



**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 de *Enterobacter sp.* M55 halotolerante**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biotecnología

**AUTOR**

Abad HURTADO GOMEZ

**ASESOR**

Dra. Amparo Iris ZAVALA PESANTES

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

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

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

## Referencia bibliográfica

---

Hurtado A. Purificación y caracterización bioquímica de L-asparaginasa de *Enterobacter* sp. M55 halotolerante [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2021.

---

## Metadatos complementarios

<b>Datos de autor 1</b>	
Nombres y apellidos	Abad Hurtado Gomez.
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	46590391
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0002-4278-243X">https://orcid.org/0000-0002-4278-243X</a>
<b>Datos de asesor</b>	
Nombres y apellidos	Amparo Iris Zavaleta Pesantes.
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	17880045
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0003-3844-7185">https://orcid.org/0000-0003-3844-7185</a>
<b>Datos del jurado</b>	
<b>Presidente del jurado</b>	
Nombres y apellidos	Luisa Pacífica Negrón Ballarte
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07237298
<b>Miembro del jurado 1</b>	
Nombres y apellidos	Roberto Jhalver Vega Paulino
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	40556214
<b>Miembro del jurado 2</b>	
Nombres y apellidos	Celia Bertha Vargas De La Cruz
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	42354741
<b>Miembro del jurado 3</b>	
Nombres y apellidos	Amparo Iris Zavaleta Pesantes.

Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	17880045
<b>Datos de investigación</b>	
Línea de investigación	B.2.6.2. Biotecnología Industrial
Grupo de investigación	Biotecnología Microbiana y Salud - BIOMIAS
Agencia de financiamiento	Perú. Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (CONCYTEC). Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (Fondecyt). CONVENIO N° 169 - FONDECYT – 2017.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Farmacia y Bioquímica, Laboratorio de Biología Molecular País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Calle: Jr. Puno N°1002 Latitud: -12.05572 Longitud: -77.02324
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2018-2020
URL de disciplinas OCDE	Bioquímica, Biología molecular <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03</a> Tecnologías de bioprocesamiento, Biocatálisis, Fermentación <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.09.02">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.09.02</a>



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



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

Siendo las **11:00 hrs. del 29 de diciembre de 2021** se reunieron mediante la plataforma de Google meet de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Evaluador de tesis, presidido por la Dra. Luisa Pacífica Negrón Ballarte e integrado por los siguientes miembros: Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes (Asesora), Dr. Roberto Jhalver Vega Paulino y Mg. Celia Bertha Vargas De La Cruz; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"Purificación y caracterización bioquímica de L-asparaginasa de *Enterobacter sp. M55* halotolerante"**, presentado por el Bachiller en Farmacia y Bioquímica **ABAD HURTADO GOMEZ**.

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 el graduando.

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

.....**18 (DIECIOCHO) – Muy bueno**.....

Luego, la Presidenta del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Bachiller en Farmacia y Bioquímica **ABAD HURTADO GOMEZ**, el Grado Académico de Magister en **Biotecnología**.

Siendo las **12:30** hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las **12:35** hrs. del 29 de diciembre de 2021.

.....  
Dra. Luisa Pacífica Negrón Ballarte (P.P., D.E.)  
Presidenta

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

.....  
Dr. Roberto Jhalver Vega Paulino (P. Asoc. T.C.)  
Miembro

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

Observaciones:  
.....  
.....



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



**EL DIRECTOR DE LA UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS QUE SUSCRIBE DEJA,**

# CONSTANCIA

**00048-FFB-UPG-2021**

Que mediante procedimiento de la evaluación de originalidad según Resolución Rectoral N° 043005-R-18, de la tesis intitulada **Purificación y caracterización bioquímica de L-asparaginasa de *Enterobacter sp. M55 halotolerante***, presentado por Abad Hurtado Gomez, con fecha de recepción 13/10/2021, con fecha de aplicación al programa de similitud el 13/10/2021 con el software utilizado el TURNITIN, con la configuración de exclusión de textos entrecomillas, bibliografías y cadenas menores a 40 palabras, mediante el procedimiento de la evaluación de originalidad, el porcentaje de similitud según programa detector es **5%**, por lo que, cumple los criterios de originalidad sin observación, según informe adjunto.

Se expide la presente constancia para el trámite de expedito, según lo establecido en el Reglamento General de Estudios de Posgrado 2018, aprobado con RR. 04790-R-18.

**Lima, 14 de octubre de 2021**



Firmado digitalmente por JAVE  
NAKAYO Jorge Leonardo FAU  
20143092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 15.10.2021 11:21:29 -05:00

**DR. JORGE LEONARDO JAVE NAKAYO**  
**DIRECTOR**

JLJN/ecj

*A Juana Cáceres Vargas, mi novia, por sus enseñanzas de los valores de Bondad, Honradez, Esfuerzo, Respeto, Perseverancia y sobre todo Amor.*

*A Leon Sprenger, mi amigo, aún por la distancia, siempre está para darme consejos de la vida.*



## **AGRADECIMIENTOS**

A todas las personas que me ayudaron a culminar esta tesis, tanto en Perú, Brasil y Chile. Gracias a sus conocimientos que me brindaron se pudo avanzar exitosamente los experimentos.

Especialmente a mi asesora de tesis, la Dra. Amparo Zavaleta Pesantes, por brindarme la confianza para desarrollar la tesis, consejos que frecuentemente me brinda y me ayuda a mejorar día a día.

Al Dr. Adarlberto Pessoa y la Dra María Elena Lienqueo, por aceptarme realizar pasantía en la Universidad de Sao Paulo y Universidad de Chile. Gracias a ellos la tesis pudo culminarse a tiempo y con buenos resultados.

A Stephy Saavedra, mi amiga y compañera del proyecto y maestría. Siempre estuvo no solo en lo académico, sino también para darme consejos y charlas durante las tardes.

A Juan Carlos Flores, por su amistad y sobre todo sus enseñanzas en el Laboratorio de Biología Molecular.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Biología Molecular, Manuel, Camila, Sayuri, Ysamar y César. Gracias a ellos mi estadía en el laboratorio no hubiese sido mejor.

A los docentes de la maestría de Biotecnología, con sus enseñanzas ayudaron consolidar mis conocimientos.

El presente trabajo fue parcialmente financiado por:

FONDECYT- CONCYTEC mediante el convenio N°: 169- 2017- Fondecyt

## INDICE

CAPITULO 1	CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1	Situación problemática .....	11
1.2	Formulación del problema.....	13
1.3	Justificación de la investigación.....	13
1.4	Objetivos.....	14
1.4.1	Objetivo general .....	14
1.4.2	Objetivos específicos.....	14
CAPITULO 2	CAPITULO II. MARCO TEÓRICO.....	15
2.1	Antecedentes.....	15
2.2	Bases teóricas .....	19
2.2.1	L-asparaginasa.....	19
2.2.2	Métodos de purificación enzimática .....	21
2.2.3	Caracterización enzimática .....	30
2.2.3.1	Cinética enzimática .....	30
CAPITULO 3	CAPÍTULO III. METODOLOGÍA.....	35
3.1	<i>Enterobacter sp.</i> M55.....	35
3.2	Producción de L-asparaginasa .....	35
3.3	Purificación de L-asparaginasa de <i>Enterobacter sp.</i> M55.....	35
3.3.1	Lisis celular por sonicación.....	35

3.3.2	Determinación del pH en la purificación de intercambio aniónico (DEAE-sepharose)	36
3.3.3	Purificación por cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-sepharose) ....	36
3.3.4	Purificación por cromatografía de exclusión por tamaño .....	37
3.4	Caracterización de L-asparaginasa de <i>Enterobacter sp. M55</i> .....	37
3.4.1	Actividad L-ASNasa por método del ácido L-aspartil- $\beta$ -hidroxámico.....	37
3.4.2	Actividad L-ASNasa por método de Nessler .....	38
3.4.3	Perfil de homogeneidad de la L-asparaginasa por electroforesis .....	38
3.4.4	Ensayo cuantitativo de la actividad proteolítica.....	38
3.4.5	Determinación de parámetros cinéticos de L-asparaginasa de <i>Enterobacter sp. M55</i>	39
3.4.6	Efecto del pH y temperatura en la actividad enzimática.....	39
3.5	Determinación de proteínas totales.....	40
3.5.1	Especificidad de sustrato.....	40
3.5.2	Efecto de iones metálicos, componentes del suero e inhibidores enzimáticos ...	40
CAPITULO 4	CAPITULO IV. RESULTADOS .....	42
CAPITULO 5	CAPITULO V. DISCUSIÓN .....	58
CAPITULO 6	CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES .....	63
CAPITULO 7	CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64
CAPITULO 8	CAPÍTULO VIII. ANEXOS .....	71

## RESUMEN

L-asparaginasa (EC 3.5.1.1) cataliza la reacción de hidrólisis de L-asparagina en ácido aspártico y amonio, usada para el tratamiento de diversas enfermedades como leucemia linfoblástica aguda, linfosarcomas, linfomas no-Hodgkin, entre otras. A pesar de que existen en el mercado diversas presentaciones comerciales de esta enzima aún no se resuelven los problemas de hipersensibilidad en pacientes tratados, en consecuencia, existe una búsqueda constante de nuevas fuentes de L-asparaginasa con mejores características que las descritas. En este aspecto, este estudio presenta la purificación y la caracterización de L-asparaginasa intracelular de *Enterobacter sp.* M55 halotolerante aislado de las salinas de Maras. Para ello, se cultivó la bacteria en medio M9, las células se concentraron por centrifugación y lisaron por sonicación. En la purificación se utilizaron técnicas de intercambio aniónico DEAE y por exclusión molecular, así se obtuvo un rendimiento de 36,26 % y una actividad específica de 0,574 UI/mg. Además, los parámetros cinéticos fueron:  $K_m$  5,71 mM y  $V_{max} = 0,16 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  y actividad L-glutaminasa menor a 2%; las condiciones óptimas de reacción fueron 37 °C y pH 6,0. Asimismo, la actividad se mantuvo mayor a 50% frente a hemoglobina, y se incrementó en 43% en presencia de glucosa. Con base a esta información, L-asparaginasa de *Enterobacter sp.* M55 presenta gran potencial clínico por la alta especificidad a L-asparagina y la baja actividad L-glutaminasa.

**Palabras clave:** *Enterobacter sp.*, L-asparaginasa, Salinas de Maras, intercambio aniónico, parámetros cinéticos

## ABSTRACT

L-asparaginase (EC 3.5.1.1) catalyzes the hydrolysis of L-asparagine into aspartic acid and ammonium, and it is used for the treatment of several diseases such as acute lymphoblastic leukemia, lymphosarcomas, non-Hodgkin's lymphomas, among others. Although there are various commercial presentations of this enzyme on the market, hypersensitivity problems in treated patients have not yet been resolved, consequently, there is a constant search for new sources of L-asparaginase with better characteristics than those described. In this regard, this study presents the purification and characterization of L-asparaginase from *Enterobacter sp.* M55 Halotolerant, isolated from the salt pans of Maras. For this, the bacteria were cultivated in M9 medium, the cells were concentrated by centrifugation and Lysis by sonication. In the purification, DEAE anion exchange and molecular exclusion techniques were used, thus obtaining a yield of 36.26% and a specific activity of 0.574 IU/mg. Furthermore, the kinetic parameters were  $K_m$  5.71 mM and  $V_{max}$  0.16  $\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$  and L-glutaminase activity less than 2%; optimal reaction conditions were 37 ° C and optimum pH was 6.0. Also, the activity remained greater than 50% against hemoglobin, and increased by 43% in the presence of glucose. Based on this information, L-asparaginase from *Enterobacter sp.* M55 has great clinical potential due to high specificity for L-asparagine and low L-glutaminase activity.

Keywords: *Enterobacter sp.*, L-asparaginase, salt pans of Maras, anion exchange, kinetic parameters.

## Índice de figura

Figura 1. Cromatografía de exclusión por tamaño .....	28
Figura 2. Curvas de selectividad de los medios Superdex 200 y G25 .....	29
Figura 3. Factores en la resolución de SEC .....	30
Figura 4. Componentes de cromatografía de afinidad .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 5. Cromatografía por de afinidad de glutatión S-transferasa (A) y polihistidina (B. Fuente: Li y col. (27) .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 6. Dinámica de biomasa, actividad L-ASNasa y proteínas totales después del rompimiento celular de <i>Enterobacter sp</i> M55 por sonicación.....	42
<b>Figura 8. Actividad proteasa no ligada a agarosa DEAE equilibrada a diferente pH ....</b>	<b>44</b>
Figura 9. Actividad L-asparaginasa y proteínas totales de <i>Enterobacter sp</i> M55 eluidas con gradiente de NaCl (0 – 0.5 M) .....	46
Figura 10. Perfil cromatográfico de exclusión por tamaño de L-asparaginasa de <i>Enterobacter sp</i> M55, usando Superdex 200 increase 10/300 GL column.....	47
Figura 11. SDS-PAGE de la L-asparaginasa de <i>Enterobacter sp</i> . M55. Carriles: C, marcador de peso molecular; M, extracto enzimático inicial; DEAE, cromatografía intercambio aniónico; SEC, cromatografía de exclusión por tamaño.....	50
Figura 14. Efecto del pH en la actividad L-asparaginasa de <i>Enterobacter sp</i> M55.....	53
Figura 15. Efecto de inhibidores en la actividad L-asparaginasa de <i>Enterobacter sp</i> M55.....	54
Figura16. Efecto de sales en la actividad L-asparaginasa de <i>Enterobacter sp</i> M55 .....	55
Figura 17. Efecto de los componentes del suero en la actividad L-asparaginasa de <i>Enterobacter sp</i> M55 .....	56
Figura18. Especificidad de L-asparaginasa de <i>Enterobacter sp</i> M55.....	57

## Índice de tablas

Tabla 1. Características fisicoquímicas y cinéticas de L-ASNasas.....	20
Tabla 2. Intercambiadores iónicos comunes .....	26
Tabla 3. Tampones no volátiles para intercambio aniónico.....	27
Tabla 4. Tampones no volátiles para intercambio catiónico.....	27
Tabla 5. Métodos de inmovilización más comunes .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Tabla 6. Purificación de L-asparaginasa de Enterobacter sp. M55.....	49



## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Situación problemática

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, en el 2015 ocasionó 8,8 millones de muertes, por tanto, es un problema de salud pública. De estos, el 70 % fue registrado en países en vías de desarrollo, en los cuales menos del 30% tienen acceso a tratamientos oncológicos (1).

La leucemia es un tipo de cáncer de la sangre que afecta a los leucocitos o glóbulos rojos, así, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) afecta a los linfocitos. Sin embargo, en Perú no existen datos estadísticos sobre la LLA y solo se toma como referencia de forma general. Este cáncer afecta principalmente a niños menores de 14 años, en el 2016 se presentaron 410 casos nuevos registrados en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (2). Sin embargo, en el 2012, la leucemia fue la undécima causa de muerte por cáncer en Lima Metropolitana, se registraron 1076 muertes por leucemia entre los años 2010 y 2012 correspondiendo a una tasa de mortalidad de 3,9 por 100.000 habitantes. (3)

En los últimos años, el éxito del tratamiento de la LLA es mayor, principalmente debido a la incorporación de L-asparaginasa (L-ASNasa) en los protocolos de tratamiento. En el mercado existen L-ASNasa de *Escherichia coli* nativa (L-ASNasa nativa), L-ASNasa de *Erwinia chrysanthemi* (ASNasa de Erwinia), y una forma pegilada de L-ASNasa de *E. coli* nativa. L-ASNasa nativa (L-ASNasa pegilada). La L-ASNasa nativa está en primera línea en los protocolos de tratamiento; sin embargo, es la causante del 30% a 70% de las reacciones de hipersensibilidad (4). La L-ASNasa de *Erwinia* es un medicamento de reserva para pacientes que desarrollan hipersensibilidad a la L-ASNasa nativa. La L-ASNasa pegilada disminuye los problemas de hipersensibilidad, pero varios investigadores concluyeron que aún siguen siendo significativas. Aunque se haya aumentado el éxito de recuperación con las dos últimas

presentaciones de L-ASNasa, el costo de tratamiento es elevado, lo que hace poco accesible a estos medicamentos en países en vías de desarrollo como el nuestro.

En nuestro entorno, EsSalud cuenta con L-asparaginasa de *E. coli* nativa en su petitorio, por lo que ésta enzima es la piedra angular en los protocolos de tratamiento de LLA, a esto se acompaña con algún esteroide inmunosupresor para disminuir el riesgo inmunogénico, aun así, las reacciones de hipersensibilidad están presentes en más del 30% de los pacientes sometidos al tratamiento. Además, puede enmascarar la presencia de hipersensibilidad subclínica, estado donde se produce anticuerpos para inactivar a la L-ASNasa sin evidenciarse los síntomas de hipersensibilidad. Lo que ocasiona retraso del inicio y/o continuidad del tratamiento.

