



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Producción de L-asparaginasa intracelular en *Bacillus*
sp. CH11 halotolerante en cultivo discontinuo**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biotecnología

AUTOR

Stephy SAAVEDRA BOCANEGRA

ASESOR

Dra. Amparo Iris ZAVALETA PESANTES

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Saavedra, S. (2021). *Producción de L-asparaginasa intracelular en Bacillus sp. CH11 halotolerante en cultivo discontinuo*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Stephy Saavedra Bocanegra
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	46634215
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-4867-7622
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Amparo Iris Zavaleta Pesantes
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	17880045
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-3844-7185
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Víctor Crispín Pérez
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07363013
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Carol Flores Fernández
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	46430930
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Celia Bertha Vargas De La Cruz
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	42354741
Miembro del jurado 3	
Nombres y apellidos	Amparo Iris Zavaleta Pesantes
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	17880045

Datos de investigación	
Línea de investigación	B.2.6.2. Biotecnología Industrial
Grupo de investigación	Biotecnología Microbiana y Salud - BIOMIAS
Agencia de financiamiento	Perú. Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (CONCYTEC). Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (Fondecyt). CONVENIO N° 169 - FONDECYT – 2017.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Farmacia y Bioquímica, Laboratorio de Biología Molecular País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Calle: Jr. Puno N°1002 Latitud: -12.05572 Longitud: -77.02324
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2018-2020
URL de disciplinas OCDE	Bioquímica, Biología molecular https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03 Tecnologías de bioprocesamiento, Biocatálisis, Fermentación https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.09.02



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado



**ACTA DE SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS PARA OPTAR
AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**

Siendo las **10:00 hrs. del 22 de diciembre de 2021** se reunieron mediante la plataforma de Google meet de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Evaluador de tesis, presidido por el Dr. Víctor Crispín Pérez e integrado por los siguientes miembros: Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes (Asesora), Mg. Carol Flores Fernández y Mg. Celia Bertha Vargas De La Cruz; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"Producción de L-asparaginasa intracelular en Bacillus sp. CH11 halotolerante en cultivo discontinuo"**, presentado por la Bachiller en Ciencia y Tecnología de los Alimentos **Stephy Saavedra Bocanegra**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la Tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Biotecnología**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.

A continuación, el Jurado Evaluador de Tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

19 (Diecinueve) Excelente

Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue a la Bachiller en Ciencia y Tecnología de los Alimentos **Stephy Saavedra Bocanegra**, el Grado Académico de Magister en **Biotecnología**.

Siendo las 11:00 hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las 11:5 hrs. del 22 de diciembre de 2021.

.....
Dr. Víctor Crispín Pérez (P.P., T.P.)
Presidente

.....
Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes (P. P., T.C.)
Miembro - Asesora

.....
Mg. Celia Bertha Vargas De La Cruz (P. Aux. T.C.)
Miembro

.....
Mg. Carol Flores Fernández
Miembro

Observaciones:

.....

DEDICATORIA

A mi querida madre, July Bocanegra de la Cruz por su constante apoyo, sacrificio y amor incondicional.

A mis hermanos, Erick, Hellen y Etienne por sus consejos y apoyo en todos mis estudios universitarios.

A S.Y.M.P.V.Z por que han estado en todo momento a mi lado.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, la Dra. Amparo Zavaleta Pesantes, por sus grandes enseñanzas, paciencia y comprensión en todo momento; y por haber confiado en mi persona.

A los Dr. Adalberto Pessoa Jr. y Dra. Gisele Monteiro del Departamento de Tecnología Bioquímico-Farmacéutica, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de São Paulo, São Paulo, Brasil por aceptar una pasantía en su laboratorio y brindarme sus consejos y experiencias.

A Abad Hurtado y Juan Carlos Flores por haber formado parte del equipo de investigación y que sus conocimientos aportaron grandes logros al desarrollo de esta tesis.

A los miembros del laboratorio de Biología Molecular, en especial a la Dra. Karim Jiménez, Mg. Cynthia Esquerre, Mg. Carmen Peña, Mg. Elizabeth Chávez, Mg. Carol N. Flores, Mg Sayuri Kina, Cesar, Ysamar, Camila, Lucero, Isabel, Eliana y Manuel por su apoyo y amistad.

A mis compañeros de la promoción ingresante 2018 de la maestría en Biotecnología, por su amistad incondicional, sus consejos y buenos deseos.

Al Jurado Examinador y Calificador por el apoyo brindado en la revisión de este trabajo de investigación.

**Este trabajo de investigación fue
financiado por el convenio N° 169 -
Fondecyt - 2017**

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	2
LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
LISTA DE TABLAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN	13
1.3. Objetivos.....	14
CAPITULO II: MARCO TEÓRICO	15
2.1. Antecedentes.....	15
2.2. Bases teóricas.....	16
2.2.1. Enzima L- asparaginasa.....	16
2.2.2. Producción de L-ASNasa por diferentes microorganismos.....	21
2.2.3. L-ASNasas disponibles en el tratamiento de LLA.....	22
2.2.4. Estrategias para superar las limitaciones en el uso de las L-ASNasas	23
CAPITULO III: METODOLOGÍA.....	28
3.1 Materiales, reactivos y equipos.....	28
3.2 Métodos analíticos.....	28
3.2.1 Actividad L-ASNasa	28
3.2.2 Determinación de biomasa.....	28
3.2.3 Ensayo cuantitativo de actividad proteolítica	29
3.2.4 Cuantificación de proteínas totales.....	29
3.2.5 Rompimiento celular por sonicación	29
3.3 Metodología experimental.....	30
3.3.1 Microorganismos	30
3.3.2 Selección de cepas con actividad L-ASNasa extracelular	30
3.3.3 Producción de L-ASNasa en matraces.....	31
3.3.4 Determinación de condiciones de cultivo de <i>Bacillus sp</i> CH11	35
3.4. Análisis estadístico	37
CAPITULO IV: RESULTADOS	38
4.1 Selección de cepa	38

4.2	<i>Screening</i> de cepas productoras de L-ASNasa extracelular	39
4.3	Evaluación de nutrientes en el crecimiento de <i>Bacillus</i> sp CH11 por Plackett-Burman	41
4.4	Efecto de las proteasas sobre la actividad L-ASNasa	43
4.5	Producción de actividad L-ASNasa intracelular	46
4.6	Determinación de condiciones de crecimiento de <i>Bacillus</i> sp CH11	50
CAPITULO V: DISCUSIÓN.....		54
CAPITULO VI: CONCLUSIONES		61
CAPITULO VIII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		62
CAPITULO VIII: ANEXOS.....		72

LISTA DE ABREVIATURAS

Ácido bicinconínico:	BCA
Ácido etilendiaminotetraacético:	EDTA
Administración de Medicamentos y Droga:	FDA
Agencia de Medicina de Europa:	AME
Aminoácido:	aa
Aspartato:	Asp
Atributos críticos de calidad:	CQA
Clonación independiente de ligación:	CIL
Erwinia chrysanthemi:	ErA
Fluoruro de fenilmetilsufonil:	PMSF
Fumarate nitrate reduction:	Fnr
Glutamina:	Gln
Glutación reductasa:	gor
Intracelular:	IC
L-ASNasa de <i>Escherichia coli</i> :	EcA
L-asparagina:	L-Asn
L-asparaginasa:	L-ASNasa
Leucemia Linfoblástica Aguda:	LLA
Luria Bertani:	LB
Proteína receptora de cAMP	Crp
Punto isoeléctrico:	pI
Reacción en cadena de la polimerasa:	PCR
Tiorredoxina reductasa:	trxB
Unión Europea:	UE

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de L-ASNasas comerciales	23
Tabla 2. K_M de L-ASNasas según sustrato	24
Tabla 3. Cepas de <i>Bacillus</i> sp productoras de L-ASNasa aisladas de ambientes salinos del Perú(67)	30
Tabla 4. Componentes de medio de cultivo empleados para la producción de L-ASNasa (g/L)	32
Tabla 5. Evaluación de nutrientes para el diseño Plackett-Burman	33
Tabla 6. Concentración de nutrientes evaluados en el diseño Plackett-Burman	33
Tabla 7. Matriz del diseño Plackett-Burman	33
Tabla 8. Diseño Factorial 2^3 en la producción de L-asparaginasa por <i>Bacillus</i> sp CH11 ...	36
Tabla 9. Cuantificación de actividad L-ASNasa de cepas de <i>Bacillus</i> sp en azul de bromotimol y rojo de fenol en cultivo sumergido	38
Tabla 10. Análisis de varianza (ANOVA) del <i>screening</i> de producción de L-ASNasa extracelular	40
Tabla 11. Prueba de Tukey del <i>screening</i> de producción de L-ASNasa extracelular de <i>Bacillus</i> sp halotolerantes	40
Tabla 12. Análisis de varianza del diseño Plackett-Burman del cultivo de <i>Bacillus</i> sp CH11	42
Tabla 13. Efecto de la actividad proteasa sobre la actividad de L-ASNasa de <i>E. coli</i>	44
Tabla 14. Análisis de varianza del efecto de proteasas de cepas de <i>Bacillus</i> sp sobre la actividad de L-ASNasa de <i>E. coli</i>	44
Tabla 15. Prueba de Tukey	45
Tabla 16. Prueba de Tukey	45
Tabla 17. Prueba de Dunnett	46
Tabla 18. Actividad L-ASNasa intracelular de cepas de <i>Bacillus</i> sp halotolerantes.....	46
Tabla 19. Análisis de varianza de la producción intracelular de L-ASNasa de cepas de <i>Bacillus</i> sp halotolerantes	47
Tabla 20. Prueba de Tukey	47
Tabla 21. Diseño factorial de pH, temperatura y agitación en el cultivo de <i>Bacillus</i> sp CH11	51
Tabla 22. Análisis de varianza del diseño factorial 2^3	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de acción de L- Asparaginasa. Tomado de Ulu y Ates (2017).....	17
Figura 2. Acción antineoplásica de L-asparaginasa. Tomado de Cachumba et al. (2016)..	17
Figura 3. Dependencia crítica entre en el suministro de L-glutamina para la biosíntesis de L-asparagina. Tomado de Richards et al. (2006).....	18
Figura 4. Estructura 3D de L-ASNasa tipo II de <i>Bacillus subtilis</i> strain 168 – Base de datos SMR O34482 (ASPG2_BACSU).....	19
Figura 5. Localización y regulación de isoenzimas tipo I y II de L-ASNasa de <i>E. coli</i> . Tomado de Srikhanta et al. (2015).	21
Figura 6. Proceso de manufactura de productos biofarmacéuticos. Tomado de Jozala et al. (2016).....	25
Figura 7. Estrategia de desarrollo de L-ASNasas.....	27
Figura 8. Actividad L-ASNasa de las cepas de <i>Bacillus</i> sp halotolerantes en el medio M9 modificado con extracto de malta.....	39
Figura 9. Actividad proteolítica de las cepas de <i>Bacillus</i> sp halotolerantes productoras de L-ASNasa.	41
Figura 10. Producción de biomasa de <i>Bacillus</i> sp CH11 halotolerante según el diseño Plackett-Burman	42
Figura 11. Factores que influyen sobre la producción de biomasa de <i>Bacillus</i> sp CH11 ...	43
Figura 12. Producción de L-ASNasa (A) y proteasas (B) en cepas <i>Bacillus</i> sp halotolerantes a partir de cultivos iniciados con alta concentración celular.....	48
Figura 13. Efecto de los ciclos sonicación/enfriamiento en la temperatura de la suspensión celular durante el rompimiento de <i>Bacillus</i> sp CH11. (A) Ciclos de sonicación a 5 s seguidos de ciclos de enfriamiento de 5 s sobre hielo (B) Ciclos de sonicación de 1 s seguidos de 5 s de enfriamiento sobre hielo. Muestra de DO600 50 (Δ) y 100 (\circ) en la suspensión celular.....	49
Figura 14. Comportamiento de la densidad óptica, actividad ASNasa y actividad específica de ASNasa luego del sonicado de una suspensión celular de <i>Bacillus</i> sp CH11 con DO 52.4.	49
Figura 15. Comportamiento de la densidad óptica y actividad proteasa luego del sonicado de una suspensión celular de <i>Bacillus</i> sp CH11 con DO ₆₀₀ 52.4.....	50
Figura 16. Curva de crecimiento de <i>Bacillus</i> sp CH11	51
Figura 17. Evaluación de pH, temperatura y agitación en la producción L-ASNasa IC por <i>Bacillus</i> sp CH11 en alta concentración celular inicial. E1: pH 5, 30 °C. E2: pH 7, 30 °C. E3: pH5, 37 °C. E4: pH7, 37 °C.....	52
Figura 18. Efecto de temperatura, pH y agitación sobre el cultivo de <i>Bacillus</i> sp CH11 ...	53

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	72
Anexo 2	74
Anexo 3	75
Anexo 4	76
Anexo 5	77

RESUMEN

L-asparaginasa hidroliza L-asparagina generando ácido aspártico y amonio; utilizada en la industria farmacéutica, alimentaria, y biomédica, producida por diversos microorganismos. Por esta razón, se investigó la producción de L-asparaginasa intracelular en *Bacillus* sp. CH11 halotolerante en cultivo discontinuo. Para ello, se realizó un *screening* en 13 cepas del género *Bacillus* aisladas de las salinas de Maras (Cusco), Chilca (Lima) y Pilluana (San Martín) en medios de producción de L-asparaginasa conteniendo colorantes indicadores de pH; 10 cepas fueron productoras de esta enzima. Después, se cuantificaron las actividades L-asparaginasa y proteasa por los métodos de hidroxilamina y azocaseína, tanto a nivel extracelular e intracelular. La producción de L-asparaginasa intracelular fue evidenciada en las cepas M68, P31, P4 y CH11, esta última fue seleccionada para determinar los efectos de la temperatura, el pH y la agitación sobre la producción de esta enzima en cultivos discontinuos. Así, *Bacillus* sp CH11 produjo L-asparaginasa intracelular $0,440 \pm 0,0505$ IU/mL en cultivos discontinuos a 37 °C, pH 5 y 200 rpm, tanto el pH como la agitación presentaron significancia en la producción de la enzima. En conclusión, *Bacillus* sp CH11 es una cepa promisoría para la producción de L-asparaginasa.

Palabras clave: L-asparaginasa, *Bacillus* sp, bacteria halotolerante, actividad L-asparaginasa.

ABSTRACT

L-asparaginase hydrolyzes L-asparagine generating aspartic acid and ammonium; used in the pharmaceutical, food, and biomedical industry, produced by various microorganisms. For this reason, the production of intracellular L-asparaginase was investigated in *Bacillus* sp. Halotolerant CH11 in batch culture. For this, a screening was carried out in 13 strains of the *Bacillus* genus isolated from the salt flats of Maras (Cusco), Chilca (Lima) and Pilluana (San Martín) in L-asparaginase production media containing pH indicator dyes; 10 strains were producers of this enzyme. Afterwards, the L-asparaginase and protease activities were quantified by the hydroxylamine and azocasein methods, both at the extracellular and intracellular level. The production of intracellular L-asparaginase was evidenced in strains M68, P31, P4 and CH11, the latter was selected to determine the effects of temperature, pH and agitation on the production of this enzyme in batch cultures. Thus, *Bacillus* sp CH11 produced intracellular L-asparaginase $0,440 \pm 0,0505$ IU / mL in batch cultures at 37 ° C, pH 5 and 200 rpm, both pH and shaking were significant in enzyme production. In conclusion, *Bacillus* sp CH11 is a promising strain for the production of L-asparaginase.

Keywords: L-asparaginase, *Bacillus* sp, halotolerant bacteria, L-asparaginase activity.

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

1.1. Situación problemática

Las enzimas son biocatalizadores de reacciones químicas y metabólicas con una alta especificidad por el o los sustrato (s), obtenidas de animales, vegetales o microorganismos que habitan en diversas altitudes y nichos ecológicos, tales como mares, andes, trópico, entre otro (1). Cabe destacar que las enzimas de bacterias, hongos y levaduras presentan alto potencial biotecnológico de gran valor para los sectores farmacéutico, médico, alimentario, cosmético, químico, para la obtención de diversos productos, procesos o servicios, con la finalidad de resolver diferentes necesidades humanas (2). No obstante, de las fuentes naturales se obtienen cantidades pequeñas (2,3); además, en la producción se generan impurezas y otras proteínas, provocando bajos rendimientos y grandes desafíos en la purificación.

Dentro del grupo de enzimas bacterianas, L-asparaginasa (L-ASNasa), es utilizada en los tratamientos de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) y otras enfermedades neoplásicas (4). Actualmente, se han reportado 53 000 casos de este tipo de neoplasias, los cuales son tratados con las L-ASNasa comerciales, a pesar de obtener buenos resultados, el 60 % de pacientes han presentado reacciones de hipersensibilidad (5); hepatotoxicidad, hiperglicemia, dislipidemia, pancreatitis, entre otros (6–8); estos problemas se han atribuido a la actividad dual de la enzima, es decir, presenta afinidad por L-asparagina y L-glutamina, que varía de afinidad de acuerdo a la fuente de procedencia (9,10).

Por otro lado, se ha descrito que L-ASNasa de *Bacillus* tiene una baja o nula actividad L-glutaminasa (GLNasa) (11,12); por lo que, la obtención de la enzima a partir de cepas de *Bacillus* sp. es una alternativa como agente terapéutico. Sin embargo, la mayoría de cepas de *Bacillus* producen exoproteasas y bajo rendimiento de la enzima de interés. La selección de cepas de *Bacillus* con alta producción de L-ASNasa y la determinación del medio de cultivo con las proporciones de carbono y nitrógeno adecuadas permitirán la producción de esta enzima para su caracterización y prospección biotecnológica.

Por todo lo anteriormente mencionado, es necesario seguir en la búsqueda de nuevas cepas y estrategias de producción para garantizar un proceso reproducible y escalable.

1.2. Justificación

L-ASNasa, es utilizada en enfermedades neoplásicas linfoides, producida por tecnología del ADN recombinante a partir de los genes de *E. coli*, *Erwinia carotovora* y *E. chrysantemi*. Asimismo, se ha descrito que el gen *ansZ* de *Bacillus* presenta secuencia aminoacídica similar a L-ASNasa tipo II de *E. coli* (13) y, además la enzima produce baja o nula actividad L-GLNasa, la cual está asociada con los efectos adversos que presentan los pacientes que sufren de LLA. La identificación de una o más cepas nativas del género *Bacillus* como potenciales productoras de L-ASNasa permite no solamente estudiar una enzima con nuevas propiedades farmacológicas; sino que, dependiendo del lugar de aislamiento, podrían conferirle ciertas modificaciones estructurales a las proteínas que actúen en condiciones adversas de temperaturas, pH y salinidad; y por ende presentarían nuevas características cinéticas (14), y potencial biotecnológico, tal es el caso de los aislados de ambientes salinos (15–17). Por otra parte, una de las enfermedades que causa alta morbilidad y mortalidad es el cáncer; por lo que, hay una demanda permanente de productos biofarmacéuticos; el 15 % son aplicados en problemas oncológico (18). En consecuencia, identificar una nueva L-ASNasa de *Bacillus* sp halotolerante permite conocer e inferir su potencial terapéutico.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

- ✓ Producir L-asparaginasa intracelular en *Bacillus* sp. CH11 halotolerante en cultivo discontinuo.

1.3.2. Objetivos específicos

- ✓ Seleccionar una cepa de *Bacillus* sp halotolerante productora de L- ASNasa.
- ✓ Determinar el medio de cultivo que estimule la mayor producción de L-asparaginasa por *Bacillus* sp CH11.
- ✓ Evaluar el efecto de la temperatura y el pH en la producción de L-asparaginasa intracelular por *Bacillus* sp CH11.

CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

En 1960, el ingreso al mercado de L-ASNasa de *E. coli*, como primera línea de terapia para pacientes que sufren de neoplasias linfoides (19) permitió un gran avance farmacológico, en la recuperación de los pacientes. Con el transcurso del tiempo y el avance de la biotecnología molecular se tuvo disponible la L-ASNasa recombinante a partir de *E. coli*, bajo el nombre comercial Elspar®. Sin embargo, a fines del año 2012, la comercialización de Elspar® dejó de tener continuidad por problemas de manufactura (20); lo que conllevó a replantear de acuerdo a las necesidades y evolución de los pacientes, nuevas formulaciones de L-ASNasas no recombinantes, de forma pegilada que derivaron de *E. coli* y *E. chrysantemi*, bajo los nombres comerciales Oncaspar® y Erwinaze®, respectivamente. No obstante, las empresas reportaron una baja productividad (21), que indujo a la búsqueda de nuevas tecnologías para obtener un mayor rendimiento. A esto se llegó a sumar, que los casos de LLA fueron cerca de 53000 a nivel mundial, y para el año 2020 se pronosticó aproximadamente 56000 casos nuevos (22).

Diversas investigaciones han sido realizadas sobre L-ASNasa de *Bacillus* sp, bacteria Gram positiva; en el año 2002, Fisher *et al.*(23) reportaron que *Bacillus subtilis* 168 contiene el gen *ansZ*, que codifica una L-ASNasa funcional. En el 2011, Ebrahiminezhad *et al.* (24), aislaron cepas de *Bacillus* sp de un ambiente salino de la India con actividad L-ASNasa intracelular y extracelular; donde la actividad enzimática estuvo en un rango de 0,17 a 1,28 UI/mL. Dos años después, Singh & Srivastav (2013)(25) investigaron una nueva cepa de *Bacillus aryabhatai* ITBHU02, para la producción de L-asparaginasa extracelular; dicha cepa tenía deficiencia de proteasas y su crecimiento óptimo se produjo a 37 °C y pH 7,5. La cepa fue capaz de producir la enzima con una actividad específica de 3,02 +/- 0,3 U/mg de proteína.

En el año 2016, Shirazian *et al.* (26) estudiaron la producción de L-ASNasa y L-GLNasa por bacterias halófilas aisladas del lago salado de Urmia; el 19% de cepas mostraron actividad L-ASNasa, y pertenecieron al género *Bacillus*; evidenciando que la mayor actividad fue L-ASNasa sin actividad L-GLNasa.

Por otro lado, Zolfaghar *et al.* (2019)(27) aislaron de diferentes ambientes salinos de Irán, cepas del género *Bacillus* donde el 23,5 % fueron capaces de producir L-ASNasa. Asimismo, Roy *et al.* (2019)(28) aislaron y purificaron una L-ASNasa extracelular de *Bacillus megaterium* MG1, donde la máxima producción de L-ASNasa se observó después de 24 h a pH 7,0 y a 37 °C. Por tanto, el estudio de cepas de *Bacillus* sp aisladas de ambientes salinos es una alternativa para la producción de L-ASNasa y para la producción a granel de esta enzima.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Enzima L- asparaginasa

a. Mecanismo de acción y función

L-ASNasa (EC 3.5.1.1) cataliza la desamidación de L-asparagina (L-Asn) en ácido aspártico y amonio (Figura 1 (29)). El mecanismo de acción es de tipo “Ping Pong”, es decir, realiza un doble desplazamiento, donde el grupo nucleofílico de la enzima ataca al grupo C_γ del sustrato formando un intermediario β-acil enzima, eliminando amoniaco como producto. De esta forma, la reacción ocurre en medio acuoso, el agua también ataca nucleofílicamente al intermediario β-acil enzima, donde se obtiene como segundo producto ácido aspártico, y la enzima queda libre (30).

Este mecanismo catalítico, generalmente lo ejercen las serin-proteasas, que presentan una triada catalítica conformada por tres aminoácidos (aa) aspartato (asp), histidina y serina (aa nucleofílico), ubicados en el sitio activo de la enzima, de esta manera ocurren las dos fases anteriormente mencionadas, fase de acilación y desacilación (4).

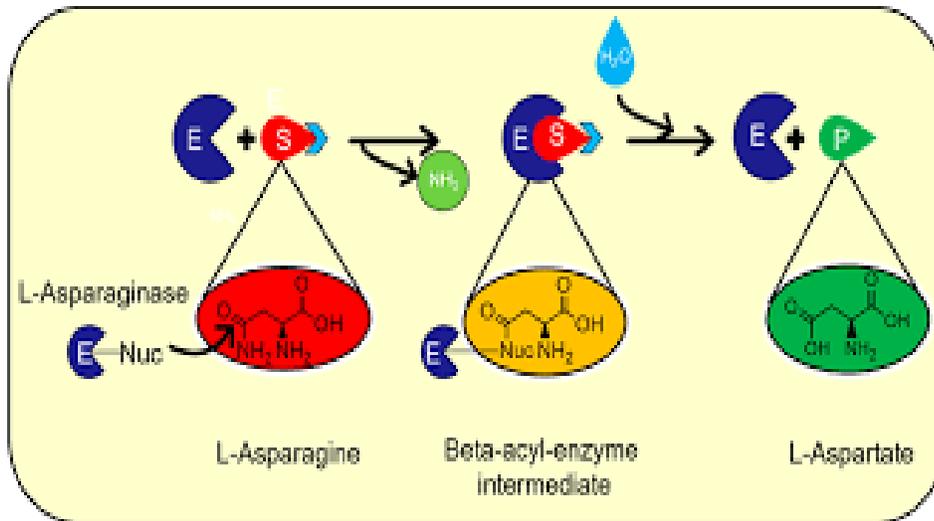


Figura 1. Mecanismo de acción de L- Asparaginasa.
Tomado de Ulu y Ates (2017).

La principal función que ejerce L-ASNasa es su acción farmacológica, los linfoblastos leucémicos y otras células tumorales requieren de L-Asn para su proliferación y supervivencia debido a que presentan bajos niveles de L-asparagina sintetasa; por ello, estas células dependen del suministro exógeno de L-Asn en sangre, considerándose auxótrofas para dicho aa. Así, mediante la hidrólisis de L-Asn, se suprime su disponibilidad en sangre y provoca la muerte de las células neoplásicas (31) (Figura 2)(4).

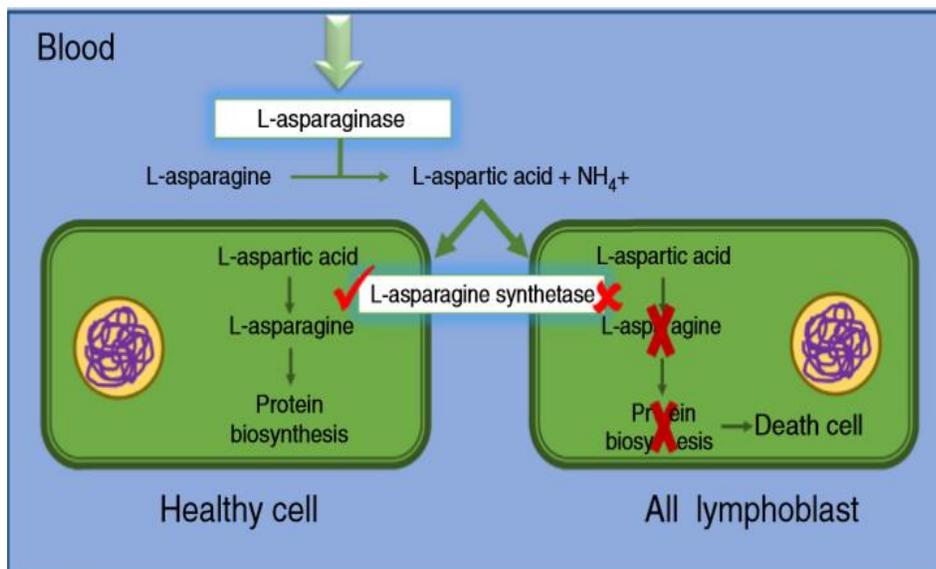


Figura 2. Acción antineoplásica de L-asparaginasa.
Tomado de Cachumba *et al.* (2016)

El uso de L-ASNasa como agente antineoplásico tiene algunos inconvenientes debido a su inestabilidad, en consecuencia presenta un menor efecto farmacológico, provocando una serie de reacciones adversas en los pacientes tales como alergias, shock anafiláctico, hipersensibilidad, entre otros (32). Asimismo, estos efectos secundarios pueden deberse a la actividad dual de L-ASNasa, es decir, que esta enzima tiene afinidad por L-asparagina y L-glutamina (Gln) (33); así, esta enzima hidroliza Gln generando una baja concentración de Gln en el plasma sanguíneo (31). Asimismo, se reporta que el grupo amino de Gln por un proceso de transaminación es cedido al aspartato generando Asn de Novo (34) (Figura 3, (33)), por lo que ocurre una dependencia crítica en el suministro de Gln para la biosíntesis de Asn (9). Por ello, la disminución del nivel de Gln debido a la exposición a L-ASNasa ayuda a bajar los niveles de Asn generando inhibición del crecimiento celular en los tratamientos contra el cáncer (35,36).

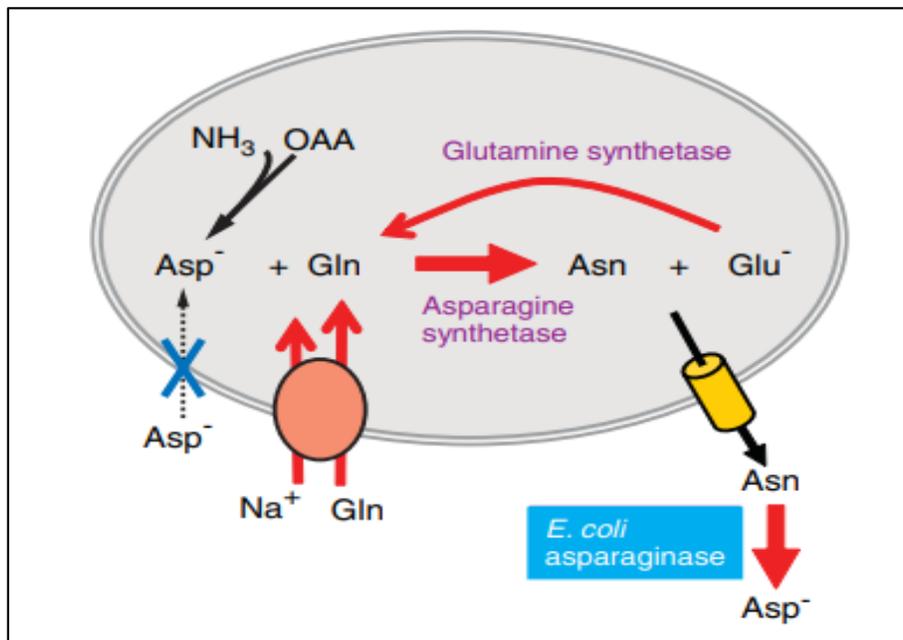


Figura 3. Dependencia crítica entre en el suministro de L-glutamina para la biosíntesis de L-asparagina. Tomado de Richards *et al.* (2006).

b. Características estructurales

L-ASNasa presenta determinadas características estructurales que varían de acuerdo a la fuente de donde proviene; su estructura tetramérica (Figura 4, (37)) presenta subunidades idénticas, cada una con un peso aproximado de 30 a 40 kDa; en su estado nativo, el peso molecular multimérico se estima en 130 kDa (38). Cada monómero presenta dos dominios a/p, y el sitio activo de la enzima se encuentra entre los dos dominios pertenecientes a diferentes monómeros (39), clasificándose así dentro de las proteínas alfa/beta (40).

La ubicación de los sitios activos está en los dominios N y C-terminales que pertenecen a diferentes subunidades y se atribuye un papel catalítico para Thr-89. Por otra parte, el contenido de aa oscila entre unos 329 a 375, y varía según su procedencia (38,41).

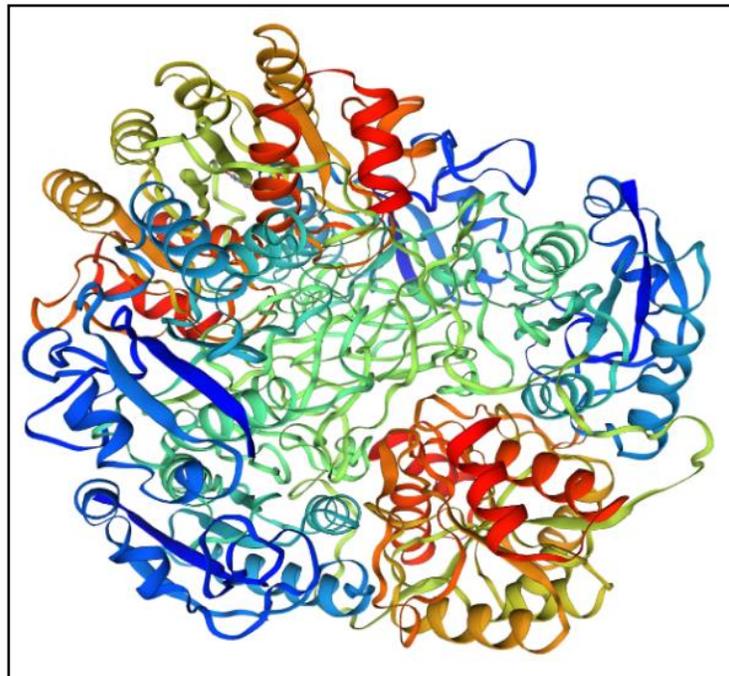


Figura 4. Estructura 3D de L-ASNasa tipo II de *Bacillus subtilis* strain 168 – Base de datos SMR O34482 (ASPG2_BACSU).

c. Características cinéticas y bioquímicas

Una de las principales características cinéticas medible es la constante de Michaelis-Menten, K_m (mM), que mide la afinidad de una enzima por su sustrato, ésta va a variar según la fuente de donde se obtenga, L-ASNasa de *Escherichia coli* (EcA) tiene un K_m de 10-15 μM (42); *Erwinia chrysanthemi* (ErA), 18 μM ; *Bacillus subtilis*, 430 μM , *Streptomyces noursei*, 25 μM ; *Bacillus aryabhatai* ITBHU02, 257 μM ; *Bacillus licheniformis* RAM-8, 14 μM ; *Bacillus subtilis* hswx88, 430 μM ; *Bacillus licheniformis* MTCC, 429 μM ; entre otros (4).

También los óptimos de pH y temperatura de L-ASNasa de *Bacillus* presenta valores de pH entre 7-8, con un punto isoeléctrico (pI) entre 5-6 y 37 °C. Además, el sustrato donde se observa la máxima actividad enzimática es L-Asn. Sin embargo, L-ASNasa también cataliza reacción con otros sustratos como D-Asn, L-Gln y L-Asp, cuyas actividades enzimáticas son mínimas en comparación con L-Asn(43).

Por otra parte, la L-ASNasa presenta las isoenzimas I y II, que varían en función a su ubicación subcelular (44). La isoenzima tipo I denominada constitutiva y presenta menor afinidad por el sustrato; y la de tipo II es inducida por la composición del medio, por proteína receptora de cAMP (Crp) y por activador transcripcional *Fumarato reductasa* (Fnr) (Figura 5) (44). L-ASNasa tipo II presenta mayor afinidad por el sustrato.

d. L-asparaginasa de *Bacillus* sp

L-ASNasa de *Bacillus* sp. está regulada por dos vías diferentes e independientes, donde se codifican para dos genes. El gen *ansZ* codifica L-ASNasa funcional, se expresa cuando el medio presenta en su composición nitrógeno limitante y es regulado por el factor de transcripción TnrA. Por otro lado, el gen *ansA* está en un operón junto con *ansB*, codifica una L-aspartasa; y la regulación de la expresión del operón *ansAB* está mediada por *ansR* de forma negativa, a su vez la actividad de *ansR* esté regulada por asparagina o aspartato (45).

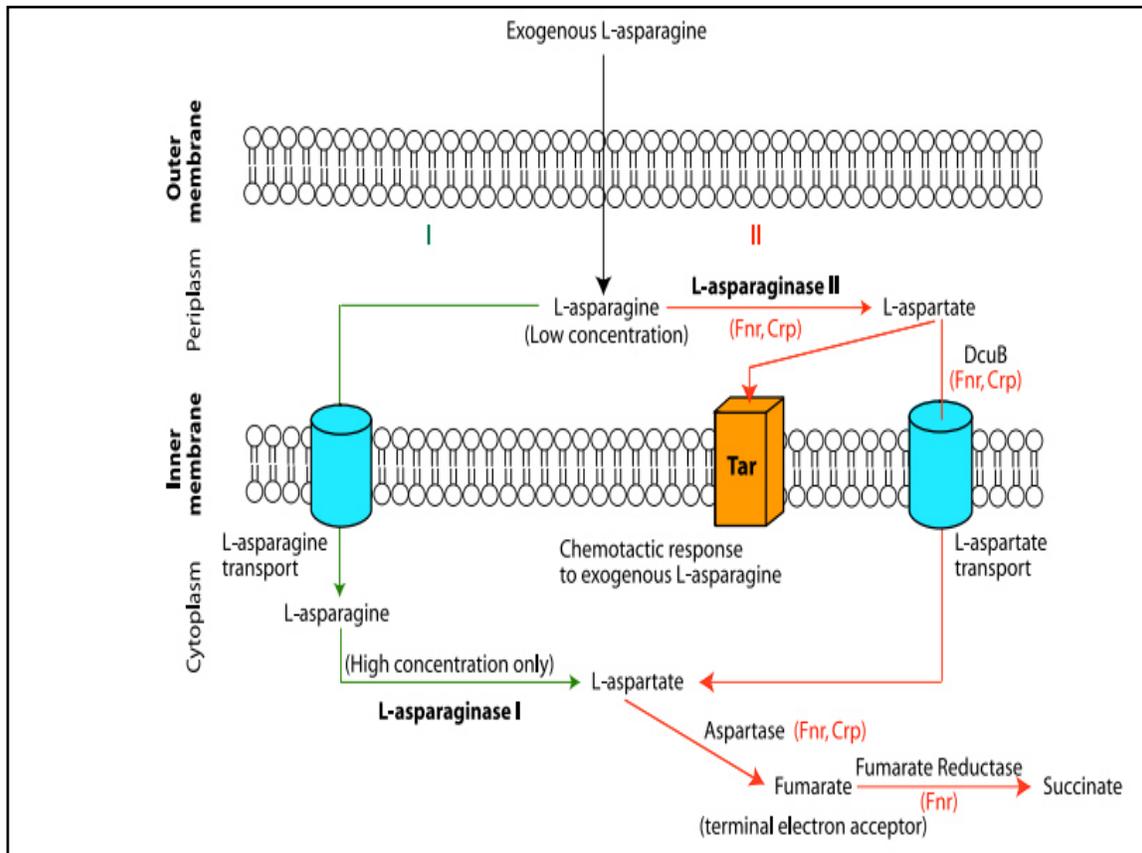


Figura 5. Localización y regulación de isoenzimas tipo I y II de L-ASNasa de *E. coli*. Tomado de Srikhanta *et al.* (2015).

2.2.2. Producción de L-ASNasa por diferentes microorganismos

L-ASNasa se encuentra en animales, plantas y microorganismos. En plantas, se ha reportado actividad enzimática en *Capsicum annum*, *Pinus pinaster*, *Withania somnifera*, entre otras. En animales, está en el tejido de los herbívoros, en el hígado de los omnívoros, y ausente en los órganos de los carnívoros (46).

En hongos y levaduras, *Aspergillus terreus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula rubra*, entre otras, son conocidas como productoras de ASNasas. También, se conoce que los actinomicetos son otro grupo de microorganismos que se han identificados como productores de L-ASNasa especialmente el género *Streptomyces*. Por otro lado, en bacterias las más utilizadas son *E. coli*, *Erwinia sp*, *Bacillus sp*, *Staphylococcus sp*, entre otras (47).

De todas las fuentes mencionadas, los microorganismos son los más utilizados porque tienen capacidad para crecer fácilmente en sustratos simples y presentan la isoenzima II (48). De cierto modo, las bacterias son más eficientes que los hongos y levaduras debido al tiempo de duplicación. Además, las bacterias producen L-ASNasa tipo II, ubicada en su espacio periplasmático con alta afinidad por el sustrato. A la vez, el género *Bacillus* presenta el gen *ansZ* que codifica ASNasa, este gen difiere del de *Escherichia coli* y *Erwinia sp.* Diversas investigaciones han demostrado que esta L-ASNasa presenta baja actividad GLNasa (49). En la producción se tiene que tener en cuenta el tipo y la concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno; el pH, la aireación, la temperatura, el tiempo de fermentación y, principalmente, el agente microbiano.

