(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 614 033**

(51) Int. Cl.:

A23L 19/00 (2006.01)
A23B 7/16 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.08.2013** **PCT/EP2013/067080**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **20.02.2014** **WO14027063**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.08.2013** **E 13753134 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016** **EP 2884857**

(54) Título: **Método de producción de un producto alimenticio**

(30) Prioridad:

17.08.2012 EP 12180858

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.05.2017

(73) Titular/es:

NOVOZYMES A/S (100.0%)
Krogshoejvej 36
2880 Bagsvaerd, DK

(72) Inventor/es:

HENDRIKSEN, HANNE VANG y
MATSUI, TOMOKO

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 614 033 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

Método de producción de un producto alimenticio

Referencia a un listado de secuencias

Esta solicitud contiene un Listado de Secuencias en forma legible por ordenador. La forma legible por ordenador se incorpora en esta memoria por referencia.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

la presente invención se refiere a un método para producción de un producto alimenticio de base vegetal tratado térmicamente que comprende tratamiento con asparaginasa.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Es bien sabido que la formación de acrilamida en los productos alimenticios calentados puede reducirse por un tratamiento que reduce la cantidad de asparagina en los materiales alimenticios, por ejemplo por sometimiento de los materiales alimenticios a la acción de la enzima asparaginasa (véase v.g. WO 2004/026.042).

Para amoldarse a la línea de producción de un producto alimenticio industrial, el tratamiento con asparaginasa debería tener lugar preferentemente durante un paso existente en el proceso de producción. Hasta ahora ha sido un reto la adaptación del tratamiento con asparaginasa al proceso de producción industrial existente de, v.g., las patatas fritas. Una razón de ello es que las enzimas asparaginasa conocidas pueden no ser estables/activas a las temperaturas de proceso típicas utilizadas en un proceso industrial para producción de patatas fritas.

WO 2004/026.042 sugiere que en la producción de patatas fritas, la asparaginasa puede añadirse en cualquier etapa adecuada del proceso, tal como, v.g., durante el escaldado. Sin embargo, para añadir una asparaginasa durante el escaldado, la misma debería retener una mayor parte de su actividad a la elevada temperatura utilizada para el escaldado. Las enzimas asparaginasa comerciales que se encuentran actualmente en el mercado se desactivan a una temperatura tan alta.

WO 2008/110.513 da a conocer cierto número de variantes termoestables de asparaginasa de *Aspergillus oryzae.* Sin embargo, ninguna de estas variantes son suficientemente termoestables para ser añadidas, v.g., durante el escaldado. El tratamiento de los palitos de patata para patatas fritas durante 5 min a 60°C se describe para una de las variantes. Pero 60°C no es una temperatura óptima para utilización industrial, debido al crecimiento microbiano potencial a esta temperatura.

WO 2008/151.807 da a conocer una asparaginasa hiper-termoestable y su uso en producción de alimentos. Dicha enzima podría añadirse posiblemente, v.g., durante el escaldado. El uso de una asparaginasa hiper-termoestable en la polución industrial de patatas fritas no es sin embargo óptimo, dado que dicha enzima no es activa durante los pasos subsiguientes en el proceso de producción que tiene lugar típicamente a temperatura inferior.

WO 2010/070.010 sugiere la puesta en contacto con asparaginasa a temperaturas tan altas como 65° C en presencia de, v.g., pirofosfato ácido de sodio (SAPP). Pero incluso 65 °C no es una temperatura óptima para utilizar industrialmente, debido a potencial crecimiento microbiano alrededor de esta temperatura.

US 2007/0141.227 A1 da a conocer la puesta en contacto de, v.g., rodajas de patata con una solución de lixiviación para extraer la asparagina. En una realización, el extracto posterior al lavado que contiene componentes lixiviados se enfría para prevenir que la enzima llegue a desactivarse y se mezcla con asparaginasa, lo que elimina una mayor parte de la asparagina del extracto.

WO 2007/077.546 da a conocer un método para reducir el nivel de asparagina en un material alimenticio que contiene asparagina, que comprende calentamiento del material alimenticio seguido por enfriamiento a una temperatura inferior a aproximadamente 70°C y adición de una enzima reductora de la asparagina.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un método industrialmente aplicable para producir un producto alimenticio de base vegetal tratado térmicamente, tal como patatas fritas, que tiene un nivel reducido de acrilamida, en el que el tratamiento con asparaginasa del material alimenticio de base vegetal tal como los palitos de patata se amolda al proceso de producción existente aplicado típicamente por la industria.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona un método para producir un producto alimenticio de base vegetal tratado térmicamente que comprende:

(a) poner en contacto un material alimenticio de base vegetal con asparaginasa a una temperatura de 67-75 °C;
(b) secar el material alimenticio de base vegetal a una temperatura del aire de 40 a 90°C; y
(c) tratar térmicamente el material alimenticio de base vegetal tratado con asparaginasa para obtener el producto alimenticio de base vegetal tratado térmicamente;

en donde la asparaginasa tiene una actividad residual después de 4 horas de incubación en agua desionizada con SAPP al 0,5% a 70°C, pH 5, de al menos 20%, con preferencia al menos 40%, más preferiblemente al menos 60%, todavía más preferiblemente al menos 80%, de la actividad sin tal incubación; y en donde la asparaginasa tiene una actividad a 35 °C, pH 6, de al menos 20%, preferiblemente al menos 30%, y más preferiblemente al menos 35%, de su actividad a 50°C, pH 6.

La invención ser refiere adicionalmente al uso de asparaginasa para tratamiento de un material alimenticio de base vegetal a una temperatura de 67-75 °C; en donde la asparaginasa tiene una actividad residual después de 4 horas de incubación en agua desionizada con 0,5% SAPP a 70°C, pH 5, de al menos 20%, preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente al menos 60%, todavía más preferiblemente al menos 80%, de la actividad sin tal incubación; y en donde la asparaginasa tiene una actividad a 35 °C, pH 6, de al menos 20%, preferiblemente al menos 30%, más preferiblemente al menos 35%, de su actividad a 50°C, pH 6.

Se proporcionan varias enzimas asparaginasa que son estables a temperatura elevada, es decir son activas todavía después de incubación prolongada a, v.g., 67-75 °C, y retienen también su actividad a temperatura inferior, v.g., a 40-60°C. Sin embargo, cualquier asparaginasa que tenga tales propiedades sería útil en el método de la presente invención.

En el método de la presente invención, tal asparaginasa puede añadirse directamente, v.g., al baño de productos químicos existente en el proceso de producción industrial de patatas fritas sin que se requiera cambio alguno del proceso. En el baño de productos químicos aplicado a menudo por la industria, los palitos de patata escaldados pueden sumergirse, v.g., en pirofosfato ácido de sodio (SAPP) y opcionalmente glucosa para controlar el color. La temperatura de la solución de inmersión se mantiene típicamente alrededor de 70°C para evitar infección microbiana. La inmersión en productos químicos va seguida típicamente por un paso de secado. Aunque el paso de secado puede realizarse a temperatura elevada, tal como, v.g., aproximadamente 85 °C, la temperatura superficial de los palitos de patata es sólo aproximadamente 40-60°C. En el método de la presente invención, la asparaginasa es activa durante el paso de secado. Así, se obtiene pleno efecto del tratamiento con asparaginasa incluso si la inmersión en productos químicos es bastante breve.

Preferiblemente, la asparaginasa debe ser activa en un intervalo de pH 5-6. El pH de una solución de inmersión en SAPP será inicialmente (en agua pura) alrededor de 4,8 pero aumentará gradualmente a 5,5-6 debido al tamponamiento por las patatas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

SEQ ID NO: 1 es la secuencia de nucleótidos del gen de asparaginasa de Aspergillus oryzae. Basándose en la secuenciación del terminal N de la asparaginasa madura codificada, los nucleótidos 1-78 codifican la secuencia señal. SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de la asparaginasa de Aspergillus oryzae. Basándose en la secuenciación del terminal N, los aminoácidos 1-26 son la secuencia señal. SEQ ID NO: 3 es la secuencia de nucleótidos de un gen que codifica una variante de asparaginasa de Aspergillus oryzae que tiene las sustituciones siguientes: N70K S307A A323R T327V A349Q S351A V353I. SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos de una variante de asparaginasa de Aspergillus oryzae que tiene las sustituciones siguientes: N70K S307A A323R T327V A349Q S351A V353I. SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos de un gen que codifica una variante de asparaginasa de Aspergillus oryzae que tiene las sustituciones siguientes: N70K A323R T327V A349Q S351A V353I. SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos de una variante de asparaginasa de Aspergillus oryzae que tiene las sustituciones siguientes: N70K A323R T327V A349Q S351A V353I.