Otro problema relacionado con la L-ASNasa es su actividad secundaria L-glutaminasa, la hidrólisis de L-glutamina genera la reducción de la síntesis de varias proteínas importantes como la albúmina, la insulina, el fibrinógeno y la proteína C, lo cual genera toxicidad de los órganos como hígado, páncreas, cerebro y alteraciones en el sistema circulatorio (5)(6).

La mayoría de estos efectos secundarios descritos arriba se le han atribuido a la elevada actividad de glutaminasa de L-ASNasa. Las ASNasas de *E. coli* nativa y *E. chrysanthemi* hidrolizan la L-glutamina hasta en un 9% de la actividad de hidrólisis total (7). Aunque la actividad L-glutaminasa de la L-ASNasa sea necesaria para la actividad frente a las células tumorales, se recomienda que sea menos del 3%. Además, otra característica importante es que tenga bajo valor de la constante de michaelis menten ( $K_m$ ).

En este aspecto existe una tendencia global en la búsqueda de microorganismos productores de L-ASNasa con igual o mejores características de L-glutaminasa y/o  $K_m$ , que las reportadas como alternativa para el tratamiento de la LLA, principalmente. Por ello, el objetivo de este

trabajo principalmente se basa en la caracterización de una L-ASNasa de *Enterobacter sp.* M55 halotolerante aislado de las salinas de Maras de Cusco.

## **1.2 Formulación del problema**

¿Las características bioquímicas de actividad L-glutaminasa y Km de la L-ASNasa purificada de *Enterobacter sp.* M55 halotolerante serán mejores o iguales que las estudiadas hasta la actualidad?

## **1.3 Justificación de la investigación**

Perú presenta nichos ecológicos que contienen microorganismos muy diversos con alto potencial prospectivo en las industrias alimentaria, farmacéutica, médica, cosmética, química, entre otras. Tal es el caso de las salineras, ambientes hostiles para diversos organismos, los cuales han creado estrategias para enfrentar las altas concentraciones de sales.

En el mercado, la L-ASNasa de primera línea y más usada es la de *Escherichia coli*, por su bajo costo, principalmente; pero las reacciones adversas como la hipersensibilidad, hepatotoxicidad, pancreatitis y leucopenia, son las principales causas del fracaso en la terapia. Por otro lado, las enzimas provenientes de la *Erwinia chrysanthemi* y la pegilada resultan ser costosas para países como el nuestro. Razones por el que se requieren la búsqueda de nuevas fuentes de L-ASNasa con menor Km, baja actividad L-glutaminasa y a menor costo.

Por otro lado, el Informe del Programa Nacional de Toxicología sobre Carcinógenos considera a la acrilamida como un potencial carcinógeno humano (8). Recientemente en los países desarrollados se están preocupando por los niveles altos en los alimentos. Tal es así; la unión europea, a través de la comisión; industria alimentaria y las autoridades nacionales elaboraron recomendaciones para reducir la formación de acrilamida en alimentos de origen

amiláceo que son procesados a altas temperaturas (ejemplo: galletas, pan, cereales, papas fritas y alimentos para bebés). En estas recomendaciones, sugieren que los alimentos sean pre-tratados con L-ASNasa antes que pasen el proceso térmico. (9)

Por estos motivos, se caracterizó una L-ASNasa de *Enterobacter sp.M55* halotolerante aislado de un ambiente de alta concentración salina. Se evaluó su afinidad por su sustrato, factor relacionado con los efectos adversos en el tratamiento de la LLA; estabilidad a factores hostiles como temperatura, pH, metales, etc.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo general**

Purificar y caracterizar parcialmente la L-asparaginasa de *Enterobacter sp.M55* halotolerante aislado de las salinas de Maras

### **1.4.2 Objetivos específicos**

- Purificar L-asparaginasa a partir de un cultivo de *Enterobacter sp. M55* halotolerante
- Determinar los parámetros cinéticos de L-asparaginasa aislada de *Enterobacter sp. M55* halotolerante.
- Determinar el efecto de iones y compuestos séricos sobre la velocidad de reacción de L-asparaginasa aislada de *Enterobacter sp. M55* halotolerante

## CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Antecedentes

Roy y col. (2019), caracterizaron una L-asparaginasa extracelular de *Bacillus megaterium* MG1 purificada 31,52 veces con actividad específica de 215 U mg<sup>-1</sup> y un rendimiento de 29%. Además, ellos determinaron que la enzima es un homotetrámero de 185 kDa en su estado nativo y 47 kDa en SDS-PAGE. Los parámetros cinéticos de Km y Vmax fueron 2,0 x 10<sup>-4</sup> M y 1,198 mM s<sup>-1</sup>, respectivamente, asimismo, la actividad enzimática óptima fue a 37 °C y pH 8,5. Por otro lado, determinaron que los iones Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup> disminuyen la actividad mientras que el Na<sup>+</sup> y el K<sup>+</sup> aumentan. Adicionalmente, la enzima presento buena estabilidad y actividad en solventes orgánicos y agentes reductores (10).

El-Naggar y col. (2018), caracterizaron una L-asparaginasa de *Streptomyces brollosae* NEAE-115 purificada 7,83 veces con actividad específica de 76,671 U/mg y un rendimiento de 7,25 %. La enzima peso 67 kDa y mostró una actividad máxima a pH 8,5 y 37 °C. Los parámetros cinéticos de Km y Vmax fueron 2,139 × 10<sup>-3</sup> M y 152,6 UmL<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>. El tiempo de vida media fue de 65,02 min a 50 °C, mientras que a 60 °C fue de 62,65 min (11).

Husain y col. (2016a), caracterizaron L-asparaginasa extracelular, de *Enterobacter cloacae*, por lo cual purificaron hasta obtener 105,07 UI/mg que corresponde 119,39 veces de purificación con sephadex G-100 con un rendimiento de 33%. Esta enzima es homodimérica, 106 kDa, el monómero peso aproximadamente 52 kDa y pI 4,5 con actividad óptima a pH entre 7,0 y 8,0 y entre 35 a 40 °C. Los parámetros cinéticos de esta enzima fueron K<sub>m</sub>, V<sub>max</sub> y K<sub>cat</sub> de 1,58×10<sup>-3</sup> M, 2,22 IU μg<sup>-1</sup> y 5,3 × 10<sup>4</sup> s<sup>-1</sup>, respectivamente. A la vez, indican que la actividad L-asparaginasa fue incrementada con Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, mientras que con Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> Cd<sup>2+</sup>,

$\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  disminuyó. Finalmente, determinaron alta especificidad por L-asparagina y ninguna actividad por L-glutamina (12).

Husain y col. (2016b), caracterizaron una L-asparaginasa libre de actividad L-glutaminasa de *Pseudomonas otitidis*. La enzima purificada peso aproximadamente  $205 \pm 3$  kDa en PAGE-nativa y  $34 \pm 1$  kDa en SDS-PAGE, revelando que la enzima es homohexámero, el punto isoeléctrico fue 5,5. Además, las condiciones óptimas de reacción fueron  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  y pH 7,5. Asimismo,  $\text{Na}^{+}$  y  $\text{K}^{+}$  y los agentes reductores (2-mercaptoetanol y glutatión) incrementaron la actividad; mientras que  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ ; y el agente bloqueante del grupo tiol (yodoacetamida) inhibieron la actividad enzimática. Con respecto al tiempo de vida media *in vitro* es mayor que la L-asparaginasa comercial proveniente de *Escherichia coli* (13)

Jimat y col. (2017), purificaron L-asparaginasa de *Bacillus sp.* por 2,21 veces con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico y exclusión por tamaño; y determinaron 50,07% de rendimiento usando sulfato de amonio. La enzima pura presento actividad específica de 10,11 U/mg y pesó 65 kDa en su estado nativo, asimismo se determinó que la enzima es un dímero (14).

Rahimzadeh y col. (2016), purificaron y caracterizaron dos L-asparaginasas intracelulares aisladas de *Bacillus* PG-03 y *Bacillus* PG-04. Las L-ASNasas fueron purificados por DEAE-Sepharose, los resultados de la SDS-PAGE fueron 25 kDa y 30 kDa;  $K_m$  23,8 mM y 3,3 mM; presentaron actividad en un rango de pH entre 3,0 y 9,0 con actividad máxima a pH 6,0 y 7,0; máxima actividad a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; tiempo de vida media de 69,3 min y 34,6 min a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Además, las ASNasa fueron estables en un amplio rango de pH y temperatura (15).

Dash y col. (2016), purificaron y caracterizaron una L-asparaginasa de *Actinomycetales BkSoiiA*. La enzima fue purificada 95,06 veces y mostró una actividad específica de 204,37 U/mg con un rendimiento del 3,49%. Por SDS-PAGE se determinó 57 kDa. Los parámetros cinéticos de  $K_m$  y  $V_{max}$  fueron  $0,91 \times 10^{-6}$  M y 15,6 U/ml, respectivamente. La enzima purificada mostró máxima actividad a un pH de 10,0 y fue estable a pH entre 7,0 y 9,0. La enzima fue inhibida por varios iones divalentes (16)

Mahajan y col. (2014), caracterizaron la ASNasa extracelular del *Bacillus licheniformis* RAM-8. Para ello, el extracto crudo extracelular fue purificado por ultrafiltración, precipitación con acetona, columna DEAE y finalmente por sephadex G-150. El nivel de purificación fue hasta 30 veces, utilizando sephadex G-150. Las características de L-ASNasa fueron: 134,8 kDa;  $K_m$  0,014 mM;  $V_{max}$  4,03 IU/ $\mu$ g; actividad óptima a pH 9,0 y 60 °C. Los activadores de la enzima fueron  $Na^+$  y  $Co^{2+}$  e inhibidores Ca, Mn, Zn, Ni, Cu, Cd, Hg, EDTA, EGTA, urea, ácido bromoacético, PCMB, 2-mercaptoetanol, ditiotreitól, lactato, piruvato y oxalato. Además, determinaron alta especificidad a L-asparagina, baja actividad a D-asparagina y mínima actividad a L-glutamina (17).

Makky y col. (2014), caracterizaron la ASNasa de *Streptobacillus* sp. KK2S4, ellos produjeron ASNasa con lactosa 0,2% (p/v), nitrato de sodio 0,1% (p/v), polvo de mazorca de maíz pretratado 6% (p/v), suspensión bacteriana 4% (v/v) en 50 ml de medio MM9 a pH 5,0 y 40 ° C. La actividad específica fue 21,77 IU/mg con una purificación de 39,58 veces y un rendimiento de 39%. El SDS-PAGE mostró una banda única de 11,2 kDa. Además, la actividad óptima de la enzima purificada fue a pH 8,5 y 35 °C (18).

Gholamian y col. (2013), investigaron los efectos de la temperatura y el pH tanto en el crecimiento bacteriano como en la actividad enzimática de *Bacillus* sp GH5, y mostraron que el

crecimiento máximo se produjo a 37 °C y pH 7,0. Además, se observó una actividad máxima de L-ASNasa a 37 °C y pH 8,5 (19).

Singh y col. (2013), caracterizaron una L-asparaginasa extracelular de *Bacillus aryabhatai* ITBHU02. La enzima fue purificada 68,9 veces con una actividad específica de 680,47 U mg<sup>-1</sup>. La enzima fue homotetramérica con 155 kDa y el monómero de 38,8 kDa. La actividad enzimática óptima fue a pH de 8,5 y 40 °C. Los parámetros cinéticos de Km, Vmax y Kcat fueron 0,257 mM, 1,537 U μg<sup>-1</sup> y 993,93 s<sup>-1</sup>, respectivamente. Asimismo, se determinó alta especificidad a L-asparagina y baja por L-glutamina. La actividad fue incrementada por K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup>, mientras que los cationes divalentes la disminuyeron. La enzima presentó aproximadamente el 74% de hélices α y el 12% de láminas β. (20)

Kumar y col. (2013) caracterizaron una L-asparaginasa de *Cladosporium* sp. esta enzima fue purificada 867,7 veces con una actividad específica de 83,3 UI/mg. La enzima fue un trímero de 121 kDa (homodímeros de 37 kDa y un monómero de 47 kDa). Los óptimos de temperatura y pH fueron 30 °C y 6,3; con parámetros cinéticos de Vmax de 4,44 μmol/mL / min y Km de 0,1 M. La actividad enzimática fue inhibida por β-mercaptometanol, mientras que Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Zn<sup>2+</sup> disminuyeron la actividad enzimática, por el contrario, Fe<sup>3+</sup>, Pb<sup>2+</sup> y KI estimularon la activaron (21).

Kumar y col. (2011), purificaron y caracterizaron una L-asparaginasa sin actividad L-glutaminasa intracelular de *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428. La enzima fue homotetramérica con 144,4 kDa y un punto isoeléctrico de aproximadamente 8,4. Además, los parámetros cinéticos tales como Km, Vmax y kcat de L-asparaginasa fueron 0,657 mM, 4,45 U μg<sup>-1</sup> y 2,751 × 10<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>, respectivamente. El pH óptimo estuvo en el rango entre 8,0 a 10,0, y la temperatura óptima fue 40 °C (22)



Esta enzima fue activada por Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, L-cistina, L-histidina, glutatión y 2-mercaptoetanol; mientras que es moderadamente inhibida por cationes divalentes y reactivos del grupo tiol.

## **2.2 Bases teóricas**

### **2.2.1 L-asparaginasa**

#### **a) Características estructurales de L-asparaginasa**

La ASNasa II de *E. coli* es una enzima prototipo, en su estado activo es homotetramérica, pertenece a la clase de proteínas  $\alpha/\beta$ . Cada subunidad está conformada por 326 residuos de aminoácidos y cada uno presenta dos dominios. El primer dominio conformado por 201 aa y el segundo por 125 aa. El sitio activo está conformado por dos residuos de treonina, un aspartato y una lisina. Los dos residuos de treonina son necesarios para la actividad, pero solo una de ellas reacciona con la asparagina (12).

#### **b) Mecanismo de acción de la L-asparaginasa**

L-asparaginasa (EC 3.5.1.1) es una amidohidrolasa, que hidroliza la L-asparagina en amonio y ácido aspártico. El mecanismo de acción consiste en el ataque nucleofílico del grupo  $\beta$ -amida de la asparagina. Si bien existen varias posibilidades para la identidad del residuo nucleofílico, el oxidrilo de la cadena lateral de la treonina-89 es el más probable (12)

#### **c) Fuentes de microorganismos, características fisicoquímicas y cinéticas de la L-asparaginasa**

Existen muchas fuentes de L-ASNasa, pero solo de *E. coli* y *E. chrysanthemi* son comercializadas. Además de estas, existen numerosos reportes de cepas de *Bacillus sp* productoras de L-ASNasa cuyas principales características de presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Características fisicoquímicas y cinéticas de L-ASNasas

Bacteria	Actividad específica de L-asparaginasa	Grado de purificación	Enzima nativa	Peso molecular (kDa)	K <sub>M</sub> (mM)	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)	Activador/ inhibidor	Extracelular/ intracelular	Fuente
<i>Bacillus sp.</i>	SUPEROSA: 10.11 U/mg	2.21	Dimérica	65 (M)	-	-	-		Extracelular	(Jimat y col., 2017)
<i>Bacillus licheniformis</i> <i>RAM-8</i>	Extracto: 23 UI/mg ultrafiltración: 30 UI/mg acetona: 42 UI/mg DEAE: 419 UI/mg Sephadex G-150): 697,09 UI/mg	30.17	Tetramérica	134,8 (T)	0,014	9	60	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> y Mg <sup>++</sup> / PMSF (80%)/ EDTA, úrea, ácido bromoacético, 2-mercaptoetanol, lactato, piruvato.	Extracelular	(Mahajan y col., 2014)
<i>Bacillus PG-03 y Bacillus PG-04</i>	-	-	Tetramérica	25 (M) y 30 (M)	23.8 3.3	6 y 7	37 y 40	-	Intracelular	(Rahimzadeh y col., 2016)
<i>Bacillus sp GH5</i>	1835 UI/mg (CM-sephadex C50)	128.3				8.5	37	-	Extracelular	(Gholamian y col., 2013)
<i>Streptobacillus sp. KK2S4</i>	Extrac. crudo: 0.55 UI/mg sulfato: 0.95 UI/mg DEAE: 2.75 UI/mg Sephadex G-50: 21.77 U/mg	39.58	Tetramérica	11.2 (M)	-	8.5	35	Ca <sup>++</sup> /EDTA	extracelular	(Makky col., 2014)
<i>Bacillus sp. DKMBT10</i>	-	-	Tetramérica	45 (M)	-	7	37	Mg <sup>++</sup> /EDTA	extracelular	(15)

## **2.2.2 Métodos de purificación enzimática**

### **a) Clasificación de métodos de purificación según la naturaleza de las proteínas.**

#### **Purificación por solubilidad**

La solubilidad de las enzimas depende de concentración de sales, polaridad del solvente, pH del medio y temperatura. En el método de purificación por solubilidad, el uso de las sales es el más común para la purificación, debido a que aumenta la fuerza iónica del medio y disminuye la solubilidad de las proteínas, fenómeno conocido como *salting out*. La sal retira el agua de hidratación de la proteína; por tanto, estas tienden a agregarse y precipitar. Cada proteína precipita a diferentes saturaciones de sales, la más usada es el sulfato de amonio, dado que permite purificar una proteína de interés, proteger su estado nativo y a su vez concentrar (23)(24).