Las características de crecimiento de *Bacillus sp* son las siguientes: temperatura óptima entre 37 a 40 °C; pH 7; requiere oxígeno, entre otros (50). Además, se ha reportado que L-ASNasa de *Bacillus* es intracelular, por lo que las condiciones de crecimiento deben ser óptimas y se requiere cultivos de alta densidad para posteriormente realizar el rompimiento celular para obtener la enzima. Asimismo, todas las condiciones de crecimiento y producción con *Bacillus* se realiza en cultivos sumergidos.

2.2.3. L-ASNasas disponibles en el tratamiento de LLA

Existen diferentes formulaciones disponibles de L-ASNasa, las principales son: La primera es derivada de *E. coli*; la segunda es aislada de *E. chrysanthemi*; y la tercera es una forma pegilada de la ASNasa de *E. coli* nativa la cual es conjugada con polietilenglicol (51).

Como terapia de primera línea, se suministra la derivada de *E coli*; cuando los pacientes manifiestan reacciones de hipersensibilidad a esta enzima se prescribe L-ASNasa derivada de *Erwinia* (terapia de segunda línea)(51).

De acuerdo, a las características farmacológicas de la forma pegilada de ASNasa, se ha utilizado como preparación inicial de L-ASNasa en algunos regímenes de tratamiento de LLA, ya que la formación de anticuerpos disminuye, hay una menor incidencia de alergia y una vida media sérica prolongada (51). En la Tabla 1 se indican las presentaciones comerciales de L-ASNasas y su origen.

Tabla 1. Características de L-ASNasas comerciales

Nombre comercial	Origen de la enzima	Semivida	Vía de administración	Referencias
Elspar®	<i>E. coli</i> nativa	1,30 días	Intravenoso o intramuscular	(51–53)
Kidrolase®	<i>E. coli</i> nativa	8,00 – 30,00 h	Intramuscular	(54)
Graspa®	<i>E. coli</i>	---	---	(54)
Leunase®	<i>E. coli</i> recombinante	---	Intramuscular Intravenoso	(54)
Spectrila®	<i>E. coli</i> como célula hospedera	17,33 h	Intravenoso	(55)
Erwinase®	<i>E. chrysanthemi</i> nativa	0,65 día	Intramuscular	(51–53)
Crisantaspase®	<i>E. chrysanthemi</i> nativa	6,40 ± 0,50 h 16,00 h	Intravenosa Intramuscular	(54) (56)
Oncaspar®	Pegilada de <i>E.coli</i>	5,73 días	Intramuscular	(51–53)

2.2.4. Estrategias para superar las limitaciones en el uso de las L-ASNasas

a. Inmunogenicidad de L-ASNasas

La terapia utilizada contra LLA consta de cuatro fases; la primera incluye una inducción de remisión; seguida de una consolidación / terapia dirigida por el sistema nervioso central; reinducción (intensificación retardada) y mantenimiento / continuación. La duración total del tratamiento puede ser aproximadamente 5 años. El uso de L-ASNasa se da en las dos primeras fases del tratamiento. No obstante, los pacientes al recibir el tratamiento con L-ASNasa presentan hipersensibilidad contra EcA, toxicidad común, donde el 30% de los

pacientes desarrollan una reacción alérgica limitante del tratamiento. La presencia de anticuerpos anti-ASNasa tiene una incidencia que varía del 26% al 71% de los pacientes (57).

Los resultados de varios estudios sugieren que la ASNasa pegilada es menos inmunogénica que la enzima nativa EcA y los pacientes que desarrollan anticuerpos tienen más probabilidades de sufrir una reacción alérgica (Tabla 2). L-ASNasa ErA no reacciona de forma cruzada con anticuerpos de L-ASNasa EcA y, por lo tanto, ofrece una alternativa al tratamiento. Sin embargo, el 14% de los pacientes que reciben ErA han continuado presentando reacciones de hipersensibilidad, y las reacciones alérgicas son la principal causa de que los pacientes interrumpan el tratamiento.

Por otro lado, se ha observado una reducción de la inmunogenicidad con L-ASNasa humanizada, las cuales tienen un perfil de inmunogenicidad reducida, pero tienen baja afinidad por L-Asn en la sangre (58).

Tabla 2. K_M de L-ASNasas según sustrato

Enzima	Sustrato		Referencia
	L-Asn	L-Gln	
EcA	$1,5 \times 10^{-5}$ mol/L	$1,4 \times 10^{-3}$ mol/L	(58,59)
ErA	$4,8 \times 10^{-5}$ mol/L	$3,6 \times 10^{-4}$ mol/L	(58,59)

b. Desarrollo de nuevas L-ASNasas

Durante el desarrollo de biofarmacéuticos, la calidad del producto final debe cumplir con las especificaciones, ya que pequeñas alteraciones en el proceso como parámetros operativos, línea celular, métodos de producción y la purificación pueden afectar los atributos críticos de calidad (CQA) tales como estructura, actividad y concentración de contaminantes (55,60).

La producción de L-ASNasa se divide en dos etapas: La primera conocida como “*upstream*” y la segunda “*downstream*” (Figura 6)(61).

La primera etapa consiste en la transformación de sustratos en el producto; aquí se incluye, selección de línea celular, medio de cultivo, biorreactor, selección de parámetros (es decir, pH, temperatura, suministro de oxígeno, etc.), selección del tipo de proceso (cultivo

sumergido / en estado sólido), escalamiento en biorreactor (lote alimentado, continuo, discontinuo, entre otros), y optimización (55,61).

Para la etapa “*downstream*” se aplican todos los pasos necesarios para la purificación de la enzima, como recuperación inicial, purificación y pulido. En cuanto a los biofarmacéuticos inyectables, como L-ASNasa, el proceso de fabricación debe ser aún más minucioso, ya que la presencia de contaminantes, puede potencialmente conducir a consecuencias clínicas perjudiciales (55,61).

La selección de la línea celular constituye la base del desarrollo del bioproceso (medio cultivo, tipo de proceso y sus parámetros, estrategia de depuración, entre otros) debido a que esto afecta directamente a la característica de la enzima producida, relacionada con el perfil de calidad del producto (48,55).

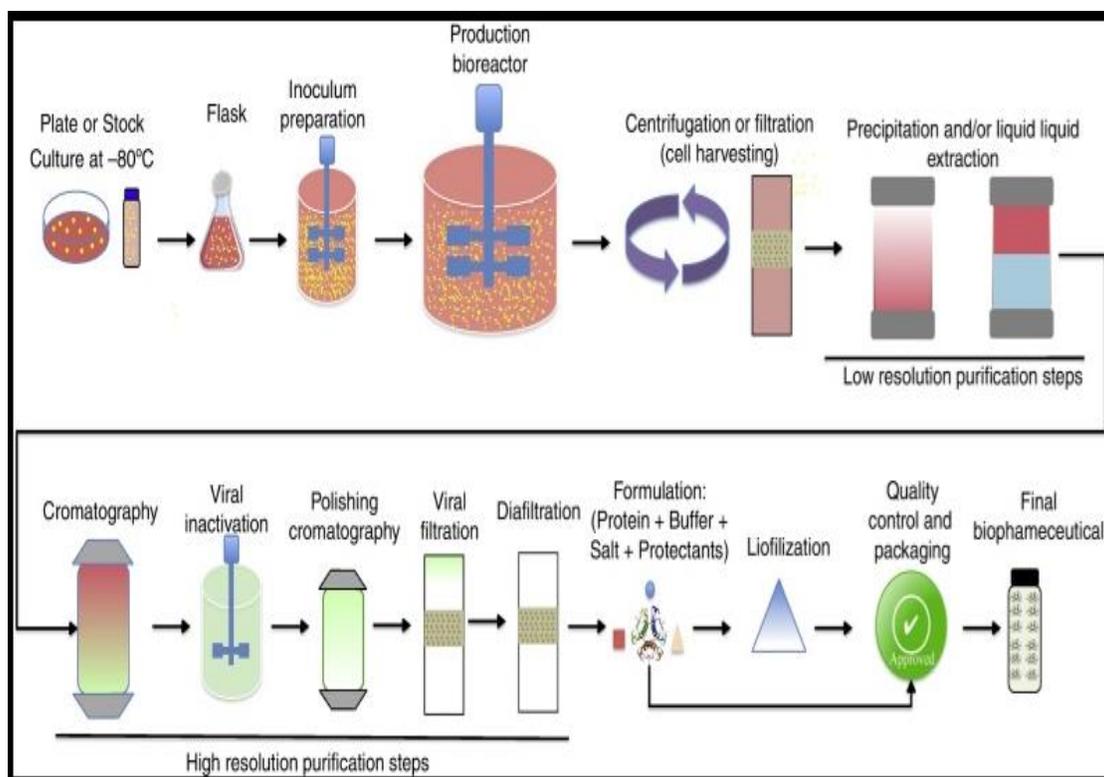


Figura 6. Proceso de manufactura de productos biofarmacéuticos. Tomado de Jozala *et al.* (2016)

Otro punto importante es la identificación de la composición óptima de los medios de cultivo, temperatura, pH, niveles de oxígeno y otros factores de cultivo los cuales son de suma importancia. En el caso de microorganismos nativos, las fuentes de carbono y nitrógeno son los factores más influyentes. El cultivo sumergido es utilizado para la producción industrial de ASNasa para uso farmacéutico y ASNasa de hongos filamentosos se utiliza exclusivamente en la industria alimentaria (62).

Muchos estudios han desarrollado ASNasas con una farmacocinética mejorada y efectos secundarios reducidos. Más específicamente, en la primera etapa del proceso se centran los estudios a la búsqueda de actividad L-GLNasa reducida; evaluar después del proceso *downstream*, los valores de K_M que sean los más bajos al igual que los pesos moleculares bajos, mayor diversidad estructural y diferentes respuestas a las moléculas efectoras (55,63). Actualmente, se ha diseñado una mutante versión quimérica de ASNasa humanizada con bajo K_M , con 90% de identidad de secuencia (58).

Por otro lado, se viene desarrollando la conjugación de ASNasa con inulina oxidada donde las características farmacocinéticas y fisicoquímicas han mejorado, obteniendo una mejor resistencia a la digestión con tripsina y mayores estabilidades térmicas, vida media más larga, un rango de pH óptimo más amplio que el de ASNasas nativas (55). La Figura 7 (55) indican los problemas farmacocinéticos sobre el desarrollo de la L-ASNasa como biofármaco.

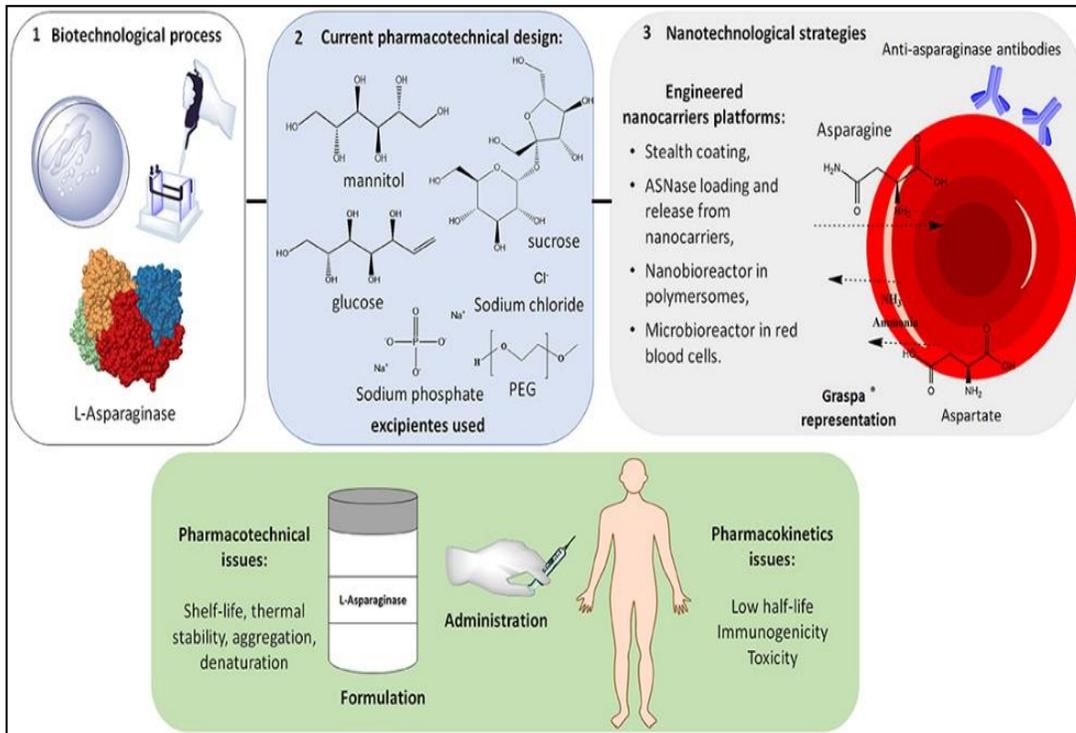


Figura 7. Estrategia de desarrollo de L-ASNasas.
Tomado de Brumano *et al.* (2019)

CAPITULO III: METODOLOGÍA

Los análisis y pruebas correspondientes a este trabajo de investigación se realizaron en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y en la Universidad de Sao Paulo (Brasil).

3.1 Materiales, reactivos y equipos

Los materiales, reactivos y equipos utilizados se encuentran descritos en el anexo 1.

3.2 Métodos analíticos

3.2.1 Actividad L-ASNasa

La actividad L-ASNasa fue medida por el método de hidroxilamina (64), que consiste en la cuantificación de β -hidroxamato aspártico férrico producido por la reacción efectuada por L-ASNasa en presencia de hidroxilamina. La mezcla de reacción contenía 700 μ L de buffer Tris HCl 50 mM (pH 8,6), 100 μ L de L-Asn 100 mM, 100 μ L de hidroxilamina 1 M (pH 7,0), y 100 μ L de muestra (extracto crudo de la enzima y/o sobrenadante de la lisis celular). La reacción fue incubada a 37 °C durante 30 min, después se agregó 250 μ L de la mezcla FeCl₃ 0,62 M/ ATC 0,306 M/ HCl 0,33M y se centrifugó a 5000 rpm por 5 min. Después, el sobrenadante de la mezcla se midió por espectrofotometría a 500 nm. La cantidad de β -hidroxamato aspártico férrico fue determinada con la curva estándar preparada a partir de una solución de β -hidroxamato aspártico (Anexo 2). La actividad L-ASNasa fue expresada en IU/ mL.

Una unidad internacional (IU) de L-ASNasa fue definida como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de β -hidroxamato aspártico por minuto a 37 °C.

3.2.2 Determinación de biomasa

La determinación de biomasa fue realizada con la medición de la densidad óptica (DO), esta técnica mide la intensidad logarítmica de la luz que recae sobre la muestra, en relación a la luz transmitida a través de la muestra (65). Para ello, de 100 μ L de muestra se realizaron

diluciones hasta 1:100, después fue medida por espectrofotometría a 600 nm. Esto sirvió para ajustar la biomasa a una DO de 50 por muestra.

3.2.3 Ensayo cuantitativo de actividad proteolítica

Se empleó el método descrito por Coelho *et al.* (2016)(66) usando azocaseína como sustrato. El extracto crudo enzimático (500 μ L) fue mezclado con azocaseína 0,6 % w/v disuelta en Tris-HCl 50 mM pH 8,5; e incubado durante 30 min a 37 °C. Para detener la reacción se adicionó ATC 10 % y se centrifugó a 5000 rpm por 5 min. El sobrenadante obtenido (100 μ L) fue mezclado con 100 μ L de NaOH 0,5 N y leído a 430 nm en un lector multipocillo. Para el cálculo de la actividad, fue restada la absorbancia del blanco de la muestra, al cual se le añadió ATC previamente a la adición de la enzima.

3.2.4 Cuantificación de proteínas totales

Se utilizó el método de ácido bicinonínico (BCA) (56), cuyo fundamento consiste en la determinación de proteínas totales, las cuales pueden reaccionar con iones cobre (Cu^{2+}) a través de las cadenas laterales de los aminoácidos cisteína, triptófano, tirosina y cistina en un medio básico, reduciéndose los iones Cu^{2+} a Cu^+ al reaccionar con el BCA, formando un complejo coloreado púrpura cuyo máximo espectro de absorción es a 562 nm.

Se utilizó un kit de BCA donde primero se prepara una mezcla de BCA y Cu^{2+} en una relación de 50:1 (V/V), de la mezcla se utilizó 200 μ L en una placa multipocillo y se mezcló con 25 μ L de muestra e incubo durante 25 min; el mismo procedimiento se realizó para la preparación de la curva de calibración utilizando albúmina de suero bovino (Anexo 3). Al término de la incubación, se realizó la medición en un fluorímetro a 562 nm.

3.2.5 Rompimiento celular por sonicación

La sonicación se realizó para determinar la actividad L-ASNasa intracelular según el método de Qeshmi (60). Después de la incubación en el medio de producción, las células se cosecharon por centrifugación y resuspendieron en buffer de lisis que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM hasta obtener una DO a 600 nm de 50. Las células fueron sonicadas manteniendo a 4 °C, 30 % amplitud, durante 2,3 mins con pulsos de 1 s encendido y 5 s apagado. Las células lisadas fueron centrifugadas a 10000

rpm a 4 °C por 25 min; después el sobrenadante fue usado para la medición de la actividad L-ASNasa.

3.3 Metodología experimental

3.3.1 Microorganismos

Se utilizaron 13 cepas de *Bacillus* sp aisladas de las salinas de Pilluana, Maras y Chilca (Tabla 3); estos microorganismos pertenecen al cepario del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Tabla 3. Cepas de *Bacillus* sp productoras de L-ASNasa aisladas de ambientes salinos del Perú(67)

Código de cepa	Salinera
M84, M76, M75, M68, M64, M62, M54	Maras
CH11	Chilca
P31, P19, P4, P7, P6	Pilluana

3.3.2 Selección de cepas con actividad L-ASNasa extracelular

a) Reactivación e inóculo

Se utilizó caldo Luria Bertani (LB) como medio de pre-enriquecimiento que contenía 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L de triptona y 5 g/L de NaCl, donde cada una de las 13 cepas fueron inoculadas en tubos que contenían 2 mL del medio, e incubados a 37 °C por 16 h. Seguidamente, se sembraron 20 µl en caldo LB, crecieron cada una de las cepas a 37 °C durante 16 h, al término de la incubación se utilizó el 10 % (v/v) como tamaño de inóculo.

b) Screening de bacterias productoras de L-ASNasa extracelular

Se trabajó con el medio modificado M9 (68) el cual fue utilizado para la actividad cualitativa de L-ASNasa extracelular, que contenía (g/L): L-Asn, 5; K₂HPO₄, 6; KH₂PO₄, 3; NaCl, 0,5; MgSO₄.7H₂O, 0,12; CaCl₂.2H₂O, 0,011; azul de bromotimol, 0,007 % y/o rojo de fenol al

0,009 %, a pH 6 (69). Se agregó un inóculo del 10 % (v/v) a cada tubo y fueron incubados a 37 °C durante cuatro días. Para el caso de las cepas donde se utilizó el indicador azul de bromotimol (0,007 %) se consideraron cepas positivas, las que viraron de color verde a azul; y de naranja a rojo para el indicador rojo de fenol. Después, los cultivos fueron centrifugados a 4000 rpm por 15 min y los sobrenadantes medidos en un espectrofotómetro a 620 nm (azul de bromotimol) y 560 nm (rojo de fenol). Asimismo, se midió la variación del pH con un potenciómetro; los controles negativos fueron sin inóculo.

3.3.3 Producción de L-ASNasa en matraces

a) Producción de L-ASNasa extracelular

- **Preparación del inóculo**

Las cepas bacterianas que dieron positivo al viraje de color verde a azul en medio líquido fueron reactivadas en caldo LB por 16 h a 37 °C. Después de la incubación, 2 mL del cultivo fueron centrifugados a 5000 rpm por 5 min, las células fueron lavadas dos veces con solución de NaCl 8,5 g/L en condiciones estériles.

