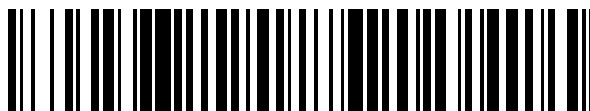


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 102**

51 Int. Cl.:

C12N 9/24 (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 15175933 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 2949748**

54 Título: **Novedoso proceso para la reducción de acrilamida enzimática en productos alimenticios**

30 Prioridad:

31.05.2005 EP 05104683

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

22.10.2019

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 2 728 102 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

Novedoso proceso para la reducción de acrilamida enzimática en productos alimenticios

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

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

Recientemente, se ha publicado la aparición de acrilamida en una cantidad de alimentos y alimentos preparados al horno (Tareke *et al.* Chem. Res. Toxicol. 13, 517-522 (2000)). Puesto que la acrilamida se considera como probablemente carcinógena para animales y seres humanos, este hallazgo ha derivado, como resultado, en una preocupación global. Otras investigaciones han revelado que, son detectables cantidades considerables de acrilamida en una variedad de alimentos comunes preparados cocidos, fritos y horneados y se ha demostrado que la aparición de acrilamida en alimentos ha sido el resultado del proceso de horneado.

El límite oficial en el Reino Unido de contaminación de acrilamida en productos alimenticios se establece a 10 ppb (10 microgramos por kilogramo) y los valores presentados anteriormente superan ampliamente este valor para un lote de productos, en especial, cereales, productos de pan y productos a base de 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 en Mottram *et al.* Nature 419:448 (2002). De acuerdo con esta hipótesis, la acrilamida se puede formar durante la reacción de Maillard. Durante el horneado y tostado, la reacción de Maillard es la principal responsable del color, aroma y sabor. Una reacción asociada con la de Maillard es la degradación de Strecker de aminoácidos y se ha propuesto una vía a la acrilamida. La formación de acrilamida se ha vuelto detectable cuando la temperatura superaba los 120 °C y la tasa de formación más alta se observó a aproximadamente 170 °C. Cuando hay presente asparagina y glucosa, se pudieron observar los niveles más altos de acrilamida, mientras que la glutamina y el ácido aspártico solo dieron como resultado cantidades ínfimas. El hecho de que la acrilamida se forma principalmente de la asparagina (combinada con azúcares reductores) puede explicar los altos niveles de acrilamida en productos vegetales cocinados al horno o tostados. Varias materias primas vegetales son conocidas por contener niveles sustanciales de asparagina. En las patatas, la asparagina es el aminoácido libre dominante (940 mg/kg), correspondiéndose con un 40 % del contenido de aminoácidos total) y en harina de trigo, la asparaginasa está presente a un nivel de aproximadamente 167 mg/kg, correspondiéndose con un 14 % de la agrupación de aminoácidos libres total (Belitz and Grosch in Food Chemistry - Springer New York, 1999). Por lo tanto, en el interés de la salud pública, existe una necesidad urgente de productos alimenticios que tengan niveles sustancialmente inferiores de acrilamida o, preferentemente, estén desprovistos de ella.

Se ha propuesto una variedad de soluciones para disminuir el contenido de acrilamida, bien alterando las variables de procesamiento, por ejemplo, temperatura o duración de la etapa de calentamiento o bien, químicamente o enzimáticamente evitando la formación de acrilamida, o retirando la acrilamida formada. La presente invención implica la disminución enzimática de formación de acrilamida.

35 Las vías enzimáticas para disminuir la formación de acrilamida son, entre otras, el uso de asparaginasa para disminuir la cantidad de asparagina en el producto alimenticio, puesto que la asparagina se observa como un precursor importante de la acrilamida.

La publicación internacional WO2004/037007 describe una composición enzimática que comprende asparaginasa y celulosa y el uso de la misma para disminuir los niveles de acrilamida en granos de café tostados.

40 La publicación internacional WO2003/083043 describe métodos recombinantes para producir un polipéptido secretado que tiene actividad de L-asparaginasa, así como los polipéptidos aislados que tienen actividad de L-asparaginasa y ácidos nucleicos de los mismos.

La publicación internacional WO2004/030468 describe un proceso para la producción de un producto alimenticio como panes torpedo que implica una etapa de calentamiento, en donde la masa se trata con asparaginasa y, posteriormente, se hornea la masa.

