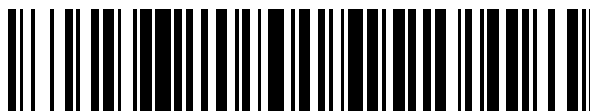


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 280**

51 Int. Cl.:

C07K 14/37 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2011** E 11712561 (7)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016** EP 2593473

54 Título: **Asparaginasa de basidiomicetos**

30 Prioridad:

14.07.2010 EP 10169405

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

04.10.2016

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)
Avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**BERENDS, PIETER;
RABE, SWEN;
BERGER, RALF GÜNTER;
LINKE, DIANA y
EISELE, NADINE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 585 280 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 de basidiomicetos

5 Sector de la invención

El sector de la presente invención, se refiere a una enzima asparaginasa, susceptible de poderse obtener a partir de los hongos Basidiomicetos, de la especie de Basidiomicetos *Flammulina velutipes*. Se dan también a conocer, así mismo, procedimiento para la hidrólisis de la L-hidrólisis de la L-asparagina, y de la L-glutamina. También se da a conocer, así mismo, un procedimiento para reducir la formación de acrilamida, en una sustancia, la cual comprende L-asparagina.

Antecedentes y trasfondo de la invención

15 Las aplicaciones de las enzimas asparaginas, en la tecnología de la alimentación, se originaron a partir del descubrimiento consistente en que, un tratamiento térmico de los alimentos, convierte a la asparagina, en presencia de un hidrato de carbono reductor, parcialmente, en acrilamida. Puesto que, los hidratos de carbono, se encuentran tan omnipresentes como los aminoácidos, en los alimentos, existe un riesgo permanente de generar la acrilamina cancerígena y genotóxica durante el tratamiento térmico de un alimento. El tratamiento térmico es, por ejemplo, un proceso de horneado, un proceso de asado o tostado, un proceso de barbacoa, o una fritura en abundante grasa. El inicio de la formación de acrilamida, durante el tratamiento térmico del alimento, se observa a unos niveles de temperatura, los cuales excedan de los 120 °C. El comité mixto de los expertos en aditivos alimentarios de la organización para las agricultura y los alimentos de las Naciones Unidas y de la Organización Mundial de la Salud (JECFA – [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives] -), ha manifestado que, la exposición a la acrilamida, puede representar un problema o preocupación, dado la genotoxicidad y la carcinogenicidad.

(Véase, a dicho efecto, www.inchem.org/documents/jecfa/jecval/jec_41.htm, consultada en fecha 1 de Julio del 2010.)

30 Una preocupación particular, en la industria de los alimentos, es la que surge para numerosas variedades de, por ejemplo, panes, galletas, tentempiés, pasteles, cereales, semillas tostadas (tales como el cacao, el café), productos a base de patatas extruidas o cortadas, los cuales necesitan seguir inherentemente un tratamiento térmico.

35 El tratamiento térmico de los productos alimenticios, es indispensable para la obtención de una buena calidad del producto alimenticio en cuestión. Así, por ejemplo, la reacción de oscurecimiento o dorado (reacción de Maillard), en los productos alimenticios, forman los típicos sabores o aromas, colores, y antioxidantes en los productos alimenticios. De una forma adicional, se consigue la seguridad microbiana y el tiempo de vida de conservación extendido del producto alimenticio, debido al tratamiento térmico del producto alimenticio.

40 Sería deseable el posibilitar una eliminación selectiva de la L-asparagina, previamente al tratamiento térmico del producto alimenticio.

45 La ingeniería genética de la patata, mediante la utilización de un gen de asparagina sintetasa antisentido y promotores específicos de tubérculos, según se ha reportado, reduce, pero no elimina la asparagina, del tubérculo consistente en la patata (Rommens, 2007); una completa eliminación de la asparagina, es supuestamente letal para la planta.

50 Las enzimas, son herramientas selectivas ideales, para modificar un constituyente de un producto alimenticio, sin afectar a otros constituyentes del producto alimenticio en cuestión. Una acción catalítica de las enzimas, en el producto alimenticio, es la que se distingue mediante un alto sustrato, más una especificidad de la reacción, y mediante las suaves condiciones físicas de la acción de las enzimas. La acción de las enzimas, en el producto alimenticio, es más respetuosa con el entorno medioambiental (es decir, más ecológica), ya que no se encuentran involucrados disolventes orgánicos o metales pesados (“química verde”; “biotecnología blanca”). Las enzimas utilizadas para modificar el constituyente alimenticio, permiten cambiar un constituyente alimenticio individual, al mismo tiempo que se evitan cualesquiera reacciones secundarias, las cuales podrían eventualmente dar como resultado la formación de compuestos tóxicos, en el producto alimenticio en cuestión.

60 Sin embargo, no obstante, en la actualidad, no puede contemplarse o preverse ninguna tecnología enzimática, para la hidrólisis selectiva de un aminoácido unido a una proteína, tal como la asparagina, a partir de una proteína alimenticia, incluso menos, al mismo tiempo que se mantiene la estructura típica y las propiedades sensoriales del respectivo material alimenticio.

65 Sería deseable el hecho de hidrolizar, por ejemplo, asparagina libre y móvil, en el producto alimenticio, para su conversión en ácido aspártico. La asparagina, no puede entonces servir como una molécula precursora para la formación de la acrilamida, cuando se procede a tratar térmicamente el producto alimenticio.

Estado actual de técnica especializada

La asparaginasa (EC 3.5.1.1; L-asparagina amidohidrolasa), se trata de una enzima, la cual cataliza a la hidrólisis de la asparaginasa, convirtiéndolo en el ácido aspártico, con la liberación de amoníaco. Por definición, las enzimas asparaginasa, actúan sobre el enlace nitrógeno – carbono, en las amidas lineales, pero no en las uniones o enlaces de los péptidos de la L-asparaginasa.

La L-asparagina, fue el primer aminoácido detectado (en el año 1806, en el jugo del *Asparagus officinalis* [es decir, el espárrago] -), y la L-asparaginasa, se encuentra omnipresente, en todas las células vivientes. De una forma correspondientemente en concordancia con ello, las enzimas asparagina, se encuentran en abundancia, de una forma natural, en la naturaleza, desde los microorganismos procarióticos hasta vertebrados; véase, a dicho efecto el trabajo Halpern, Y.S. y Grossowicz, N., Hydrolysis of amides by extracts from mycobacteria, - Hidrólisis de las amidas mediante extractos procedentes de micobacterias -, *Biochem. J.* 65: 716 – 720 (1957); el trabajo de Ho, P.P.K., Frank, B.H. y Burck, P.J., Crystalline L-asparaginasa from *Escherichia coli* B., - L-asparaginasa, procedente de *Escherichia coli* B. -, *Science* 165: 510 - 512 (1969); el trabajo de Suld, H.M. y Herbut, P.A., Guinea pig serum and liver L-asparaginasa - Comparison of serum and papain-digested liver L-asparaginasa, - Suero de conejillos de indias y L-asparaginasa hepáticas – Comparación entre las L-asparaginasa en el suero y el hígado, digeridas con asparaginasa. *J. Biol.Chem.* 245: 2797 - 2801 (1970). Los tetrámeros de asparaginasa procedentes de *E.coli*, con 326 aminoácidos (Jackson, R. Ch. y Handschumacher, R. E., *Escherichia coli* L-asparaginasa. Catalytic activity and subunit nature, - L-asparaginasa de *Escherichia coli*. Actividad catalítica y naturaleza de las subunidades -, *Biochemistry*, 1970, 9 (18), páginas 3585 - 3590), fueron los primeros en ser examinados en detalle.

Hasta tiempos recientes, la L-asparaginasa, se ha venido utilizando como citostático, en la terapia contra el cáncer, para luchar contra las células de leucemia, y los tumores de las células mastocitos (véase, a dicho efecto, el trabajo Herbert F. Oettgen, L-Asparaginasa: Ein neues Prinzip in der Chemotherapie maligner Neoplasien, - L-asparaginasa: Un nuevo principio en la quimioterapia de las neoplasias malignas -, *Annals of Hematology*, 1969, 19 (6), 351 - 356).

Más recientemente, se ha reportado el hecho de que, las enzimas asparaginasa, se derivaban de las bacterias (*Helicobacter pylori*, Scotti et al. 2010; *Pyrococcus furiosus*, Greiner-Stoeffele y Struhalla, 2008) y de los mohos (*Aspergillus niger*, Van der Laan et al. 2008; *Aspergillus oryzae*, Matsui et al. 2008). Se ha reivindicado el hecho de que, la adición de cationes divalentes y trivalentes y de varios aminoácidos y trioles libres (Elder et al. 2007), o de alfa-amilasa de Boer, 2006), o de cloruro cálcico, conjuntamente con ácido fosfórico o con ácido cítrico (Elder et al. 2005), ayudan, de algún modo a mantener la actividad de la enzima asparaginasa.

Una enzima glutaminasa, se encuentra relacionada con la enzima asparaginasa. La enzima glutaminasa, se deriva, de una forma típica, de bien ya sea las bacterias del ácido láctico, ya que éstas, se encuentran, por ejemplo, en la flora intestinal del pollo (Thongsanit et al. 2008; *Lactobacillus rhamnosus*, Weingand-Ziade et al. 2003), o bien ya sea de las levaduras (*Zygosaccharomyces rouxii*, Iyer y Singhal 2010), o bien ya se de los hongos marinos (*Beauveria bassiana*, Sabu et al. 2002), o bien, otra vez, de los mohos de *Aspergillus* (Prasanth et al. 2009).