- **Screening de bacterias productoras de L-ASNasa en matraces**

Los pellets celulares obtenidos en el proceso anterior, fueron resuspendidos en cuatro medios de producción de L-ASNasa, con un tamaño de inóculo del 10 % (v/v), en matraces de 50 mL. Cada cultivo contenía un volumen de 10 mL, una vez inoculado cada matraz, fueron incubados a 37 °C, pH 7 y 100 rpm durante 72 h. Posteriormente, los cultivos fueron centrifugados a 10000 rpm, 4 °C por 5 min. El sobrenadante libre de células fue considerado como extracto crudo y empleado para cuantificar las actividades L-ASNasa extracelular y proteolítica. La composición de los cuatro medios de producción evaluados se detalla en la Tabla 4.

Tabla 4. Componentes de medio de cultivo empleados para la producción de L-ASNasa (g/L)

Medio A ^a	Medio B ^a	Medio C ^b	Medio D ^c
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ * 10,00	Extracto de malta	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ ** 35,00	C ₆ H ₁₂ O ₆ 2,00
Na ₂ HPO ₄ 6,00	2,000	CH ₄ N ₂ O 0,80	Na ₂ HPO ₄ 6,00
KH ₂ PO ₄ 3,00	Na ₂ HPO ₄ 6,000	K ₂ HPO ₄ 2,60	NaCl 5,00
NaCl 0,5	KH ₂ PO ₄ 3,000	KH ₂ PO ₄ 2,00	MgSO ₄ 0,50
MgSO ₄ 0,12	NaCl 0,600	MgSO ₄ 1,845 NaCl	CaCl ₂ 0,15
KNO ₃ 1,00	CaCl ₂ 0,011	5,00	KH ₂ PO ₄ 3,00
	MgSO ₄ 0,12	KNO ₃ 1,00	Glutamato 1,00

^a modificado de Qeshmi *et al.* (2016)(70)

^b modificado de Jia *et al.* (2013)(71)

^c modificado de Mahajan *et al.* (2014)(12)

*Maltosa

** Sacarosa

- **Evaluación de nutrientes de *Bacillus sp***

Se evaluó el efecto de 14 factores con respecto a la producción de L-ASNasa extracelular; para así identificar los inductores y represores de la expresión de L-ASNasa, se utilizó el diseño Plackett-Burman. Las variables seleccionadas fueron trabajadas a dos niveles -1 y +1 (Tabla 5 y 6); 14 variables más cinco variables *dummy* (variables utilizadas para reducir el error) (Tabla 7). Se usó matraces de 50 mL que contenían un medio base (NaH₂PO₄ 6 g/L, NaCl 10 g/L, K₂HPO₄ 2 g/L, MgSO₄ 0,5 g/L y CaCl₂ 0,005 g/L) y los factores evaluados, según sea el caso para cada experimento.

Tabla 5. Evaluación de nutrientes para el diseño Plackett-Burman

Fuentes de carbono		Fuentes complejas		Fuentes de nitrógeno	
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/>	C ₆ H ₁₂ O ₆	<input type="checkbox"/>	Peptona	<input type="checkbox"/>	Prolina
<input type="checkbox"/>	C ₃ H ₈ O ₃	<input type="checkbox"/>	Corn Steep Solid	<input type="checkbox"/>	NH ₄ Cl
<input type="checkbox"/>	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	<input type="checkbox"/>	<u>Triptona</u>	<input type="checkbox"/>	Arginina
<input type="checkbox"/>	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ *	<input type="checkbox"/>	Extracto de malta	<input type="checkbox"/>	Glutamina
				<input type="checkbox"/>	Asparagina
				<input type="checkbox"/>	Glutamato

* Lactosa

Tabla 6. Concentración de nutrientes evaluados en el diseño Plackett-Burman

Nutrientes (g/L)	-1	+1
Carbono	0	10,0
Nitrógeno	0	5,0
Medios complejos o indefinidos	0	2,5

Tabla 7. Matriz del diseño Plackett-Burman

N° de ensayo	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄	X ₁₅	X ₁₆	X ₁₇	X ₁₈	X ₁₉
1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1
2	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1
3	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1
4	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1
5	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1
6	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1
7	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1
8	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1
9	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1

10	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1
11	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1
12	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1	-1
13	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1
14	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1
15	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1
16	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1
17	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1
18	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1
19	-1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1	1
20	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

- **Efecto de las proteasas sobre la actividad L-ASNasa**

Se evaluó el efecto del sobrenadante libre de células de *Bacillus* sp sobre la actividad L-ASNasa. Para ello, se usó como control positivo la L-ASNasa comercial de *E. coli*, y las actividades proteasas de cepas de *Bacillus* sp, fueron medidas enfrentando ambas actividades a fin de ver alguna interacción.

b) Producción de L-ASNasa intracelular

- **Producción de biomasa**

La producción de L-ASNasa intracelular está directamente relacionada a la concentración de biomasa, debido a ello se realizaron cultivos de alta concentración celular. Por consiguiente, se reactivaron las cepas y luego se cultivaron en medio LB a pH 7,0 suplementado con glucosa 10 g/L que promueva la producción de biomasa. El cultivo fue incubado a 37 °C, 200 rpm por 18 h, en una relación volumen medio y recipiente de cultivo de 1:5. Luego, las células obtenidas fueron colectadas por centrifugación a 5000 rpm por 5 min, lavadas con NaCl 8,5 g/L por dos veces. Todo el procedimiento fue realizado en condiciones estériles.

- **Producción de L-ASNasa en alta concentración celular**

Las células obtenidas en el medio de producción de biomasa fueron transferidas en condiciones estériles a un medio de producción de L-ASNasa g/L (L-asparagina, 1; glucosa, 10; extracto de levadura, 10; Na₂HPO₄, 3; NaH₂PO₄, 6; NaCl, 0,5; MgSO₄·7H₂O, 0,12; CaCl₂·2H₂O, 0,011; pH inicial 7,0). La proporción de volúmenes de medios de producción

utilizados fue de 1:2 (biomasa: L-ASNasa). El cultivo de medio de producción fue incubado a 37 °C a 200 rpm durante 24 h. Posteriormente, fue centrifugado a 6000 rpm por 5 min y lavado en NaCl 8,5 g/L dos veces. Al final, las células obtenidas fueron tratadas para su rompimiento celular.

- **Evaluación del rompimiento celular por sonicación**

Se utilizaron las células de *Bacillus* sp que fueron suspendidas a una $DO_{600}=50$ en tampón de rompimiento (Tris-HCl 50 mM pH 7,0, EDTA 1,0 mM) y sometidas a rompimiento utilizando un equipo disruptor celular de ultrasonido. La sonicación se realizó a 200 W y 20 kHz. La distancia entre el fondo de la botella y el extremo de la punta se mantuvo a aproximadamente 10 mm.

Las células se sometieron a sonicación y se colocaron en un sistema de baño de enfriamiento para evitar el sobrecalentamiento (menor a 10 °C). Las células de *Bacillus* sp. ($DO_{600}=50$) se sonicaron usando los siguientes parámetros: 30% de amplitud, 1 s de pulsación y 5 s de reposo durante 4 min. Las muestras se recogieron después de 25, 50, 75, 90, 105, 120, 150 y 180 "pulsaciones"; el homogenizado obtenido luego se centrifugó a 15000 g, 4 °C, 20 min y en el sobrenadante se analizaron las actividades L-ASNasa, proteasa y proteínas totales. Además, la suspensión celular fue medida a 600 nm y se elaboró una curva de rompimiento.

3.3.4 Determinación de condiciones de cultivo de *Bacillus* sp CH11

a) Curva de crecimiento

Para determinar los parámetros cinéticos del crecimiento de *Bacillus* sp CH11 y establecer el tiempo de cultivo previo a la fase de producción, fue elaborada la curva de crecimiento. Se inoculó 1 mL del criopreservado a un matraz que contenía 50 mL de medio LB suplementado con glucosa 10 g/L, y se realizaron las mediciones cada 2 h, por triplicado. Las lecturas de las muestras se realizaron por espectrofotometría a 600 nm.

b) Efecto de temperatura, pH y agitación del cultivo

Se evaluó el efecto de la temperatura, el pH, y la agitación en el cultivo de *Bacillus* sp CH11. La producción de L-ASNasa en alta concentración celular se trabajaron en un medio base que contenía: medio M9 modificado, L-Asn (1 g/L), extracto de levadura (10 g/L), y glucosa

(10 g/L); dichos cultivos fueron incubados a 30 °C y 37 °C, a pH 5,0 (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄) y 7,0 (KH₂PO₄/Na₂HPO₄), todos los tratamientos fueron evaluados con agitación a 200 rpm y sin agitación (Tabla 8). Al final, las células obtenidas fueron tratadas para liberar el contenido intracelular por sonicación. La matriz elaborada fue un diseño factorial 2³ con una réplica.

Tabla 8. Diseño Factorial 2³ en la producción de L-asparaginasa por *Bacillus sp* CH11

N° de ensayo	pH	Temperatura	Agitación
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1	-1	-1
10	1	-1	-1
11	-1	1	-1
12	1	1	-1
13	-1	-1	1
14	1	-1	1
15	-1	1	1
16	1	1	1

3.4. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se expresaron como la media \pm error estándar y fueron analizados por un análisis de varianza de una vía (ANOVA). El software Statistica 10 fue empleado para los análisis estadísticos donde ANOVA se trabajó con un nivel de confianza del 95% y se consideraron significativos valores de $p < 0,05$. Además, en la elaboración de los gráficos se utilizó el programa Prisma.

CAPITULO IV: RESULTADOS

4.1 Selección de cepa

Se seleccionaron los cultivos que aumentaron la absorbancia a 620 nm y 560 nm para los medios de cultivo que contenían azul de bromotimol y rojo de fenol, respectivamente (Tabla 9)(72). De las 13 cepas evaluadas de *Bacillus* sp, 10 de ellas fueron consideradas como productoras de L-ASNasa con el indicador azul de bromotimol (Anexo 4), las cuales presentaron una DO $\geq 0,140$

Tabla 9. Cuantificación de actividad L-ASNasa de cepas de *Bacillus* sp en azul de bromotimol y rojo de fenol en cultivo sumergido

Código de cepa	Azul de bromotimol			Rojo de fenol		
	pH final	Viraje de color	DO 620	pH final	Viraje de color	DO 560
M84	7,9	+	0,225	7,3	+	>3
M76	8,2	+	0,217	8,4	+	>3
M75	6,5	-	0,013	6,6	+	0,923
M68	7,6	+	0,141	7,9	+	>3
M64	8,1	+	0,222	8,1	+	0,743
M62	8,3	+	0,462	8,2	+	>3
M54	7,7	+	0,166	7,3	+	>3
CH11	8,2	+	0,189	8,1	+	>3
P31	8,3	+	0,245	8,1	+	>3
P19	8,2	+	0,206	7,7	+	>3
P7	6,8	-	0,027	7,5	+	>3
P6	6,8	-	0,000	6,5	+	>3
P4	7,9	+	0,181	7,3	+	>3

Para los posteriores ensayos, sólo se consideraron las cepas M84, M76, M68, M64, M62, M54, CH11, P31, P19, y P4.

4.2 Screening de cepas productoras de L-ASNasa extracelular

Se cuantificó la actividad L-ASNasa de las 10 cepas seleccionadas anteriormente, en los medios de la Tabla 4; de los cuatro medios evaluados, el medio B que contenía en su composición en (g/L): extracto de malta 2; Na₂HPO₄ 6; KH₂PO₄ 3; NaCl 0,6; CaCl₂ 0,011; MgSO₄ 0,12 presentó la mejor respuesta con respecto a la actividad L-ASNasa (Figura 8). Sin embargo, la actividad L-ASNasa fue menor de 0,1 U/mL, inferior a lo reportado, a pesar de ello, se encontraron diferencias entre cepas con respecto a la producción según la prueba de Tukey (Tabla 11). Las cepas que presentaron mejor actividad fueron M68, M64, M62, CH11 y P19.

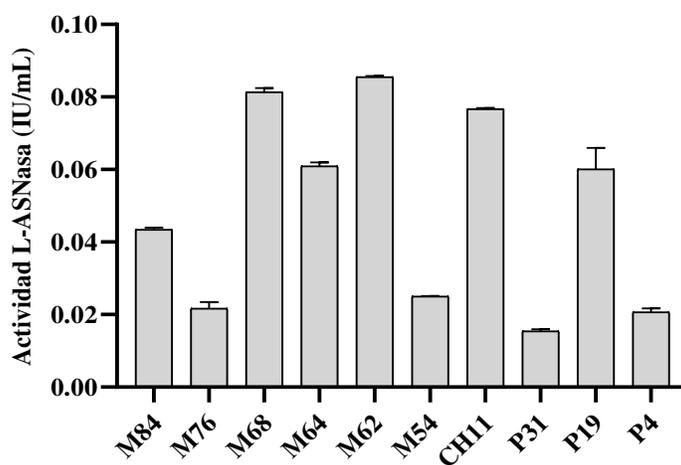


Figura 8. Actividad L-ASNasa de las cepas de *Bacillus* sp halotolerantes en el medio M9 modificado con extracto de malta.

Del análisis ANOVA (Tabla 10), se observa que hay diferencias en la actividad L-ASNasa extracelular según las cepas de *Bacillus* sp halotolerantes ($p < 0,05$). Las cepas se seleccionaron en un nivel de confianza del 95% según su actividad.

Tabla 10. Análisis de varianza (ANOVA) del *screening* de producción de L-ASNasa extracelular

Factor	Variable dependiente Actividad L-ASNasa (IU/mL)				
	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrado	F	p
Intercepto	1	0,048177	0,048177	5854,703	0,0000
Cepas de <i>Bacillus</i> sp	9	0,013428	0,001492	181,322	0,0000
Error	10	0,000082	0,000008		
Total suma de cuadrados	19	0,013511			

Tabla 11. Prueba de Tukey del *screening* de producción de L-ASNasa extracelular de *Bacillus* sp halotolerantes

Cepas de <i>Bacillus</i> sp	{1} – 0,4350	{2} – 0,2175	{3} – 0,8140	{4} – 0,6100	{5} – 0,8550	{6} – 0,2457	{7} – 0,7675	{8} – 0,1550	{9} – 0,6015	{10} – 0,
1 M84		0,000623	0,000225	0,002803	0,000225	0,001585	0,000227	0,000256	0,004033	0,000475
2 M76	0,000623		0,000225	0,000225	0,000225	0,986712	0,000225	0,520541	0,000225	0,999993
3 M68	0,000225	0,000225		0,000936	0,892103	0,000225	0,813255	0,000225	0,000717	0,000225
4 M64	0,002803	0,000225	0,000936		0,000351	0,000225	0,006014	0,000225	0,999999	0,000225
5 M62	0,000225	0,000225	0,892103	0,00035		0,000225	0,180586	0,000225	0,000316	0,000225
6 M54	0,001585	0,986712	0,000225	0,000225	0,000225		0,000225	0,154666	0,000226	0,915406
7 CH11	0,000227	0,000225	0,813255	0,006014	0,180586	0,000225		0,000225	0,004121	0,000225
8 P31	0,000256	0,52054	0,000225	0,000225	0,000225	0,154666	0,000225		0,000225	0,722063
9 P19	0,004033	0,000225	0,000717	0,999999	0,000316	0,000226	0,004121	0,000225		0,000225
10 P4	0,000475	0,999999	0,000225	0,000225	0,000225	0,915406	0,000225	0,722063	0,000225	

*Los valores de color rojo son los que resultan ser significativos con respecto a cualquier factor con el que se está realizando la comparación

Además, se observó que estas cepas también produjeron proteasas extracelularmente (Figura 9).

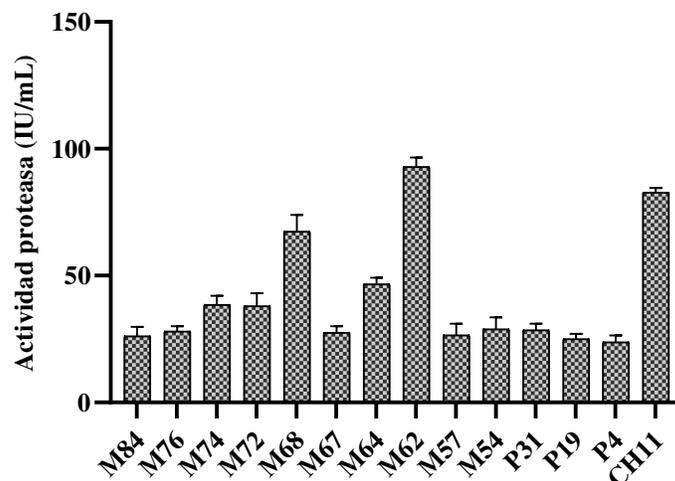


Figura 9. Actividad proteolítica de las cepas de *Bacillus* sp halotolerantes productoras de L-ASNasa.

4.3 Evaluación de nutrientes en el crecimiento de *Bacillus* sp CH11 por Plackett-Burman

Con el fin de identificar los factores inductores y represores de la expresión de L-ASNasa, se realizó un diseño factorial Plackett-Burman en la cepa *Bacillus* sp CH11 halotolerante. Sin embargo, no se obtuvo un resultado significativo para la producción de L-ASNasa; pero, sí para la producción de biomasa (Figura 10). No obstante, no se descartó el uso de la L-asparagina como componente en el medio de cultivo.

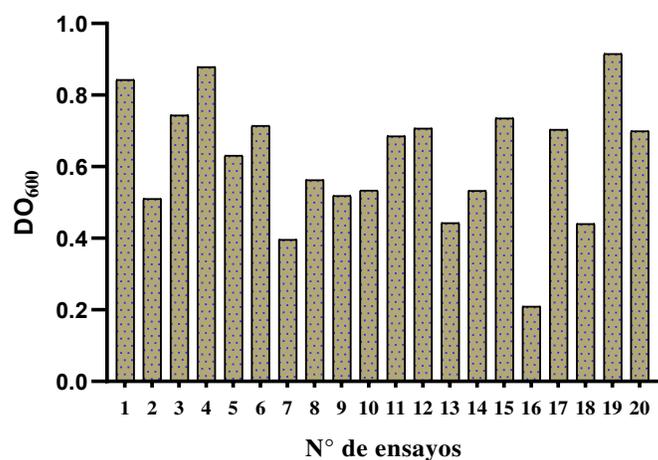


Figura 10. Producción de biomasa de *Bacillus* sp CH11 halotolerante según el diseño Plackett-Burman

Del análisis ANOVA (Tabla 12), se observa que los factores que influyeron significativamente en la producción de biomasa fueron sacarosa, prolina, glutamato y triptona ($p < 0,05$) con un nivel de confianza 95% (Figura 11); la línea roja en este gráfico indica los factores significativos sobre la variable dependiente

Tabla 12. Análisis de varianza del diseño Plackett-Burman del cultivo de *Bacillus* sp CH11

Factor	Suma de cuadrados	Grado de libertad	Media cuadrado	F	p
(1) Glucosa	0,0052	1	0,0052	0,9654	0,3709
(3) Glicerol	0,0149	1	0,0149	2,7965	0,1553
(3) Sacarosa	0,0370	1	0,0370	6,9241	0,0465
(4) Lactosa	0,0039	1	0,0039	0,7363	0,4301
(5) Peptona	0,0344	1	0,0344	6,4493	0,0519
(6) Corn steep solid	0,0230	1	0,0230	4,3111	0,0925
(7) Triptona	0,1026	1	0,1026	19,2218	0,0071
(8) Extracto de malta	0,0137	1	0,0137	2,5693	0,1699
(9) Prolina	0,1395	1	0,1395	26,1404	0,0037
(10) Cloruro de amonio	0,0349	1	0,0349	6,5325	0,0509
(11) Arginina	0,0005	1	0,0005	0,1007	0,7638
(12) Glutamina	0,0234	1	0,0234	4,3877	0,0904
(13) Asparagina	0,0145	1	0,0145	2,7085	0,1607
(14) Glutamato	0,1155	1	0,1155	21,6372	0,0056
Error	0,0267	5	0,0053		
Total suma de cuadrados	0,5896	19			

$R^2:0,95474$; R^2 (ajustado): $0,82802$

El R^2 indica que el 95,47 % de variabilidad en la respuesta es explicado por el modelo obtenido en el diseño Plackett-Burman.