Los solventes orgánicos también son utilizados para concentrar y purificar las proteínas, el fundamento de estos solventes se debe a su baja constante dieléctrica que permite su baja solvatación del medio acuoso hacia las proteínas y por lo tanto estas precipitan. Estos solventes tienden a precipitar las proteínas, por lo que se recomienda trabajar por debajo de 0 °C. La acetona es el solvente más utilizado para este fin. Otro método de purificación es el uso de su punto isoelectrico, como se sabe que las proteínas tienden a precipitar en el pH que corresponde a su punto isoelectrico (23)(24).

#### **Purificación por tamaño o masa**

La diálisis es un método de separación de las enzimas a través de una membrana semipermeable, utilizado principalmente en la desalinización y concentración de proteínas de gran tamaño. La ultrafiltración es otro método de purificación, las membranas de ultrafiltración son generalmente de acetato de celulosa u otros materiales

porosos. Se puede usar para purificar y concentrar con la ayuda de una fuerza externa de vacío o centrífuga para acelerar el proceso. La cromatografía de filtración en gel o cromatografía de exclusión por tamaño se basa en la formación de perlas porosas con tamaños de poros conocidos. En esta columna, las enzimas de menor tamaño son las que tardan en salir de la columna. Las enzimas de gran tamaño se excluyen y no ingresan a los poros y se eluyen más rápido que los pequeños. Este tipo de cromatografía es utilizado para estimar el tamaño de la enzima. Otro factor que afecta a este tipo de cromatografía es la forma de la proteína y la fuerza iónica del eluyente (23) (25)

### **Purificación por polaridad**

Las enzimas presentan carga neta, esta característica es bien aprovechada para la purificación por cromatografía que contienen perlas con grupos funcionales con carga positiva o negativa. Las enzimas cargadas positivamente se unen a las perlas con carga negativa, llamado cromatografía aniónica. La cromatografía catiónica consiste en el uso de columnas cargadas positivamente que captan enzimas de carga negativa. Los principales grupos funcionales en intercambio iónico son Dietilaminoetil (DEAE), aminoetilo cuaternario (QAE) y amonio cuaternario (Q) como intercambiador y carboximetil (CM), sulfopropil (SP) y metilsulfonato (S) como intercambiador. La electroforesis es otro método que emplea un campo eléctrico para separar enzimas en función de la densidad de la carga. Los métodos más utilizados emplean matriz SDS-PAGE. La distancia que migra es inversamente proporcional al logaritmo de su radio molecular, es aproximadamente proporcional al peso molecular. De manera similar sucede, en una matriz con gradiente de pH. La enzima migra, debido al campo eléctrico, hasta encontrarse con pH en el que la enzima la carga neta es cero (punto isoeléctrico) (23) (26)

## **Purificación con base en la afinidad de unión**

Esta técnica es útil para la separación de enzimas por su afinidad con grupos químicos, mientras más específica sea la enzima por el grupo químico, mejor será la separación de esta. Un ejemplo de cromatografía de afinidad de ligando es la cromatografía de afinidad Ni-NTA (níquel - ácido nitrolotriácético - agarosa). Este ligando se une fuertemente a un péptido de seis aminoácidos que consiste solo en histidinas (6His). Otras formas de cromatografía de afinidad incluyen cromatografía de colorante-ligando, cromatografía de inmunoadsorción y cromatografía covalente.

### **b) Clasificación de métodos de purificación de proteínas según la naturaleza de la técnica.**

La obtención de proteínas libres de impurezas es muy importante tanto en la industria alimentaria y farmacéutica, más aún en esta última. La calidad de pureza en la industria farmacéutica determina la calidad del medicamento. También, para caracterizar las proteínas, como determinar su estructura aminoacídica es necesario la alta pureza de las proteínas. Para ello, los métodos cromatográficos son una buena alternativa para la obtención de enzimas con alta pureza; sin embargo, son mucho más costosos, lo cual son utilizados para muestras pequeñas, razón por la cual son difícilmente escalables (27).

### **Métodos cromatográficos**

El botánico Mikhail Tswett, a inicios del ciclo XX introdujo el término cromatografía después de separar pigmentos de plantas en una columna de planta. Desde entonces, la cromatografía evolucionó mucho a tal punto de que esta técnica es la más utilizada para la obtención de muestras de alta calidad de pureza; sin embargo, tiene algunas limitaciones, principalmente el alto costo de la técnica. Esta técnica

consiste en una fase móvil y fase estacionaria (generalmente sólido). La muestra puede adsorberse a la fase móvil o estacionaria, según las condiciones de pH, carga neta, peso molecular, ligandos en la fase estacionaria, punto isoeléctrico de la muestra. Por ello, existen muchas estrategias y técnicas de purificación para obtener buena calidad de proteínas, lo cual generalmente permite usar dos o más técnicas complementaria para tal objetivo (27). A continuación, se describirá las técnicas cromatográficas.

### **Cromatografía de intercambio iónico**

La cromatografía de intercambio iónico es una técnica básica que se fundamenta en la interacción electrostática reversible, muy útil para la separación de compuestos cargados en su superficie como proteínas y péptidos. Donde estas presentes en la fase móvil se unirán electrostáticamente al intercambiador de iones, presente en la fase estacionaria. Estos se competirán con iones de mayor fuerza para eluir las proteínas. Las proteínas con carga similar al del intercambiador serán eliminados por no adherirse a la resina.

Intercambiador aniónico:  $R^+ A^- B^-$

Intercambiador catiónico:  $R^- A^+ B^+$

Dónde: R (intercambiador), A (proteína) y B (ion competidor)

Para que suceda esto, las proteínas deben estar con una carga neta positiva o negativa. Por ello es necesario conocer el punto isoeléctrico ( $pI$ ) de las proteínas para la correcta elección de los intercambiadores.

### **Punto isoeléctrico de proteína**

El punto isoeléctrico ( $pI$ ) se refiere al pH en el que la carga neta una proteína es cero; es decir, el pH donde la suma de las cargas positivas equivale a la suma de cargas

negativas. Los aminoácidos que generalmente brindan las cargas positivas y negativas son cisteína, aspartato, lisinas y las histidinas, y residuos de aspartato y glutamato, respectivamente. Cuando el pH de la solución está por encima del pI de la proteína, esta se carga negativamente debido a que los grupos carboxilos de los aminoácidos se ionizan ( $-\text{COO}^-$ ); y si está por debajo del pI, la proteína se carga positivamente debido a que el grupo amino de los aminoácido acepta hidrógenos ( $-\text{NH}_3^+$ ). La carga neta es la suma de las cargas positivas y negativas, sin importar la distribución de las cargas. Sin embargo, la interacción de la proteína depende de las cargas de su superficie, y no necesariamente de la carga neta diferente a cero. Por ello, una mínima diferencia de pH de la solución a la del punto isoeléctrico no aseguraría una superficie cargada esperada. En este sentido, se recomienda trabajar que la solución sea una unidad más bajo o alto para asegurar la carga de la superficie deseada de la proteína.

### **Selección de intercambiador**

Un intercambiador consta de la unión covalente de una matriz porosa o no porosa y un grupo funcional cargados positiva o negativamente. La matriz debe estar libre de cargas para evitar las interacciones inespecíficas y solo dependa de la porosidad y la carga de los grupos funcionales; las matrices no porosas dependen únicamente de la carga de los grupos funcionales, aumentando la especificidad.

La elección del tipo de técnica depende de la naturaleza y la capacidad de sustitución de los grupos funcionales del ligando. La clasificación depende principalmente de la carga de los ligandos, así encontramos a intercambiadores aniónicos y catiónicos. El ligando de los intercambiadores de aniones puede cargarse positivamente y atraer a las proteínas cargadas negativamente. Por el contrario, los intercambiadores de cationes se pueden cargar negativamente y atraer a las proteínas cargadas positivamente. También

pueden clasificarse en intercambiadores fuertes y débiles, esto depende de la ionización de los ligandos, los que tienen alto coeficiente de ionización están completamente ionizados en un amplio rango de pH, por lo que se puede trabajar muy bien en un amplio rango de pH y no se ve afectado la carga. Por el contrario, el pH puede ser un factor de la carga del ligando débil. En la tabla 2 se muestra algunos intercambiadores.

Tabla 2. Intercambiadores iónicos comunes

<b>Intercambiador</b>	<b>Ligando</b>	<b>Grupo cargado</b>
<b>Catión fuerte</b>	Sulfopropilo (SP)	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$
<b>Catión fuerte</b>	Metil sulfonato (S)	$-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$
<b>Catión débil</b>	Carboximetilo (CM)	$-\text{O}-\text{CH}_2\text{COO}^-$
<b>Anión fuerte</b>	Amonio cuaternario (Q)	$-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
<b>Anión débil</b>	Dietilaminoetilo (DEAE)	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{H}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$
<b>Anión débil</b>	Dietilaminopropilo (ANX)	$-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{H}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$

### **Fase móvil**

La fase móvil se compone por una solución tampón de pH e iones de sal neutra. La carga del intercambiador debe ser el mismo de los iones del amortiguador para evitar la unión electrostática entre estos y dejar libre para que el primero se una a las proteínas cargadas.



Tabla 3. Tampones no volátiles para intercambio aniónico

Intervalo de pH	Sustancia	Concentración (mM)	Contraión	pKa (25 °C)
4,3 – 5,3	N-metilpiperazina	20	Cl <sup>-</sup>	4,75
4,8 – 5,8	Piperazina	20	Cl <sup>-</sup> o HCOO <sup>-</sup>	5,33
5,5 – 6,5	L-histidina	20	Cl <sup>-</sup>	6,04
6,0 – 7,0	Bis-Tris	20	Cl <sup>-</sup>	6,48
6,2-7,2; 8,6-9,6	Bis-Tris propano	20	Cl <sup>-</sup>	6,65; 9,10
7,6 – 8,6	Tris	20	Cl <sup>-</sup>	8,07
8,4 – 9,4	Dietanolamina	20 a pH 8.4 50 a pH 8.8	Cl <sup>-</sup>	8,88
9,0 – 10,0	Etanolamina	20	Cl <sup>-</sup>	9,50
9,2 – 10,2	Piperazina	20	Cl <sup>-</sup>	9,73
10,6 – 11,6	Piperidina	20	Cl <sup>-</sup>	11,12

Tabla 4. Tampones no volátiles para intercambio catiónico

Intervalo de pH	Sustancia	Concentración (mM)	Contraión	pKa (25 °C)
1,4 – 2,4	Ácido maleico	20	Na <sup>+</sup>	1,92
2,6 – 3,6	Ácido cítrico	20	Na <sup>+</sup>	3,13
3,3 – 4,3	Ácido láctico	50	Na <sup>+</sup>	3,86
3,3 – 4,3	Ácido fórmico	50	Na <sup>+</sup> o Li <sup>+</sup>	3,75
3,7 – 4,7; 5,1 – 6,1	Ácido succínico	50	Na <sup>+</sup>	4,21; 5,64
4,3 – 5,3	Ácido acético	50	Na <sup>+</sup> o Li <sup>+</sup>	4,75
5,6 – 6,6	MES*	50	Na <sup>+</sup> o Li <sup>+</sup>	6,27
6,7 – 7,7	Fosfato	50	Na <sup>+</sup>	7,2
7,0 – 8,0	HEPES*	50	Na <sup>+</sup> o Li <sup>+</sup>	7,56
7,8 -8,8	BICINE*	50	Na <sup>+</sup>	8,33

\*MES: (Ácido 2-morfolin -4-ilenosulfónico), HEPES: ácido hidroxietil piperazinaetanosulfónico, BICINE: N,N-Bis(2-hidroxietil)glicina.

La unión de las proteínas al intercambiador debe darse en condiciones de baja fuerza iónica, y eluidas con alta fuerza iónica. Generalmente, el aumento de la fuerza iónica es adicionando cloruro de sodio (NaCl) al sistema tampón.

### **Cromatografía de exclusión por tamaño**

La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC; Size-Exclusion Chromatography) o cromatografía en gel separa las proteínas en función al tamaño de estas. Las resinas utilizadas presentan diferentes porosidades, estas generan un recorrido largo y sinuoso para las que pueden ingresar, excluyendo a las proteínas muy grandes. Por lo tanto, debido a que el recorrido de las proteínas pequeñas es mayor, el tiempo de salida de la columna también es mayor a diferencia de las proteínas grandes que salen más rápido (ver figura 1)

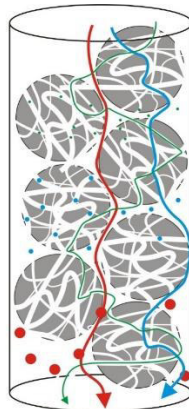


Figura 1. Cromatografía de exclusión por tamaño

### **Fase estacionaria**

La fase estacionaria está formada por la resina, donde juega un papel importante en la calidad de resolución de separación, donde el volumen, tamaño de partícula y distribución de tamaño de poro juegan un papel importante.

La matriz está formada por un conjunto de perlas, estas son polímeros en forma de redes o poros en la superficie e interior de la perla. Estos poros funcionan como canales para el recorrido de aquellas proteínas que pueden ingresar. El grado de reticulación determina la distribución y tamaño de los poros.

La distribución de los poros determina la selectividad de la matriz y puede explicarse con la curva de selectividad (figura 2).

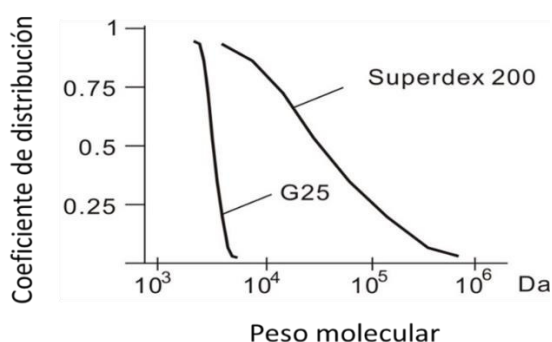


Figura 2. Curvas de selectividad de los medios Superdex 200 y G25

En la figura 2 se puede observar que el superdex 200 de la compañía General Electric presenta un rango de selectividad lineal de  $1 \times 10^4$  a  $6 \times 10^5$ , fuera de este rango no es posible la separación diferencial. Las moléculas más grandes que el límite superior presentan un coeficiente de distribución de cero, debido a que no existen poros que permite la separación. Por otro lado, las moléculas menores al límite inferior presentan un coeficiente de uno, estas ingresan a todos los poros sin diferenciarse y no existe la separación diferencial.

La columna con G25 es utilizado para la separación de moléculas pequeñas como los péptidos o desalinización de muestras, debido a que presentan una selectividad estrecha y presentan una mejor resolución de moléculas pequeñas.

## Fase móvil

La fase móvil generalmente es un sistema tampón, la variedad es amplia debido a que las resinas son compatibles con varios compuestos. La resolución de la separación puede ser al volumen de muestra cargada, tamaño de la columna, viscosidad del sistema tampón y flujo de la fase móvil. Generalmente se recomienda agregar NaCl 0,15M para evitar las interacciones inespecíficas.

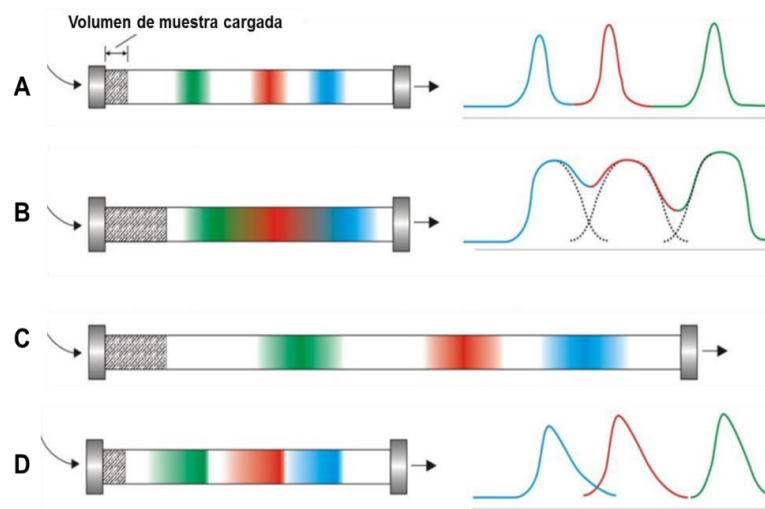


Figura 3. Factores en la resolución de SEC

A, típica cromatografía de SEC; B, Volumen de muestra, un aumento en el volumen de muestra también aumenta el ancho de salida de la muestra; C, Tamaño de la columna, al incrementar el tamaño de la columna, las proteínas realizan un mayor recorrido y logran separarse; D, viscosidad y flujo del eluyente, el incremento de la viscosidad y flujo, disminuye la resolución debido a la influencia en la transferencia de masas entre la fase estacionaria y la fase móvil mostrándose en picos con colas.