Un uso concertado de la enzima asparaginasa en la tecnología alimentaria, es bastante reciente. En el año 2007, se introdujo, en el mercado europeo, la enzima preventAse (de la firma DSM). La enzima preventAse (de la firma DSM), se produce mediante un moho recombinante, *Aspergillus niger*. Se ha obtenido una asparaginasa competitiva, a la cual se le denomina Acrylaway (de la firma Novozymes), a partir de especies de mohos relacionadas, la especie *Aspergillus oryzae*, mediante la utilización de una fermentación discontinua de alimentación, sumergida (submerged feed-batch fermentation), de una cepa genéticamente modificada, la cual porte un gen que codifique para una enzima asparaginasa, procedente de la especie *Aspergillus oryzae*. Ambas especies de *Aspergilli* (*Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*), se describen como teniendo una larga historia de un uso industrial seguro, encontrándose éstos ampliamente distribuidos en la naturaleza, y utilizándose, de una forma usual, para la producción de enzimas de grado alimenticio.

Hendriksen et al., dan a conocer, en la publicación *Journal of agricultural and food chemistry* -, Diario de la química agrícola y química -, volumen 57, nº 10 (2009), páginas 4168 – 4176, una enzima asparaginasa procedente del hongo *Aspergillus oryzae*. El documento de patente internacional WO 2008 / 128 975, da a conocer una enzima asparaginasa, procedente de la especie de hongo *Aspergillus niger*, y dos variantes ésta.

En las aplicaciones de horneado o cocción, la enzima asparaginasa, se mezcla, de una forma típica, con la masa de pasta, antes de proceder al tratamiento térmico del producto alimenticio (tal como, por ejemplo, un tratamiento consistente en un horneado o cocción), con objeto de eliminar la formación de acrilamida. Para las frituras francesas, consistentes en las frituras de patatas (patatas fritas), puede utilizarse la inmersión y bañado o el rociado de las piezas o trozos de patatas, en una solución, o con una solución, de la solución de la enzima asparaginasa. Un procedimiento de este tipo, puede ser muy eficiente. En la fabricación de patatas chips, Corrigan (2008), reportó el hecho de una disminución de los niveles acrilamida, en el producto finalizado, correspondiente a un valor que va desde los 1688 µg / kg, hasta los 60 µg / kg, en comparación con las patatas chips no tratadas. Se supuso que era factible una reducción de la formación de acrilamida, en un valor correspondiente a un porcentaje < 99,9 %, (Elder et al., 2004).

La seguridad del producto, en términos de enzima asparaginasa aplicada al producto alimenticio, no es un problema, ya que, la enzima asparaginasa, se inactivará, por calor, mediante el tratamiento térmico del producto alimenticio en cuestión, en la etapa previa al envasado. Así, por lo tanto, es resulta improbable el hecho consistente en que, la enzima asparaginasa, entre en contacto con el consumidor, de una forma activa.

5

Enzimas procedentes de los basidiomicetos

La mayor parte de los aprox. 1.000 hongos comestibles, pertenecen a la clase de los *Basidiomycota* (Basidiomicetos). A los Basidiomicetos, se les hace referencia, a menudo, como hongos superiores. Los basidiomicetos, se reproducen mediante la formación de células semejantes a pilares, las cuales portan cuatro meiosporas. La anatomía de los basidiomicetos, es la que da su nombre a su denominación (lat. Basidium = pila). Los basidiomicetos, se aprecian, en el mundo entero, debido a su rico sabor, a su alto contenido de proteínas y a su alto contenido de fibras, conjuntamente con una baja energía. Las culturas asiáticas, asignan, de una forma adicional, distintas actividades dirigidas a la protección de la salud y de curación, a una gran parte de los hongos consistentes en los Basidiomicetos.

Los basidiomicetos saprotróficos, habitan, de una forma usual, en los desechos forestales, en los suelos forestales, en los lechos de hojas y en los árboles caídos. Las células vegetativas, se extienden en la esfera subterránea, formando células filamentosas largas (hifas). Para sobrevivir en los materiales orgánicos más recalcitrantes, en la tierra, la estructura o red de lignina dimensional, éstos poseen un conjunto remarcablemente potente de oxidorreductasas. Entre las oxidorreductasas, se encuentran la lignina peroxidasa, la manganeso peroxidasa, la peroxidasa versátil, las oxidasas las cuales producen H₂O₂, tales como las consistentes en la glucosa oxidadas, y las fenol oxidasa, del tipo Lacasa. Se encuentran así mismo, también, las glicoxidasas, tales como las consistentes en las celulasas, las cuales ayudan a degradar la porción de celulosa de la madera.

Puesto que, la madera de los árboles de hoja percedera y de las coníferas, no contienen una cantidad significativa de proteínas y de aminoácidos, no se prevé un acontecimiento en el que se produzca una actividad de la enzima asparaginasa, en el crecimiento de los hongos, en este hábitat particular.

Los cultivares de *Flammulina velutipes*, procedentes de los Basidiomicetos, son también conocidos, según se sabe, como Enokitake, hongo de aguja dorada, o colibia de pie aterciopelado. La especie de *Flammulina velutipes*, forma cuerpos fructíferos blancos, delgados, y éstos de utilizan, en las cocinas asiáticas, como hongos versátiles. El hongo en cuestión, se utiliza, de una forma tradicional, en estado fresco, en latas para sopas, en ensaladas, y en otros platos. El hongo, puede refrigerarse (es decir, guardarse en un frigorífico, durante un transcurso de tiempo de aprox. una semana).

Objeto de la invención

Un objeto de la presente invención, es la de proporcionar una enzima asparaginasa, con una alta actividad y una alta estabilidad operativa.

Un objeto adicional de la presente invención, es la de reducir la formación de acrilamida, en un producto alimenticio, mediante la utilización de la enzima asparaginasa.

Resumen de la invención

En un aspecto de la presente revelación, en concordancia con la invención, la revelación, se refiere a una enzima asparaginasa, susceptible de poderse obtener a partir de los basidiomicetos. De una forma particular, el basidiomiceto a partir de la cual se obtiene la asparaginasa, es el Basidiomiceto *Flammulina velutipes*.

En un aspecto adicional de la presente revelación, en concordancia con la invención, se refiere a un procedimiento para la hidrolización de por lo menos una L-asparagina o L-glutamina. El procedimiento, comprende el tratar una substancia, la cual comprende por lo menos una L-asparagina ó una L-glutamina, con una enzima asparaginasa, susceptible de poderse obtener a partir del Basidiomiceto.

En un aspecto adicional de presente revelación, en concordancia con la presente invención, ésta se refiere a un procedimiento para reducir la formación de acrilamida, en una substancia, la cual comprende L-asparagina. El procedimiento, comprende, el aplicar a la substancia, la cual comprende la L-asparagina, la enzima asparaginasa, susceptible de poderse obtener a partir del Basidiomiceto. El procedimiento, comprende, entonces, el calentamiento de la substancia, la cual comprende la L-asparagina.

La substancia, la cual comprende por lo menos una de entre la L-asparagina o la L-glutamina, puede ser un producto alimenticio.

65

Figuras

La presente invención, se describe, a continuación, en la parte que sigue de este documento, haciendo referencia a algunas formas de presentación, tal y como se muestra en las figuras anexas, en donde:

5 La fig. 1, muestra un transcurso de tiempo de la formación intracelular, de la enzima asparaginasa de *Flammulina velutipes*, la cual se ha cultivado en un cultivo sumergido.

10 La fig. 2, muestra un transcurso de tiempo de la formación extracelular, de la enzima asparaginasa de *Flammulina velutipes*, la cual se ha cultivado en un cultivo sumergido.

15 La fig. 3, muestra las secuencias nucleotídicas genómica (A) y de codificación (B) de la secuencia de aminoácidos (C) la enzima asparaginasa de *Flammulina velutipes*. Los primeros 19 aminoácidos, se identificaron como siendo la secuencia señal.

La fig. 4, muestra la tolerancia a la sal de la enzima asparaginasa procedente de los hongos de la especie *Flammulina velutipes*, expresada en *E. coli*, como un huésped heterólogo, y el cual se utiliza como una enzima cruda.

20 La fig. 5, muestra la estabilidad de la enzima asparaginasa procedente de los hongos de la familia *Flammulina velutipes*, expresada en *E. coli*, como un huésped heterólogo, y el cual se utiliza como una enzima cruda.

La fig. 6, muestra un valor pH óptimo de la enzima asparaginasa de *Flammulina velutipes*,

25 La fig. 7, muestra la estabilidad a la temperatura de la enzima asparaginasa de *Flammulina velutipes*, expresada en *E. coli*, como un huésped heterólogo, y el cual se utiliza como una enzima cruda.

La fig. 8, muestra a) la actividad en electroforesis en gel de poliacrilamida, nativa, marcada mediante tinción, y b) separaciones en PAGE desnaturalizante, de la enzima asparaginasa de *Flammulina velutipes*.

30 La fig. 9, muestra una temperatura óptima de la enzima asparaginasa de *Flammulina velutipes*.

Descripción detallada de la invención

35 Para una comprensión completa de la presente invención, y de las ventajas aportadas por ésta, se hace referencia a la información detallada de la invención, tomada conjuntamente con las figuras.

40 Debe entenderse el hecho de que, varios aspectos de la presente invención, son meramente ilustrativos de las formas específicas para formar y utilizar la presente invención, y que éstos, no limitan el ámbito de la invención, cuando éstos se toman en consideración, conjuntamente con las reivindicaciones anexas y la información detallada, la cual se facilita abajo, a continuación.

45 En la presente revelación, en concordancia con la presente invención, el término enzima asparaginasa, se utiliza para hacer referencia a una enzima, la cual es capaz de hidrolizar a ambas, la L-asparagina y la L-glutamina.

Un propósito de la presente invención, es la de reducir, de una forma significativa, la formación de una acrilamida carcinogénica, en productos alimenticios los cuales se han tratado térmicamente, mediante una hidrólisis enzimática concertada, del precursor de acrilamida, L-asparaginasa, con la enzima asparaginasa.