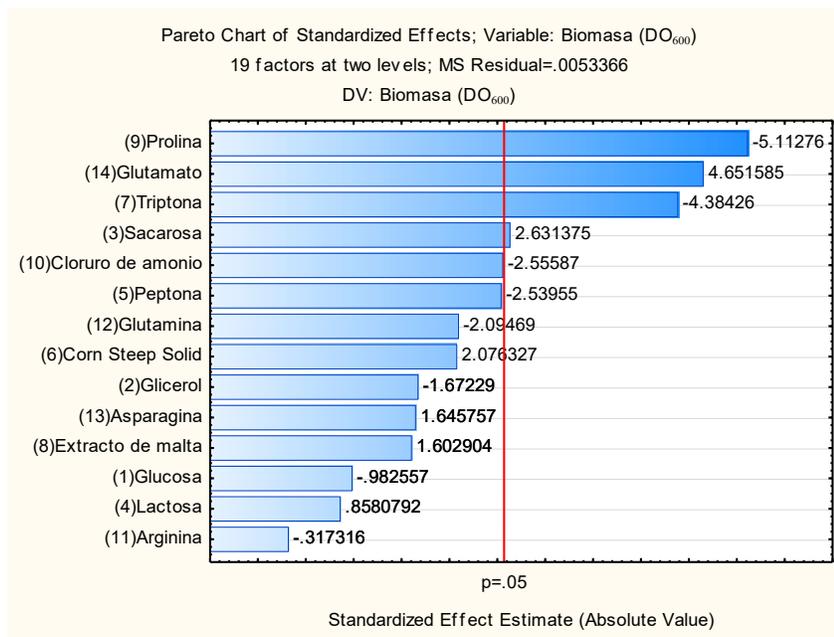


Figura 11. Factores que influyen sobre la producción de biomasa de *Bacillus* sp CH11

4.4 Efecto de las proteasas sobre la actividad L-ASNasa

Se midieron las actividades proteasas de las cepas de *Bacillus* sp M62 y M64, enfrentándose ambas actividades con la actividad L-ASNasa de *E. coli*. Las actividades proteolíticas para las cepas M64 y M62 fueron 46 IU/ mL y 320 IU/mL, respectivamente. La cepa M64 presentó siete veces menos actividad proteasa que M62. Sin embargo, se observó que la pérdida de actividad L-ASNasa fue independiente del grado de actividad proteasa (Tabla 13). L-ASNasa de *E. coli* (control) tuvo una actividad de 59,4 IU/mL; sin embargo, cuando se incubó durante 30 min con el extracto crudo proteolítico de las cepas M64 y M62 por separado, la actividad L-ASNasa disminuyó, teniendo una pérdida de más del 90 % de la actividad L-ASNasa.

Tabla 13. Efecto de la actividad proteasa sobre la actividad de L-ASNasa de *E. coli*.

Grupos	Actividad		
	proteasa (IU/mL)	ASNasa (IU/mL)	residual (%)
Control *	0	59,4 ± 1,600	100,0
T1, ASNasa + sobrenadante M62	320 ± 2,5	4,3 ± 0,350	7,2
T2, ASNasa + sobrenadante M64	46 ± 1,25	5,7 ± 0,525	9,6

*L-ASNasa comercial de *E. coli*

Del análisis ANOVA (Tabla 14), se observa que la evaluación de la influencia del efecto de proteasa producidas por las cepas M62 y M64 sobre la actividad de L-ASNasa de *E. coli* fue significativa ($p < 0,05$).

Tabla 14. Análisis de varianza del efecto de proteasas de cepas de *Bacillus* sp sobre la actividad de L-ASNasa de *E. coli*.

Factor	Variable dependiente Actividad Proteasa (IU/mL)					Variable dependiente Actividad L-ASNasa (IU/mL)			
	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrado	F	<i>p</i>	Suma de cuadrados	Media cuadrado	F	<i>p</i>
Intercepto	1	88938,4	88938,38	17076,17	0,000001	3217,850	3217,850	1631,701	0,000033
Grupos	2	119408,2	59704,12	11463,19	0,000001	3942,266	1971,133	999,518	0,000058
Error	3	15,6	5,21			5,916	1,972		
Total suma de cuadrados	5	119423,9				3948,182			

Se realizó la prueba de Tukey de comparaciones múltiples de las tres muestras (Tabla 15); se obtuvo que T₁ (M62) y T₂ (M64) presentaron diferencia significativa ($p < 0,05$) con respecto al control según la actividad proteasa; asimismo, entre cepas también hubo diferencia significativa ($p < 0,05$).

Tabla 15. Prueba de Tukey

Actividad proteasa (IU/mL)			
Grupos	{1} – 0,0000	{2} – 319,50	{3} – 45,750
1 Control		0,000319	0,000749
2 T ₁ (M62)	0,000319		0,000319
3 T ₂ (M64)	0,000749	0,000319	

Con respecto a la actividad L-ASNasa, las cepas M62 (T₁) y M64 (T₂) presentaron diferencia significativa ($p < 0,05$) con respecto al control; entre T₁ y T₂ no hubo diferencia significativa ($p > 0,05$) (Tabla 16); es decir, ambas actividades fueron estadísticamente similares, el efecto de las proteasas sobre L-ASNasa se evidenció en ambos casos.

Tabla 16. Prueba de Tukey

Actividad L-ASNasa (IU/mL)			
Grupos	{1} – 59,400	{2} – 4,3500	{3} – 5,7250
1 Control		0,000346	0,000348
2 T ₁ (M62)	0,000346		0,636567
3 T ₂ (M64)	0,000348	0,636567	

La prueba de Dunnett se utilizó fundamentalmente para comparar cada grupo con el control. En este caso, los grupos 1 y 2 estuvieron constituidos por L-ASNasa de *E. coli* más los sobrenadantes del extracto crudo M62 y M64, respectivamente; y el grupo control fue solamente L-ASNasa de *E. coli* (Tabla 13). Se observó que hubo diferencia ($p < 0,05$) en la actividad proteasa que presentaron los grupos 1 y 2 con respecto al control que no tuvo actividad proteasa. La actividad L-ASNasa del grupo control comparado con los grupos 1 y 2 fue significativa ($p < 0,05$); los grupos tuvieron una disminución de la actividad L-ASNasa ante la presencia de proteasas (Tabla 17).

Tabla 17. Prueba de Dunnett

	Actividad proteasa (IU/mL)	Actividad L- ASNasa (IU/mL)
	{1} – 0,0000	{1} – 59,4
1	<i>E. coli</i> (control)	
2	T ₁ (M62) 0,000000	0,000060
3	T ₂ (M64) 0,000451	0,000065

4.5 Producción de actividad L-ASNasa intracelular

Se determinó la actividad L-ASNasa intracelular de las cepas M84, M76, M68, M64, M62, M54, CH11, P31, P19, P4 donde la máxima actividad intracelular (IC) fue $0,973 \pm 0,098$ (Tabla 18).

Tabla 18. Actividad L-ASNasa intracelular de cepas de *Bacillus* sp halotolerantes

Región	Cepa	Actividad L-ASNasa (IU/mL)
Maras	M68	$0,973 \pm 0,098$
	M84	0,003
	M76	0,003
	M64	0,003
	M62	0,003
	M54	0,003
Chilca	CH11	$0,440 \pm 0,0505$
	P31	$0,545 \pm 0,0400$
Pilluana	P4	$0,354 \pm 0,0455$
	P19	0,0030

También fue evaluada la producción de proteasas IC de las cepas M68, CH11, P31 y P4 que presentaron mayor actividad L-ASNasa IC (Figura 12), las cuatro cepas produjeron proteasas. Sin embargo, las cepas CH11 y P31 produjeron menor cantidad de proteasas. En consecuencia, la cepa CH11 fue seleccionada para evaluar el efecto de la temperatura, la agitación y el pH en la producción de L-ASNasa intracelular.

Del análisis ANOVA (Tabla 19), se observa que hay diferencias en la actividad L-ASNasa IC según las cepas de *Bacillus* sp halotolerantes ($p < 0,05$). Las cepas se seleccionaron en un

nivel de confianza del 95% según su actividad. La Tabla 20 muestra la diferencia significativa entre cepas según la producción L-ASNasa IC.

Tabla 19. Análisis de varianza de la producción intracelular de L-ASNasa de cepas de *Bacillus* sp halotolerantes

Factor	Variable dependiente Actividad L-ASNasa (IU/mL)				
	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrado	F	p
Intercepto	1	1,083182	1,083182	346,0521	0,000000
Cepas de <i>Bacillus</i> sp	9	2,039904	0,226656	72,4114	0,000000
Error	10	0,031301	0,003130		
Total suma de cuadrados	19	2,071205			

Tabla 20. Prueba de Tukey

Cepas de <i>Bacillus</i> sp	{1} – 0,97260	{2} – 0,00269	{3} – 0,00269	{4} – 0,00269	{5} – 0,00269	{6} – 0,00269	{7} – 0,43971	{8} – 0,54511	{9} – 0,35365	{10} – 0,00269
1 M68		0,000225	0,000225	0,000225	0,000225	0,000225	0,000265	0,000596	0,000229	0,000225
2 M84	0,000225		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,000523	0,000258	0,002288	1,000000
3 M76	0,000225	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	0,000523	0,000258	0,002288	1,000000
4 M64	0,000225	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	0,000523	0,000258	0,002288	1,000000
5 M62	0,000225	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	0,000523	0,000258	0,002288	1,000000
6 M54	0,000225	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		0,000523	0,000258	0,002288	1,000000
7 CH11	0,000265	0,000523	0,000523	0,000523	0,000523	0,000523		0,679653	0,849830	0,000523
8 P31	0,000596	0,000258	0,000258	0,000258	0,000258	0,000258	0,679653		0,107707	0,000258
9 P4	0,000229	0,002288	0,002288	0,002288	0,002288	0,002288	0,849830	0,107707		0,002288
10 P19	0,000225	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,000523	0,000258	0,002288	

*Los valores de color rojo son los que resultan ser significativos con respecto a cualquier factor con el que se está realizando la comparación

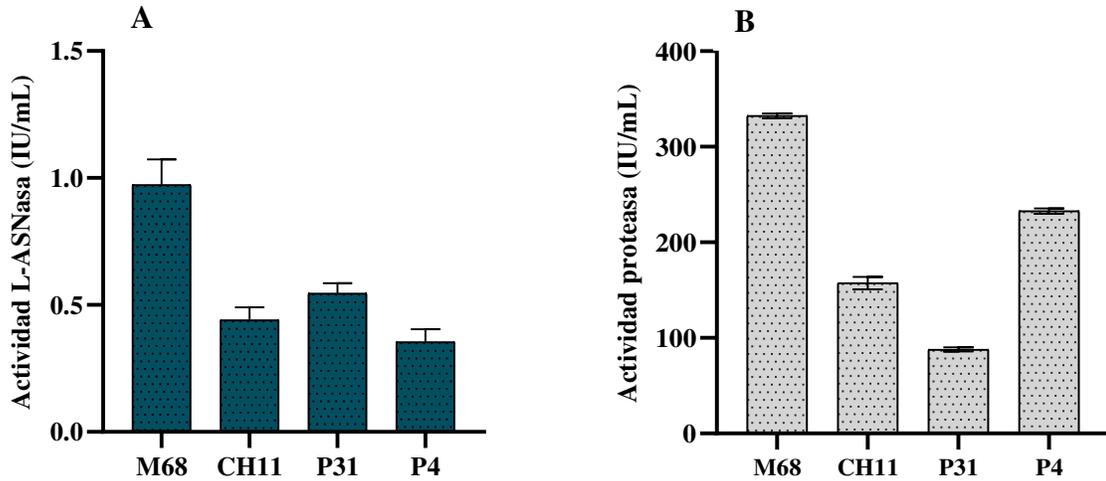


Figura 12. Producción de L-ASNasa (A) y proteasas (B) en cepas *Bacillus* sp halotolerantes a partir de cultivos iniciados con alta concentración celular.

- **Efecto del rompimiento celular**

Las condiciones de rompimiento celular por sonicación fueron optimizadas con el objetivo de preservar la estabilidad de L-ASNasa; para ello, se elaboró una curva de rompimiento con la finalidad de determinar el tiempo que favoreció un extracto crudo con mayor actividad L-ASNasa en la menor concentración de proteínas totales. La cepa CH11 fue considerada como modelo de rompimiento.

La Figura 13 muestra el efecto de los ciclos de sonicación/enfriamiento en el aumento de la temperatura de la muestra. Los ciclos de 5s/5s sonicación/enfriamiento fue menos eficiente para enfriar la muestra (la temperatura supera los 10 °C luego de 2 min de sonicación) (Figura 13A). Mientras que en ciclos de 1s/5s sonicación/enfriamiento la temperatura permaneció más tiempo (hasta 10 min) a menos de 10 °C, incluso hasta concentración celular elevadas como 100 unidades de densidad óptica a 600 nm (Figura 13B). Como se observa, la sonicación de una muestra de células suspendidas de DO₆₀₀ igual a 50 generó mayor calor que una suspensión celular DO₆₀₀ igual a 100 (Figura 13B).

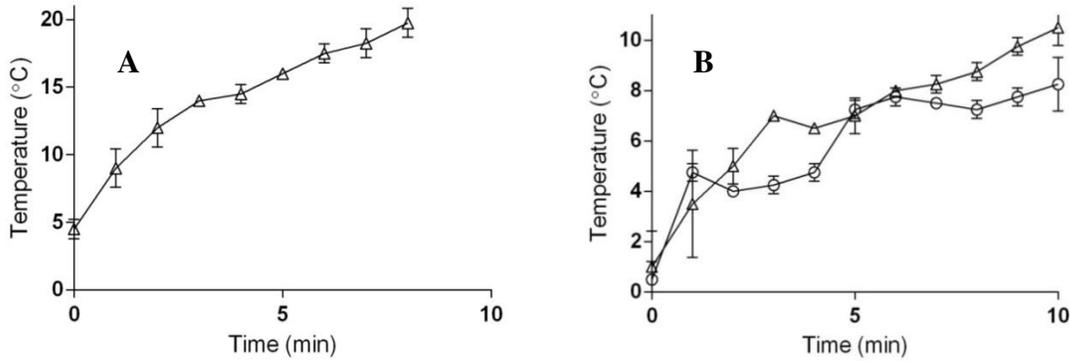


Figura 13. Efecto de los ciclos sonicación/enfriamiento en la temperatura de la suspensión celular durante el rompimiento de *Bacillus* sp CH11. (A) Ciclos de sonicación a 5 s seguidos de ciclos de enfriamiento de 5 s sobre hielo (B) Ciclos de sonicación de 1 s seguidos de 5 s de enfriamiento sobre hielo. Muestra de DO600 50 (△) y 100 (○) en la suspensión celular.

En la Figura 14 se muestra que la actividad ASNasa aumenta rápidamente hasta tiempo de 1 min y 30 s, después la actividad varía mínimamente, lo que implica la liberación total de ASNasa. Por otro lado, se observó que la actividad específica de ASNasa disminuye proporcionalmente hasta los 90 s, debido a la liberación de proteínas intracelulares o productos de la micronización celular.

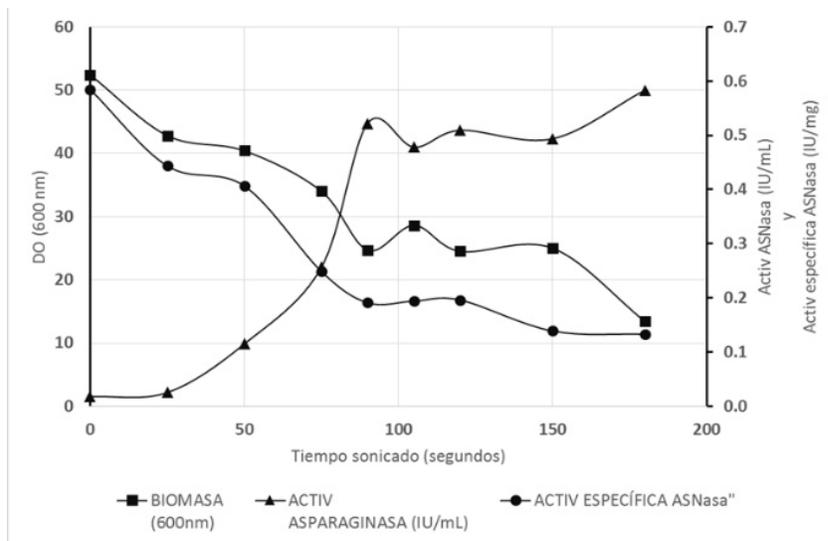


Figura 14. Comportamiento de la densidad óptica, actividad ASNasa y actividad específica de ASNasa luego del sonicado de una suspensión celular de *Bacillus* sp CH11 con DO 52.4.

Con relación a la liberación de proteasas IC, en la Figura 15 se presenta similar comportamiento que la actividad L-ASNasa, y alcanzó máxima liberación luego de 1 min y 30 s. A pesar de tener proteasas en el extracto crudo enzimático de L-ASNasa, la actividad proteasa fue menor comparada con los valores obtenidos en la producción extracelular. Considerando lo anteriormente mencionado, se determinó que el tiempo óptimo de sonicación fue de 90 ciclos (1s/5s de sonicación/enfriamiento) para las cepas de *Bacillus*.

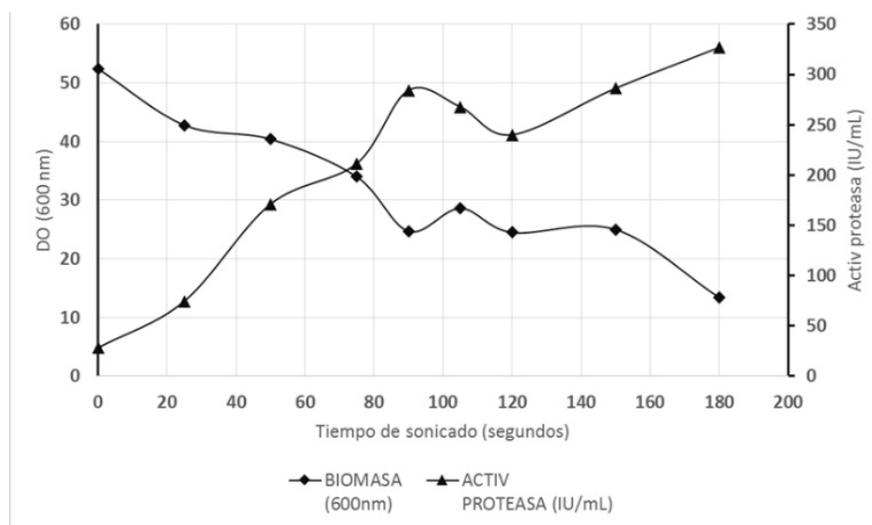


Figura 15. Comportamiento de la densidad óptica y actividad proteasa luego del sonicado de una suspensión celular de *Bacillus* sp CH11 con DO₆₀₀ 52.4.

4.6 Determinación de condiciones de crecimiento de *Bacillus* sp CH11

a) Curva de crecimiento

Se realizó la curva de crecimiento de *Bacillus* sp CH11 y se estableció que la fase exponencial fue de 5 h aproximadamente en un medio que contenía 50 mL de LB suplementado con 10 g/L de glucosa (Figura 16). La fase logarítmica fue determinada para obtener un inóculo de alta concentración celular y viabilidad.

