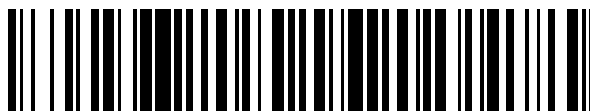


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 222**

51 Int. Cl.:

A23L 1/31 (2006.01)
A23L 1/318 (2006.01)
A23L 1/325 (2006.01)
A23L 1/33 (2006.01)
A23L 1/333 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
A23L 1/314 (2006.01)
A23L 1/317 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2006 E 06700828 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015 EP 1836907**

54 Título: **Producto cárnico transformado o producto de pasta de pescado y procedimiento para su producción**

30 Prioridad:

13.01.2005 JP 2005005853

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.10.2015

73 Titular/es:

AJINOMOTO CO., INC. (50.0%)
15-1, Kyobashi 1-chome, Chuo-ku
Tokyo 104-8315, JP y
AMANO ENZYME INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

MIWA, NORIKO;
NAKAGOSHI, HIROYUKI;
HIROSE, FUMIYUKI;
NAKAMURA, NAMI;
KODERA, TOMOHIRO y
WAKABAYASHI, HIDEHIKO

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 547 222 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

Producto cárnico transformado o producto de pasta de pescado y procedimiento para su producción.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un producto cárnico transformado, o a un producto de pasta de pescado, en los que se utiliza un enzima desamidante de proteínas, y, asimismo, a un procedimiento para su obtención.

10 **Técnica anterior**

Como fuente que proporciona proteínas, que es necesaria para la conservación de la vida, el hombre ha utilizado carne, representada por tejidos músculo-esqueléticos de mamíferos, que incluyen principalmente ganado y aves de corral, carne de pescado que se compone de tejidos músculo esqueléticos de pescado, y tejidos corporales, órganos, etc., de otros animales vertebrados e invertebrados. El alimento proteico mencionado anteriormente de animales contiene proteínas musculares habituales tales como actina y miosina, a pesar de su origen, y muestran las características habituales para el procesamiento. Por ejemplo, la capacidad de mantenimiento acuoso, la propiedad de unión, elasticidad, de congelamiento, etc., se consideran como características funcionales de las proteínas musculares. Estas características contribuyen principalmente a la incorporación de grasa y de humedad en un producto tipo pasta, tal como embutido y kamaboko de pescado hervido, o la propiedad de unión, de congelamiento, etc. de los productos cárnicos reestructurados. Las proteínas musculares con diversas características funcionales como tales, son desnaturalizadas habitualmente cuando se someten a un tratamiento de procesamiento tal como calentamiento, congelación, enfriamiento y presurización. La desnaturalización de las proteínas musculares hace aflorar olores de la carne propiamente, dando lugar a un buen sabor, pero, por otra parte, da lugar a problemas desfavorables desde el punto de vista de procesamiento, tal como la generación de goteos a partir de los tejidos cárnicos, y la disminución en el rendimiento del producto final. Además, algunos resultados provocan efectos no beneficiosos sobre la propiedad sensorial, tal como que la calidad cárnica deviene dura y se pierde la suavidad, dando lugar a una textura seca. Cuando comparativamente, bloques voluminosos cárnicos (piezas de carne) entre estas piezas, se cuecen tal como en el caso del bistec y/o de las chuletas de cerdo empanadas, fritas en profundidad, por ejemplo, la calidad de tierno y la de jugoso constituyen factores importantes para servir deliciosas carnes, pero la carne tal como se ha mencionado anteriormente, tiende a volverse dura por el cocinado térmico y el jugo cárnico tiende también a volatilizarse y perderse. Además, cuando un producto de pasta de pescado tal como el kamaboko al vapor se calienta demasiado tiende a ponerse excesivamente duro, a perder su suavidad y a aumentar su separación del agua.

Para la supresión de la conversión en tenaz de la carne mediante un tratamiento de procesamiento, ya se conoce un procedimiento en el que se utilice ácido monoglicérido orgánico (véase la solicitud abierta al público de la patente japonesa (Kokai) No. Sho 49/020,353), un procedimiento en el que se utiliza un surfactante tal como la lecitina (véase la solicitud abierta al público de la patente japonesa (Kokai) No. Hei 04/148,663), un procedimiento en el que se utiliza la sal o similares (véase la solicitud abierta al público de la patente japonesa (Kokai) No. Hei 04/036,167), y un procedimiento en el que se utiliza un enzima (véase la solicitud abierta al público de patente japonesa (Kokai) No. Hei 04/278,063. Como procedimiento para procurar suavidad a un producto de pasta de pescado, se ha conocido uno en el que se utilizan conjuntamente una transglutaminasa y una sal de metal alcalino (véase la solicitud abierta al público de patente japonesa (Kokai) No. Hei 08(080,176) con respecto al problema de la disminución de la capacidad de mantenimiento acuoso de la carne y de la obtención de rendimiento mediante un tratamiento de transformación, se ha conocido habitualmente de una adición de polifosfato y sacárido. El polifosfato posee una acción disociativa para la miosina y actina, que son proteínas musculares, poseyendo un efecto significativo para mejorar la propiedad de unión y el rendimiento de productos cárnicos transformados. Sin embargo, debido a un efecto tal como su acción inhibitoria para la absorción cálcica, también ha existido una gran demanda de los consumidores para la eliminación del polifosfato. Además de lo anterior, con el fin de mejorar la capacidad de mantenimiento acuoso y de la propiedad gelificante de los productos cárnicos transformados o/y de los productos cárnicos de pescado, existe un procedimiento en el que se hace que actúe al respecto una transglutaminasa (véase, patente japonesa No. 2.630.829), un procedimiento en el que una solución acuosa de una mezcla de iones cálcicos y caseinato alcalino, es descompuesta por un enzima de coagulación láctea (véase, la solicitud abierta al público de la patente japonesa (Kokai) No. Hei 03/094,624), un procedimiento en el que una solución que contiene cloruro sódico y almidón se absorbe con alimentos (véase solicitud abierta al público de patente japonesa (Kokai) No. Hei 06/343,424), etc. Con respecto a la utilización de un enzima desamidante de proteínas para los productos cárnicos transformados y productos de pasta de pescado, se ha conocido un procedimiento en el que proteínas de soja que son desaminizadas mediante un enzima desamidante de proteínas, se añaden al embutido (véase la solicitud abierta al público de patente japonesa (Kokai) No. 2000/050,887). Como tales, con respecto a varios problemas en la transformación alimentaria, como resultado de la desnaturalización de las proteínas musculares, se han adoptado varios medios que solucionan cada uno de los casos, pero, en la actualidad, en la que las necesidades de los consumidores están diversificándose, las medidas anteriormente mencionadas están lejos de considerarse suficientes.

En la solicitud abierta al público de la patente japonesa (Kokai) No. 2000/050,887), se describe que un enzima

desamidante de proteínas actúa sobre proteínas cárnicas tales como miosina y actina. Sin embargo, la descripción se realiza sólo para la reactividad de un enzima desamidante de proteínas con las proteínas cárnicas, no existiendo una descripción específica para el efecto de la acción del enzima sobre los materiales que contienen las proteínas musculares. De este modo, la técnica que se expone en el documento de patente es una técnica para mejorar las funciones (tales como solubilidad, propiedades dispersantes, propiedades espumantes, estabilidad de las burbujas, propiedades emulsificantes y estabilidad de la emulsión) de las proteínas separadas que van a añadirse a los materiales alimenticios, no existiendo ni descripción ni sugerencias para el efecto de la presente invención que se mencionará a continuación, es decir, para el efecto de mejora en el rendimiento después del calentamiento, el efecto supresor para la separación de agua durante el almacenamiento y el de mejora de la textura de los productos cárnicos transformados y de los productos de pasta de pescado para ser lisos y blandos. Además, la proteína desamidada de soja que se añade como material en el presente documento de patente, está contenida sólo un poco en el producto final, y a continuación, la proteína se prepara mediante un tratamiento de calentamiento a 80°C durante 30 minutos, y, por tanto, el enzima se inactiva y no actúa en las proteínas cárnicas en el embutido. De este modo desde tal punto de vista, resulta evidente que el procedimiento del documento de patente es distinto del de la presente invención.

Los documentos JP 10 057013 A, JP 3 098552 A, WO 01/28353 A2, Okayama, T. et al.: "Effect of glutaminase preparation from *Bacillus subtilis* GT strain on sensory evaluation of processed meat products", *Fleischwirtschaft*, vol. 78, no. 1, 1998, páginas 41-42, los documentos WO 2004/004489 A1, JP 2001 218590 A, WO 97/43910 A1, JP 8 080176 A, JP 7 184606 A, y JP 6 225704 A, muestran un procedimiento para la producción de un producto cárnico transformado o de un producto de pasta de pescado, en el que un enzima proteico desamidante se añade a un material alimenticio que incluye una proteína muscular, y en el que el enzima actúa sobre la proteína muscular, en el que ésta se obtiene a partir de carne de ganado, carne de aves de corral, carne de pescado, un molusco o un crustáceo, en el que la cantidad añadida del enzima proteico desamidante, es de 0,01 a 100 unidades por 1 g del material alimenticio.

Exposición de la invención

La presente invención proporciona un alimento en el que la disminución del rendimiento y la separación de agua causada por la desnaturalización proteica en la transformación (tal como calentamiento, congelación y enfriamiento) de un alimento que contiene proteínas musculares, así como en el almacenamiento, son suprimidos, manteniéndose la textura lisa y blanda, y suprimiéndose el deterioro del olor y del sabor, proporcionando también un procedimiento para obtener dicho alimento.

Se ha estudiado exhaustivamente a partir de los problemas anteriores, y se descubrió que, cuando un enzima desamidante de proteínas se añade a un material alimenticio que incluye proteínas musculares, y se procede para actuar al respecto, es posible resolver los problemas anteriormente mencionados. De este modo, la presente invención se ha conseguido. Es decir, esta invención, se define como:

[1] Procedimiento para obtener un producto cárnico transformado o uno de pasta de pescado, en el que un enzima proteico desamidante que posee una acción de desamidación proteica sin fragmentación del enlace peptídico y entrecruzamiento de la proteína, se añade a un material alimenticio que incluye una proteína muscular, actuando el enzima sobre la proteína muscular.

[2] El procedimiento según el ítem [1] anterior, en el que la proteína muscular se obtiene a partir de la carne del ganado, carne de aves de corral, carne de pescado, un molusco o un crustáceo.

[3] El procedimiento según [1] o [2] anteriores, en el que la cantidad del enzima proteico desamidante que se añade, es de 0,01 a 100 unidades por 1 g del material alimenticio.

[4] Producto cárnico transformado o producto de pasta de pescado obtenido mediante el procedimiento según cualquiera de los ítems [1] a [3] anteriores.

[5] Utilización de un enzima proteico desamidante que posee una acción de desamidación de una proteína, sin la fragmentación del enlace peptídico y el entrecruzamiento de la proteína con un ablandador cárnico.

El enzima desamidante de proteínas en esta invención posee una acción de desamidación de una proteína sin la fragmentación del enlace peptídico y el entrecruzamiento de la proteína, ejerciendo la acción directamente sobre el grupo amídico de la proteína. No existe una particular limitación para su tipo, siempre que posea dicha acción. Con respecto a los ejemplos de dichos enzimas, existen los que se dan a conocer en la solicitud abierta al público de patente japonesa (kokai) No. 2000/050,887), o en la solicitud abierta al público de patente japonesa (Kokai) No. 2001/021,850, pero no existiendo en ellas limitaciones particulares. Con respecto al enzima de desamidación proteica, puede utilizarse un enzima preparado a partir del líquido de cultivo de un microorganismo que produzca un enzima de desamidación proteica. No existe una limitación particular en el microorganismo utilizado para la preparación del enzima de desamidación proteica.

Con respecto a un procedimiento para preparar un enzima de desamidación proteica, a partir del líquido de cultivo de un microorganismo, pueden utilizarse procedimientos públicamente conocidos para la separación y purificación de proteínas (tales como separación mediante centrifugación, concentración de UF, salación y diversas cromatografías utilizando intercambios iónicos, etc.). Por ejemplo, el líquido de cultivo se centrifuga para eliminar células, y se someten, entonces éstas a una combinación de salación, cromatografía, etc., para dar lugar a un enzima deseado. En la recuperación del enzima a partir del interior celular, las células se desintegran, por ejemplo, mediante un tratamiento de presurización o ultrasónico, sometiéndolas entonces a la misma separación y purificación que anteriormente con lo cual el enzima deseado pueda prepararse. También es posible que la serie de etapas anteriormente mencionadas (desintegración celular, separación y purificación), se lleve a cabo, después de que las células se hayan recuperado a partir del líquido de cultivo, mediante, por ejemplo, tratamiento mediante filtración y centrifugación. El enzima puede potenciarse mediante un procedimiento de secado tal como liofilización o el secado al vacío y, en este momento, puede utilizarse un agente de carga o un adyuvante para secado.

La actividad del enzima desamidante de proteínas según esta invención se mide mediante un procedimiento que constituye una modificación del mencionado en la solicitud abierta al público de la patente japonesa (Kokai) No. 2000/050,887), esto es, mediante el procedimiento siguiente:

(1) Una solución acuosa (10 µl) que contiene un enzima desamidante de proteínas, se añade a 100 µl de tampón fosfato 176 mM (pH 6,5), que contiene 30 mM de Z-Gln-Gly, incubándose a 37°C durante 10 minutos, y deteniéndose la reacción añadiendo 100 µl de una solución de TCA al 12%.

(2) En este momento, la concentración del enzima se ajusta a 0,05 mg/ml mediante una dilución apropiada, utilizando tampón fosfato 20 mM (pH 6,0) y, después de una separación mediante centrífuga (12.000 rpm a 4°C durante 5 minutos), el líquido sobrenadante se somete a medición cuantitativa de NH₃, utilizando un equipo-F de amoníaco (fabricado por Roche).

(3) 10 µl del líquido sobrenadante y 190 µl de tampón trietanolamínico 0,1 M (pH 8,0) se añadieron a 100 µl de un líquido reactivo II, unión con el equipo-F, dejando que la mezcla permanezca a temperatura ambiente durante 5 minutos y, utilizando sus 100 µl, se midió la absorbancia a 340 nm. A los 200 µl residuales se les añadió 1,0 µl del reactivo III (unión al equipo-F; glutamato deshidrogenasa), dejando que la mezcla permaneciera a temperatura ambiente durante 20 minutos, midiéndose la absorbancia a 340 nm de los 200 µl residuales. La concentración de amoníaco en la solución reactiva se determinó a partir de una curva de calibración que muestra la relación entre la concentración de amoníaco y los cambios en la absorbancia (340 nm) preparados utilizando la solución estándar de amoníaco unida al equipo-F.