### 2.2.3 Caracterización enzimática

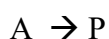
#### 2.2.3.1 Cinética enzimática

Las enzimas son las encargadas de acelerar reacciones (catalizadores positivos). La cinética enzimática se ocupa en medir y describir matemáticamente la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas (28).

## Tipo de reacción y orden de reacción

### Reacción irreversible de primer orden

Es la reacción más simple y poco común que existe. Consiste en la conversión de una sustancia (A) en un producto (P).



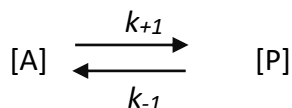
La flecha hacia la derecha significa que la sustancia A es mínima e indetectable, y se encuentra en equilibrio hacia la derecha. Además, la reacción hacia la izquierda (reacción inversa) no sucede.

La velocidad de reacción ( $v$ ) se puede calcular en términos de aparición de producto (P) dependiente del tiempo ( $t$ ), o en términos de consumo de la sustancia A, dependiente del tiempo.

$$v = \frac{\delta[P]}{\delta t} = -\frac{\delta[A]}{\delta t} = k_1[A]$$

### Reacción reversible de primer orden

Es la reacción simple y muy común que existe. El equilibrio de esta reacción no está muy lejos del producto (P) o sustancia (A).



La ecuación de esta reacción es la siguiente:

$$v = -\frac{\delta[A]}{\delta t} = k_1[A] - k_{-1}[P]$$

Donde,

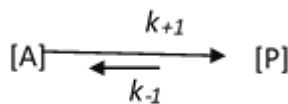
$k_{+1}$ : constante de velocidad de reacción directa de primer orden.

$k_{-1}$ : constante de velocidad de reacción indirecta de primer orden.

Alcanzará el equilibrio cuando las velocidades de reacción directa e indirecta sean iguales; por lo tanto, la velocidad general de reacción sea cero.

La constante de equilibrio ( $K_{eq}$ ) es la división de las constantes de reacciones directa e inversa. Para que la reacción vaya en la dirección del producto, la constante de equilibrio debe ser grande (ecuación 1).

$$K_{eq} = \frac{k_{+1}}{k_{-1}}$$

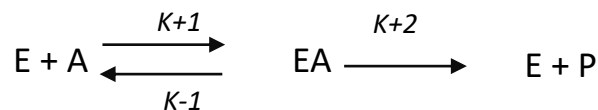


..... ecuación 1

### La ecuación de Michaelis-Menten (28)(29)

Esta ecuación describe la velocidad de reacción de muchas reacciones enzimáticas, cuando la concentración de enzima es mucho menos que el de sustrato y el complejo enzima-sustrato (ES) es constante.

Los dos pasos de conversión de la sustancia A en producto (P) son la unión del sustrato A con la enzima y el segundo paso es el paso catalítico.



E, enzima; A, sustrato; EA: complejo enzima-sustrato,  $k_{+2}$ : constante de disociación o constante catalítico ( $k_{cat}$ ). Esta constante se asume que es muy bajo comparado a las otras constantes ( $k_{+1}$ ,  $k_{-1}$ ).

Donde, la formación de producto se puede determinar mediante la constante de disociación y la concentración del complejo enzima sustrato ([EA])

$$v = k_{cat}[EA], k_{+2}=k_{cat}$$

La constante de Michaelis-Menten (Km) se puede determinar según la ecuación

$$K_m = \frac{[E] \cdot [A]}{[EA]}$$

[E]: concentración de enzima, [A]: concentración de sustrato, [EA]: concentración del complejo enzima-sustrato.

La velocidad máxima se determina según la ecuación

$$V_{max} = k_{cat} [E_t]$$

Donde:

V<sub>máx</sub>: velocidad máxima, E<sub>t</sub>: enzima total

Y la ecuación de Micaelis-Menten es:

$$v = \frac{V_{max}[A]}{K_m + [A]}$$

## Parámetros de la ecuación de Michaelis-Menten (28)

### $K_m$ (mol.L<sup>-1</sup>)

Este parámetro la fuerza con el que se une la enzima con su sustrato. Según la teoría de Michaelis Menten,  $k_{cat}$  es un valor insignificante en comparación de  $k_{-1}$ . Por lo tanto,  $K_m$  está en función de  $k_{-1}$  y  $k_{+1}$ .

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_{+1}} = \frac{k_{-1}}{k_{+1}}$$

$K_m$  baja indica mayor afinidad hacia su sustrato, por lo que  $k_{+1}$  mayor que  $k_{-1}$ . Por el contrario,  $K_m$  indica la débil afinidad de la enzima por el sustrato, debido a que  $k_{+1}$  es menor a  $k_{-1}$ .

$K_m$  se considera constante cuando el pH, temperatura y estado redox son estables. También, el valor de  $K_m$  corresponde a la concentración de sustrato donde la velocidad es la mitad de la velocidad máxima ( $V_{max}$ ), según la ecuación no lineal de Michaelis Menten.

### $k_{cat}$ (s<sup>-1</sup>)

El  $k_{cat}$ , es la constante catalítica o velocidad de la conversión del sustrato en producto, en condiciones de saturación de sustrato por unidad de tiempo y enzima. A mayor valor, mayor es los eventos catalíticos.



## CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

### 3.1 *Enterobacter sp. M55*

Bacilo Gram negativo, aislado de las salinas de Maras - Cusco, pertenece al cepario del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Esta bacteria fue reactivada en medio Luria Bertani (LB) a 37 °C por 24 h y conservada por criopreservación a -20 °C.

### 3.2 Producción de L-asparaginasa

*Enterobacter sp. M55* se cultivó en 2 mL de medio LB a 37 °C por 24 h. Luego, este cultivo se usó como inóculo al 10 % (v/v) para la producción de L-asparaginasa en medio Czapek Dox modificado (30) conteniendo en g/L: glucosa 10; extracto de levadura 10; asparagina 1; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6; NaCl 0,5; CaCl<sub>2</sub> 0,012 y MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,12 a pH 7,0. Después, la mezcla se incubó a 200 rpm, 37 °C durante 24 h. Posteriormente, las células se cosecharon por centrifugación a 5000 rpm a 4 °C por 10 min. En seguida, las células se resuspendieron en NaCl 0,85% y centrifugaron a 5000 rpm a 4 °C por 10 min (esta actividad se realizó dos veces). Finalmente, estas células se resuspendieron a una densidad óptica de 50 D.O (a 600 nm) en el tampón de lisis Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0 a 4 °C.

### 3.3 Purificación de L-asparaginasa de *Enterobacter sp. M55*

#### 3.3.1 Lisis celular por sonicación

Las células se rompieron por ultra-sonicación utilizando las sondas Branson modelo 250 y 450 (Branson Ultrasonics Sonifier™, Dunbury, CT, USA). El nivel de la punta de la sonda estuvo en la mitad del volumen de la muestra. Asimismo, el recipiente que con la muestra se mantuvo a -10 °C para evitar el sobrecalentamiento. Los parámetros de sonicación fueron: tiempo total 2,5 con pulsaciones de 5 s e intervalos de 30 s de

reposo, y 30% de amplitud. Al final, se centrifugó a  $15000 \times g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 40 min. El sobrenadante recuperado fue denominado extracto crudo enzimático inicial, al cual se determinó las actividades L-asparaginasa y proteasa; y proteínas totales.

### **3.3.2 Determinación del pH en la purificación de intercambio aniónico (DEAE-sepharose)**

Se evaluó la influencia del pH del buffer tris-HCl de equilibrio en la ligación de la L-ASNasa y proteasas. Para ello el extracto crudo se ajustó el pH a 7,5; 8,0; 8,5 y 9,0. Cada muestra se eluyó en la resina DEAE-sepharose (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), previamente equilibrada con cinco volúmenes de columna (VC) usando tampón Tris HCl 20 mM a pH 7,5; 8,0; 8,5 o 9,0, según el pH de la muestra. Las fracciones no ligadas luego de eluir la muestra se analizaron las actividades L-ASNasa y proteasa.

### **3.3.3 Purificación por cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-sepharose)**

El extracto crudo enzimático inicial a pH 6,5 se añadió a una columna de agarosa dietilaminoetil (DEAE-sepharose) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) previamente equilibrada con cinco volúmenes de columna (VC) usando tampón Tris HCl 20 mM a pH 6,5. Las proteínas ligadas inespecíficamente fueron eluidas (desligadas) usando NaCl, 20 mM en 3 VC de NaCl disuelto en el mismo tampón de equilibrio. Después, las proteínas ligadas específicamente se eluyeron a flujo constante con un gradiente isocrático 0,2 mL/min de alta concentración de cloruro de sodio (desde 100 a 500 mM) disuelto en tampón Tris HCl 20 mM a pH 6,5. En seguida, se determinaron las actividades L-ASNasa y proteasa; y las proteínas totales en las fracciones colectadas. En seguida, las fracciones que presentaron una mayor actividad L-ASNasa se concentraron hasta 1,0 mL por ultrafiltración a 10 kDa (Amicon, Millipore, USA) para pasar a la siguiente fase de purificación.

### **3.3.4 Purificación por cromatografía de exclusión por tamaño**

Con el fin de aumentar el grado de pureza, en términos de actividad enzimática por mg de proteínas totales. Así, 1 mL de la muestra concentrada en la fase de purificación aniónica se separó por cromatografía de exclusión por tamaños usando una columna de agarosa superdex 200 10/300, equilibrada y eludida con tampón Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM (pH 6,5) a un flujo de 0,5 mL/min. Después, en las fracciones colectadas de 1 mL se determinó la actividad L-ASNasa y proteínas totales. Las dos fracciones colectadas con mayor actividad L-ASNasa se juntaron para determinar L-ASNasa, proteínas totales y SDS-PAGE.

## **3.4 Caracterización de L-asparaginasa de *Enterobacter sp. M55***

### **3.4.1 Actividad L-ASNasa por método del ácido L-aspartil- $\beta$ -hidroxámico**

Consiste en la cuantificación del aspartil- $\beta$ -hidroxamato férrico producido por la reacción efectuada por L-ASNasa en presencia de hidroxilamina (31). La mezcla de reacción contenía: 700  $\mu$ L de tampón Tris HCl 50 mM (pH 8,6), 100  $\mu$ L de L-asparagina 100 mM, 100  $\mu$ L de hidroxilamina 1 M (pH 7,0) y 100  $\mu$ L de muestra. La mezcla se incubo a 37 °C durante 30 min, después se agregaron 250  $\mu$ L de la solución de cloruro férrico, ATC y HCl a las concentraciones de 0,62 M; 0,306 M y 0,33 M respectivamente; después se centrifugó a 5 000 rpm por 5 min. A 1 mL del sobrenadante se midió la absorbancia a 500 nm en un espectrofotómetro (modelo Genesys 10UV, marca THERMO). La cantidad de aspartil-  $\beta$ -hidroxamato férrico fue determinada con la curva estándar preparada a partir de una solución de aspartil- $\beta$ -hidroxamato. La actividad L-ASNasa fue expresada en UI/mL. Una unidad internacional (UI) de L-ASNasa fue definida como la cantidad de enzima que libera 1 mol de aspartil- $\beta$ -hidroxamato por min a 37 °C.

### **3.4.2 Actividad L-ASNasa por método de Nessler**

Este método fue descrito por Shifrin (32), y se adaptó en este trabajo. La mezcla de 1000  $\mu\text{L}$  de buffer Tris-HCl 50 Mm, pH 7,0, 100  $\mu\text{L}$  de L-asparagina 189 mM y 900  $\mu\text{L}$  agua Milli-Q fue incubado a 37°C, durante 5 min, luego se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de muestra e incubó a 37°C, durante 30 min. Después, se añadió 100  $\mu\text{L}$  de TCA, para detener la reacción. Luego se centrifugó a 5000 rpm por 2 min para clarificar, a 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de agua Milli-Q en una placa de lectura. Finalmente, agregar 50  $\mu\text{L}$  de reactivo Nessler y dejar por 1 min antes de la lectura a 436 nm en un lector de placas (Infinite M200PRO, Brand TECAN). Se usó solución de sulfato de amonio para la preparación de la curva estándar. Una unidad internacional (UI) de actividad de L-asparaginasa (según especificaciones) fue definida como la cantidad de enzima requerida para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de amonio por ml por min a pH de 7,0 y 37 °C.

### **3.4.3 Perfil de homogeneidad de la L-asparaginasa por electroforesis**

La homogeneidad de las muestras del extracto inicial, después de las etapas de purificación se determinó mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras, descritas por Laemmli (33), el gel de separación y apilamiento al 12% (pH 8,8) y al 5% (pH 6,8), respectivamente. El tampón de electroforesis Tris-glicina (pH 8,5) y el tampón de carga Tris-HCl 60 mM pH 6,8, glicerol 25%, SDS 2%, 2-mercaptoetanol 14,4 Mm, Azul de bromofenol 0,1%. Las proteínas fueron reveladas con azul brillante de Coomassie R-250.

### **3.4.4 Ensayo cuantitativo de la actividad proteolítica**

Se empleó el método descrito por Cólho y col., usando azocaseína como sustrato (34). El extracto crudo enzimático (100  $\mu\text{L}$ ) fue mezclado con 100  $\mu\text{L}$  de azocaseína 0,6 % w/v (disuelta en Tris-HCl 50 mM pH 8,5) e incubado durante 30 min a 37 °C.

Después, a la mezcla de reacción se adicionó 100  $\mu$ L de ATC 10 % y centrifugó a 5 000 rpm por 5 min. A 100  $\mu$ L del sobrenadante se mezcló con igual volumen de NaOH 0,5 N y leyó a 430 nm en un lector de placas (Infinite M200PRO, Brand TECAN). Para el cálculo de la actividad, se consideró la absorbancia de un blanco de muestra, al cual se le añadió ATC antes de adicionar la enzima. La actividad fue expresada en UI/mL, donde una unidad de actividad es definida como la cantidad de enzima que aumenta en 0,001 la absorbancia de azocaseína hidrolizada por min de reacción.

### **3.4.5 Determinación de parámetros cinéticos de L-asparaginasa de *Enterobacter sp. M55***

Los valores de  $V_{max}$  y  $K_M$  se determinaron a 37 °C y pH 6,0 utilizando L-asparagina como sustrato entre 2 y 20 mM usando la enzima luego de purificar por exclusión por tamaño. Primero, se determinaron las actividades L-ASNasas de cada concentración de sustrato (2, 3, 4, 5, 10, 15 y 20 mM) a diferentes tiempos de reacción (0, 1, 5, 8, 11, 14, 20 y 30 min). Se calculó las velocidades de reacción por cada concentración de sustrato, graficando el producto versus el tiempo, cuya pendiente representa la velocidad de reacción. Luego, se graficó la curva de Michaelis-Menten, velocidades de reacción versus concentraciones de sustrato. Los parámetros  $V_{max}$  y  $K_M$  se determinaron a partir de la curva de Michaelis-Menten con Excel usando solver.

### **3.4.6 Efecto del pH y temperatura en la actividad enzimática**

La actividad L-asparaginasa se analizó a temperaturas 10, 15, 25, 30, 37,45, 50, 60 y 70 °C, a pH 7,5. Los resultados se expresaron en términos de actividad relativa con respecto a la máxima actividad.

De forma similar, la actividad L-asparaginasa se evaluó a pH entre 4,0; 4,5; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,5 y 9,0 a 37 °C. Los resultados se expresaron en términos de actividad relativa respecto a la máxima actividad.

### **3.5 Determinación de proteínas totales**

La concentración de proteínas totales se determinó por el método del ácido bicinconínico (BCA) utilizando el kit “Bicinchoninic Acid Protein Assay” (Sigma-Aldrich) (35), se basa en la reacción de las uniones peptídicas y cadenas laterales de los aminoácidos cisteína, triptófano y tirosina con el cobre ( $\text{Cu}^{+2}$ ) en solución alcalina, reduciéndolo a  $\text{Cu}^+$ . Esto forma un complejo soluble en agua con dos moléculas de BCA, de color púrpura, que absorbe a 562 nm. Se utilizó como estándar albúmina sérica bovina (BSA) a las concentraciones de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1,0 mg mL<sup>-1</sup>. La concentración de proteínas totales fue expresada en mg.mL<sup>-1</sup>.

#### **3.5.1 Especificidad de sustrato**

La especificidad del sustrato se determinó midiendo la actividad enzimática con diferentes amidas como sustrato a 10 mM, a pH 6,0 y 37 °C, usando el método de Nessler. Así, se utilizaron L-asparagina, D-asparagina, L-glutamina, D-glutamina, ácido L-aspartico, ácido D-aspartico, ácido L-glutámico, L-ornitina y úrea. Los resultados se presentaron en términos de porcentaje de actividad relativa con respecto al mejor sustrato.