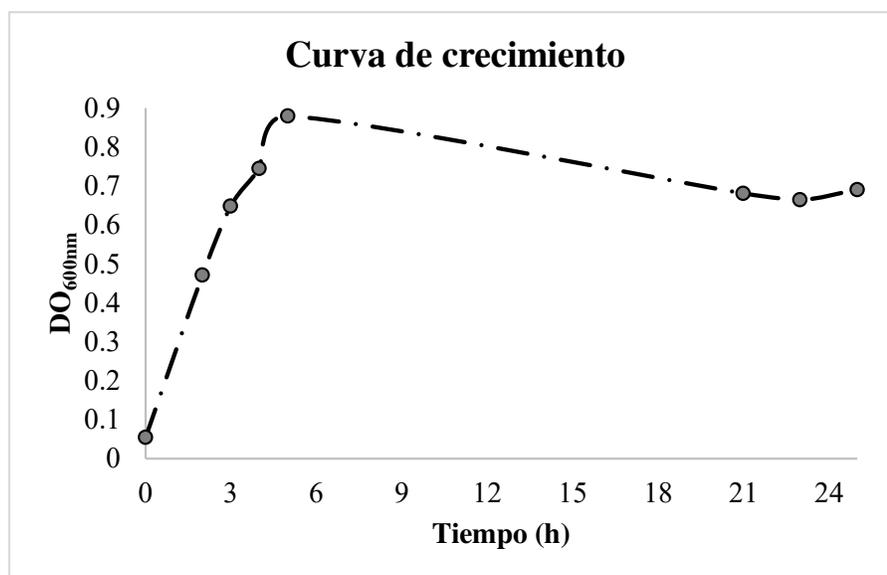


Figura 16. Curva de crecimiento de *Bacillus* sp CH11

b) Efecto de temperatura, pH y agitación sobre el cultivo

Fueron evaluados los efectos de pH 5,0 y 7,0 sobre el crecimiento de *Bacillus* sp CH11, el mejor fue el pH 5,0; la temperatura en ambos pH no presentó diferencias en la producción de L-ASNasa IC, por lo que el cultivo se realizó en este rango de temperatura (Tabla 21).

Tabla 21. Diseño factorial de pH, temperatura y agitación en el cultivo de *Bacillus* sp CH11

Nº de experimento	pH	T (°C)	Agitación	Actividad L-ASNasa (IU/mL)
1	-1	-1	-1	0,0690
2	1	-1	-1	0,0570
3	-1	1	-1	0,0190
4	1	1	-1	0,0710
5	-1	-1	1	0,1210
6	1	-1	1	0,0650
7	-1	1	1	0,1230
8	1	1	1	0,0800
9	-1	-1	-1	0,0682
10	1	-1	-1	0,0583
11	-1	1	-1	0,0200
12	1	1	-1	0,0715
13	-1	-1	1	0,1250
14	1	-1	1	0,0660
15	-1	1	1	0,1245

16	1	1	1	0,0950
----	---	---	---	--------

La agitación favorece la aeración del medio y la mejora en el crecimiento celular y la producción de diversas moléculas, así el cultivo se realizó con agitación a 200 rpm y sin agitación. En consecuencia, con agitación se determinó mayor actividad L-ASNasa, que sin agitación (Figura 17)

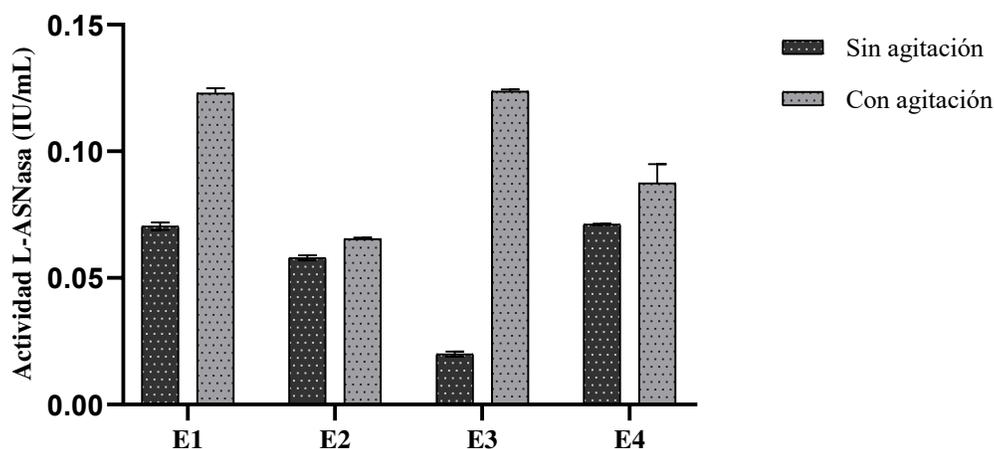


Figura 17. Evaluación de pH, temperatura y agitación en la producción L-ASNasa IC por *Bacillus* sp CH11 en alta concentración celular inicial. E1: pH 5, 30 °C. E2: pH 7, 30 °C. E3: pH5, 37 °C. E4: pH7, 37 °C.

Tabla 22. Análisis de varianza del diseño factorial 2³

Factor	Suma de cuadrados	Grado de libertad	Media cuadrado	F	p
(1) Replica	0,000035	1	0,000035	0,36237	0,573444
(2) pH	0,000701	1	0,000701	7,35891	0,042139
(3) Temperatura	0,000041	1	0,000041	0,42668	0,542463
(4) Agitación	0,008349	1	0,008349	87,65891	0,000234
1 y 2	0,000009	1	0,000009	0,09607	0,769099
1 y 3	0,000010	1	0,000010	0,10253	0,761765
1 y 4	0,000024	1	0,000024	0,24951	0,638619
2 y 3	0,001762	1	0,001762	18,49791	0,007709
2 y 4	0,004526	1	0,004526	47,51697	0,000984
3 y 4	0,000848	1	0,000848	8,90580	0,030649
Error	0,000476	5	0,000095		

Total suma de cuadrados	0,016780	15			
------------------------------------	----------	----	--	--	--

R^2 :0,97162; R^2 (ajustado):0,91486

El R^2 indica que el 97,16 % de variabilidad en la respuesta es explicado por el modelo obtenido en el diseño factorial 2^3 .

Del análisis ANOVA (Tabla 22), se observa que los factores que influyeron significativamente en la producción de L-ASNasa IC fueron pH y agitación ($p < 0,05$) con un nivel de confianza del 95%; del grafico de Pareto, la línea roja indica el valor que define estadísticamente los factores significativos (Figura 18). Así, los que ejercen un efecto significativo sobre la variable dependiente fueron la agitación, el pH, las interacciones pH-temperatura, pH-agitación, temperatura-agitación.

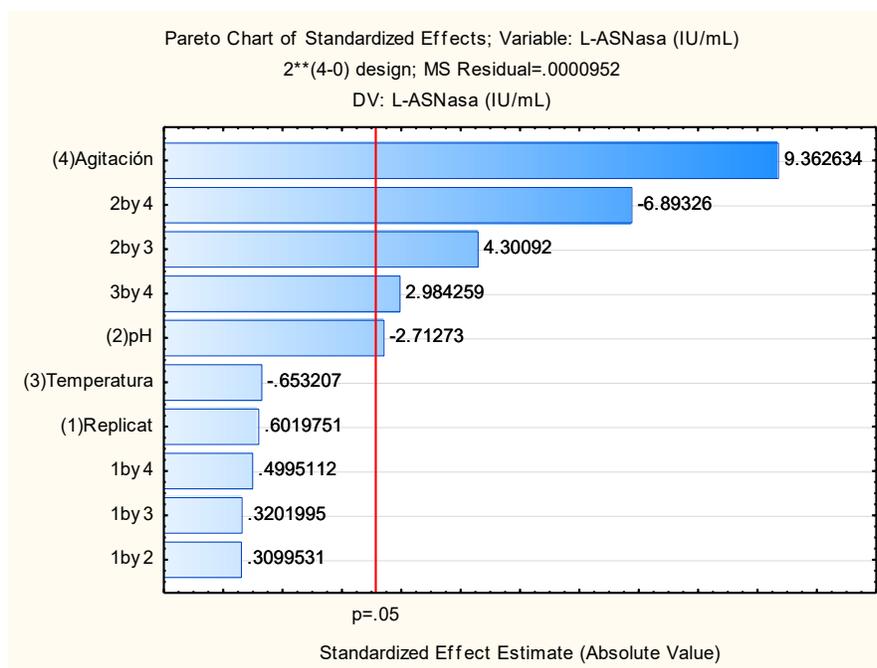


Figura 18. Efecto de temperatura, pH y agitación sobre el cultivo de *Bacillus* sp CH11

CAPITULO V: DISCUSIÓN

Especies del género *Bacillus* se han aislado de diversos ambientes, ecosistemas y regiones geográficas. Así, cepas productoras de enzimas como la L-asparaginasa (L-ASNasa) se han aislado de ambientes salinos de Irán, Egipto, India, Perú, entre otros (73). Microorganismos que habitan en salares poseen estrategias de adaptación a las condiciones extremas tanto de pH, temperatura, presión y concentración salina (17,74,75). Es así, que bacterias halófilas o halotolerantes aisladas de estos ambientes pueden contener L-ASNasa con nuevas o mejores propiedades catalíticas como alternativas para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda, así como en la reducción de acrilamida en alimentos termoprocesados (76).

En este aspecto, se ha descrito que L-ASNasa disminuye las concentraciones de L-asparagina libre en células cancerosas (77). Actualmente, las L-ASNasas bacterianas utilizadas son obtenidas de *Erwinia chrysanthemi* y *Escherichia coli*; sin embargo, estas enzimas presentan actividad L-glutaminasa (L-GLNasa) causando efectos secundarios. Sin embargo, se ha descrito que *Bacillus stratosphericus* produce una L-ASNasa con baja actividad L-GLNasa y menor efecto adverso (78). Cabe resaltar, que los efectos secundarios del tratamiento con L-ASNasa son diversos y aún siguen las investigaciones para su resolución; por lo tanto, existe una demanda creciente por el estudio de nuevas fuentes de L-ASNasa que mejoren las dificultades existentes.

De ambientes salinos, se han reportado L-ASNasas aisladas de los géneros *Bacillus*, *Halomonas*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Mesoflavibacter*, *Vibrio*, *Enterobacter*, entre otros (79–81). Así, por ejemplo, en Irán Zolfagha *et al.* (2019)(82) aislaron cepas de *Bacillus* sp. productoras de L-ASNasa. Además, Ebrahiminezhad *et al.* (2011)(83) describen 23 (72 %) aislados del lago de Maharloo identificados como *Bacillus* sp, donde ocho de ellos tuvieron actividad L-ASNasa. Asimismo, Montes *et al.* (2021)(67) identificaron 24 aislados de las salinas de Chilca (Lima), Maras (Cusco) y Pilluana (San Martín) de los cuales 13 pertenecen al género de *Bacillus*; dichas cepas fueron evaluadas por la actividad L-ASNasa de forma cualitativa mediante el uso de los indicadores rojo de fenol y azul de bromotimol en el medio de cultivo (Tabla 9). Las diferencias en la producción de

L-ASNasa por las cepas de *Bacillus* sp fueron detectadas con el azul de bromotimol, el cual tiene un mayor poder de contraste en la variación del color debido a la hidrólisis de L-asparagina en ácido aspártico y amonio por acción de L-ASNasa; y así, el color del medio cambia a azul por incremento de las concentraciones de amonio (69). En este aspecto, Mahajan *et al.* (2013)(69) probaron el método basado en indicadores de pH para evaluar microorganismos productores de L-ASNasa e incorporaron el azul de bromotimol en el medio que contiene L-asparagina, el cambio de verde (pH neutro) a azul (pH mayor a 8,0); de este modo, los investigadores indican que el azul de bromotimol es más sensible y preciso que el rojo de fenol. Asimismo, Dhale *et al.* (2014)(84) reportan que el cambio en el color del medio de cultivo se debe a la liberación de amoníaco por la actividad de L-ASNasa producida.

De las 13 cepas de *Bacillus* sp halotolerantes (Tabla 3), 10 presentaron actividad L-ASNasa extracelular desde 0,01 hasta 0,085 IU/mL (Figura 8) en el medio M9 modificado suplementado con extracto de malta (Tabla 4); estas actividades fueron bajas en comparación con Prakash *et al.* (2020)(85) quienes reportan que los aislados BITHSP009, BITHSP011, BITHSP002, BITHSP012 presentan actividades (IU/mL) de 0,25, 4,84, 0,70 y 1,33 IU/mL, respectivamente; y *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, muestran 0,25, 1,11 y 1,20 IU/mL, respectivamente. Asimismo, Ebrahiminezhad *et al.* (2011)(24) determinaron que *Bacillus* sp BCCS034 presenta una actividad de 1,64 IU/mL. Por el contrario, Pradhan *et al.* (2014)(86) reportaron que *B. subtilis* hswx88 produjo 23,8 IU/mL.

En esta investigación, las cepas de *Bacillus* sp mostraron actividades L-ASNasa y proteasa desde la fase exponencial de crecimiento (Figura 8 y 9). Las proteasas influyeron en la pérdida de la estabilidad de L-ASNasa (87) durante el crecimiento de las diferentes cepas. Con respecto a las proteasas, se ha descrito que cepas del género *Bacillus* son las más productoras (88). Así, las cepas de *Bacillus* estudiadas produjeron proteasas a concentraciones menores a 100 IU/mL (Figura 9), las L-ASNasas de las cepas M68, M64, M62, CH11 y P19 presentaron mayor estabilidad, lo cual se explicaría por la coproducción de inhibidores de proteasas. Por ejemplo, Singh *et al.* (2013)(87) indican que *B. aryabhatai* ITBHU02 presenta 31,27 U de L-ASNasa, sin actividad proteasa en el extracto crudo.

Con el fin de aumentar la producción de L-ASNasa extracelular, se realizó un diseño Plackett-Burman de evaluación de nutrientes (Tablas 5 -7) para la cepa CH11. Sin embargo, no se determinó actividad L-ASNasa, la cual ha sido descrita en diversas cepas del género *Bacillus*. En este aspecto, la producción de L-ASNasa depende del gen *ansA*, ubicado en el operón *ansAB* regulado por asparagina o aspartato (23). En consecuencia, este operón es inducido o reprimido por los componentes del medio de cultivo; en ese caso se reporta incremento de la producción de L-ASNasa cuando existe una fuente de nitrógeno limitante en medio mínimo de glucosa que contiene glutamato, prolina o urea como única fuente de nitrógeno (23). Además, Ameen *et al.* (2020)(89) indican que la expresión del gen *ansZ* que codifica para L-ASNasa en *B. subtilis* es activada en un medio limitante de nitrógeno (23).

Por otro lado, el diseño Plackett-Burman presentó resultados significativos (Tabla 12) para el crecimiento celular de *Bacillus sp* CH11 (Figura 10); la sacarosa y el glutamato tuvieron efectos positivos; por el contrario, con la prolina y la triptona se obtuvieron efectos negativos (Figura 11). Estos factores se deben tomar en cuenta para otros diseños de crecimiento celular debido a que la mayor producción de L-ASNasa ocurre en la fase exponencial del crecimiento bacteriano (26). Asimismo, en nuestro estudio, el uso de L-asparagina no es significativo; sin embargo, en otras investigaciones han mostrado efectos positivos en la producción de L-ASNasa por la inducción de la expresión de L-ASNasa (90-93). De igual forma, Thenmozhi *et al.* (2011)(94) utilizaron el diseño Plackett-Burman, para evaluar el efecto de nutrientes, de esta forma encontraron que la harina de soja, la L-asparagina y el NaCl son variables significativas en la producción de L-ASNasa de *B. cereus* MAB5. Asimismo, Shirazian *et al.* (2016)(26) reportaron que al utilizar diseños estadísticos aumentando las concentraciones de asparagina hasta 5,8% y glucosa hasta 5% incrementaron la producción L-ASNasa en *Bacillus aryabhatai*; y cuando sobrepasaron estos valores obtuvieron un efecto negativo; de forma similar fue la interacción entre el cloruro de sodio y la L-asparagina. Por otra parte, Abdelrazek *et al.* (2019)(95) evaluaron el efecto de glucosa 0,5%; cloruro de amonio 0,1%, y sulfato de magnesio 10 mM en la producción de la enzima, ellos indican que son las concentraciones óptimas para la producción máxima de L-ASNasa en *B. licheniformis*. En consecuencia, la interacción entre nutrientes y sus concentraciones juegan un papel importante en la regulación de las concentraciones de L-ASNasa.

Con referencia al efecto de las proteasas sobre la actividad L-ASNasa de *E. coli* (Tabla 13), se observó la pérdida de más del 90 % de la actividad después de 30 min de incubación, lo cual sugiere que la pérdida de actividad es independiente del grado de actividad proteasa; los valores fueron significativos mediante el análisis ANOVA (Tabla 14), pruebas de Tukey (Tablas 15 y 16) y Dunnett (Tabla 17). En consecuencia, a pesar de una baja producción de proteasas, la estabilidad de L-ASNasa disminuye; en este aspecto, la presencia de las proteasas podría anular la producción de L-ASNasa cuando las bacterias son cultivadas durante varias horas. No obstante, se ha reportado que las bacterias producen inhibidores que regulan sus propias proteasas, tal es el caso de BSuPI, un inhibidor producido por *B. subtilis*, el cual inhibe varias serin proteasas microbianas (96). Acorde a ello, Pritsa *et al.* (2001)(97) describen que compuestos como el fluoruro de fenilmetilsufonil (PMSF), inhibidor de serin proteasas inactivó a L-ASNasa; de esta forma, se puede inferir que L-ASNasa es una serinproteína. Asimismo, Sindhu & Manonmani (2018)(98) aseveraron una inhibición de L-ASNasa en un 63 % por PMSF.

Considerando que la producción de la biomasa es dependiente de los nutrientes, se evaluó la producción de L-ASNasa intracelular (L-ASNasa IC) en cultivos a alta densidad óptica a 600 nm. En este aspecto, se desarrolló una etapa previa de cultivo en medio LB, rico en nutrientes que favorecen el crecimiento rápido de bacterias, contiene menos de 100 μ M de azúcares fermentables (99). Para la fase de producción de biomasa, se utilizó el medio LB suplementado con glucosa 10 g/L, se creció hasta la fase exponencial para obtener células metabólicamente activas. La producción de L-ASNasa IC se determinó mediante las actividades que estuvieron en el rango de 0,353 - 0,973 IU/mL (Tabla 18) en las cepas M68, CH11, P31 y P4 (Figura 12A) en el medio modificado, propuesto por Qeshmi *et al.* (100), cuyo ensayo fue significativo (Tabla 19); de igual forma, las actividades fueron diferentes entre cepas (Tabla 20). En este aspecto, Ebrahiminezhad *et al.* (2011)(83) reportaron 0,2 IU/mL de L-ASNasa IC en el extracto celular de *B. thuringiensis*; Rahimzadeh *et al.* (2016)(50) describen a *Bacillus* PG-03 y *Bacillus* PG-04 cuyas actividades intracelulares fueron aproximadamente de 3 U/mL en presencia de L-asparagina 1%(w/v), medio M9 y maltosa 20 % a las 24 h. Asimismo, Abdelrazek *et al.* (2019)(101) indican que *B. lichiniformis* presenta una actividad intracelular de 5,5 IU/mL/h.

La actividad proteolítica de las cepas productoras de L-ASNasa IC (Figura 12B) redujo la estabilidad de la enzima, por lo que se requieren estrategias para incrementar la actividad L-ASNasa y minimizar la pérdida de su actividad enzimática por acción de las proteasas. Para continuar con la investigación, se estudió la cinética de crecimiento de la cepa CH11 (Figura 16); además, se evaluó los efectos del pH, temperatura, y agitación en la producción de L-ASNasa IC (Tabla 21); la mejor producción fue a pH 5,0 (Figura 17), ello puede ser debido a que a pH menor de 6,0 limita la producción de proteasas en algunas especies del género *Bacillus* (102), de esta forma ello representaría mejores condiciones para la estabilidad de L-ASNasa. La temperatura en ambos pH no influyó en la producción de L-ASNasa IC (Tabla 22), por lo que el cultivo puede ser realizado en este rango de temperatura. Así por ejemplo, Rudrapati & Audipudi (103) reportaron la mejor producción de ASNasa por *Bacillus firmus* AVP18 a 37 °C. Asimismo, se evaluó el efecto de la agitación sobre la producción de L-ASNasa (Figura 18), debido a que la agitación favorece la disponibilidad del oxígeno y los nutrientes del medio. Se conoce que la solubilidad del oxígeno en medio acuoso es baja (aproximadamente 7 mg/L) y con alta concentración de células en el cultivo, la solubilidad se reduce aún más (104). Además, se debe tener en consideración que el oxígeno no solo influye en el crecimiento celular, sino también sobre la expresión de algunos genes y en el estado oxidativo de proteínas (105). Algunos estudios indican que se observa una mayor producción de L-ASNasa a 220 rpm (106), y en sistema de biorreactor, la estrategia de control de velocidad incluía agitación a 600 rpm durante las primeras 12 h, seguido de un aumento gradual hasta 900 rpm, permitió una mejora en el rendimiento (107).

Con referencia a la optimización de las condiciones de rompimiento celular permitió determinar el tiempo para obtener un extracto crudo con mayor actividad L-ASNasa y menor concentración de proteínas totales. En este aspecto, los métodos de rompimiento celular ofrecen alta eficiencia de liberación de proteínas; sin embargo, muestran una baja selectividad de proteínas debido a la micronización, porque los residuos celulares generados son formados secuencialmente en finas partículas durante periodos prolongados de rompimiento; la liberación de ADN incrementa la viscosidad y la liberación de proteasas IC. Además, el método de sonicación genera calor, lo cual favorece la acción de las proteasas (108). Considerando estas desventajas, se optimizó el rompimiento celular a temperaturas menores a 10 °C (Figura 13A) para minimizar el tiempo y prevenir el aumento en la

viscosidad. Como se observa en la Figura 13B, la sonicación de una muestra de células suspendidas de DO₆₀₀ igual a 50 generó mayor calor que una de 100; debido a que el incremento en la viscosidad de la suspensión celular reduce la generación de calor en la muestra (109). La liberación de productos intracelulares como se muestra en las Figuras 14 y 15, está relacionada con el tiempo y el nivel de sonicación (110), la biomasa inició con una DO₆₀₀ de 52,4, y después de 90 s de sonicación la DO₆₀₀, fue menor a 25, después de ese periodo, la densidad varía poco, lo cual sugiere el inicio de la micronización. En este contexto se define óptimo al tiempo mínimo en que se libera la enzima y presenta la mayor actividad enzimática a menor concentración de proteínas totales (111,112).

Los hallazgos del estudio determinaron que L-ASNasa es susceptible a proteasas y eso se reflejó en la variación de los resultados; no obstante, L-ASNasa IC fue influenciada por el pH y agitación por lo que la producción de la enzima se podría incrementar si se utilizan metodologías de optimización como la superficie de respuesta, para obtener valores óptimos de las variables de estudio. Asimismo, en un primer *screening* el pH 5 resultó beneficioso; por lo que se recomienda evaluar rangos cercanos al encontrado para determinar la estabilidad, a fin de que no ocurra una desnaturalización parcial de la enzima en respuesta a la disociación de los grupos ionizables de la proteína; o una inhibición de la unión del sustrato a la enzima como resultado del cambio en las propiedades y la forma de la enzima y / o el sustrato (95). Del mismo modo, la agitación al favorecer la disponibilidad de oxígeno y nutrientes en el medio (113), se sugiere que se evalúen valores mayores a 200 rpm ya que el aumento en la velocidad de agitación ayuda a mezclar los nutrientes que mejoran su absorción por los microorganismos (114,115), utilizando una estrategia de control de velocidad de agitación de varias etapas tomando en cuenta que a velocidades altas podría ocurrir un posible daño de la fisiología del organismo (107). Asimismo, los tiempos de producción podrían ser menores a 24 h, debido a que tiempos prolongados de agitación conlleva a la degradación de la enzima por las proteasas y también se agotan los componentes o se producen inhibidores en el medio. Es así que si se determina tiempos reducidos resultaría rentable y disminuiría la posibilidad de descomposición de la enzima (106,116).

La selección de *Bacillus sp* CH11 se debió a la identificación de la secuencia del gen *ansZ*, el cual expresa L-ASNasa tipo II; esta enzima es intracelular; por lo que, su obtención es

dificultosa, el proceso de rompimiento celular influye en la degradación, y su escalamiento es costoso. En consecuencia, se recomienda el clonaje y expresión del gen *ansZ* de esta bacteria halotolerante en *E. coli*, a fin de evitar la degradación de la enzima por las proteasas producidas. Además, la pared celular de *E. coli* es delgada y facilita la liberación de la enzima; así, la producción se incrementaría y facilitaría su purificación.

CAPITULO VI: CONCLUSIONES

- ✓ Se seleccionaron cepas de *Bacillus* sp halotolerante productoras de L- ASNasa extracelular con métodos cualitativo y cuantitativo en cultivo sumergido en medio M9 suplementado con azul de bromotimol y extracto de malta, respectivamente.
- ✓ Se produjo L-ASNasa intracelular cuyas actividades fueron 0,973, 0,545, 0,354 y 0,440 U/mL en las cepas M68, CH11, P31 y P4, respectivamente, en un medio que contenía en g/L: L-asparagina, 1; glucosa, 10; extracto de levadura, 10; hidrogeno fosfato de sodio, 3; di hidrogeno fosfato de sodio, 6; cloruro de sodio, 0,5; sulfato de magnesio, 0,12; cloruro de calcio, 0,011.
- ✓ Se encontró que el pH y la agitación influyeron significativamente en la producción de L- ASNasa intracelular en *Bacillus* sp CH11 halotolerante. Así, se obtuvo una actividad de 0,125 U/mL cuando las condiciones fueron pH 5, temperatura 37 °C y agitación 200 rpm.

CAPITULO VIII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Quax W. Bacterial Enzymes. In: Rosenberg E, editor. *The Prokaryotes: Applied Bacteriology and Biotechnology*. 2013. p. 193–211.
2. Ferrer-Miralles N, Domingo-Espín J, Corchero J, Vázquez E, Villaverde A. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microb Cell Fact*. 2009;8(17):1–8.
3. Trono D. Recombinant enzymes in the food and pharmaceutical industries [Internet]. *Biomass, Biofuels, Biochemicals: Advances in Enzyme Technology*. Elsevier B.V.; 2019. 349–387 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-64114-4.00013-3>
4. Cachumba Muso JJ, Antunes FAF, Peres GFD, Brumano LP, Santos JC Dos, Da Silva SS. Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. *Brazilian J Microbiol* [Internet]. 2016;47:77–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.004>
5. Pieters R, Hunger SP, Boos J, Rizzari C, Silverman L, Baruchel A, et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2011;117(2):238–49.
6. Aldoss I, Douer D, Behrendt CE, Chaudhary P, Mohrbacher A, Vrona J, et al. Toxicity profile of repeated doses of PEG-asparaginase incorporated into a pediatric-type regimen for adult acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Haematol*. 2016;96(4):375–80.
7. Tong WH, Pieters R, de Groot-Kruseman HA, Hop WCJ, Boos J, Tissing WJE, et al. The toxicity of very prolonged courses of PEG asparaginase or *Erwinia* asparaginase in relation to asparaginase activity, with a special focus on dyslipidemia. *Haematologica*. 2014;99(11):1716–21.
8. Hijiya N, Van Der Sluis IM. Asparaginase-Associated toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia. Vol. 57, *Leukemia and Lymphoma*. 2016. 748–757 p.
9. Parmentier JH, Maggi M, Tarasco E, Scotti C, Avramis VI, Mittelman SD. Glutaminase activity determines cytotoxicity of l-asparaginases on most leukemia cell lines. *Leuk Res* [Internet]. 2015;39(7):757–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2015.04.008>
10. Nguyen HA, Su Y, Zhang JY, Antanasijevic A, Caffrey M, Schalk AM, et al. A Novel L - asparaginase with low L -glutaminase co-activity is highly efficacious against both T- and B-cell acute lymphoblastic leukemias in vivo. *Am Assoc Cancer Res*. 2018;(9):1549–61.
11. Chohan SM, Rashid N. Gene cloning and characterization of recombinant L-Asparaginase from *Bacillus subtilis* strain R5. *Biol*. 2018;73(5):537–43.
12. Mahajan R V., Kumar V, Rajendran V, Saran S, Ghosh PC, Saxena RK. Purification and characterization of a novel and robust L-asparaginase having low-glutaminase activity from

- bacillus licheniformis: In vitro evaluation of anti-cancerous properties. PLoS One. 2014;9(6).
13. Onishi Y, Yano S, Thongsanit J, Takagi K, Yoshimune K, Wakayama M. Expression in *Escherichia coli* of a gene encoding type II L-asparaginase from *Bacillus subtilis*, and characterization of its unique properties. *Ann Microbiol*. 2011;61(3):517–24.
 14. Kushner DJ. Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. In: Kushner DJ, editor. *Microbial life in extreme environments*. Academic Press; 1978. p. 317–68.
 15. Oren A. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environ Technol*. 2010;31(8–9):825–34.
 16. Corral P, Amoozegar MA, Ventosa A. Halophiles and their biomolecules: Recent advances and future applications in biomedicine. *Mar Drugs*. 2020;18(1).
 17. Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62(2):504–44.
 18. Sanchez-Garcia L, Martín L, Mangués R, Ferrer-Miralles N, Vázquez E, Villaverde A. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: A 2015 update. *Microb Cell Fact*. 2016;15(33):1–7.
 19. Egler R., Ahuja P., Matloub Y. L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. *J Pharmacol Pharmacother* [Internet]. 2016;7(2):62–71. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4936081/#ref13>
 20. Palmer E. Lundbeck to stop making cancer drug [Internet]. *FiercePharma*. 2012. p. 1. Available from: <https://www.fiercepharma.com/m-a/lundbeck-to-stop-making-cancer-drug>
 21. Moscardó Guilleme C, Fernández Delgado R, Sevilla Navarro J, Astigarraga Aguirre I, Rives Solà S, Sánchez De Toledo Codina J, et al. Actualización del tratamiento con L-asparaginasa en Pediatría. *An Pediatr*. 2013;79(5):329e1–11.
 22. Solomon B, Parihar N, Ayodole L, Hughes M. Global incidence and prevalence of acute lymphoblastic leukemia: A 10-year forecast. In: 11th International Conference on Hematology & Hematological Oncology. Las Vegas: *Journal of Blood Disorders & Transfusion*; 2017. p. 9864.
 23. Fisher SH, Wray L V. *Bacillus subtilis* 168 contains two differentially regulated genes encoding L-asparaginase. *J Bacteriol*. 2002;184(8):2148–54.
 24. Ebrahiminezhad A, Rasoul-amini S, Ghasemi Y. L -Asparaginase production by moderate halophilic bacteria isolated from Maharloo salt lake. *Indian J Microbiol*. 2011;51(3):307–11.
 25. Singh Y, Srivastav SK. Statistical and evolutionary optimization for enhanced production of an antileukemic enzyme, L-asparaginase, in a protease-deficient *Bacillus aryabhatai* ITBHU02 isolated from the soil contaminated with hospital waste. *Indian J Exp Biol*. 2013;51(4):322–35.

26. Shirazian P, Asad S, Amoozegar MA. The potential of halophilic and halotolerant bacteria for the production of antineoplastic enzymes: L-Asparaginase and L-glutaminase. *EXCLI J*. 2016;15:268–79.
27. Zolfaghar M, Amoozegar MA, Khajeh K, Babavalian H, Tebyanian H. Isolation and screening of extracellular anticancer enzymes from halophilic and halotolerant bacteria from different saline environments in Iran. *Mol Biol Rep* [Internet]. 2019;46(3):3275–86. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04787-7>
28. Roy MP, Das V, Patra A. Isolation, purification and characterization of an extracellular L-asparaginase produced by a newly isolated *Bacillus megaterium* strain MG1 from the water bodies of Moraghat forest, Jalpaiguri, India. *J Gen Appl Microbiol*. 2019;65(3):137–44.
29. Ulu A, Ates B. Immobilization of L-Asparaginase on Carrier Materials: A Comprehensive Review. *Bioconjug Chem*. 2017;28:1598–610.
30. Ehrman M, Cedar H, Schwartz JH. L-Asparaginase II of *Escherichia coli*: Studies on the enzymatic mechanism of action. *J Biol Chem*. 1971;246(1):88–94.
31. Shrivastava A, Khan AA, Khurshid M, Kalam MA, Jain SK, Singhal PK. Recent developments in L-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. 2016;100:1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.01.002>
32. Soares AL, Guimarães GM, Polakiewicz B, Pitombo RNDM, Abrahão-Neto J. Effects of polyethylene glycol attachment on physicochemical and biological stability of *E. coli* L-asparaginase. *Int J Pharm*. 2002;237(1–2):163–70.
33. Richards NGJ, Kilberg MS. Asparagine Synthetase Chemotherapy. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:629–54.
34. Wise DR, Thompson CB. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2010;35(8):427–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2010.05.003>
35. Willems L, Jacque N, Jacquelin A, Neveux N, Maciel TT, Lambert M, et al. Inhibiting glutamine uptake represents an attractive new strategy for treating acute myeloid leukemia. *Blood J*. 2013;122(20):3521–33.
36. Samudio I, Konopleva M. Asparaginase unveils glutamine-addicted AML. *Blood J*. 2013;122(20):3398–401.
37. SWISS-MODEL [Internet]. O34482 (ASPG2_BACSU) *Bacillus subtilis* (strain 168). [cited 2020 Jul 11]. Available from: <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/O34482?csm=95FC5A221CE57B58>
38. Swain A, Jaskolski M, Housset D, Rao J, Wlodawer A. Crystal structure of *Escherichia coli*

- L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90(4):1474–8.
39. Rao JKM, Gribskov M, Lubkowski J, Miller M, Swain AL, Wlodawer A. A Comparison of the Crystal Structures of Bacterial L-Asparaginases. 1996;
 40. Augusta M, Rodrigues D. Avaliação da atividade e resistência à clivagem proteolítica de L-asparaginases recombinantes obtidas por reação em cadeia da polimerase propensa a erro avaliação da atividade e resistência à clivagem proteolítica de L-asparaginases recombinantes Obtidas. Universidade de Sao Paulo; 2016.
 41. Madej T, Lanczycki C, Zhang D, Thiessen P, Geer R, Marchler-Bauer A, et al. " MMDB and VAST+: tracking structural similarities between macromolecular complexes. Nucleic Acids Res. 2014 Jan; 42(Database issue):D297-303. Nucleic Acids Res. 2014. p. 297–303.
 42. Chand S, Mahajan R V, Prasad JP, Sahoo DK, Mihooliya KN, Dhar MS, et al. A comprehensive review on microbial L -asparaginase : Bioprocessing , characterization , and industrial applications. Biotechnol Appl Biochem [Internet]. 2020;1–30. Available from: 10.1002/bab.1888
 43. Zhang S, Xie Y, Zhang C, Bie X, Zhao H, Lu F, et al. Biochemical characterization of a novel L -asparaginase from *Bacillus megaterium* H-1 and its application in French fries. Food Res Int. 2015;77(3):527–33.
 44. Srikhanta YN, Atack JM, Beacham IR, Jennings MP. Distinct physiological roles for the two L -asparaginase isozymes of *Escherichia coli*. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 2013;436(3):362–5. Available from: 10.1016/j.bbrc.2013.05.066
 45. Shakambari G, Sameer Kumar R, Ashokkumar B, Ganesh V, Vasantha VS, Varalakshmi P. Cloning and expression of L-asparaginase from *Bacillus tequilensis* PV9W and therapeutic efficacy of Solid Lipid Particle formulations against cancer. Sci Rep. 2018;8(1):1–11.
 46. Clementi A. La desamidation enzymatique de l'asparagine chez les différentes espèces animales et la signification physiologique de sa presence dans l'organisme. Arch Intern Physiol. 1922;19:369.
 47. Vidya J, Sajitha S, Ushasree M V., Binod P, Pandey A. Therapeutic Enzymes: L-Asparaginases [Internet]. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products. Elsevier B.V.; 2016. 249–265 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00012-9>
 48. Lopes AM, Oliveira-nascimento L De, Ribeiro A, Jr AT, Breyer CA, Oliveira MA De, et al. Critical Reviews in Biotechnology Therapeutic l-asparaginase : upstream , downstream and beyond. Crit Rev Biotechnol. 2017;37(1):82–9.
 49. Fisher SH, Wray L V. *Bacillus subtilis* 168 Contains Two Differentially Regulated Genes

- Encoding L -Asparaginase. *J Bacteriol.* 2002;184(8):2148–54.
50. Rahimzadeh M, Poodat M, Javadpour S, Qeshmi FI. Purification , Characterization and Comparison between Two New L-asparaginases from *Bacillus* PG03 and *Bacillus* PG04. *Open Biochem J* [Internet]. 2016;10:35–45. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5144114/pdf/TOBIOJ-10-35.pdf>
 51. Ceconello DK, Magalhães MR de, Werlang ICR, Lee ML de M, Michalowski MB, Daudt LE. Asparaginase: an old drug with new questions. *Hematol Transfus Cell Ther* [Internet]. 2020;42(3):275–82. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.htct.2019.07.010>
 52. Dias FFG, Ruiz ALTG, Torre A Della, Sato HH. Purification, characterization and antiproliferative activity of L-asparaginase from *Aspergillus oryzae* CCT 3940 with no glutaminase activity. *Asian Pac J Trop Biomed* [Internet]. 2016;6(9):785–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.07.007>
 53. Barba P, Dapena JL, Montesinos P, Rives S. Asparaginase use for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Med Clin (Barc)* [Internet]. 2017;148(5):225–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.medcli.2016.12.006>
 54. Munhoz I. Produção , caracterização cinética e engenharia de proteína asparaginase 1 de *Saccharomyces cerevisiae* para avaliação de seu uso como biofármaco. Universidad de Sao Paulo; 2015.
 55. Brumano LP, da Silva FVS, Costa-Silva TA, Apolinário AC, Santos JHPM, Kleingesinds EK, et al. Development of L-asparaginase biobetters: Current research status and review of the desirable quality profiles. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;6(JAN):1–22.
 56. Medicines Evaluation Board. Public Assessment Report Scientific discussion Erwinase, powder for solution for injection 10,000 IU/vial (crisantaspase) [Internet]. 2015. Available from: <https://db.cbg-meb.nl/Pars/h16986.pdf>
 57. Egler R., Ahuja S., Matloub Y. L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. *J Pharmacol Pharmacother.* 2016;7(2):62.
 58. Beckett A, Gervais D. What makes a good new therapeutic l-asparaginase? *World J Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2019;35(10):1–13. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2731-9>
 59. Nguyen HA, Su Y, Lavie A. Design and characterization of erwinia chrysanthemi L-asparaginase variants with diminished L-glutaminase activity. *J Biol Chem.* 2016;291(34):17664–76.
 60. Sassi AB, Nagarkar R, Hamblin P. Biobetter Biologics. In: Singh M, Salnikova M, editors. *Novel Approaches and Strategies for Biologics, Vaccines and Cancer Therapies* [Internet]. Elsevier Inc.; 2015. p. 199–217. Available from:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124166035000092>

61. Jozala AF, Gerald DC, Tundisi LL, Feitosa V de A, Breyer CA, Cardoso SL, et al. Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. *Brazilian J Microbiol* [Internet]. 2016;47:51–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.007>
62. Xu F, Oruna-Concha M-J, Elmore JS. The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food. *FOOD Chem*. 2016;210:163–71.
63. Krishnapura PR, Belur PD, Subramanya S. A critical review on properties and applications of microbial l-asparaginases. *Crit Rev Microbiol* [Internet]. 2016;42(5):720–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.3109/1040841X.2015.1022505>
64. Grossowicz N, Wainfan E, Borek E, Waelsch H. The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine. *J Biol Chem*. 1950;187(1):111–25.
65. Zhang, John X., Kazunori H. Optical transducers: Optical molecular sensing and spectroscopy. In: *Principles, Designs and Applications in Biomedical Engineering Micro and Nano Technologies*. 2nd ed. 2019. p. 231–309.
66. Coêlho DF, Saturnino TP, Fernandes FF, Mazzola PG, Silveira E, Tambourgi EB. Azocasein Substrate for Determination of Proteolytic Activity : Reexamining a Traditional Method Using Bromelain Samples. *Biomed Res Int*. 2016;2016.
67. Montes J, Canales PE, Flores-santos JC, Saavedra S, Hurtado-Gomez A, Esquerre-Huallpa C, et al. Bacteria producing L -asparaginase isolated from Peruvian saline environments. *Manglar*. 2021;18(2):193–9.
68. Gulati R, Saxena RK, Gupta R. A rapid plate assay for screening L -asparaginase producing microorganisms. *Lett Appl Microbiol*. 1997;24:23–6.
69. Mahajan R V, Saran S, Saxena RK, Srivastava AK. A rapid, efficient and sensitive plate assay for detection and screening of L-asparaginase - producing microorganism. *Fed Eur Microbiol Soc Microbiol Lett*. 2013;341:122–6.
70. Qeshmi FI, Rahimzadeh M, Javadpour S, Poodat M. Intracellular L-Asparaginase from *Bacillus* sp. PG02: Purification, Biochemical Characterization and Evaluation of Optimum pH and Temperature. *Am J Biochem Biotechnol*. 2016;12(1):12–9.
71. Jia M, Xu M, He B, Rao Z. Cloning, expression, and characterization of L-asparaginase from a newly isolated *Bacillus subtilis* B11-06. *J Agric Food Chem*. 2013;61(39):9428–34.
72. Truppo MD, Turner NJ. Micro-scale process development of transaminase catalysed reactions. *Org Biomol Chem*. 2010;8(6):1280–3.
73. Flores-Fernández ML, Zavaleta AI, Chávez-Hidalgo EL. Bacterias halotolerantes con actividad lipolítica aisladas de las Salinas de Pilluana - San Martín. *Cienc Invest*.