La presente invención se refiere a un método para producción de un producto alimenticio de base vegetal tratado térmicamente que comprende:
(a) poner en contacto un material alimenticio de base vegetal con asparaginasa a una temperatura de 67-75 °C;
(b) secar el material alimenticio de base vegetal en condiciones en las que la asparaginasa es activa; y,
(c) tratar térmicamente el material alimenticio de base vegetal tratado con asparaginasa para obtener el producto alimenticio de base vegetal tratado térmicamente.

El material alimenticio de base vegetal puede ser cualquier material alimenticio basado en vegetales que debe ser tratado térmicamente. El mismo puede derivarse de un tubérculo o raíz vegetal tal como, pero sin carácter limitante, el grupo constituido por patata, batata, ñame, haba de ñame, chirivía, raíz de perejil, alcachofa de Jerusalén, zanahoria, rábano, nabo, y mandioca.

La conversión de un tubérculo o raíz vegetal en un material alimenticio de base vegetal adecuado puede comprender, v.g., enjuagado, lavado, pelado, corte, etc., a fin de producir palitos de tubérculo o raíz, v.g., palitos de patata, de cualquier tamaño y/o forma, v.g., la forma de cuñas, palitos o rodajas, v.g., de tamaño y forma adecuados para conversión ulterior in un producto alimenticio de base vegetal tratado térmicamente tal como, v.g., patatas fritas.

En el contexto de la presente invención, debe entenderse que el término patatas fritas abarca tanto las patatas fritas finales listas para consumo como un pre-producto parcialmente frito que debe freírse u hornearse antes de ser consumido.

En una realización preferida, el material alimenticio de base vegetal es un material de patata tal como piezas de patata, v.g., cuñas de patata, palitos de patata o rodajas de patata. En una realización más preferida, el material alimenticio de base vegetal son cuñas de patata o rodajas de patata. En una realización todavía más preferida, el material alimenticio de base vegetal son palitos de patata y el producto alimenticio de base vegetal tratado térmicamente son patatas fritas.

Preferiblemente, el material alimenticio de base vegetal ha sido escaldado antes del paso (a). El escaldado puede realizarse por cualquier método conocido en la técnica, v.g., por escaldado húmedo, escaldado al vapor, escaldado por microondas o escaldado infrarrojo.

En una producción industrial típica de patatas fritas, inicialmente las patatas se lavan, se clasifican, se pelan al vapor y se cortan. Después del corte, los palitos de patata se escaldan en 2 a 3 pasos secuenciales, típicamente a 65-90°C durante 10-30 min. El escaldado se realiza para desactivar las enzimas endógenas en la patata, para cocinar parcialmente la patata y para lixiviar los azúcares reductores a fin de prevenir el tueste excesivo del producto final. Después del escaldado, los palitos de patata pueden sumergirse rápidamente, v.g. durante 20-180seg, en una solución salina de fosfato templada, v.g., una solución templada de pirofosfato ácido de sodio (SAPP), a fin de prevenir el agrisado del producto final. La inmersión se combina opcionalmente con una inmersión en glucosa a fin de controlar el color final. Las patatas pueden secarse en un secadero con aire circulante caliente a 45-95 °C, dando como resultado una pérdida de peso de 5-25%. Por último, los palitos de patata se fríen parcialmente antes de ser congelados rápidamente y envasados. La freidura final es realizada en el restaurante o por los consumidores.

En el método de la presente invención, la puesta en contacto con la asparaginasa puede combinarse preferiblemente con inmersión en solución salina de fosfato templada. Es decir, el material alimenticio de base vegetal, preferiblemente las cuñas de patata o los palitos de patata, más preferiblemente las cuñas de patata escaldadas o los palitos de patata escaldados, se sumerge(n) o incuba(n) en una solución que comprende asparaginasa y, v.g., SAPP en un baño de inmersión a una temperatura de 67-75 °C, seguido por secado. Alternativamente, la puesta en contacto puede realizarse por pulverización del material alimenticio de base vegetal, preferiblemente las cuñas de patata o los palitos de patata, más preferiblemente las cuñas de patata escaldadas o los palitos de patata escaldados, con una solución que comprende asparaginasa y, v.g., SAPP a una temperatura de 67-75 °C seguido por secado.

En una realización preferida, el paso (a) del método de la invención es la inmersión de un material alimenticio de base vegetal, preferiblemente cuñas de patata o palitos de patata, más preferiblemente cuñas de patata escaldadas o palitos de patata escaldados, en una solución de asparaginasa que tiene una temperatura de 67-75 °C, preferiblemente 68-74 °C, más preferiblemente 70°C. La solución de asparaginasa puede comprender asparaginasa a una concentración de 1000 a 100.000 ASNU/L, preferiblemente 5.000 a 50.000 ASNU/L, más preferiblemente 10.000 a 30.000 ASNU/L.

En una realización más preferida, la solución de asparaginasa comprende además SAPP a una concentración de 0,05 a 5%, preferiblemente 0,1 a 1,5%, más preferiblemente 0,5 a 1%. La solución de asparaginasa puede comprender además glucosa, v.g., a una concentración de 0,5 a 2%.

En una realización preferida, la inmersión se realiza durante un tiempo de 1 segundo a 10 min, preferiblemente 30seg a 3 min.

El secado en el paso (b) debe realizarse a una temperatura del aire de 40 a 90°C, preferiblemente 55 a 85 °C, más preferiblemente 65 a 75 °C, es decir en condiciones en las cuales la asparaginasa es activa. El secado puede realizarse en un horno en el que la temperatura, la humedad y/o el flujo de aire pueden ajustarse al nivel o niveles deseados. El secado puede efectuarse, v.g., durante entre 5 y 30 min.

Con preferencia, el secado se realiza de tal manera que la temperatura superficial del material alimenticio de base vegetal, tal como las cuñas de patata o palitos de patata (escaldados), durante el secado en el paso (b) es 25 a 60°C, preferiblemente 35 a 50°C.

En una realización preferida, el contenido de acrilamida del producto alimenticio de base vegetal tratado térmicamente se reduce al menos 25%, con preferencia al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos

45% o al menos 50%, comparado con el contenido de acrilamida de un producto alimenticio de base vegetal tratado térmicamente producido por un método similar sin la adición de asparaginasa.

En una realización más preferida, el material alimenticio de base vegetal son palitos de patata, el producto alimenticio de base vegetal tratado térmicamente son patatas fritas, y el contenido de acrilamida de las patatas fritas se reduce al menos 25%, preferiblemente al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45% o al menos 50%, comparado con el contenido de acrilamida de patatas fritas producidas por un método similar sin la adición de asparaginasa.

El contenido de acrilamida puede determinarse por cualquier método conocido en la técnica, v.g. por el método descrito en el ejemplo 3.

La invención se refiere además a un uso de asparaginasa para el tratamiento de un material alimenticio de base vegetal a una temperatura de 67-75 °C.

Una asparaginasa en el contexto de la presente invención significa una enzima que tiene actividad de asparaginasa, es decir, una enzima que cataliza la hidrólisis de la asparagina a ácido aspártico (EC 3.5.1.1).

La actividad de asparaginasa puede determinarse conforme a uno de los ensayos de actividad de asparaginasa descritos en los Ejemplos, v.g., por el ensayo ASNU. En una realización, una asparaginasa a utilizar en el método de la presente invención tiene al menos 20%, v.g. al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 100% de la actividad de asparaginasa del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2 cuando se mide a pH 7 y a 37 °C.

La asparaginasa puede ser una asparaginasa microbiana, v.g., una asparaginasa derivada de una bacteria, un arquea o un hongo. La misma puede ser una asparaginasa de tipo salvaje, es decir, una asparaginasa encontrada en la naturaleza o puede ser una asparaginasa variante, es decir, una asparaginasa que comprende una alteración, es decir una sustitución, inserción, y/o deleción, en una o más (v.g., varias) posiciones comparada con una asparaginasa parental de la cual puede haberse derribado aquélla. Una sustitución significa reemplazamiento del aminoácido que ocupa una posición con un aminoácido diferente; una deleción significa eliminación del aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa adición de un aminoácido adyacente a e inmediatamente siguiente al aminoácido que ocupa una posición.

Una asparaginasa a utilizar conforme a la invención tiene una actividad residual después de 4 horas de incubación en agua desionizada con SAPP al 0,5% a 70°C, y pH 5, de al menos 20%, preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente al menos 60%, y todavía más preferiblemente al menos 80%, de la actividad sin tal incubación. La actividad de asparaginasa puede determinarse por el ensayo rASNU como se describe en los Ejemplos. La misma puede determinarse a pH 6 y a 37 °C.

Preferiblemente, una asparaginasa a utilizar conforme a la invención tiene una actividad residual después de 4 horas de incubación en agua desionizada con SAPP al 0,5% a 72ºC, pH 5, de al menos 5%, preferiblemente al menos 10%, más preferiblemente al menos 20%, todavía más preferiblemente al menos 40%, tal como al menos 60% o al menos 80%, de la actividad sin tal incubación.