#### **3.5.2 Efecto de iones metálicos, componentes del suero e inhibidores enzimáticos**

El efecto de los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Ba}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Co}^{++}$  y  $\text{Fe}^{+++}$  sobre la actividad enzimática se determinó a la concentración de 100 mM, la actividad L-ASNasa en presencia de las sales se determinó a 37 °C, pH 6,0 durante 30 min.

También se determinó el efecto de los componentes del suero (citrato, arabinosa, glucosa, ácido pirúvico, lactato, D-galactosa y hemoglobina) a la concentración de 10 mM. Los resultados se presentaron en términos de porcentaje de actividad relativa con respecto al control. Finalmente, se determinó la actividad enzimática frente a inhibidores enzimáticos a 10 mM (PMSF, EDTA, EGTA úrea, DL-ditiotreitol, mercaptoetanol, SDS y glutatión), excepto glutatión 0,5 mM.

## CAPITULO IV. RESULTADOS

En esta investigación se presenta la purificación y la caracterización bioquímica parcial de la L-asparaginasa intracelular de *Enterobacter sp M55*, por lo que fue necesario la lisis celular por sonicación, el tiempo óptimo fue 90 s. En la figura 6 se observa que a partir de los 90 s de sonicación la biomasa se mantiene estable en 25 de absorbancia, así como la actividad L-ASNasa en 0,5 UI/mL, proteínas totales 3 mg/mL. De la misma forma, la actividad proteolítica se mantiene en aproximadamente 300 UI/mL (Figura 7).

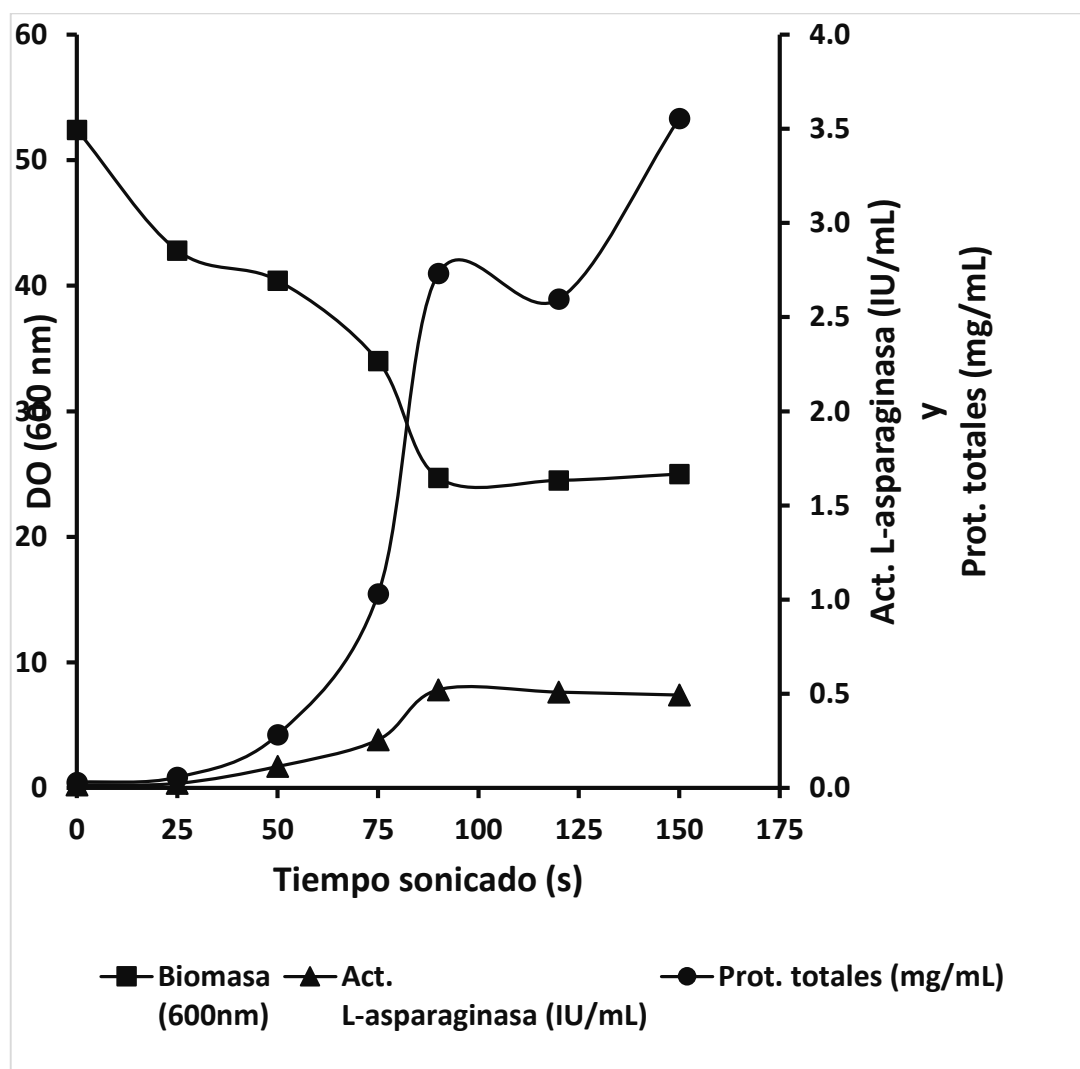


Figura 4. Dinámica de biomasa, actividad L-ASNasa y proteínas totales después del rompimiento celular de *Enterobacter sp M55* por sonicación



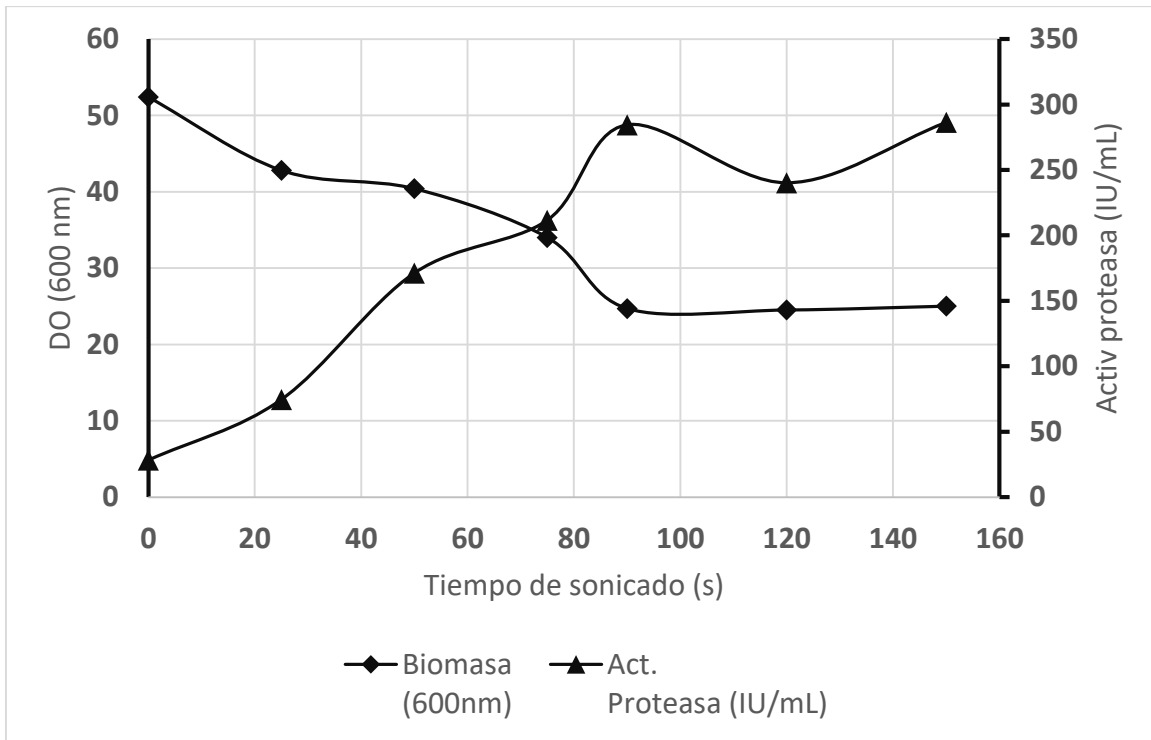
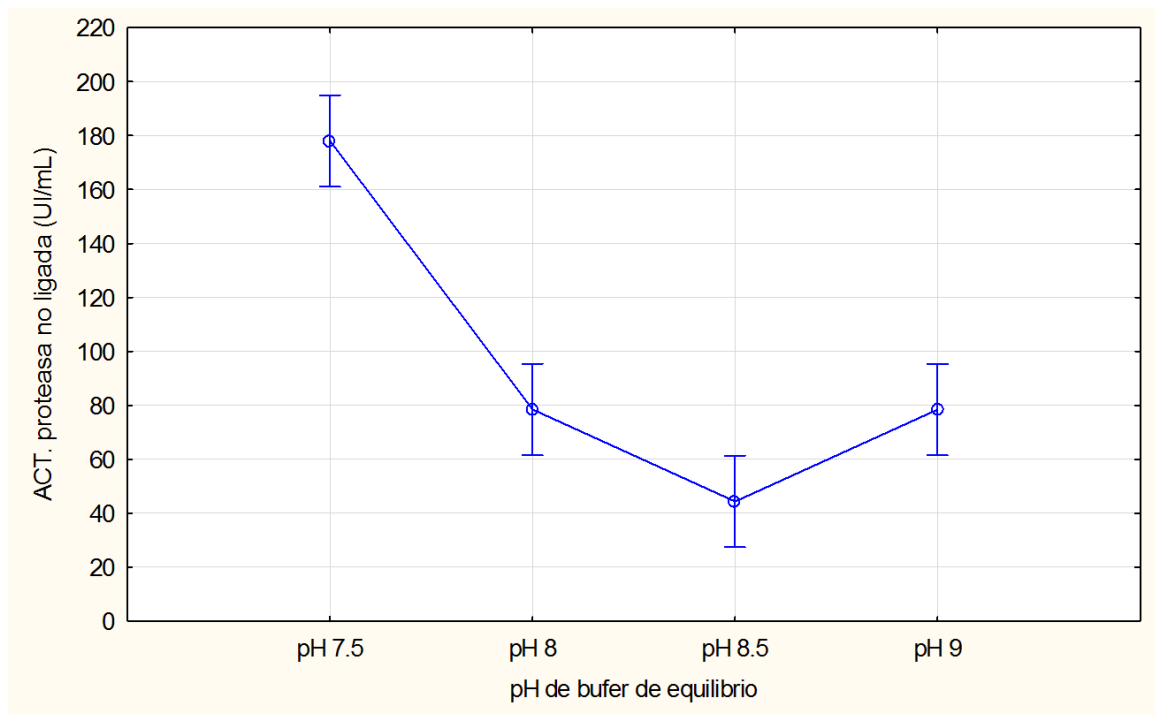


Figura 7. Tiempo de sonicado, concentración de biomasa y actividad proteolítica

La L-ASNasa según su punto isoeléctrico puede adquirir cargas a diferentes pH, permitiendo su unión específica a iones de manera reversible. En la figura 8, se muestra actividad proteasa presente en las fracciones no ligadas después de pasar por la resina agarosa DEAE equilibrada a diferentes pH. Según el análisis Tukey, el promedio de actividad proteasa no ligada a celulosa DEAE a pH 7,5 es significativamente mayor al 95% de confianza.



**Figura 5. Actividad proteasa no ligada a agarosa DEAE equilibrada a diferente pH**

La aplicación de la resina DEAE en la purificación de L-ASNasa es frecuente en los trabajos publicados. En otros estudios, el tampón de elución conteniendo Tris HCl 20 mM y NaCl a alta concentración, pH 8,6 fue el mejor para la purificación de L-ASNasa de *Bacillus* sp. (14)(17)(36). En esta investigación, se observa que a pH 7,5 permite eliminar el mayor porcentaje de las proteasas, sin embargo, a pH superior no hubo diferencias significativas respecto a la capacidad de ligación de la L-ASNasa. Estas diferencias se deberían al valor del punto isoeléctrico de las proteínas, para el caso de L-ASNasa de *Enterobacter* sp M55 probablemente tenga un punto isoeléctrico menor a 7,5, lo cual tendría una carga neta negativa que favorece su ligación en la resina DEAE. Por otro lado, las proteasas podrían tener un punto isoeléctrico próximo o por encima de 7,5, lo que imposibilitaría que se cargue y por lo tanto no permitiría ligarse en la resina DEAE.

En la figura 9 se muestra el perfil de actividad L-ASNasa y proteínas cuando son eluidas con un gradiente lineal de NaCl a través de la resina DEAE. Respecto a la actividad L-ASNasa, se muestra actividad L-ASNasa cuando se eluye con NaCl 0,3 M que corresponde a las fracciones 13, 14 y 15.

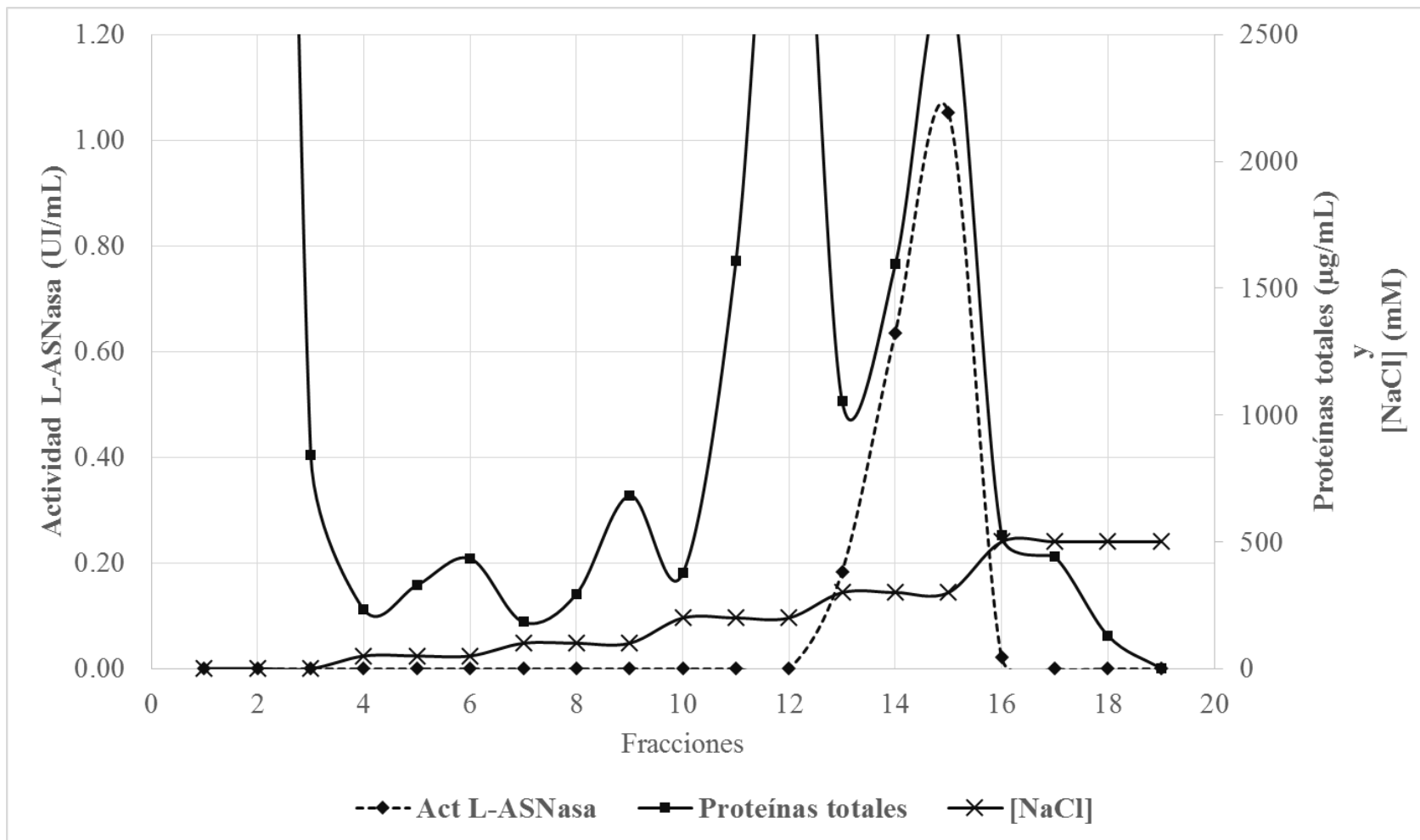


Figura 6. Actividad L-asparaginasa y proteínas totales de *Enterobacter sp M55* eluidas con gradiente de NaCl