(4) La medición de la concentración proteica se llevó a cabo con una longitud de onda detectora de 595 nm, utilizando un ensayo proteico CBB (Azul Brillante de Coomassie) (fabricado por Nakarai Tesk). Como estándar, se utilizó BSA (Pierce).

(5) La actividad de un enzima desamidante de proteínas se determina mediante la expresión siguiente.

Actividad específica (U/mg) = [(Concentración de amoníaco (µmol/ml) en la solución reactiva) x (Cantidad (ml) de la solución reactiva) x (proporción diluida del enzima)]/[(cantidad (ml) de solución enzimática) x (Concentración (mg/ml) proteica) x (Tiempo de reacción (min))].

Las proteínas musculares en la presente invención constituyen proteínas plasmáticas en las fibras musculares, una proteína miofibrilar que participa en la construcción muscular o de una proteína del tejido conjuntivo que existe en éste. Los ejemplos de las proteínas plasmáticas son la albúmina y la mioglobina que son proteínas solubles en el citoplasma y que contienen la mayoría de los enzimas que participan en la vía glicolítica. Los ejemplos de proteínas miofibrilares son miosina, actina, actomiosina, tropomiosina, troponina y conectina, que son componentes constituyentes principales. Los ejemplos de proteínas del tejido conjuntivo son el colágeno y la elastina, que son las proteínas constituyentes principales. Un material en el que las proteínas musculares, son desnaturizadas mediante un tratamiento tal como diversos procesamientos, como la gelatina preparada mediante desnaturización del colágeno, se incluye también en un material alimenticio que comprende proteínas musculares según la presente invención.

Un material alimenticio que incluye proteínas musculares se denomina carne, que incluye, por ejemplo, carne de ganado, carne de aves de corral, carne de pescado o músculos de moluscos o crustáceos, y ocupa el lugar que incluye músculo, grasa, sangre, tendones, órganos internos, médula y cerebro, excluyendo huesos, dientes y uñas. Para ser más específico, es carne derivada de animales tales como vacas, cerdos y ovejas, aves tales como pollos, patos y avestruces, pescados tales como sardinas, atún, salmón y bacalao, moluscos tales como pulpos y jibias, crustáceos tales como cangrejos y camarones, reptiles como cocodrilos y serpientes, y anfibios tales como ranas, no existiendo límite para el tipo del material utilizado en esta invención.

Los ejemplos del producto cárnico transformado que se procesa utilizando el material alimenticio anteriormente mencionado, son jamón, embutido *chashu* (rodajas de cerdo asado), empanadas de carne, hamburguesas, bolas de

carne, carne asada, cerdo rustido y similares. También se incluyen en la presente memoria, carne cortada, calentada tal como hervida o rustida y la que se transforma en tierna enzimática o mecánicamente. Los ejemplos de productos de pasta de pescado lo constituyen carne de pescado *kamaboko*. *kamaboko* de cangrejo *hampen* (pastelillo de pescado blanco transformado, *chikuwa* (un tipo de embutido de pescado), *kamaboko* frito en profundidad, *tsumire* (empanadas de pescado), jamón de carne de pescado, embutidos de carne de pescado y bolas de carne de pescado, aunque no existe una limitación particular en el tipo de productos, teniendo en cuenta que es un producto que incluye proteínas cárnicas.

En el caso de un producto de pasta tal como embutido y *kamaboko*, un procedimiento para añadir un enzima desamidante de proteínas a un material alimenticio, puede llevarse a cabo de tal forma que la solución enzimática o el polvo enzimático se añada bien aisladamente o conjuntamente con otro material tal como aderezo. En el caso del jamón o similar, la solución enzimática puede infundirse en el material común o éste puede sumergirse en la solución enzimática. Alternativamente, la solución enzimática o el polvo enzimático pueden rociarse sobre el material. Con respecto al modo de añadir el enzima, puede utilizarse disuelto en un líquido tal como la solución de aderezos carnosos previamente mezclado y el material pulverulento puede utilizarse, o puede utilizarse el enzima disuelto en un líquido tal como la solución de aderezos.

Una cantidad que se añade del enzima de desamidación proteica a 1 g del material alimenticio, o 1 g del material cárnico es preferentemente de entre 0,01 a 100 unidades, o más preferentemente, de 0,1 a 10 unidades. Aunque no existe una limitación particular para las condiciones de la reacción (tales como el tiempo de reacción, y la temperatura y pH del sistema reaccionante) del enzima de desamidación proteico, la temperatura de reacción preferida está entre 5 y 70°C. El pH del sistema reactivo es preferentemente de entre 2 y 10, más preferentemente entre 4 y 8 y, todavía de forma más preferente, de entre 5 y 8. El tiempo de reacción es preferentemente de entre 10 segundos a 5 días, y, más preferentemente, de entre 10 minutos y 24 horas. Las condiciones como tales pueden modificarse o ajustarse apropiadamente, dependiendo, por ejemplo, de la pureza del enzima utilizado y del tipo estado, concentración, etc., de la proteína incluida en el material alimenticio.

Mejor modo de poner en práctica la invención

La invención se ilustra a continuación con mayor detalle a partir de los ejemplos siguientes:

Ejemplo 1

En este Ejemplo, como enzima desamidante de proteínas, se utilizó la proteína glutaminasa derivada de *Chryseobacterium*. La secuencia del gen de la proteína glutaminasa (EC.3.5.1) derivado de *Chryseobacterium proteolyticum*, ya se ha determinado [Eur. J. Biochem. 268, 1410-1421 (2001)]. Refiriéndose a la secuencia, la conversión al codon de alta frecuencia para utilización en *Chryseobacterium glutamicum*, se llevó a cabo para construir una secuencia génica, tal como se muestra en SEC ID nº: 1. La secuencia contiene una secuencia señal (prerregional), una prorregión de la proteína glutaminasa, y las regiones codificantes de la forma madura de la proteína glutaminasa. Su secuencia génica completa se preparó mediante síntesis. Basándose en la información de la secuencia génica de la SEC ID nº: 1 construida, se sintetizaron los cebadores de las secuencias que se muestran en SEC ID nº: 5 (5'-CATGAAGAACCTTTCTGTC-3') y SEC ID nº: 6 (5'GTAAAAGGATCCATTAATTAATCC-3'). El cebador que se muestra en SEC ID nº: 5 contiene la secuencia N-terminal de la secuencia señal de la proteína glutaminasa, mientras que el cebador que se muestra en SEC ID nº: 6 contiene la secuencia C-terminal de la forma madura de la proteína glutaminasa y la secuencia de reconocimiento de BamHI. Utilizando el ADN que posee una secuencia que se muestra en SEC ID nº: 1 como un molde, se llevó a cabo una PCR utilizando cebadores con secuencias que se muestran en SEC ID nº: 5 y SEC ID nº: 6 para amplificar la prorregión de la proteína glutaminasa y las regiones que codifican la forma madura de la proteína glutaminasa. El fragmento de PCR se insertó en el sitio SmaI de pVC7 que se menciona en la solicitud abierta al público de la patente japonesa (Kokai) No. Hei 09/070,291, introduciéndose entonces en la célula competente (preparada por Takara Shuzo) de *E. coli* JM109. Se obtuvieron las células que mantenían el plásmido donde se clonó el gen de la proteína glutaminasa, recuperándose el plásmido. Se determinó la secuencia nucleótida del fragmento clonado en el plásmido, y se confirmó que era idéntica a la secuencia que se muestra en SEC ID nº: 1.

