



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

**Purificación y caracterización bioquímica de L-
asparaginasa BZ recombinante de *Bacillus sp.* CH11
halotolerante**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biotecnología

AUTOR

Annsy Camila ARREDONDO NUÑEZ

ASESORES

Dra. Amparo Iris ZAVALA PESANTES

Mg. Carol Nathali FLORES FERNÁNDEZ (Coasesor)

Lima, Perú

2023



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

Arredondo A. Purificación y caracterización bioquímica de L-asparaginasa BZ recombinante de *Bacillus sp.* CH11 halotolerante [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2023.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Annsy Camila Arredondo Nuñez
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	75652925
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-4603-9125
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 de coasesor	
Nombres y apellidos	Carol Nathali Flores Fernández
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	46430930
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-6250-201X
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Doris Virginia Huerta Canales
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08213401
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Karim Lizeth Jiménez Aliaga

Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	40957382
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Gladys Angelica Moscoso Mujica
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	23982336
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.2.6.1. Biotecnología de enzimas
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. Perú. Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (CONCYTEC). E009-2019-01: Movilización en Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica – Pasantías. CONTRATO N°307-2019-FONDECYT
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	2021 - 2023
URL de disciplinas OCDE	Biotecnología relacionada con la salud https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.04.01 Bioinformática https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.02.03



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



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

Siendo las **12:00 hrs. del 24 de noviembre de 2023** se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado de tesis, presidido por la Dra. Doris Virginia Huerta Canales e integrado por los siguientes miembros: Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes (asesora), Dra. Karim Lizeth Jiménez Aliaga y Dra. Gladys Angelica Moscoso Mujica; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE L-ASPARAGINASA BZ RECOMBINANTE DE *BACILLUS SP. CHII* HALOTOLERANTE"**, presentado por la Bachiller en Farmacia y Bioquímica **Annsy Camila Arredondo Nuñez**.

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 graduanda.

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

Veinte (20) Aprobado por Excelencia

Luego, la Presidenta del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue a la Bachiller en Farmacia y Bioquímica **Annsy Camila Arredondo Nuñez**, el Grado Académico de Magíster en **Biotecnología**.

Siendo las **13.20** hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las **13.30** hrs. del 24 de noviembre de 2023

Dra. Doris Virginia Huerta Canales (P. P. D.E.)
Presidente

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

Dra. Karim Lizeth Jiménez Aliaga (P. Asoc. D.E.)
Miembro

Dra. Gladys Angelica Moscoso Mujica (P. Aux., T.C.)
Miembro

Observaciones:

.....
.....



CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes en mi condición de asesora acreditado con la Dictamen N°00037-FFB-UPG-2021 de la tesis, cuyo título es: **Purificación y caracterización bioquímica de L-asparaginasa BZ recombinante de *Bacillus sp.* CH11 halotolerante**, presentado por la Bach. Annsy Camila Arredondo Nuñez para optar el Grado Académico de Magister en Biotecnología CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Tesis, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de **12% de similitud, nivel PERMITIDO para continuar con los trámites correspondientes y para su publicación en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado correspondiente.

Firma de la Asesora

DNI: 17880045

Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes



*Dedico este trabajo a mis padres,
Javier Arredondo y Luz Nuñez
y mis hermanas Nani y Layla,
por todo su amor,
apoyo y paciencia.*

AGRADECIMIENTOS

A mi *alma máter*, la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por ser mi institución formadora.

A todos los docentes y autoridades de la Facultad de Farmacia y Bioquímica ya que han contribuido a mi formación profesional.

A mi asesora de tesis, Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes por su apreciada asesoría para el desarrollo de la tesis, por todas sus enseñanzas, su infinita paciencia y su confianza a mi persona. Agradecerle el haberme introducido a conocer el campo de la investigación científica, darme la oportunidad de ser parte del Laboratorio de Biología Molecular, y de los Grupos de Investigación BIOCIFAR y BIOMIAS y ser mi ejemplo para seguir.

A mi co-asesora de tesis, la Dra. Carol Nathali Flores Fernández, por orientarme en el desarrollo de la tesis, brindarme su amistad, enseñanzas, consejos y ser una científica referente a la cual admiro mucho.

Al grupo de investigación Biomolecular NMR Spectroscopy Group de la *University of Jyväskylä* en Finlandia por su asesoría en el desarrollo de la tesis.

Al grupo de investigación BIOMÍAS y al Laboratorio de Biología Molecular, en particular a Dra. Karim Jiménez, Mg. Adrián Intiquilla, Mg. Pamela Canales, Isabel, César, Lucero, Sofía y Carlos.

ÍNDICE

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	2
2.1 Antecedentes	2
2.2 Aspectos teóricos.....	3
2.2.1 Características génicas y estructurales de L-asparaginasa.....	3
2.2.2 Mecanismo de acción de L-asparaginasa.....	4
2.2.3 Fuentes, características fisicoquímicas y cinéticas de L-asparaginasa	4
2.2.4 Análisis bioinformático.....	5
2.2.5 Clonaje molecular	6
2.2.6 Vector de expresión pET15b	7
2.2.7 <i>Escherichia coli</i> DH5 α	8
2.2.8 <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)pLysS.....	9
2.2.9 Métodos de purificación cromatográfica de proteínas.....	9
2.2.10 Cinética enzimática.....	12
CAPÍTULO III. MetodoLogía	14
3.1 Diseño experimental.....	14
3.2 Obtención de la muestra.....	14
3.3 Amplificación del gen <i>ansZ</i> de <i>Bacillus sp.</i> CH11	14
3.4 Secuenciamiento del gen <i>ansZ</i> de <i>Bacillus sp.</i> CH11	14
3.5 Análisis bioinformático del gen <i>ansZ</i>	15
3.6 Clonaje del gen <i>ansZP21</i> de <i>Bacillus sp.</i> CH11.....	15
3.6.1 Amplificación del gen <i>ansZP21</i>	15
3.6.2 Digestión de restricción del producto de PCR y vector pET15b	16
3.6.3 Ligación del gen <i>ansZP21</i> en el vector pET15b.....	16
3.6.4 Transformación a <i>Escherichia coli</i> DH5 α	16
3.6.5 Selección de clones recombinantes.....	17
3.7 Producción de L-ASNasa_BZ por fermentación discontinua	17
3.8 Purificación de L-ASNasa_BZ por cromatografía de afinidad (IMAC).....	18
3.9 Desalinización de L-ASNasa_BZ purificada	18
3.10 Ensayo de actividad L-asparaginasa	18
3.11 Ensayo de determinación de proteínas totales.....	19
3.12 Electroforesis en gel de poliacrilamina (<i>SDS-page</i>)	19

3.13	Zimograma de actividad L-asparaginasa.....	19
3.14	Determinación peso molecular de L-ASNasa_BZ.....	19
3.15	Caracterización bioquímica de L-ASNasa_BZ.....	20
3.15.1	Efecto del pH y la temperatura	20
3.15.2	Efecto de inhibidores y iones metálicos.....	20
3.15.3	Determinación de parámetros cinéticos	20
3.15.4	Evaluación de termoestabilidad	20
3.15.5	Recolección de datos y análisis.....	21
CAPÍTULO IV. RESULTADOS.....		22
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN.....		34
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES		38
CAPÍTULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		39
CAPÍTULO VII. ANEXOS		45

RESUMEN

L-asparaginasa de origen bacteriano es utilizada en tratamientos antineoplásicos y en la industria alimentaria. Una nueva L-asparaginasa de tipo II, proveniente de *Bacillus sp.* CH11 aislado de las salinas de Chilca (Perú), fue codificada por el gen *ansZP21* truncado en el extremo amino terminal, fue insertada en el vector pET15b y expresada en *Escherichia coli* BL21 (DE3)pLysS. La proteína recombinante se purificó mediante cromatografía de afinidad en una sola etapa, con un grado de purificación y rendimiento de 85,2 y 61,9 %, respectivamente. La proteína recombinante es homotetramérica con peso molecular estimado de 155 kDa determinado mediante cromatografía de filtración en gel. La enzima exhibió una actividad de 234.38 U mg⁻¹, con óptimos a pH 9,0 y 60 °C. La vida media a 60 °C fue de 3 h 48 min y retuvo el 50% de la actividad a 37 °C durante 24 h. La L-asparaginasa recombinante se activó con KCl, CaCl₂, MgCl₂, mercaptoetanol y DL-ditiotreitol ($p < 0.01$). Además, $V_{\text{máx}}$ y K_m fueron 145,2 $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$ y 4,752 mM, respectivamente. Estos hallazgos evidencian una nueva y prometedora L-asparaginasa tipo II para futuras aplicaciones biotecnológicas.

Palabras clave: L-asparaginasa II; gen *ansII*, proteína recombinante, *Bacillus sp.*; caracterización bioquímica, cromatografía de afinidad

ABSTRACT

L-asparaginase from bacterial sources have been used in antineoplastic treatments and the food industry. A novel type II L- asparaginase encoded by the N-truncated gene *ansZP21* of halotolerant *Bacillus sp.* CH11 isolated from Chilca salterns in Peru was expressed using a heterologous system in *Escherichia coli* BL21 (DE3)pLysS. The recombinant protein was purified using one-step nickel affinity chromatography with 85.2 purification-fold and 61.9 % yield. The recombinant protein is homotetrameric with an estimated molecular weight of 155 kDa by gel filtration chromatography. The enzyme exhibited activity of 234.38 U mg⁻¹ and a maximum catalytic activity at pH 9.0 and 60 °C. The enzyme half-life at 60 °C was 3 h 48 min, and L-asparaginase retained 50% of initial activity at 37 °C for 24 h. The activity was considerably enhanced by KCl, CaCl₂, MgCl₂, mercaptoethanol, and DL-dithiothreitol ($p < 0.01$). Moreover, the V_{max} and K_m were 145.2 $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$ and 4.752 mM, respectively. These findings evidence a promising novel type II L-asparaginase for future biotechnological applications.

Keywords: L-asparaginase II; *Bacillus sp.*; saline environment; biochemical characterization

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
<i>ansZ</i>	Gen de L-asparaginasa tipo II de <i>Bacillus sp</i> CH11
<i>ansZP21</i>	Gen de L-asparaginasa tipo II N-truncado de <i>Bacillus sp</i> CH11
ATC	Ácido tricloroacético
<i>BamHI</i>	Enzima de restricción de tipo II producida por <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
BCA	Ácido bicinconínico
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTPs	Trifosfatos de desoxinucleótidos (<i>deoxynucleotide triphosphates</i>)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
K_m	Constante de Michaelis-Menten
L-ASNasa_BZ	L-asparaginasa tipo II recombinante de <i>Bacillus sp.</i> CH11
LB	Luria-Bertani
<i>NdeI</i>	Enzima de restricción producida por <i>Neisseria denitrificans</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
pET15b_ansZP21	Plásmido recombinante que contiene el gen de L-asparaginasa <i>ansZP21</i>
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
R_f	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
RT	Temperatura ambiente
SDS	Dodecilsulfato sódico
SOC	Medio súper óptimo con catabolito de represión
TAE	Tris/Ácido bórico/ EDTA
VC	Volúmenes de columna
$V_{m\acute{a}x}$	Velocidad máxima de reacción
X-gal	Sustrato cromogénico β -galactosidasa

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Elementos genéticos del vector pET15b
- Tabla 2.** Modificaciones genéticas presentes en *Escherichia coli* DH5 α
- Tabla 3.** Fenotipo de *Escherichia coli* BL21 (DE3)pLysS
- Tabla 4.** Requerimientos del porcentaje de pureza de proteínas y aplicaciones
- Tabla 5.** Características fisicoquímicas proteicas para métodos cromatográficos
- Tabla 6.** Etapas de purificación de L-ASNasa_BZ
- Tabla 7.** Efecto de los inhibidores enzimáticos y iones metálicos en la actividad L-ASNasa_BZ
- Tabla 8.** Características fisicoquímicas y cinéticas de L-asparaginasas del género *Bacillus*
- Tabla 9.** Datos de la curva estándar del marcador de ADN
- Tabla 10.** Datos de la curva estándar del método de Nessler
- Tabla 11.** Datos de la curva estándar del método de BCA
- Tabla 12.** Datos de la curva estándar de GF
- Tabla 13.** Efecto del pH en la actividad L-ASNasa_BZ
- Tabla 14.** Efecto de la temperatura en la actividad L-ASNasa_BZ

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Mecanismo de acción de L-asparaginasa. Las flechas rojas representan los ataques nucleofílicos
- Figura 2.** Flujo de modelamiento por AlphaFold2. Las flechas muestran el flujo de información
- Figura 3.** Mapa del vector pET-15b
- Figura 4.** Combinaciones recomendadas de etapas de purificación
- Figura 5.** Curvas de formación de producto o descenso del sustrato en un diagrama directo y logarítmico en reacciones de orden cero y primer orden
- Figura 6.** Gel de agarosa 1% conteniendo el gen *ansZ* amplificado
- Figura 7.** Predicción del péptido señal mediante el servidor SignalP 6.0 y distorsión estructural por IUPred3
- Figura 8.** Elucidación estructural del monómero de proteína
- Figura 9.** Gel de agarosa al 1% conteniendo el gen *ansZP21* amplificado a diferentes temperaturas de hibridación
- Figura 10.** Gel de agarosa 1% conteniendo vector pET15b y y gen *ansZP21* amplificado cortados con *NdeI* y *BamHI*
- Figura 11.** Gel de agarosa al 1% conteniendo los productos de ligación
- Figura 12.** Gel de agarosa al 1% conteniendo la selección de clones
- Figura 13.** Gel de agarosa 1% mostrando los productos de la digestión enzimática de pET15b_ansZP21
- Figura 14.** Purificación de L-ASNasa_BZ
- Figura 15.** Zimograma de la actividad L-asparaginasa
- Figura 16.** Cromatografía de filtración en gel
- Figura 17.** Efecto del pH y temperatura en la actividad enzimática
- Figura 18.** Gráfico de Lineaweaver-Burk elaborado con las inversas de las concentraciones de L-asparagina versus el recíproco de V_0
- Figura 19.** Termoestabilidad L-ASNasa_BZ
- Figura 20.** Curva estándar del marcador de ADN
- Figura 21.** Curva estándar del método Nessler
- Figura 22.** Curva estándar del método BCA
- Figura 23.** Curva estándar de Filtración en Gel

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

L-asparaginasa (EC 3.5.1.1) hidroliza L-asparagina en L- aspartato y amonio, y se encuentra en bacterias, levaduras, hongos, mamíferos, plantas, entre otros. Actualmente, en medicina se utiliza como agente antineoplásico; y en la industria de alimentos termoprocados para disminuir la formación de acrilamida. Las fuentes más estudiadas de obtención de la enzima son las bacterias por su fácil manipulación, rápido crecimiento, menor complejidad y costo, entre otros.

Por otro lado, las L-asparaginasas nativas presentan bajo rendimiento y elevados costos de producción; en contraste, el uso de técnicas de ADN recombinante, bioinformática e ingeniería de proteínas en sistemas heterólogos de expresión permiten obtener altas concentraciones de la enzima, mejorar la afinidad por el sustrato y la eficiencia catalítica, e incluso otorgan propiedades particulares a la proteína tales como: sistema de expresión sofisticados, inserción/eliminación de péptido señal, secuencias de afinidad, entre otros; con la finalidad de controlar la obtención eficiente de proteína purificada.

Además, las estrategias de purificación y caracterización de enzimas abrirán nuevos campos de aplicación en los ámbitos sanitario e industrial. En efecto, existe una necesidad creciente por mejorar los protocolos de purificación como los métodos cromatográficos para la separación de proteínas fisiológicamente activas en escalas analítica y preparativas. En consecuencia, los estudios de L-asparaginasas recombinantes de origen microbiano son permanentes y conllevan a la obtención de un insumo de alto valor biológico.

De esta manera, el presente estudio tiene como objetivo caracterizar la L-asparaginasa ZP21 recombinante (L-ASNasa_ZP21) de *Bacillus sp.* CH11. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Clonar el gen *ansZP21* en el vector de expresión pET15b
- Producir la L-ASNasa_BZ en *Escherichia coli* BL21 (DE3)pLysS por fermentación discontinua
- Purificar la L-ASNasa_BZ por cromatografía de proteínas a alta velocidad
- Caracterizar bioquímicamente la L-ASNasa_ZP21

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

Yim y col, purificaron la L-asparaginasa recombinante proveniente de *Bacillus amyloliquefaciens* mediante cromatografía de afinidad con columna de Ni-sepharose 6FF (GE healthcare, USA). Obtuvieron un índice de purificación de 8,26 y recuperación del 30,80 %. La proteína recombinante pesó aproximadamente 38,2 kDa y pH óptimo de 8,5; además, los parámetros cinéticos de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ fueron 1,15 mM y 136,3 IU/mg respectivamente, por lo que se podría utilizar en industria alimentaria (1).