Preferiblemente, una asparaginasa a utilizar conforme a la invención tiene una actividad residual después de 4 horas de incubación en agua desionizada con SAPP al 0,5% a 74 °C, pH 5, de al menos 1%, preferiblemente al menos 5%, más preferiblemente al menos 10%, todavía más preferiblemente al menos 20%, tal como al menos 40% o al menos 60%, de la actividad sin tal incubación.

Una asparaginasa a utilizar conforme a la invención tiene una actividad a 35°C, pH 6, de al menos 20%, preferiblemente al menos 30%, más preferiblemente al menos 35%, de su actividad a 50° C, pH 6.

Preferiblemente, la asparaginasa tiene una actividad a 70°C, pH 6, de al menos 20%, preferiblemente al menos 25%, más preferiblemente al menos 30%, de su actividad a 50°C, pH 6.

Más preferiblemente, la asparaginasa tiene (i) una actividad a 35°C, pH 6, de al menos 20%, preferiblemente al menos 30%, más preferiblemente al menos 35%, de su actividad a 50°C, pH 6, y (ii) una actividad a 70°C, pH 6, de al menos 20%, preferiblemente al menos 25%, más preferiblemente al menos 30%, de su actividad a 50°C, pH 6.

Preferiblemente, la asparaginasa tiene una actividad a pH 5 de al menos 20%, preferiblemente al menos 30%, más preferiblemente al menos 40%, todavía más preferiblemente al menos 50%, de su actividad a pH 6,5. La actividad puede determinarse a 50°C.

Más preferiblemente, la asparaginasa tiene (i) una actividad a 35°C, pH 6, de al menos 20%, preferiblemente al menos 30%, más preferiblemente al menos 35%, de su actividad a 50°C, pH 6, (ii) una actividad a 70°C, pH 6, de al menos 20%, preferiblemente al menos 25%, más preferiblemente al menos 30%, de su actividad a 50°C, pH 6, y (iii) una actividad a pH 5, 50°C, de al menos 20%, preferiblemente al menos 30%, más preferiblemente al menos 40%, todavía más preferiblemente al menos 50%, de su actividad a pH 6,5, 50°C.

Preferiblemente, la asparaginasa tiene una actividad residual después de 2 horas de incubación en agua desionizada con SAPP al 0,5% a pH 4 y 70°C de al menos 20%, preferiblemente al menos 30%, más preferiblemente al menos 40%, todavía más preferiblemente al menos 50% de la actividad sin tal incubación.

En una realización, la asparaginasa se obtiene de, o es una variante de una asparaginasa parental obtenida de un microorganismo de cualquier género. Para los propósitos de la presente invención, el término "obtenido de" como se utiliza en esta memoria en conexión con una fuente dada significará que el parental codificado(a) por un polinucleótido es producido por la fuente o por una cepa en la cual ha sido insertado el polinucleótido de la fuente. En una realización, el parental se secreta extracelularmente.

La asparaginasa o su parental puede ser una asparaginasa fúngica. La misma puede ser una asparaginasa fúngica filamentosa tal como una asparaginasa de *Acremonium, Agaricus, Alternaria*, *Aspergillus, Aureobasidium, Botryospaeria*, *Botryotinia*, *Ceriporiopsis, Chaetomidium, Chrysosporium, Claviceps*, *Cochliobolus, Coprinopsis*, *Coptotermes*, *Corynascus, Cryphonectria, Cryptococcus, Diplodia*, *Exidia, Filibasidium, Fusarium, Gibberella, Holomastigotoides, Humicola*, *Irpex*, *Lentinula, Leptospaeria, Magnaporthe*, *Melanocarpus, Meripilus, Mucor, Myceliophthora, Neocallimastix*, *Neosartorya*, *Neurospora, Paecilomyces*, *Penicillium, Piromyces*, *Poitrasia*, *Pseudoplectania, Pseudotricho-nympha, Rhizomucor, Schizophyllum*, *Sclerotinia, Scytalidium, Talaromyces*, *Thermoascus, Thielavia, Tolypocladium*, *Trichoderma, Trichophaea, Verticillium, Volvariella,* o *Xylaria*.

En una realización, la asparaginasa o su parental es una asparaginasa de *Acremonium cellulolyticus, Aspergillus aculeatus, Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus, Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus, Botryotinia fuckeliana*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense, Chrysosporium merdarium, Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum, Chrysosporium tropicum, Chrysosporium zonatum*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum, Fusarium graminearum, Fusarium graminum, Fusarium heterosporum, Fusarium negundi, Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum, Fusarium sambucinum, Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides, Fusarium sulphureum, Fusarium torulosum, Fusarium trichothecioides, Fusarium venenatum, Humicola grisea, Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa, Irpex lacteus, Mucor miehei, Myceliophthora thermophila, Neosartorya fischeri, Neurospora crassa, Penicillium chrysogenum, Penicillium citrinum, Penicillium funiculosum, Penicillium purpurogenum, Phanerochaete chrysosporium*, *Sclerotinia sclerotiorum, Thielavia achromatica, Thielavia albomyces, Thielavia albopilosa*, *Thielavia australeinsis*, *Thielavia fimeti*, *Thielavia microspora*, *Thielavia ovispora*, *Thielavia peruviana*, *Thielavia setosa, Thielavia spededonium, Thielavia subthermophila, Thielavia terrestris, Trichoderma harzianum, Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum, Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*.

En una realización preferida, la asparaginasa es una variante de una asparaginasa parental que puede obtenerse de *Aspergillus,* v.g., de *Aspergillus aculeatus, Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus terreus.* Preferiblemente, aquélla es una variante que tiene una estabilidad térmica incrementada en comparación con su parental. La estabilidad térmica puede determinarse como se describe en el Ejemplo 1.
En otra realización preferida, la asparaginasa es una variante de una asparaginasa parental que puede obtenerse de *Aspergillus oryzae*, v.g., la asparaginasa de SEQ ID NO: 2 o su polipéptido maduro, o una variante de una asparaginasa parental que puede obtenerse de *Aspergillus niger*, v.g., la asparaginasa descrita en WO2004/030468.

En otra realización preferida, la asparaginasa tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en 50% a cualquiera de SEQ ID NOs: 2 ó 4, preferiblemente al menos 60%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% idéntica a cualquiera de SEQ ID NOs: 2 ó 4.

En otra realización preferida, la asparaginasa es una variante de una asparaginasa parental que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en 50% a cualquiera de SEQ ID NOs: 2 ó 4, preferiblemente al menos 60%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o 100% idéntica a cualquiera de SEQ ID NOs: 2 ó 4.

En otra realización preferida, la asparaginasa es una variante de asparaginasa que comprende una sustitución en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 122, 140,197, 238, 239, 240, 241, 253, 258, 259, 297 ó 373 de SEQ ID NO: 2, y que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en 50% a cualquiera de SEQ ID NOs: 2 ó 4, preferiblemente al menos 60%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% idéntica a cualquiera de SEQ ID NOs: 2 ó 4.

En otra realización preferida, la asparaginasa es una variante de asparaginasa que comprende (i) una o más de las sustituciones siguientes, en donde cada posición corresponde a una posición en SEQ ID NO: 2: T71C, T74A, T74C, K122A, K122R, V139G, T140D, K194L, D197E, I228M, S238C, N239C, K240R, P241E, K253R, I258V, I258Y, R259C, R259V, S297V, S299A, T314A, P333L, S334P, S334W, E337S, S338G, S338W, G356D, K363R o E373H, o (ii) una deleción en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 27, 28 ó 29 de SEQ ID NO: 2; en donde la variante de asparaginasa tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 50% idéntica a cualquiera de SEQ ID NOs: 2 ó 4, preferiblemente al menos 60%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% idéntica a cualquiera de SEQ ID NOs: 2 ó 4.

En otra realización preferida, la asparaginasa es una variante de asparaginasa que comprende (i) una o más de las sustituciones siguientes, en donde cada posición corresponde a una posición en SEQ ID NO: 2: T71C, T74A, T74C, K122A, K122R, V139G, T140D, K194L, D197E, I228M, S238C, N239C, K240R, P241 E, K253R, I258V, I258Y, R259C, R259V, S297V, S299A, T314A, P333L, S334P, S334W, E337S, S338G, S338W, G356D, K363R o E373H, o (ii) una deleción en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 27, 28 ó 29 de SEQ ID NO: 2; en donde la variante de asparaginasa tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 50% idéntica a SEQ ID NO: 4, preferiblemente al menos 60%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% idéntica a SEQ ID NO: 4.