50 En una forma de presentación de la siguiente revelación, en concordancia con la presente invención, se da a conocer un procedimiento para la fabricación de una enzima asparaginasa. La enzima asparaginasa, poseen una estabilidad operativa, y ésta se obtiene a partir del micelio de los Basidiomicetos *Flammulina velutipes*.

55 Una cepa de *Flammulina velutipes*, se encuentra comercialmente disponible en el mercado, de procedencia de colecciones de cultivos, tal como las colecciones de cultivos de la entidad alemana DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania) o de la entidad holandesa CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Países Bajos).

60 El uso de micelio de los Basidiomicetos *Flammulina velutipes*, ofrece grandes ventajas, en términos de facilidad de producción y de cultivo, ya que no es necesaria la colección de cuerpos fructíferos. Como resultado del uso extensivo de esta especie de Basidiomicetos *Flammulina velutipes*, como producto alimenticio, no existen riesgos visibles para la salud, o problemas de seguridad.

65 El hongo de los Basidiomicetos *Flammulina velutipes*, puede cultivarse fácilmente en un cultivo sumergido, mediante unas demandas mínimas, en cuanto a lo referente a los suplementos del medio. Deben encontrarse presentes, una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, y una fuente de fósforo; estas fuentes, se proporcionan, de una forma

típica, mediante mezclas naturales, tales como las consistentes en un extracto de levadura, o glucosa más sales inorgánicas de amonio y de fosfatos. Se recomienda, en todos los medios nutrientes de microorganismos, la adición de una mezcla de elementos menores y de elementos en trazas (oligoelementos). El cultivo de los Basidiomicetos *Flammulina velutipes*, se lleva a cabo, de una forma preferible, en un cultivo sumergido, durante un transcurso de tiempo que va desde los 3 días a los 20 días, de una forma preferible, en un transcurso de tiempo que va de desde los 6 días a los 15 días. La temperatura, durante el cultivo de los Basidiomicetos *Flammulina velutipes*, de una forma típica, es la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde los 10 °C hasta los 35° C, siendo ésta, de una forma preferible, la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes, los cuales van desde los 20 °C hasta los 30 °C. Un valor pH típico, es el que se encuentra comprendido entre aprox. 4 hasta aprox. 8, prefiriéndose un valor pH comprendido entre aprox. 5 hasta aprox. 7. De una forma adicional, son típicas, para este procedimiento, unas condiciones de baja luz.

El procedimiento de producción de biomasa y de la enzima asparaginasa, se opera bajo unas condiciones suaves, y éste es respetuoso con el entorno medioambiental, como contraste a otros procedimientos correspondientes al arte anterior de la técnica especializada.

La actividad enzima asparaginasa, se acumula, en primer lugar, de una forma intracelular, tal y como se muestra en la figura 1, y a continuación, se secreta a un medio de nutrientes, tal y como se muestra en la figura 2.

El medio de nutrientes, facilita la gestión del procedimiento, así como también, el aislamiento de la enzima asparaginasa, y el enriquecimiento de ésta, mediante la utilización de técnicas, las cuales se conocen bien, en arte especializado de la técnica. Las técnicas en cuestión, pueden ser las consistentes en la ultra-filtración, en la precipitación o en la absorción. Puede así, de este modo, obtenerse un sobrenadante de cultivo concentrado, exento de células, de la enzima asparaginasa y, a continuación, éste puede utilizarse para la hidrólisis técnica. Si bien las enzimas asparaginasa pueden aislarse mediante técnicas las cuales se conocen bien, en el arte especializado de la técnica, no es no obstante necesario, el proceder a ello, y en el presente procedimiento, puede también utilizarse, de una forma adicional, una mezcla cruda de la enzima obtenida,

Durante el transcurso de un cultivo sumergido de *Flammulina velutipes*, se encontró un pico de actividad enzima asparaginasa, después de un transcurso de tiempo de aprox. una semana. Se inició una excreción, en el interior del espacio intracelular, después de un transcurso de tiempo de aprox. 14 días.

Tal y como puede verse en la fig. 8, la actividad, procediendo a una tinción de marcaje sobre un gel de poliacrilamida, nativo, confirmó la especificidad catalítica y mostró, bandas activas de la enzima purificada, a 13 y 74 kDa, indicando la presencia de una forma de oligómero, aparte del monómero.

En el caso en el que se requiera una pureza máxima de la enzima asparaginasa, puede entonces procederse a utilizar un producto recombinante procedente del *Bacillus subtilis*. Con objeto de proceder al desarrollo de cepas recombinantes, debe conocerse la secuencia total de aminoácidos de la enzima asparaginasa. La secuencia entera de aminoácidos de la enzima asparaginasa, se muestra en la figura 3, figura ésta, en la cual se muestra la secuencia total, con la totalidad de las 123 porciones de aminoácidos, tal y como se deduce a raíz de la secuencia total de 372 pares de bases del gen estructural. En el par de bases 18, una secuencia señal, precede a la región codificadora.

La enzima asparaginasa, se añade a un sustrato. Mediante la adición de la enzima asparaginasa al sustrato, se intenta el hecho consistente en que, la enzima asparaginasa en cuestión, contacte con el sustrato. Esta acción, puede incluir, por ejemplo, una proyección pulverizada o rociado (spray), una inmersión o recubrimiento del sustrato, con la enzima asparaginasa en cuestión. El sustrato, de una forma preferible, es un material alimenticio, el cual comprende una cualquiera de entre la L-asparagina o la L-glutamina. La enzima asparaginasa, se aplica, de una forma usual, al sustrato, a unas concentraciones correspondientes a nivel total comprendido dentro de unos márgenes los cuales van desde 1 milimolar hasta 200 milimolar, de una forma preferible, desde 10 milimolar hasta 30 milimolar, en dependencia de la actividad específica. La enzima asparaginasa, puede añadirse como la proteína pura. De una forma alternativa, la enzima asparaginasa, puede personalizarse, a medida, en concordancia con el uso que se pretende para ella, mediante la adición de determinados ingredientes a la enzima asparaginasa en cuestión, tales como los consistentes en la lactosa, en el glicerol, o en la albúmina, con objeto de facilitar la dosificación. La enzima asparaginasa fabricada o la enzima asparaginasa personalizada a medida, puede encontrarse en la forma una tableta de enzima, de un granulado, de un líquido estabilizado, o de una preparación parecida a una pasta.

Se procede a llevar a cabo una hidrólisis del sustrato, con objeto de obtener el sustrato en cuestión, con unos niveles significativamente bajos, de asparagina o de glutamina, si se compara con el sustrato, previamente a llevar a cabo el tratamiento. Las condiciones las cuales pueden utilizarse para la hidrólisis, son condiciones estándar, y éstas pueden fácilmente determinarse, por parte de una persona experta en el arte especializado de la técnica.

Puesto que la actividad enzima asparaginasa no se encuentra afectada por el entorno medioambiental químico, en el cual se encuentra ésta presente, el sustrato a ser tratado, puede ser, por ejemplo, un sustrato consistente en:

- Bebidas
 Granos de cacao
 Queso
 Granos de café
- 5 Productos de confitería o pastelería
 Postres
 Masas de pasta
 Aderezos o condimentos
- 10 Patatas fritas
 Bebidas de frutas
 Productos cárnicos
 Dietas médicas
 Suplementos nutritivos
- 15 Productos alimenticios para animales de compañía o domésticos
 Patatas chips
 Salsas
 Tentempiés
 Sopas
- 20 De una forma particular, el sustrato en cuestión, se trata de un artículo o producto comestible, el cual pueda consumirse por parte de un ser humano o por parte de un animal.
- El grado de hidrólisis de la asparagina, en el sustrato, o bien puede determinarse o evaluarse, procediendo a medir la disminución de la asparagina, el incremento de ácido aspártico, o de amoníaco, o bien, después de haber procedido a procesar el producto alimenticio, procediendo a medir el nivel cualquier acrilamida residual.
- 25 La ventaja aportada por la presente invención, es la consistente en que, la nueva enzima asparaginasa resultante, tiene una distinta afinidad y una eficacia mejorada, para la hidrólisis de la L-asparagina.
- 30 Resulta todavía incluso más sorprendente, el hecho consistente en la excelentes propiedades técnicas de la enzima asparaginasa, en cuanto a lo referente a la estabilidad operativa, la cual facilita el uso, en procesos en los que se emplea una elevada temperatura y fuerza iónica, y diferentes condiciones del valor pH (véanse, a dicho efecto, las figuras 4 – 7). No son necesarios ni aditivos ni ningunos otros co-sustratos adicionales, los cuales sean distintos al agua.
- 35 La nueva enzima asparaginasa, posee una buena estabilidad al valor pH, y un amplio rango de pH óptimo, comprendido dentro de unos márgenes situados entre un valor pH de 5,6 y un valor pH de 9, véanse, a dicho efecto, las figuras 5 y 6. El valor pH de la mayoría de los productos alimenticios, se encuentra comprendido dentro de este rango de valores.
- 40 Una estabilidad operativa de la enzima asparaginasa, no se reduce, incluso a temperaturas las cuales correspondan a un nivel tan alto como el de 55 °C, véase, a dicho efecto, la figura 7.
- 45 Un punto isoeléctrico del monómero y el oligómero de enzima asparaginasa, se encuentra en un valor cercano a 5,2, según se determina mediante electroforesis en gel, de enfoque isoeléctrico en la zona de enfoque isoeléctrico. Las masas moleculares, del monómero y oligómero de enzima asparaginasa, son las correspondientes a un valor de 12,8, según se deduce a partir de la secuencia completa, y de un valor de aprox. 74, para la forma agregada, según se deduce a partir de la electroforesis en gel de poli(acrilamida), nativo, (PAGE), véase, a dicho efecto, la fig. 8.
- 50 La única secuencia de la enzima asparaginasa, de la forma la cual se muestra en la figura 3, se determinó mediante análisis de ESI-MS (análisis mediante espectrómetro de masa de ionización por electroproyección). La mejores homologías de los péptidos inicialmente encontrados, se encontraron para una carboxilasa / metalo-peptidasa (valor E > 30), para una lipasa / esterasa / desacetilasa (valor E > 100), y para una hidrolasa aspártica / glicósido, semejante a la pepsina (valor E > 14). Los resultados de los valores de E, de una forma generalizada,
- 55 inhomogéneos y reducidos, indican el hecho consistente en que, la enzima asparaginasa en cuestión, se trata de una enzima asparaginasa nueva, y la cual es verdaderamente nueva. Esto se explica, mediante la única fuente, la especie de basidiomiceto.
- 60 La presente invención, se describe aquí, en este documento de solicitud de patente, de una forma adicional, por medio de ilustración, en los siguientes ejemplos, no limitativos, los cuales se facilitan abajo, a continuación.

