestables.

Un ejemplo adicional se refiere a la descafeinización de granos de café. En el caso de estos procedimientos de tratamiento se vaporizan los granos de café verdes, no tostados y/o se remojan en agua parcialmente caliente, para extraer la cafeína de los granos. Con ayuda de la amidohidrolasa utilizada de acuerdo con la invención se permite combinar, etapas de descafeinización de este tipo, que habitualmente discurren a temperaturas de más de 37 °C, con un tratamiento de asparaginasa simultáneo, es decir el proceso de tratamiento de café descafeinado como tal requieren menos tiempo y en consecuencia se hacen más económicos. Los procedimientos convencionales para la descafeinización de granos de café se conocen por el experto y comprenden entre otras cosas el "procedimiento de agua suizo", el "método directo", el "método indirecto" o el "procedimiento de triglicéridos". En este contexto puede remitirse por ejemplo por completo a R. Heiss, *Lebensmitteltechnologie: Biotechnologische, chemische, mechanische und thermische Verfahren der Lebensmittelverarbeitung*, Springer; 6ª edición, 2003.

Sorprendentemente la amidohidrolasa de acuerdo con la invención puede utilizarse también de manera especialmente ventajosa en una vaporización/humidificación de granos de café. Una vaporización/humidificación de este tipo sirve, tal como ya se expuso anteriormente, para la apertura de los poros de los granos de café, para inactivar/reducir a continuación más fácilmente la asparagina presente en los granos. Una vaporización/humidificación tiene lugar habitualmente a temperaturas elevadas, es decir a temperaturas de hasta preferentemente como máximo 100 °C, dado que tanto la solubilidad de asparagina en disolventes calientes es

elevada, como que también se abren los poros de los granos de café a temperaturas calientes. Con ayuda de la amidohidrolasa termoestable, de acuerdo con la invención, puede tener lugar una reducción de asparagina por un lado al mismo tiempo durante la vaporización/humidificación, por otro lado, la reducción de asparagina puede ocurrir de manera más rápida y eficiente debido a la alta tolerancia a la temperatura de la enzima.

La amidohidrolasa de acuerdo con la invención puede utilizarse también en la producción de productos de pastelería frescos tales como pan, panecillos o similares. Estos productos de pastelería frescos se producen con frecuencia con ayuda de procedimientos de extrusión con cocción, que discurren habitualmente a temperaturas entre 95 y 105 °C. Mediante las propiedades termoestables de la amidohidrolasa de acuerdo con la invención puede añadirse la enzima durante la extrusión con cocción y de este modo provocan una reducción del contenido en asparagina. Para la reducción de asparagina es necesario en el caso de la extrusión con cocción tanto el amasado de la masa como la generación de burbujas de gas, que se generan mediante el escape de ácido carbónico a partir del agua calentada. Mediante el proceso de tostación o de cocción posterior, que discurre habitualmente en un intervalo de temperatura de 200 a 600 °C, se inactiva o desnaturaliza la amidohidrolasa de acuerdo con la invención.

En muchas etapas de tratamiento de productos alimenticios y estimulantes, la incubación en un entorno acuoso a altas temperaturas entre 70 y 110 °C desempeña un papel, que está intercalada al tratamiento posterior térmico, que lleva a la formación de acrilamida. Entre ellas figuran a modo de ejemplo etapas de cocción. Tratamientos acuosos en el intervalo de temperatura anterior se utilizan por ejemplo en la producción de patatas fritas conformadas o de chips de patata conformados. La ventaja inesperada de la asparaginasa de acuerdo con la invención se basa en que la enzima puede utilizarse directamente en estos procesos y a las altas temperaturas consigue velocidades de reacción muy altas, que con cantidades de enzima muy bajas permiten eficacias muy elevadas.

También en procesos de procesamiento de cereales puede utilizarse ventajosamente la amidohidrolasa de acuerdo con la invención. En el caso de la producción de copos de maíz se cocina sémola de maíz en mezcla con azúcar, sal y malta y a continuación se procesa adicionalmente y se tuesta. La tostación provoca la formación indeseada de la acrilamida. En el caso de la cocción se recorren temperaturas entre 70 y 100 °C, que son muy adecuadas para un uso de la amidohidrolasa de acuerdo con la invención, de modo que puede suprimirse la formación de acrilamida.

En el caso de procesos de procesamiento de cereales los procesos de extrusión desempeñan con frecuencia un papel. Por ejemplo, en el caso de la producción de cereales para el desayuno se llevan a cabo procesos de extrusión a una temperatura final de 80-100 °C. También se describen procesos en los que desempeñan un papel los procesos de retención a altas temperaturas entre 70 y 100 °C.

Los productos, que se procesan a altas temperaturas y que contienen centeno, presentan por regla general contenidos en acrilamida muy elevados (por ejemplo pan crujiente). En el caso de la producción de pan crujiente, en el proceso de cocción se consiguen muy rápidamente temperaturas elevadas. El pan crujiente puede tratarse antes del proceso de cocción con una disolución de la amidohidrolasa de acuerdo con la invención para reducir la formación de acrilamida durante el proceso de cocción.

Una ventaja adicional, inesperada de la amidohidrolasa termoestable, utilizada de acuerdo con la invención es la posibilidad de una reutilización (reciclado) de la enzima. De este modo, la amidohidrolasa, que por sus propiedades termoestables también a temperaturas elevadas, es decir hasta preferentemente 100 °C no desnaturalizada, extraída después de su uso o separada por otras vías y puede utilizarse por lo tanto para la nueva aplicación. Una disolución de amidohidrolasa recirculada de esta manera puede pasar varios ciclos, es decir preferentemente al menos 1, 2, 3, 4 o 5 ciclos para la reducción de asparagina.

La aplicación de las amidohidrolasas utilizadas de acuerdo con la invención es preferentemente inocua para la salud, dado que en el caso de estas amidohidrolasas se trata de sustancias naturales, no tóxicas.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un procedimiento para el tratamiento de un producto alimenticio o de un estimulante que comprende las etapas:

(i) incubar el producto alimenticio o el estimulante con una amidohidrolasa tal como se definió anteriormente a una temperatura de incubación de al menos 70 °C, más preferentemente al menos 80 °C, aún más preferentemente al menos 90 °C y de la manera más preferente al menos 99 °C; y

(iii) opcionalmente calentar el producto alimenticio o el estimulante hasta una temperatura, que se encuentra preferentemente al menos 10 °C, más preferentemente al menos 15 °C, aún más preferentemente al menos 20 °C, de la manera más preferente al menos 50 °C y en particular al menos 60 °C por encima de la temperatura de incubación.

En una forma de realización preferida el procedimiento de acuerdo con la invención para el tratamiento de un producto alimenticio o de un estimulante comprende las etapas:

(i) incubar el producto alimenticio o el estimulante con una amidohidrolasa tal como se describió anteriormente a una temperatura de incubación de al menos 70 °C, más preferentemente al menos 80 °C, aún más preferentemente al menos 90 °C y de la manera más preferente al menos 99 °C;

5 (ii) separar la amidohidrolasa del producto alimenticio o del estimulante o inactivar la amidohidrolasa;

(iii) opcionalmente calentar el producto alimenticio o el estimulante hasta una temperatura, que se encuentra preferentemente al menos 10 °C, más preferentemente al menos 15 °C, aún más preferentemente al menos 20 °C, de la manera más preferente al menos 50 °C y en particular al menos 60 °C por encima de la temperatura de incubación; y

(iv) opcionalmente reutilizar la amidohidrolasa separada opcionalmente en la etapa (ii) en la etapa (i).

15 La etapa (i) del procedimiento de acuerdo con la invención se lleva a cabo preferentemente en condiciones (tiempo, temperatura, valor de pH, cantidad de amidohidrolasa, etc.), de modo que se disminuye la cantidad de asparagina (libre) contenida originalmente en el producto alimenticio o estimulante en al menos un 50 %, más preferentemente al menos un 75 %, aún más preferentemente al menos un 80 %, aún más preferentemente al menos un 85 %, de la manera más preferente al menos un 90 % y en particular al menos un 95 %. Un experto puede encontrar condiciones adecuadas mediante ensayos rutinarios habituales.

20 La etapa (i) del procedimiento de acuerdo con la invención se lleva a cabo preferentemente en condiciones (tiempo, temperatura, valor de pH, cantidad de amidohidrolasa, etc.), de modo que se reduce la cantidad de acrilamida formada en el tratamiento posterior térmico opcionalmente siguiente en al menos un 20 %, preferentemente un 30 % aún más preferentemente en al menos un 40 % y de la manera más preferente en al menos un 50 %.