La publicación internacional WO2004/032648 describe un método de preparación de un producto tratado con calor que comprende proporcionar una materia prima, como una masa, tratar la materia prima con asparaginasa y tratar con calor para alcanzar un contenido de agua final por debajo del 35 % en peso.

50 La publicación internacional WO2004/026043 describe un método para reducir el nivel de asparagina en una materia alimentaria como patata o maíz que comprende añadir una enzima reductora de asparagina a la materia alimentaria antes de calentarla.

Sin embargo, para algunas aplicaciones, el uso de asparaginasa sola no es suficiente para disminuir el contenido de acrilamida del producto alimenticio al nivel deseado. Por lo tanto, es el objeto de la presente invención proporcionar

una composición enzimática que dé como resultado una disminución mejorada de niveles de acrilamida en alimentos preparados mediante el uso de la composición de acuerdo con la descripción.

El objetivo de la presente invención se consigue proporcionando una composición enzimática que comprende asparaginasa y xilanasas.

- 5 Sorprendentemente, se ha encontrado que la adición de xilanasas junto con asparaginasa da como resultado un efecto sinérgico con respecto a la disminución de los niveles de acrilamida en alimentos preparados con esta composición enzimática.

10 En la publicación internacional WO 2004/032648 se describe una composición enzimática que comprende asparaginasa y una enzima capaz de oxidar los azúcares reductores como 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 de acuerdo con la presente descripción aumenta la cantidad de azúcares reductores, pero aún alcanza una disminución dramática en el nivel de acrilamida del producto alimenticio, incluso más bajo que cuando solo se hubiera añadido asparaginasa.

15 Se puede usar cualquier asparaginasa (EC 3.5.1.1) disponible en la presente invención. Se puede obtener asparaginasa adecuada (E.C. 3.5.1.1) a partir de diversas fuentes, tales como, por ejemplo, de plantas, animales y microorganismos. Ejemplos de microorganismos adecuados son las especies de *Escheria*, *Erwinia*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Aspergillus* y *Bacillus*. Se pueden encontrar ejemplos de asparaginasas adecuadas en las publicaciones internacionales WO03/083043 y WO2004/030468. Una asparaginasa preferente es la asparaginasa que tiene la SEQ ID NO:3 o un equivalente funcional de la misma tal como se describe en la publicación internacional WO04/030468.

Cualquier enzima hidrolizante (EC 3.x.x.x) puede ser adecuada para la presente divulgación. Para las referencias de clasificación EC como las realizadas 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.

- 25 Sin embargo, preferentemente se usan las enzimas hidrolizantes que pertenecen al grupo de hidrolasas de éster carboxílico (EC 3.1.1.x) o del grupo de glucosidasas que hidrolizan compuestos de o-glucosilo (EC 3.2.1.x.).

Ejemplos de hidrolasas de éster carboxílico 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).

30 Ejemplos de compuestos de o-glucosilo hidrolizantes adecuados preferentes 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), xilanasas (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 descripción, que incluyen mezclas de hidrolasas de éster carboxílico con compuestos de o-glucosilo hidrolizantes. El experto en la materia sabe el modo de obtener las enzimas hidrolizantes adecuadas para su uso en la descripción.

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

En otra realización, la asparaginasa se combina con una enzima que permite la movilización de la asparaginasa o la penetración de la asparaginasa. Estas composiciones son particularmente adecuadas cuando hay presente células estructuralmente intactas de origen vegetal y se tiene que hidrolizar un polímero endógeno de la matriz vegetal.

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

45 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, en el que la enzima hidrolizante es una xilanasas.

La asparaginasa y al menos una enzima hidrolizante pueden añadirse por separado o en una composición, preferentemente en una composición según la descripción. 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 descripción disminuya con respecto a un producto alimenticio producido sin ninguno de los componentes en la composición según la .

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 la enzima hidrolizante que van a usarse en el método según la invención, deben considerarse las mismas preferencias que se han descrito anteriormente.

- 5 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 la enzima hidrolizante que van a usarse en el método según la invención, deben considerarse las mismas preferencias que se han descrito anteriormente.
- 10 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 planta. La forma intermedia puede comprender las materias primas individuales usadas y/o procesadas a partir de las mismas. 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 ingredientes 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 hervida, puré de patata, puré de patata deshidratado y masa de patata.

- 15 El producto alimenticio puede prepararse a partir de al menos una materia prima que es de origen vegetal, por ejemplo, patata, tabaco, café, cacao, arroz, cereal, fruta. Ejemplos de cereales son trigo, centeno, grano, maíz, cebada, granones, 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 una materia prima también están incluidos en el alcance de la presente invención, por ejemplo, productos alimenticios que comprenden tanto trigo (harina) como patata.