La secuencia del gen TorA que contiene el péptido señal TorA derivado de *Escherichia coli*, ya se ha determinado (*Mol. Microbiol.* 11:1169-1179 (1994)). Haciendo referencia a esta secuencia, los cebadores que se muestran en SEC ID nº: 7 (5'ATGAACAATAACGATCTCTTCAGG-3') y SEC ID nº: 8 (5'-CCGGATCCTGGTCATGATTTCACCTG-3') se sintetizaron, y utilizando el ADN cromosómico de la cepa W3110 de *E. coli*, se prepararon como molde, según un procedimiento habitual (El procedimiento de Saito y Miura [*Biochim. Biophys. Acta*, 72, 619 (1963)], amplificándose mediante el procedimiento PCR) la región TorA codificante y su secuencia señal localizada por encima de ella. En el PCR, se utilizó la ADN polimerasa (Pyrobest) preparada por (Takara Shuzo), utilizándose las condiciones reactivas según un protocolo recomendado por el fabricante. Incidentalmente, la secuencia de SEC ID nº: 8, contiene una secuencia de reconocimiento del enzima de restricción BamHI. La secuencia de ADN que codifica la secuencia señal de TorA, se muestra en SEC ID nº: 3.

Utilizando un plásmido pPKSPTG1 que se menciona en WO 01/23591 como molde, la región que codifica el péptido

señal y el promotor, se amplificaron llevando a cabo la PCR utilizando cebadores que poseen secuencias que se muestran en SEC ID nº: 9 (5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3') y SEC ID nº: 10 (5'-AAGAGATCGTTATTGTTTCATAGAGGCGAAGGCTCCTTGAATAG-3'). La secuencia de SEC ID nº: 10 contiene una secuencia del extremo 5' del gen que codifica el péptido señal TorA. Después de esto, este producto PCR y un producto PCR que contiene una región que codifica TorA y su secuencia señal localizada por encima de ella, amplificados mediante un cebador presentando secuencias SEC ID nº: 7 y SEC ID nº: 8, se mezclaron en una proporción de 1:1, y utilizando ésta como molde, se realizó un PCR de reticulación utilizando un cebador que posee secuencias que se muestran en SEC ID nº: 8 Y SEC ID nº: 9. Como resultado, se amplificó un gen fusionado que contiene una secuencia que alberga la región promotora PS2, la secuencia señal TorA y una secuencia que codifica TorA. El producto PCR de entrecruzamiento se sometió a digestión con los enzimas de restricción Scal y BamHI, y se sometió a electroforesis en gel de agarosa, para detectar un fragmento de ADN de alrededor de 3,1 kbp. Este fragmento se seccionó a partir del gel de agarosa, se recuperó utilizando EasyTrap Ver. 2, (preparado por Takara Shuzo), y se insertó en el sitio Scal-BamHI del plásmido pPk4 mencionado en la Solicitud abierta a examen de la Patente Japonesa (Kokai) No. Hei 09/322,774, para dar lugar a un plásmido pPKT-TorA. Cuando la secuencia nucleótida de la secuencia del gen insertado en el plásmido se determinó, se confirmó que se había construido un gen fusionado predicho. Utilizando el plásmido como molde, se amplificó mediante PCR, un área que contenía la región promotora de PS2 y una región que codificaba el péptido señal TorA, donde los cebadores tenían consecuencias de SEC ID nº: 9 y SEC ID nº: 11 (5'-GATTTCTGTTGCCGTTGGAATCCGCAGTCGCACGTCGCGGCG-3'). Incidentalmente la secuencia que se muestra en SEC ID nº: 11 posee la secuencia 5'-terminal de la región que codifica el enzima desamidante de proteínas, la cual posee una proregión. Después de esto, una región codificando la proteína glutaminasa que presenta una proregión se amplificó mediante PCR utilizando cebadores con secuencias que se muestran en SEC ID nº: 6 y SEC ID nº: 12 (5'-GATTCCAACGGCAACCAGGA-3'), utilizando un plásmido en el que la proteína glutaminasa es clonada, como un molde. Posteriormente, estos productos PCR se mezclaron en una proporción 1:1, y, utilizándolos como un molde, se llevó a cabo un PCR de entrecruzamiento utilizando cebadores que poseían secuencias que se muestran en SEC ID nº: 6 y SEC ID nº: 9 para amplificar un gen fusionado con el gen codificante del enzima desamidante de proteínas con una proregión, una secuencia señal TorA y la región promotora PS2. El producto PCR se sometió a digestión con los enzimas de restricción Scal y BamHI, sometiéndose a una electroforesis en gel de agarosa, para detectar un fragmento de ADN de alrededor de 3,1 kbp. Este fragmento de ADN se obtuvo mediante sección a partir de un gel de agarosa, recuperándose mediante la utilización de EasyTrap Ver. 2 (preparado por Takara Shuzo), y se insertó en el sitio Scal-BamHI del plásmido pPK4 que se menciona en la Solicitud abierta a examen de Patente Japonesa (Kokai) No. Hei 09/322,774, para dar lugar a un plásmido pPKT-PPG. Se determinó una secuencia nucleótida de la secuencia insertada en el plásmido, confirmándose que se había obtenido un gen fusionado que se había predicho. Incidentalmente una secuencia aminoácida de la proteína glutaminasa con una proregión, se muestra en SEC ID nº: 2, mientras que en SEC ID nº: 4 se muestra una secuencia aminoácida del péptido señal TorA. Sin embargo, se predijo que, cuando se llevara a cabo la maduración mediante una proteasa disponible comercialmente, para la forma nativa de la protein glutaminasa, la pro-secuencia no se fragmentó correctamente. Por lo tanto, "QTNK" que constituye una secuencia C-terminal de la pro-secuencia se reemplazó con "FGPK", de forma que la fragmentación de la proregión se realizó de forma que llevara a idéntica secuencia que la N-terminal de la forma nativa de la protein glutaminasa. Al reemplazar con "FGPK", se utilizaron los cebadores que presentaban las secuencias que se muestran en SEC ID nº: 13 (5'-CTT GGG GCC GAA GCC CTT GAC TTC TTT GGT CAG-3') y SEC ID nº: 14 (5'-TTC GGC CCC AAG TTG GCG TCC GTC ATT CCA GAT-3'). La secuencia de SEC ID nº: 13 constituye un cebador para amplificar la proregión, mientras que la secuencia de SEC ID nº: 14, constituye un cebador para amplificar la forma madura de la protein glutaminasa. Utilizando pPKT-PPG como molde, se amplificó la proregión de la protein glutaminasa, utilizando cebadores con secuencias que se muestran en SEC ID nº: 12 y SEC ID nº: 13, mientras que la forma madura de la protein glutaminasa se amplificó utilizando cebadores con secuencias que se muestran en SEC ID nº: 14 y SEC ID nº: 6. Posteriormente, estos productos PCR se mezclaron en una proporción de 1:1 y, utilizándola como un molde, se llevó a cabo una PCR de reticulación, utilizando cebadores con secuencias que se muestran en SEC ID nº: 6 y SEC ID nº: 12, para amplificar el gen de la protein glutaminasa con la proregión en la que el extremo C de la pro-secuencia se reemplazó con FGPK. El producto PCR de entrecruzamiento se clonó al sitio SmaI de pUC 18 /pUCPPG (FGPK) y su secuencia nucleótida se confirmó una vez que la pro-secuencia fue reemplazada. Después de esto el fragmento (grande) AatII-BstPI de pPKT-PPG y el (pequeño) de AatII-BstPI pUCPPG (FGPK), se conectaron, con objeto de constituir pPKT-PPG (FGPK).