- 2010;13(2):88–92.
74. Gomes J, Steiner W. The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food Technol Biotechnol*. 2004;42(4):223–35.
 75. Enache M, Kamekura M. Hydrolytic enzymes of halophilic microorganisms and their economic values. *Rom J Biochem*. 2010;47(1):46–59.
 76. Batool T, Makky EA, Jalal M, Yusoff MM. A Comprehensive Review on L-Asparaginase and Its Applications. *Appl Biochem Biotechnol*. 2016;178(5):900–23.
 77. Safary A, Moniri R, Hamzeh-Mivehroud M, Dastmalchi S. Highly efficient novel recombinant L-asparaginase with no glutaminase activity from a new halo-thermotolerant *Bacillus* strain. *BioImpacts* [Internet]. 2019;9(1):15–23. Available from: <https://doi.org/10.15171/bi.2019.03>
 78. Pola M, Rajulapati SB, Potla Durthi C, Erva RR, Bhatia M. In silico modelling and molecular dynamics simulation studies on L-Asparaginase isolated from bacterial endophyte of *Ocimum tenuiflorum*. *Enzyme Microb Technol* [Internet]. 2018;117(June):32–40. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.06.005>
 79. Ashok A, Doriya K, Rao JV, Qureshi A, Tiwari AK, Kumar DS. Microbes producing L-asparaginase free of glutaminase and urease isolated from extreme locations of Antarctic Soil and Moss. *Sci Rep* [Internet]. 2019;9(1):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-38094-1>
 80. Muneer F, Siddique MH, Azeem F, Rasul I, Muzammil S, Zubair M, et al. Microbial l-asparaginase: purification, characterization and applications. *Arch Microbiol* [Internet]. 2020;202(5):967–81. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01814-1>
 81. Barati M, Faramarzi MA, Nafissi-Varcheh N, Khoshayand MR, Tehrani MHH, Vahidi H, et al. L-asparaginase activity in cell lysates and culture media of halophilic bacterial isolates. *Iran J Pharm Res*. 2016;15(3):435–40.
 82. Zolfaghar M, Amoozegar MA, Khajeh K, Babavalian H, Tebyanian H. Isolation and screening of extracellular anticancer enzymes from halophilic and halotolerant bacteria from different saline environments in Iran. *Mol Biol Rep*. 2019;46(3):3275–86.
 83. Ebrahiminezhad A, Rasoul-Amini S, Ghasemi Y. L-asparaginase production by moderate halophilic bacteria isolated from Maharloo Salt Lake. *Indian J Microbiol*. 2011;51(3):307–11.
 84. Dhale MA, Mohan-Kumari HP. A comparative rapid and sensitive method to screen l-asparaginase producing fungi. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2014;102:66–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2014.04.010>
 85. Prakash P, Singh HR, Jha SK. Indicator dye based screening of glutaminase free L-asparaginase producer and kinetic evaluation of enzyme production process. *Prep Biochem*

- Biotechnol [Internet]. 2020;50(8):803–13. Available from: <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1737942>
86. Pradhan B, Dash SK, Sahoo S. Screening and characterization of extracellular L-asparaginase producing *Bacillus subtilis* strain hswx88, isolated from Taptapani hot spring of Odisha, India. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013;3(12):936–41.
 87. Singh Y, Gundampati R, Jagannadham M, Srivastava S. Extracellular L-asparaginase from a protease-deficient *Bacillus aryabhatai* ITBHU02: purification, biochemical characterization, and evaluation of antineoplastic activity in vitro. *Appl Biochem Biotechnol*. 2013;171(7):1759–1774.
 88. Bhunia B, Basak B, Dey A. A review on production of serine alkaline protease by *Bacillus spp*. *J Biochem Technol*. 2012;3(4):448–57.
 89. Ameen F, Alshehri WA, Al-Enazi NM, Almansob A. L-Asparaginase activity analysis, ansZ gene identification and anticancer activity of a new *Bacillus subtilis* isolated from sponges of the Red Sea. *Biosci Biotechnol Biochem* [Internet]. 2020;84(12):2576–84. Available from: <https://doi.org/10.1080/09168451.2020.1807310>
 90. Sunitha M, Ellaiah P, Devi RB. Screening and optimization of nutrients for Lasparaginase production by *Bacillus cereus* MNTG-7 in SmF by Plackett-Burmann design. *African J Microbiol Res*. 2010;4(4):297–303.
 91. Gholamian S, Gholamian S, Nazemi A, Miri Nargesi M. Optimization of culture media for L-asparaginase production by newly isolated bacteria, *Bacillus sp.* GH5. *Microbiology*. 2013;82(6):856–63.
 92. Gholamian S, Nazemi A, Nargesi M. Isolation and characterization of a novel *Bacillus sp.* strain that produces L-asparaginase, an antileukemic drug. *Asian J Biol Sci*. 2013;6(2):106–15.
 93. Savitri, Asthana N, Azmi W. Microbial L-Asparaginase : A Potent Antitumour Enzyme. *Indian J Biotechnol*. 2003;2(April):184–94.
 94. Thenmozhi C, Sankar R, Karupiah V, Sampathkumar P. L-asparaginase production by mangrove derived *Bacillus cereus* MAB5: Optimization by response surface methodology. *Asian Pac J Trop Med* [Internet]. 2011;4(6):486–91. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60132-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60132-6)
 95. Abdelrazek NA, Elkhatib WF, Raafat MM, Aboulwafa MM. Experimental and bioinformatics study for production of l-asparaginase from *Bacillus licheniformis*: a promising enzyme for medical application. *AMB Express* [Internet]. 2019;9(1). Available from: <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0751-3>
 96. Harish BS, Uppuluri KB. Microbial serine protease inhibitors and their therapeutic

- applications. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2018;107:1373–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.115>
97. Pritsa AA, Kyriakidis DA. L-asparaginase of *Thermus thermophilus*: Purification, properties and identification of essential amino acids for its catalytic activity. *Mol Cell Biochem*. 2001;216(1–2):93–101.
 98. Sindhu R, Manonmani HK. Expression and characterization of recombinant L-asparaginase from *Pseudomonas fluorescens*. *Protein Expr Purif* [Internet]. 2018;143:83–91. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.09.009>
 99. Sezonov G, Joseleau-Petit D, D’Ari R. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J Bacteriol*. 2007;189(23):8746–9.
 100. Qeshmi FI, Rahimzadeh M, Javadpour S, Poodat M. Intracellular L-Asparaginase from *Bacillus* sp.PG02: Purification, Biochemical Characterization and Evaluation of Optimum pH and Temperature. *Am J Biochem Biotechnol*. 2016;12(1):12–9.
 101. Abdelrazek NA, Elkhatib WF, Raafat MM, Aboulwafa MM. Experimental and bioinformatics study for production of l-asparaginase from *Bacillus licheniformis*: a promising enzyme for medical application. *AMB Express*. 2019;9(1).
 102. Surendran A, Vennison SJ, Ravikumar S, Ali MS. Optimization of alkaline protease production *Bacillus sphaericus* SBS4 by soil bacterium. *J Pharm Res*. 2011;4(5):1517–9.
 103. Rudrapati P, Audipudi A V. Production and purification of anticancer enzyme L-asparaginase from *Bacillus firmus* AVP 18 of Mangrove Sample through submerged fermentation. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*. 2017;5(5):1–18.
 104. Bhattacharya SK, Dubey AK. Effects of dissolved oxygen and oxygen mass transfer on overexpression of target gene in recombinant *E. coli*. *Enzyme Microb Technol*. 1997 Apr;20(5):355–60.
 105. De Maré L, Velut S, Ledung E, Cimander C, Norrman B, Karlsson EN, et al. A cultivation technique for *E. coli* fed-batch cultivations operating close to the maximum oxygen transfer capacity of the reactor. *Biotechnol Lett*. 2005 Jul;27(14):983–90.
 106. Al.Bahrani MHA. Study the optimum parameters for production of cloned L-asparaginase type I by *Escherichia coli*. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*. 2016;5(8):479–85.
 107. Li X, Zhang X, Zhang H. Design of a high-efficiency synthetic system for L -asparaginase production in *Bacillus subtilis*. *Eng Life Sci*. 2019;19:229–39.
 108. Peterson ME, Daniel RM, Danson MJ, Eisenthal R. The dependence of enzyme activity on temperature: determination and validation of parameters. *Biochem J*. 2007;402(2):331–7.
 109. Lovitt RW, Jones M, Collins SE, Coss GM, Yau CP, Attouch C. Disruption of bakers’ yeast using a disrupter of simple and novel geometry. *Process Biochem*. 2000;36:415–21.

110. Singh RS. A comparative study on cell disruption methods for release of aspartase from *E. coli* K-12. *Indian J Exp Biol*. 2013;51(11):997–1003.
111. Schütte H, Kula M-R. Analytical disruption of microorganisms in a mixer mill. *Enzyme Microb Technol*. 1988;10(9):552–8.
112. Hummel W, Kula M-R. Simple method for small-scale disruption of bacteria and yeasts. *J Microbiol Methods*. 1989;9(3):201–9.
113. Sooch BS, Kauldhar BS. Influence of multiple bioprocess parameters on production of lipase from *Pseudomonas* sp. BWS-5. *Brazilian Arch Biol Technol*. 2013;56(5):711–21.
114. Heinemann B, Howard AJ, Palocz HJ. Influence of dissolved oxygen levels on production of L-asparaginase and prodigiosin by *Serratia marcescens*. *Appl Microbiol*. 1970;19(5):800–4.
115. Pansuriya RC, Singhal RS. Effects of dissolved oxygen and agitation on production of serratiopeptidase by *Serratia marcescens* NRRL B-23112 in stirred tank bioreactor and its kinetic modeling. *J Microbiol Biotechnol*. 2011;21(4):430–7.
116. El-Hefnawy MAA, Attia M, El-Hofy ME, Shymaa MAA. Optimization production of L-asparaginase by locally isolated filamentous Fungi from Egypt. *Curr Sci Int*. 2015;4(03):330–41.

CAPITULO VIII: ANEXOS

Anexo 1

Materiales de plástico y vidrio

- Asa de siembra
- Fiola (100 mL)
- Matraces (50 y 250 mL)
- Micropipetas (100 y 1000 μ L)
- Pipetas
- Placas Petri estéril
- Probetas (100 mL)
- Termómetro
- Tubos de ensayo con tapa

Medios de cultivo y reactivos

- Ácido bicinconínico (MERCK)
- Ácido clorhídrico (AMRESCO)
- Ácido etilendiaminotetraacético (MERCK)
- Ácido tricloro acético (MERCK)
- Agua destilada
- Albúmina de suero bovino (MERCK)
- Arginina (MERCK)
- Asparagina (MERCK)
- Azocaseína (MERCK)
- Azul de bromotimol (MERCK)
- Caldo Luria Bertani (MERCK)
- Cloruro de amonio
- Cloruro de calcio dihidratado
- Cloruro de sodio
- Cloruro férrico
- Corn Steep Solid
- Dihidrógeno fosfato de potasio
- Extracto de malta
- Fosfato dipotásico (AMRESCO)
- Galactosa (AMRESCO)
- Glucosa (AMRESCO)
- Glutamato
- Glutamina (MERCK)
- Hidroxilamina (MERCK)
- Lactosa (AMRESCO)
- Maltosa (AMRESCO)
- NaOH (AMRESCO)

- Peptona bacteriológica (OXOID)
- Prolina
- Rojo de fenol
- Sacarosa (MERCK)
- Sulfato de magnesio heptahidratado (MERCK)
- Sulfato de manganeso (MERCK)
- Triptona (MERCK)
- Tris HCl
- β -hidroxamato aspártico (MERCK)

Equipos de análisis

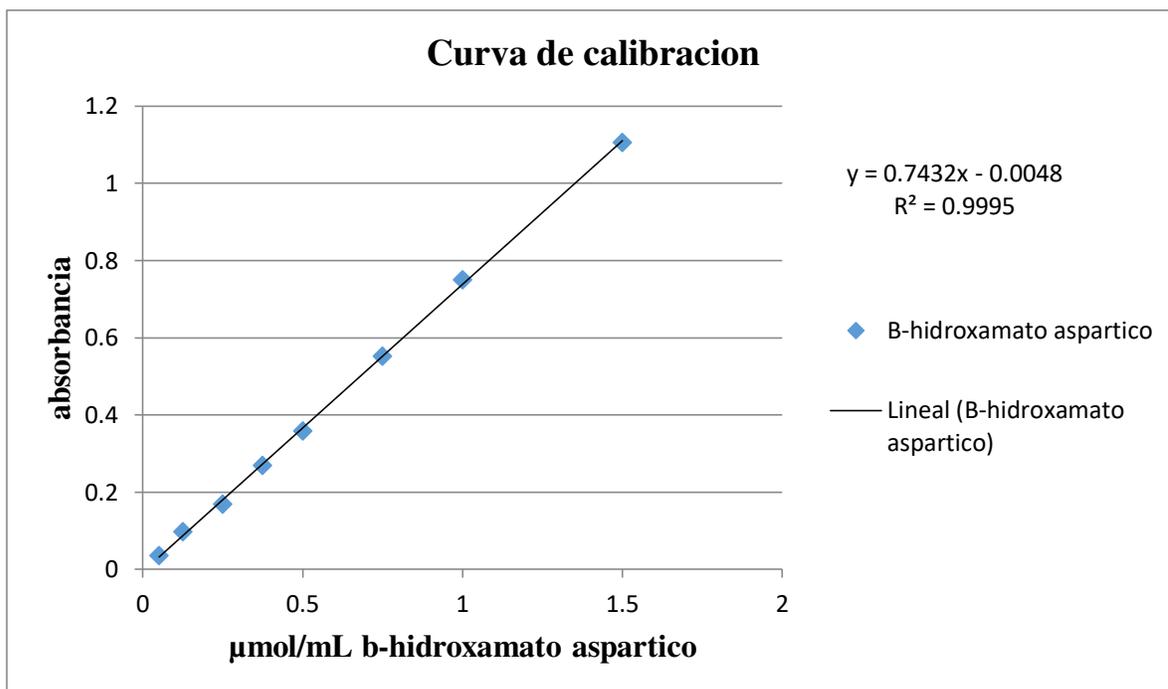
- Espectrofotómetro Genesys 10 UV (THERMO)
- Fluorímetro (TECAN Infinite M200 PRO)
- pH metro (HANNA)

Equipos de trabajo

- Autoclave
- Balanza Analítica (EPPENDORF)
- Centrifuga 5810R (EPPENDORF)
- Incubadora (PRECISION)
- Shaker (WINPACT)
- Sonicador Branson Models 250 y 450 (Branson Ultrasonics Sonifier™, Dunbury, CT, EE. UU.)

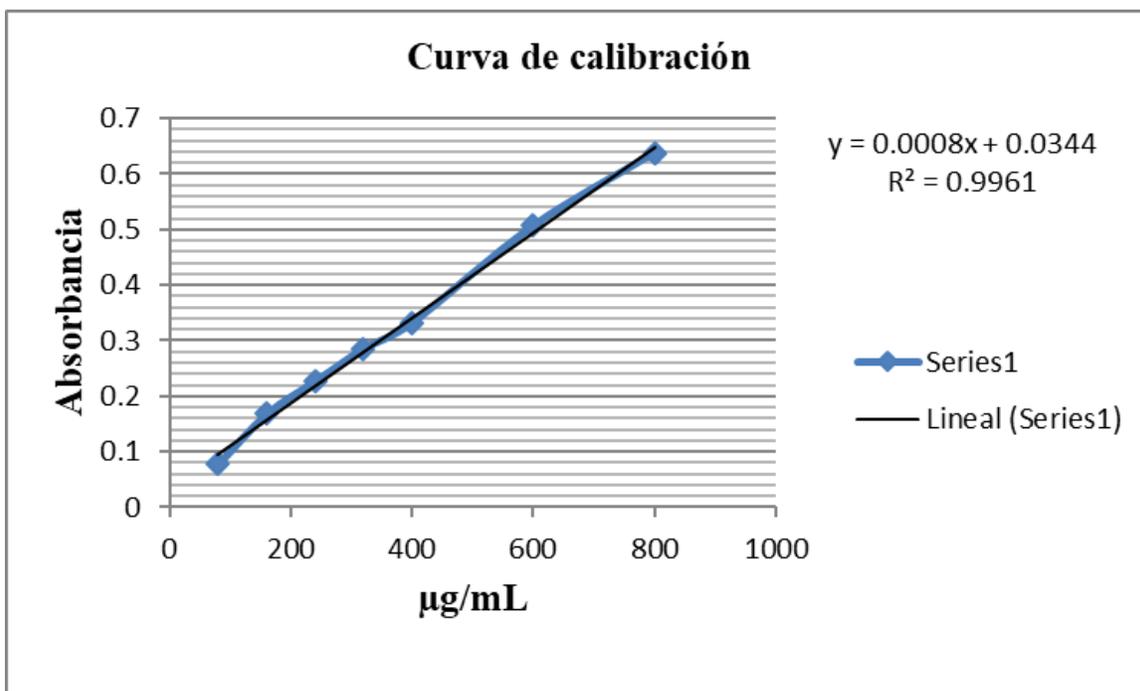
Anexo 2

- Curva de calibración con estándar β -hidroxamato aspártico



Anexo 3

- Curva de calibración de proteínas totales por el método BCA



Anexo 4

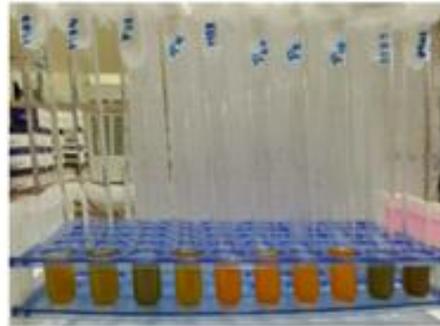
Screening de cepas productoras de L-ASNasa

- Prueba en caldo

Prueba rojo de fenol

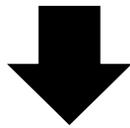
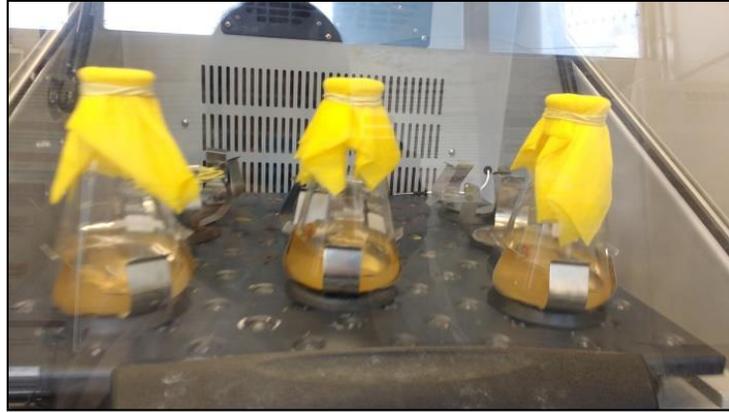


Prueba azul de bromotimol



Anexo 5

- Producción de L-ASNasa de *Bacillus* sp CH11 halotolerante en matraces



Medición de la actividad después del rompimiento celular.