- 20 El producto alimenticio puede prepararse a partir de al menos una materia prima que es de origen vegetal, por ejemplo, patata, tabaco, café, cacao, arroz, cereal, fruta. Ejemplos de cereales son trigo, centeno, grano, maíz, cebada, granones, 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 una materia prima también están incluidos en el alcance de la presente invención, por ejemplo, productos alimenticios que comprenden tanto trigo (harina) como patata.
- 25 Ejemplos de productos alimenticios en los que el proceso según la invención puede ser adecuado son cualquier producto a base de harina - por ejemplo, pan, productos de pastelería, pastel, bretzels, bagels, pastel de miel holandés, galletas, pan de jengibre, pastel de jengibre y biscote -, y cualquier producto a base de patata - por ejemplo, patatas fritas, patatas a la francesa, patatas fritas de bolsa, buñuelos de patata - y cualquier producto a base de maíz - por ejemplo pan de maíz, frituras de maíz y copos de maíz.

- 30 Un proceso de producción preferente 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 preferente es freír con abundante aceite patatas fritas a partir de rebanadas de patata. Todavía otro proceso de producción preferente es freír con abundante aceite frituras de maíz de masa basada en maíz extruida.

- 35 Etapas de calentamiento preferentes 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 superior, 120 °C o superior. 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.

- 40 En lo sucesivo, se ilustra la invención mediante 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 %.

- 45 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 %.

- 50 El nivel de acrilamida del pan con asparaginasa como la única enzima de panificación se estableció al 100 %.

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	Xilanasas	DSM Food Specialties
Bakezyme W	Glucanasa/celulasa	DSM Food Specialties
Bakezyme XE	Celulasa	DSM Food Specialties
Bakezyme A	Alfa-L-arabinofuranosida arabinofuranohidrolasa/ arabinofuranosidasa A	DSM Food Specialties
Lipopan F	Galactolipasa/ fosfolipasa A1 / fosfolipasa A2/ lisofosfolipasa/lipasa	Novozymes A/S

Ejemplo 1

5 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 $^{13}\text{C}_3$ 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

La solución de acetato de etilo se analiza usando cromatografía gaseosa. 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 a 220 °C, el horno se enfría y se estabiliza antes de la siguiente inyección.

La detección se realiza usando espectrometría de masas con ionización química en línea en modo de ion positivo, usando metano como gas de ionización. Se monitorizan los iones característicos m/z 72 (acrilamida) y m/z 75 ($^{13}\text{C}_3$ acrilamida) para la cuantificación.

Equipo usado

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

Las cantidades en ppm o ppb se basan en la cantidad de harina, a menos que se indique lo contrario.

Ejemplo 2

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

30 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 (NaHCO_3) (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 de 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 continuación, 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 %.

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 panificación	de 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	150	17	12
	Asparaginasa	50		
5	Bakezyme HSP6000	200	234	100
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		

Prueba n.º	Enzima de panificación	Dosificación (ppm)	Contenido de acrilamida (ppb)	% de acrilamida restante
	Lipopan F	50		
	Bakezyme A10000	30		
	Bakezyme XE	50		
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 realizó la preparación de panes mini-torpedo en un proceso de horneado estándar mezclando 200 g de harina de trigo integral (harina marrón Mogul 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 continuación, 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)	% restante de acrilamida
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
8	Bakezyme HSP6000	50	67	87
	Asparaginasa	50		
9	Bakezyme HSP6000	200	70	100
10	Bakezyme HSP6000	200	60	86

Prueba n.º	Enzima de panificación	Dosificación (ppm)	Contenido de acrilamida (ppb)	% restante de acrilamida
	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.

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.