C. glutamicum ATCC13869 se transformó utilizando el plásmido constituido pPKT-PPG (FGPK), y se seleccionó una cepa celular que se había desarrollado en un medio de agar CM2G, que contenía 25 mg/l de kanamicina. La cepa celular seleccionada se incubó en un medio líquido MM que contenía 25 mg/l de kanamicina, a 30°C durante 48 horas. Un líquido sobrenadante después de centrifugación del líquido incubado de *C. glutamicum*, se filtró a través de un filtro (0,45 µm), concentrándose el filtrado mediante una membrana de ultrafiltración (excluyéndose, debido a esto, un peso molecular no superior a 10.000). El intercambio de tampones se llevó a cabo utilizando un tampón fosfato 50 mM (pH 7,5), fragmentándose mediante tripsina para conseguir la maduración la proregión del enzima desamidante de proteínas. Después de esto, se volvió a llevar a cabo la concentración e intercambio del tampón (tampón de 20 mM de acetato, pH 5,0), sometiéndose la muestra concentrada a una cromatografía de intercambio catiónico, y recuperándose la fracción activa del enzima desamidante de proteínas, que se utilizó entonces como un producto enzimático puro. Cuando la actividad relativa del producto enzimático puro, se midió, según el

procedimiento tal como se ha descrito anteriormente, fue de aproximadamente 100 a 140 U/mg.

Se dispusieron 100 partes en peso de carne picada de pata de cerdo y 20 partes en peso de solución salina al 10% en un dispositivo para corte de alimentos, se mezclaron durante 15 segundos, añadiéndose 5 partes en peso de agua (producto control). Se dispusieron 100 partes en peso de carne picada de pata de cerdo y 20 partes en peso de solución salina al 10%, en un dispositivo cortador de alimentos, mezclándose y picándose durante 15 segundos y, después de esto, el enzima puro de desamidación proteica anteriormente mencionado (100 U/mg), correspondiente a 0,1 unidades por 1 g de carne picada de pata de cerdo, disuelto en 5 partes en peso de agua, seguido por su mezcla, se añadió al cerdo (producto 1 de prueba). De forma similar al caso del producto 1 de prueba, se añadió a 1 g de carne picada de pata de cerdo, para preparar los productos 2, 3 o 4 de prueba, respectivamente, el enzima desamidante de proteínas puro correspondiente a 0,2, 1 o 10 unidades. Los materiales se dispusieron conjuntamente agitando la mezcla mediante una espátula, y volviendo otra vez a mezclar durante 15 segundos, utilizando un dispositivo alimenticio. Estas operaciones de agitado y mezcla se repitieron 4 veces, rellenando entonces un tubo con carcasa de colágeno que presentaba un diámetro de 3 cm, dejando que reposara durante 1 hora, a 5°C. Después de esto, se secó en una atmósfera seca de 60°C durante 40 minutos, se hirvió al vapor, a 75°C durante 2 horas, enfriándose entonces incidentalmente, en los productos a los que se añadieron enzimas (productos 1 a 4 de prueba; todos ellos siendo productos de esta invención), es probable que las reacciones enzimáticas se llevan a cabo en una fase seca, en una fase bullente con vapor, y la mayor parte del enzima se inactiva. Para el producto de control y los productos de prueba 1 a 4, después del calentamiento, se midieron el rendimiento y las propiedades físicas, y posteriormente, se evaluaron mediante una prueba sensorial, la textura y el sabor. El rendimiento después del calentamiento se expresó como "(peso después de calentamiento)/(peso antes del calentamiento)" (%). Con respecto a las propiedades físicas, el producto de prueba se obtuvo como columnas de 3 cm de alto, y una bola de 5 mm atravesó a 1 mm/segundo el corte transversal, utilizando un analizador de textura (TA.XT2i, fabricado por Stable Microsystems), midiéndose la fuerza rotura en este momento. Con respecto a las muestras de evaluación sensorial obtenidas como rodajas de un grosor de 3 cm, se probaron por ocho especialistas entrenados, evaluándose su dureza y lisura en ese momento. El resultado de la evaluación se muestra en la Tabla 1.

En los productos 1 a 4 de la prueba, la blandura y lisura se potenciaron y su evaluación global se potenció mucho comparado con el producto de control. Además, los productos 2 a 4 de la prueba tendían a que la textura de tipo conglomerado era intensa, el tacto lingual suave, el lado del corte presentaba un buen brillo y una fina textura, mostrando una calidad favorable como embutido de un tipo de corte fino. Tal efecto fue significativo cuando una cantidad añadida del enzima desamidante de proteínas por 1 g del material alimenticio era 1 unidad o más, pero, incluso cuando era 0,1 unidades, el efecto todavía se podía reconocer. Además, cuando el producto de control y el producto 3 de la prueba se precintaban ajustadamente, se hervían durante 10 minutos en agua a 90°C y se sometían a una prueba sensorial, el producto de control cambiaba a una textura, mientras que el producto 3 de prueba mantenía su suave textura.

Tabla 1: Resultados de la evaluación sensorial del embutido

	Cantidad (unidades) del Enzima añadido a 1 g como material alimenticio	Fuerza de(g)	Evaluación sensorial (textura fina)	Evaluación sensorial (evaluación total)
Producto de control	0	373	3	3
Producto 1 de Prueba (producto de la invención)	0,1	371	3,5	3,1
Producto 2 de Prueba (producto de la invención)	0,2	341	4	3,9
Producto 3 de Prueba (producto de la invención)	1	316	5	4,7
Producto 4 de Prueba (producto de la invención)	10	310	5	4,8

Ejemplo 2

Se cortaron 1.000 g de carne matricial de pescado preparados desintegrando la carne (congelada matricial de pescado) de grado FA en escamas finamente con un cortador Stephan y se agitaron a una velocidad lenta durante 1,5 minutos, entonces a una velocidad media durante 1,5 minutos y a una velocidad alta durante 1,5 minutos). Después de esto, se añadieron 30 g de sal, y 600 g de agua helada y la mezcla se cortó mediante un cortador Stephan, agitándose (a velocidad baja durante 1 minuto, a continuación a velocidad media durante 30 segundos y a velocidad alta durante 2 minutos). Entonces, se añadieron 50 g de almidón de patata ("Esusan Ginrei" (preparado por Ajinomoto, 50 g de azúcar, 20 g de *mirin* (sake azucarado), 10 g de adobo *umami* (Ajinomoto" (glutamato monosódico) preparado por Ajinomoto Co., y el enzima desamidante de proteínas puro (100 U/mg), preparado mediante el procedimiento del Ejemplo 1, correspondiendo la cantidad del enzima a 5 unidades por gramo de

sustancia fundamental de la carne de pescado, agitándose la mezcla otra vez con el cortador Stephan a velocidad media, hasta que la temperatura de la mezcla que se alcanzara fuera de entre 8 y 10°C. Con la sustancia fundamental de la carne de pescado preparada de esta forma se rellenó un tubo de vinilideno no transparente provisto de una carcasa, que se mantuvo mediante calentamiento a 40°C durante 40 minutos y que se calentó a 85°C durante 30 minutos para obtener un *kamaboko* provisto de carcasa (producto de prueba). Como control, se preparó mediante idéntico procedimiento, el conjunto *kamaboko*, calentando a 40°C durante 40 minutos sin añadir el enzima (producto de control). Se midió la fuerza de ruptura y la deformación cuando un proyectil de 5 mm atravesó a 1 mm/segundo la sección transversal del *kamaboko*, utilizando un analizador de textura. Además, se observaron el rendimiento después del calentamiento y el estado de separación del agua después del almacenamiento durante dos semanas, llevándose a cabo una evaluación sensorial. El resultado se muestra en la Tabla 2.