En otra realización preferida, la asparaginasa es una variante de asparaginasa que comprende una o más de las sustituciones siguientes, en donde cada posición corresponde a una posición en SEQ ID NO: 2: T71C, T74A, T74C, K122A, K122R, V139G, T140D, K194L, D197E, I228M, S238C, N239C, K240R, P241 E, K253R, I258V, I258Y, R259C, R259V, S297V, S299A, T314A, P333L, S334P, S334W, E337S, S338G, S338W, G356D, K363R o E373H; en donde la variante de asparaginasa tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 50% idéntica a SEQ ID NO: 4, preferiblemente al menos 60%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% idéntica a SEQ ID NO: 4.

En otra realización preferida, la asparaginasa es una variante de asparaginasa que comprende una o más de las sustituciones siguientes, en donde cada posición corresponde a una posición en SEQ ID NO: 2: T74A, K122A, K122R, K194L, K240R, P241E, S299A, S334P, S334W, E337S o S338W; en donde la variante de asparaginasa tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 50% idéntica a SEQ ID NO: 4, preferiblemente al menos 60%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% idéntica a SEQ ID NO: 4.

En otra realización preferida, la asparaginasa es una variante de asparaginasa que comprende una o más de las sustituciones siguientes, en donde cada posición corresponde a una posición en SEQ ID NO: 2: K122A, K240R, P241E, S299A, S334P, E337S o S338W; en donde la variante de asparaginasa tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 50% idéntica a SEQ ID NO: 4, preferiblemente al menos 60%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% idéntica a SEQ ID NO: 4.

En otra realización preferida, la asparaginasa es una variante de asparaginasa descrita en la Solicitud de Patente No. EP12180861 presentada el 17 de agosto 2012 que se incorpora en esta memoria por referencia.

EJEMPLOS

Materiales y Métodos

Ensayo de actividad de asparaginasa (ASNU)

La actividad de asparaginasa puede medirse en ASNU. Una unidad de asparaginasa (ASNU) se define como la cantidad de enzima necesaria para generar 1,0 µmol de amoníaco en 1 min a 37 °C y pH 7,0, en tampón MOPS 0,1 M con 9,2 mg/mL de asparagina.

La asparaginasa hidroliza la asparagina a ácido aspártico y amonio. El amonio producido se combina con α-cetoglutarato para formar ácido glutámico por el cual la NADH se oxida a NAD^+. La reacción es catalizada por un exceso de glutamato-deshidrogenasa. El consumo de NADH se mide por fotometría a 340 nm. La NADH tiene una absorbancia a 340 nm, mientras que NAD^+ no tiene absorbancia alguna. De este modo se mide una disminución de color, y puede correlacionarse con la actividad de asparaginasa.

La actividad se determina con relación a un estándar de asparaginasa de actividad conocida. Como estándar puede utilizarse un producto comercial que tiene una actividad declarada, como Acrylaway L.

Ensayo de actividad de asparaginasa - utilizado en los Ejemplos 1 y 2

Principio:

La asparaginasa hidroliza asparagina a ácido aspártico y amonio. El amonio producido se determina utilizando el reactivo de Nessler.

La actividad se determina con relación a un estándar de actividad conocida en ASNU o a una muestra de control relevante. La actividad determinada según este ensayo se designa como nASNU.

Incubación de la enzima:

Temperatura	37°C
pH	6,0
Tampón	Ácido cítrico 20 mM, pH 6 + 0,001% Triton x-100
Solución sustrato de asparagina	25 mg/ml en tampón
Reactivo de parada	Ácido tricloroacético (TCA) 1,5 M
Enzima estándar	0-20 ASNU/ml Las diluciones de la enzima se hacen en tampón.
Tiempo de incubación	10 min

Procedimiento:

Tampón	750 µL
Asparagina (25 mg/mL)	100 µL
Muestra	100 µL
TCA 1,5 M (reactivo de parada)	50 µL
Volumen total	*1.000 µL*

Se mezclan el tampón y la asparagina y se dejan equilibrar a 37 °C durante 10-15 min. Añadir el estándar de enzima o la muestra y se incuba durante 10 min a 37 °C. Se añade TCA para parar la reacción.

Determinación de amonio (ensayo Nessler):

Temperatura	Ambiente
pH	~ 12, controlado por adición de reactivo Nessler
Reactivo Nessler	Cloruro de mercurio(II), yoduro de potasio, hidróxido de potasio
Tiempo de incubación	10 min
A_{436}	Medida del punto final a 440 nm

Procedimiento:

	Placa de microtitulación
Agua MQ	140 µL
Muestra	20 µL
Reactivo Nessler	40 µL
Volumen Total	*200 µL*
Añadir a la placa de microtitulación el agua MQ, la muestra y el reactivo Nessler. Se agita mediante sacudidas durante 10 seg y se deja incubar luego durante 10 min antes de nueva agitación y lectura a 140 nm.	

Ensayo de actividad de asparaginasa (ensayo rASNU) - utilizado en los Ejemplos 4, 5, 6 y 7

Reactivos:

- Tampón de fosfato de potasio 1 M (pH 6,0)
  KH2PO4 1 M (136g/500 ml) + K_2HPO_4 1 M (174g/500 ml)
  Ajustar a pH 6,0

- Tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 6,0) + 0,1% Triton X-100(1 L)
  100 ml tampón de fosfato de potasio 1 M (pH 6,0)
  1 g Triton X-100
  Ajustar a 1000 ml
- Solución de Hidroxilamina (HA) 2 M (100 ml)
  13,9 g hidroxilamina
  Ajustar a 100 mL con tampón de fosfato de potasio 100 mM (pH 6)
- Solución de parada (500 ml)
  23,83 ml acetato
  13,88 g $FeCl_3$ 6 H_2O
  84 ml HCl 5 N
  Ajustar a 500 ml con H_2O
- Solución sustrato (100 ml)
  10 ml tampón de fosfato de potasio 1 M
  0,5 g L-asparagina
  5 ml soln. HA 2M
  Ajustar a 100 ml con H_2O

Ensayo de actividad:

1 Pipetear 20 µL de muestra en un pocillo.
2 Añadir 100 µL de solución sustrato al pocillo.
3 Incubar 20 min. a 55°C (o como se indique de otro modo).
4 Añadir 100 µL de solución de parada al pocillo.
5 Medir A490.

Comparar el resultado con el de un control en cuanto a efecto relativo o con un estándar de actividad conocida en ASNU. La actividad determinada de acuerdo con este ensayo se designa como rASNU.

Enzimas asparaginasa

JN065N2 es una variante de asparaginasa de *Aspergillus oryzae* tipo salvaje descrita en WO 2008110513 que tiene las sustituciones de aminoácidos siguientes: N70K A323R T327V A349Q S351A V353I comparada con la secuencia de aminoácidos del tipo salvaje.

JN070es una variante de JN065N2 que tiene además la sustitución de aminoácidos S307A, es decir tiene las sustituciones de aminoácidos siguientes comparada con la secuencia de aminoácidos de la asparaginasa de *Aspergillus oryzae* tipo salvaje: N70K S307A A323R T327V A349Q S351A V353I.

En los Ejemplos presentes se utilizan las variantes siguientes (Tabla 0) de JN070. Para evitación de cualquier posible duda: V.g., la variante JN102 tiene las sustituciones de aminoácidos siguientes comparada con la secuencia de aminoácidos de la asparaginasa de tipo salvaje de *Aspergillus oryzae*: N70K K122A S307A A323R T327V A349Q S351 A V353I.

Tabla 0: Variantes de JN070

	Sustituciones a JN070
JN102	K122A
JN117	K290V
JN135	S297V S299A
JN140	S334P
JN145	S338W
JN148	K290V S338W
JN152	S299A
JN158	K122A P241E S299A
JN159	K122A K290V S338W
JN161	K122A P241E K290V S299A S338W
JN162	K122A P241E K290V S338W

	Sustituciones a JN070
JN165	K122A S299A S334P
JN166	K122A P241E S334P
JN167	K122A P241E S299A S334P
JN168	K122A K290V S334P S338W
JN178	K122A K240R P241E S299A S334P
JN179	K122A K240R P241E K253R S299A S334P
JN180	K122A K240R P241E S299A S334P E337S
JN181	K122A K240R P241E K253R S299A S334P E337S
JN182	K122A P241E S299A S334P E337S
JN183	K122A P241E S299A S334P S338W
JN184	K122A P241E S299A S334W
JN226	A27* T28* D29* K122A P241E S299A S334P S338W

Ejemplo 1

Estabilidad térmica en agua de escaldado de patatas con SAPP

Se añadió 0,5% de SAPP a agua de escaldado de patatas (= 4 L de agua desionizada que se ha utilizado para escaldado de 2400 g de patatas a 85 °C (16 porciones de 150 g durante 4 min cada una)) y se ajustó el pH a 5. Esta solución tiene por objeto mimetizar una solución de SAPP utilizada para tratamiento continuo de patatas fritas por inmersión química.

Se testó la estabilidad térmica de las diferentes variantes de asparaginasa en esta solución a 70°C: Cada variante de asparaginasa utilizada a una dosis de enzima de 10.000 ASNU/L se incubó en 20 mL de agua de escaldado de patatas con SAPP a 70°C durante 4 horas. Se tomaron muestras cada ½-1 hora durante un periodo total de 4 horas y se analizó la actividad de enzima. Los resultados se muestran a continuación.

Tabla 1: Actividad residual después de 4 horas de incubación en "agua de escaldado de patatas con SAPP" a 70°C comparada con la actividad inicial en el tiempo 0.

	%		%		%
Muestra	Act. residual	Muestra	Act. residual	Muestra	Act. residual
JN102	58	JN159	72	JN179	90
JN117	53	JN161	108	JN180	114
JN135	100	JN162	124	JN181	84
JN140	47	JN165	99	JN182	84
JN145	81	JN166	108	JN183	109
JN148	71	JN167	103	JN184	100
JN152	80	JN168	111	JN226	114
JN158	103	JN178	97		

Como se ve por la Tabla, todas las variantes exhiben estabilidad aumentada a 70°C comparadas con la asparaginasa tipo salvaje de *Aspergillus oryzae* que tiene una actividad residual <10% en condiciones similares.

Ejemplo 2

Comparación de la estabilidad térmica de las variantes termoestables y la enzima de tipo salvaje del tratamiento continuo de patatas fritas para mitigación de la acrilamida

Se pelaron manualmente patatas (Maris Piper o Bintje) para freír y se cortaron en patatas fritas (tamaño 0,8 x 0,8 x 5 cm) utilizando una cortadora de patatas fritas (Coupe Frites). Los palitos de patata de las patatas individuales se mezclaron y se mantuvieron en agua desionizada hasta su utilización. Porciones de 20 g de palitos de patata se escaldaron en dos pasos; primeramente a 85 °C durante 4 min (4 L de agua desionizada que se reutilizó) y subsiguientemente en 250 mL de agua desionizada a 70°C durante 15 min (agua nueva para cada muestra). El tratamiento con la enzima se realizó por mantenimiento de los palitos de patata escaldados durante 5 min a 70°C en 200 mL de solución de enzima (pirofosfato ácido de sodio al 0,5% en agua desionizada) dosificando 10.000 ASNU/L de las variantes o la enzima de tipo salvaje. Cada 5 mL se sumergió en el baño de enzima una nueva porción de palitos de patata a fin de mimetizar el uso continuo del baño de enzima. Se tomaron muestras del baño de enzima cada 30 min durante un periodo total de 4 horas y se congelaron para análisis posterior de la actividad.

Los resultados se muestran a continuación.

Tabla 2: Actividad residual de la solución de enzima después de 4 horas de uso continuo a 70°C de inmersión de tiras de patata recién escaldadas y mantenimiento de cada porción durante 5 min. La actividad residual después de 4 horas se calcula como porcentaje de la actividad inicial medida para t = 0.

	%		%		%
Muestra	Act. residual	Muestra	Act. residual	Muestra	Act. residual
JN102	81	JN158	112	JN179	111
JN117	107	JN159	86	JN181	100
JN135	83	JN161	80	JN182	100
JN140	73	JN165	122	JN183	108
JN145	87	JN166	108	JN184	128
JN148	85	JN167	73	JN226	121
JN152	77	JN168	80	tipo salvaje	8

Como se ve por la tabla, todas las variantes exhiben un aumento significativo de estabilidad a 70°C comparadas con la enzima de tipo salvaje también en condiciones de uso continuo en un esquema de aplicación.

Ejemplo 3

Eficiencia de aplicación de las variantes termoestables en el tratamiento de patatas fritas para mitigación de la acrilamida

Se pelaron manualmente patatas (Maris Piper o Bintje) para freír y se cortaron en patatas fritas (tamaño 0,8 x 0,8 x 5 cm) utilizando una cortadora de patatas fritas (Coupe Frites). Los palitos de patata de las patatas individuales se mezclaron y se mantuvieron en agua desionizada hasta su utilización. Porciones de 75 g de palitos de patata se escaldaron en dos pasos; primeramente a 85 °C durante 4 min (4 L de agua desionizada que se reutilizó) y subsiguientemente en 250 mL de agua desionizada a 70°C durante 15 min (agua nueva para cada muestra). El tratamiento con la enzima se realizó por inmersión de los palitos de patata escaldados durante 1 min a 70°C en 250 mL de solución de enzima (pirofosfato ácido de sodio al 0,5%, pH 5 en agua desionizada) utilizando una dosis de 10.000 ASNU/L de las variantes. Para comparación, se incluyó una muestra de control sumergida en SAPP al 0,5% sin enzima. El ensayo de la enzima de tipo salvaje se realizó a 55 °C para asegurar la actividad. Las muestras se prepararon por triplicado. Después del tratamiento con la enzima, los palitos de patata se secaron en un armario de calentamiento ventilado durante 10 min a 85 °C, 20% RH (humedad relativa), y se frieron parcialmente en aceite vegetal durante 1 min a 175 °C. Las muestras se congelaron rápidamente y se frieron finalmente por segunda vez durante 3 min a 175 °C.

Las patatas fritas se mezclaron y la acrilamida se extrajo utilizando acetonitrilo y un Extractor Automático con Disolvente (ASE de Dionex). El extracto se trató con solución Carrez I y II (la solución Carrez I contiene 15 g/100 mL de hexacianoferrato(II) de potasio trihidratado ($K_4[Fe(CN)_6]$ x $3H_2O$); la solución Carrez II contiene 30 g/100 ml de sulfato de zinc heptahidratado ($ZnSO_4$ x $7H_2O$)), se dejó durante una noche en el frigorífico y se filtró utilizando un filtro de 0,22 µm antes del análisis por HPLC (columna: Dionex IonPac ICE-AS1, 9x250 mm, eluyente: HCl 5 mM,

detección: UV a 202 nm). La acrilamida se identificó y se cuantificó por comparación con estándares conocidos.

Los resultados se dan a continuación.

Tabla 3: Reducción calculada de la formación de acrilamida en las patatas fritas finales tratadas con las diferentes variantes a una dosis fija de 10.000 ASNU/L y a una temperatura de inmersión de 70°C. La reducción se calcula por comparación con una muestra de control sumergida en SAPP sin enzima. Para la enzima de tipo salvaje, el tratamiento se realizó a una temperatura de inmersión de 55 y 70°C. Los números duplicados son de pruebas separadas repetidas.

Tratamiento	Reducción frente a la muestra de control,%
Control	0
Tipo salvaje (55°C)	45
Tipo salvaje (70°C)	1
JN135	53
JN140	55
JN145	35
JN152	54/50
JN158	52
JN159	49
JN161	41
JN165	37
JN166	36
JN167	46
JN168	42
JN178	41
JN179	51
JN180	52
JN181	51/51
JN182	51/49
JN183	48
JN184	47
JN226	61

La acrilamida en el producto final de patatas fritas se ha reducido aproximadamente 50%, demostrando que las variantes son activas en la aplicación. Para la enzima de tipo salvaje, las reducciones alcanzadas en los niveles de acrilamida eran 45% a 55 °C y 1% a 70°C.

Ejemplo 4

Actividad a temperatura

Se diluyó enzima purificada con tampón de acetato de sodio 20 mM de pH 5,5 a una concentración aproximada de 2 rASNU/ml. Se añadieron 10 µL de solución de enzima a 100 µL de solución sustrato, que se ha pre-incubado a temperatura diferente, de ensayo rASNU en una placa PCR de 96 pocillos y se incubaron durante 20 min. La reacción se paró por adición de 100 µL de solución de parada, y se midió la absorbancia a 490 nm.

Tabla 4: Actividad a temperatura en porcentaje de la actividad a 50°C

Variante No.	Actividad térmica (100% a 50°C)		
	35°C	60°C	70°C
Tipo salvaje	78%	64%	4%
JN065	67%	68%	24%
JN070	64%	68%	25%
JN117	63%	69%	30%
JN135	79%	72%	29%
JN140	69%	67%	34%
JN145	72%	68%	25%
JN148	67%	75%	29%
JN152	57%	79%	35%
JN158	51%	79%	38%
JN159	67%	68%	27%
JN161	51%	82%	39%
JN162	63%	73%	31%
JN165	55%	77%	38%
JN166	63%	69%	30%
JN167	53%	83%	42%
JN168	71%	71%	31%
JN178	50%	83%	42%
JN179	45%	83%	41%
JN180	39%	92%	51%
JN181	38%	96%	52%
JN182	41%	92%	50%
JN183	57%	77%	37%
JN184	58%	92%	46%
JN226	59%	84%	41%

Ejemplo 5

Actividad a pH

Se diluyeron enzimas purificadas con tampón de acetato de sodio 20 mM de pH 5,5 a una concentración aproximada de 2 rASNU/mL. Se añadieron 10 µL de solución de enzima a 100 µL de solución sustrato preincubada con pH diferente preparada por mezcla de 2 vols. de solución sustrato del ensayo rASNU y volumen igual de tampón Britton-Robinson 200 mM (pH 2,5 - 11,5). Después de 20 min de incubación a 50°C, la reacción se paró por adición de 100 µL de solución de parada y se midió la absorbancia a 490 nm.

Tabla 5: Actividad a pH

Variante No.	Actividad a pH
	pH5/pH6,5 a 50°C
Tipo salvaje	36%
JN065	41%

Variante No.	Actividad a pH
	pH5/pH6,5 a 50°C
JN070	44%
JN102	45%
JN117	47%
JN135	29%
JN140	50%
JN145	43%
JN148	44%
JN152	52%
JN158	53%
JN159	45%
JN161	55%
JN162	45%
JN165	61%
JN166	51%
JN167	59%
JN168	53%
JN178	59%
JN179	57%
JN180	64%
JN181	62%
JN182	58%
JN183	60%
JN184	55%
JN226	62%

Ejemplo 6

Estabilidad a pH a 70°C

La enzima purificada se diluyó con SAPP al 0,5% de pH 4,0- 7,0 (el pH se ajustó utilizando HCl o NaOH) a una concentración aproximada de 6 rASNU/mL. Se transfirieron 50 µL de solución diluida de enzima a una placa PCR de 96 pocillos y se incubaron a 70°C durante 2 horas. Inmediatamente después de la incubación, se añadieron 10 µL de solución incubada a 100 µL de solución sustrato preincubada del ensayo rASNU en una placa de 96 pocillos y se incubaron a 50°C durante 20 min. La reacción se paró por adición de 100 µL de solución de parada y se midió la absorbancia a 490 nm. La actividad residual se determinó utilizando la actividad de una muestra similar incubada a 25 °C como control.

Tabla 6: Estabilidad al pH

Variante No.	Estabilidad al pH a 70°C, 2h			
	pH4	pH5	pH6	pH7
Tipo Salvaje	0%	0%	0%	0%
JN065	10%	12%	0%	0%
JN070	68%	55%	0%	0%

Variante No.	Estabilidad al pH a 70°C, 2h			
	pH4	pH5	pH6	pH7
JN102	62%	64%	0%	0%
JN117	77%	78%	0%	0%
JN135	93%	94%	10%	0%
JN140	74%	77%	28%	0%
JN145	93%	99%	46%	0%
JN148	77%	80%	44%	0%
JN152	91%	92%	27%	0%
JN158	93%	98%	73%	0%
JN159	87%	91%	69%	0%
JN161	98%	100%	94%	74%
JN162	98%	102%	93%	1%
JN165	98%	100%	84%	2%
JN166	95%	98%	81%	0%
JN167	105%	103%	92%	40%
JN168	108%	105%	95%	12%
JN178	105%	106%	99%	37%
JN179	109%	104%	94%	4%
JN180	109%	116%	102%	74%
JN181	110%	112%	100%	38%
JN182	109%	112%	101%	74%
JN183	106%	104%	98%	75%
JN184	94%	84%	54%	0%
JN226	99%	99%	92%	80%

Ejemplo 7

Estabilidad térmica de la enzima en SAPP al 0,5%

La enzima purificada se diluyó con dihidrógeno-pirofosfato de sodio (SAPP) al 0,5% de pH 5,0 a una concentración aproximada de 6 rASNU/mL. Se transfirieron 50 µL de solución diluida de enzima a una placa PCR de 96 pocillos y se incubaron a 70°C-80° C durante 4 horas utilizando un ciclador térmico. Inmediatamente después de la incubación, se añadieron 10 µL de solución incubada a 100 µL de solución sustrato preincubada del ensayo rASNU en una placa de 96 pocillos y se incubaron a 37 °C o 50°C durante 20 min. La reacción se paró por adición de 100 µL de solución de parada y se midió la absorbancia a 490 nm. La actividad residual se determinó utilizando la actividad de una muestra similar incubada a 25 °C como control.

TABLA 7: Actividad residual después de 4 horas

Variante No.	Actividad residual después de 4 horas en SAPP al 0,5%, pH5					
	70°C	72 °C	74 °C	76 °C	78 °C	80°C
Tipo salvaje	1%	1%				
JN065	1%	2%				
JN070	35%	1%	2%	1%	1%	
JN102	53%	6%	2%	2%	1%	

Variante No.	Actividad residual después de 4 horas en SAPP al 0,5%, pH5					
	70°C	72 °C	74 °C	76 °C	78 °C	80°C
JN117	61%	6%	1%	1%	1%	
JN135	88%	72%	21%	1%	1%	
JN140	67%	52%	21%	2%	1%	
JN145	90%	71%	17%	2%	1%	
JN148	74%	62%	26%	2%	1%	
JN152	79%	67%	25%	0%	0%	
JN158	93%	79%	67%	43%	2%	
JN159	86%	75%	47%	3%	0%	
JN161	100%	99%	95%	77%	71%	
JN162	102%	97%	91%	50%	1%	
JN165	98%	92%	80%	64%	37%	
JN166	100%	95%	85%	61%	9%	
JN167	103%	101%	97%	82%	68%	
JN168	104%	97%	87%	72%	25%	
JN178	103%	103%	99%	92%	78%	33%
JN179	93%	87%	81%	74%	53%	10%
JN180	100%	106%	104%	96%	83%	64%
JN181	100%	100%	96%	87%	72%	35%
JN182	101%	102%	99%	94%	76%	59%
JN183	99%	100%	98%	94%	76%	62%
JN184	94%	87%	64%	48%	22%	0%
JN226	100%	103%	102%	96%	90%	76%

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novozymes A/S

<130> 12475-WO-PCT
<160> 6
<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 1137
<212> DNA
<213> Aspergillus oryzae

<400> 1
atgggtgtca atttcaaagt tcttgccctg tcggccttag ctactattag ccatgcttcg 60
cctctcctat atcctcgagc cacagactcg aacgtcacct atgtgttcac caaccccaat 120
ggcctgaact ttactcagat gaacaccacc ctgccaaacg tcactatctt cgcgacaggc 180
ggcacaatcg cgggctccag cgccgacaac accgcaacaa caggttacaa agccggtgca 240
gtcggcatcc agacactgat cgacgcggtc ccggaaatgc taaacgttgc caacgtcgct 300
ggcgtgcaag taaccaatgt cggcagccca gacatcacct ccgacattct cctgcgtctc 360
tccaaacaga tcaacgaggt ggtctgcaac gaccccacca tggccggtgc agtggtcacc 420
cacggcaccg acacgctcga agaatccgcc ttcttcctcg acgccacggt caactgtcgc 480
aagcccgtgg tcatcgtcgg cgccatgcgc ccttcaaccg ccatctcggc tgacggcccc 540
ctcaacctcc tgcaatccgt caccgtcgcc gcgagcccca aggcccgaga ccgcggcgcc 600
ctgattgtca tgaacgaccg catcgtatcc gccttctacg cctccaagac gaacgccaac 660
accgtcgata cattcaaggc catcgaaatg ggtaacctgg gcgaggtcgt ctccaacaaa 720
ccctacttct tctacccccc agtcaagcca acaggcaaga cggaagtaga tatccggaac 780
atcacctcca tccccagagt cgacatcctc tactcatacg aagacatgca caatgacacc 840
ctttactccg ccatcgacaa cggcgcaaag ggcatcgtta tcgccggctc cggctccggc 900
tccgtctcca cccccttcag cgccgccatg gaagacatca caaccaaaca caacatcccc 960
atcgtagcca gcacgcgcac cggaaacggg gaggtgccgt cctccgccga gtcgagccag 1020
atcgcaagcg ggtatttgaa ccccgcaaag tcacgcgttt tgcttggctt gttgcttgcc 1080
caggggaaga gtattgagga aatgagggcg gtttttgagc ggattggggt tgcttga 1137

<210> 2
<211> 378
<212> PRT
<213> Aspergillus oryzae

<400> 2
Met Gly Val Asn Phe Lys Val Leu Ala Leu Ser Ala Leu Ala Thr Ile 1
5 10 15
Ser His Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Pro Arg Ala Thr Asp Ser Asn Val
20 25 30
Thr Tyr Val Phe Thr Asn Pro Asn Gly Leu Asn Phe Thr Gln Met Asn 35
40 45
Thr Thr Leu Pro Asn Val Thr Ile Phe Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala 50
55 60
Gly Ser Ser Ala Asp Asn Thr Ala Thr Thr Gly Tyr Lys Ala Gly Ala 65
70 75 80
Val Gly Ile Gln Thr Leu Ile Asp Ala Val Pro Glu Met Leu Asn Val 85
90 95
Ala Asn Val Ala Gly Val Gln Val Thr Asn Val Gly Ser Pro Asp Ile 100
105 110
Thr Ser Asp Ile Leu Leu Arg Leu Ser Lys Gln Ile Asn Glu Val Val 115
120 125
Cys Asn Asp Pro Thr Met Ala Gly Ala Val Val Thr His Gly Thr Asp 130
135 140
Thr Leu Glu Glu Ser Ala Phe Phe Leu Asp Ala Thr Val Asn Cys Arg 145
150 155 160
Lys Pro Val Val Ile Val Gly Ala Met Arg Pro Ser Thr Ala Ile Ser 165
170 175
Ala Asp Gly Pro Leu Asn Leu Leu Gln Ser Val Thr Val Ala Ala Ser 180
185 190
Pro Lys Ala Arg Asp Arg Gly Ala Leu Ile Val Met Asn Asp Arg Ile 195
200 205

Val Ser Ala Phe Tyr Ala Ser Lys Thr Asn Ala Asn Thr Val Asp Thr 210
215 220
Phe Lys Ala Ile Glu Met Gly Asn Leu Gly Glu Val Val Ser Asn Lys 225
230 235 240
Pro Tyr Phe Phe Tyr Pro Pro Val Lys Pro Thr Gly Lys Thr Glu Val 245
250 255
Asp Ile Arg Asn Ile Thr Ser Ile Pro Arg Val Asp Ile Leu Tyr Ser 260
265 270
Tyr Glu Asp Met His Asn Asp Thr Leu Tyr Ser Ala Ile Asp Asn Gly 275
280 285
Ala Lys Gly Ile Val Ile Ala Gly Ser Gly Ser Gly Ser Val Ser Thr
290 295 300
Pro Phe Ser Ala Ala Met Glu Asp Ile Thr Thr Lys His Asn Ile Pro
305 310 315 320
Ile Val Ala Ser Thr Arg Thr Gly Asn Gly Glu Val Pro Ser Ser Ala
325 330 335
Glu Ser Ser Gln Ile Ala Ser Gly Tyr Leu Asn Pro Ala Lys Ser Arg
340 345 350
Val Leu Leu Gly Leu Leu Leu Ala Gln Gly Lys Ser Ile Glu Glu Met
355 360 365
Arg Ala Val Phe Glu Arg Ile Gly Val Ala
370 375

<210> 3
<211> 1137
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Variante

<400> 3
atgggtgtca atttcaaagt tcttgccctg tcggccttag ctactattag ccatgcttcg 60
cctctcctat atcctcgagc cacagactcg aacgtcacct atgtgttcac caaccccaat 120
ggcctgaact ttactcagat gaacaccacc ctgccaaacg tcactatctt cgcgacaggc 180
ggcacaatcg cgggctccag cgccgacaag accgcaacaa caggttacaa agccggtgca 240
gtcggcatcc agacactgat cgacgcggtc ccggaaatgc taaacgttgc caacgtcgct 300
ggcgtgcaag taaccaatgt cggcagccca gacatcacct ccgacattct cctgcgtctc 360
tccaaacaga tcaacgaggt ggtctgcaac gaccccacca tggccggtgc agtggtcacc 420
cacggcaccg acacgctcga agaatccgcc ttcttcctcg acgccacggt caactgtcgc 480
aagcccgtgg tcatcgtcgg cgccatgcgc ccttcaaccg ccatctcggc tgacggcccc 540
ctcaacctcc tgcaatccgt caccgtcgcc gcgagcccca aggcccgaga ccgcggcgcc 600
ctgattgtca tgaacgaccg catcgtatcc gccttctacg cctccaagac gaacgccaac 660
accgtcgata cattcaaggc catcgaaatg ggtaacctgg gcgaggtcgt ctccaacaaa 720
ccctacttct tctacccccc agtcaagcca acaggcaaga cggaagtaga tatccggaac 780
atcacctcca tccccagagt cgacatcctc tactcatacg aagacatgca caatgacacc 840
ctttactccg ccatcgacaa cggcgcaaag ggcatcgtta tcgccggctc cggctccggc 900
tccgtctcca cccccttcgc ggccgccatg gaagacatca caaccaaaca caacatcccc 960
atcgtacgca gcacccgcgt cggaaacggg gaggtgccgt cctccgccga gtcgagccag 1020
atcgcaagcg ggtatttgaa cccccagaag gcccgcatct tgcttggctt gttgcttgcc 1080
caggggaaga gtattgagga aatgagggcg gtttttgagc ggattggggt tgcttga 1137

<210> 4
<211> 378
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Variante

<400> 4
Met Gly Val Asn Phe Lys Val Leu Ala Leu Ser Ala Leu Ala Thr Ile 1
5 10 15
Ser His Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Pro Arg Ala Thr Asp Ser Asn Val
20 25 30
Thr Tyr Val Phe Thr Asn Pro Asn Gly Leu Asn Phe Thr Gln Met Asn
35 40 45

Thr Thr Leu Pro Asn Val Thr Ile Phe Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala
50 55 60
Gly Ser Ser Ala Asp Lys Thr Ala Thr Thr Gly Tyr Lys Ala Gly Ala
65 70 75 80
Val Gly Ile Gln Thr Leu Ile Asp Ala Val Pro Glu Met Leu Asn Val
85 90 95
Ala Asn Val Ala Gly Val Gln Val Thr Asn Val Gly Ser Pro Asp Ile
100 105 110
Thr Ser Asp Ile Leu Leu Arg Leu Ser Lys Gln Ile Asn Glu Val Val
115 120 125
Cys Asn Asp Pro Thr Met Ala Gly Ala Val Val Thr His Gly Thr Asp
130 135 140
Thr Leu Glu Glu Ser Ala Phe Phe Leu Asp Ala Thr Val Asn Cys Arg
145 150 155 160
Lys Pro Val Val Ile Val Gly Ala Met Arg Pro Ser Thr Ala Ile Ser
165 170 175
Ala Asp Gly Pro Leu Asn Leu Leu Gln Ser Val Thr Val Ala Ala Ser
180 185 190
Pro Lys Ala Arg Asp Arg Gly Ala Leu Ile Val Met Asn Asp Arg Ile
195 200 205
Val Ser Ala Phe Tyr Ala Ser Lys Thr Asn Ala Asn Thr Val Asp Thr
210 215 220
Phe Lys Ala Ile Glu Met Gly Asn Leu Gly Glu Val Val Ser Asn Lys
225 230 235 240
Pro Tyr Phe Phe Tyr Pro Pro Val Lys Pro Thr Gly Lys Thr Glu Val
245 250 255
Asp Ile Arg Asn Ile Thr Ser Ile Pro Arg Val Asp Ile Leu Tyr Ser
260 265 270
Tyr Glu Asp Met His Asn Asp Thr Leu Tyr Ser Ala Ile Asp Asn Gly
275 280 285
Ala Lys Gly Ile Val Ile Ala Gly Ser Gly Ser Gly Ser Val Ser Thr
290 295 300
Pro Phe Ala Ala Ala Met Glu Asp Ile Thr Thr Lys His Asn Ile Pro
305 310 315 320
Ile Val Arg Ser Thr Arg Val Gly Asn Gly Glu Val Pro Ser Ser Ala
325 330 335
Glu Ser Ser Gln Ile Ala Ser Gly Tyr Leu Asn Pro Gln Lys Ala Arg
340 345 350
Ile Leu Leu Gly Leu Leu Leu Ala Gln Gly Lys Ser Ile Glu Glu Met
355 360 365
Arg Ala Val Phe Glu Arg Ile Gly Val Ala
370 375

<210> 5
<211> 1137
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante

<400> 5
atgggtgtca atttcaaagt tcttgccctg tcggccttag ctactattag ccatgcttcg 60
cctctcctat atcctcgagc cacagactcg aacgtcacct atgtgttcac caaccccaat 120
ggcctgaact ttactcagat gaacaccacc ctgccaaacg tcactatctt cgcgacaggc 180
ggcacaatcg cgggctccag cgccgacaag accgcaacaa caggttacaa agccggtgca 240
gtcggcatcc agacactgat cgacgcggtc ccggaaatgc taaacgttgc caacgtcgct 300
ggcgtgcaag taaccaatgt cggcagccca gacatcacct ccgacattct cctgcgtctc 360
tccaaacaga tcaacgaggt ggtctgcaac gaccccacca tggccggtgc agtggtcacc 420
cacggcaccg acacgctcga agaatccgcc ttcttcctcg acgccacggt caactgtcgc 480
aagcccgtgg tcatcgtcgg cgccatgcgc ccttcaaccg ccatctcggc tgacggcccc 540
ctcaacctcc tgcaatccgt caccgtcgcc gcgagcccca aggcccgaga ccgcggcgcc 600
ctgattgtca tgaacgaccg catcgtatcc gccttctacg cctccaagac gaacgccaac 660
accgtcgata cattcaaggc catcgaaatg ggtaacctgg gcgaggtcgt ctccaacaaa 720
ccctacttct tctacccccc agtcaagcca acaggcaaga cggaagtaga tatccggaac 780
atcacctcca tccccagagt cgacatcctc tactcatacg aagacatgca caatgacacc 840
ctttactccg ccatcgacaa cggcgcaaag ggcatcgtta tcgccggctc cggctccggc 900

tccgtctcca cccccttcag cgccgccatg gaagacatca caaccaaaca caacatcccc 960
atcgtacgca gcacccgcgt cggaaacggg gaggtgccgt cctccgccga gtcgagccag 1020
atcgcaagcg ggtatttgaa cccccagaag gcccgcatct tgcttggctt gttgcttgcc 1080
caggggaaga gtattgagga aatgagggcg gtttttgagc ggattggggt tgcttga 1137