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 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 continuación, 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)	% restante de acrilamida
1	Ninguna		50	100
2	Asparaginasa	50	42	84
3	Bakezyme GOX 10.000	1	40	100
4	Bakezyme GOX 10.000	1	37	93
	Asparaginasa	50		
5	Pectinex *	5	41	100
6	Pectinex	5	34	83
	Asparaginasa	50		
7	Bakezyme MA 10.000	100	48	100
8	Bakezyme MA 10.000	100	32	67
	Asparaginasa	50		
9	Bakezyme BXP501	3	43	100
10	Bakezyme BXP501	3	39	91
	Asparaginasa	50		
*: 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 a base de 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. Uso de una composición enzimática que comprende:
 - a. asparaginasa;
 - b. xilanasa.
- 5 en la producción de un producto alimenticio para disminuir los niveles de acrilamida en el producto alimenticio.
2. Uso según la reivindicación 1, en donde el producto alimenticio es un producto alimenticio a base de harina, a base de maíz o a base de patata.
3. Uso según la reivindicación 1 o 2, en donde el uso es en la industria panadera.
- 10 4. 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 donde la enzima hidrolizante es una xilanasa 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 efectiva en reducir el nivel de acrilamida del producto alimenticio en comparación con un producto alimenticio al que no se añadieron asparaginasa y enzima hidrolizante.
- 15 5. Método según la reivindicación 4, en donde la asparaginasa y la al menos una enzima hidrolizante se añaden por separado.
- 20 6. Método según la reivindicación 4, por la cual los componentes a. y b. se añaden en una única composición, preferentemente, una composición enzimática que comprende:
 - a. asparaginasa y;
 - b. xilanasa.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde el producto alimenticio es un producto alimenticio a base de harina, a base de maíz o a base de patata.
- 25 8. Método o uso según cualquiera una de las reivindicaciones 2 a 7, por el cual el producto alimenticio es un producto horneado.
9. Método según la reivindicación 8, en donde el producto horneado es un producto horneado de harina de trigo y/o harinas de otro origen de cereal.
- 30 10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, por el cual el producto alimenticio es un producto frito con abundante aceite, tostado o asado.
11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 2-10, en donde dicha forma intermedia de dicho producto alimenticio es una masa.
12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 2-8, en donde dicho producto alimenticio está hecho de al menos una materia prima que es de origen vegetal.
- 35 13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en donde el producto alimenticio es pan, productos de pastelería, pastel, bretzels, bagels, pastel de miel holandés, galletas, pan de jengibre, pastel de jengibre, biscote, patatas fritas, patatas a la francesa, patatas fritas de bolsa, buñuelos de patata, pan de maíz, frituras de maíz o copos de maíz.
- 40 14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 13, en donde 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.