25 En una forma de realización preferida la etapa (i) del procedimiento de acuerdo con la invención se lleva a cabo preferentemente en condiciones (tiempo, temperatura, valor de pH, cantidad de amidohidrolasa, etc.), de modo que después de la realización de la etapa (iii) la cantidad de acrilamida contenida en el producto alimenticio o estimulante asciende como máximo a 200 ppm, más preferentemente como máximo a 150 ppm, aún más preferentemente como máximo a 135 ppm, de la manera más preferente como máximo a 100 ppm y en particular como máximo a 50 ppm. Un experto puede encontrar condiciones adecuadas mediante ensayos rutinarios habituales.

30 En una forma de realización así mismo preferida la etapa (i) del procedimiento de acuerdo con la invención se lleva a cabo preferentemente en condiciones (tiempo, temperatura, valor de pH, cantidad de amidohidrolasa, etc.), de modo que después de la realización de la etapa (iii) la cantidad de acrilamida contenida en el producto alimenticio o estimulante asciende como máximo a 1.000 µg/kg, más preferentemente como máximo a 500 µg/kg, aún más preferentemente como máximo a 300 µg/kg, de la manera más preferente como máximo a 150 µg/kg y en particular como máximo a 50 µg/kg. Un experto puede encontrar condiciones adecuadas mediante ensayos rutinarios habituales.

40 En una forma de realización preferida tiene lugar la realización de la etapa (i) durante al menos 240 min, más preferentemente al menos 120 min, aún más preferentemente al menos 60 min, de la manera más preferente al menos 20 min y en particular al menos 5 min.

45 En una forma de realización preferida la relación en peso de producto alimenticio o estimulante con respecto a amidohidrolasa se encuentra en el intervalo de $10^2 : 1$ a $10^{10} : 1$, más preferentemente de $10^2 : 1$ a $10^8 : 1$, aún más preferentemente de $10^4 : 1$ a $10^8 : 1$, de la manera más preferente de $10^4 : 1$ a $10^7 : 1$ y en particular de $10^5 : 1$ a $10^7 : 1$.

50 En una forma de realización preferida la amidohidrolasa se proporciona en una disolución acuosa y se reúne con el producto alimenticio o estimulante, por ejemplo mediante pulverización. A este respecto la concentración de la amidohidrolasa en la disolución acuosa asciende preferentemente a de 10^{-6} a 100 g/l más preferentemente de 10^{-5} a 10 g/l, aún más preferentemente de 10^{-4} a 1 g/l, de la manera más preferente de 10^{-3} a 10^{-1} g/l y en particular de 10^{-2} a 5×10^{-2} g/l.

55 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un producto alimenticio o estimulante, que puede obtenerse mediante el procedimiento descrito anteriormente. El producto alimenticio o estimulante presenta preferentemente un contenido residual de como máximo 200 ppm, más preferentemente como máximo 150 ppm, aún más preferentemente como máximo 135 ppm, de la manera más preferente como máximo 100 ppm y en particular como máximo 50 ppm en asparagina y/o acrilamida.

60 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un producto alimenticio o estimulante, que puede obtenerse mediante el procedimiento descrito anteriormente. El producto alimenticio o estimulante presenta preferentemente un contenido residual de como máximo 400 µg/kg, más preferentemente como máximo 300 µg/kg, aún más

preferentemente como máximo 200 µg/kg, de la manera más preferente como máximo 100 µg/kg y en particular como máximo 50 µg/kg en asparagina y/o acrilamida.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un vector, que contiene una secuencia de nucleótidos, tal como se definió anteriormente. Preferentemente un vector de este tipo se selecciona del grupo que consiste en plásmidos, cósmidos, fagémidos, fagos-vectores, cromosomas artificiales bacterianos (*Bacterial Artificial Chromosomes*) y cromosomas artificiales de levadura (*Yeast Artificial Chromosomes*).

Un aspecto adicional de la invención es un procedimiento para la producción de una amidohidrolasa tal como se definió anteriormente, que comprende las siguientes etapas:

- a) introducir un vector, tal como se definió anteriormente, en un sistema de expresión;
- b) opcionalmente expresar la amidohidrolasa en el sistema de expresión;
- c) opcionalmente disgregar o lisar o separar el sistema de expresión;
- d) opcionalmente añadir una nucleasa adecuada, opcionalmente termoestable para la hidrólisis de los ácidos nucleicos del sistema de expresión;
- e) opcionalmente desnaturalizar el sistema de expresión mediante una incubación a preferentemente 60 °C, más preferentemente 70 °C, aún más preferentemente 80 °C, de la manera más preferente 90 °C y en particular 100 °C durante una duración de preferentemente 1 min, más preferentemente 5 min, aún más preferentemente 10 min, de la manera más preferente 20 min y en particular 60 min;
- f) opcionalmente separar constituyentes indeseados del sistema de expresión mediante centrifugación, filtración, microfiltración o ultrafiltración;
- g) opcionalmente unir la amidohidrolasa a un soporte sólido, teniendo lugar la unión a través de interacciones iónicas, hidrófobas o mediadas por etiqueta de afinidad;
- h) opcionalmente lavar el soporte para la eliminación de constituyentes indeseados en condiciones a las que la amidohidrolasa permanece esencialmente unida al soporte;
- i) opcionalmente eluir la amidohidrolasa del soporte mediante condiciones tampón adecuadas;
- k) opcionalmente concentrar la disolución de amidohidrolasa mediante precipitación, ultrafiltración, liofilización o secado; y
- l) opcionalmente transferir la amidohidrolasa a un tampón de almacenamiento adecuado.

Las asparaginases naturales pueden localizarse de manera intracelular y extracelular. Si se desea sobreexpresar asparaginases de manera intracelular en grandes cantidades, entonces aparece el problema de que altas concentraciones de asparaginasa en la célula ejercen un efecto tóxico, dado que hidrolizan el aminoácido asparagina esencial para la célula. Se descubrió sorprendentemente que la amidohidrolasa de acuerdo con la invención en el intervalo de temperatura de 20-37 °C, en el que habitualmente se llevan a cabo procesos de fermentación de organismos mesófilos tales como por ejemplo *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Aspergillus sp.*, presenta sólo una actividad residual muy baja. De este modo la enzima a 25 °C presenta una actividad residual de < 2 %. Esto permite la expresión intracelular de la asparaginasa de acuerdo con la invención en huéspedes de expresión mesófilos en grandes cantidades.

Un aspecto adicional de la invención comprende un procedimiento para la producción de una amidohidrolasa tal como se definió anteriormente, en el que la amidohidrolasa se expresa de forma intracelular en un microorganismo, siendo la actividad residual de la enzima a la temperatura de cultivo durante la expresión de la amidohidrolasa < 30 %, preferentemente < 15 %, aún más preferentemente < 10 %, aún más preferentemente < 5 %, de la manera más preferente < 2 %.

Protocolos de fermentación accesibles para el experto para microorganismos permiten rendimientos de biomasa húmeda de preferentemente >100 g/l, aún más preferentemente >125 g/l, aún más preferentemente >150 g/l, aún más preferentemente >175 g/l y de la manera más preferente >200 g/l.

En una forma de realización preferida, en la expresión intracelular de la amidohidrolasa en un microorganismo se consigue un rendimiento de actividad de >10 kU / g de biomasa húmeda, más preferentemente >20 kU / g de biomasa húmeda, más preferentemente >40 kU / g de biomasa húmeda, más preferentemente >60 kU / g de biomasa húmeda, de la manera más preferente >80 kU / g de biomasa húmeda.

En una forma de realización preferida, en la expresión intracelular de la amidohidrolasa en un microorganismo se consigue un rendimiento de actividad de > 100.000 unidades por litro de volumen de cultivo, preferentemente > 500.000 unidades por litro, aún más preferentemente > 1 millones de unidades por litro, aún más preferentemente > 3 millones de unidades por litro, aún más preferentemente > 6 millones de unidades por litro y de la manera más preferente > 10 millones de unidades por litro.

En una forma de realización preferida la expresión de la de acuerdo con la invención tiene lugar de forma intracelular en un huésped de expresión mesófilo tal como por ejemplo *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Aspergillus sp.*

Los siguientes ejemplos sirven para explicar en detalle la invención, sin embargo no han de interpretarse como limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Expresión de una asparaginasa termoestable

Con los dos cebadores PF_AsnI_S (5'-ACCTGCGGTCTCGCATGAAAATTCTTC-TAATTGGGATGGG-3'; <SEQ ID NO: 3>) y PF_AsnI_A (5'-GGATCCCTGCA-GTTAATCTCTAAGCTCTCCAAGTAG-3'; <SEQ ID NO: 4>) (ambos de Thermo Electron, Ulm) se amplificó el gen que codifica para la asparaginasa I de *Pyrococcus furiosus* (<SEQ ID NO: 1>) mediante una PCR de ADN de DSM 3638 de *Pyrococcus furiosus* en las siguientes condiciones.