<210> 6
<211> 378
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Variante

<400> 6
Met Gly Val Asn Phe Lys Val Leu Ala Leu Ser Ala Leu Ala Thr Ile 1
5 10 15
Ser His Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Pro Arg Ala Thr Asp Ser Asn Val
20 25 30
Thr Tyr Val Phe Thr Asn Pro Asn Gly Leu Asn Phe Thr Gln Met Asn
35 40 45
Thr Thr Leu Pro Asn Val Thr Ile Phe Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala
50 55 60
Gly Ser Ser Ala Asp Lys Thr Ala Thr Thr Gly Tyr Lys Ala Gly Ala
65 70 75 80
Val Gly Ile Gln Thr Leu Ile Asp Ala Val Pro Glu Met Leu Asn Val
85 90 95
Ala Asn Val Ala Gly Val Gln Val Thr Asn Val Gly Ser Pro Asp Ile
100 105 110
Thr Ser Asp Ile Leu Leu Arg Leu Ser Lys Gln Ile Asn Glu Val Val
115 120 125
Cys Asn Asp Pro Thr Met Ala Gly Ala Val Val Thr His Gly Thr Asp
130 135 140Thr Leu Glu Glu Ser Ala Phe Phe
Leu Asp Ala Thr Val Asn Cys Arg 145 150 155 160
Lys Pro Val Val Ile Val Gly Ala Met Arg Pro Ser Thr Ala Ile Ser 165
170 175
Ala Asp Gly Pro Leu Asn Leu Leu Gln Ser Val Thr Val Ala Ala Ser 180
185 190
Pro Lys Ala Arg Asp Arg Gly Ala Leu Ile Val Met Asn Asp Arg Ile 195
200 205
Val Ser Ala Phe Tyr Ala Ser Lys Thr Asn Ala Asn Thr Val Asp Thr 210
215 220
Phe Lys Ala Ile Glu Met Gly Asn Leu Gly Glu Val Val Ser Asn Lys 225
230 235 240
Pro Tyr Phe Phe Tyr Pro Pro Val Lys Pro Thr Gly Lys Thr Glu Val 245
250 255
Asp Ile Arg Asn Ile Thr Ser Ile Pro Arg Val Asp Ile Leu Tyr Ser 260
265 270
Tyr Glu Asp Met His Asn Asp Thr Leu Tyr Ser Ala Ile Asp Asn Gly 275
280 285
Ala Lys Gly Ile Val Ile Ala Gly Ser Gly Ser Gly Ser Val Ser Thr 290
295 300
Pro Phe Ser Ala Ala Met Glu Asp Ile Thr Thr Lys His Asn Ile Pro 305
310 315 320
Ile Val Arg Ser Thr Arg Val Gly Asn Gly Glu Val Pro Ser Ser Ala 325
330 335
Glu Ser Ser Gln Ile Ala Ser Gly Tyr Leu Asn Pro Gln Lys Ala Arg 340
345 350
Ile Leu Leu Gly Leu Leu Leu Ala Gln Gly Lys Ser Ile Glu Glu Met 355
360 365
Arg Ala Val Phe Glu Arg Ile Gly Val Ala 370
375

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un producto alimenticio de base vegetal tratado térmicamente que comprende:
(a) poner en contacto un material alimenticio de base vegetal con asparaginasa a una temperatura de 67-75 °C;
(b) secar el material alimenticio de base vegetal a una temperatura del aire de 40 a 90°C; y
(c) tratar térmicamente el material alimenticio de base vegetal tratado con asparaginasa para obtener el producto alimenticio de base vegetal tratado térmicamente;
en donde la asparaginasa tiene una actividad residual después de 4 horas de incubación en agua desionizada con SAPP al 0,5% a 70°C, pH 5, de al menos 20%, con preferencia al menos 40%, más preferiblemente al menos 60%, todavía más preferiblemente al menos 80%, de la actividad sin tal incubación; y en donde la asparaginasa tiene una actividad a 35 °C, pH 6, de al menos 20%, preferiblemente al menos 30%, y más preferiblemente al menos 35%, de su actividad a 50°C, pH 6.

2. El método de la reivindicación 1 en donde el material alimenticio de base vegetal son palitos de patata y el producto alimenticio de base vegetal tratado térmicamente son patatas fritas.

3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el paso (a) es inmersión de un material alimenticio de base vegetal en una solución de asparaginasa que tiene una temperatura de 67-75 °C, preferiblemente 68-72 °C, más preferiblemente 70°C.

4. El método de la reivindicación 3, en el cual la solución de asparaginasa comprende asparaginasa a una concentración de 1000 a 100.000 ASNU/L, preferiblemente 5.000 a 50.000 ASNU/L, más preferiblemente 10.000 a 30.000 ASNU/L.

5. El método de la reivindicación 4, en el cual la solución de asparaginasa comprende además pirofosfato ácido de sodio a una concentración de 0,05 a 5%, preferiblemente 0,1 a 1,5%, más preferiblemente 0,5 a 1%.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en el cual la inmersión es durante un tiempo de 1 segundo a 10 min, preferiblemente 30seg a 3 min.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual el material alimenticio de base vegetal se ha escaldado antes del paso (a).

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual el secado en el paso (b) se realiza a una temperatura del aire de 55 a 85 °C, preferiblemente 65 a 75 °C.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual la temperatura de la superficie del material alimenticio de base vegetal durante el secado en el paso (b) es 25 a 60°C, preferiblemente 35 a 50°C.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual el secado en el paso (b) se realiza durante entre 5 y 30 min.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual el contenido de acrilamida del producto alimenticio de base vegetal tratado térmicamente se ha reducido al menos 25%, preferiblemente al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45% o al menos 50%, comparado con el contenido de acrilamida de un producto alimenticio de base vegetal tratado térmicamente producido por un método similar sin la adición de asparaginasa.

12 . Uso de asparaginasa para tratamiento de un material alimenticio de base vegetal a una temperatura de 67-75°C; en el cual la asparaginasa tiene una actividad residual después de 4 horas de incubación en agua desionizada con SAPP al 0,5% a 70°C, pH 5, de al menos 20%, preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente al menos 60%, todavía más preferiblemente al menos 80%, de la actividad sin tal incubación; y en donde la asparaginasa tiene una actividad a 35°C, pH 6, de al menos 20%, preferiblemente al menos 30%, más preferiblemente al menos 35%, de su actividad a 50°C, pH 6.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o el uso de la reivindicación 12 en el cual la asparaginasa tiene una actividad a 70°C, pH 6, de al menos 20%, preferiblemente al menos 25%, más preferiblemente al menos 30%, de su actividad a 50°C, pH 6.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 ó 13 o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 12-13 en el cual la asparaginasa es una variante de asparaginasa que comprende una sustitución en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 122, 140,197, 238, 239, 240, 241, 253, 258, 259, 297 ó 373 de SEQ ID NO: 2, y que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 50% idéntica a cualquiera de SEQ ID NOs: 2 ó 4.

15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 ó 13 o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 12-13 en el cual la asparaginasa es una variante de asparaginasa que comprende (i) una o más de las sustituciones siguientes, en donde cada posición corresponde a una posición en SEQ ID NO: 2: T71C, T74A, T74C, K122A, K122R, V139G, T140D, K194L, D197E, I228M, S238C, N239C, K240R, P241E, K253R, I258V, I258Y, R259C, R259V, S297V, S299A, T314A, P333L, S334P, S334W, E337S, S338G, S338W, G356D, K363R o E373H, o (ii) una deleción en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 27, 28 ó 29 de SEQ ID NO: 2; en donde la variante de asparaginasa tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 50% idéntica a cualquiera de SEQ ID NOs: 2 ó 4, preferiblemente al menos 60%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% idéntica a cualquiera de SEQ ID NOs: 2 ó 4.