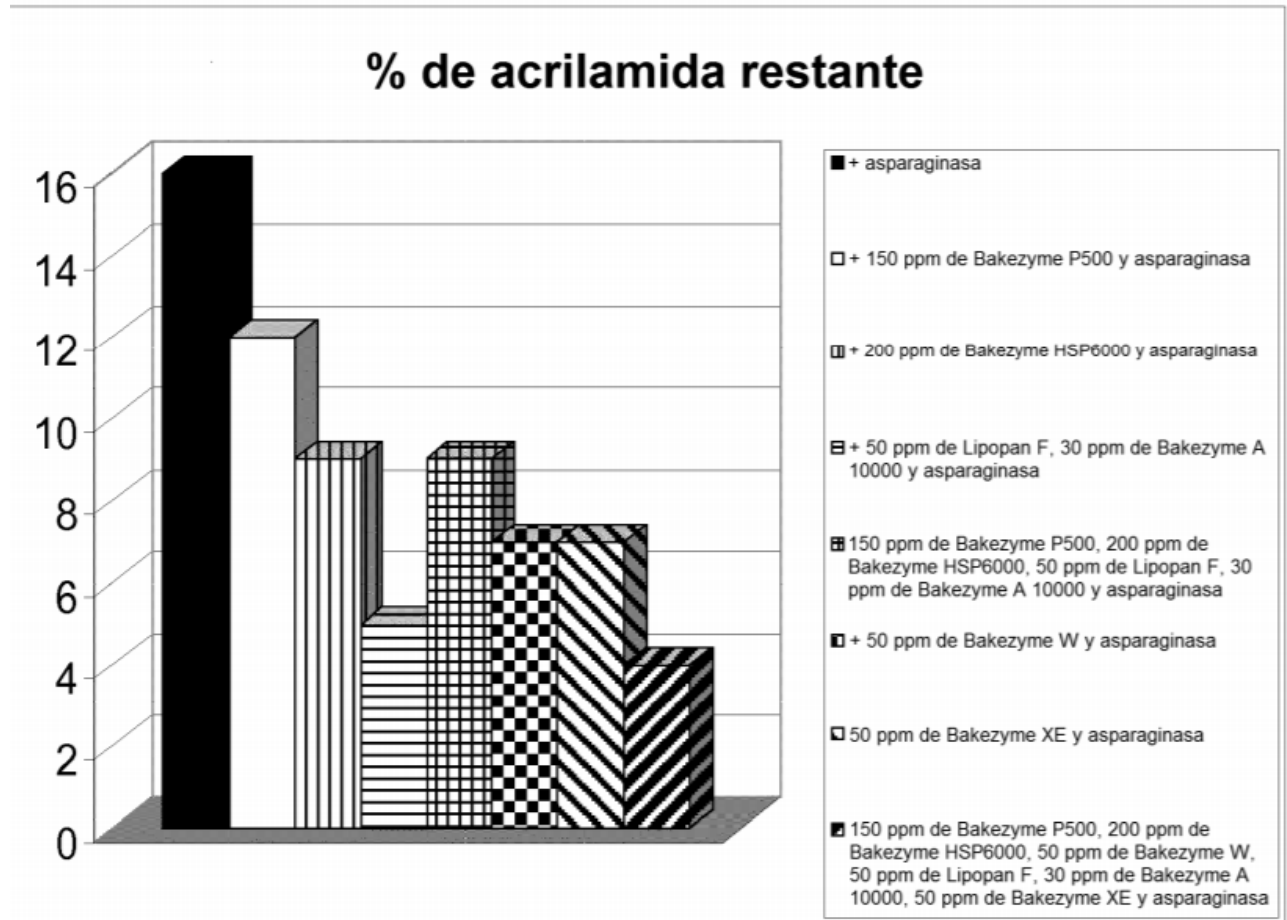


Fig. 1

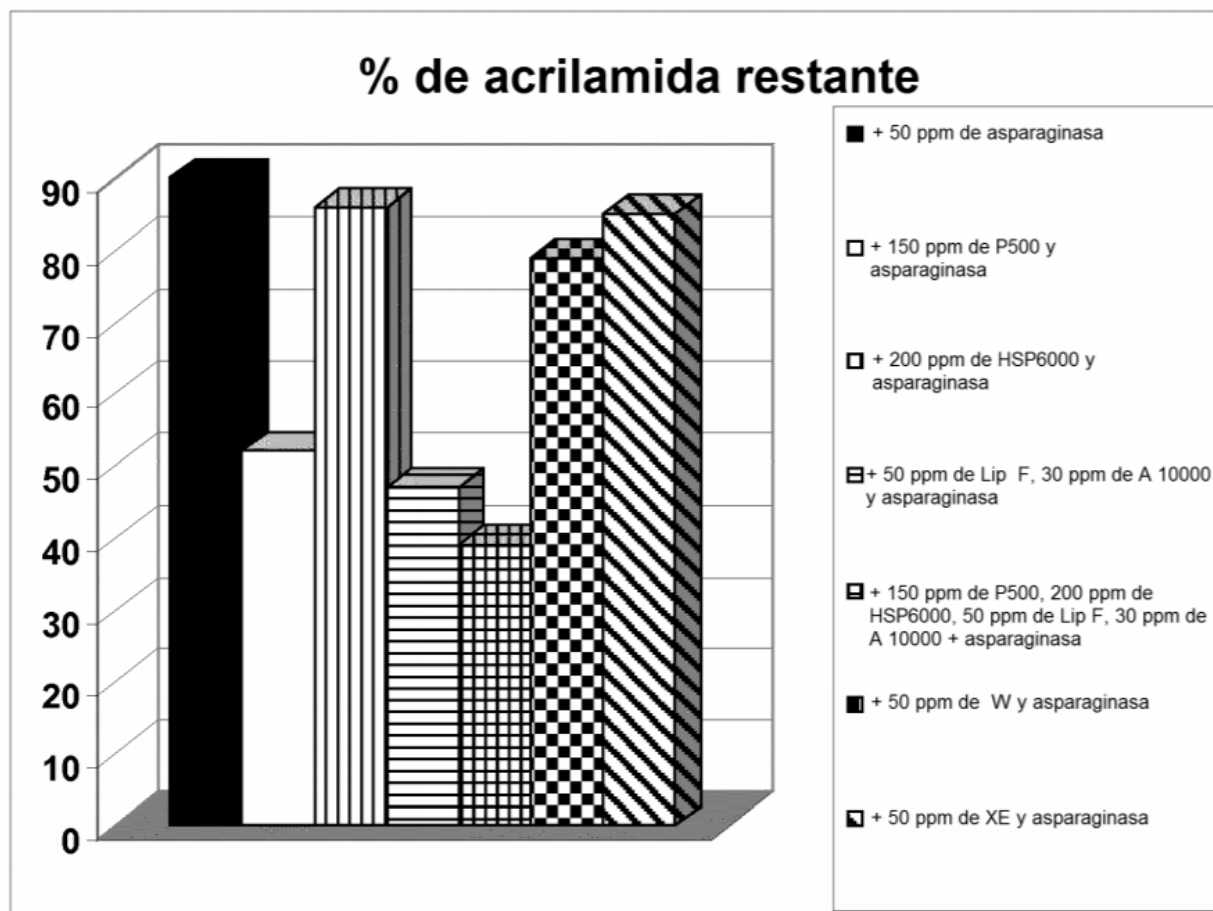