1.1 Condiciones de PCR:

Preparación para PCR:

10 µl	10x tampón VENT (NEB, Beverly, EE.UU.)
2 µl	dNTPs (respectivamente 10 mM)
100 pmol	Cebador PF_AsnI_S <SEQ ID NO: 3>
100 pmol	Cebador PF_AsnI_A <SEQ ID NO: 4>
1 µl	ADN de <i>Pyrococcus furiosus</i> DSM 3638
2 U	VENT-polimerasa (NEB)
hasta 100 µl	H ₂ O dest.

Perfil de temperatura de la PCR:

2 min / 94 °C

- | | | | |
|----|---|---|-------------|
| 1. | 45 s / 94 °C (desnaturalización) | } | 25 x |
| 2. | 45 s / 57 °C (adición) | | |
| 3. | 60 s / 72 °C (elongación) | | |

2 min / 72 °C

El producto de PCR resultante se purificó a través del kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen, Hilden) según las instrucciones del fabricante.

1.2 Digestión de restricción:

El gen obtenido en el punto 1.1 se clonó en el vector de expresión pRSF-1b <SEQ ID NO: 5> (vector pRSF-1 b, Novagen-Merck-Biosciences, Bad Soden).

Para ello se digirieron el producto de PCR por medio de las endonucleasas de restricción *Eco31I* y *PstI* y el vector pRSF-1 b <SEQ ID NO: 5> por medio de las endonucleasas de restricción *NcoI* y *PstI* (todas de Fermentas, Vilnius, Lituania) tal como se expuso anteriormente:

1.3 Preparaciones de digestión de restricción:

Producto de PCR	Vector
2 µg de producto de PCR	4 µg de pRSF-1 b <SEQ ID NO: 5>
3 µl de 10x tampón G ⁺ (Fermentas)	4 µl 10x tampón Y ⁺ (Fermentas)
10 U de <i>Eco31I</i>	10 U de <i>NcoI</i>
20 U de <i>PstI</i>	20 U de <i>PstI</i>
hasta 30 µl de H ₂ O dest.	hasta 40 µl de H ₂ O dest.

Las preparaciones de digestión de restricción se incubaron durante 2 horas a 37 °C. A la "preparación de vector" se añadió a continuación para la desfosforilación 1 U de SAP (*Shrimp Alkaline Fosfatoase*, Fermentas, Vilnius, Lituania) y se incubó durante 30 min más a 37 °C. A continuación se inactivaron las enzimas durante 20 min a 80 °C. Después se purificaron los productos por medio del kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen, Hilden).

1.4 Ligación, transformación en *E. coli* y reaislamiento de plásmido

El ADN de vector y el producto de PCR (véase el punto 1.3) se unieron entre sí mediante la incubación con ligasa de ADN de T4 tal como se expuso anteriormente:

Preparación de ligasa:

200 fmol	pRSF-1 b <SEQ ID NO: 5>
600 fmol	producto PCR
3 μ l	10x tampón ligasa (Fermentas)
1 μ l	ligasa de ADN de T4
hasta 30 μ l	H ₂ O dest.

Las preparaciones se incubaron durante 8 h a 16 °C y a continuación se inactivó la enzima mediante incubación de 10 minutos a 65 °C. 1 μ l de esta preparación se utilizaron directamente para la transformación de células XL1 Blue competentes que pueden obtenerse comercialmente (Stratagene, La Jolla, EE.UU.) por medio de electroporación. Las células sometidas a electroporación se sembraron en placa sobre placas de agar sólido con canamicina y se cultivaron durante la noche a 37 °C. A partir de una colonia individual resultante se aisló de nuevo el plásmido acabado por medio del kit de purificación de plásmido kit de minipreparación QIAprep (Qiagen, Hilden) según las instrucciones del fabricante y se obtuvo el plásmido de expresión pRSF_Pf-AsnI <SEQ ID NO: 6>.

El plásmido de expresión pRSF_Pf-AsnI <SEQ ID NO: 6> se introdujo por medio de electroporación en Rosetta 2 (DE3) (Novagen-Merck-Biosciences, Bad Soden) se introdujeron células y se sembraron en placa las células sobre placas de agar LB (10 g de Trypton, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl, hasta 1 l de agua dest.) con canamicina (Kan) y cloranfenicol (Cam).

De estas placas se cogieron clones individuales y se prepararon en primer lugar cultivos previos para la expresión. Para esto se inocularon 100 ml de medio de (Kan, Cam) de LB con glucosa al 1 % (p/v) con 1 ml de un cultivo previo de 5 ml y se agitaron hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,6 a 37 °C y 200 rpm (revoluciones por minuto). Las células se separaron por filtración (4 °C, 15 min, 3200xg) y se desechó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 2 ml de glicerol al 10 % (v/v). La suspensión se tomó en alícuotas respectivamente de 200 μ l, se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C.

El cultivo principal para la expresión consistía en 500 ml de medio de (Kan, Cam) de LB con glucosa al 1 % (p/v). Se inoculó con una alícuota del cultivo previo. El cultivo principal se incubó a 37 °C y 200 rpm. Después de alcanzar una DO₆₀₀ de 0,9 se indujo con IPTG 1 mM (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) y se agitó durante la noche a 30 °C y 200 rpm. Al día siguiente se sedimentaron las células mediante centrifugación (4 °C, 15 min, 3200Xg) y después de retirar el medio se pesó el sedimento y se resuspendió con 20 ml de tampón de lisis (Tris/HCl 10 mM pH 8,0, lisozima 0,5 mg/ml) y se disgregó con ultrasonidos (5330 s, 80 % de potencia). La suspensión de las células disgregadas se centrifugó (4 °C, 30 min, 14000Xg). El sobrenadante se sometió a continuación a una incubación durante 30 min a 80 °C y se somete a una nueva centrifugación (4 °C, 30 min, 14000Xg). El sedimento se desechó y se extrajo el extracto bruto así obtenido y se almacenó para ensayos adicionales a 4 °C. Del sobrenadante se determinó el rendimiento de actividad con 160 kU (véase el ejemplo 2). A partir del peso del sedimento celular de 4 g resultó un rendimiento de 40 kU por g de biomasa húmeda.

Ejemplo 2 – Determinación del perfil de temperatura

Principio de ensayo

Las asparaginasa catalizan la conversión de asparagina en aspartato con la liberación de iones amonio. Éstos pueden detectarse a través de reactivos de color, tales como por ejemplo el reactivo de Nessler. Como alternativa pueden detectarse iones amonio también a través de la reacción de Berthelot (DIN 38 406 E5). El ensayo con reactivo de Nessler se basa en una determinación de punto final. La reacción se incubó a este respecto a lo largo de un periodo de tiempo de 30 min a la temperatura correspondiente, se detiene y se detectan los iones de amonio que se generan.

Reactivos y disoluciones

Reactivos:

L-asparagina monohidratada: Applichem A3669, MW 150,14 g/mol
Sulfato de amonio: Merck, 1.101211, MW 132,14 g/mol
Reactivo de Nessler: Fluka, 72190 Tris, TCA

Disoluciones madre y tampón:

Tris/HCl 50 mM pH 8,6
 Disolución de L-asparagina 172 mM
 TCA 1,5 M (ácido tricloroacético)

Disoluciones de calibración:

Disolución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 mM

2.1 Creación de una curva de calibración

Para ello se prepararon las siguientes preparaciones:

En cada caso 50 μl						Tris/HCl 50 mM pH 8,6
0 μl	5 μl	10 μl	20 μl	30 μl	40 μl	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 mM
45 μl	40 μl	35 μl	25 μl	15 μl	5 μl	H ₂ O dest.

Las preparaciones se mezclaron y se añadieron en cada caso 5 μl de TCA 1,5 M y se mezclaron de nuevo.

Se dispusieron previamente para cada valor 860 μl de H₂O dest. en un recipiente de reacción de 1,5 ml y se añadieron y se mezclaron 40 μl de la preparación respectiva. A cada mezcla madre se añadieron rápidamente 100 μl de reactivo de Nessler y se mezclaron brevemente las muestras. Después de 5 min se calibró el fotómetro a 436 nm frente a agua y se midieron rápidamente las muestras. Los valores se introdujeron en una recta de calibración (véase la figura 1).

2.2 Medición de muestras

Por medio de un ensayo de determinación de proteínas comercial (Bradford, Bio-Rad Laboratories GmbH, Múnich) se determinó la concentración de proteína del extracto bruto del ejemplo de realización 1 con aproximadamente 4 mg/ml. La disolución de asparaginasa se diluyó 1:2000 en Tris/HCl 50 mM pH 8,6. Para cada una de las muestras que van a medirse se dispuso previamente la siguiente preparación:

50 μl	Tris/HCl 50 mM pH 8,6
35 μl	H ₂ O dest.
5 μl	Disolución de L-Asn 172 mM

Las preparaciones se mezclaron y se calentaron previamente en un termociclador hasta la temperatura deseada (37, 70, 80, 90 y 99 °C).