En el producto de prueba (producto de esta invención), la fuerza de rotura disminuyó y la deformación aumentó, tal como se compara con el producto de control, tal como se muestra en la Tabla 2. Además, el producto de esta invención cambió a una estructura sensible y lisa. Cuando el peso procedente del agua separada después del calentamiento, se descartó y se midió, el producto de esta invención mostró menos cambio en el peso y, comparado con el producto de control, el rendimiento después del calentamiento mejoró. Por otra parte, el sabor, gusto, etc., fueron casi los mismos que los del grupo control. Además cuando se observó el estado de separación del agua después de haberla conservado enfriándose a 5°C durante dos semanas, casi no existió separación de agua en el *kamaboko* que se trató al vapor, de la presente invención, y la textura, sabor, gusto, etc., fueron casi los mismos que los que había antes de llevar a cabo el almacenamiento.

Tabla 2: Resultados de evaluación sensorial de kamaboko

	Producto de prueba (producto de la invención)	Producto de control
Fuerza de rotura (g)	601	645
Deformación (mm)	19,1	13,3
Peso antes de calentamiento (g)	102,5	98,6
Peso después de calentamiento (g)	101,2	90,8
Rendimiento sobre calentamiento (%)	98,7	92,1
Estado de la separación del agua después de almacenamiento durante 2 semanas	±	+++
Evaluación sensorial	oo	Δ

oo: muy favorable
o: favorable
Δ: normal
x: desfavorable
±: poco
+++ : mucho

El preparado mediante idéntico procedimiento que el descrito anteriormente, se sometió a una evaluación con respecto a la separación del agua. Se llevaron a cabo ensayos con respecto a dos circunstancias, una, la separación acuosa que tuvo lugar después del tratamiento en un autoclave (a 121°C durante 30 minutos) y después del congelamiento a -30°C, seguido por descongelación. El porcentaje, de la separación acuosa se calculó como (peso (g) de agua separada/(peso (g) antes del tratamiento). El resultado se muestra en la Tabla 3. En todos los productos de la presente invención, la proporción de la separación acuosa disminuyó y particularmente añadiendo, por lo menos 0,2 unidades del enzima por gramo del material, la separación acuosa se suprimió significativamente. De esta forma, en el *Kamaboko* preparado añadiendo el enzima desamidante de proteínas, la separación acuosa se suprimió incluso cuando un tratamiento de separación acuosa era apto para tener lugar.

Tabla 3 Evaluación para la separación obligatoria del agua de kamaboko

Cantidad del enzima añadida a 1 g del material de pasta de pescado	Separación acuosa después de utilizar el autoclave	Separación acuosa después de congelación-descongelación
Nada añadido (producto control)	11,0	7,2
0,1 unidades (producto de la invención)	10,5	6,9
0,2 unidades (producto de la invención)	9	6,3
1 unidad (producto de la invención)	7,7	5,5

El *kamaboko* preparado mediante idéntico procedimiento que el descrito anteriormente, se sometió a una evaluación en cuanto a su capacidad de mantenimiento del agua, midiendo la pérdida de ésta con respecto al calor, utilizando un horno microondas (500 W; para 20 a 60 segundos). El resultado se muestra en la Tabla 4. Cuando el enzima desamidante de proteínas se añadió en una cantidad por lo menos, de entre 0,1 unidades a 1 g del material de pasta de pescado, puede suprimirse una cantidad de pérdida de agua, dependiendo de la concentración enzimática, el aumento de ese efecto. Comparado con el *kamaboko*, que era un control teniendo una superficie seca y dura, y muchas arrugas, el producto de esta invención fue más suave, manteniendo un estado blando y liso. Con respecto a la textura, el producto de control se endureció, perdiéndose su lisura, mientras que, en el producto de la presente invención, se hizo patente de forma importante el deterioro en su lisura y blandura. Muestra que, en el producto de esta invención, la evaporación de la humedad mediante calentamiento y el deterioro de la textura (que deviene dura y pierde su lisura) son suprimidas. A partir del resultado, puede esperarse por la presente invención, la mejoría de la calidad de los alimentos que contienen proteínas cárnicas, a los cuales se aplica un excesivo tratamiento de procesamiento, tal como volatilización y guisado.

Tabla 4: Evaluación de la capacidad de mantenimiento acuoso de kamaboko

Tiempo de tratamiento con el horno microondas	Cantidad de enzima añadida a 1 g del material de pasta de pescado			
Tiempo (sec)	Producto de control	0,1 unidades (producto de la invención)	0,2 unidades (producto de la invención)	1 unidad (producto de la invención)
20	7,6	7,3	6	5,6
40	29,1	26,7	22,3	22,2
60	49,9	46,3	40,7	40,1

Porcentaje de evaporación de humedad (%) = $\frac{[(\text{peso después del tratamiento con el horno microondas}) - (\text{Peso antes del tratamiento con el horno microondas})]}{(\text{Peso antes del tratamiento con el horno microondas})} \times 100$ (unidad; %)

Ejemplo 3

Se combinaron 100 partes en peso de lomo de cerdos, 20 partes en peso de solución salina al 10%, y 5 partes en peso de agua, se pusieron al vacío, y entonces se bañaron en ácido haciéndolas rotar en un tambor durante una noche bajo una situación de enfriamiento (producto de control). El producto enzimático de desamidación poco proteico (100 U/mg) preparado mediante el procedimiento mencionado en el Ejemplo 1, se añadió a 1 g de lomo de cerdo en una cantidad correspondiente a 0,1 unidades, 1 unidad o 5 unidades que se disuelven en agua, se utilizó para limpiar el lomo de cerdo, de la misma forma que en el caso del producto de control (Productos 1 a 3 de prueba), respectivamente; todos eran los productos de la presente invención. Al día siguiente, se rellenó con el producto una carcasa de vinilideano cilíndrica opaca (diámetro, 7 cm), se secó en una atmósfera seca a 60°C durante 60 minutos, se ahumó a 60°C durante 30 minutos, se vaporizó a 60°C durante 2 horas y a 75°C durante 30 minutos, enfriándose para preparar jamón. Con respecto al producto de control y a los productos 1 a 3 de Prueba, se midió el peso excluyendo al agua separada, calculándose los valores de (peso después de calentamiento)/(peso antes de calentamiento) en porcentajes, determinándose el rendimiento después del calentamiento. A continuación, se llevó a cabo una evaluación sensorial por 8 especialistas, utilizando el jamón que se había cortado en lonchas de un grosor de 2 mm. En la evaluación sensorial, se evaluó en primer lugar la lisura del lado de la loncha obtenida del jamón, tocándolo con la mano, y comiéndose entonces el jamón, realizando la evaluación de la dureza y de la sensación de humedad a cinco niveles. El resultado de la prueba se muestra en la Tabla 5.

El rendimiento de los productos de la presente invención después del calentamiento aumentó, comparado con el producto de control y, a cantidades mayores añadidas del enzima, se obtuvieron más efectos. Además, los lugares en los que se cortaron los jamones que constituyen los productos de esta invención, (lonchas) fueron muy suaves, siendo, asimismo, blanda su textura. Además, en los productos de la presente invención, la percepción del secado al morder, fue aparentemente escasa, y los tiempos de deglución fueron escasos, ya que los productos se evaluaron como de fácil deglución.

Tabla 5: Resultado de evaluación sensorial de los jamones

Cantidad del enzima añadido a 1 g de material	Rendimiento sobre calentamiento (%)	Lisura de la superficie de la loncha	Dureza	Sensación de humedad
(Producto de control)	84,3	3 (bases)	(3 bases)	3 (bases)
0,1 unidades (producto de la invención)	84,9	3	3	3,5

1 unidad (producto de la invención)	85,6	4	2	4
5 unidades (producto de la invención)	86,0	5	2	5

En los jamones preparados mediante idéntico procedimiento tal como se describe anteriormente, el jamón que se preparó añadiendo 1 unidad del enzima a 1 gramo de carne, se sometió a ensayo respecto a la separación acuosa mediante recalentamiento. Así, el jamón que fue sometido a un empaquetamiento al vacío, se calentó en agua hirviendo (100°C) durante 5 minutos, midiéndose la cantidad separada de agua después del calentamiento, determinándose el porcentaje de la separación del agua (porcentaje de separación acuosa (%) = (Cantidad de agua separada (%))/Peso original (g)). El resultado se muestra en la Tabla 6. Comparado con el producto de control, el jamón de la presente invención mostró un porcentaje disminuido de la separación del agua. A partir del resultado, se muestra la posibilidad de que la separación de agua después de recalentamiento, con un objetivo de esterilización de la superficie del jamón, después del envasamiento, se suprime, mejorando la calidad.

Tabla 6: Separación acuosa después de recalentamiento del jamón

Cantidad de enzima añadido a g de carne	Porcentaje de separación del agua después de calentamiento (%)
Producto de control	13,5
1 unidad (producto de la invención)	11,2

Ejemplo 4

Se prepararon dos tipos de soluciones de inmersión según la fórmula que se muestra en la Tabla 7. Es decir, existe una solución de inmersión que incluye una única solución salina (producto de control), y una solución de inmersión que contiene el enzima desamidante de proteínas (producto de prueba). Los tendones en bloques de lomo de cerdo utilizados como material, se cortaron previamente midiéndose el peso, añadiendo 25 g de cada solución de inmersión a 100 g del material cárnico, empacándose la mezcla al vacío. Se dejó que permaneciera a 4°C durante 12 horas, de forma que la solución de inmersión se difundiera bien en la carne, para conseguir una carne picada. Cada uno de los dos lados de la carne picada se asó durante 1,5 minutos mediante una placa caliente (a aproximadamente 160°C), para preparar una carne rustida. El rendimiento después de calentamiento sobre el asado, se determinó según la fórmula siguiente:

Rendimiento después de calentamiento (%) = (Peso de la parte sólida después de calentamiento)/(Peso total antes de calentamiento).

Se llevó a cabo a continuación una evaluación sensorial por siete especialistas, en cinco niveles para "carne tierna".

La Tabla 8 muestra el resultado del rendimiento después de calentamiento y de la evaluación sensorial. Comparado con el producto de control, el producto de prueba que era el cerdo utilizando la solución de inmersión (el producto de la presente invención) mostró, después de calentamiento, un aumento del rendimiento. Además, comparado con el producto de control, el producto de prueba, que era el cerdo utilizando la solución de inmersión (el producto de la presente invención) fue jugoso, mostró una textura tierna, exhibiendo una sensación como si la carne atravesase ligeramente los dientes con la textura fibrosa propia de la carne cuando todavía se conserva. Además del lomo de cerdo, se realizaron también preparaciones similares para el solomillo de res y la carne de pechuga de pollo, obteniéndose resultados similares. De este modo, se puede hacer que la carne resulte tierna mediante el enzima desamidante de proteínas, ya que éste se ha confirmado que puede utilizarse como un ablandador cárnico.

Tabla 7: Formulación de las soluciones de inmersión

	Producto de control	Producto de prueba
Sal	4,0%	4,0%
Solución enzimática desamidante de proteínas (130 U/ml)		3,0%
Agua	96,0%	93,0%
Total	100%	100%

Tabla 8: Rendimiento después de calentamiento y Resultados de Evaluación Sensorial en cinco posiciones

	Peso antes de calentamiento (g)	Peso después de calentamiento (g)	Rendimiento (%)	Evaluación sensorial en cinco posiciones (Promedio de 7 personas)
Producto de control	88,2	59,2	67,1	3,0
Producto de prueba (producto de la invención)	87,5	61,0	70,0	4,8

Ejemplo comparativo 1

Tal como se muestra en el Ejemplo 4, se descubrió que el enzima desamidante de proteínas utilizado en la presente invención tenía el efecto similar de una proteasa, que se utiliza a menudo con el objetivo de hacer que la carne sea tierna. Por tanto, se llevó a cabo la comparación con una proteína. Así, en vez del enzima desamidante de proteínas, una preparación proteásica (Papaína, preparada por Amano Enzyme), se disolvió en una cantidad del 0,01% en la solución de inmersión mencionada en la tabla y, de igual manera que en el Ejemplo 7, se prepararon unos productos cárnicos picados para lomo de cerdo y para carne de pechuga de pollo. El lomo de cerdo se tostó, mientras que la carne de pechuga de pollo se sometió a un empaquetamiento al vacío, seguido por un calentamiento en agua hirviendo durante 10 minutos. Cuando fueron sometidos a una prueba sensorial, aunque todos los productos que utilizan proteasa se ponen tiernos en término de dureza, la sensación "de fibra" inherente a la carne, se deterioró y la calidad se convirtió en otra, siendo distinta a la del producto de la presente invención. Especialmente en la carne de pollo, el grado de conseguir la calidad de tierna fue excesivo y una parte suya se "descongeló", de forma que el producto no pudo disfrutarse en absoluto por su sensación de mordedura. Como tal, cuando se utilizó una proteasa como ablandador de carne, resultó una blandura excesiva en la carne y un bajón en la calidad de la ella (textura y sabor), cuando la reacción fue excesiva, siendo, por tanto, un problema que el control reactivo sea muy difícil. Sin embargo, ya que el enzima desamidante de proteínas, mantiene una sensación fibrosa apropiada inherente a la carne, controlar su reacción cuando se utiliza como inductor de la calidad de tierna es muy sencillo, y depende fuertemente de los períodos para la distribución y conservación, por lo que es posible entonces proporcionar un producto que tenga una calidad estable. Esto puede deberse probablemente al hecho de que un mecanismo suave del enzima de desamidación proteica no es la descomposición de las proteínas cárnicas, sino la mitigación de su coagulación después del calentamiento.

Aplicabilidad industrial

Según la presente invención, se puede proporcionar un alimento que contenga proteínas musculares (y en el que, en su almacenamiento, se suprimen la disminución del rendimiento y la separación acuosa causada por la desnaturalización proteica en su procesamiento (mediante calentamiento, congelación y enfriamiento) así como el deterioro del sabor y del gusto, manteniéndose una textura lisa y blanda, pudiendo dar lugar asimismo a un procedimiento para obtener dicho alimento. Por tanto, esta invención es muy útil en el ámbito alimentario.

Listado de secuencias

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> Productos cárnicos transformados, productos de pasta de pescado y procedimiento para los mismos.