Fig. 2

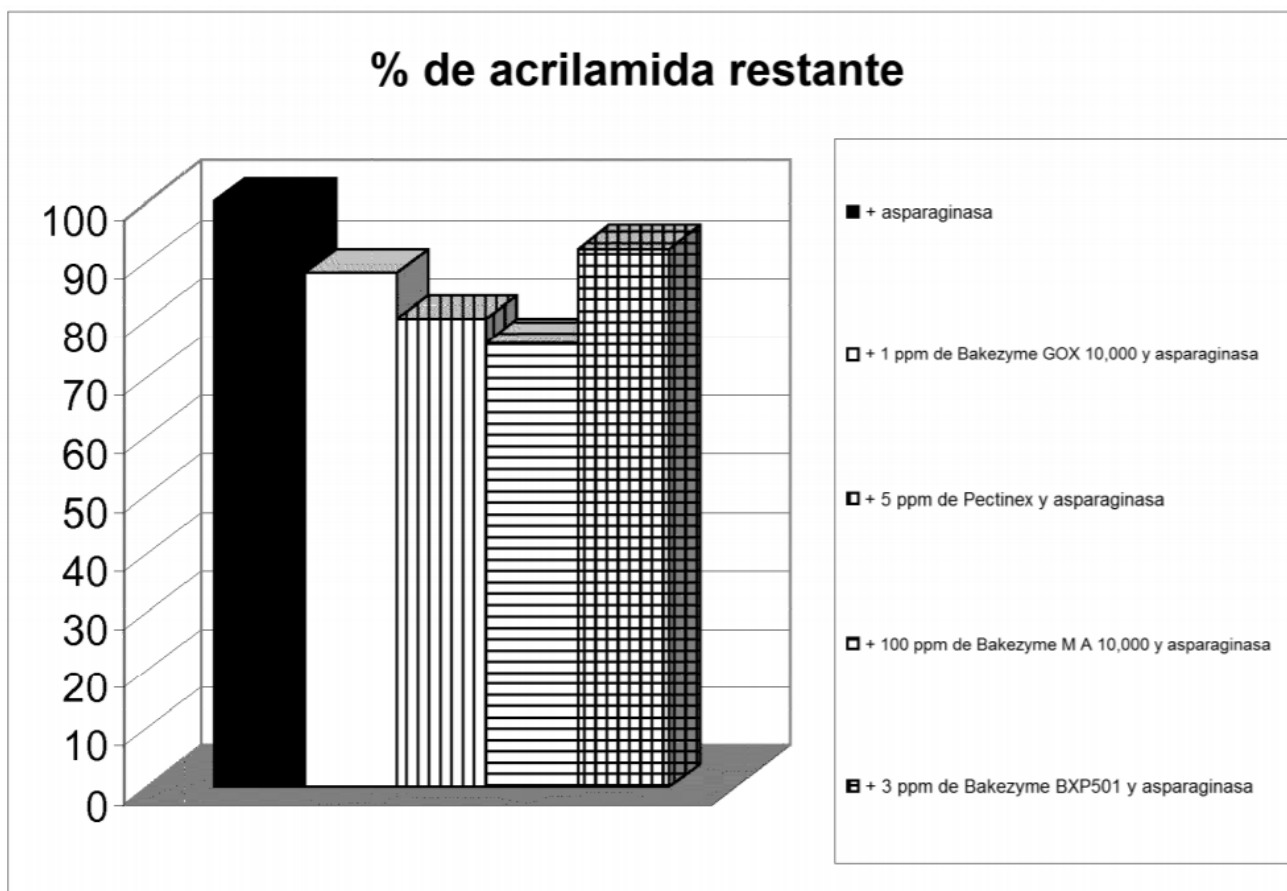


Fig. 3