EJEMPLOS

- 65 En los ejemplos los cuales se facilitan a continuación, se procedió a utilizar materiales y procedimientos, tales como los que se describen, de una forma resumida.

Materiales y procedimientosCultivo de *Flammulina velutipes*

5 Previamente a su uso, se procedió a introducir, en una autoclave, todos los medios todos y el equipamiento, y se aplicaron técnicas de estándar de esterilización, durante la totalidad del desarrollo del procedimiento. El hongo *Flammulina velutipes*, se mantuvo en placas de agar, estándar (30,0 g L⁻¹ de glucosa monohidratada; 4,5 g L⁻¹ de asparagina monohidratada; 1,5 g L⁻¹ de KH₂PO₄; 0,5 g L⁻¹ de MgSO₄; 3,0 g L⁻¹ de extracto de levadura; 15,0 g L⁻¹ de agar agar; 1,0 ml L⁻¹ de una solución de trazas de metales (oligoelementos), con un contenido de 0,005 g L⁻¹ de CuSO₄ · 5H₂O, 0,08 g L⁻¹ de FeCl₃ · 6H₂O, 0,09 g L⁻¹ de ZnSO₄ · 7H₂O, 0,03 g L⁻¹ de MnSO₄ · H₂O y 0,4 g L⁻¹ de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). El valor pH del medio, se ajustó, a un valor pH de 6, con 1 M NaOH, previamente a proceder a la esterilización.

15 Se procedió a preparar los precultivos, mediante una homogeneización, de un tampón de agar de 10 x 10 mm, con micelio de *Flammulina velutipes*, en 100 ml solución de nutrición estándar, estéril, mediante la utilización de un dispositivo de la clase Ultra Turrax (Micra D-9, Art, Müllheim, Alemania). Los cultivos sumergidos, se mantuvieron a una temperatura de 24 °C y a una velocidad angular de 150 r. p. m. (revoluciones por minutos). Después de haber procedido al cultivo, durante un transcurso de tiempo de 5 días, se procedió a transferir 50 ml del precultivo, a 250 ml de medio de cultivo principal, consistente en medio mínimo (1,5 g L⁻¹ de KH₂PO₄; 0,5 g L⁻¹ de MgSO₄; 1,0 ml L⁻¹ de una solución de trazas de metales – oligoelementos -), y 40 g L⁻¹ de gluten, ó 40 mM glutamina, respectivamente.

Preparación de la enzima asparaginasa, a partir de *Flammulina velutipes*

25 Después de un transcurso de tiempo de 18 días de cultivo, el cultivo en cuestión, se filtró, y el sobrenadante que contenía la enzima asparaginasa extracelular (200 ml), se sometió a espumado inverso [1]). Se procedió a concentrar el retenido, mediante la utilización de una ultra-filtración, con un corte de peso molecular (MWCO – [de sus siglas en idioma inglés, correspondientes a Molecular weight cut – off] -), correspondiente a un valor de 10.000 kDa (Millipore, Bedford, MA), y éste se separó, vía cromatografía de exclusión de tamaño, a una Superosa 6, con 300 mM Tris / HCl, pH 7,5.

Test de ensayo de actividad

35 Se procedió a precalentar, a una temperatura de 37 °C, 10 mM L-glutamina ó 10 mM L-asparagina, en 0,1 M fosfato potásico, a un valor pH de 7,0. El ensayo resultante, se inició mediante la adición de 50 µl de enzima nativa o mediante 10 µl de enzima recombinante, en un volumen total de reacción de 150 µl, y éste se paró, después de un transcurso de tiempo de 10 – 20 minutos, mediante la adición de 20 µl de TCA al 3 %, o mediante recombinante o mediante un calentamiento, a una temperatura de 95 °C, durante un transcurso de tiempo de 10 minutos. Se procedió a llevar a cabo un experimento de control, sin aminoácidos. Se siguió la formación del producto, mediante la utilización de HPLC. Una unidad de actividad enzimática, se calculó como la cantidad de enzima requerida para producir 1 µM de ácido glutámico o de ácido aspártico, respectivamente, a 37 °C por minuto.

45 La HPLC, se llevó a cabo mediante la utilización de C18 Nucleodur Pirámide, 5 µm, 4 mm de columna ID, metanol, como eluyente, 0,1 M acetato sódico más 0,44 % de trietilamina (pH ajustado a un valor de 6,5, mediante la utilización de HCl) como eluyente B, o-ftaldialdehído como el reactivo de derivatización, y un detector de fluorescencia.

Proteína libre

50 La concentración de proteína, en el sobrenadante de la hidrólisis, se estimó en concordancia con el procedimiento de Lowry, mediante la utilización de albúmina de suero bovino, como patrón de referencia estándar.

Temperatura y pH óptimos

55 La determinación de la temperatura y del valor pH óptimos, de la enzima asparaginasa, se llevó a cabo mediante soluciones de enzima, las cuales se recolectaron durante el cultivo, o después de que la proteína recombinante se encontrara disponible, en una forma soluble. El valor pH óptimo, se examinó en un rango correspondiente a unos valores comprendidos dentro de unos márgenes, los cuales iban desde un pH 4 hasta un pH 9 (0,1 M acetato sódico, pH 4,5; 0,1 M fosfato potásico, pH 6, 7, (; 0,1 M carbonato sódico, pH 9), a una temperatura de 37 °C. La determinación de la temperatura óptima, era la correspondiente a unos valores comprendidos dentro de unos márgenes que van desde los 20 °C, a un valor pH óptimo.

Estabilidad a la temperatura y al valor pH

65 Para la determinación de la estabilidad al valor pH de la enzima recombinante, se procedió a incubar 10 µl de enzima recombinante, durante un transcurso de tiempo de 16 horas, a una temperatura de 37 °C, en 40 µl del tampón respectivo, el cual se ha descrito anteriormente, arriba. Se procedió a añadir 100 µl de 10 mM glutamina en

0,1 M fosfato potásico (pH 7), y la reacción, se incubó, durante un transcurso de tiempo de 20 minutos, a una temperatura de 37 °C. Se procedió a llevar a cabo un experimento de control, sin sustrato. Se procedió interrumpir la reacción, a una temperatura de 95 °C, durante un transcurso de tiempo de 10 minutos. Se procedió a calcular el ácido glutámico generado, después del análisis de HPLC, de la forma la cual se ha descrito anteriormente, arriba.

Para el análisis de la estabilidad a la temperatura, se procedió a incubar 10 l de la enzima recombinante, durante un transcurso de tiempo de hora, al respectivo nivel de °C, en 40 µl de un tampón de fosfato potásico 0,1 M (a un valor pH de 7). A continuación de ello, se procedió a añadir 100 µl de 10 mM glutamina en 0,1 M fosfato potásico (pH 7), y la mezcla de ensayo, se incubó, durante un transcurso de tiempo de 20 minutos, a una temperatura de 37 °C. Se procedió a llevar a cabo un experimento de control, sin sustrato. Se procedió interrumpir la reacción, a una temperatura de 95 °C, durante un transcurso de tiempo de 10 minutos. Se procedió a calcular el ácido glutámico generado, después del análisis de HPLC, de la forma la cual se ha descrito anteriormente, arriba.

Análisis en tándem de ionización por espectrometría de masas y electroproyección de péptidos trípticos

Se procedió a escindir bandas de peptidasa de los geles poliacrilamida con SDS (dodecilsulfato sódico), y éstas se digirieron con tripsina. Los péptidos resultante, se extrajeron y se purificaron, en concordancia con protocolos estándar. Para la realización de la MS (espectrometría de masas) y ionización por electroproyección (ESI) de los péptidos, se procedió a utilizar un espectrómetro de masas, del tipo "Qtof II mass spectrometer" (de la firma Micromass, Gran Bretaña), equipado con una fuente de iones por nanoproyección, y capilares recubiertos de oro. Para la realización de los experimentos de disociación inducidos por colisión, se procedió a transmitir, de una forma selectiva, múltiples iones principales (progenitores) a partir del analizador de masas cuadrupolar, al interior de la célula de colisión (25 – 30 eV). Los iones secundarios (hijos), se separaron mediante un analizador de espectrometría masas, en tiempo de vuelo ortogonal. Para la identificación de las proteínas de las bases de datos de la secuencia proteínas de especies cruzadas, en las bases de datos primarios, públicos, de proteínas, se procedió utilizar las huellas digitales de la masa del péptido, obtenida mediante el análisis en tándem de ionización por espectrometría de masas y electroproyección (ESI – tandem MS).

Electroforesis en gel de poliacrilamida, nativa (native – PAGE) y electroforesis en gel de poliacrilamida mediante dodecilsulfato sódico (SDS – PAGE)

Se procedió a llevar a cabo análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida mediante dodecilsulfato sódico (SDS – PAGE – [de sus siglas en idioma inglés, correspondientes a sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis] -), en un gel de separación de poliacrilamida, al 12 %. Se prepararon muestras, procediendo a mezclar 20 µl de tapón de carga [0,1 M Tris / HCl (a un valor pH de 6,8), 0,2 M DTT, 4 % SDS, 20 % de glicerina, 0,2 % de azul de bromofenol], y se procedió a su ebullición, evolución, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos. Después de haber procedido a realizar la electroforesis, a 20 mA por gel, se procedió a marcar los geles, mediante tinción con Azul Brillante de Coomassie. Con objeto de llevar a cabo las determinaciones moleculares, se procedió a la utilización de proteínas marcadoras de 250 a 10 kD (de procedencia de la firma BioRad, Alemania).

Se procedió a llevar a cabo el análisis de Electroforesis en gel de poliacrilamida, nativa (native – PAGE), en unas condiciones no desnaturalizantes. Las muestras, se prepararon procediendo a mezclarlas, en un valor de relación 1 : 1 (referido a vol. / vol.) con un tampón de carga [0,05 M Tris / HCl (pH 6,8), 2 % de SDS, 10 % de glicerina, 0,1% de azul de bromofenol]. Después de la electroforesis, a 10 mA por gel, a una temperatura de 8 °C, se procedió a lavar los geles, 2 veces, en 2,5 % de Tritón X - 100. El procedimiento de marcaje mediante tinción, se base en la desaminación de la L-glutamina, mediante la glutaminasa, con objeto de producir el L-glutamato. La oxidación del L-glutamato, mediante deshidrogenasa glutamato, se acopla a la reducción de un tinte o colorante de tetrazolio, convirtiéndose a su forma insoluble coloreado, consistente en el formazán. La solución de marcaje por tinción de glutaminasa, la cual contenía 15 mM L-glutamina, 0,5 g ml⁻¹ de deshidrogenasa glutamato de hígado bovino, 0,1 M fosfato potásico, pH 7, 2 mg ml⁻¹ NAD, 0,04 mg ml⁻¹ fenazina metosulfato, y 2 mg ml⁻¹, de nitroazul de tratazolio. La actividad enzimática, apareció después la incubación, a una temperatura correspondiente a un valor de 37 °C, como bandas violetas.

Enfoque isoeléctrico

Se procedió a llevar a cabo un análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de enfoque isoeléctrico, en un sistema Multiphor II (de procedencia de la firma Pharmacia LKB, Suecia), mediante la utilización de geles prefabricados Servalyt™ Precotes™, con un gradiente de pH inmovilizado de un valor comprendido dentro de unos márgenes que van de 3 a 10 (de procedencia de la firma Serva, Alemania), para 3500 V h (2000, 6 mA, 12 W). Se estimó que, los puntos isoeléctricos de asparaginasa, eran 5, utilizando una mezcla de ensayo de proteínas, de un pl que iba de 3,5 a 10,7 (Serva, Alemania). Los geles, se marcaron mediante marcaje de tinción de Coomassie, plata, o marcaje de actividad, de la forma la cual se ha descrito anteriormente, arriba.

Preparación de RNA

Se procedió a preparar el RNA, a partir de 500 mg de micelio, almacenado en RNALater® (Invitrogen), mediante la

utilización de un equipo de ensayo, a modo de kit, del tipo “NucleoSpin® RNA Plant Kit” (de procedencia de la firma Macherey-Nagel, Düren, Alemania).

Síntesis de cDNA

5 Se procedió a mezclar 5 µg de RNA total, con 25 pmol de 3'PCR (ATTCTAGAGGCCGAGGCCGCGACATG 30*T VN), se llenó hasta un volumen de 11 µl, con H₂O tratada con DEPC (pirocarbonato de dietilo [DEPC, de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a diethylpyrocarbonate] -). A continuación, la mezcla, se incubó, a una temperatura de 70 °C, durante un transcurso de tiempo de 5 minutos y, a continuación, ésta se enfrió, en hielo, durante un transcurso de tiempo de 2 minutos. Subsiguientemente, se procedió a la adición de 0,5 µl 5 x tampón de reacción, 2 µl de mezcla de dTNP 10 (mM cada una) 0,5 µl de RiboLock™ y 20 pmol de SMART IIA (AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG), y se incubó, a una temperatura de 37 °C, durante un transcurso de tiempo de 5 minutos. Después de haber procedido a la adición de 200 U de transcriptasa inversa, del tipo “RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase”, se procedió a incubar la mezcla, a una temperatura de 42 °C, durante un transcurso de tiempo de 60 minutos. La terminación, se llevó a cabo, procediendo a calentar, a una temperatura de 70 °C, durante un transcurso de tiempo de 5 minutos.

20 Se procedió a llevar a cabo una síntesis de una segunda hebra de DNA, procediendo a mezclar 2,5 µl 10 x tampón síntesis de amplio rango, 2 µl de mezcla de dNTP (2,5 mM cada uno), 25 pmol de 5'PCR (AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT), 25 pmol de 3'PCR, 1 ml de DMSO, 1 U de mezcla de enzimas de PCR de amplio rango, 3 µl ss cDNA y ddH₂O hasta 5 µl. A continuación, la mezcla de reacción, se incubó, a una temperatura de 94 °C, durante un transcurso de tiempo de 5 minutos, seguido por 30 ciclos, a una temperatura de 94 °C, durante un transcurso de tiempo de 20 segundos, y a una temperatura de 68 °C, durante un transcurso de tiempo de 6 minutos y, la extensión final, se llevó a cabo, a una temperatura de 68 °C, durante un transcurso de tiempo de 20 minutos.

Las enzimas y reactivos, se compraron, en el mercado, de procedencia de la firma Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania. Los oligonucleótidos, se sintetizaron por la parte de la firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Alemania.

Captura de secuencias

35 Los cebadores degenerados, se dedujeron a partir de las secuencias de péptidos. Las PCRs, se llevaron a cabo procediendo a mezclar 2,5 µl 10 x tampón Taq del tipo “TrueStart™ Taq-buffer”, 2 µl de mezcla de dNTP (2,5 mM cada uno), 2 µl de 25 nM MgCl₂, 25 pmol de cebador avanzado, 25 pmol de cebador inverso, 0,8 µl de DMSO, 0,625 U de DNA polimerasa Taq, del tipo “TrueStart™ Taq DNA Polymerase”, 1 µl ds cDNA y ddH₂O, hasta 25 µl.

40 La toma de contacto de la PCR [2], se llevó a cabo procediendo a incubar la mezcla de reacción, a una temperatura de 95 °C, durante un transcurso de tiempo de 5 minutos, y a continuación, durante 12 ciclos, a una temperatura de 95 °C, durante un transcurso de tiempo de 30 segundos (72 °C – 1 °C / ciclo) durante un transcurso de tiempo de 60 segundos, y a una temperatura de 72 °C, durante un transcurso de tiempo de 90 segundos. Se procedió a llevar a cabo 25 ciclos adicionales, a una temperatura de reasociación de 60 °C. La extensión final, se llevó a cabo a una temperatura de 72 °C, durante un transcurso de tiempo de 20 minutos.

45 Se procedió a analizar las reacciones en cadena de la polimerasa (PCRs), mediante electroforesis en gel de agarosa (1 % de agarosa, (de la firma (Serva, Heidelberg, Alemania), preparada en tampón de TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético), 1 mM EDTA, pH 8). Para la detección del DNA, se procedió a añadir, a la solución, 0,05 % SYBRSafe™ (de procedencia de la firma Invitrogen), después de que ésta se enfriara a una temperatura de aprox. 50 °C.

50 La extracción del DNA, en geles de agarosa, se llevó a cabo mediante un equipo de ensayo, a modo de kit, del tipo NucleoSpin Extract II Kit (de procedencia de la firma Macherey-Nagel).

55 Los fragmentos de DNA, se ligaron en el vector TA de PCR, del “tipo pCR.1® TA-Vector” (de la firma Invitrogen), procediendo a mezclar 1 µl de vector, 1 µl 10 x tampón de T4 DNA ligasa, 5 U T4 DNA ligasa, 0,5 U T4 DNA ligasa, 0,5 µl de 5 mM ATP, y 6,5 µl de DNA inserto. A continuación, se procedió a incubar la mezcla de reacción, a una temperatura de 25 °C, durante un transcurso de tiempo de dos horas.

60 Para la transformación, se procedió a añadir 5 µl de la reacción de ligado, 50 µl de *E. coli* TOP10, químicamente competente (de procedencia de la firma Invitrogen), se procedió a su incubación, durante un transcurso de tiempo de 20 minutos, se sometió a un choque de calor, a una temperatura de 42 °C, durante un transcurso de tiempo de 45 segundos, y se transfirió, de nuevo, en hielo. A continuación, se procedió a añadir, inmediatamente, 500 µl de medio SOC (de procedencia de la firma Invitrogen). Las células, se agitaron, a una velocidad de 300 r. p. m. (revoluciones por minuto), a una temperatura de 37 °C, y durante un transcurso de tiempo de 50 minutos, y a continuación, éstas en emplazaron en una placa LB-agar, con un contenido de 50 µg / ml de ampicilina, y 20 µg / ml

de X-Gal (de procedencia de la firma Roth). Las placas inoculadas, se incubaron, a una temperatura de 37 °C, durante el transcurso de toda la noche.

5 La selección de clones positivos, se llevó a cabo mediante PCR de colonias. La mezcla de reacción, se componía, de la forma la cual se ha descrito anteriormente, arriba, si bien, no obstante, se utilizaron cebadores M13 uni (-21) (TGAAAACGACGGCCAGT) y M13 rev (-29) (CAGGAAACAGCTATGACC). Los moldes, se añadieron procediendo a resuspender material de colonias blancas, en la mezcla de reacción.

10 La mezcla de reacción, se incubó, a una temperatura de 95 °C, durante un transcurso de tiempo de 5 minutos, seguido de 40 ciclos, a una temperatura de 95 °C, durante un transcurso de tiempo de 30 segundos, a una temperatura de 55 °C, durante un transcurso de tiempo de 1 minuto, y a una temperatura de 72 °C, durante 1 minuto / kb. La extensión final, se realizó a una temperatura de 72 °C, durante un transcurso de tiempo de 20 minutos.

15 El DNA plásmido, se aisló, mediante el equipo de aislamiento de DNA plásmido, a modo de kit, del tipo "NucleoSpin Plasmid DNA Kit" (de procedencia de la firma Macherey-Nagel). La secuenciación, se llevó a cabo en un equipo del tipo "Eurofins MWG Operon" (de Ebersberg, Alemania).

20 Con objeto de completar la secuencia, se procedió a derivar cebadores específicos, a partir de fragmentos de DNA de asparaginasa identificados, y se aparearon con cebadores 5'PCR ó 3'PCR, respectivamente. Las PCRs, se llevaron a cabo de la forma la cual se ha descrito anteriormente, arriba, con una temperatura de reasociación de 55 °C, y una etapa de extensión o alargamiento, de un transcurso de tiempo de 1 minuto, a una temperatura de 72 °C.

25 La amplificación de la secuencia de asparaginasa completa, se llevó a cabo con los cebadores FvNase_5' (ATGAAATCTTTTGGCCCTCTTCG) y FvNase_3' (TCAAGCAAAGTGATGAAGG), a una temperatura de reasociación de 55 °C, y una etapa de extensión de un transcurso de tiempo de 1 minuto, a una temperatura de 72 °C.

30 Con objeto de verificar la secuencia, se procedió a preparar DNA genómico, a partir de micelio, mediante la utilización de un kit de purificación de DNA genómico, del tipo "Genomic DNA Purification Kit (de procedencia de la firma Fermentas). Se procedió a amplificar y a secuenciar la secuencia de la asparaginasa, completa.

Análisis del DNA y secuencia de aminoácidos

35 Se procedió a llevar a cabo la identificación de la secuencia de señal N-terminal, mediante el análisis con la Señal P 3.0 [3]. Se procedió así mismo, también, a investigar la homología de secuencias, mediante una búsqueda en la base de datos GenBank, mediante la utilización de la familia de programas BLAST [4].

Expresión de heterólogos en E. coli

40 Para la clonación de la asparaginasa, se procedió a amplificar el gen, a partir de un DNA plasmídico, mediante procedimiento de PCR (Replicación en cadena de la polimerasa – [PCR, de sus iniciales en idioma inglés, correspondientes a Polymerase Chain Reaction] -), sitios de restricción de flanqueo EcoRI y BamHI, mediante la utilización de los cebadores FvNase_EcoRI (ATAGAATTCATGAAATCTTTTGGCCCTCTTC) y FvNase_BamHI (ATAGGATCCTCAAGCAAAGTTCGATGAA). La cassette genética, se digirió y se ligó, en un vector de expresión pCTPS de X-Zyme, para proporcionar el constructor de expresión pCTP2-Aspa. Se procedió a cultivar las cepas de E. coli DH5alpha y JM105 transformadas con pCTP2-Aspa, en medio LB, a una temperatura de 37 °C, a un valor de AD_{600 nm}, de 0,7, inducido con 0,5 nM de IPTG, y se continuó cultivando, durante el transcurso de toda la noche. Las células, se resuspendieron en tampón Tris, a un valor pH de 7,5, éstas se lisaron mediante sonicación (tratamiento con ultrasonidos), y los residuos celulares, se retiraron mediante proceso de centrifugación. La purificación de la asparaginasa, se facilitó con sulfato amónico.

Asparaginasa recombinante procedente del Bacillus Subtilis

55 La secreción de proteínas, a partir de bacterias, se trata de un proceso ATP-dependiente, el cual involucra la translocación de una pre-proteína y la subsiguiente segmentación proteolítica de la pre-proteína en cuestión, sobre la superficie exterior de la membrana, al interior de la enzima madura. Una secuencia de señal, contiene la totalidad de la información necesaria para objetivizar, como diana, la proteína en cuestión, a la membrana, para la translocación.

60 Si bien la secreción, en el *Bacillus subtilis*, no se entiende tan bien, como la secreción en *E. coli*, se asume, no obstante, el hecho consistente en que, ésta, acontece mediante el mismo mecanismo (véase, a dicho efecto, el trabajo de Saier, M. H., Jr., Werner, P. K. y Muller, M. 1989, Microbiol. Rev 53: 333 -3 66; el trabajo de Overhoff, B., Klein, M., Spies, M. y Freudl, R., 1991, Mol. Gen. Genet. 228: 417 - 423). Una diferencia, entre los dos conjuntos de proteínas secretadas, es la consistente en la longitud de sus péptidos señal, la cual tiende a ser de hasta 20 aminoácidos más largos, en las gram-positivas, que la longitud correspondiente a sus contrapartes homólogas gram-negativas. Así, de este modo, la estrategia general, para la expresión de proteínas heterólogas, en organismos gram-positivos, tales como el consistente en el *Bacillus subtilis*, involucra el apareamiento de la proteína objetivizada

como diana, a una aparato secretor del huésped (véase, a dicho efecto, Mountain, A., 1989, Bacillus, C. Harwood, ed., Plenum Press, New York, 73 - 114). Los protocolos estándar, mediante la utilización de las técnicas las cuales se han descrito anteriormente, arriba, son técnicas conocidas en el arte de la técnica especializada, y éstas se utilizaron para las sobreexpresión de asparaginasa recombinante, mediante *Bacillus subtilis*.

Ejemplo 1 – Cultivo de *Flammulina velutipes*

La totalidad de los medios y del equipamiento, se sometieron a tratamiento de autoclave, previamente a su uso, y se aplicaron durante la totalidad del procedimiento. Se procedió a mantener el *Flammulina velutipes*, en placas de agar estándar (30,0 g L⁻¹ de glucosa monohidratada; 4,5 g L⁻¹ de asparagina monohidratada; 1,5 g de L⁻¹ KH₂PO₄; 0,5 g de L⁻¹ MgSO₄; 3,0 g L⁻¹ de extracto de levadura; 15,0 g L⁻¹ de agar agar; 1,0 ml L⁻¹ de una solución de trazas de metales (oligoelementos), la cual contenía 0,005 g L⁻¹ de CuSO₄ · 5H₂O, 0,08 g L⁻¹ de FeCl₃ · 6H₂O, 0,09 g L⁻¹ de ZnSO₄ · 7H₂O, 0,03 g L⁻¹ de MnSO₄ · H₂O y 0,4 g L⁻¹ de EDTA. El pH del medio, se ajustó a un valor de 1, con 1 M NaOH, previamente a la esterilización.

Se procedió a preparar los precultivos, mediante la homogeneización de un tampón de agar de 10 x 10 mm, más micelio de *Flammulina velutipes*, en 100 ml de una solución de una de nutrición, estándar, mediante la utilización de un instrumento del tipo Ultra Turrax (Micra D-9, Art, Mullheim, Alemania). Los cultivos sumergidos, se mantuvieron a una temperatura de 24 °C, y a 150 r. p. m. (revoluciones por minutos). Después de un cultivo, durante un transcurso de tiempo de 5 días, se procedió a transferir 50 ml de precultivo, al interior de 250 del medio de cultivo principal, consistente en medio mínimo (1,5 g L⁻¹ de KH₂PO₄; 0,5 g L⁻¹ de MgSO₄; 1,0 ml L⁻¹ de solución de elementos de trazas – oligoelementos) y 40 g L⁻¹ de gluten ó 10 mM de glutamina, respectivamente.

Ejemplo 2 – Preparación de las enzimas, a partir de *Flammulina velutipes*

Después de 18 días de cultivo, se procedió a filtrar el cultivo, y el sobrenadante que contenía la enzima extracelular (200 ml), se sometió a espumado inverso [1], siendo, la asparaginasa y otra proteína, las únicas proteínas restantes en el sobrenadante. Se procedió, a continuación, a concentrar el líquido restante, mediante la utilización de un proceso de autofiltración (MWCO – corte de peso molecular -10.000)(MWCO, de sus iniciales en idioma inglés, correspondientes a Molecular wigth cut – off), y ambas proteínas, se separaron, vía cromatografía de exclusión de tamaño, en una Superosa 6.

La mayor parte de la actividad hidrolítica originalmente presente, se recuperó, indicando ello el hecho consistente en que, este protocolo, proporcionaba un concentrado de enzimas de utilidad, únicamente mediante dos etapas.

Ejemplo 3 – Hidrólisis de la L-asparaginasa, mediante la utilización de una enzima nativa

Se procedió precalentar 100 µl de 10 mM asparagina, en un tampón 0,1 M de K₂HPO₄ / KH₂PO₄ (pH 7,0), a una temperatura de 37 °C, durante un transcurso de tiempo 5 minutos. La reacción, se inició mediante la adición de 50 µl de solución enzimática. Después de un tiempo de incubación de 20 minutos, a una temperatura de 37 °C, y de una velocidad angular correspondiente a 400 r. p. m. (revoluciones por minuto), en el agitador térmico, se procedió a parar el ensayo, mediante la adición de 20 µl de TCA (ácido trifluoroacético). A continuación, se procedió a llevar a cabo un experimento de control, sin substrato. Se procedió a medir, de una forma cuantitativa, los contenidos de ácido aspártico, mediante procedimiento de HPLC, después de una derivatización con OPA, y se utilizó la diferencia entre la muestra y el control, para calcular entonces la actividad de la enzima.

La evidencia analítica, indicaba una hidrólisis enzimática del substrato L-asparagina.

Ejemplo 4 – Hidrólisis de la L-glutamina, mediante la utilización de una enzima nativa

Se procedió precalentar 100 µl de 10 mM glutamina, en un tampón 0,1 M de K₂HPO₄ / KH₂PO₄ (pH 7,0), a una temperatura de 37 °C, durante un transcurso de tiempo 5 minutos. La reacción, se inició mediante la adición de 50 µl de solución enzimática. Después de un tiempo de incubación de 20 minutos, a una temperatura de 37 °C, y de una velocidad angular correspondiente a 400 r. p. m. (revoluciones por minuto), en el agitador térmico, se procedió a parar el ensayo, mediante la adición de 20 µl de TCA. A continuación, se procedió a llevar a cabo un experimento de control, sin substrato. Se procedió a medir, de una forma cuantitativa, los contenidos de ácido glutámico, mediante procedimiento de HPLC, después de una derivatización con OPA, y se utilizó la diferencia entre la muestra y el control, para calcular entonces la actividad de la enzima.

Esta evidencia analítica, indicaba una actividad secundaria de la asparaginasa, hacia el substrato L-glutamina.

Ejemplo 5 – Hidrólisis de la L-asparagina, mediante la utilización de una enzima recombinante

Se procedió precalentar 140 µl de 10 mM asparagina, en un tampón 0,1 M de K₂HPO₄ / KH₂PO₄ (pH 7,0), a una temperatura de 37 °C, durante un transcurso de tiempo 5 minutos. La reacción, se inició mediante la adición de 50 µl de solución de enzima recombinante, diluida, a un valor de 200 veces, con agua. Después de un tiempo de

5 incubación de 10 minutos, a una temperatura de 37 °C, y de una velocidad angular correspondiente a 400 r. p. m. (revoluciones por minuto), en un agitador térmico, se procedió a parar el ensayo, mediante calentamiento, a una temperatura de 95 °C, durante un transcurso de tiempo de 10 minutos. A continuación, se procedió a llevar a cabo un experimento de control, sin sustrato. Se procedió a medir, de una forma cuantitativa, los contenidos de ácido aspártico, mediante procedimiento de HPLC, después de una derivatización con OPA, y se utilizó la diferencia entre la muestra y el control, para calcular entonces la actividad de la enzima. La actividad de la enzima asparaginasa recombinante, hacia la asparaginasa, se calculó que era de 43,3 Ku L⁻¹.

10 Ejemplo 6 – Hidrólisis de la L-glutamina, mediante la utilización de una enzima recombinante

10 Se procedió precalentar 140 µl de 10 mM glutamina, en un tampón 0,1 M de K₂HPO₄ / KH₂PO₄ (pH 7,0), a una temperatura de 37 °C, durante un transcurso de tiempo 5 minutos. La reacción, se inició mediante la adición de 50 µl de solución de enzima recombinante, diluida, a un valor de 200 veces, con agua. Después de un tiempo de incubación de 10 minutos, a una temperatura de 37 °C, y de una velocidad angular correspondiente a 400 r. p. m. (revoluciones por minuto), en un agitador térmico, se procedió a parar el ensayo, mediante calentamiento, a una temperatura de 95 °C, durante un transcurso de tiempo de 10 minutos. A continuación, se procedió a llevar experimentos en blanco, sin sustrato. Se procedió a medir, de una forma cuantitativa, los contenidos de ácido glutámico, mediante procedimiento de HPLC, después de una derivatización con OPA, y se utilizó la diferencia entre la muestra y de los resultados del experimento en blanco, para calcular entonces la actividad de la enzima. La actividad de la enzima asparaginasa recombinante, hacia la glutamina, se calculó que era de 4,3 Ku L⁻¹.

25 Habiendo así procedido, de este modo, a la descripción de la presente invención, de una forma detallada, deberá entenderse el hecho consistente en que, la descripción detallada, no pretende limitar el ámbito de la invención, en cuanto a ésta. Lo que se desea, proteger, mediante la patente, se expone en las reivindicaciones las cuales se facilitan abajo, a continuación.

REIVINDICACIONES

1.- Una enzima asparaginasa, con la secuencia de aminoácidos:

5 MKSFALFVPL IVAAVNSAV VTFSTGLGCN SVSQTYRGNG NFCADPPGDW SSVGFSEIGG DNRVTVHNQN
SCTPASQVGQ GFGPACWNQG ATKLRSAWVA CPGQRLAENG TIVDDDGAFI DFA

2.- La enzima asparaginasa de la reivindicación 1, encontrándose en la forma de un sólido, de un líquido, o de una forma intermediaria, entre la de un sólido y un líquido.

10 3.- Una combinación de la enzima asparaginasa, de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, y un excipiente seleccionado de entre uno cualquiera de entre lactosa, glicerol, o albúmina.

15 4.- Un procedimiento para la hidrólisis de por lo menos una de entre la L-asparagina y la L-glutamina, procedimiento éste, el cual comprende:

- tratar un sustrato el cual comprende por lo menos una de entre la L-asparagina o la L-glutamina, con la enzima asparaginasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

20 5.- El procedimiento de la reivindicación 4, en donde, el sustrato el cual comprende por lo menos una de entre la L-asparagina o la L-glutamina, es por lo menos uno de entre un producto consumible para un humano, o un producto consumible para un animal.

25 6.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5, en donde, la sustancia, se selecciona de entre por lo menos uno de entre las consistentes en las bebidas, los granos de cacao, el queso, los granos de café, los productos de confitería o pastelería, los postres, las masas de pasta, los aderezos o condimentos, las patatas fritas, los brebajes, los productos cárnicos, los suplementos médicos, los suplementos nutritivos, los productos alimenticios para animales de compañía o domésticos, las patatas chips, las salsas, los tentempiés, o las sopas.

30 7.- Un procedimiento para reducir la formación de acrilamida, en un sustrato alimenticio, el cual comprende L-asparagina, procedimiento éste, el cual comprende:

- aplicar, a la sustancia alimenticia la cual comprende L-asparagina, la enzima asparaginasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y

35 - calentar la sustancia, la cual comprende la L-asparagina.

8.- El procedimiento de la reivindicación 7, en donde, el calentamiento, se lleva a cabo a una temperatura de por lo menos 120 °C.

40 9.- El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, en donde, la fuente de L-asparagina, es por lo menos una de entre un producto consumible para un humano, o un producto consumible para un animal.

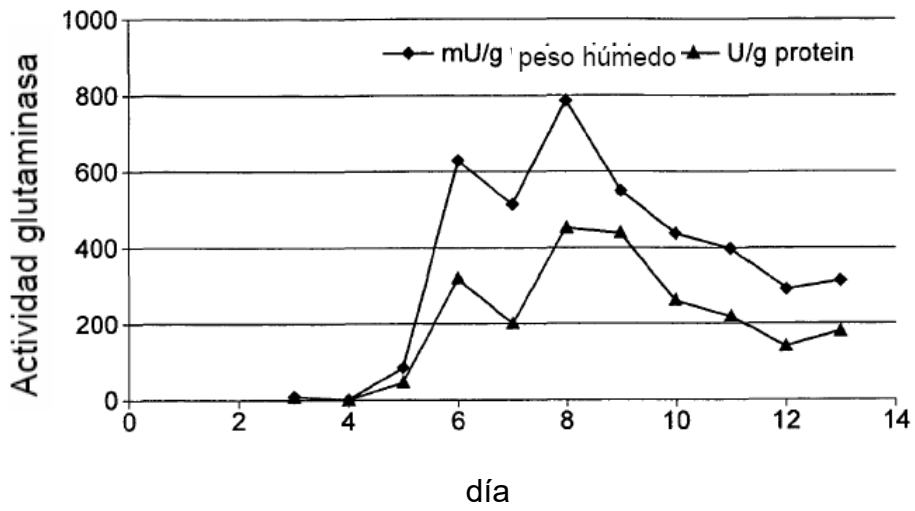


Fig. 1

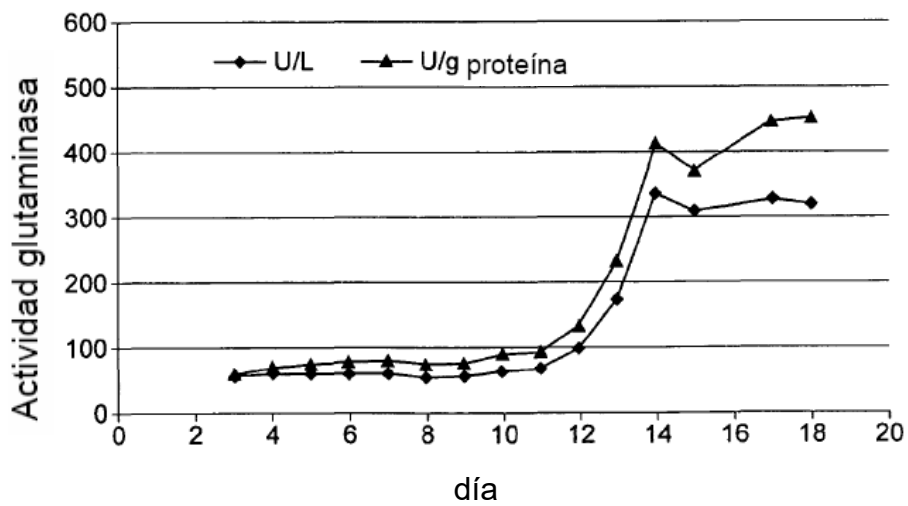


Fig. 2

A

```

1 atgaaatctt ttgccctctt cgtccctctc atcgttgctg ctgtcgtcaa
51 cagcgccgtg gtcacctttt ccaccggcct tggctgcaac tctgtctcgc
151 agacctaccg tggcaactgc aacttctgcg ctgaccacc cggcggtagg
101 tctacttcac attgatccct atagctcgat gctcatctca tctactagac
201 tggagctcag tcggcttttc tgagatcgga ggcgacaacc gcgtcacctg
251 tcataaccag aacagctgca cccccgcttc gcaggtcggc caaggctttg
301 gaccggcctg ctggaaccaa ggcgctacca agcttcgctc tgcttggggt
351 gcgtgccctg gacagaggty agtcggttct ctgcagcttc ttcttttggg
401 ttacgaacga tgccaactaga ctcgctgaga acggtaccat cgtcgacgac
451 gacggcgcct tcatcgactt tgcttga

```

B

```

1 atgaaatctt ttgccctctt cgtccctctc atcgttgctg ctgtcgtcaa
51 cagcgccgtg gtcacctttt ccaccggcct tggctgcaac tctgtctcgc
151 agacctaccg tggcaactgc aacttctgcg ctgaccacc cggcgactgg
101 agctcagtcg gcttttctga gatcggaggc gacaaccgcy tcaccgttca
201 taaccagaac agctgcaccc ccgcttcgca ggtcggccaa ggctttggac
251 cggcctgctg gaaccaaggc gctaccaagc ttcgcttctg ttgggttgcg
301 tgccttgac agagactcgc tgagaacggt accatcgtcg acgacgacgg
351 cgcttcatg gactttgctt ga

```

C

```

1 MKSFALFVPL IVAAVVNSAV VTFSTGLGCN SVSQTYRGNG NFCADPPGDW
51 SSVGFSEIGG DNRVTVHNQN SCTPASQVGQ GFGPACWNQG ATKLRSAWVA
101 CPGQRLAENG TIVDDDGAFI DFA

```

FIG. 3

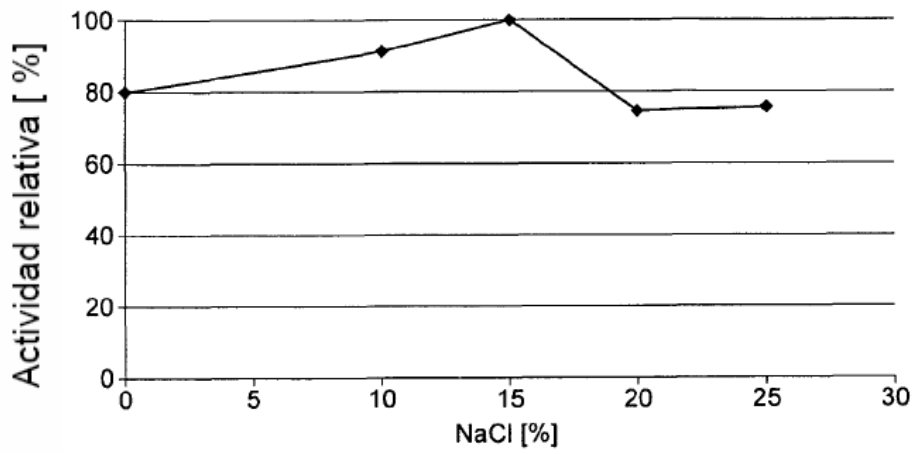


FIG. 4

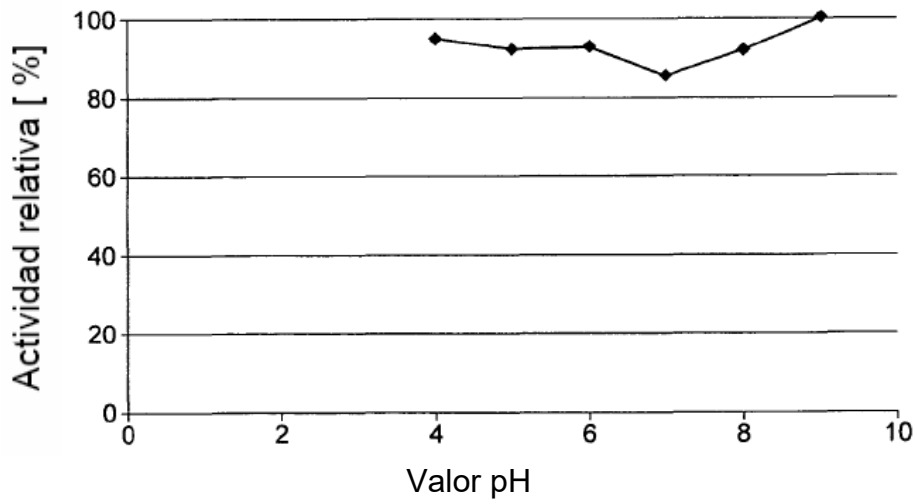


Fig. 5

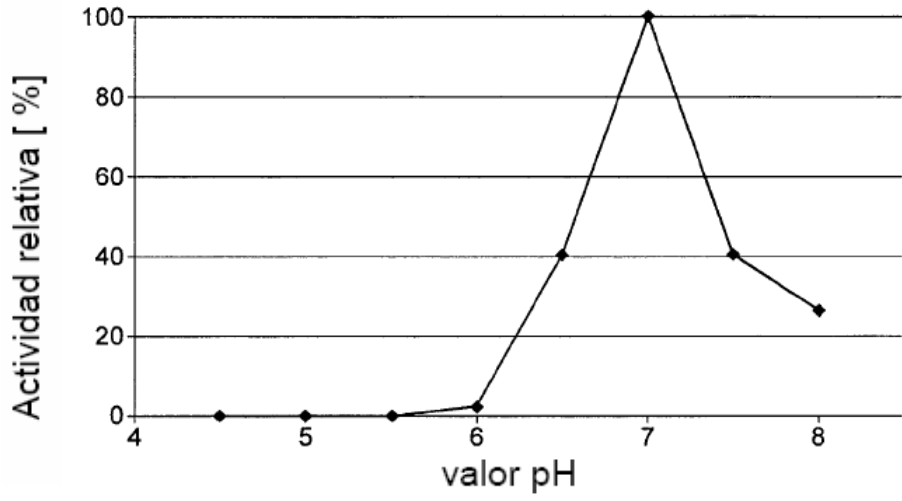


FIG. 6

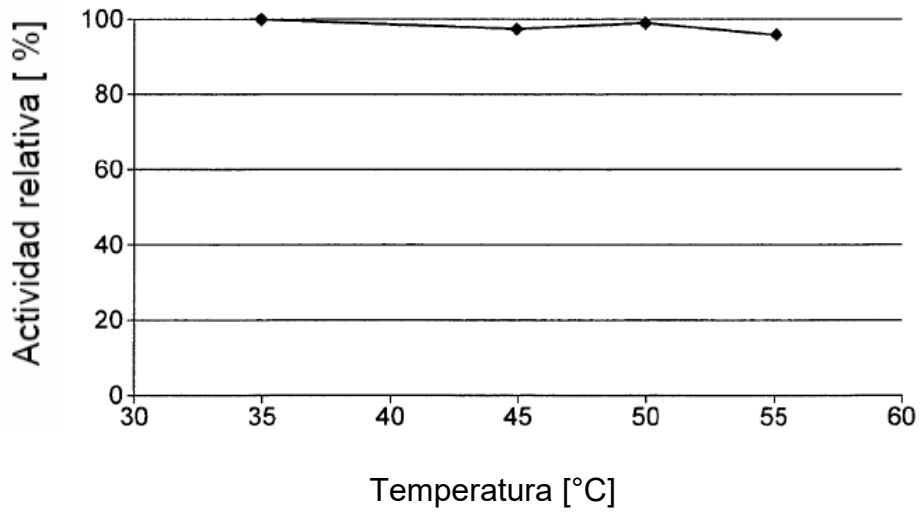


Fig. 7

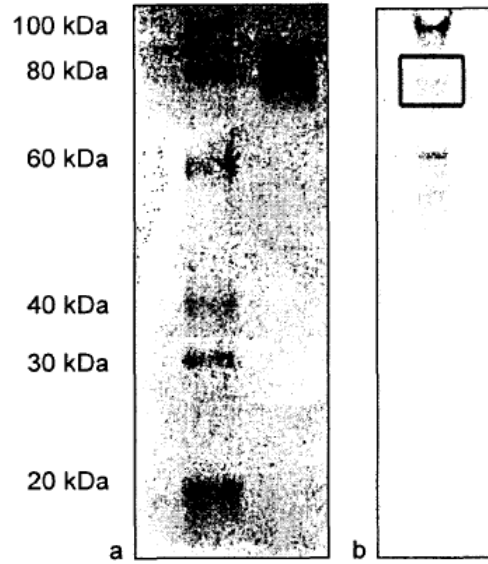


FIG. 8

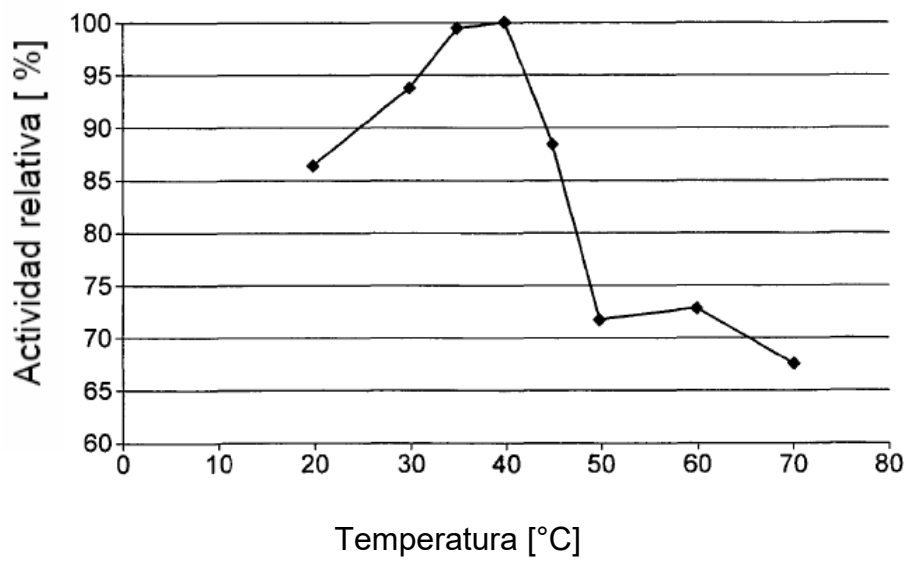


Fig. 9