A las preparaciones se añadieron 5 μl de la muestra de enzimas diluida y para el valor de referencia se añadieron 5 μl de tampón, las preparaciones se mezclaron brevemente y se incubaron entonces durante 30 min a la temperatura de reacción respectiva. A continuación se enfriaron las reacciones sobre hielo y se detuvieron mediante adición de 5 μl de disolución de TCA 1,5 M.

La determinación de los iones amonio liberados tuvo lugar inmediatamente a continuación. Se dispusieron para cada valor 860 μl de H₂O dest. en un recipiente de reacción de 1,5 ml y se añadieron y se mezclaron 40 μl de la preparación respectiva. A cada preparación se añadieron rápidamente 100 μl de reactivo de Nessler y se mezclaron brevemente las muestras. Después de 5 min se calibró el fotómetro a 436 nm frente a agua y se midieron las muestras rápidamente.

En primer lugar se calculó el valor de absorción determinado en iones amonio liberados por medio de la curva de calibración (véase la figura 1). A continuación se calculó a través de la definición de la unidad (una unidad de asparaginasa libera 1 μmol de NH_4 por minuto en las condiciones de ensayo) la actividad volumétrica [U/ml] de la enzima. Cálculos de este tipo son en general conocidos por el experto.

2.3 Determinación del valor óptimo de temperatura

Para las distintas temperaturas se midió el contenido en NH_4 a una longitud de onda de 436 nm y se determinaron las actividades (enzimáticas) volumétricas resultantes de lo mismo. La actividad volumétrica a 90 °C se estableció al 100 % (= valor de referencia) y las actividades volumétricas respectivas a las otras temperaturas de manera correspondiente referidas a este valor de referencia (= actividad relativa). Los valores correspondientes están resumidos en la siguiente tabla, así como gráficamente en la figura 2:

Temp.	Valor de medición 436 nm	Unidades por ml	Actividad relativa
37 °C	0,018	320	9 %
70 °C	0,126	2140	58 %
80 °C	0,205	3460	94 %
90 °C	0,218	3670	100 %
99 °C	0,2	3370	92 %

Ejemplo 3 – Determinación de la estabilidad frente a la temperatura

Reactivos y disoluciones, la determinación de la curva de calibración así como la realización de los ensayos de actividad tuvo lugar tal como se describió anteriormente en el ejemplo de realización 2.

3.1 Estabilidad frente a la temperatura a 95 °C

La determinación de la actividad (enzimática) volumétrica tuvo lugar en este sentido siempre a una temperatura de incubación de 90 °C. Para la determinación de la estabilidad frente a la temperatura se diluyó la disolución de asparaginasa del ejemplo de realización 1 1:10 en Tris/HCl 50 mM pH 8,6 y a continuación se incubó previamente durante distintos intervalos de tiempo a 95 °C (0, 1, 15, 30, 45 y 60 min). A continuación tuvo lugar una dilución adicional de 1:100 en Tris/HCl 50 mM pH 8,6 y la determinación de la actividad residual restante. La actividad enzimática volumétrica sin incubación previa a 95 °C se estableció al 100 % (= valor de referencia) y todos los demás valores se refieren a este valor de referencia (= actividad relativa). Los valores obtenidos/calculados a este respecto están resumidos en la siguiente tabla (véase también la figura 3):

Tiempo en min	Valor de medición a 436 nm	Unidades por ml	Actividad relativa
0	0,398	3340	100 %
1	0,466	3900	117 %*
15	0,403	3380	101 %*
30	0,464	3890	116 %*
45	0,464	3890	116 %*
60	0,418	3500	105 %*

* actividad relativa = actividad residual

3.2 Estabilidad frente a la temperatura a 99 °C

El ensayo para la determinación de la estabilidad frente a la temperatura a 99 °C se llevó a cabo de manera análoga al ensayo descrito anteriormente en el punto 3.1. Los valores obtenidos/calculados en este sentido están resumidos en la siguiente tabla (véase también la figura 4):

Tiempo en min	Valor de medición a 436 nm	Unidades por ml	Actividad relativa
0	0,411	3440	100 %
1	0,416	3490	101 %*
15	0,396	3320	97 %*
30	0,276	2320	67 %*
45	0,329	2790	81 %*
60	0,294	2470	72 %*

* actividad relativa = actividad residual

Ejemplo 4 – Reducción del contenido en acrilamida en granos de café

Para la detección de la eficacia del tratamiento de alimentos con la asparaginasa de acuerdo con la invención se sometieron granos de café en bruto antes de la tostación a una etapa de tratamiento con la enzima a 80 °C y se determinó la reducción del contenido en acrilamida después de la tostación.

Para ello se prepararon las siguientes preparaciones de ensayo:

Blanco 1: 500 g de granos de café en bruto tipo arábica-mezcla +
267 g de TRIS/HCl 100 mM pH 8,6 (25 °C)

Blanco 2: 500 g de granos de café en bruto tipo arábica de Brasil +
267 g de TRIS/HCl 100 mM pH 8,6 (25 °C)

Muestra 1: 500 g de granos de café en bruto tipo arábica-mezcla +
267 g de M TRIS/HCl 100 mM pH 8,6 (25 °C) +
1400 unidades de asparaginasa del ejemplo de realización 1

Muestra 2: 500 g de granos de café en bruto tipo arábica de Brasil +
267 g de TRIS/HCl 100 mM pH 8,6 (25 °C) +
1400 unidades asparaginasa del ejemplo de realización 1

- 5 Los blancos y las muestras se incubaron durante 60 min a 80 °C con rotación. A continuación se separó por filtración el líquido de los granos de café, se secaron los granos y se tostaron.

La determinación del contenido en acrilamida tuvo lugar por un laboratorio de ensayo acreditado independiente. Los resultados de los ensayos se muestran en la siguiente tabla (véase también la figura 4):

10

	Contenido en acrilamida en µg/kg	Desviación media en µg/kg	Contenido residual
Blanco 1	480	20	100 %
Muestra 1	222	19	46 %
Blanco 2	585	35	100 %
Muestra 2	273	18	47 %

Protocolo de secuencias:

15

<110> c-Lecta GmbH

<120> Amidohidrolasas para el tratamiento de productos alimenticios o estimulantes

<130> IV0003

20

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.4

25

<210> 1

<211> 981

<212> ADN

<213> *Pyrococcus furiosus*

<400> 1

ES 2 480 542 T3

```

gtgaaaattc ttctaattgg gatgggtgga acaattgcga gtgtaaaggc cgagaatgga      60
tatgaggctt cgttggtccgt taaagaagtt ttagatatcg ccggaatcaa agattgtgag      120
gattgtgatt ttctcgattt aaagaacggt gatagcacgc ttatccagcc agaagattgg      180
gtagatcttg ctgaaactct ttacaagaat gtaaaaaaat atgatggaat tatagtcact      240
catggtaccg atactcttgc ctacacttct tcaatgataa gtttcatgct tagaaacccc      300
ccaataccca tcgtatttac tggttctatg atacctgcc a ctgaagaaaa tagtgcagcc      360
cccctaaact tgcaaacagc aataaagttt gcaacttctg gaattagggg agtttacgtg      420
gccttcaatg gaaaagttat gcttggagtt agaacatcta aggttaggac aatgagcaga      480
gatgcattcg aaagcattaa ctaccctata attgcagaat taagaggaga agatctctgtg      540
gttaacttta ttccaaagtt taacaatgga gaagtcacat tagaccttag gcacgatcca      600
aaagttctag ttataaagct aatcccagga ctttcggggg acataatttag ggcagctgta      660
gagctgggat atagaggaat tgtcatagaa ggttatggag ctggaggaat tccttatagg      720
ggaagtgatt tacttcaaac aatagaggag ctctccaagg agattccaat agtaatgaca      780
accaggcaa tgtacgatgg agttgatcta acgaggatca aagttgggag attagccctt      840
agagctggag taatcccagc gggggacatg acaaaaaggg caacagtaac aaagctcatg      900
tggattctag gccacacaaa caatgtggaa gaaataaaaag tattaatgag aaaaaatcta      960
gttggagagc ttagagatta a                                          981

```

<210> 2

<211> 326

<212> PRT

5 <213> *Pyrococcus furiosus*

<400> 2

ES 2 480 542 T3

Met Lys Ile Leu Leu Ile Gly Met Gly Gly Thr Ile Ala Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly Glu Asn Gly Tyr Glu Ala Ser Leu Ser Val Lys Glu Val Leu Asp
20 25 30