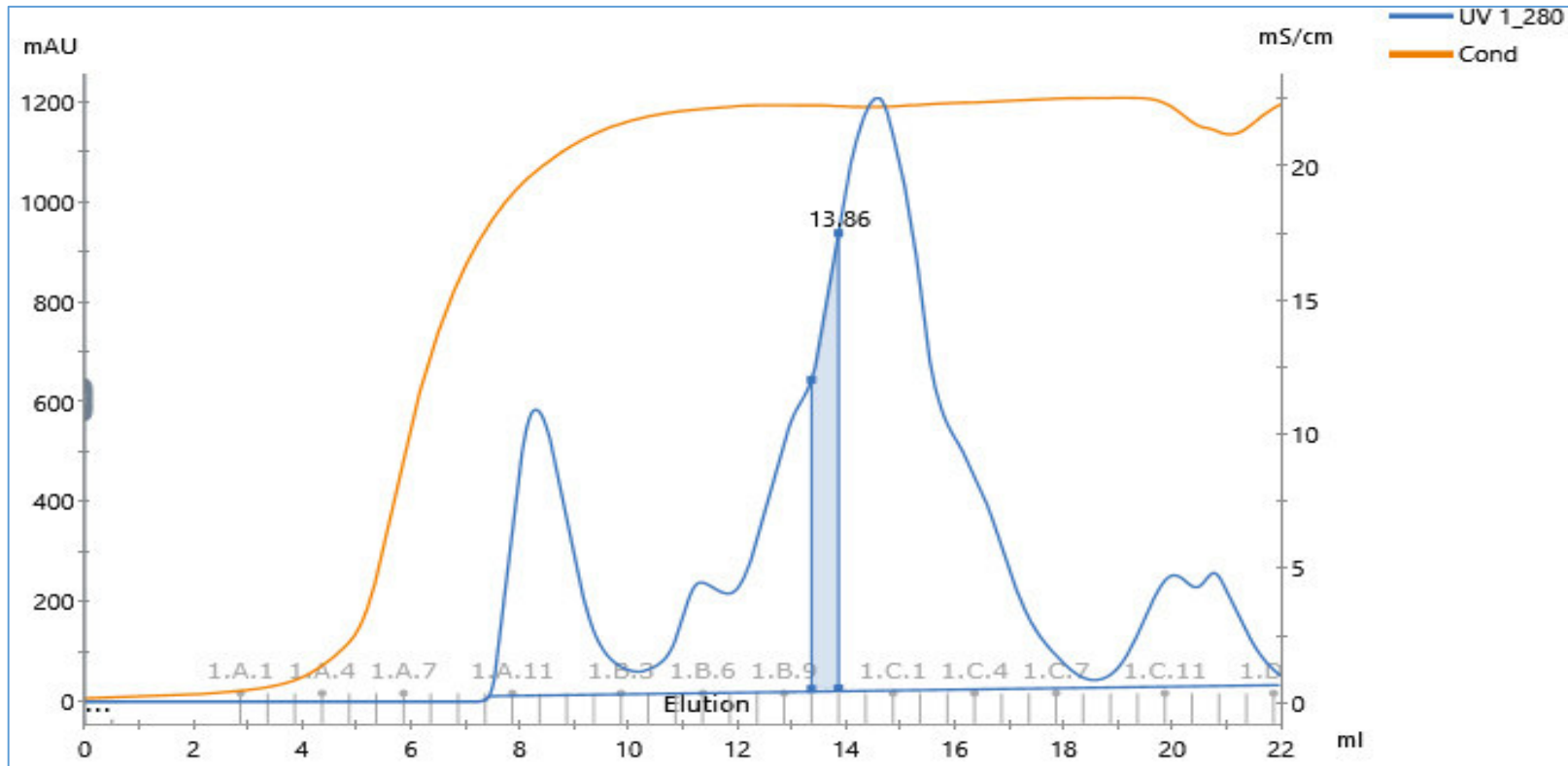


Figura 7. Perfil cromatográfico de exclusión por tamaño de L-asparaginasa de *Enterobacter sp M55*, usando Superdex 200 *increase 10/300* GL column

En la figura 10 se observa el perfil de purificación en una columna de exclusión por tamaño, la actividad L-ASNasa se evidencia en el volumen 13,86 mL.

En la tabla 6 se muestra un factor de purificación de 13,07 veces mayor al extracto enzimático crudo, luego de dos etapas de purificación (cromatografía DEAE y cromatografía por exclusión molecular), con un valor de proteínas totales de 1,32 mg/mL, la actividad específica de la enzima purificada fue 0,574 UI/mg. Jimat D. y col. lograron purificar L-ASNasa de *Bacillus* sp. 2,21 veces, Makky y col. 39,6 veces, Mahajan y col. 30,3 veces, usando una estrategia de exclusión molecular de forma

secuencial, con una resina Superose 12, Sephadex G-50 y Sephadex G-150, obteniendo las actividades específicas de 0,11 UI/mg, 21,77 UI/mg y 697,09 UI/mg, respectivamente (14)(37)(17).

Tabla 5. Purificación de L-asparaginasa de *Enterobacter sp.* M55

Pasos de purificación	Enzima total	Actividad L-ASNasa (UI/mL)	Proteínas totales (mg/mL)	Actividad L-ASNasa específica (UI/mg)	Rendimiento (%)
Extracto inicial	2.845	0.200	4.552	0.044	100.000
Intercambio iónico (DEAE-sepharose)	1.451	1.450	7.282	0.199	51.013
Exclusion por tamaño (superdex 200)	1.032	0.894	1.557	0.574	36.262

En la figura 11 se observa las corridas cromatografías del extracto enzimático inicial, fracción luego de purificar con DEAE, en el carril SEC se observan menor número de fragmentos comparando con DEAE.

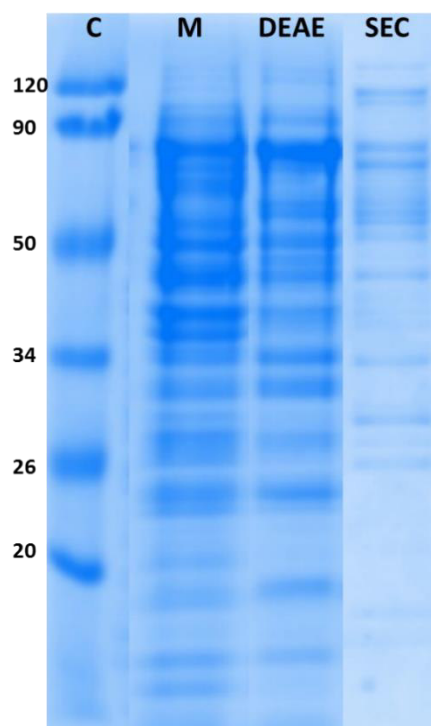


Figura 8. SDS-PAGE de L-asparaginasa de *Enterobacter sp.* M55. Carriles: C, marcador de peso molecular (kDa); M, extracto enzimático inicial; DEAE, cromatografía intercambio aniónico; SEC, cromatografía de exclusión por tamaño.

En la figura 12 se observa los parámetros cinéticos de L-asparaginasa como  $K_m = 5,71 \text{ mM}$  y  $V_{m\acute{a}x} = 0,16 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  según el método de regresión no lineal.



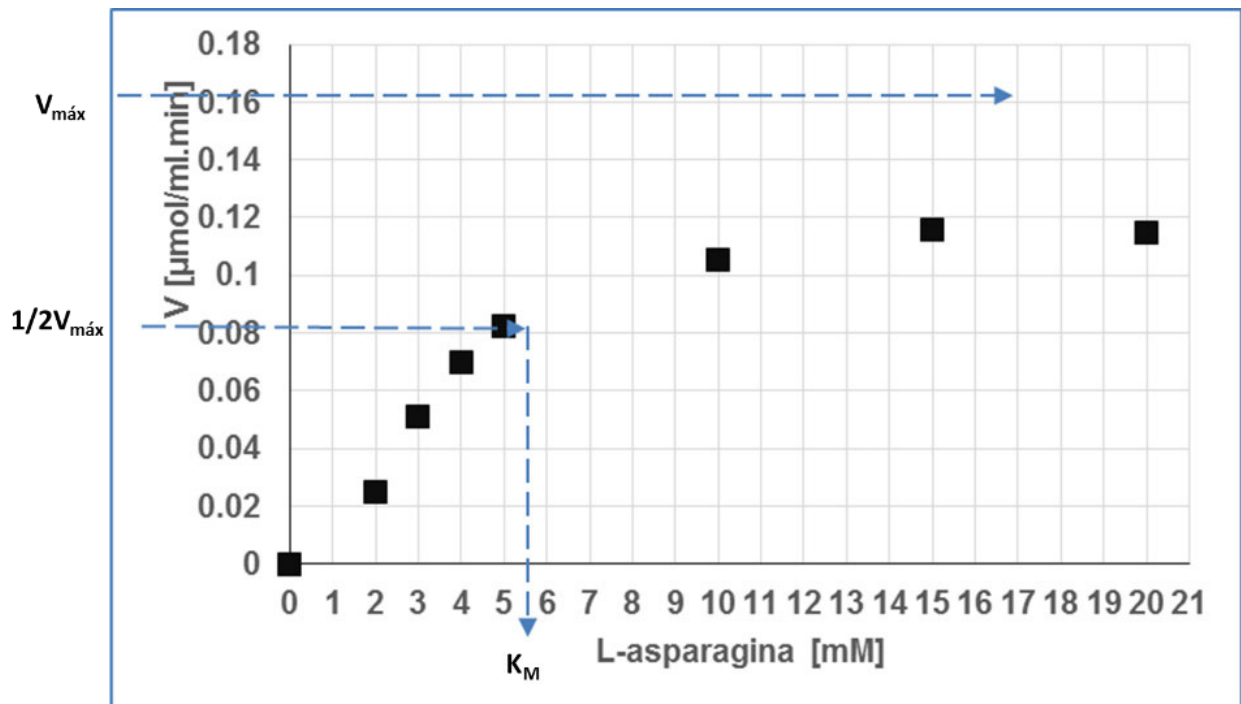


Figura 12. Cinética enzimática no lineal de L-asparaginasa de *Enterobacter sp* M55

En la figura 13, se observa la actividad relativa de L-ASNasa a diferentes temperaturas. La mayor actividad L-ASNasa fue a 37 °C, valor considerado como el 100% con relación a las otras analizadas. La actividad relativa a temperatura mayor a 50 °C fue menor al 10%.

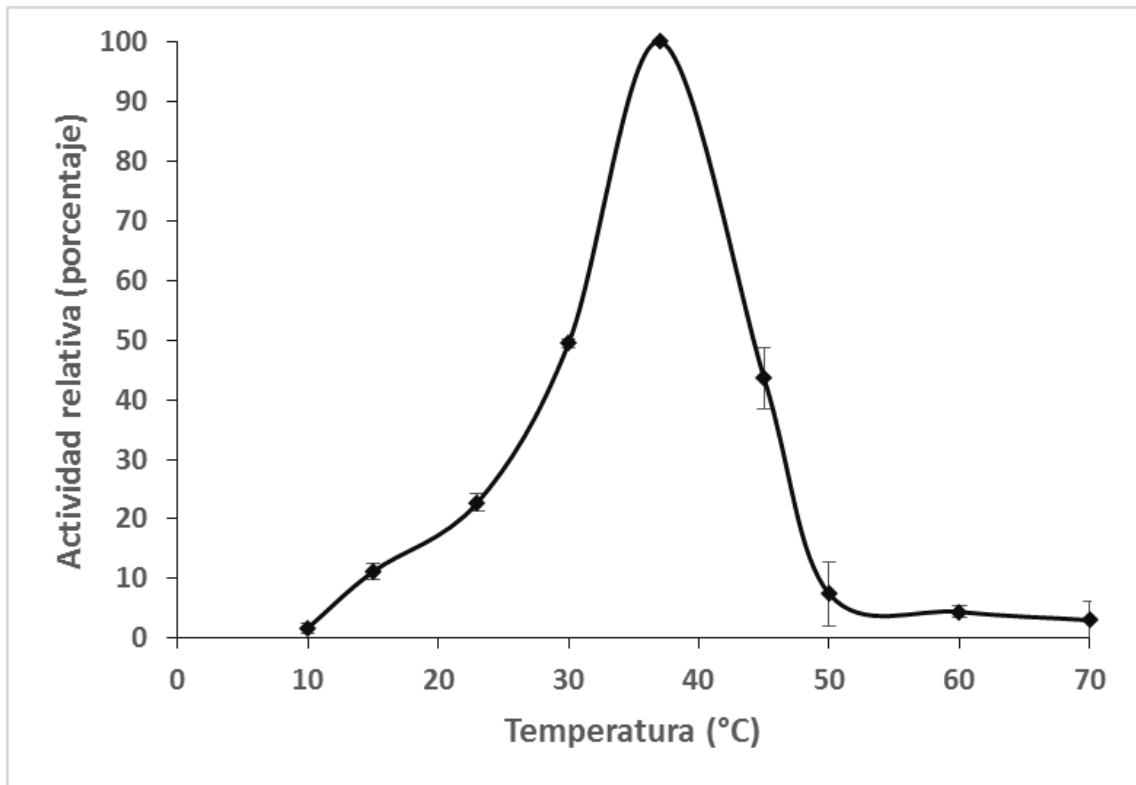


Figura 13. Efecto de la temperatura en la actividad L-ASNasa de *Enterobacter sp*  
M55

En la figura 14, se observa la actividad relativa de L-ASNasa a diferentes condiciones de pH. La máxima actividad se observó entre los pH 6,0 y 6,5, en el primero presentó la máxima actividad o actividad relativa de 100%. Además, a pH 9,0 la actividad se conserva aproximadamente 50%.

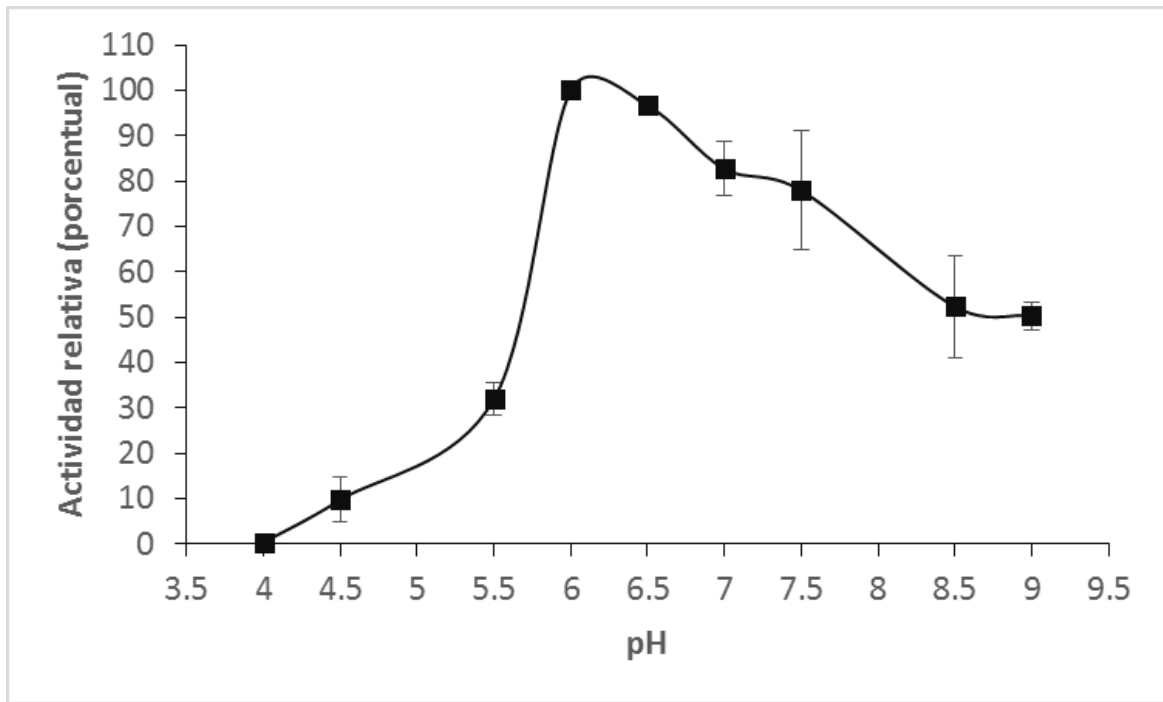


Figura 9. Efecto del pH en la actividad L-asparaginasa de *Enterobacter sp* M55

En la figura 15, se observa que las actividades L-ASNasa con los inhibidores de serin proteasas (PMSF) y metaloenzimas (EDTA, EGTA) estadísticamente no difieren a la actividad sin inhibidor (control). La actividad relativa, en presencia de urea, aumentó en 33%, respecto al control. Los agentes reductores como DL-ditiotreitol, mercaptoetanol inhibieron completamente la actividad. Sin embargo, el glutatión (agente reductor) incrementó la actividad L-ASNasa en un 55%. Finalmente, la L-ASNasa perdió su actividad en presencia de SDS.

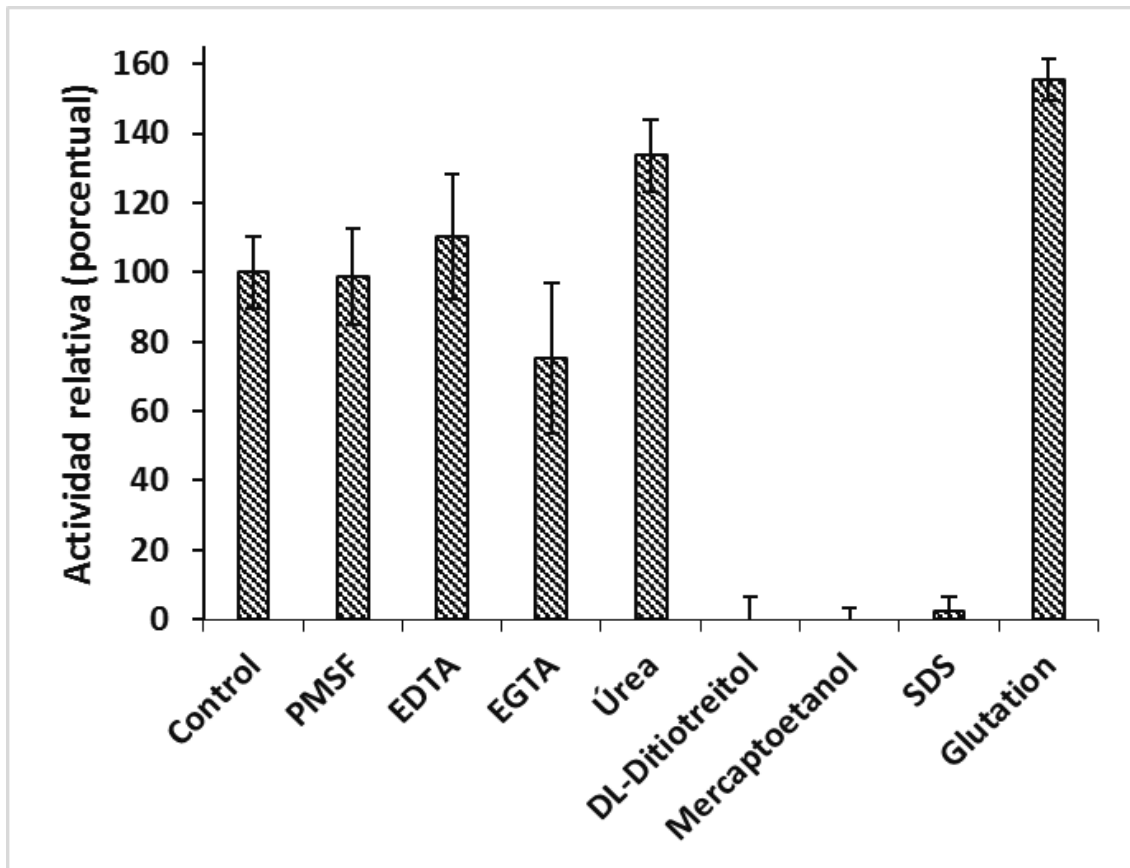


Figura 10. Efecto de inhibidores en la actividad L-asparaginasa de *Enterobacter sp*

M55

En la figura 16 se observa la actividad relativa en presencia de cationes divalentes ( $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Ba^{++}$ ,  $Mn^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Co^{++}$ ) y trivalente ( $Fe^{+++}$ ), estos iones inhibieron la actividad enzimática. Por el contrario, los iones  $Na^+$  y  $K^+$  no afectaron la actividad.

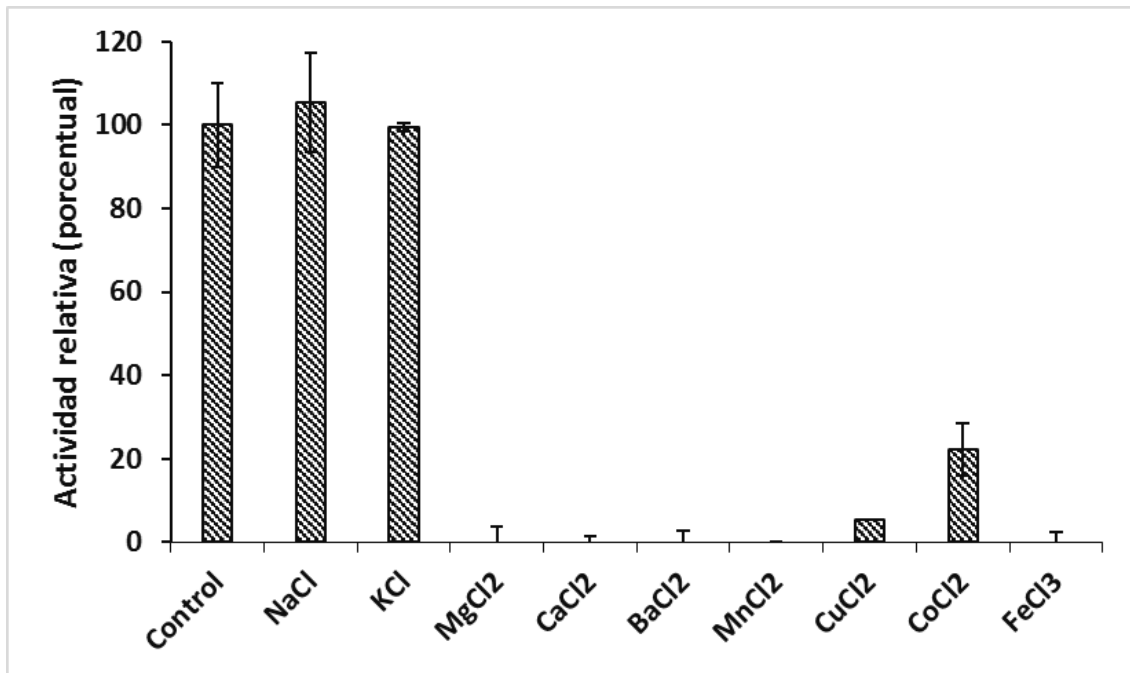


Figura 11. Efecto de sales en la actividad L-asparaginasa de *Enterobacter sp* M55

En la figura 17 se observa la actividad relativa de L-ASNasa en presencia de componentes sanguíneos. Así, glucosa 10 mM incrementó la actividad relativa en un 43%. Por el contrario, arabinosa, lactato, D-galactosa disminuyeron la actividad en 23 %, 13 % y 36%, respectivamente. De igual forma, los compuestos séricos como citrato y ácido pirúvico disminuyeron la actividad en 5,7 % y 33,1 %, respectivamente. Finalmente, la hemoglobina disminuyó la actividad en 41,3 %.

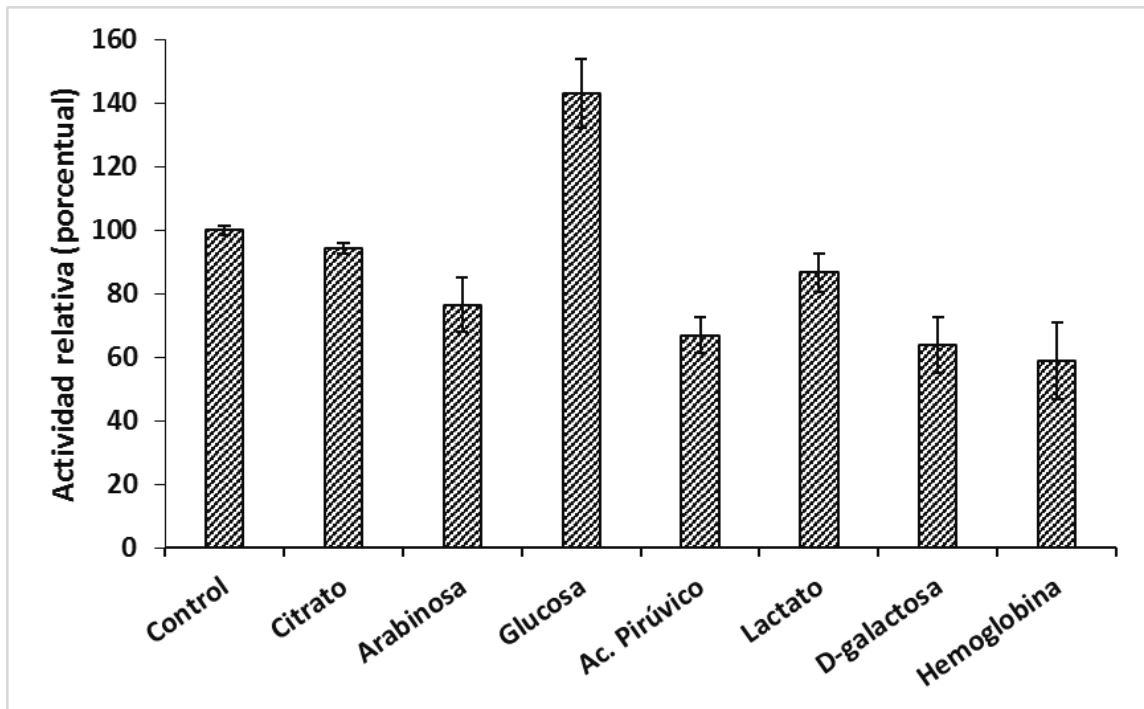


Figura 12. Efecto de los componentes del suero en la actividad L-asparaginasa de *Enterobacter sp* M55

En la figura 18 se muestra los resultados de actividades relativas frente a sustratos enzimáticos. L-asparagina fue el mejor sustrato para L-ASNasa, por lo tanto, fue el sustrato control (100%). Por otro lado, las actividades cuando se usaron L-glutamina, L-histidina, L-ácido glutámico, L-ácido aspártico, D-ácido aspártico y urea como sustrato fueron 1,9 %; 2,2%; 9%, 0%; 9,9% y 27,6%, respectivamente.

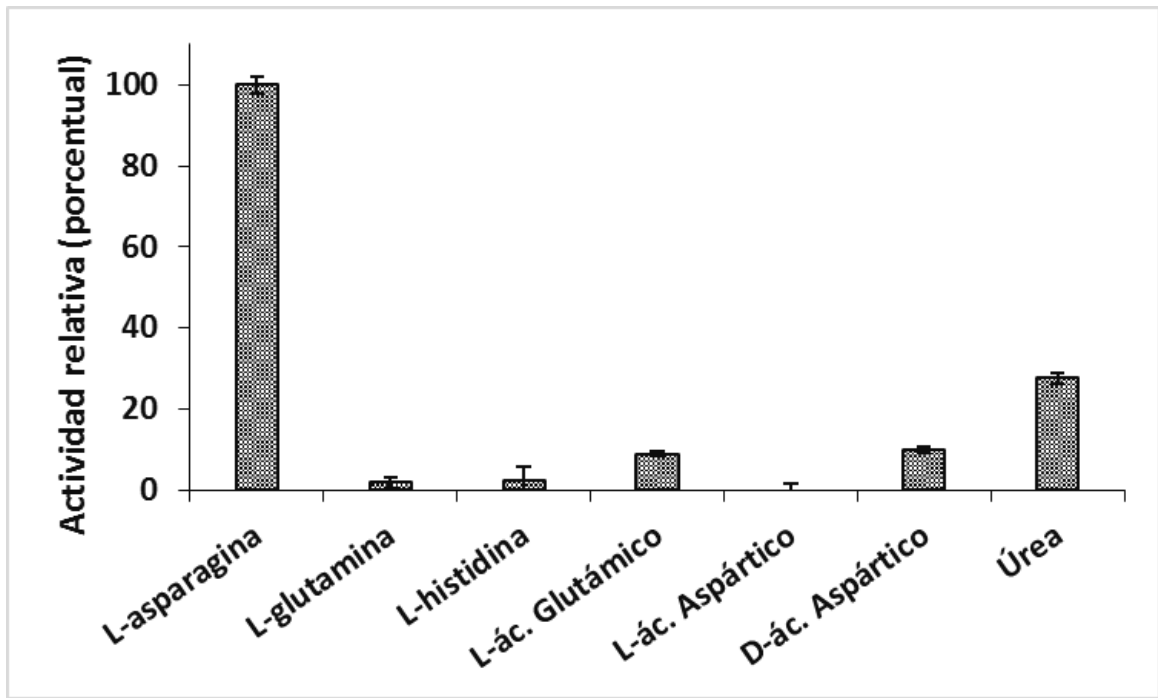


Figura13. Especificidad de sustrato de L-asparaginasa de *Enterobacter sp* M55

## CAPITULO V. DISCUSIÓN

L-asparaginasa es una enzima incluida en los protocolos de tratamiento de leucemia linfoblástica aguda (38). La L-ASNasa proveniente de *E.coli* causa hipersensibilidad en alrededor del 30% de los pacientes tratados (6), motivo por el cual se suspende el tratamiento. Además, las L-ASNasas disponibles generan efectos adversos como inflamación pancreática, hiperglucemia, convulsiones neurológicas e hipersensibilidad (39), debido a la actividad L-glutaminasa intrínseca de la enzima en más del 3% (22)(40). En este aspecto, las investigaciones de búsqueda de L-ASNasa libre o de baja actividad L-glutaminasa son permanentes.

En esta investigación se presenta información de la L-asparaginasa intracelular de *Enterobacter sp* M55 aislado de las salinas de Maras - Cusco. Para ello, la bacteria se cultivó

en medio M9 modificado (30), las células se rompieron por sonicación, el contenido intracelular fue el extracto enzimático inicial (extracto crudo). Las actividades L-ASNasa y proteasas fueron 0,2 y 284,0 IU/mL respectivamente; las proteínas totales 4,55 mg/mL. Estos valores evidencian la presencia de la enzima y el desafío está en la purificación.

El extracto enzimático inicial fue cargado a una columna de intercambio aniónico con resina DEAE, con los tampones de equilibrio y de elución a pH 6,0, estas condiciones difieren de otros estudios que indican pH 8,6 (14)(17)(36)(12). A pH 6,0 se separó L-ASNasa de las proteasas que no se ligaron durante el intercambio iónico. En la figura 7, a pH 8,5; la concentración de proteasas en la sección no ligada es baja en comparación a pH 7,5; lo cual significa que a menor pH se eliminan las proteasas de las fracciones ligadas con L-ASNasa. De estos datos, se infiere que el punto isoeléctrico de



la enzima de *Enterobacter sp* M55 es menor a 6,0, con una carga neta negativa que favorece su ligación a la resina DEAE; de igual forma, las L-ASNasas de *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes* presentaron puntos isoelectricos de 4,5 (12) y 5,3 (41) respectivamente. Por el contrario, las proteasas de *Enterobacter sp* M55 deben presentar un punto isoelectrico mayor de 6,0.

Las fracciones del intercambio aniónico que presentaron máxima actividad L-ASNasa fueron concentradas y aplicadas a la columna superdex 200 - 10/300 GL para la cromatografía de filtración en gel. De esta forma, la L-ASNasa de *Enterobacter sp* M55 se purificó 15,94 veces en las dos etapas, con un rendimiento del 36,26 % y una actividad específica de 0,574 UI/mg (Tabla 7). En este contexto, las L-ASNasas de *Enterobacter aerogenes* y *E. cloacae* purificadas 10 veces y 119,39 veces con las mismas técnicas presentaron rendimientos de 54% y 33%, y actividades específicas de 55 UI/mg y 105,07 UI/mg, respectivamente (12)(41). Lo cual se explica por la cantidad de enzima de interés y las proteínas iniciales; además, es importante enfatizar que la purificación de una proteína se recomienda realizar en menos pasos y en menor tiempo para evitar la desnaturalización o pérdida de actividad (42). Así, en la figura 11 se observa los perfiles proteicos del extracto enzimático inicial y los purificados por cromatografía de intercambio aniónico (DEAE) y exclusión por tamaño (SEC). El extracto inicial proveniente de la lisis por sonicación de la biomasa con densidad óptica de 50,0 ( $\lambda = 600$  nm), presentó 4,55 mg de proteínas/mL y 0,2 UI/mL de L-ASNasas.

La L-ASNasa de *Enterobacter sp* M55 parcialmente purificada presentó  $K_m = 5,71$  mM para L-asparagina según el método de regresión no lineal (figura 12). La  $K_m$  se define como la concentración de sustrato donde se alcanza la mitad de la velocidad de reacción máxima en condiciones conocidas de pH y temperatura; cuando el valor de  $K_M$  es menor, la afinidad de la enzima por el sustrato es mayor. En este aspecto, 5,71 mM

está dentro del promedio de los valores descritos para L-asparaginasas provenientes de bacterias entre 0,014 a 23,8 mM como por ejemplo: de *Enterobacter cloacae* 1,58 mM (12), *Erwinia aroideae* 3,0 mM (39), *Escherichia coli* 3,5 mM y Bacillus PG-03 23,8 mM (15). Además, la afinidad por L-glutamina, fue menor al 2,0 % con referencia a L-asparagina (figura 18). Cabe señalar, que la actividad glutaminasa relativa de *Enterobacter sp M55* es menor al de las enzimas comerciales, las cuales presentan valores mayores a 3,0% (22)(40). Con referencia a la actividad L-glutaminasa de la L-asparaginasas podría causar efectos adversos al disminuir la síntesis de proteínas plasmáticas (43). Por lo tanto, debido a la baja actividad L-glutaminasa, la enzima de *Enterobacter sp. M55* presenta gran potencial terapéutico.

En la figura 14, se observa la actividad relativa de L-ASNasa a diferentes valores de pH. Se encontró que la máxima actividad fue dentro del rango de pH 6,0 a 6,5; Además, a pH fisiológico conservó más del 80% de la actividad enzimática. Asimismo, la enzima conservó más del 50% de actividad hasta pH 9,5. Además, la temperatura óptima fue 37 °C, coincidiendo con la temperatura corporal. Por el contrario, las condiciones óptimas de pH y temperatura para las actividades de L-ASNasa de *Enterobacter cloacae* (12) y *Enterobacter cloacae* (44) estuvieron entre 7,0 y 8,5; y 35 °C y 40 °C respectivamente. Para el caso de L-ASNasa de *Enterobacter sp M55* fue pH 6,0 si bien, esta enzima pertenece a una cepa del género, es la única intracelular reportada; además, se aisló de las salinas de Maras – Cusco; por el contrario, las cepas de *E. cloacae* reportadas fueron aisladas de suelos de India.

En la figura 6, se observa que el PMSF (inhibidor de serin proteasas) no altera la actividad con relación al control (sin inhibidor), lo cual indica que los residuos catalíticos de L-ASNasa de *Enterobacter sp. M55* no presenta serina. Tampoco, es una metaloenzima por no ser inhibida por EDTA, ni EGTA. Estos reportes concuerdan con

las enzimas descritas de *Enterobacter cloacae* (12), *Bacillus licheniformis* (17) y *Pectobacterium carotovorum* MTCC1428 (22).

Por otra parte, Mahajan y col. (17) describen que L-ASNasa de *B. licheniformis* fue inhibida menos del 20% por urea, y en *Streptomyces brollosae* NEAE-115 más del 50%; a diferencia de esta investigación, con la urea incrementó la actividad relativa en 33,0% (figura 15). Este incremento puede deberse la actividad relativa de 27,0 % cuando la úrea se usó como sustrato (figura 18). Este último resultado difiere de Husain y col.(12), quienes indican que L-asparaginasa de *Enterobacter cloacae* no presentó actividad cuando se usó la úrea como sustrato. Doriya y colaboradores detectaron la presencia de actividad ureasa en preparaciones de L-ASNasa (45). Debido a la actividad ureasa, se recomienda continuar con pasos de purificación (46) o aplicar métodos de clonación de la enzima L-ASNasa para eliminar la enzima Ureasa.

Además, DL-ditiotreitol y mercaptoetanol inhiben la actividad enzimática, coincidiendo con L-ASNasa de *Bacillus licheniformis* (17), el primero, es un agente reductor fuerte que inhibe la enzima debido a la presencia de dos grupos sulfhidrilo, permitiendo formar anillos (47); y el segundo, es un agente reductor débil que también inhibió la L-asparaginasa. Sin embargo, el glutatión, agente reductor débil, causó un efecto opuesto, incrementó la actividad enzimática, coincidiendo con L-ASNasa de *Enterobacter cloacae* (12). Los agentes reductores débiles a diferencia de los fuertes, inhiben la enzima en una reacción de dos pasos, lo cual necesita una mayor concentración para finalizar la inhibición (48). En nuestro caso, la concentración de glutatión fue 0,5 mM, menor a la concentración de mercaptoetanol 10 mM.

Por otro lado, los iones Mg<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup>, Ba<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup>, Cu<sup>++</sup>, Co<sup>++</sup> inhiben la actividad enzimática en su totalidad; y Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> no alteran la actividad con respecto al control

(figura 16). Estos resultados coinciden con L-ASNasas de *Enterobacter cloacae* (12) y *Bacillus licheniformis* (17); Sin embargo, El-Nagar y col. (11) reportan que L-ASNasa de *Streptomyces broollosae* NEAE-115 incrementa su actividad en presencia de  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$  y  $Co^{++}$  y se inhibe con  $Ca^{++}$ ,  $Cu^{++}$  y  $Ba^{++}$ .

En la figura 17, se observa el efecto de los componentes del suero sanguíneo en la actividad L-ASNasa; la glucosa 10 mM incrementó la actividad L-ASNasa en un 43%, en comparación con arabinosa, lactato, D-galactosa. Otros compuestos orgánicos séricos como citrato y piruvato disminuyeron la actividad enzimática hasta en un 50 %; y la hemoglobina hasta en un 58%. Otro estudio, indicó que L-ASNasa de *Bacillus licheniformis*, en presencia de glucosa mantiene la actividad; y en presencia de hemoglobina disminuye hasta un 20% (17). En nuestro caso, en presencia de glucosa se incrementó la actividad, lo cual es beneficioso para su uso terapéutico.

Debido al perfil de especificidad de sustrato de la L-asparaginasa, alta afinidad por L-asparaginasa ( $K_m = 5,71$  mM) y baja actividad glutaminasa (2%) se sugiere utilizar estrategias con herramientas y técnicas de bioinformática, ingeniería genética y de proteínas para el clonaje y expresión del gen de *Enterobacter sp* M55, de este modo, explorar y validar el perfil cinético de la enzima y potencial terapéutico. Así también, eliminar la enzima ureasa y disminuir costos de producción y purificación.

## CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

- L-asparaginasa de *Enterobacter sp.* M55 se purificó parcialmente 13,065 veces con un rendimiento del 36,26 % y una actividad específica de 0,574 UI/mg.
- Los parámetros catalíticos de L-asparaginasa de *Enterobacter sp.* M55 fueron,  $K_M$  5,71 mM de L-asparagina;  $V_{max}$ ,  $0,16 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ , las condiciones óptimas de reacción fueron a pH 6,0 y 37 °C. Además, presentó actividad menor a 2% por L-glutaminasa.
- L-asparaginasa de *Enterobacter sp.* M55 mantuvo su actividad más del 50% con hemoglobina; por el contrario, la glucosa incrementó la actividad hasta un 43,0%.

## CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. Cáncer [Internet]. 2018. Available from: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
2. INEN. Casos nuevos de cancer registrados en INEN, periodo 2000 - 2016 (ambos sexos). Vol. IV. Lima; 2016.
3. INEN. Registro de cáncer de Lima Metropolitana: Volumen V, Estudio de incidencia y Mortalidad 2010-2012. Lima; 2016.
4. Ceconello DK, Magalhães MR de, Werlang ICR, Lee ML de M, Michalowski MB, Daudt LE. Asparaginase: an old drug with new questions. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2020;42(3):275–82.
5. Shrivastava A, Khan A, Khurshid M, Kalaml M, Jain SK, Singhal PK. Recent developments in l -asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. *Oncol / Hematol* [Internet]. 2016;100:1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.01.002>
6. Schmiegelow K, Attarbaschi A, Barzilai S, Escherich G, Frandsen TL, Halsey C, et al. Consensus definitions of 14 severe acute toxic effects for childhood lymphoblastic leukaemia treatment: a Delphi consensus. *Lancet Oncol.* 2016;17:231–9.
7. Brumano LP, da Silva FVS, Costa-Silva TA, Apolinário AC, Madalena Santos JH, Kleingesinds EK, et al. Development of L-asparaginase biobetters: Current research status and review of the desirable quality profiles. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;6:1–22.
8. Programa Nacional de Toxicología. Informe sobre carcinógenos. decimocuar.

2016.

9. Union Europea. Acrilamida [Internet]. 2015. Available from: [https://ec.europa.eu/food/safety/chemical\\_safety/contaminants/catalogue/acrylamide\\_en](https://ec.europa.eu/food/safety/chemical_safety/contaminants/catalogue/acrylamide_en)
10. Roy MP, Das V, Patra A. Isolation , purification and characterization of an extracellular L -asparaginase produced by a newly isolated *Bacillus megaterium* strain MG1 from the water bodies of Moraghat forest, Jalpaiguri, India. *J Gen Appl Microbiol.* 2019;65:137–44.
11. El-naggar NE, Deraz SF, El-ewasy SM, Suddek GM. Purification, characterization and immunogenicity assessment of glutaminase free L-asparaginase from *Streptomyces broilosae* NEAE-115. *BMC Pharmacol Toxicol.* 2018;19(51):1–15.
12. Husain I, Sharma A, Kumar S, Malik F. Purification and Characterization of Glutaminase Free Asparaginase from *Enterobacter cloacae*: In-Vitro Evaluation of Cytotoxic Potential against Human Myeloid Leukemia HL-60 Cells. *PLoS One.* 2016;11(2):1–27.
13. Husain I, Sharma A, Kumar S, Malik F. Purification and characterization of glutaminase free asparaginase from *Pseudomonas otitidis*: induce apoptosis in human leukemia MOLT-4 cells. *Biochimie.* 2016;121:38–51.
14. Jimat D, Mohamed I, Azmi A, Jamal P. Purification and partial characterization of L -asparaginase enzyme produced by newly isolated *Bacillus* sp. *IJUM Eng J.* 2017;18(2):1–10.
15. Rahimzadeh M, Poodat M, Javadpour S, Qeshmi FI. Purification ,

- Characterization and Comparison between Two New L-asparaginases from Bacillus PG03 and Bacillus PG04. *Open Biochem J.* 2016;10:35–45.
16. Dash C, Mohapatra SB, Maiti PP. Optimization , Purification and Characterization of L- Asparaginase from Actinomycetales bacterium BkSoiiA. *Prep Biochem Biotechnol.* 2016;46(1):1–7.
  17. Mahajan R V, Kumar V, Rajendran V, Saran S, Ghosh PC, Saxena K. 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):1–8.
  18. Makky EA, Loh YC, Karim R. Purification and partial characterization of a low molecular weight L -asparaginase produced from corn cob waste. *Biocatal Agric Biotechnol* [Internet]. 2014;34:265–270. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2014.07.004>
  19. Gholamian S, Gholamian S, Nazemi A, Nargesi MM. Isolation and Characterization of a Novel Bacillus sp. Strain that Produces L-asparaginase, an Antileukemic Drug. *Asian J Biol Sci.* 2013;6(2):106–15.
  20. Singh Y, Gundampati R, Jagannadham M, Srivastava S. Extracellular L - Asparaginase from a Protease-Deficient Bacillus aryabhatai ITBHU02: Purification , Biochemical Characterization , and Evaluation of Antineoplastic Activity In Vitro. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013;171:1759–74.
  21. Kumar N, Manonmani H. Purification , characterization and kinetic properties of extracellular L -asparaginase produced by Cladosporium sp . *World J Microbiol Biotechnol.* 2013;29:577–87.



22. Kumar S, Dasu VV, Pakshirajan K. Purification and characterization of glutaminase-free L -asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428. *Bioresour Technol.* 2011;102(2):2077–82.
23. Voet D, Voet J. *Bioquímica*. 3era Edici. Buenos Aires; 2004. 140–141 p.
24. Koolmant J, Röhm K-H. *Bioquímica, Textos y atlas*. 3era edici. Buenos Aires; 2003. 78 p.
25. Coskun O. *Separation Tecniques: CHROMATOGRAPHY*. North Clin Istanbul. 2016;3(2):156–60.
26. Campbell M, Farrell S. *Bioquímica*. sétima edi. Belmont; 2012. 375 p.
27. Kumar P, Sharma S. An overview of purification methods for proteins. *Int J Appl Res.* 2015;1(12):450–9.
28. Rogers A, Gibon Y. *Enzyme Kinetics: Theory and Practice*. In: Schwender J, editor. *Plant Metabolic Networks*. New York; 2009. p. 71–100.
29. Roskoski R. Michaelis-Menten Kinetics, Module in Biomedical Sciences [Internet]. Elsevier. Elsevier Inc.; 2015. p. 1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.05143-6>
30. Sharma A, Husain I. Optimization of medium components for extracellular glutaminase free asparaginase from *Enterobacter cloacae*. *IntJCurrMicrobiolAppSci.* 2015;4(1):296–309.
31. Grossowicz N, Wainfan E, Borek E, Waelsch H. The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine. *J Biol Chem.* 1950;187(1):111–25.

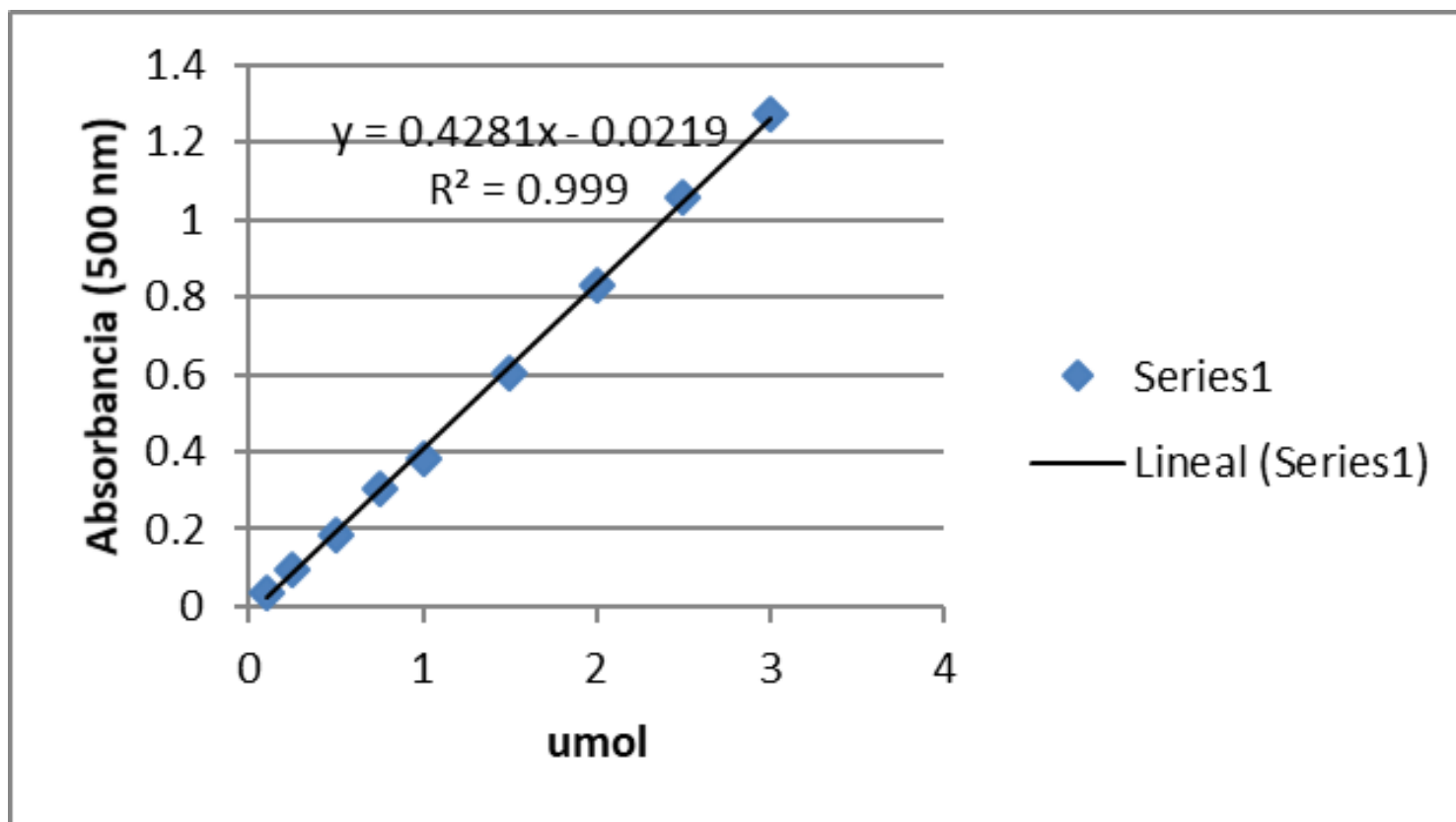
32. Shifrin S, Parrott CL. In Vitro Assembly of L-Asparaginase Subunits. *J Biol Chem.* 1974;249(13):4175–80.
33. Laemmli U. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680–5.
34. Cólho DF, Saturnino TP, Fernandes FF, Mazzola PG, Silveira E, Tambourgi EB. Azocasein Substrate for Determination of Proteolytic Activity: Reexamining a Traditional Method Using Bromelain Samples. *Biomed Res Int.* 2016;2016.
35. Smith P., KROHN R., Hermanson G., Mallia AK, Gartner F., Provenzano M., et al. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem.* 1985;150:76–85.
36. Moorthy V, Ramalingam A, Sumantha A, