

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 084**

51 Int. Cl.:

C12N 9/18 (2006.01)
C12N 9/20 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)
C12N 9/26 (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01)
C12N 9/82 (2006.01)
A21D 8/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2006 E 14168497 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017 EP 2767586**

54 Título: **Proceso novedoso para la reducción enzimática de acrilamida en productos alimenticios**

30 Prioridad:

31.05.2005 EP 05104683

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.08.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

DE BOER, LEX

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 628 084 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

Proceso novedoso para la reducción enzimática de acrilamida en productos alimenticios

La presente invención se refiere a una composición enzimática novedosa adecuada para su uso en un proceso de preparación de alimentos con el fin de reducir el contenido de acrilamida en productos alimenticios.

5 La composición enzimática novedosa es especialmente adecuada para su uso en la industria panadera.

Recientemente, se publicó la aparición de acrilamida en varios alimentos y alimentos preparados en horno (Tareke et al. Chem. Res. Toxicol. 13, 517-522 (2000)). Desde que la acrilamida se considera probablemente carcinogénica para animales y seres humanos, este hallazgo había producido preocupación mundial. Investigación adicional reveló que cantidades considerables de acrilamida son detectables en una variedad de alimentos comunes horneados, fritos y preparados en el horno y se demostró que la aparición de acrilamida en el alimento era el resultado del proceso de horneado.

El límite oficial en el RU para la contaminación por acrilamida en productos alimenticios está establecido a 10 ppb (10 microgramos por kilogramo) y los valores presentados anteriormente superaron con creces este valor para muchos productos, especialmente cereales, productos de pan y productos basados en patata o maíz.

15 Se ha propuesto una vía para la formación de acrilamida a partir de aminoácidos y azúcares reductores como resultado de la reacción de Maillard por Mottram et al. Nature 419:448 (2002). Según esta hipótesis, puede formarse acrilamida durante la reacción de Maillard. Durante el horneado y asado, la reacción de Maillard es principalmente responsable del color, olor y sabor. Una reacción asociada a la de Maillard es la degradación de Strecker de aminoácidos y se propuso una vía hacia la acrilamida. La formación de acrilamida llegó a ser detectable cuando la temperatura superó 120 °C, y la velocidad de formación más alta se observó a aproximadamente 170 °C. Cuando estaban presentes asparagina y glucosa, podrían observarse los niveles más altos de acrilamida, mientras que la glutamina y el ácido aspártico solo produjeron cantidades traza. El hecho de que la acrilamida se forme principalmente a partir de la asparagina (combinada con azúcares reductores) puede explicar los altos niveles de acrilamida en productos de planta cocinados en horno o asados. Se sabe que varios materiales de partida de planta contienen niveles sustanciales de asparagina. En las patatas, la asparagina es el aminoácido libre dominante (940 mg/kg, correspondiente al 40 % del contenido de aminoácido total) y en harina de trigo la asparaginasa está presente como un nivel de aproximadamente 167 mg/kg, correspondiente al 14 % del conjunto de aminoácidos libres totales (Belitz y Grosch en Food Chemistry - Springer New York, 1999). Por tanto, en interés de la salud pública, hay una necesidad urgente de productos alimenticios que tengan niveles sustancialmente más bajos de acrilamida o, preferentemente, carezcan de ella.

Se ha propuesto una variedad de soluciones para reducir el contenido de acrilamida, tanto alterando las variables de procesamiento, por ejemplo la temperatura o duración de la etapa de calentamiento, como previniendo químicamente o enzimáticamente la formación de la acrilamida o eliminando la acrilamida formada. La presente invención implica la disminución enzimática de la formación de acrilamida.

35 Las vías enzimáticas para reducir la formación de acrilamida son, entre otras, el uso de asparaginasa para reducir la cantidad de asparagina en el producto alimenticio, ya que la asparagina se considera un precursor importante para la acrilamida.

Sin embargo, para algunas aplicaciones el uso de asparaginasa sola no es suficiente para reducir el contenido de acrilamida del producto alimenticio al nivel deseado. Por tanto, es el objetivo de la presente invención proporcionar una composición enzimática que produzca una disminución mejorada de los niveles de acrilamida en el alimento preparado por el uso de la composición según la invención.

El objetivo de la presente invención se alcanza proporcionando una composición enzimática adecuada para reducir el contenido de acrilamida en productos alimenticios preparados con esta composición enzimática que comprende asparaginasa y al menos una enzima hidrolizante, en la que la enzima hidrolizante es una alfa-amilasa.

45 Sorprendentemente, se encontró que la adición de alfa-amilasa junto con asparaginasa produce un efecto sinérgico con respecto a reducir los niveles de acrilamida en el alimento preparado con esta composición enzimática.

El documento WO2004/037007 desvela un método de reducción de la acrilamida en granos de café tostados, granos de café tostados que tienen niveles reducidos de acrilamida y un artículo de comercio.

Una composición enzimática que comprende asparaginasa y una enzima capaz de oxidar los azúcares reductores se desvela en el documento WO 2004/032648, ya que está en línea con la enseñanza de que la acrilamida se forma mediante la reacción entre asparagina y azúcares reductores.

Sin embargo, la composición enzimática según la presente invención aumenta la cantidad de azúcares reductores, pero aún así alcanza una espectacular disminución en el nivel de acrilamida del producto alimenticio, incluso más bajo que cuando solo se hubiera añadido asparaginasa.

Puede usarse cualquier asparaginasa (EC 3.5.1.1) disponible en la presente invención. La asparaginasa (E.C. 3.5.1.1) adecuada puede obtenerse de diversas fuentes, tales como, por ejemplo, de plantas, animales y microorganismos. Ejemplos de microorganismos adecuados son especies de *Escherichia*, *Erwinia*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Aspergillus* y *Bacillus*. Ejemplos de asparaginasas adecuadas pueden encontrarse en los documentos WO03/083043 y WO2004/030468. Una asparaginasa preferida es la asparaginasa que tiene SEQ ID NO:3 o un equivalente funcional de la misma como se describe en el documento WO04/030468.

Cualquier enzima hidrolizante (EC 3.x.x.x) puede ser adecuada. Para las referencias de clasificación EC como las hechas en el presente documento se usaron la Nomenclatura Recomendada de Enzimas (1992) de la IUBMB publicada por Academic Press Inc. (ISBN 0-12-227165-3). X se usa en el presente documento para indicar un número entero.

Sin embargo, preferentemente se usan las enzimas hidrolizantes que pertenecen al grupo de las glucosidasas que hidrolizan compuestos de o-glucosilo (EC 3.2.1.x.).

Ejemplos de hidrolasas de éster carboxílico adecuadas son lipasas (EC 3.1.1.3), pectina esterasa (EC 3.1.1.11), galactolipasa EC 3.1.1.26), fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32), fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4), lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5).

Ejemplos de compuestos de o-glucosilo hidrolizantes adecuados preferidos son alfa-amilasa (EC 3.2.1.1), beta-amilasa (EC 3.2.1.2), pectinasa (EC 3.2.1.15), celulasa (EC 3.2.1.4), xilanasa (EC 3.2.1.32), arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55) y glucanasa (EC 3.2.1.6).

También pueden usarse mezclas de enzimas hidrolizantes en la composición según la invención, que incluyen mezclas de hidrolasas de éster carboxílico con compuestos de o-glucosilo hidrolizantes. El experto en la materia sabe cómo obtener las enzimas hidrolizantes adecuadas para su uso en la invención.

En la composición según la invención, la asparaginasa se combina con una alfa-amilasa. Esta composición es especialmente adecuada para la industria panadera y podría ser parte de una pre-mezcla.

En un segundo aspecto de la invención, la invención se refiere a un proceso novedoso de reducción del contenido de acrilamida en productos alimenticios. En una realización preferida, el producto alimenticio es un producto horneado. En otra realización preferida, el producto alimenticio es un producto frito en abundante aceite. En otra realización más preferida, el producto alimenticio es un producto asado o tostado, en particular una masa o pan asado o tostado.

El proceso para la producción de un producto alimenticio que implica al menos una etapa de calentamiento comprende añadir asparaginasa y al menos una enzima hidrolizante a una forma intermedia de dicho producto alimenticio en dicho proceso de producción, por el cual la asparaginasa y al menos una enzima hidrolizante se añaden antes de dicha etapa de calentamiento en una cantidad que es eficaz en reducir el nivel de acrilamida del producto alimenticio en comparación con un producto alimenticio al que no se añadieron asparaginasa y enzima hidrolizante.

La asparaginasa y al menos una enzima hidrolizante pueden añadirse por separado o en una composición, preferentemente en una composición según la invención. Preferentemente, la composición se añade al proceso de producción de alimentos en una cantidad tal que el contenido de acrilamida del producto alimenticio producido en presencia de la composición enzimática según la invención disminuya con respecto a un producto alimenticio producido sin ninguno de los componentes en la composición según la invención.

Más preferentemente, la composición se añade al proceso de producción de alimentos en una cantidad tal que el contenido de acrilamida del producto alimenticio producido en presencia de la enzima se reduzca al menos el 10 %, 15 %, 20 %, 25 % o el 30 %, preferentemente al menos el 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 % o el 70 %, más preferentemente al menos el 80 %, 85 % o el 90 %, lo más preferentemente al menos el 95 %, 97 %, 98 % o el 99 % en comparación con el alimento producido en presencia de asparaginasa y en ausencia de la enzima hidrolizante. Para la asparaginasa y las enzimas hidrolizantes que van a usarse en el método según la invención, deben considerarse las mismas preferencias que se han descrito anteriormente.

Una forma intermedia del producto alimenticio se define en el presente documento como cualquier forma que se produzca durante el proceso de producción antes de obtener la forma final del producto alimenticio, esto incluye partes de plantas, pero también una rebanada o un corte de una parte de una planta. La forma intermedia puede comprender los materiales de partida individuales usados y/o procesados a partir de los mismos. Por solo dar dos ejemplos, para el producto alimenticio pan, las formas intermedias pueden comprender trigo, harina de trigo, la mezcla inicial de los mismos con otros componentes de pan tales como, por ejemplo agua, sal, levadura y composiciones que mejoran el pan, la masa mezclada, la masa amasada, la masa congelada, la masa fermentada y la masa parcialmente horneada. Para el producto alimenticio patatas fritas moldeadas, las formas intermedias pueden comprender patata cocida, puré de patata, puré de patata seco y masa de patata.

El producto alimenticio puede prepararse a partir de al menos un material de partida que es de origen vegetal, por ejemplo, patata, tabaco, café, cacao, arroz, cereal, fruta. Ejemplos de cereales son trigo, centeno, grano, maíz,

cebada, grañones, trigo sarraceno y avena. Se pretende que el trigo englobe aquí y en lo sucesivo todas las especies conocidas del género *Triticum*, por ejemplo *aestivum*, *durum* y/o *spelta*. Productos alimenticios preparados a partir de más de un material de partida también están incluidos en el alcance de la presente invención, por ejemplo productos alimenticios que comprenden tanto trigo (harina) como patata.

- 5 Ejemplos de productos alimenticios en los que el proceso según la invención puede ser adecuado son cualquier producto basado en harina - por ejemplo, pan, hojaldre, pastel, bretzels, bagels, pastel de miel holandés, galletas, pan de jengibre, pastel de jengibre y biscote -, y cualquier producto basado en patata - por ejemplo, patatas fritas, patatas fritas de bolsa, buñuelos de patata - y cualquier producto basado en maíz - por ejemplo pan de maíz, frituras de maíz y copos de maíz.
- 10 Un proceso de producción preferido es el horneado de pan y otros productos horneados de harina de trigo y/o harinas de otro origen de cereal. Otro proceso de producción preferido es freír con abundante aceite patatas fritas a partir de rebanadas de patata. Todavía otro proceso de producción preferido es freír con abundante aceite frituras de maíz de masa basada en maíz extruida.
- 15 Etapas de calentamiento preferidas son aquellas en las que al menos una parte del producto alimenticio intermedio, por ejemplo la superficie del producto alimenticio, se expone a temperaturas a las que se promueve la formación de acrilamida, por ejemplo 110 °C o más alta, 120 °C o más alta. La etapa de calentamiento en el proceso según la invención puede llevarse a cabo en hornos, por ejemplo a una temperatura entre 180-220 °C, tal como para el horneado de pan y otros productos de panadería, o en aceite tal como el freír patatas fritas de bolsa, por ejemplo a 160-190 °C.
- 20 La invención se ilustra después por los siguientes ejemplos no limitantes.

Breve descripción de las figuras

Figura 1 El efecto de 50 ppm de asparaginasa en varias combinaciones de enzima sobre los niveles de acrilamida en cortezas de mini-torpedos preparados con sales leudantes (en %). El nivel de acrilamida de la combinación de enzimas sin asparaginasa se estableció al 100 %.

- 25 **Figura 2** El efecto de 50 ppm de asparaginasa de *A. niger* en varias combinaciones de enzima sobre los niveles de acrilamida en cortezas de mini-torpedos preparados con harina marrón Mogul Brand Chapatti y levadura de panadero. El nivel de acrilamida de la combinación de enzima sin asparaginasa se estableció al 100 %.

Figura 3 El efecto de asparaginasa de *A. niger* en varias combinaciones de enzima sobre los niveles de acrilamida en cortezas de mini-torpedos preparados con harina kolibri y levadura de panadero. El nivel de acrilamida del pan con asparaginasa como la única enzima de panificación se estableció al 100 %.

30

Materiales

Tabla 1. Enzimas de panificación usadas en los ejemplos

Enzima de panificación	Actividad enzimática	Proveedor
Bakezyme P500	Alfa-amilasa	DSM Food Specialties
Bakezyme HSP6000	Xilanasa	DSM Food Specialties
Bakezyme W	Glucanasa/celulasa	DSM Food Specialties
Bakezyme XE	Celulasa	DSM Food Specialties
Bakezyme A	Alfa-L-arabinofuranósido arabinofuranohidrolasa/ arabinofuranosidasa A	DSM Food Specialties
Lipopan F	Galactolipasa/ fosfolipasa A1 / fosfolipasa A2/ lisofosfolipasa/lipasa	Novozymes A/S

Ejemplo 1

- 35 **Medición de acrilamida**

Pretratamiento de muestras

Se extraen 600 mg de muestra secada y homogeneizada usando 5 ml de agua milliQ. Se añade 1 µg de patrón interno ¹³C₃ acrilamida en disolución (CIL) al extracto. Después de 10 minutos de centrifugación (6000 rpm), se

llevan 3 ml de la capa superior a una columna Extreluut-3BT (Merck). Usando 15 ml de acetato de etilo, se eluye acrilamida de la columna. Se evapora el acetato de etilo bajo una corriente de nitrógeno suave hasta aproximadamente 0,5 ml.

Condiciones cromatográficas

- 5 La disolución de acetato de etilo se analiza usando cromatografía de gases. La separación se obtiene usando una columna CP-Wax 57 (Varian) (longitud 25 m, diámetro interno 0,32 mm, película 1,2 µm) y helio como gas portador con un flujo constante de 5,4 ml/min. Se realiza inyección sin división de 3 µl. La temperatura del horno se mantiene a 50 °C durante 1 minuto, después de lo cual la temperatura se aumenta con 30 °C/min hacia 220 °C. Después de 12 minutos de temperatura constante de 220 °C, el horno se enfría y se estabiliza antes de la siguiente inyección.
- 10 La detección se realiza usando espectrometría de masas con ionización química en línea en modo de ión positivo, usando metano como gas de ionización. Se monitorizan los iones característicos m/z 72 (acrilamida) y m/z 75 (¹³C₃ acrilamida) para la cuantificación.

Equipo usado

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

Las cantidades en ppm o ppb se basan en la cantidad de harina, a menos que se establezca de otro modo.

15 **Ejemplo 2**

Efectos de las enzimas de panificación y asparaginasa de *Aspergillus niger* sobre la formación de acrilamida en panes mini-torpedo preparados con sales leudantes

Se hizo la preparación de mini-torpedos con sales leudantes mezclando 200 g de harina de trigo integral (harina marrón Mogul Brand Chapatti, Mogul Lasu B.V. La Haya, Holanda), 4 g de sal, 68 ppm de ácido ascórbico, 2 g de DKS (NaHCO₃) (Chem Proha, Chemiepartners B.V. Dordrecht, Holanda), 2,7 g de Sap 40 (pirofosfato ácido de sodio, E450) (Chemische Fabrik Budenheim KG, Budenheim, Alemania) 1 g de SSL (estearoil-lactilato de sodio) (Danisco, Dinamarca) 1 g de GMS (monoestearato de glicerilo, (Admul), Quest, Naarden, Holanda). Las cantidades de enzimas de panificación que van a probarse se indican en la Tabla 1 (Lipopan F y Novamyl son obtenibles de Novo, las otras enzimas son obtenibles de DSM-Gist). Se añadieron 226 ml de agua. La mezcla tuvo lugar en una mezcladora de varilla durante 8 minutos y 45 segundos. La temperatura de la masa fue 27 °C. Directamente después de la mezcla, la masa se divide en dos trozos de 150 g, se redondea y se fermenta durante 25 minutos en un armario de fermentación a 32 °C. A partir de aquí se formaron trozos de masa y se realizó una fermentación final a 32 °C durante 100 minutos. Los trozos de masa se hornearon durante 20 minutos a 225 °C. La acrilamida en la corteza se determinó como se describe en el Ejemplo 1. El porcentaje de acrilamida que quedó en los panes tratados con asparaginasa se calculó del siguiente modo:

$$\frac{\text{contenido de acrilamida (combinación de enzima de panificación X más asparaginasa)}}{\text{contenido de acrilamida (combinación de enzima de panificación X sin asparaginasa)}} \times 100 \%$$

y se muestra en la Tabla 2 y la Figura 1 para varias combinaciones de enzima. Por ejemplo, el porcentaje de acrilamida que queda en el pan tratado con Bakezyme P500 y asparaginasa se calculó dividiendo los resultados de la prueba N.º 4 entre los resultados de la prueba N.º 3 y multiplicando esto por 100 %.

35 *Tabla 2. Acrilamida en cortezas de panes mini-torpedo preparados con sales leudantes y varias enzimas de panificación como se indica en el ejemplo y el efecto de la asparaginasa de *Aspergillus niger* sobre los niveles de acrilamida.*

Prueba N.º	Enzima de panificación	Dosificación (ppm)	Contenido de acrilamida (ppb)	% de acrilamida restante
1	Ninguna		185	100
2	Asparaginasa	50	30	16
3	Bakezyme P500	150	143	100
4	Bakezyme P500 Asparaginasa	150 50	17	12
5	Bakezyme HSP6000	200	234	100

ES 2 628 084 T3

Prueba N.º	Enzima de panificación	Dosificación (ppm)	Contenido de acrilamida (ppb)	% de acrilamida restante
6	Bakezyme HSP6000	200	21	9
	Asparaginasa	50		
7	Lipopan F	50	250	100
	Bakezyme A10000	30		
8	Lipopan F	50	13	5
	Bakezyme A10000	30		
	Asparaginasa	50		
9	Bakezyme P500	150	279	100
	Bakezyme HSP6000	200		
	Lipopan F	50		
	Bakezyme A10000	30		
10	Bakezyme P500	150	25	9
	Bakezyme HSP6000	200		
	Lipopan F	50		
	Bakezyme A10000	30		
	Asparaginasa	50		
11	Bakezyme W	50	263	100
12	Bakezyme W	50	19	7
	Asparaginasa	50		
13	Bakezyme XE	50	228	100
14	Bakezyme XE	50	17	7
	Asparaginasa	50		
15	Bakezyme P500	150	464	100
	Bakezyme HSP6000	200		
	Bakezyme W	50		
	Lipopan F	50		
	Bakezyme A10000	30		
	Bakezyme XE	50		

Prueba N.º	Enzima de panificación	Dosificación (ppm)	Contenido de acrilamida (ppb)	% de acrilamida restante
16	Bakezyme P500	150	18	4
	Bakezyme HSP6000	200		
	Bakezyme W	50		
	Lipopan F	50		
	Bakezyme A10000	30		
	Bakezyme XE	50		
	Asparaginasa	50		

De la Tabla 2 y la Figura 1 puede llegarse a la conclusión de que la adición de las enzimas de panificación Bakezyme® HSP6000, Lipopan® F, Bakezyme® A10000, Bakezyme® W, Bakezyme® XE y combinaciones de las mismas producirá un elevado nivel de acrilamida en la corteza en comparación con un pan de referencia sin enzimas de panificación. La adición de una cantidad apropiada de asparaginasa a la masa producirá, sin embargo, un nivel de acrilamida reducido en comparación con la referencia correspondiente sin asparaginasa e incluso más bajo que una referencia en la que no se usaron enzimas de panificación.

Ejemplo 3

Efectos de enzimas de panificación y asparaginasa de *A. niger* sobre la formación de acrilamida en los panes mini-torpedos preparados con levadura de panificación y harina de trigo integral

Se hizo la preparación de panes mini-torpedo en un proceso de horneado estándar mezclando 200 g de harina de trigo integral (harina marrón Brand Chapatti), 4,6 g de levadura Koningsgist®, 4 g de sal, 68 ppm de ácido ascórbico y varias enzimas y combinaciones de enzima como se indica en la Tabla 2. Se añadieron 132 g de agua y la mezcla se realizó en una mezcladora de varilla durante 8 minutos y 45 segundos. La temperatura de la masa fue 27 °C. Directamente después de la mezcla, la masa se dividió en dos trozos de 150 g, se redondeó y se fermentó durante 25 minutos en un armario de fermentación a 32 °C. A partir de aquí se formaron trozos de masa y se realizó una fermentación final de 100 minutos a 32 °C, los trozos de masa se hornearon durante 20 minutos a 225 °C. La acrilamida en la corteza se determinó como se describe en el Ejemplo 1. El porcentaje de acrilamida que quedó en los panes tratados con asparaginasa se calculó como se indica en el Ejemplo 2.

En la Tabla 3 y la Figura 2 se muestran los efectos de la asparaginasa en varias combinaciones de enzima.

*Tabla 3. Acrilamida en cortezas de panes mini-torpedo preparados con harina de trigo integral, levadura y varias enzimas de panificación y el efecto de la asparaginasa de *Aspergillus niger* sobre los niveles de acrilamida.*

Prueba N.º	Enzima de panificación	Dosificación (ppm)	Contenido de acrilamida (ppb)	% de acrilamida restante
1	Ninguna		78	100
2	Asparaginasa	50	70	90
3	Bakezyme P500	15	73	100
4	Bakezyme P500	15	65	89
	Asparaginasa	50		
5	Bakezyme P500	150	94	100
6	Bakezyme P500	150	49	52
	Asparaginasa	50		
7	Bakezyme HSP6000	50	77	100

Prueba N.º	Enzima de panificación	Dosificación (ppm)	Contenido de acrilamida (ppb)	% de acrilamida restante
8	Bakezyme HSP6000	50	67	87
	Asparaginasa	50		
9	Bakezyme HSP6000	200	70	100
10	Bakezyme HSP6000	200	60	86
	Asparaginasa	50		
11	Lipopan F	50	159	100
	Bakezyme A10000	30		
12	Lipopan F	50	74	47
	Bakezyme A10000	50		
	Asparaginasa	50		
13	Bakezyme XE	50	80	100
14	Bakezyme XE	50	68	85
	Asparaginasa	50		
15	Bakezyme P500	150	257	100
	Bakezyme HSP6000	200		
	Bakezyme A10000	30		
	Lipopan F	50		
16	Bakezyme P500	150	100	39
	Bakezyme HSP6000	200		
	Bakezyme A10000	30		
	Lipopan F	50		
	Asparaginasa	50		
17	Bakezyme W	50	90	100
18	Bakezyme W	50	71	79
	Asparaginasa	50		

En la Figura 2 se presentan los efectos de la asparaginasa de *A. niger* en presencia de (combinaciones de) enzimas. En comparación con el nivel de acrilamida en la corteza de panes preparados con la enzima o combinación de enzima mencionada, los niveles relativos y en algunos casos incluso los absolutos de acrilamida son más bajos cuando se usa asparaginasa en presencia de (combinaciones de) enzimas.

5

De la Tabla 3 y la Figura 2 puede llegarse a la conclusión de que la adición de las enzimas de panificación Bakezyme P500, Bakezyme A10000, Bakezyme HSP6000, Lipopan F, Bakezyme W, Bakezyme XE y combinaciones de las mismas producirá un elevado nivel de acrilamida en la corteza en comparación con un pan de referencia indiferente si se prepara con la sal leudante NaHCO₃ o levadura. La adición de una cantidad apropiada de asparaginasa a la masa producirá, sin embargo, una reducción del nivel de acrilamida en comparación con la referencia correspondiente sin asparaginasa y en algunos casos incluso más baja que una referencia en la que no se usaron enzimas de panificación, pero donde estaba presente asparaginasa.

10

Ejemplo 4

Efectos de las enzimas de panificación y asparaginasa de *A. niger* sobre la formación de acrilamida en los panes mini-torpedo preparados con levadura de panificación y harina kolibri

Se hizo la preparación de panes mini-torpedo en un proceso de horneado estándar mezclando 200 g de harina kolibri (Meneba), 4,6 g de levadura Koningsgist®, 4 g de sal, 68 ppm de ácido ascórbico y varias enzimas y combinaciones de enzima como se indica en la Tabla 2. Se añadieron 114 g de agua y la mezcla se realizó en una mezcladora de varilla durante 6 minutos y 15 segundos. La temperatura de la masa fue 27 °C. Directamente después de mezclar la masa, se dividió en dos trozos de 150 g, se redondeó y se fermentó durante 25 minutos en un armario de fermentación a 32 °C. A partir de aquí se formaron trozos de masa y se realizó una fermentación final de 100 minutos a 32 °C, los trozos de masa se hornearon durante 20 minutos a 225 °C. La acrilamida en la corteza se determinó como se describe en el Ejemplo 1. El porcentaje de acrilamida que quedó en los panes tratados con asparaginasa se calculó como se indica en el Ejemplo 2.

En la Tabla 4 y la Figura 3 se muestran los efectos de la asparaginasa en varias combinaciones de enzima.

Tabla 4. Acrilamida en cortezas de panes mini-torpedo preparados con harina kolibri con levadura y varias enzimas de panificación y el efecto de la asparaginasa de *Aspergillus niger* sobre los niveles de acrilamida.

Prueba N.º	Enzima de panificación	Dosificación (ppm)	Contenido de acrilamida (ppb)	% de acrilamida restante
1	Ninguna		50	100
2	Asparaginasa	50	42	84
3	Bakezyme GOX 10,000	1	40	100
4	Bakezyme GOX 10,000 Asparaginasa	1 50	37	93
5	Pectinex*	5	41	100
6	Pectinex Asparaginasa	5 50	34	83
7	Bakezyme MA 10,000	100	48	100
8	Bakezyme MA 10,000 Asparaginasa	100 50	32	67
9	Bakezyme BXP501	3	43	100
10	Bakezyme BXP501 Asparaginasa	3 50	39	91

*: Pectinex se obtiene de NOVO.

En la Figura 3 se presentan los efectos de la asparaginasa de *A. niger* en presencia de (combinaciones de) enzimas. En comparación con el nivel de acrilamida en la corteza de panes preparados con la enzima o combinación de enzima mencionada, los niveles absolutos de acrilamida son más bajos cuando se usa asparaginasa en presencia de (combinaciones de) enzimas. En algunos casos, la cantidad relativa de acrilamida que queda es más alta como resultado del contenido más bajo de acrilamida en ausencia de la enzima asparaginasa. El nivel absoluto de acrilamida en presencia de la combinación de enzima más asparaginasa es, sin embargo, más bajo que la referencia.

De la Tabla 4 y la Figura 3 puede llegarse a la conclusión de que la adición de las enzimas de panificación Bakezyme GOX 10,000, Bakezyme MA 10,000, Bakezyme BXP501 y Pectinex a una masa basada en harina kolibri producirá un nivel más bajo de acrilamida en la corteza cuando la enzima o combinación de enzima se combinen con una cantidad apropiada de asparaginasa, en comparación con un pan de referencia con asparaginasa como la única enzima de panificación.

REIVINDICACIONES

1. Composición enzimática adecuada para reducir el contenido de acrilamida en productos alimenticios preparados con esta composición enzimática que comprende:
 - a. asparaginasa y;
 - 5 b. al menos una enzima hidrolizante, en la que la enzima hidrolizante es una alfa-amilasa.
2. Uso de una composición según la reivindicación 1 en la producción de un producto alimenticio para reducir los niveles de acrilamida en el producto alimenticio.
3. Uso según la reivindicación 2, en el que el producto alimenticio es un producto alimenticio basado en harina, basado en maíz o basado en patata.
- 10 4. Uso según la reivindicación 2 o 3, en el que el uso es en la industria panadera.
5. Método para la producción de un producto alimenticio que implica al menos una etapa de calentamiento, que comprende añadir:
 - a. asparaginasa; y
 - b. al menos una enzima hidrolizante, en el que la enzima hidrolizante es una alfa-amilasa
- 15 a una forma intermedia de dicho producto alimenticio en dicho proceso de producción por el cual la asparaginasa y la al menos una enzima hidrolizante se añaden antes de dicha etapa de calentamiento en una cantidad que es eficaz en reducir el nivel de acrilamida del producto alimenticio en comparación con un producto alimenticio al que no se añadieron asparaginasa y enzima hidrolizante.
- 20 6. Método según la reivindicación 5, en el que la asparaginasa y la al menos una enzima hidrolizante se añaden por separado.
7. Método según la reivindicación 5, por el cual los componentes a. y b. se añaden en una única composición, preferentemente una según la reivindicación 1.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que el producto alimenticio es un producto alimenticio basado en harina, basado en maíz o basado en patata.
- 25 9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, por el cual el producto alimenticio es un producto horneado.
10. Método según la reivindicación 9, en el que el producto horneado es un producto horneado de harina de trigo y/o harinas de otro origen de cereal.
- 30 11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, por el cual el producto alimenticio es un producto frito con abundante aceite, tostado o asado.
12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, en el que dicha forma intermedia de dicho producto alimenticio es una masa.
13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, en el que dicho producto alimenticio está hecho de al menos un material de partida que es de origen vegetal.
- 35 14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13, en el que el producto alimenticio es pan, hojaldre, pastel, bretzels, bagels, pastel de miel holandés, galletas, pan de jengibre, pastel de jengibre, biscote, patatas fritas, patatas fritas de bolsa, buñuelos de patata, pan de maíz, frituras de maíz o copos de maíz.
- 40 15. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 14, en el que la etapa de calentamiento es una etapa en la que al menos una parte de la forma intermedia de dicho producto alimenticio se expone a temperaturas de 110 °C o más altas.

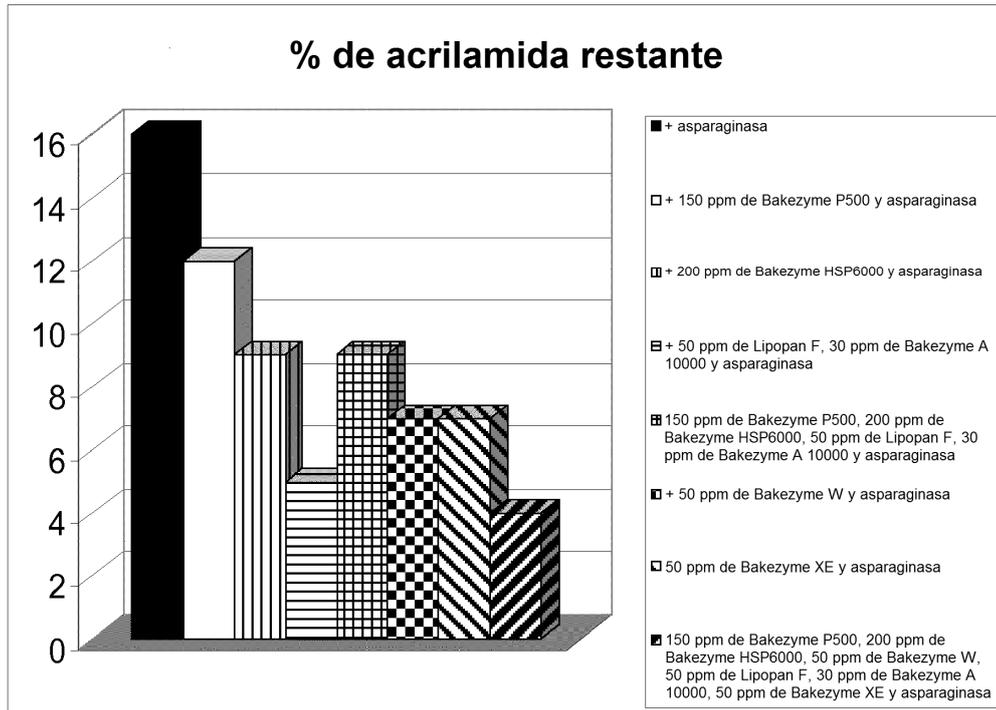


Fig. 1

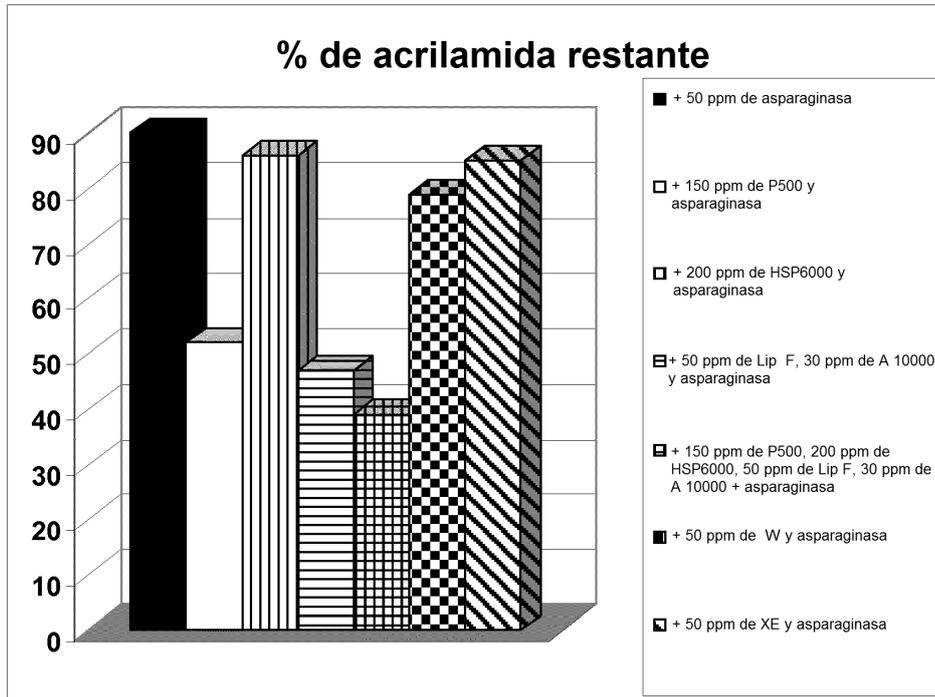


Fig. 2

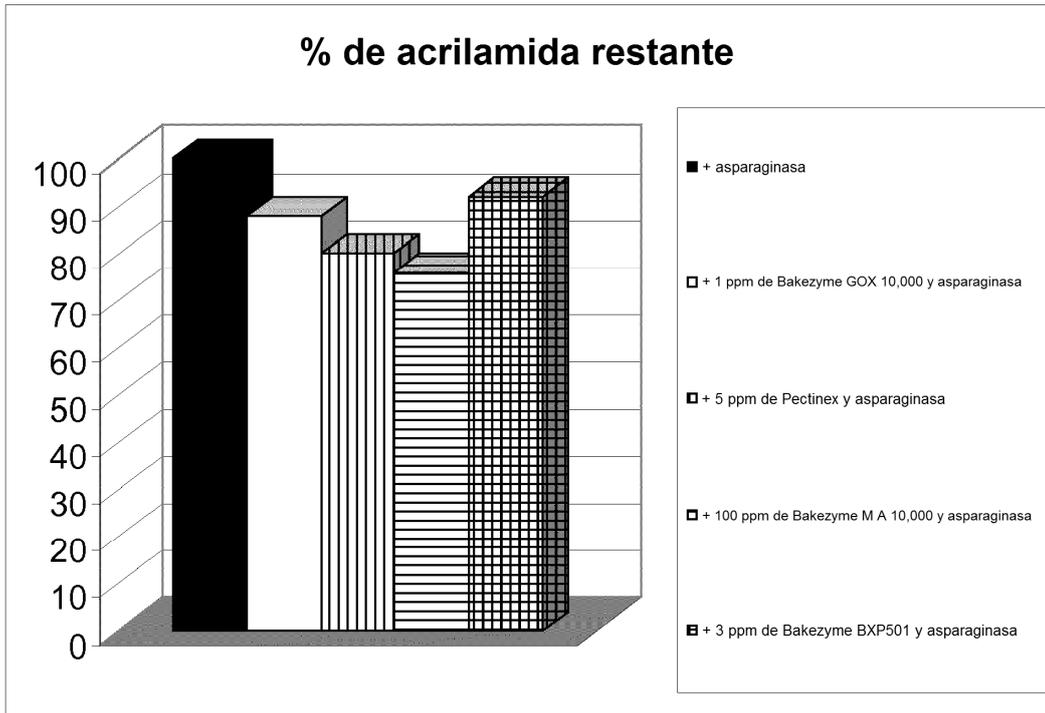


Fig. 3