Ile Ala Gly Ile Lys Asp Cys Glu Asp Cys Asp Phe Leu Asp Leu Lys
35 40 45

Asn Val Asp Ser Thr Leu Ile Gln Pro Glu Asp Trp Val Asp Leu Ala
50 55 60

Glu Thr Leu Tyr Lys Asn Val Lys Lys Tyr Asp Gly Ile Ile Val Thr
65 70 75 80

His Gly Thr Asp Thr Leu Ala Tyr Thr Ser Ser Met Ile Ser Phe Met
85 90 95

ES 2 480 542 T3

Leu Arg Asn Pro Pro Ile Pro Ile Val Phe Thr Gly Ser Met Ile Pro
100 105 110

Ala Thr Glu Glu Asn Ser Asp Ala Pro Leu Asn Leu Gln Thr Ala Ile
115 120 125

Lys Phe Ala Thr Ser Gly Ile Arg Gly Val Tyr Val Ala Phe Asn Gly
130 135 140

Lys Val Met Leu Gly Val Arg Thr Ser Lys Val Arg Thr Met Ser Arg
145 150 155 160

Asp Ala Phe Glu Ser Ile Asn Tyr Pro Ile Ile Ala Glu Leu Arg Gly
165 170 175

Glu Asp Leu Val Val Asn Phe Ile Pro Lys Phe Asn Asn Gly Glu Val
180 185 190

Thr Leu Asp Leu Arg His Asp Pro Lys Val Leu Val Ile Lys Leu Ile
195 200 205

Pro Gly Leu Ser Gly Asp Ile Phe Arg Ala Ala Val Glu Leu Gly Tyr
210 215 220

Arg Gly Ile Val Ile Glu Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Ile Pro Tyr Arg
225 230 235 240

Gly Ser Asp Leu Leu Gln Thr Ile Glu Glu Leu Ser Lys Glu Ile Pro
245 250 255

Ile Val Met Thr Thr Gln Ala Met Tyr Asp Gly Val Asp Leu Thr Arg
260 265 270

ES 2 480 542 T3

Tyr Lys Val Gly Arg Leu Ala Leu Arg Ala Gly Val Ile Pro Ala Gly
275 280 285

Asp Met Thr Lys Glu Ala Thr Val Thr Lys Leu Met Trp Ile Leu Gly
290 295 300

His Thr Asn Asn Val Glu Glu Ile Lys Val Leu Met Arg Lys Asn Leu
305 310 315 320

Val Gly Glu Leu Arg Asp
325

<210> 3

<211> 40

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> sintetizada químicamente

10 <400> 3

acctgcggtc tcgcatgaaa attcttctaa ttgggatggg 40

<210> 4

<211> 36

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> sintetizada químicamente

20 <400> 4

ggatccctgc agttaatctc taagctctcc aactag 36

<210> 5

25 <211> 3669

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

30 <223> plásmido pRSF-1b

<400> 5

tggtgtccgg gatctcgacg ctctccctta tgcgactcct gcattaggaa attaatacga	60
ctcactatag gggaattgtg agcggataac aattccccctg tagaaataat tttgtttaac	120
tttaataagg agatatacca tggcacatca ccaccaccat cacgtgggta ccggttcgaa	180
tgatgacgac gacaagagtc cggatcccaa ttgggagctc gtgtacacgg cgcgcctgca	240
ggtcgacaag cttgcggccg cactcgagtc tggtaaagaa accgctgctg cgaaatttga	300
acgccagcac atggactcgt ctactagcgc agcttaatta acctaggctg ctgccaccgc	360
tgagcaataa ctagcataac cccttggggc ctctaaacgg gtcttgaggg gttttttgct	420
gaaacctcag gcatttgaga agcacacggg cactctgctt ccggtagtca ataaaccggt	480
aaaccagcaa tagacataag cggctattta acgaccctgc cctgaaccga cgacaagctg	540
acgaccgggt ctccgcaagt ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc cctatttgtt	600
tatttttcta aatacattca aatatgtatc cgctcatgaa ttaattctta gaaaaactca	660
tcgagcatca aatgaaactg caatttatc atatcaggat tatcaatacc atatttttga	720
aaaagccgtt tctgtaatga aggagaaaac tcaccgaggc agttccatag gatggcaaga	780
tcctgggtatc ggtctcgat tccgactcgt ccaacatcaa tacaacctat taatttcccc	840
tcgtcaaaaa taaggttatc aagtgagaaa tcaccatgag tgacgactga atccggtgag	900
aatggcaaaa gtttatgcat ttctttccag acttggtcaa caggccagcc attacgctcg	960
tcataaaaat cactcgcac aaccaaaccg ttattcattc gtgattgcgc ctgagcgaga	1020

cgaaatacgc ggtcgtgtt aaaaggacaa ttacaaacag gaatcgaatg caaccggcgc	1080
aggaacactg ccagcgcac aacaatattt tcacctgaat caggatattc ttctaatacc	1140
tggaatgctg ttttcccggt gatcgcatg gtgagtaacc atgcatcatc aggagtacgg	1200
ataaaatgct tgatggtcgg aagaggcata aattccgtca gccagtttag tctgaccatc	1260
tcattctgtaa catcattggc aacgctacct ttgccatgtt tcagaaacaa ctctggcgca	1320
tcgggcttcc catacaatcg atagattgtc gcacctgatt gcccgacatt atcgcgagcc	1380
catttatacc catataaatc agcatccatg ttggaattta atcgcggcct agagcaagac	1440
gtttcccggt gaatatggct catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag	1500
ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggc	1560
atgcagcgtc ctcccgcttc ctgcgtcact gactcgctac gctcggtcgt tcgactgcgg	1620
cgagcgggtg cagctcactc aaaagcggta atacggttat ccacagaatc aggggataaa	1680
gccggaaaga acatgtgagc aaaaagcaaa gcaccggaag aagccaacgc cgcaggcggt	1740
tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gccagagggtg	1800
gcgaaaccgg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct cctcgtgcg	1860
ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc ctccgggaag	1920
cgtggcgctt tctcatagct cagctgttg gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc	1980
caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa	2040
ctatcgtctt gagtccaacc cggtaaagaca cgacttatcg ccaactggcag cagccattgg	2100
taactgattt agaggacttt gtcttgaagt tatgcacctg ttaaggctaa actgaaagaa	2160
cagattttgg tgagtgcggc cctccaaccc acttaccttg gttcaaagag ttggtagctc	2220
agcgaacctt gagaaaacca ccgttggtag cgggtggttt tctttattta tgagatgatg	2280

aatcaatcgg tctatcaagt caacgaacag ctattccgtt actctagatt tcagtgaat	2340
ttatctcttc aaatgtagca cctgaagtca gcccatacg atataagttg taattctcat	2400
gttagtcatg ccccgcgccc accggaagga gctgactggg ttgaaggctc tcaagggcat	2460
cggtcgagat cccggtgcct aatgagtgag ctaacttaca ttaattgcgt tgcgctcact	2520
gcccgccttc cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc	2580
ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgcca gggtaggttt tcttttcacc agtgagacgg	2640
gcaacagctg attgcccttc accgcctggc cctgagagag ttgcagcaag cggtcacgc	2700
tggtttgccc cagcaggcga aaatcctgtt tgatgggtgt taacggcggg atataacatg	2760
agctgtcttc ggtatcgtcg tatccacta ccgagatgtc cgcaccaacg cgcagcccgg	2820
actcggtaat ggcgcgcatt gcgcccagcg ccatctgac gttggcaacc agcatcgag	2880
tgggaacgat gccctcattc agcatttgca tggtttggtg aaaaccggac atggcactcc	2940
agtcgccttc ccgttccgct atcggtgaa tttgattgag agtgagatat ttatgccagc	3000
cagccagacg cagacgcgcc gagacagaac ttaatgggac cgctaacagc gcgatttgc	3060
ggtgacccaa tgcgaccaga tgctccacgc ccagtcgct accgtcttca tgggagaaaa	3120
taatactgtt gatgggtgtc tggtcagaga catcaagaaa taacgccgga acattagtgc	3180
aggcagcttc cacagcaatg gcatcctggt catccagcgg atagttaatg atcagcccac	3240
tgacgcgttg cgcgagaaga ttgtgcaccg ccgctttaca ggcttcgacg ccgcttcggt	3300
ctaccatcga caccaccacg ctggcaccca gttgatcggc gcgagattta atcgccgcga	3360
caatttgca cggcgcgtgc agggccagac tggaggtggc aacgccaatc agcaacgact	3420
gtttgcccgc cagttgttgt gccacgcggt tgggaatgta attcagctcc gccatcgccg	3480
cttcacttt ttcccgcgtt ttcgcagaaa cgtggctggc ctggttcacc acgcgggaaa	3540