Asimismo, Moorthy y col, aislaron L-asparaginasa recombinante obtenida a partir de *Bacillus sp.* mediante método de precipitación con sulfato de amonio al 70 % y cromatografía de intercambio catiónico de baja afinidad DEAE-Celulosa. Se obtuvo un índice de purificación de 11,2 con una recuperación de 43,1 %. Además, la proteína peso ~134,8 kDa, y en su forma monomérica 45 kDa, pH óptimo de 7,0, estabilidad a pH entre 5,0 a 9,0 y $V_{m\acute{a}x}$ de 1,12 IU/mg. De este modo, la estabilidad de la enzima en condiciones fisiológicas de pH y temperatura podría tener aplicación en la industria sanitaria (2).

De igual forma, Mahajan y col, reportaron una L-asparaginasa recombinante procedente de *Bacillus licheniformis*. La purificación se realizó por ultracentrifugación por membrana de 30 kDa, precipitación con acetona 80 % a 4 °C, cromatografías de intercambio catiónico de baja afinidad DEAE-Celulosa y filtración en gel (Sephadex G-100). La proteína peso ~134,8 kDa, y en su forma monomérica 33,7 kDa, pH óptimo 9,0, estabilidad a pH de 7,0 a 9,0; los parámetros catalíticos K_m y $V_{m\acute{a}x}$ fueron $1,4 \times 10^{-2}$ mM y de 697,09 IU/mg respectivamente. Por estas características fisicoquímicas, la enzima tendría un potencial como antineoplásico (3).

Por otro lado, Shafei y col, purificaron una L-asparaginasa recombinante proveniente de *Penicillium cyclopium* por precipitación con acetona al 60 % y cromatografía de filtración en gel (Sephadex G-100). Se alcanzó un índice de purificación de 52,3 y porcentaje de recuperación de 4. Además, la proteína pesó 55 kDa, alta actividad a pH 8,0 y 37 °C, los parámetros catalíticos K_m y $V_{m\acute{a}x}$ fueron 0,3 mM y 333,3 IU/mg respectivamente. Además, la proteína purificada mostró una reducción del 93% de acrilamida en patatas fritas y una actividad anti-proliferativa diferentes líneas celulares (4).

A la vez, Jia y col, estudiaron el gen *ansZ* aislado de *Bacillus subtilis* B11-06, de esta forma se obtuvo L-asparaginasa recombinante que fue purificada por precipitación con sulfato de amonio 80 % y cromatografía de interacción hidrofóbica (*Butyl Sepharose* HP). Con estas condiciones se obtuvo un índice de purificación de 3,98 y porcentaje de recuperación de 26,05. La proteína recombinante mostró K_m 0,43 mM y $V_{m\acute{a}x}$ 77,51 μ M/min, los óptimos de pH 7,5 y temperatura 40 °C. Además, la enzima fue estable a pH entre 6,0 a 9,0. La actividad de la enzima recombinante fue mayor al tipo salvaje, por lo cual, podría tener aplicación a nivel de industria alimentaria (5).

Asimismo, Dutta y col, reportan el aislamiento de L-asparaginasa de *Aspergillus fumigatus*, esta proteína se purificó por ultracentrifugación, precipitación con sulfato de amonio al 80 %, intercambio catiónico de baja afinidad DEAE-Sepharose FF y filtración en gel (Sephadex G-100). Se obtuvo un índice de purificación de 232,04 y un porcentaje de recuperación de 65,7. Por otra parte, la proteína pesó ~35 kDa, pH óptimo 9,0, estabilidad a pH entre 5,0 y 10,0; los parámetros catalíticos K_m y $V_{m\acute{a}x}$ fueron 7,02 mM y 355,33 IU/mg respectivamente (6).

Finalmente, Sudhir y col, describen el clonaje y expresión del gen *ansA3* de *Bacillus licheniformis* en el vector pRSET A, expresados en *E. coli* BL21. La proteína se purificó por cromatografía de afinidad (Ni-NTA, Nucleo-pore, Genetix, India) logrando un índice de purificación de 3,02 y grado de recuperación del 52 %. Los estudios de estabilidad mostraron que L-asparaginasa II es activa a pH entre 7,0 a 9,0, con actividad óptima a 8,0; pero es inactiva a condiciones altas de acidez y alcalinidad. Por estas características, esta enzima podría tener aplicación farmacéutica (7).

2.2 Aspectos teóricos

2.2.1 Características génicas y estructurales de L-asparaginasa

Existen dos tipos de L-asparaginasa de *Escherichia coli*. La I es de naturaleza intracelular y baja afinidad por el sustrato; utilizada en la industria alimentaria. Asimismo, L-asparaginasa II es secretada extracelularmente con alta afinidad utilizada para el tratamiento antineoplásico (8). Por otro lado, el genoma de *Bacillus subtilis* presenta dos genes que codifican L-asparaginasa. El gen *ansA* codifica una proteína similar a L-asparaginasa tipo I de *Escherichia coli* y; el gen *ansZ*, al tipo II (9). Con relación a la proteína proveniente de *E. coli*, se muestran tres regiones conservadas en la proteína que contienen los sitios activos Thr12, Thr85, Asp86 y Lys156. Las dos Thr

conservadas intervienen en las reacciones secuenciales nucleofílicas durante la aminohidrólisis (10,11).

2.2.2 Mecanismo de acción de L-asparaginasa

L-asparaginasa (EC 3.5.1.1) es aminohidrolasa, el mecanismo de acción enzimática tiene lugar en dos etapas con la formación del producto intermedio beta-acil-L-asparaginasa. Primero, el residuo nucleofílico de la enzima se activa por el amino terminal (NH_2) presente en L-asparagina reaccionando entre sí y se generará el producto intermedio Beta-acil-L-asparaginasa. Segundo, una molécula de agua ataca el carbono éster del nucleófilo activado presente en el producto intermedio. De esta manera, se produce una molécula de ácido aspártico y otra de amonio (12) (Figura 1).

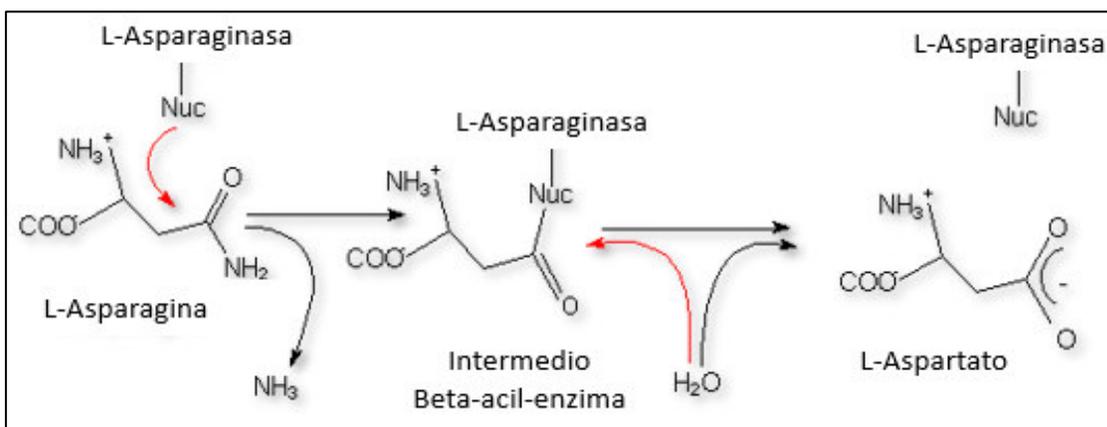


Figura 1. Mecanismo de acción de L-asparaginasa. Las flechas rojas representan los ataques nucleofílicos (13)

2.2.3 Fuentes, características fisicoquímicas y cinéticas de L-asparaginasa

Las fuentes para la obtención de la enzima son diversas, tales como plantas, animales, bacterias, hongos, levaduras, entre otros; sin embargo, las bacterianas son las más importantes porque facilitan los procesos de producción y presentan alta estabilidad (14). Así, las propiedades bioquímicas de las fuentes bacterianas son diversas y su actividad óptima se ha descrito en amplios rangos de pH y temperatura (15).

2.2.4 Análisis bioinformático

La bioinformática proporciona datos para la identificación y descripción de proteínas, como el peso molecular, la composición aminoacídica, la predicción del punto isoeléctrico; y la elucidación estructural, entre otros. La determinación de la estructura de una proteína es crucial para comprender el mecanismo de acción enzimática y las interacciones con otras biomoléculas. De esta manera, los métodos actuales de determinación estructural se dividen en experimentales (*in vivo e in vitro*) y bioinformáticos (*in silico*). La información de una proteína obtenida experimentalmente comprende técnicas como difracción de rayos X, cristalografía, espectroscopía de resonancia magnética nuclear y microscopía crioelectrónica; los cuales brindan datos concluyentes, pero requieren equipos de costo elevado y alta capacitación profesional. En contraste, los métodos bioinformáticos no ofrecen información determinante, pero sí predicciones valiosas, representando un método asequible y gratuito por los programas de libre acceso (16).

2.2.4.1 *Ab initio modeling* (AlphaFold2)

AlphaFold2 es un método moderno que utiliza un algoritmo de predicción de estructuras proteicas estables con mayor exactitud, esta metodología combina el alineamiento de múltiples secuencias (análisis evolutivo) con la matriz de interacción por pares de aminoácidos y algoritmo de inteligencia artificial (IA). Así, este método es descrito de alta confiabilidad con estimaciones precisas por residuo, lo cual permite el uso seguro de estas predicciones (Figura 2) (17,18).

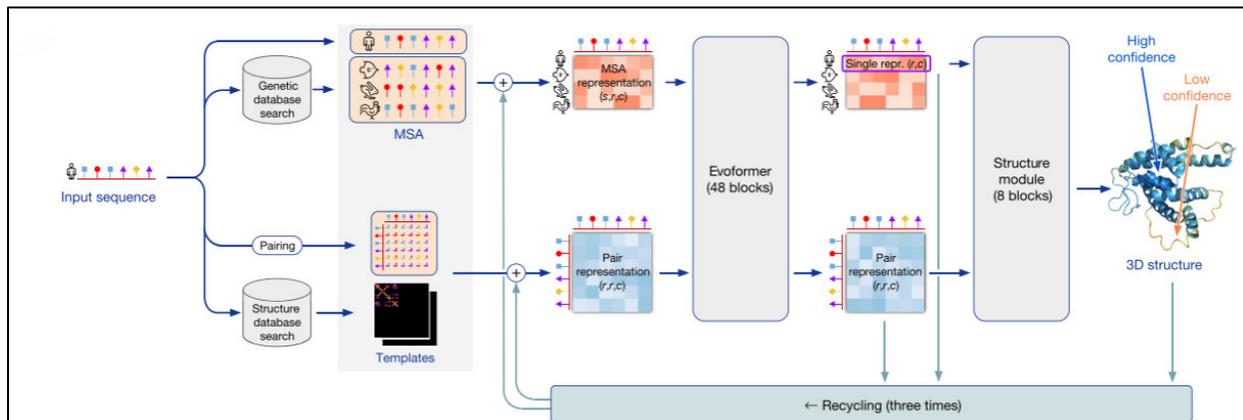


Figura 2. Flujo de modelamiento por AlphaFold2. Las flechas muestran el flujo de información (18).

2.2.5 Clonaje molecular

La clonación molecular consiste en aislar el gen de interés, preparar el ADN recombinante utilizando vectores para el clonaje y expresión del gen de interés en una célula huésped (sistema de expresión heterólogo). Actualmente existen muchas técnicas disponibles, entre todas, el clonaje utilizando enzimas de restricción es el más utilizado. Estas técnicas se utilizan principalmente para producir proteínas recombinantes tales como: enzimas, hormonas, factores de coagulación, vacunas, anticuerpos monoclonales, entre otras(19).

El procedimiento de clonaje comienza con el aislamiento del ADN genómico del contenido celular separando principalmente proteínas, lípidos y carbohidratos. Para ello, la célula se lisa mediante métodos químicos o físicos, luego se degradan las proteínas de las muestras mediante enzimas proteolíticas y el ADN genómico se precipita con etanol y recupera mediante centrifugación (20). A continuación, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite amplificar el gen de interés a partir del ADN molde, donde los cebadores diseñados definen la región de amplificación. El proceso utiliza una mezcla de reacción que contiene: tampón, cationes divalentes y monovalentes, ADN molde, cebadores, ADN polimerasa y dNTP. La reacción de PCR consta de un paso de desnaturalización inicial, seguido de la unión del cebador y el alargamiento para amplificar el gen de interés (21).

Posteriormente, las enzimas de restricción reconocen y cortan una secuencia específica, generan extremos complementarios de tipo romo o pegajoso. El vector y el gen de interés se tratan con las mismas enzimas de restricción; de esta manera se pueden combinar para generar el ADN recombinante (19). Luego, la reacción de ligación permite combinar el gen de interés con el vector de clonaje linealizado para obtener el ADN recombinante utilizando principalmente la enzima ADN ligasa T4. Finalmente, el ADN exógeno se introduce en células huésped competentes mediante el proceso de transformación; se pueden utilizar métodos químicos (método DMSO) o físicos (choque térmico y electroporación) (22).

En la verificación del clonaje se describieron los métodos de determinación de características fenotípicas del vector en placas de agar, análisis de la presencia/ausencia del gen de interés mediante PCR de colonias o digestión de restricción y secuenciación (22).

2.2.6 Vector de expresión pET15b

El pET-15b es un vector circular usado para clonaje de fragmentos de ADN de hasta 118 kb. El vector contiene una secuencia His6X-Tag N-terminal seguida de un sitio de reconocimiento a trombina (Tabla 1) (Figura 3).

Tabla 1. Elementos genéticos del vector pET15b (23)

Elemento	Función	Posición (pb)
T7 promotor	Sitio de reconocimiento a T7 ARN polimerasa para inicio de la transcripción	463-479
His6X-Tag	Etiqueta utilizada para purificación por IMAC	362-380
Sitio de clonaje múltiple	Sitio de corte por enzimas de restricción	319-335
T7 terminador	Sitio de término de transcripción de la T7 RNA polimerasa	213-259
Secuencia codificante de <i>lacI</i>	Gen represor para la regulación del operón <i>lac</i> e inhibición por Isopropil β -D-tiogalactósido (IPTG)	866-1965
Origen de pBR322	Origen de replicación	3882
Secuencia codificante <i>Bla</i>	Gen de resistencia a ampicilina	4643-5500
Sitio de trombina	Sitio de reconocimiento/ corte de trombina	336-353

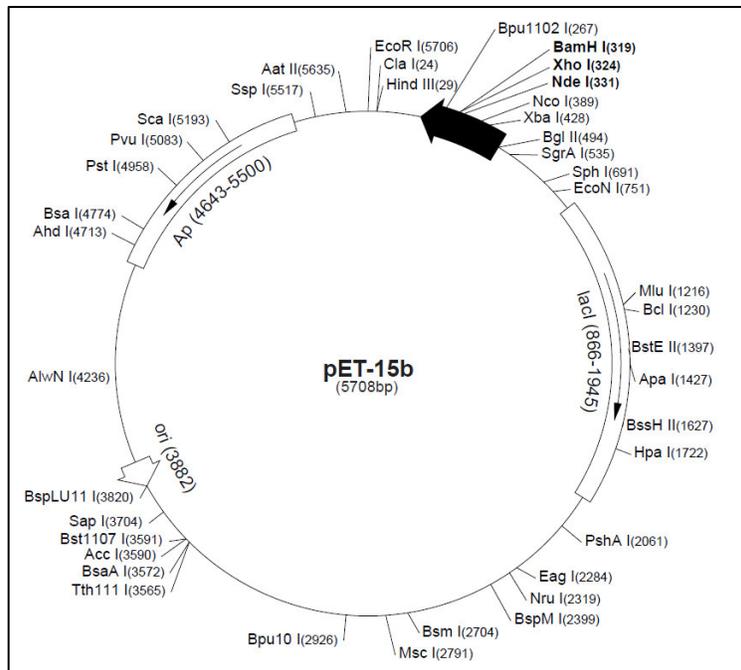


Figura 3. Mapa del vector pET-15b (24)

2.2.7 *Escherichia coli* DH5 α

Escherichia coli DH5 α es generalmente utilizada para el clonaje de genes, presenta el alelo Δ lacZ58(M15) que proporciona la α -complementación del gen β -galactosidasa para la selección de colonias (azul/blanco) en placas de agar Bluo-gal o X-gal. Se ha descrito mutaciones descritas en la Tabla 2 (25).