<130> EPA-64302

<160> 14

<170> Versión PatentIn 3.1

<210> 1

<211> 963

<212> ADN

<213> Chryseobacterium proteolyticum

<220>

<221> Característica-misc

<223> Proteína glutaminasa: secuencia nucleótida

```

<400> 1
atgaagaacc ttttcootgtc catgatggcc ttctgacccg tctcaccctt caactcootgo   60
gocgattcca acggcaacca ggaaatcaac ggcaaggaga agotttccgt taacgattct   120
aagotgaagg atttogggcaa gaccgttccg gttggcatcg acgaagagaa cggcatgac   180
aagggtgcct toatgttgac tgcgoagttc tacgagatca agccaacca gaaaaacgag   240
cagtaacotg gtatgcttcg ccaggctgtt aagaacgaat ctccagtcca cattttcctc   300
aagccaaca goaatgaaat cggcaagggtg gagtctgat cccagagga cgtccgtac   360
ttcaagaaga tctgaacca agaagtoaag ggccagacca acaatttggc gtcogtoatt   420
ccagatgtgg ctaacctcaa ctctctcttc aaccaatca agaaccagtc ttgcggtacc   480
tctacggcgt cctcccatg catcaccttc cgtacccag tcgacggotg ctacgcacgc   540
goccaaaaga tgcgccagat cttgatgaac aacggctatg actgtgagaa gcaattcgtg   600
tacgtaaac toaaggcatc caccggcacc tgotgcgtgg cgtggagcta oacggttga   660
atcttggta gotaaaaaa ogottccggo gtacaggaaa aacgoattat tgatccatcc   720
cttttttcca gggctcctgt gaccgataac gcatggogoa aogotttgcg taacacctct   780
tgoggtctg catccgttct ctcttaogct aacaccgag gaaatgttta ttacogctcc   840
oatccaatt cttaoctgta tgacaacaat ctgatcaata ccaactgtgt octgaactaa   900
ttctccctgc ttccggctg ttctccttca cctgcacogg atgtctccag ctgtggattt   960
taa                                                                    963

```

```

<210> 2
5 <211> 320
  <212> PRT
  <213> Chyrseobacterium roteollyticum

```

```

10 <220>
    <221> CARACTERÍSTICA-MISC
    <223> Proteína glutaminasa: secuencia aminoácida

```

```

<400> 2

```

Met Lys Asn Leu Phe Leu Ser Met Met Ala Phe Val Thr Val Leu Thr
1 5 10 15
Phe Asn Ser Cys Ala Asp Ser Asn Gly Asn Gln Glu Ile Asn Gly Lys
20 25 30
Glu Lys Leu Ser Val Asn Asp Ser Lys Leu Lys Asp Phe Gly Lys Thr
35 40 45
Val Pro Val Gly Ile Asp Glu Glu Asn Gly Met Ile Lys Val Ser Phe
50 55 60
Met Leu Thr Ala Gln Phe Tyr Glu Ile Lys Pro Thr Lys Glu Asn Glu
65 70 75 80
Gln Tyr Ile Gly Met Leu Arg Gln Ala Val Lys Asn Glu Ser Pro Val
85 90 95
His Ile Phe Leu Lys Pro Asn Ser Asn Glu Ile Gly Lys Val Glu Ser
100 105 110
Ala Ser Pro Glu Asp Val Arg Tyr Phe Lys Thr Ile Leu Thr Lys Glu
115 120 125
Val Lys Gly Gln Thr Asn Lys Leu Ala Ser Val Ile Pro Asp Val Ala
130 135 140
Thr Leu Asn Ser Leu Phe Asn Gln Ile Lys Asn Gln Ser Cys Gly Thr
145 150 155 160
Ser Thr Ala Ser Ser Pro Cys Ile Thr Phe Arg Tyr Pro Val Asp Gly
165 170 175
Cys Tyr Ala Arg Ala His Lys Met Arg Gln Ile Leu Met Asn Asn Gly
180 185 190
Tyr Asp Cys Glu Lys Gln Phe Val Tyr Gly Asn Leu Lys Ala Ser Thr
195 200 205
Gly Thr Cys Cys Val Ala Trp Ser Tyr His Val Ala Ile Leu Val Ser
210 215 220
Tyr Lys Asn Ala Ser Gly Val Thr Glu Lys Arg Ile Ile Asp Pro Ser
225 230 235 240
Leu Phe Ser Ser Gly Pro Val Thr Asp Thr Ala Trp Arg Asn Ala Cys
245 250 255
Val Asn Thr Ser Cys Gly Ser Ala Ser Val Ser Ser Tyr Ala Asn Thr
260 265 270
Ala Gly Asn Val Tyr Tyr Arg Ser Pro Ser Asn Ser Tyr Leu Tyr Asp
275 280 285
Asn Asn Leu Ile Asn Thr Asn Cys Val Leu Thr Lys Phe Ser Leu Leu
290 295 300
Ser Gly Cys Ser Pro Ser Pro Ala Pro Asp Val Ser Ser Cys Gly Phe
305 310 315 320

<210> 3

5 <211> 117

<212> AND

<213> Escherichia coli

<220>

10 <221> Característica-misc

<223> Secuencia señal TorA: secuencia nucleótida

<400> 3
atgaacaata acgatctott toaggoatca cgtoggogtt ttctggcaca actcggcggo 60
ttaaocgtcg ccgggatgot ggggccgtca ttgttaacgc cgcgaogtgc gactgcg 117

5 <210> 4
<211> 39
<212> PRT
<213> Escherichia coli

10 <220>
<221> CARACTERÍSTICA-MISC
<223> Péptido señal TorA

<400> 4
Met Asn Asn Asn Asp Leu Phe Gln Ala Ser Arg Arg Arg Phe Leu Ala
1 5 10 15
Gln Leu Gly Gly Leu Thr Val Ala Gly Met Leu Gly Pro Ser Leu Leu
20 25 30
Thr Pro Arg Arg Ala Thr Ala
35

15 <210> 5
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 5
25 catgaagaac ctttcctgt c 21

<210> 6
<211> 26
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

35 <400> 6
gtaaaaggat ccattaatta aaatcc 26

<210> 7
<211> 25
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 7
atgaacaata acgatctctt tcagg 25

<210> 8
50 <211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
55 <223> Oligonucleótido sintético
<400> 8
ccggatcctg gtcattgatt cacctg 26

<210> 9
 <211> 26
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 10 <400> 9
 aaattcctgt gaattagrtg atttag 26

 <210> 10
 <211> 43
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 20
 <400> 10
 aagagatcgt tattgtcat agaggcgaag gctcctgaa tag 43

 <210> 11
 25 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 11
 gatttcctgg ttgccgttg aatccgcagt cgcacgtcgc ggcg 44

 35 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 12
 45 gattccaacg gcaaccagga 20

 <210> 13
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 13
 55 cttggggccg aagccctga ctctttggt cag 33

 <210> 14
 <211> 33
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 65 <400> 14
 ttcggcccca agttggcgtc cgtcattcca gat 33

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para obtener un producto cárnico transformado o un producto de pasta de pescado, en el que un enzima desamidante de proteínas que presenta una acción para desamidar una proteína sin escisión del enlace peptídico y reticulación de la proteína es añadido a un material alimenticio que comprende una proteína muscular y el enzima actúa sobre la proteína muscular.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la proteína muscular es obtenida a partir de carne de ganado, carne de aves de corral, carne de pescado, un molusco o un crustáceo.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que la cantidad de enzima desamidante de proteínas añadido es de 0,01 a 100 unidades por 1 g del material alimenticio.
- 15 4. Producto cárnico transformado o producto de pasta de pescado producido mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Utilización de un enzima desamidante de proteínas que presenta una acción para desamidar una proteína sin escisión del enlace peptídico y reticulación de la proteína como ablandador de carne.