ES 2 480 542 T3

cggtctgata agagacaccg gcatactctg cgacatcgta taacggttact ggtttcacat 3600
tcaccaccct gaattgactc tcttccgggc gctatcatgc cataccgcga aagggttttgc 3660
gccattcga 3669

<210> 6
<211> 4554
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Plásmido pRSF_PF-AsnI

<400> 6

tgggtgtccgg gatctcgacg ctctccctta tgcgactcct gcattaggaa attaatacga 60
ctcactatag ggggaattgtg agcggataac aattcccctg tagaaataat tttgtttaac 120
tttaataagg agatatacca tgaaaattct tctaattggg atgggtggaa caattgcbag 180
tgtaaagggc gagaatggat atgaggettc gttgtccgtt aaagaagttt tagatatcgc 240
cggaatcaaa gattgtgagg attgtgattt tctcgattta aagaacgttg atagcacgct 300
tatccagcca gaagattggg tagatcttgc tgaaactctt tacaagaatg taaaaaata 360
tgatggaatt atagtcactc atggtaccga tactcttgcc tacacttctt caatgataag 420
tttcatgctt agaaaccccc caataccat cgtatttact ggttctatga tacctgccac 480
tgaagaaaat agtcatgccc ccctaaactt gcaaacagca ataaagtttg caacttctgg 540
aattagggga gtttacgtgg ctttcaatgg aaaagttatg cttggagtta gaacatctaa 600
ggtaggaca atgagcagag atgcattcga aagcattaac taccctataa ttgcagaatt 660
aagaggagaa gatctcgtgg ttaactttat tccaaagttt aacaatggag aagtcacatt 720
agaccttagg cacgatccaa aagttctagt tataaagcta atcccaggac tttcggggga 780

catatttagg gcagctgtag agctgggata tagaggaatt gtcatagaag gttatggagc	840
tggaggaatt ccttataggg gaagtgattt acttcaaaca atagaggagc tctccaagga	900
gattccaata gtaatgacaa cccaggcaat gtacgatgga gttgatctaa cgaggtacaa	960
agttgggaga ttagccctta gagctggagt aatcccagcg ggggacatga caaaagaggc	1020
aacagtaaca aagctcatgt ggattctagg ccacacaaac aatgtggaag aaataaaagt	1080
attaatgaga aaaaatctag ttggagagct tagagattaa ctgcaggtcg acaagcttgc	1140
ggccgcactc gagtctggtt aagaaaccgc tgctgcgaaa tttgaacgcc agcacatgga	1200
ctcgtctact agcgcagctt aattaaccta ggctgctgcc accgctgagc aataactagc	1260
ataaccctt ggggcctcta aacgggtctt gaggggtttt ttgctgaaac ctcaggcatt	1320
tgagaagcac acggtcacac tgcttccggt agtcaataaa ccggtaaacc agcaatagac	1380
ataagcggct atttaacgac cctgccctga accgacgaca agctgacgac cgggtctccg	1440
caagtggcac ttttcgggga aatgtgcgcy gaaccctat ttgtttattt ttctaaatac	1500
attcaaatat gtatccgctc atgaattaat tcttagaaaa actcatcgag catcaaatac	1560
aactgcaatt tattcatatc aggattatca ataccatatt ttgaaaaag ccgtttctgt	1620
aatgaaggag aaaactcacc gaggcagttc cataggatgg caagatcctg gtatcgggtc	1680
gcgattccga ctcgtccaac atcaatacaa cctattaatt tcccctcgtc aaaaataagg	1740
ttatcaagtg agaaatcacc atgagtgacg actgaatccg gtgagaatgg caaaagtta	1800
tgcatttctt tccagacttg ttcaacagge cagccattac gctcgtcac aaaaactc	1860
gcatcaacca aaccgttatt cattcgtgat tgcgctgag cgagacgaaa tacgcggtcg	1920
ctgttaaaag gacaattaca aacaggaatc gaatgcaacc ggcgcaggaa cactgccagc	1980
gcatcaacaa tattttcacc tgaatcagga tattcttcta atacctgaa tgctgttttc	2040

ccggggatcg cagtgggtgag taaccatgca tcatcaggag tacggataaa atgcttgatg	2100
gtcgggaagag gcataaattc cgtcagccag tttagtctga ccctctcatc tgtaacatca	2160
ttggcaacgc tacctttgcc atgtttcaga aacaactctg gcgcatcggt cttcccatat	2220
aatcgataga ttgtcgcacc tgattgcccg acattatcgc gagcccatct ataccatata	2280
aaatcagcat ccatgttgga atttaatcgc ggcttagagc aagacgtttc ccgttgaata	2340
tggtcatatc tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg	2400
agcggatata tatttgaatg tatttagaaa aataaataaa taggcatgca gcgtctctcc	2460
gttctctcgc tcaactgactc gctacgctcg gtcgttcgac tgcggcgagc ggtgtcagct	2520
cactcaaaaag cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataaagccgg aaagaacatg	2580
tgagcaaaaa gcaaagcacc ggaagaagcc aacgcgcgag gcgtttttcc ataggctccg	2640
ccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagccag aggtggcgaa acccgacagg	2700
actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac	2760
cctgccgctt accggatacc tgctcgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca	2820
tagctcacgc tgttggtatc tcagttcggg gtaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt	2880
gcacgaaccc ccggttcagc ccgaccgctg cgcttatcc ggtaactatc gtcttgagtc	2940
caaccgggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc attggtaact gatthagagg	3000
actttgtctt gaagttatgc acctgttaag gctaaactga aagaacagat tttgggtgagt	3060
gcggtcctcc aaccactta ccttggttca aagagttggt agctcagcga accttgagaa	3120
aaccaccgtt ggtagcgggt gtttttcttt atttatgaga tgatgaatca atcggctctat	3180
caagtcaacg aacagctatt ccgttactct agatttcagt gcaatttatc tcttcaaatg	3240
tagcacctga agtcagcccc atacgatata agttgtaatt ctcatgttag tcatgccccg	3300

cgcccaccgg aaggagctga ctgggttgaa ggctctcaag ggcacggtc gagatcccgg 3360

tgcctaata ga gtgagctaac ttacattaat tgcgttgccg tcaactgccc ctttccagtc 3420

gggaaacctg tgcgtgccagc tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga gaggcgggtt 3480

gcgtattggg cgccaggggt gtttttcttt tcaccagtga gacgggcaac agctgattgc 3540

ccttcaccgc ctggccctga gagagttgca gcaagcggc cagcgtggtt tgccccagca 3600

ggcgaaaatc ctgtttgatg gtggttaacg gcgggatata acatgagctg tcttcggtat 3660

cgctgtatcc cactaccgag atgtccgcac caacgcgcag cccggactcg gtaatggcgc 3720

gcattgcgcc cagcgccatc tgatcggttg caaccagcat cgcagtggga acgatgccct 3780

cattcagcat ttgcatggtt tgttgaaaac cggacatggc actccagtcg cttcccgtt 3840

ccgctatcgg ctgaatttga ttgcgagtga gatatttatg ccagccagcc agacgcagac 3900

gcgccgagac agaacttaat gggcccgtc acagcgcgat ttgctggtga cccaatgcga 3960

ccagatgctc cagccccagt cgcgtaccgt cttcatggga gaaaataata ctgttgatgg 4020

gtgtctggc agagacatca agaaataacg ccggaacatt agtgcaggca gcttccacag 4080

caatggcatc ctggatcatc agcggatagt taatgatcag cccactgacg cgttgccgca 4140

gaagattgtg caccgcgcgt ttacaggctt cgacgcgcgt tcgttctacc atcgacacca 4200

ccacgctggc acccagttga tcggcgcgag atttaatcgc cgcgacaatt tgcgacggcg 4260

cgtgcagggc cagactggag gtggcaacgc caatcagcaa cgactgtttg cccgccagtt 4320

gttgtgccac gcggttgga atgtaattca gctccgccat cgcgcgttcc actttttccc 4380

gcgttttcgc agaaacgtgg ctggcctggt tcaccacgcg ggaaacggc tgataagaga 4440

caccggcata ctctgcgaca tcgtataacg ttactgggtt cacattcacc acctgaatt 4500

gactctcttc cgggcgctat catgccatac cgcgaaaggt tttgcgccat tcga 4554

REIVINDICACIONES

1. Uso de una amidohidrolasa, que después de una duración de incubación de 20 min a 70 °C presenta una actividad residual de al menos el 75 % y un valor óptimo de temperatura en el intervalo de 70 a 120 °C, para el tratamiento de un producto alimenticio o de un estimulante mediante incubación del producto alimenticio o del estimulante con la amidohidrolasa a una temperatura de incubación de al menos 70 °C, siendo la amidohidrolasa una asparaginasa, cuya secuencia de aminoácidos presenta una homología de al menos el 50 % con respecto a la secuencia de aminoácidos <SEQ ID NO: 2>.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** la amidohidrolasa
 - a una temperatura en el intervalo de 60 a 120 °C presenta una actividad específica de al menos 200 unidades/mg; y/o
 - presenta un valor óptimo de pH en el intervalo de pH 1 a pH 14; y/o
 - después de almacenamiento a 4 °C a lo largo de un periodo de tiempo de 1 mes presenta una actividad residual de al menos el 80 %; y/o
 - a lo largo del intervalo de pH de pH 5 - pH 10 presenta una actividad de al menos el 10 % en comparación con la actividad máxima.
3. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la asparaginasa es "asparaginasa I" de *Pyrococcus furiosus*.
4. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la asparaginasa está codificada por una secuencia de nucleótidos, que presenta una homología de al menos el 60 % con respecto a la secuencia de nucleótidos <SEQ ID NO: 1>.
5. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la secuencia de aminoácidos de la asparaginasa presenta una homología de al menos el 75 % con respecto a la secuencia de aminoácidos <SEQ ID NO: 2>.
6. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el tratamiento del producto alimenticio o del estimulante
 - sirve para la hidrólisis de asparagina para dar ácido aspártico; y/o
 - sirve para la disminución del contenido en asparagina y/o acrilamida en el producto alimenticio o el estimulante.
7. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado por que** la disminución del contenido en asparagina tiene lugar para que el producto alimenticio o el estimulante, en el caso de un tratamiento posterior térmico, presenten un contenido en acrilamida disminuido.
8. Uso de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el producto alimenticio y/o estimulante se selecciona del grupo que consiste en pan crujiente, pan tostado, galletas, galletas saladas, pan para tostar, barquillos, magdalenas, rosquillas, cruasanes, brownies, cereales para el desayuno, bizcochos, chips de patata, chips de tortilla, chips de maíz, crackers, patatas fritas, galletas de arroz, polenta, cuscús, tortitas, nueces, mezclas preparadas mezclas para pasteles, mezclas para bizcochos, mezclas para pan, picatostes, pienso para perros, pienso para gatos, granos de café y granos de cacao.
9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado por que** el tratamiento comprende una descafeinización y/o un lavado de granos de café.
10. Procedimiento para el tratamiento de un producto alimenticio o de un estimulante que comprende la etapa:
 - (i) incubar el producto alimenticio o el estimulante con una amidohidrolasa tal como se define en una de las reivindicaciones 1 a 5 a una temperatura de incubación de al menos 70 °C.
11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado por que** comprende la etapa:
 - (ii) separar la amidohidrolasa del producto alimenticio o del estimulante o inactivar la amidohidrolasa.

Figura 1

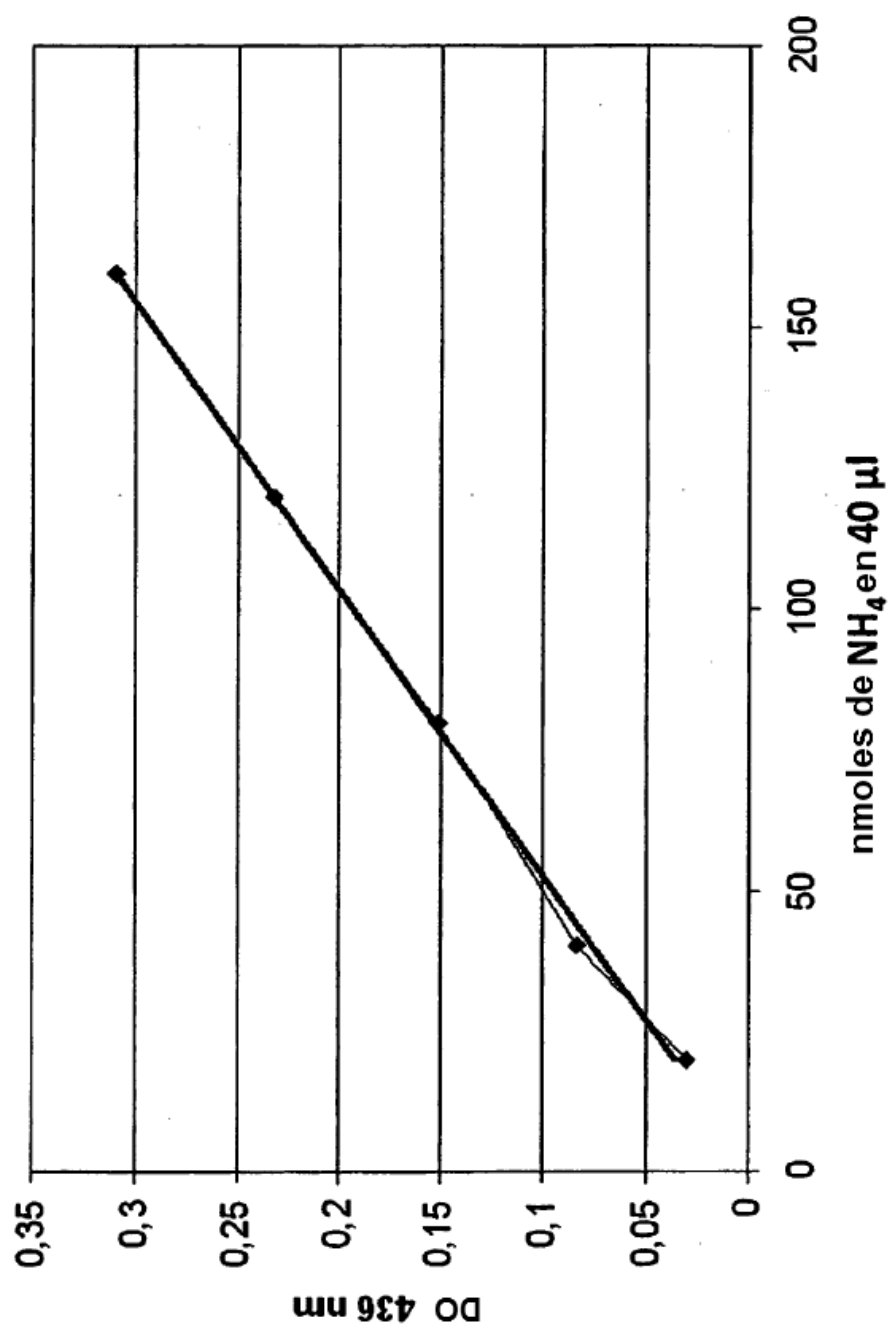


Figura 2

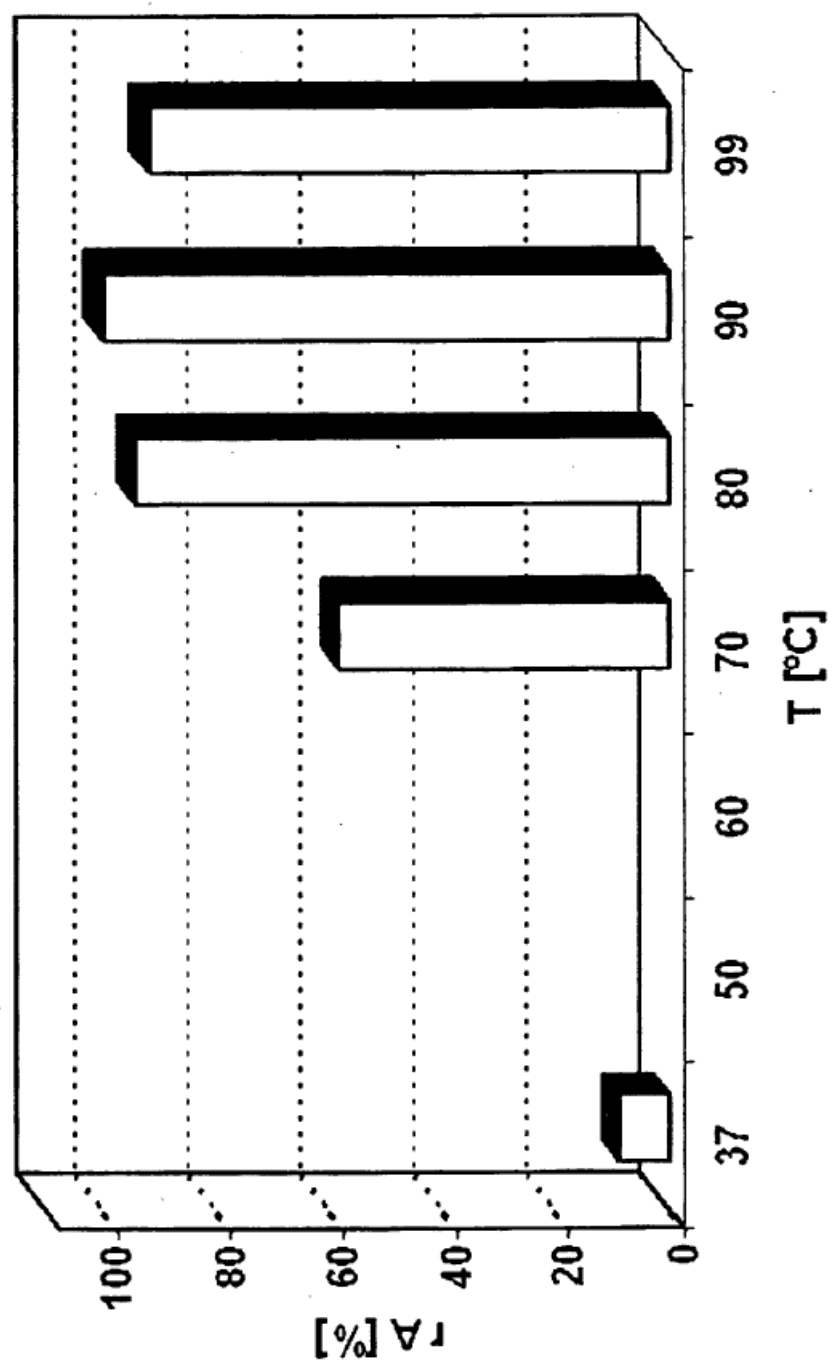


Figura 3

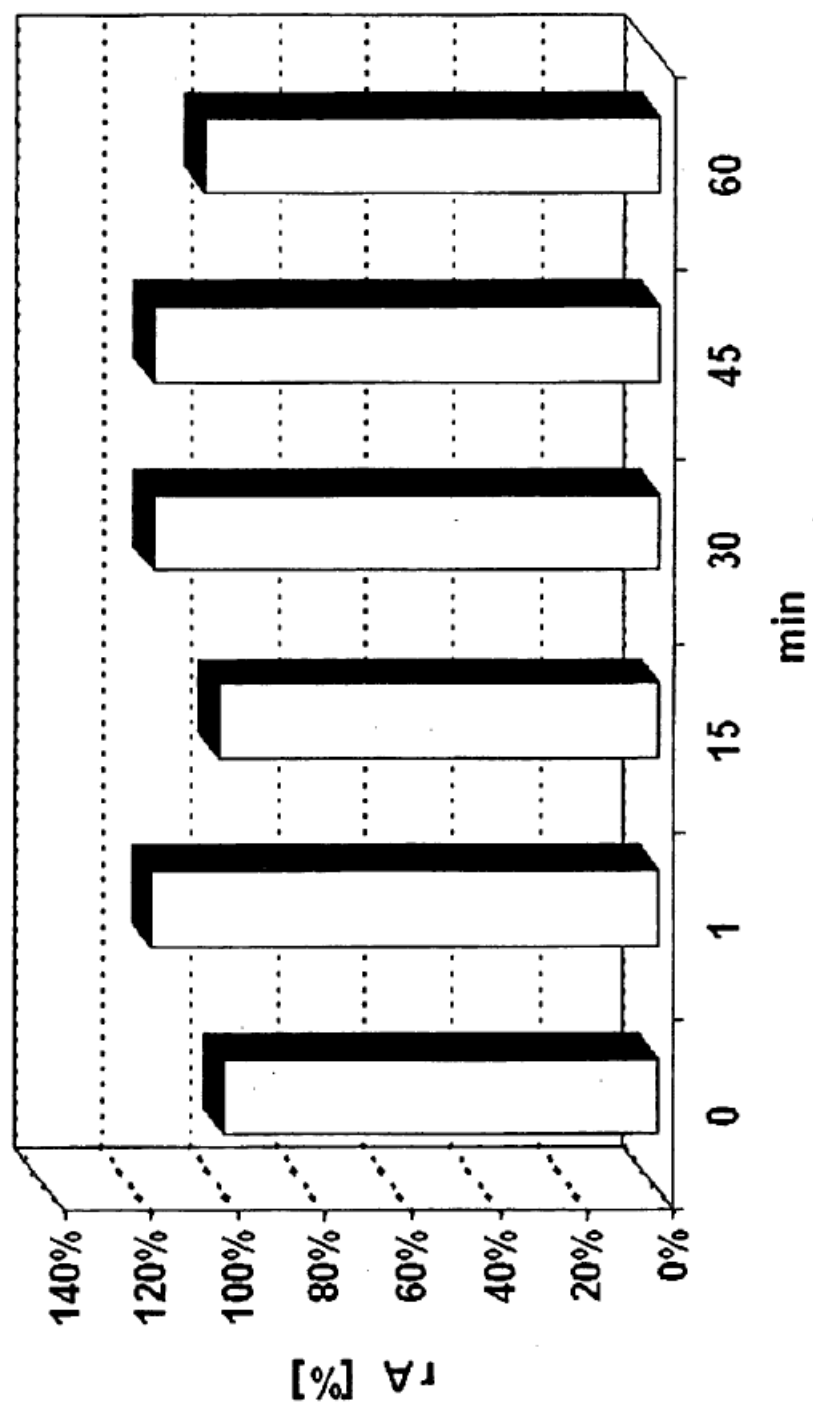


Figura 4

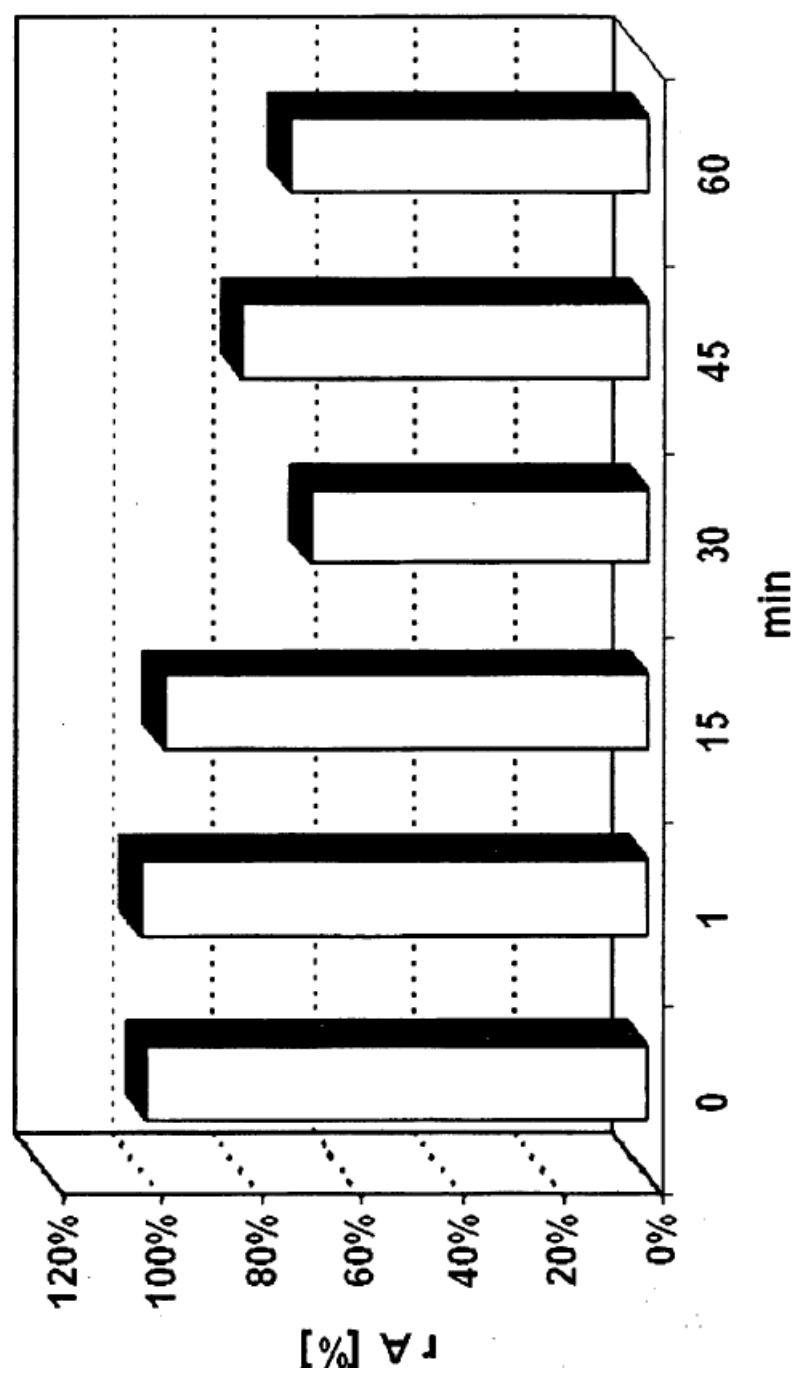


Figura 5