Tabla 2. Modificaciones genéticas presentes en *Escherichia coli* DH5 α (25)

Modificación	Fenotipo
<i>endA1</i>	Ausencia de la endonucleasa I no específica que impide la degradación del ADN recombinante.
<i>recA1</i>	Evita la recombinación homóloga que mantiene el ADN recombinante estable.
<i>hsdR17</i>	Permite transformación eficiente con ADN no-metilado por interrupción del gen endonucleasa Eco KI.

2.2.8 *Escherichia coli* BL21 (DE3)pLysS

Escherichia coli BL21 (DE3)pLysS se utiliza para para la expresión de proteínas recombinantes mediante el uso del sistema de expresión T7 (Tabla 3) (26)

Tabla 3. Fenotipo de *Escherichia coli* BL21 (DE3)pLysS (26)

Modificación	Fenotipo
pLysS Cam ^R	Portador de plásmido de expresión de lisozima T7 que evita la expresión de células no inducidas.
Origen p15a	Genera que el plásmido sea compatible con plásmidos derivados de pUC o pBR322.
Lisógeno DE3	Portador del gen ARN polimerasa T7 bajo el control del promotor lacUV5 por inducción de IPTG
- <i>OmpT</i> / - <i>Ion</i>	No hay presencia de los genes <i>Ion</i> y <i>OmpT</i> que codifican proteasas, a fin de reducir la degradación de las proteínas expresadas.

2.2.9 Métodos de purificación cromatográfica de proteínas

Los métodos de purificación cromatográficos de las enzimas se eligen con base en las características químico-estructurales de la proteína y de los requerimientos de uso final del producto (Tabla 4). Estas técnicas están relacionadas con el tamaño, forma, carga, punto isoelectrico, distribución de la carga, hidrofobicidad, solubilidad, densidad, afinidad de unión a ligando, metal vinculante y secuencia aminoacídica de la proteína (Tabla 5). Los protocolos de purificación en su mayoría comprenden la combinación en etapas de las diferentes técnicas cromatográficas (Figura 4), cada etapa significará una pérdida de la proteína de interés, por lo cual es recomendable el procesamiento de la muestra alcanzando el mayor índice de purificación con un mínimo número de pasos (27,28).

Las estrategias de purificación se dividen en las siguientes fases (27,28):

- Captura, se isla y concentra la proteína de interés.
- Purificación intermedia, eliminación de gran parte de las impurezas de mayor concentración, tales como virus, endotoxinas, proteínas de membrana y ácidos nucleicos.
- Pulido, purificación máxima de la proteína de interés.

Tabla 4. Requerimientos del porcentaje de pureza de proteínas y aplicaciones (28)

Pureza (%)	Aplicación
> 99	Uso terapéutico y estudios <i>in vivo</i>
95 - 99	Cristalografía de rayos X y métodos de caracterización fisicoquímica
< 95	Producción de antígenos para anticuerpos, secuenciación de N-terminal, entre otros

Tabla 5. Características fisicoquímicas proteicas para métodos cromatográficos (28)

Característica	Método cromatográfico
Carga	Intercambio iónico (IEX)
Tamaño	Filtración en gel (GF)
Hidrofobicidad	Interacción hidrofóbica (HIC) y Fase reversa (RPC)
Bioreconocimiento (especificidad a ligando)	Afinidad (AC)

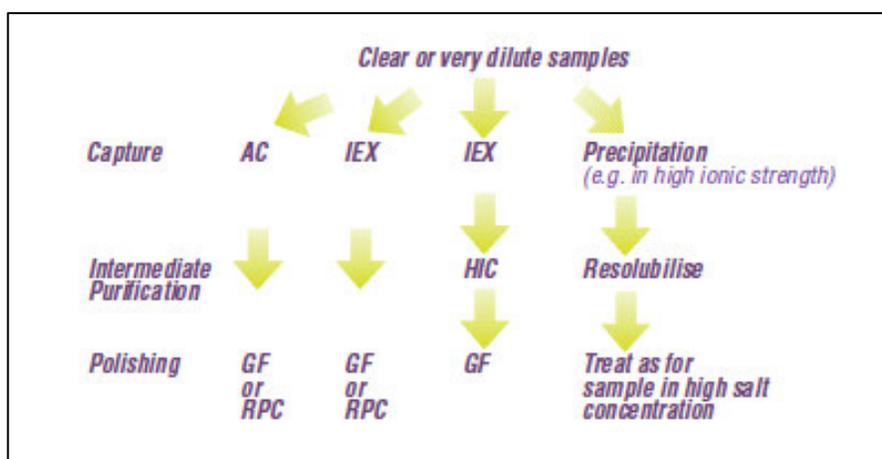


Figura 4. Combinaciones recomendadas de etapas de purificación. AC (C. de Afinidad), IEX (C. de intercambio iónico), HIC (C. de hidrofobicidad), GC (C. de filtración en gel) y RPC (C. de fase reversa) (28).

2.2.9.1 Cromatografía por filtración en gel

La cromatografía por filtración en gel (GF) es una técnica de separación basada en el peso molecular de los componentes en una muestra. La interacción de la muestra con la resina es no absorbente lo que permite una alta retención de la actividad biomolecular. La selectividad del método disminuye cuando se aplica una muestra con proteínas de alto peso molecular; por lo que, en muestras complejas tendrá mayor eficiencia solo si es posterior a otros métodos de purificación. Además, este tipo de cromatografía puede estar influenciado por la forma de la proteína y la fuerza iónica del eluyente (29). Diversos estudios de purificación de L-asparaginasa mostraron un alto índice de purificación utilizando cromatografía por tamaño de exclusión posterior a una cromatografía por intercambio iónico. En este sentido, la aplicación del método GF es una alternativa para la obtención de proteínas recombinantes de alta pureza (6,30).

2.2.9.2 Cromatografía por intercambio iónico

La cromatografía por intercambio iónico se basa en la purificación de la proteína de interés por diferencia de carga. Para el desarrollo de esta técnica es importante considerar el punto isoeléctrico (IP) de la proteína calculado a partir de la cantidad y naturaleza de los residuos de aminoácidos presentes. Así, en función a la carga de la proteína se pueden utilizar dos métodos de separación, tales como: intercambio catiónico y aniónico. Los valores de pH de un tampón por encima del IP cargarán negativamente a la proteína (aniónica), y por debajo cargarán positivamente a la misma (catiónica) (31).

Por otra parte, las modificaciones postraduccionales de la proteína tales como glicosilación o fosforilación, dan como resultado eluciones de múltiples picos que deben ser separados antes de un estudio estructural experimental (32). También, los principales grupos funcionales en intercambio iónico son Dietilaminoetil (DEAE), aminoetilo cuaternario (QAE) y amonio cuaternario (Q) como grupos aniónicos y carboximetil (CM), sulfopropil (SP) y metilsulfonato (S) como grupos catiónicos.

2.2.9.3 Cromatografía por afinidad

La cromatografía por afinidad es una técnica de gran precisión y alta eficiencia, en esta técnica se explota el principio de reconocimiento biomolecular reversible. La etiqueta más utilizada es la de polihistidina, la cual está incluida en la mayoría de los vectores de expresión y forma fácilmente

enlaces coordinados con el Co^{+2} , Cu^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Ca^{+2} , Fe^{+2} inmovilizados. El Ni^{+2} es el ion más utilizado, sin embargo, cuando la purificación no es satisfactoria se debe evaluar la determinación empírica del ion metal más eficaz de unión a la proteína (33).

También, se ha observado que la presencia de múltiples sitios de unión en la estructura proteica (histidina, triptófano y cisteína) pueden conducir a una fuerte unión al metal inmovilizado y evitar la reversibilidad de la unión biomolecular; por ello, se debe considerar la ubicación de la etiqueta y composición aminoacídica de la proteína de interés (34)

2.2.10 Cinética enzimática

La cinética enzimática hace referencia al análisis cuantitativo de los componentes determinantes de la actividad enzimática y permite formular modelos moleculares de reacción. Se ha descrito que la actividad enzimática es proporcional a la concentración de la enzima, además, la concentración de sustrato es clave en la determinación de los parámetros cinéticos (Figura 5) (35,36).

2.2.10.1 Reacción de primer orden

El orden de reacción se determina graficando el tiempo (h) en el eje X versus el logaritmo de la actividad residual en el eje Y. La reacción de primer orden representa la conversión espontánea del sustrato en producto, en donde la constante de velocidad de primer orden es determinada por la siguiente ecuación (37,38):

$$\ln [A]_t = -kt + \ln [A]_0 \quad (1)$$

Donde $[A]_0$ es el control de actividad (100%) y $[A]_t$ es la actividad enzimática en un determinado tiempo t (h). Así, la vida media de la enzima $t_{(1/2)}$ es determinada por la siguiente ecuación (37,38):

$$t_{(1/2)} = \ln(2)k^{-1} \quad (2)$$

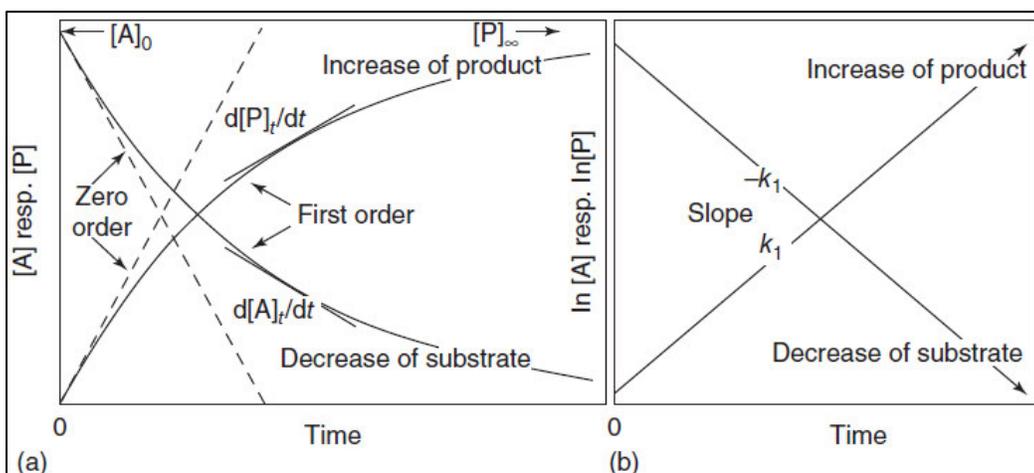


Figura 5. Curvas de formación de producto o descenso del sustrato en un diagrama directo **(a)** y logarítmico **(b)** en reacciones de orden cero y primer orden (35).

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1 Diseño experimental

Tipo de estudio: Descriptivo.

3.2 Obtención de la muestra

Bacillus sp. CH11 se aisló de las salinas de Chilca en Lima-Perú, es parte del cepario del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (39).

3.3 Amplificación del gen *ansZ* de *Bacillus sp.* CH11

El ADN genómico se extrajo y purificó acorde al protocolo de *Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit* (Zymo research, Tustin, California, USA). El gen *ansZ* se amplificó mediante PCR del ADN genómico del *Bacillus sp.* CH11. Se utilizaron los cebadores forward (5'-GGC CCA TAT GAA AAA ACA ACG AAT GCT-3') y reverse (5'-TGC CGG ATC CTC AAT ACT CAT TGA AA-3') (Merck - Darmstadt, Alemania). La mezcla de reacción comprendía 2 µL de tampón DreamTaq 10X/ MgCl₂ 20 mM (*Thermo Scientific®*), 1 µL de cada cebador 10 µM, 0,5 µL de dNTP 10 mM (*Thermo Scientific®*), 0,1 µL de ADN polimerasa DreamTaq 5U/µL (*Thermo Scientific®*) y H₂O hasta un volumen final de 20 µL. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94 °C por 4 min, 35 ciclos a 95 °C por 45 s; 55 °C por 45 s; 72 °C por 2 min y una extensión final a 72 °C por 5 min (T100 *Thermal Cycler*, BIO-RAD). Finalmente, el producto amplificado se observó por electroforesis en gel de agarosa al 1 % (SeaKem® GTG® *Agarose*, *Thermo Scientific®*) con tampón TAE 1X con *Midori Green advance DNA Stain* (*Nippon Genetics Europe GmbH*, Mariaweilerstraße, Düren, Alemania), se empleó *Quick-Load®* 1 kb ADN *Ladder* (*New England Biolabs®*, Ipswich, Massachusetts, USA) como marcador de peso molecular, 100 V por 20 min con *RunOne™ Electrophoresis Cell* (*Embi Tec*, San Diego, California, USA).

3.4 Secuenciamiento del gen *ansZ* de *Bacillus sp.* CH11

La mezcla de reacción estuvo compuesta por 1 µL de 25x *Big-Dye sequencing premix* (*Applied Biosystems*, Hitachi, Japón), 3,75 µL de 5x buffer (*Applied Biosystems*, Hitachi, Japón), 1 µL del cebador (3,2 µM) (forward: 5'-GGC CCA TAT GAA AAA ACA ACG AAT GCT-3'; reverse: 5'-

TGC CGG ATC CTC AAT ACT CAT TGA AA-3') (Merck – Darmstadt), 11,75 µL H₂O y 2,5 µL de producto de PCR (70 ng/µL). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 96 °C por 1 min, seguido por 25 ciclos a 96 °C por 10 s; 50 °C por 5 s; 60 °C por 4 min (MyCycler, BIO-RAD, Hércules, California, USA). El producto de PCR fue precipitado con 2 µL de EDTA 125 mM, 2 µL de acetato de sodio 3M, 50 µL de etanol 95% y el precipitado se lavó con 70 µL de etanol. La muestra se resuspendió en 10 µL de formamida y se secuenció en ABI 3130xl *genetic analyzer* (Applied Biosystems).

3.5 Análisis bioinformático del gen *ansZ*

La secuencia del gen *ansZ* nativo se analizó con el servidor SignalP - 6.0 (DTU Health Tech, Dinamarca) para identificar la presencia del péptido señal y IUPred3 (Eötvös Loránd University, Hungría) para identificar distorsiones estructurales. ProtParam (SIB Swiss Institute of Bioinformatics) predijo el peso molecular y el punto isoeléctrico. La secuencia se alineó con la base de datos de NLH utilizando Blastx (NLH, USA). Así también, se elucidó la estructura del monómero utilizando AlphaFold2 (EMBL-EBI, Reino Unido).

3.6 Clonaje del gen *ansZP21* de *Bacillus sp.* CH11

Se denominó gen *ansZP21* al N-truncamiento del gen *ansZ* a nivel de la secuencia que corresponde al péptido señal (60 nucleótidos) (Anexo 1)

3.6.1 Amplificación del gen *ansZP21*

El gen *ansZP21* se amplificó mediante PCR del ADN genómico del *Bacillus sp.* CH11. Se utilizaron los cebadores forward (5'-TTT **CAT ATG CCA CAT TCT CCT GAA ACA AAA GAA TCC CC**-3') y reverse (5'-TGC **CGG ATC CTC AAT ACT CAT TGA AAT AAG C**-3') (*Metabion International AG*) con sitios de reconocimiento a enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI*, mostrados en negrita. La mezcla de reacción comprendía 10 µL de tampón 5X *Phusion HF* (*Thermo Scientific*®, Waltham, Massachusetts, USA), 1 µL de dNTP 10 mM (*Thermo Scientific*®), 1 µL de ADN (10 ng/µL), 2,5 µL de cada cebador 10 µM, 0,5 µL de ADN polimerasa *Phusion HF* (2 U/µL) (*Thermo Scientific*®) y H₂O hasta un volumen final de 50 µL. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 98 °C por 30 s, 35 ciclos a 98 °C por 10 s; 58 °C por 30 s; 72 °C por 20 s y una extensión final a 72 °C por 5 min (T100 *Thermal Cycler*, BIO-RAD). Finalmente, el producto amplificado se observó por electroforesis

en gel de agarosa al 1 % utilizando las condiciones antes descritas. Luego, el producto de PCR se recuperó del gel y purificó acorde al protocolo del *GeneJET™ Gel Extraction Kit* (*Thermo Scientific®*) (40) y Micro-Start 17 VWR (rotor 75003424). Asimismo, se utilizaron diferentes temperaturas de hibridación (62, 68 y 70 °C) con la finalidad de conocer la óptima de los cebadores.

3.6.2 Digestión de restricción del producto de PCR y vector pET15b

La digestión con enzimas de restricción se realizó empleando 0,75 µg de producto de PCR del gen *ansZP21* y 1 µg ADN plasmídico pET15b para cada reacción respectivamente, 3 µL de tampón *CutSmart* (*New England Biolabs®*), 1 µL de *NdeI* (20 U/mL) (*New England Biolabs®*), 1 µL de *BamHI* (20 U/mL) (*New England Biolabs®*) y H₂O hasta un volumen final de 30 µL. Las muestras se incubaron a 37 °C por 3 h y posteriormente, los productos de amplificación se separaron por electroforesis en gel de agarosa 1 %; y recuperaron del gel y purificaron a las condiciones antes mencionadas.

3.6.3 Ligación del gen *ansZP21* en el vector pET15b

La reacción de ligación contenía 50 ng del vector linealizado pET15b, 150 ng de producto de PCR digerido, 2 µL de tampón 10X T4 ligasa (*Thermo Scientific®*), 1 µL de T4 ADN ligasa (5 U/ µL) (*Thermo Scientific®*) y H₂O hasta un volumen final de 20 µL. La mezcla se incubó a 22 °C por 10 min. Sin embargo, también se evaluaron condiciones alternativas, tales como relación 1:1 (vector:inserto) a 22 °C por 10 min y relación 1:3 (vector:inserto) a 16 °C por 1 h. La formación del ADN recombinante se verificó por electroforesis en gel de agarosa 1 % utilizando las condiciones antes descritas.

3.6.4 Transformación a *Escherichia coli* DH5α

Las células competentes de *Escherichia coli* DH5α (*Thermo Scientific®*) se descongelaron en frío por 10 min. Luego, 3 µL del producto de ligación se añadieron a 50 µL de células. La transformación se realizó por shock térmico (30 min en frío, 60 s a 42 °C y 2 min en frío). Después, se adicionaron 450 µL de medio SOC e incubó a 37 °C, 250 rpm por 30 min. Finalmente, se sembró 400 µL de la muestra en una placa LB/Ampicilina 100 µg/ml e incubó a 37 °C durante 14 h.

3.6.5 Selección de clones recombinantes

Para verificar los clones recombinantes positivos se seleccionaron aleatoriamente cinco colonias por placa.

3.6.5.1 PCR del gen *ansZP21a* a partir de colonias

La mezcla de PCR contenía lo siguiente: 2 μ L de tampón DreamTaq 10X/ MgCl₂ 20 mM (*Thermo Scientific*®), 0,2 μ L de cada cebador 10 μ M, 0,5 μ L de dNTP 10 mM (*Thermo Scientific*®), 0,1 μ L de ADN polimerasa DreamTaq 5 U/ μ L (*Thermo Scientific*®) y H₂O hasta un volumen final de 20 μ L. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min, seguido por 30 ciclos a 95 °C por 30 s; 55 °C por 30 s; 72 °C por 30 s, y una extensión final a 72 °C por 5 min (*T100 Thermal Cycler*, BIO-RAD). Las colonias seleccionadas se sembraron en placas de agar LB/Ampicilina 100 μ g/ml y posteriormente, se mezcló con la mezcla de PCR. Finalmente, las muestras se verificaron por electroforesis en gel de agarosa 1 % utilizando las condiciones antes descritas. Los clones que presentaron el producto de PCR del tamaño esperado se consideraron positivos.

3.6.5.2 Digestión enzimática del ADN recombinante

Los ADN plasmídico de los clones positivos se extrajeron y purificaron acorde al protocolo de *QIAprep® Spin Miniprep Kit* (QIAGEN, Strasse, Hilden, Alemania) (41), método basado en el uso de una columna giratoria para purificación rápida. La mezcla de reacción presentó lo siguiente: ADN recombinante 0,4 μ g, 1 μ L de tampón CutSmart (*New England Biolabs*®), 0,5 μ L de *NdeI* (20 U/ μ L) (*New England Biolabs*®), 0,5 μ L de *BamHI* (20 U/ μ L) (*New England Biolabs*®) y H₂O hasta un volumen final de 10 μ L. Las muestras se incubaron a 37 °C por 3 h y posteriormente, se separaron por electroforesis en gel de agarosa 1 % a las mismas condiciones antes mencionadas.

3.6.5.3 Secuenciación del ADN plasmídico pET15b_ansZP21

La secuenciación del ADN plasmídico pET15b_ansZP21 se realizó utilizando los cebadores universales T7 forward utilizando el método descrito anteriormente.

3.7 Producción de L-ASNasa_BZ por fermentación discontinua

Escherichia coli BL21 (DE3)pLysS (*New England Biolabs*®) se utilizó como hospedera de expresión de L-asparaginasa BZ recombinante (L-ASNasa_BZ). La transformación se realizó por shock térmico siguiendo las condiciones antes descritas, se sembró en una placa de agar

LB/Ampicilina 100 µg/ml e incubó a 37 °C por 14 h. Luego, una colonia de la placa fue recogida y pre-inoculada en 80 mL de medio LB-Miller (Merck - Darmstadt) suplementado con ampicilina 100 µg/mL a 30 °C, 230 rpm por 14 h. Posteriormente, se inoculó los 8 mL a 400 mL del medio descrito anteriormente e incubó a 37 °C, 230 rpm hasta una densidad celular OD₆₀₀: 0,6 e indujo la expresión con Isopropil β-D-tiogalactósido (IPTG) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA) a 0,5 µM a 22 °C, 230 rpm por 14 h (42,43). Las células se recolectaron por centrifugación a 6500 rpm (rotor F2158X504) a 4 °C por 20 min y la biomasa se almacenó a -80 °C hasta la purificación de la proteína.

3.8 Purificación de L-ASNasa_BZ por cromatografía de afinidad (IMAC)

Las células se lisaron acorde al protocolo de *BugBuster® Master Mix* (Novagen®, Merck) (44) y se recuperó la proteína por centrifugación a 10 000 rpm (rotor F2158X504) a 4 °C por 30 min. La L-ASNasa_BZ etiquetada con His-6X se purificó utilizando FPLC (ÄKTA start, GE Healthcare, USA) por cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC) a un flujo constante de 1 mL/min. La columna HisTrapTM FF 5 mL (GE Healthcare) se equilibró con tampón Tris 50 mM, NaCl 100 mM, imidazol 20 mM, pH 8,5 por tres volúmenes de columna (VC) y seguidamente, a la columna se cargó la muestra resuspendida en el mismo tampón antes mencionado. Las proteínas no ligadas se eliminaron por lavado de la columna con 5 VC del tampón y finalmente, la proteína se eluyó por incremento de la concentración de imidazol a 500 mM en el tampón.

3.9 Desalinización de L-ASNasa_BZ purificada

Las altas concentraciones de imidazol de las proteínas purificadas se eliminaron por una columna HiTrapTM Desalting 5 mL (GE Healthcare) a flujo constante de 1 mL/min con tampón Tris 50 mM, NaCl 100 mM pH 8,5. Se inyectó 2 mL de la muestra y se separó la fracción que presentó menor conductividad (mS/cm). Finalmente, la fracción desalinizada se analizó por *SDS-page* y determinó la actividad L-asparaginasa y proteínas totales.

3.10 Ensayo de actividad L-asparaginasa

La actividad enzimática se evaluó según el método de Nessler con modificaciones (45). La mezcla de reacción estuvo compuesta por 100 µL de tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,6, 10 µL de L-asparagina 189 mM, 90 µL de H₂O y 10 µL de la enzima. Luego, se añadió 10 µL de ácido

tricloroacético 1.5 M (ATC) e incubo a 37 °C por 10 min. En una microplaca, se adicionó por pocillo 200 µL de H₂O, 25 µL del sobrenadante obtenido y 25 µL de reactivo de Nessler, se dejó reposar por 1 min y se leyó a 436 nm. Una unidad (U) de actividad de L-asparaginasa a condiciones estándar se definió como la cantidad de enzima requerida para liberar un µmol de amonio por mL/min a pH 8,6 y 37 °C (46).

3.11 Ensayo de determinación de proteínas totales

La determinación de proteínas totales se realizó mediante el método BCA acorde al protocolo de *Bicinchoninic Acid Protein Assay* (Sigma-Aldrich®) (47,48). Así también, la curva estándar se realizó con albúmina sérica bovina (BSA) en un rango de concentración de 0,08 – 0,8 mg/mL.

3.12 Electroforesis en gel de poliacrilamina (SDS-page)

La muestra se evaluó por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % en condiciones acorde a Laemmli (49). Para la electroforesis, se cargó 8 µg del extracto crudo y 2 µg de la proteína purificada y utilizó el marcador *PageRuler™ Prestained* de 10 a 170 kDa (*Thermo Scientific®*).

3.13 Zimograma de actividad L-asparaginasa

El zimograma se realizó por electroforesis en gel de poliacrilamina al 5% en condiciones nativas. Para la electroforesis, se utilizó 2 µg de la proteína purificada y separó a +10 °C y 60 V. Después, el gel se incubó a 37 °C por 20 min en la mezcla de reacción compuesta por 25 mL de tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,6, 2 mL de asparagina 189 mM, 2 mL de hidroxilamina 2 M, 1,6 mL de NaOH 2 M con Mini Rocker Platform (BIO-RAD). Finalmente, se realizó la lectura con gotas directas de solución FeCl₂ 10 %/ATC 5 %/HCl 0,66 M (50).

3.14 Determinación peso molecular de L-ASNasa_BZ

Se utilizó la columna HiPrep™ 16/60 Sephacryl® S-200 HR (GE Healthcare) y el tampón Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM pH 8,5 a flujo constante de 0,5 mL/min. La curva estándar se elaboró con *Protein Standard Mix* 15-600 kDa (Supelco®, Sigma-Aldrich®) compuesto por ácido p-aminobenzoico (0,14 kDa), ribonucleasa A tipo I-A (13,7 kDa), albúmina grado VI (44,3 kDa), γ-globulina (150 kDa) y tiroglobulina (670 kDa). Se cargó 1 mL de muestra a la columna a las mismas condiciones antes mencionadas. La estimación del peso molecular se realizó utilizando el volumen retenido de la muestra y la ecuación de la curva estándar.

3.15 Caracterización bioquímica de L-ASNasa_BZ

3.15.1 Efecto del pH y la temperatura

El efecto de la temperatura sobre la actividad de L-ASNasa_BZ se evaluó entre 22 y 80 °C a un pH 8,6. El efecto del pH se evaluó entre 3,0 y 10,0 utilizando tampones apropiados: pH 3,0 - 5,0; citrato de sodio 50 mM pH 6,0 - 7,0; fosfato de sodio 50 mM pH 8,0 - 9,0; tampón Tris-HCl 50 mM pH 10,0; bicarbonato de sodio-NaOH a 60 °C. Los resultados se expresaron como actividad relativa (%).

3.15.2 Efecto de inhibidores y iones metálicos

El efecto de los inhibidores y los iones se examinó siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente y complementando la mezcla de reacción estándar con inhibidores y sales. Los inhibidores probados fueron PMSF, úrea, mercaptoetanol, DL-ditiotreitol, SDS y EDTA a concentración final de 10 mM y glutatión 5 mM. Las sales fueron NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, MnCl₂, BaCl₂, CuCl₂ y CoCl₂, todas a una concentración final de 100 mM. La actividad enzimática se expresó como actividad relativa (%) en comparación con el control sin ningún componente suplementado.

3.15.3 Determinación de parámetros cinéticos

Se determinaron la K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de L-ASNasa_BZ a pH 9,0; 60 °C y 10 min. Para ello, se calculó la velocidad inicial de la enzima en cada concentración de sustrato (2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 mM) considerando diferentes tiempos (1, 3, 6, 8, 10 y 12 min). La velocidad inicial representó la pendiente de la curva del producto generado ($\mu\text{Mol}/\text{mL}$) versus tiempo (h). Los valores de $V_{m\acute{a}x}$ y K_m se calcularon mediante el gráfico de Lineaweaver-Burk.

3.15.4 Evaluación de termoestabilidad

La termoestabilidad de L-ASNasa_BZ se evaluó a las temperaturas de 25, 37 y 60 °C. Para ello, las muestras se incubaron en periodos de 1, 2, 3, 4, 8, 16 y 24 h a las temperaturas antes mencionadas. La actividad de L-asparaginasa se calculó en condiciones óptimas de reacción. Los resultados se expresaron en actividad residual (%) con respecto al control (tiempo 0). Además, se determinó el orden de reacción de inactivación por calor y en base a ello, se definió k (constante de velocidad de inactivación). De esta forma se calculó el tiempo de vida media de la proteína.

3.15.5 Recolección de datos y análisis

Todos los ensayos se realizaron por duplicado y expresaron como media \pm desviaciones estándar (DE). Los datos se evaluaron mediante ANOVA unidireccional y la prueba de comparación múltiple de Dunnett utilizando GraphPad Prism versión 10.0.2 software (San Diego, USA) con significancia definida como $p < 0,01$.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

4.1 Amplificación del gen *ansZ* de *Bacillus sp.* CH11

La Figura 6 muestra el producto de PCR del gen *ansZ* a partir del ADN genómico de *Bacillus sp.* CH11.

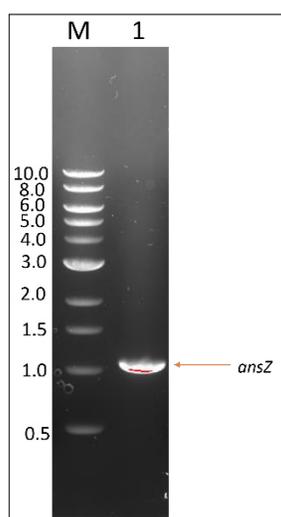


Figura 6. Gel de agarosa 1% mostrando el gen *ansZ* amplificado. Carriles: M, marcador de peso molecular y 1, gen *ansZ*

4.2 Secuenciación del gen *ansZ* de *Bacillus sp.* CH11

Las secuencias nucleotídicas de ambos lados de la hebra de ADN correspondientes al gen *ansZ* se analizaron con el servidor *Emboss Needle* y el marco de lectura abierto se determinó por el servidor *ExPaSy tool*, de esta manera, se obtuvo 1125 pb y la secuencia aminoacídica de 375 aa.

La secuencia aminoacídica se analizó con el servidor *Blastx*. Los primeros alineamientos con E. value 0.0 mostraron alto porcentaje de identidad con las siguientes secuencias de *Bacillus subtilis*: 99,47%, ID: WP_069703672.1; 99,20%, ID: WP_003234769.1; 98,93%, WP_172850445. Así también, el servidor SignalP – 6.0 determinó la presencia de péptido señal con una probabilidad de 100% (Figura 7A). La secuencia de la proteína nativa analizada mediante el servidor IUPred3 mostró una distorsión en la región N-terminal posterior a la secuencia del péptido señal (Figura 7B). Además, se elucidó estructuralmente el monómero de la proteína mediante el programa AlphaFold2, en donde, se determinó que el monómero presentó péptido señal, distorsión N-

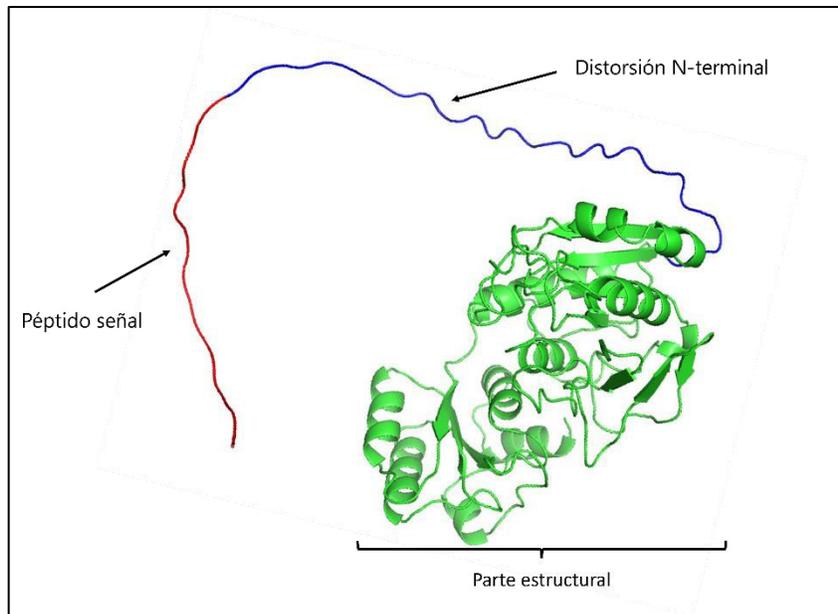


Figura 8. Elucidación estructural del monómero de proteína. El péptido señal, la distorsión N-terminal y la parte estructural se muestran en rojo, azul y verde, respectivamente.

4.3 Clonaje del gen *ansZP21* de *Bacillus sp.* CH11

4.3.1 Amplificación del gen *ansZP21*

La Figura 9 muestra los productos de PCR del gen *ansZP21* amplificado de *Bacillus subtilis* CH11 a temperaturas de hibridación de 58, 62, 68 y 70 °C. La hibridación a 58 °C fue la mejor temperatura en comparación con las otras. El tamaño del producto amplificado del gen *ansZP21* (Anexo 2) fue de 1068 pb \pm 3.0, obtenido de la ecuación de la recta elaborada a partir de los pesos (pb) de los fragmentos que conforman el marcador de peso molecular versus la distancia migrada:

$$X \rightarrow R_f(\text{gen } ansZP1): 0,528$$

$$\text{Ecuación de la curva: } Y = -4,0849X + 5,1855$$

Así, reemplazando X en la ecuación:

$$Y (\# \text{ pares de bases gen } ansZP1) = 1068 \pm 3.0 \text{ pb}$$

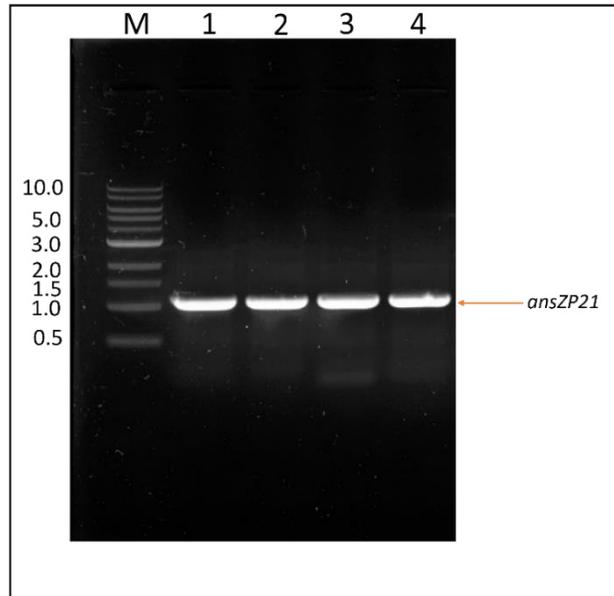


Figura 9. Gel de agarosa al 1% conteniendo el gen *ansZP21* amplificado a diferentes temperaturas de hibridación. Carriles: M, marcador de peso molecular; 1, 58 °C; 2, 60 °C; 3, 68 °C; 4, 70 °C.

4.3.2 Digestión enzimática del producto de PCR y vector pET15b

La figura 10 muestra el cambio conformacional del vector pET15b posterior a la digestión con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI*. Por otro lado, la diferencia de tamaño del producto de PCR digerido no fue visible debido a ser < 5 pb.

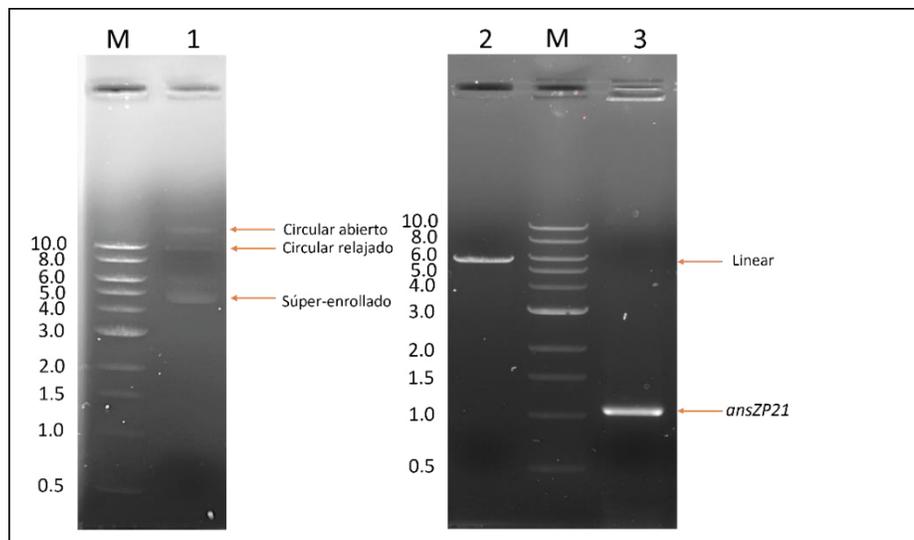


Figura 10. Gel de agarosa 1% conteniendo vector pET15b y gen *ansZP21* amplificado cortados con *NdeI* y *BamHI*: M, marcador de peso molecular; 1, pET15b no digerido; 2, pET15b digerido; 3, gen *ansZP21* digerido.

4.3.3 Ligación del gen *ansZP21* en el vector pET15b

En la Figura 11, se observa que solo la muestra 1 presentó una reacción de ligación positiva.

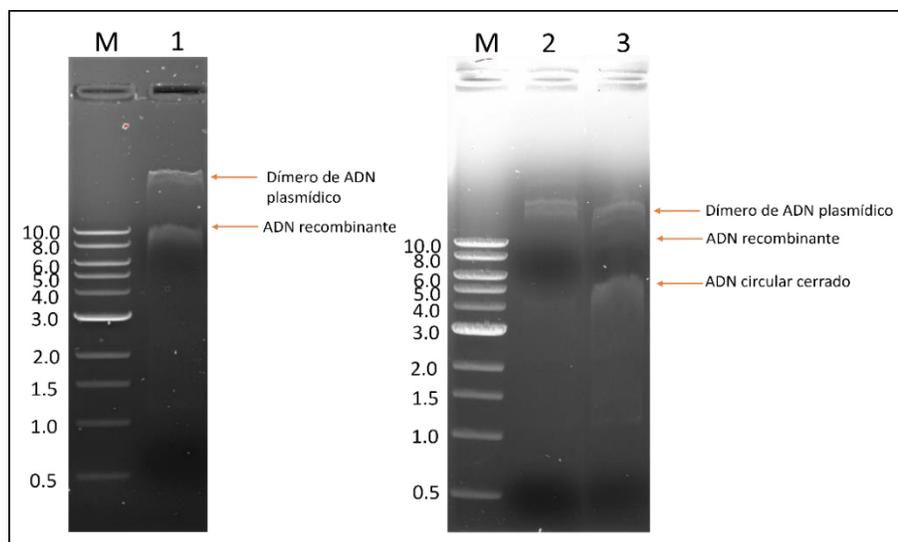


Figura 11. Gel de agarosa al 1% conteniendo los productos de ligación. Carriles: M, marcador de peso molecular; 1, Mezcla vector:inserto 1:3 a RT por 10 min; 2, 1:1 a RT por 10 min; 3, 1:3 a 16 °C por 1 h.

4.4 Selección de clones recombinantes

4.4.1 PCR de colonias conteniendo gen *ansZP21*

La figura 12 muestra clones positivos para pET15b_ *ansZP21* (ADN recombinante), donde, la colonia 1 o clon 1 se seleccionó para su posterior uso.

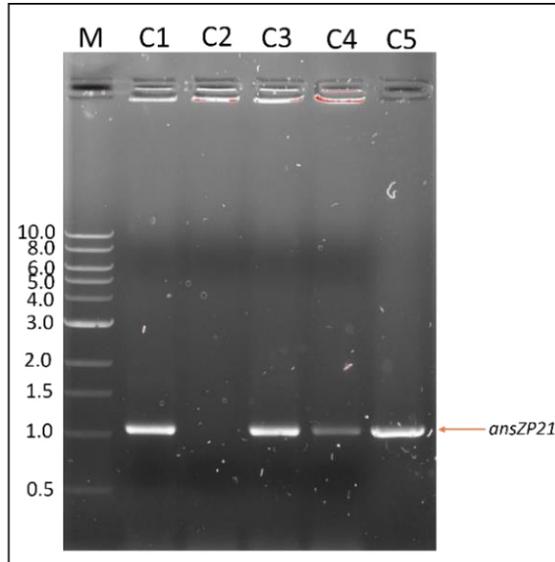


Figura 12. Gel de agarosa al 1% conteniendo la selección de clones. Carriles: C1, C3, C4, C5, clones positivos: C2, clon negativo.

4.4.2 Digestión enzimática del ADN recombinante

El ADN plasmídico pET15b_ansZP21 se cortó con *NdeI* y *BamHI*. Se observó dos fragmentos, uno correspondiente al gen *ansZP21* y el otro al vector pET15b (Figura 13).

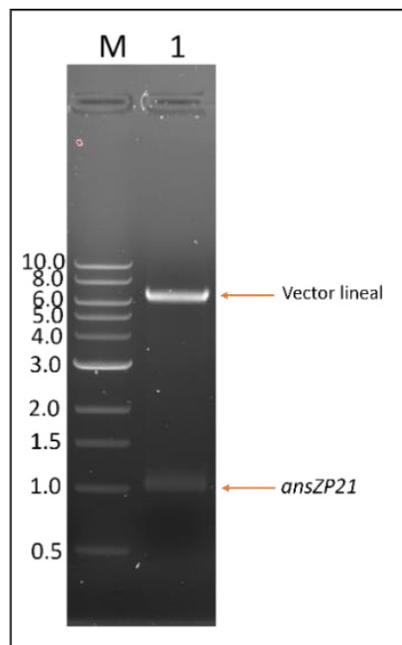


Figura 13. Gel de agarosa 1% mostrando los productos de la digestión enzimática de pET15b_ansZP21. Carriles: M, marcador de peso molecular; 1, pET15b_ansZP21 digerido.

4.5 Purificación de L-ASNasa_BZ

Las fracciones obtenidas de la cromatografía por afinidad se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (*SDS-page*) (Figura 14) y determinó la actividad L-asparaginasa (Anexo 3) y proteínas totales (Anexo 4) (Tabla 6).

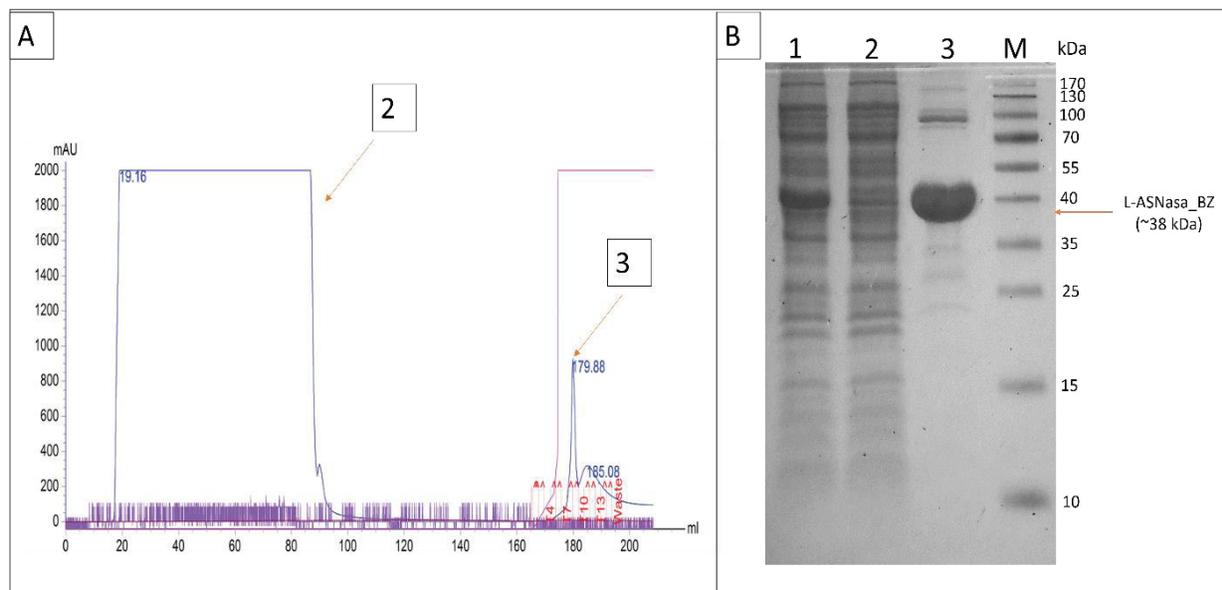


Figura 14. Purificación de L-ASNasa_BZ **A.** Cromatograma de IMAC, los picos 2 y 3 corresponden a las muestras de la figura B. **B.** Gel SDS-page. Carriles: M, marcador de peso molecular; 1, extracto crudo; 2, proteína no ligada; 3, proteína eluida (L-ASNasa_BZ).

Tabla 6. Etapas de purificación de L-ASNasa_BZ

Muestra	Actividad total (U)	Proteína total (mg mL ⁻¹)	Actividad específica (U mg ⁻¹) ¹	Rendimiento (%)	Índice de purificación
Extracto crudo	2,38 x 10 ²	86,39	2,75	100,0	1,0
Cromatografía por afinidad	1,47 x 10 ²	0,63	234,38	61,9	85,2

¹El ensayo de actividad específica se realizó a pH 8.6 y 37 °C

4.6 Zimograma de actividad L-asparaginasa

El zimograma es una técnica experimental que permite visualizar la actividad enzimática *in situ* por electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes. Así, en la figura 15 se observa una mancha con actividad positiva de L-ASNasa_BZ. Además, la proteína presentó una estructura

altamente compacta debido a su rápida migración sin coincidencia con el peso estimado de los monómeros en geles desnaturalizantes.

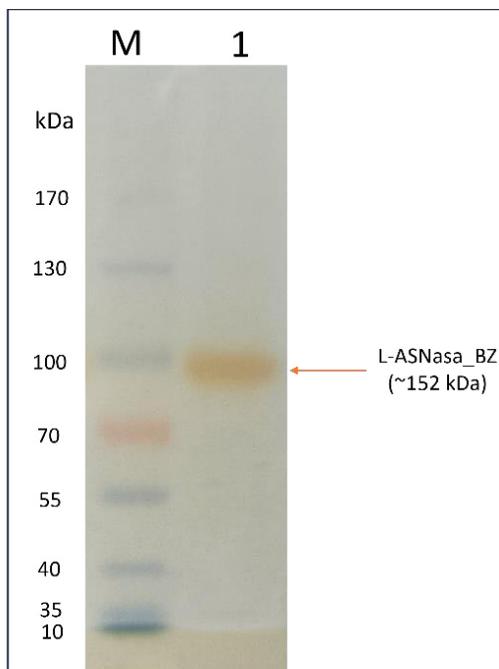


Figura 15. Zimograma de la actividad L-asparaginasa. Carriles: M, marcador de peso molecular; 1, L-ASNasa_BZ purificada.

4.7 Determinación del peso molecular de L-ASNasa_BZ

La cromatografía de filtración en gel permitió estimar el peso molecular de la L-asparaginasa recombinante. Previamente, se consideró para la curva estándar el volumen retenido de las proteínas dentro del rango de separación de la columna de HiPrep™ 16/60 Sephacryl® S-200 HR (5 kDa – 250 kDa), tales como, ribonucleasa A tipo I-A (13,7 kDa), albúmina grado VI (44,3 kDa) y γ -globulina (150 kDa) de Supelco® 15-600 kDa (Anexo 5). De esta manera, se elaboró una curva estándar y estimó el peso molecular de L-ASNasa_BZ equivalente a 153,98 kDa (Figuras 16 A y B)

$X \rightarrow R_f$ (L-ASNasa_BZ): 0,451

Ecuación de la curva: $Y = -4,0747X + 7,025$

Así, reemplazando X en la ecuación:

Y (peso molecular en kDa) = 153.98

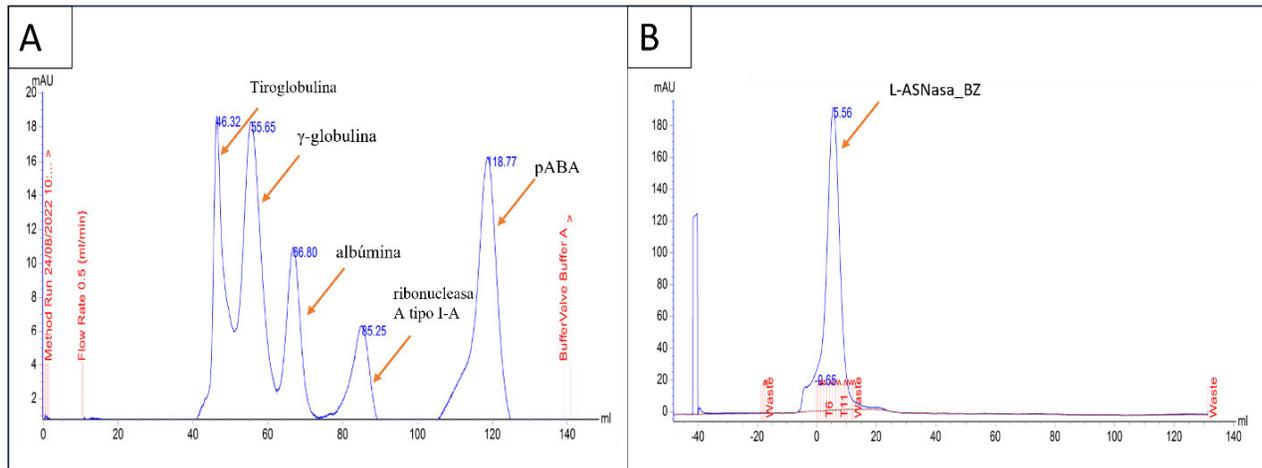


Figura 16. Cromatografía de filtración en gel. **A.** Cromatograma de la Curva estándar de Supelco® 15-600 kDa. **B.** Cromatograma de GF de L-ASNasa_BZ.

4.8 Caracterización bioquímica de L-ASNasa_BZ

4.8.1 Efecto del pH y temperatura

La figura 17A muestra la actividad relativa porcentual de L-ASNasa_BZ a diferentes pH. Se encontró que a pH 9.0 la actividad relativa fue 100 % (Anexo 6). Asimismo, en la figura 17B se observa que a 60 °C la actividad relativa fue 100 %, a esta temperatura exhibió 3,5 veces más actividad que a 37 °C. Por el contrario, la actividad a 70 °C fue 30% (Anexo 7).

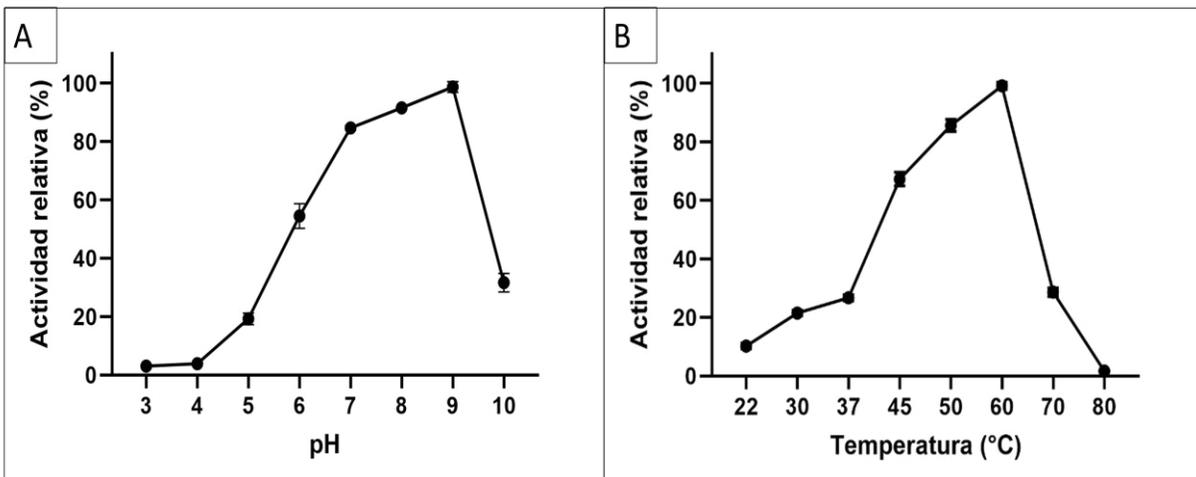


Figura 17. Efecto del pH y la temperatura en la actividad enzimática. **A.** Actividad relativa (%) vs pH. **B.** % Actividad relativa vs temperatura (°C). La actividad relativa se expresó como porcentaje de la actividad máxima. Las barras de error representan una desviación estándar de la media (n = 2).

4.8.2 Efecto de inhibidores enzimáticos y iones metálicos

En la tabla 7, se muestra la actividad enzimática en interacción con diferentes inhibidores enzimáticos como agentes reductores (DL-ditiotreitol, mercaptoetanol, glutatión), agentes quelantes (EDTA), detergentes (SDS), inhibidores de proteasa (PMFS) y úrea. La actividad de L-ASNasa_BZ se incrementó por acción de mercaptoetanol y DL-Ditiotreitol, por el contrario, inhibida por SDS y EDTA.

Asimismo, se muestra la actividad enzimática en interacción con diferentes iones monovalentes (Na^+ y K^+) y divalentes (Ca^{++} , Mg^{++} , Co^{++} , Cu^{++} , Mn^{++} y Ba^{++}). La actividad de L-ASNasa_BZ se incrementaba por acción de Ca^{++} , Mg^{++} y K^+ , e inhibida por Mn^{++} .

Tabla 7. Efecto de los inhibidores enzimáticos y iones metálicos en la actividad L-ASNasa_BZ

Reactivo	Concentración final	% Actividad residual ¹
Ninguno (control)		100,00
KCl		124,50 ± 1,85*
NaCl		106,30 ± 0,09
MgCl ₂		149,80 ± 4,04*
CaCl ₂	100 mM	310,70 ± 3,28*
BaCl ₂		95,07 ± 2,73
MnCl ₂		0.0*
CuCl ₂		0.0*
CoCl ₂		0.0*
PMFS		118,70 ± 5,77
Úrea		96,26 ± 7,36
Mercaptoetanol	10 mM	139,80 ± 3,52*
DL-Ditiotreitol		271,10 ± 37,00*
SDS		0,0*
EDTA		58,85 ± 1,46*
Glutatión	5 mM	97,86 ± 4,39

¹ La actividad relativa se expresó como el porcentaje de actividad en comparación con un control sin iones metálicos. Las barras de error representan una desviación estándar de la media (n = 2).

* p < 0,01 vs. control (prueba ANOVA)

4.8.3 Determinación de parámetros cinéticos

Del gráfico de Lineaweaver-Burk se determinó los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$, los cuales fueron 4,752 mM y $145,2 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$ respectivamente (figura 18).

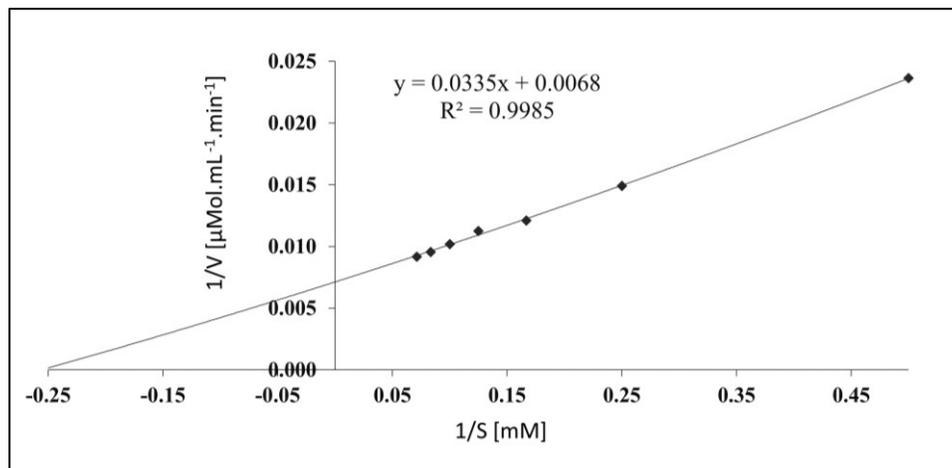


Figura 18. Gráfico de Lineaweaver-Burk elaborado con las inversas de las concentraciones de L-asparagina versus el recíproco de V_0 .

4.8.4 Evaluación de termoestabilidad

La Figura 19 presenta la termoestabilidad de L-ASNasa_BZ a 60°C retuvo alrededor del 60 % de su actividad después de 1 h de incubación. A 25 y 37°C retuvo el 50 % de actividad después de 24 h de incubación.

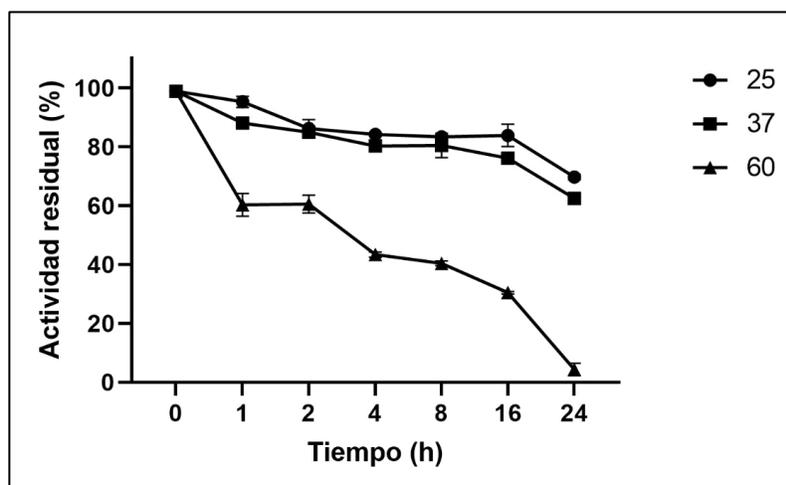


Figura 19. Termoestabilidad de L-ASNasa_BZ. Actividad residual (%) vs tiempo (h). Las barras de error representan una desviación estándar de la media (n = 2).

Tabla 8. Características fisicoquímicas y cinéticas de L-asparaginidas del género *Bacillus*

Fuente	pH	Temperatura (° C)	Actividad específica (U/mg)	Km (mM)	Cromatografía	Autor
<i>Bacillus subtilis</i> CH11	9,0	60	234,38	4,75	AC	Presente estudio
<i>B. subtilis</i> BDRD- ST26	-	65	162,90	5,29	HIC, IEX, GC	Feng Y. y col. (53)
<i>B. subtilis</i> 168	8,0 7,5	65 50	45,40 31,90	2,06 7,06	IEX, HIC	Onishi Y. y col. (8)
<i>B. subtilis</i> B11-06	7,5	40	92,45	0,43	HIC	Jia M. y col. (5)
<i>B. subtilis</i> KDPS1	5,0	37	-	-	IEX	Sanghvi G. y col. (62)
<i>B. aryabhatai</i> ITBHU02	8,5	40	680,50	0,25	HIC, GF	Singh Y. y col. (63)
<i>B. amyloliquefaciens</i> MKSE	8,5	65	136,30	1,15	AC	Yim S. y col (1)
<i>B. cereus</i>	9,0	50	550,80	9,38	HIC, IEX, GF	Feng Y. y col. (61)
<i>B. megaterium</i> H-1	8,0	40	1146,29	21,63	AC	Lu X. y col. (64)
<i>B. sonorensis</i>	7,0	45	4438,62	2,00	AC	Aly N. y col. (65)
<i>B. velenzensis</i>	7,5	37	31,77	0,04	GF	Mostafa Y. y col. (66)

-, no determinado. AC (C. de Afinidad), IEX (C. de intercambio iónico), HIC (C. de hidrofobicidad), GC (C. de filtración en gel)

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

En Perú existe una gran diversidad biológica en los 84 ecosistemas de 117 a nivel mundial (51), por ello, el uso de nuevas estrategias que aprovechen esta genética es valioso. En este contexto, la tecnología del ADN recombinante y la purificación de proteínas por cromatografía permiten la obtención de moléculas de alta pureza para estudios de caracterización *in vitro* e *in vivo*. Así, en el presente estudio se ha purificado y caracterizado bioquímicamente L-asparaginasa recombinante (L-ASNsa_BZ) cuya secuencia génica fue obtenida a partir del ADN genómico de *Bacillus sp.* CH11 aislado de las Salinas de Chilca, Lima - Perú (52).

Se han descrito diversas estrategias de expresión de L-ASNsa_BZ, entre ellas, inclusión de péptido señal y optimización de promotor (53,54), y N-truncamiento de la L-asparaginasa (8,43). Así, Tjalsma y col. (55) reportaron la secuencia N-terminal YccC en *B. subtilis*, un péptido señal de lipoproteína específica de tipo II, igual a la reportada en el presente estudio. El dominio YccC está compuesto por las regiones N, H y C que presentan cargas positivas (cinco residuos), hidrofóbicas (catorce) y polar (una) respectivamente. Además, la región C contiene un residuo Cys conservado que conforma el sitio de corte en la secuencia de *B. subtilis*. De este modo, la eliminación del péptido señal permite la formación de la proteína madura, donde la modificación diacilglicerilo de la cisteína es requerida para su eliminación (9,55,56). Por otro lado, *E. coli* como hospedera no procesa correctamente el péptido señal de *B. subtilis*; no secreta la proteína, y podría desfavorecer el plegamiento (8,50).

El gen *ansZ* de *B. subtilis* CH11 contiene 1125 pares de bases que codifican una proteína de 375 aminoácidos. La transcripción de *ansZ* incluye la presencia de un péptido señal entre los residuos Met1 y Gly19 identificado por el servidor SignalP - 6.0 con una probabilidad del 0.996 % (Figura 7A). Este hallazgo concuerda con la predicción de la estructura monomérica de L-asparaginasa II de *B. subtilis* en AlphaFold2 (Figura 8) (17,18). De esta manera, el péptido señal y Cys20 fueron eliminados para la expresión en *E. coli* BL21 (DE3)pLysS. En base a ello, el gen *ansZP21* clonado y expresado contiene 1068 pb (Figura 9), codifica una proteína de 355 aminoácidos, peso molecular teórico 37,91 kDa y punto isoeléctrico 6,16.

La predicción de IUPred3 (Figura 7B), muestra una distorsión N-terminal entre Pro21 y Pro51, compuesta principalmente por Lys 19,4 %, Ser 19,4 %, Glu 12,9 % y Pro 12,9 %. Según Mészáros

y col. (57) estos desordenes estructurales se caracterizan por tener aminoácidos que no permiten la formación de interacciones favorables y por ende no existe una estructura estable. Además, estos fragmentos cumplen funciones biológicas independientes de la conformación, tales como, flexibilidad, mejora de la interacción proteína-proteína, señalización y regulación (58). El conocimiento de la presencia de este fragmento es relevante para estudios de elucidación estructural y sobre todo en cristalografía.

L-ASNasa_BZ expresada de forma heteróloga en *E. coli* BL21(DE3)pLysS presenta una actividad específica de 234,38 U mg⁻¹ mayor a las descritas en otros estudios (Tabla 8). Ello se explica a una mejor solubilidad de las proteínas y reducción del plegamiento incorrecto asociado con el truncamiento N-terminal; y a protocolos de expresión y purificación optimizados (43,59). Así, Moura y col. (43) informan que *E. coli* BL21(DE3)pLysS codifica una L-asparaginasa con actividad de 89,0 ± 4.4 mayor a las expresadas en *E. coli* (T7) Express Crystal, 57,0 ± 1,7 en Tuner (DE3), 41,6 ± 2,0 en C43 (DE3), 22,4 ± 1,6 en BL21 (DE3), 12,5 ± 1,2 en Lemo21 (DE3), 10,9 ± 1,2 en SHuffe T7, 4,9 ± 1,9 en GroEL (DE3) y 2,2 ± 2,1 en Origami B (DE3), 0,0). Se presume que las cepas de *E. coli* Tuner (DE3), C43 (DE3), Lemo21 (DE3) y (DE3) no son hospederas eficientes en el plegamiento de la proteína. Además, Origami B y SHuffe T7 no favorecen el enlace disulfuro entre los enlaces Cys99 y Cys127 para la correcta conformación estructural; y GroEL presenta chaperonas que no tienen actividad a bajas temperaturas de post-inducción.

Asimismo, con la cromatografía de afinidad se logró un factor de purificación de 85,2 y un rendimiento de recuperación del 61,9 % (Tabla 6). L-asparaginasa N-truncada tipo II (L-ASNasaZP21) se expresó incluyendo una etiqueta 6X-His N-terminal que permitió alta selectividad para la obtención de una proteína de alta pureza a partir de una muestra compleja (1,60) (Tabla 8).

El análisis SDS-PAGE indica que L-ASNasa_BZ pesa 38 kDa acorde a lo estimado por herramientas bioinformáticas y presenta alto grado de pureza (Fig. 14b). Asimismo, el zimograma evidencia la actividad enzimática *in situ*, en donde el peso molecular de la proteína no coincide con el observado en condiciones desnaturizantes (Fig. 15). Ello estaría asociado a la oligomerización de la proteína en condiciones nativas, tal como la obtenida por cromatografía de

filtración en gel de 155 kDa (Fig. 16), equivalente a una estructura tetramérica acorde con lo descrito por Chand y col. (42) y Lubkoski y col. (67).

L-ASNasa_BZ presenta actividad óptima a 60 °C (Figura 17b); 2,7 veces mayor que a 37 °C. Además, la enzima retiene más del 60 % de actividad a 45 °C y alrededor del 30 % a 70 °C. El pH óptimo fue 9,0 (Figura 17a); sin embargo, se observó 80 % de su actividad a pH 7,0. Estos valores concuerdan con los descritos por Feng y col. (61), quienes reportaron una L-asparaginasa II N-truncada con temperatura óptima a 65 °C. En contraste, difieren de lo reportado por Jia y col. (5) donde L-asparaginasa tipo II de *B. subtilis*, exhibió una actividad óptima a 40 °C y pH de 7,5; así como, Sanghvi y col. (62) describen actividad óptima a 37 °C y pH 5,0. De igual forma, Onishi y col. (8) sugirieron que los diferentes valores óptimos de temperatura y pH se deben a variaciones en la estructura N-terminal de la proteína. Además, según Lakshmi y col. (68) estas diferencias se deberían a que la proteína proviene de una bacteria halotolerante. Sin embargo, la mayoría de L-asparaginasas bacterianas presentan actividad óptima entre 30 y 50 °C (69) a pH entre 7,0 y 9,0 (62).

Los efectos de inhibidores y iones sobre la actividad enzimática se describen en la Tabla 7, así la actividad aumentó 1,2 y 1,5 veces con KCl y MgCl₂, respectivamente, mientras con CaCl₂ fue 3,1 veces. El incremento de la actividad enzimática por efecto de los iones antes descritos también se ha reportado en *B. sonorensis* (65) y *B. amyloliquefaciens* MKSE (1). Por otro lado, algunos autores han destacado la capacidad inhibitoria de MnCl₂, CuCl₂ y CoCl₂ sobre L-asparaginasas similar a lo presentado por la de *B. subtilis* CH11 (61,62)

Asimismo, la actividad de L-ASNasa_BZ se incrementó 1,4 y 2,7 veces en presencia de Mercaptoetanol y DL-ditiotreitol, respectivamente. En este aspecto, Krishnapura y col. (69) explican que los agentes protectores de sulfhidrilo favorecen la conformación estructural de algunas proteínas durante la actividad enzimática que conlleva al aumento de esta. Además, la presencia de los compuestos reductores podría disminuir la agregación de proteínas debido a la formación de puentes disulfuro intermoleculares. Estos hallazgos son similares a los reportados para L-asparaginasas de *Pectobacterium carotovorum* (70) y *Erwinia carotovora* (71). Sin embargo, la actividad fue inhibida parcialmente por EDTA y totalmente por SDS; hallazgos similares reportaron Mahajan y col. (30) y Moorthy y col. (2).

L-ASNasa_BZ retuvo alrededor del 60 % de actividad después de 1 h de incubación a 60 °C y 50 % después de 24 h a 25 y 37 °C, mostrando una mejor estabilidad térmica en comparación con L-asparaginasa II de *B. subtilis* con 14,7 % de actividad posterior a 2 h de incubación a 50 °C y 9 % a 60 °C (5); a la vez, Rahimzadeh y col. (37) reportan 50 % de actividad posterior a 30 min y 50 °C. Sin embargo, L-ASNasa_BZ presenta menor termoestabilidad en comparación con la de *B. megaterium* (72), con 80% de actividad residual después de 6 h a 60 °C. En este aspecto, Onishi y col. (8) explican que las diferencias estructurales a nivel del fragmento N-terminal podría conllevar a variación en la estabilidad, debido a posibles interacciones entre Lys47 y Asp130 mediante la formación de un puente hidrógeno. Además, ellos destacaron la estabilidad de la proteína a pH alcalino.

La vida media de L-ASNasa_BZ a 60 °C es 3 h 48 min, mientras que a 25 y 37 °C es mayor a 24 h, en contraste Rahimzadeh y col. (37) reportan 1 h 10 min a 37 °C y 41 min a 40 °C para L-asparaginasa II de *Bacillus sp.* De este modo, se infiere que L-ASNasa_BZ presenta estabilidad térmica prometedora para aplicaciones industriales.

Con referencia a los parámetros cinéticos de $V_{\text{máx}}$ y K_m fueron 145,2 $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$ y 4,752 mM, respectivamente (Figura 18). El valor de K_m es semejante a Feng y col. (61) y Onishi y col. (8) en contraste a Jia y col. (5), Singh y col. (63) y Yim y col. (1) (Tabla 8). Sin embargo, presenta menor afinidad a sustrato comparado a lo reportado para *Escherichia coli* y *Erwinia chrysanthemi* con K_m de 0,02-0,05 y 0,05 mM, respectivamente (73).

En la construcción de L-ASNasa_BZ se presentaron numerosos desafíos para la expresión y la purificación de la proteína sin afectar la actividad biológica intrínseca y para conocer sus potenciales usos en las industrias alimentaria y farmacéutica. Estudios posteriores de producción extracelular de la enzima permitirán determinar otros métodos de producción y purificación. De igual forma, la elucidación estructural por métodos experimentales contribuirá al conocimiento del mecanismo de acción, dinámica molecular e interacción con otras biomoléculas, lo cual permitirá la valoración de esta enzima procedente de una bacteria aislada de ambiente salino.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

- Se amplificó y clonó el gen *ansZPI* N-truncado en el vector pET15b, la secuencia nucleotídica mide 1068 pb que codifica a una proteína de 355 aminoácidos.
- La producción de L-ASNasa_BZ expresada en *Escherichia coli* BL21 (DE3)pLysS se realizó en LB/Ampicilina $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ a condiciones de post inducción a $22 \text{ }^\circ\text{C}$ por 14 h, 230 rpm.
- La proteína purificada presentó una actividad específica de 234 U mg^{-1} con un 61,9 % de recuperación y un índice de purificación de 85,2.
- L-ASNasa_BZ presentó estructura homotetramérica de 155 kDa, la actividad óptima fue a pH 9,0 y $60 \text{ }^\circ\text{C}$, activada por KCl, MgCl_2 , CaCl_2 , mercaptoetanol y DL-ditiotreitol. Los parámetros cinéticos de $V_{\text{máx}}$ y K_m fueron $145,2 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ y $4,752 \text{ mM}$, respectivamente; y el tiempo de vida media de 3 h 48 min a $60 \text{ }^\circ\text{C}$.

CAPÍTULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yim S, Kim M. Purification and characterization of thermostable L-asparaginase from *Bacillus amyloliquefaciens* MKSE in Korean soybean paste. *Lwt.* 2019;109:415–21.
2. Moorthy V, Ramalingam A, Sumantha A, Shankaranaya R. Production, purification and characterization of extracellular L-asparaginase from a soil isolate of *Bacillus sp.* *Afr J Microbiol Res.* 2010;4(18):1862–7.
3. Mahajan R V., Saran S, Kameswaran K, Kumar V, Saxena RK. Efficient production of l-asparaginase from *Bacillus licheniformis* with low-glutaminase activity: Optimization, scale up and acrylamide degradation studies. *Bioresour Technol.* 2012;125:11–6.
4. Shafei MS, El-Refai HA, Mostafa H, El-Refai AMH, El-Beih FM, Easa SM, et al. Purification, characterization and kinetic properties of *Penicillium cyclopium* L-asparaginase: Impact of L-asparaginase on acrylamide content in potato products and its cytotoxic activity. *Curr Trends Biotechnol Pharm.* 2015;9(2):132–40.
5. 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.
6. Dutta S, Ghosh S, Pramanik S. L-asparaginase and L-glutaminase from *Aspergillus fumigatus* WL002: Production and some physicochemical properties. *Appl Biochem Microbiol.* 2015;51(4):425–31.
7. Sudhir AP, Dave BR, Prajapati AS, Panchal K, Patel D, Subramanian RB. Characterization of a Recombinant Glutaminase-Free L-Asparaginase (ansA3) Enzyme with High Catalytic Activity from *Bacillus licheniformis*. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014;174(7):2504–15.
8. 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.
9. Fisher SH, Wray L V. *Bacillus subtilis* 168 contains two differentially regulated genes encoding L-asparaginase. *J Bacteriol.* 2002;184(8):2148–54.
10. Chohan SM, Rashid N. Gene cloning and characterization of recombinant L-Asparaginase from *Bacillus subtilis* strain R5. *Biologia (Poland).* 2018;73(5):537–43.
11. Yun MK, Nourse A, White SW, Rock CO, Heath RJ. Crystal Structure and Allosteric Regulation of the Cytoplasmic *Escherichia coli* L-Asparaginase I. *J Mol Biol.* 2007;369(3):794–811.
12. Shakambari G, Ashokkumar B, Varalakshmi P. L-asparaginase – A promising biocatalyst for industrial and clinical applications. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2019;17:213–24.
13. El-Ghonemy DH. Medical Microbiology & Diagnosis Microbial Amidases and their Industrial Applications: A Review. *Medical Microbiology & Diagnosis [Internet].* 2014;4(1):4–9.

14. Balakrishnan K, Nair A, Kumar R. Screening of microbial isolates for the fermentative production of L-asparaginase in submerged fermentation. *Research and Reviews: Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2013;2(3):95–100.
15. Li X, Zhang X, Xu S, Xu M, Yang T, Wang L, et al. Insight into the thermostability of thermophilic L-asparaginase and non-thermophilic L-asparaginase II through bioinformatics and structural analysis. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019;103(17):7055–70.
16. Wiltgen M. Algorithms for structure comparison and analysis: Homology modelling of proteins. Vols. 1–3, *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics*. Elsevier Ltd.; 2018. 38–61.
17. Varadi M, Anyango S, Deshpande M, Nair S, Natassia C, Yordanova G, et al. AlphaFold Protein Structure Database: Massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res*. 2022 Jan 7;50(D1):D439–44.
18. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021 Aug 26;596(7873):583–9.
19. Ashwini M, Murugan SB, Balamurugan S, Sathishkumar R. *Advances in molecular cloning*. Mol Biol. 2016;50(1):1–6.
20. Roberts MAJ. Recombinant DNA technology and DNA sequencing. *Essays Biochem*. 2019;63(4):457–68.
21. Kramer MF, Coen DM. Enzymatic amplification of DNA by PCR: standard procedures and optimization. *Current protocols in pharmacology / editorial board, SJ Enna (editor-in-chief)*. 2001; Capítulo 6:1–15.
22. Carter M, Shieh J. *Molecular Cloning and Recombinant DNA Technology. Guide to Research Techniques in Neuroscience*. 2015;(1):219–37.
23. Pots J. *Alfredo Developers Guide*. Am J Epidemiol. 2010;172(10):NP.
24. Novagen. pET-15b Vector (Cat. No. 69661-3).
25. Anton BP, Raleigh EA. Complete Genome Sequence of NEB 5-alpha, a Derivative of. *Genome Announc*. 2016;4(6):6–7.
26. Thermo scientific. One Shot™ BL21(DE3)pLysS Chemically Competent E. coli [Internet]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C606010>
27. Łacki KM. Introduction to Preparative Protein Chromatography. In: *Biopharmaceutical Processing: Development, Design, and Implementation of Manufacturing Processes*. Elsevier; 2018. p. 319–66.
28. Amersham Biosciences. *Protein Purification Handbook*. 2001 [Internet]. Disponible en: www.apbiotech.com

29. Chirayil CJ, Abraham J, Mishra RK, George SC, Thomas S. Instrumental Techniques for the Characterization of Nanoparticles. Vol. 3, Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization. Elsevier Inc.; 2017. 1–36 p.
30. 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).
31. Bauer MMT, Schnapp G. Protein production for three-dimensional structural analysis. Comprehensive Medicinal Chemistry II. 2006;3:412–32.
32. Smoluch M, Mielczarek P, Drabik A, Silberring J. Online and Offline Sample Fractionation. Second Edi. Proteomic Profiling and Analytical Chemistry: The Crossroads: Second Edition. Elsevier; 2016. 63–99 p.
33. Kimple ME, Brill AL, Pasker RL. Overview of affinity tags for protein purification. Curr Protoc Protein Sci. 2013;73:1–23.
34. Andjelković U, Giacometti J, Josić D. Protein and peptide separations. Vol. 2, Liquid Chromatography: Applications: Second Edition. 2017. 107–157 p.
35. Bisswanger Hans. Enzyme Kinetics. 2017.
36. Illanes A, Altamirano C, Wilson Lorena. Homogeneous Enzyme Kinetics. In: Enzyme Biocatalysis. 2008.
37. Rahimzadeh M, Poodat M, Javadpour S, Qeshmi FI, Shamsipour F. Purification, Characterization and Comparison between Two New L-asparaginases from PG03 and PG04. Open Biochem J. 2016;10(1):35–45.
38. Sant'Anna V, Cladera-Olivera F, Brandelli A. Kinetic and thermodynamic study of thermal inactivation of the antimicrobial peptide P34 in milk. Food Chem. 2012 Jan 1;130(1):84–9.
39. Montes J. Caracterización molecular de bacterias con actividad L-asparaginasa aisladas de las Salinas de Pilluana, Maras y Chilca [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2018.
40. Thermo Fisher Scientific. GeneJET Gel Extraction Kit.
41. Qiagen. QIAprep ® Spin Miniprep Kit [Internet]. 2015. Disponible en: www.qiagen.com/contact.
42. Chand S, Mahajan R, 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. 2020;67(4):619–47.
43. de Moura WAF, Schultz L, Breyer CA, de Oliveira ALP, Tairum CA, Fernandes GC, et al. Functional and structural evaluation of the antileukaemic enzyme L-asparaginase II

- expressed at low temperature by different *Escherichia coli* strains. *Biotechnol Lett* [Internet]. 2020;42(11):2333–44.
44. Novagen. BugBuster Protein Extraction Reagent.
 45. Shifrin S, Parrott CL, Luborsky SW. Substrate binding and intersubunit interactions in L asparaginase. *Journal of Biological Chemistry*. 1974;249(5):1335–40.
 46. Hurtado A, Flores-Santos JC, Flores-Fernández CN, Saavedra S, Santos JHPM, Pessoa-Júnior A, et al. A Novel L-Asparaginase from *Enterobacter sp.* Strain M55 from Maras Salterns in Peru. *Chem Biochem Eng Q*. 2022;36(2):167–73.
 47. Sigma-Aldrich. Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination.
 48. Walker JM. The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation.
 49. Laemmli U. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680–5.
 50. Flores-Santos JC, Moguel IS, Monteiro G, Pessoa A, Vitolo M. Improvement in extracellular secretion of recombinant l-asparaginase II by *Escherichia coli* BL21 (DE3) using glycine and n-dodecane. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2021 Sep 1;52(3):1247–55.
 51. Bonilla Valerio LE. La política ambiental y el ecosistema en el Perú, Lima. 2018.
 52. Shakambari G, Ashokkumar B, Varalakshmi P. L-asparaginase – A promising biocatalyst for industrial and clinical applications. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2019;17:213–24.
 53. Feng Y, Liu S, Jiao Y, Gao H, Wang M, Du G, et al. Enhanced extracellular production of L-asparaginase from *Bacillus subtilis* 168 by *B. subtilis* WB600 through a combined strategy. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2017;101(4):1509–20.
 54. Ismail NF, Hamdan S, Mahadi NM, Murad AMA, Rabu A, Bakar FDA, et al. A mutant l-asparaginase II signal peptide improves the secretion of recombinant cyclodextrin glucanotransferase and the viability of *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*. 2011 May;33(5):999–1005.
 55. Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed JDH, Bron S, van Dijl JM. Signal Peptide-Dependent Protein Transport in *Bacillus subtilis*: a Genome-Based Survey of the Secretome . *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2000 Sep;64(3):515–47.
 56. Bengtsson J, Tjalsma H, Rivolta C, Hederstedt L. Subunit II of *Bacillus subtilis* Cytochrome c Oxidase Is a Lipoprotein. *J Bacteriol*. 1999;181(2):685–8.
 57. Mészáros B, Erdős G, Dosztányi Z. IUPred2A: Context-dependent prediction of protein disorder as a function of redox state and protein binding. *Nucleic Acids Res*. 2018 Jul 2;46(W1):W329–37.

58. Erdős G, Dosztányi Z. Analyzing Protein Disorder with IUPred2A. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2020 Jun 1;70(1).
59. Falak S, Sajed M, Rashid N. Strategies to enhance soluble production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. Vol. 77, *Biologia*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2022. p. 893–905.
60. Rodriguez EL, Poddar S, Iftekhhar S, Suh K, Woolfork AG, Ovbude S, et al. Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2020 Nov 10;1157.
61. Feng Y, Liu S, Jiao Y, Wang Y, Wang M, Du G. Gene cloning, and expression of the L-asparaginase from *Bacillus cereus* BDRD-ST26 in *Bacillus subtilis* WB600. *J Biosci Bioeng*. 2019;127(4):418–24.
62. Sanghvi G, Bhimani K, Vaishnav D, Oza T, Dave G, Kunjadia P. Mitigation of acrylamide by l - asparaginase from *Bacillus subtilis* KDPS1 and analysis of degradation products by HPLC and HPTLC. *Springerplus*. 2016;
63. Singh Y, Gundampati RK. Extracellular L -Asparaginase from a Protease-Deficient *Bacillus aryabhatai* ITBHU02: Purification, Biochemical Characterization, and Evaluation of Antineoplastic Activity In Vitro. 2013;1759–74.
64. Lu X, Chen J, Jiao L, Zhong L, Lu Z, Zhang C, et al. Improvement of the activity of L-asparaginase I improvement of the catalytic activity of L-asparaginase I from *Bacillus megaterium* H-1 by in vitro directed evolution. *J Biosci Bioeng* [Internet]. 2019;128(6):683–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.06.001>
65. Aly N, El-Ahwany A, Ataya FS, Saeed H. *Bacillus sonorensis* L-Asparaginase: Cloning, Expression in *E. coli* and Characterization. *Protein Journal*. 2020 Dec 1;39(6):717–29.
66. Mostafa Y, Alrumman S, Alamri S, Hashem M, Al-izran K, Alfaifi M, et al. Enhanced production of glutaminase-free L-asparaginase by marine *Bacillus velezensis* and cytotoxic activity against breast cancer cell lines. *Electronic Journal of Biotechnology* [Internet]. 2019;42:6–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2019.10.001>
67. Lubkowski J, Wlodawer A. Structural and biochemical properties of L-asparaginase. *FEBS Journal*. 2021 Jul 1;288(14):4183–209.
68. Lakshmi A V, Mari DS. Screening and identification of asparaginase and glutaminase producing halophilic bacteria from natural saline habitats. *International Journal on Recent Advancement in Biotechnology & Nanotechnology*. 2020;3.
69. Krishnapura PR, Belur PD, Subramanya S. A critical review on properties and applications of microbial L-asparaginases. *Crit Rev Microbiol*. 2016;42(5):720–37.
70. Kumar S, Venkata Dasu V, Pakshirajan K. Purification and characterization of glutaminase-free l-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428. *Bioresour Technol*. 2011;102(2):2077–82.

71. Warangkar SC, Khobragade CN. Purification, characterization, and effect of thiol compounds on activity of the *Erwinia carotovora* L-asparaginase. *Enzyme Res.* 2010;2010.
72. 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. *FRIN.* 2015;1–7.
73. Beckett A, Gervais D. What makes a good new therapeutic L-asparaginase? *World J Microbiol Biotechnol.* 2019;35(10):1–13.

CAPÍTULO VII. ANEXOS

Anexo 1

Secuencias aminoacídicas codificadas los genes *ansZ* y *ansZP21*

- Secuencia codificada por gen *ansZ*:

MKKQRMLVLFTALLFVFTGCPHSPETKESPKEKTRTQKVSSASASEKKGLPNIRILATG
GTIAGADQSKTSTTEYKAGVVGVESLIEAVPEMKDIANVSGEQIVNVGSTNIDNKILLKL
AKRINHLLASDDVDGIVVTHGTDLEETAYFLNLTVKSDKPVVIVGSMRPSTAISADGPS
NLYNAVKVAGAPEAKGKGTLVVLNDRIASARYVTKTNTTTTDTFKSEEMGFVGTIADDI
YFNNEITRKHTKDTDFSVSNLDELPQVDIIYGYQNDGSYLFDAAVKAGAKGIVFAGSGN
GSLSDAAEKGANS AVKKGVTVVRSTRTGNGVVTPNQDYAEKDLLASNSLNPQKARML
LMLALTKTNDPQKIQAYFNEY

**En rojo: péptido señal*

- Secuencia codificada por el gen *ansZP21*:

PHSPETKESPKEKTRTQKVSSASASEKKGLPNIRILATGGTIAGADQSKTSTTEYKAGVV
GVESLIEAVPEMKDIANVSGEQIVNVGSTNIDNKILLKLAKRINHLLASDDVDGIVVTHG
TDLEETAYFLNLTVKSDKPVVIVGSMRPSTAISADGPSNLYNAVKVAGAPEAKGKGTL
VVLNDRIASARYVTKTNTTTTDTFKSEEMGFVGTIADDIYFNNEITRKHTKDTDFSVSNL
DELPQVDIIYGYQNDGSYLFDAAVKAGAKGIVFAGSGNGSLSDAAEKGANS AVKKGVT
VVRSTRTGNGVVTPNQDYAEKDLLASNSLNPQKARMLLMLALTKTNDPQKIQAYFNEY

Anexo 2

Curva estándar del marcador de ADN Quick-Load® 1 kb

Marco de referencia (mm): 75 mm

Tabla 9. Datos de la curva estándar del marcador de ADN

	Distancia (mm)	R_f	pb	log(10)pb
1	22	0.293	10000	4.000
2	24	0.320	8000	3.903
3	26	0.346	6000	3.778
4	27	0.360	5000	3.698
5	29	0.386	4000	3.602
6	31	0.413	3000	3.477
7	34	0.453	2000	3.301
8	36.5	0.486	1500	3.176
9	41	0.546	1000	3.000
10	46	0.613	500	2.698

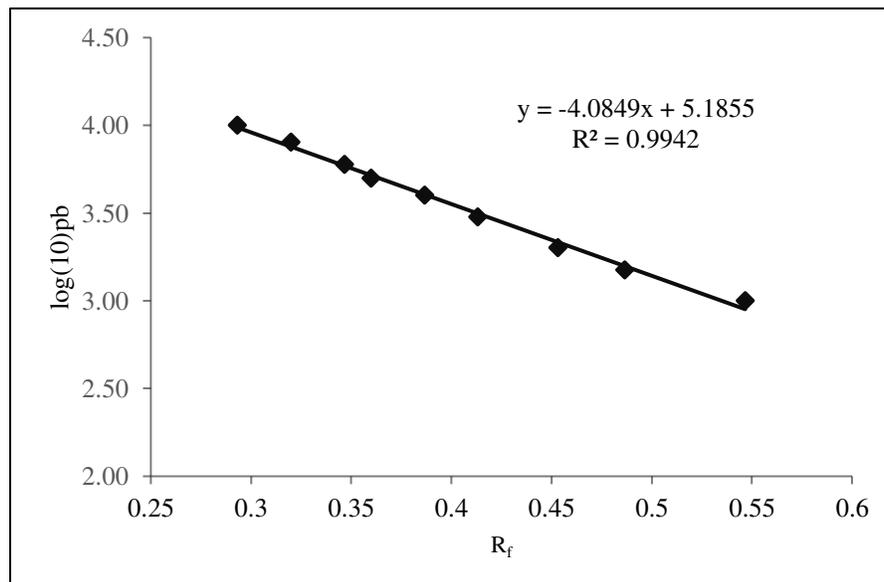


Figura 20. Curva estándar del marcador de ADN

Anexo 3

Curva estándar del método de Nessler

Tabla 10. Datos de la curva estándar del método de Nessler

μMoles amonio	Absorbancia
0.005	0.018
0.010	0.059
0.022	0.124
0.043	0.294
0.054	0.407
0.082	0.729
0.109	0.938

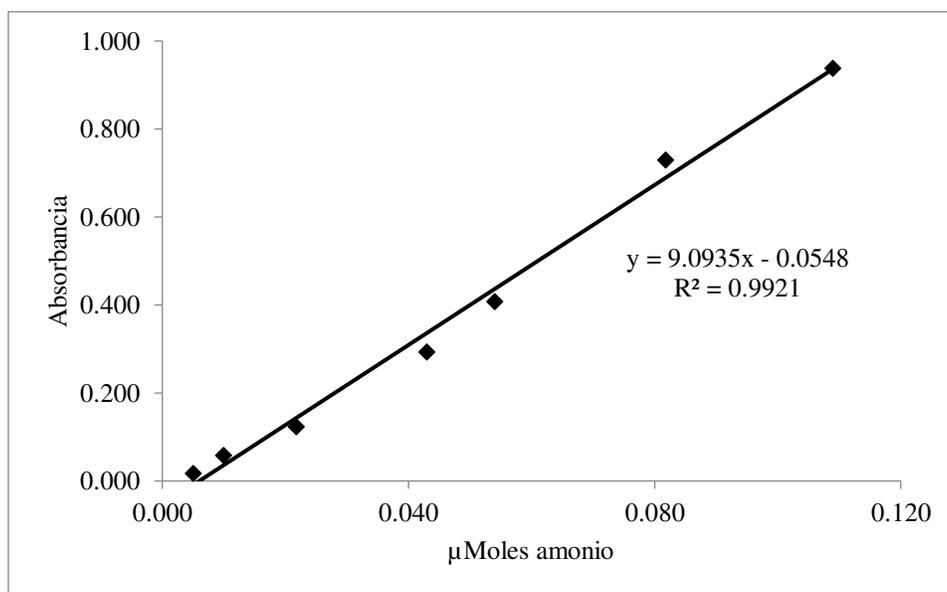


Figura 21. Curva estándar del método Nessler

Anexo 4

Curva estándar del método de BCA

Tabla 11. Datos de la curva estándar del método de BCA

$\mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína	Absorbancia
80	0.077
160	0.167
240	0.226
320	0.285
400	0.332
600	0.506
800	0.637

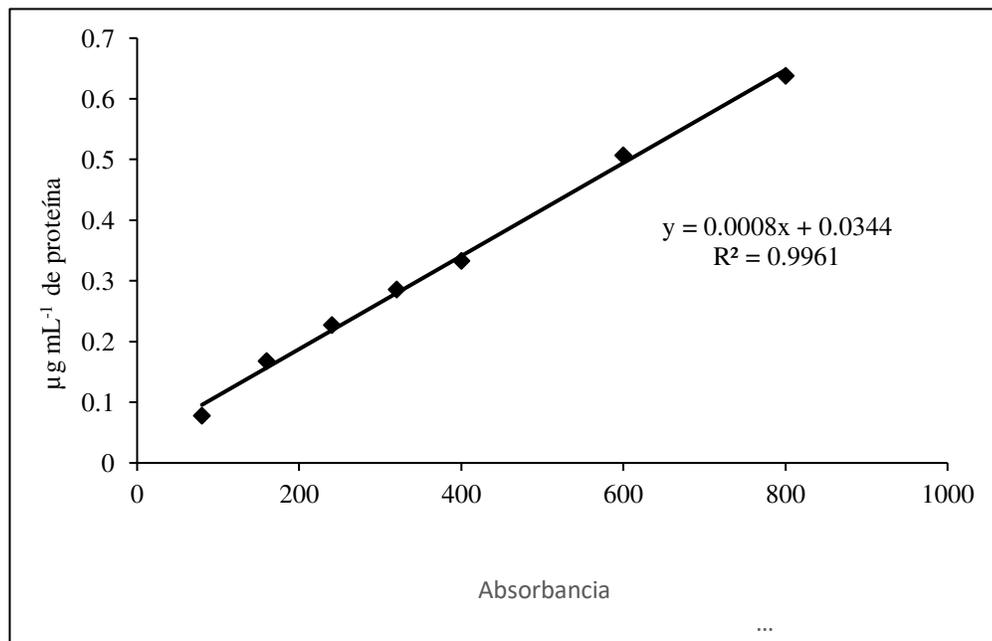


Figura 22. Curva estándar del método BCA

Anexo 5

Curva estándar de Cromatografía de Filtración en gel (GF)

Tabla 12. Datos de la curva estándar de GF

Proteína	Distancia (mL)	R _f	Peso Molecular (Da)	log(10)PM
γ -globulina	55.65	0.468	150000	5.176
Albúmina grado VI	66.80	0.562	43300	4.636
Ribonucleasa A tipo I-A	85.25	0.717	13700	4.136

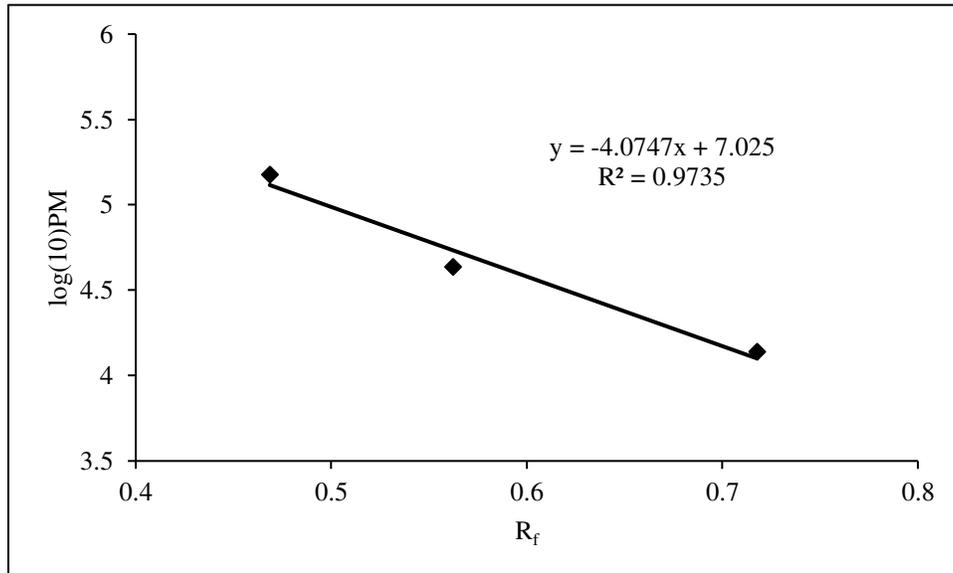


Figura 23. Curva estándar de Filtración en Gel

Anexo 6

Tabla 13. Efecto del pH en la actividad L-ASNasa_BZ

pH	% Actividad relativa
3	3.074 ± 0.01
4	3.935 ± 0.04
5	19.270 ± 1.94
6	54.460 ± 4.22
7	84.670 ± 0.76
8	91.540 ± 0.09
9	100.0
10	31.640 ± 3.17

Tabla 14. Efecto de la temperatura en la actividad L-ASNasa_BZ

Temperatura	% Actividad relativa
20	10.250 ± 0.98
30	21.510 ± 0.90
37	26.730 ± 1.03
45	67.270 ± 2.36
50	85.590 ± 2.07
60	100.0
70	28.650 ± 1.50
80	1.664 ± 0.11

Revisado por Dra. Gladys A. Moscoso Mujica 18/11/23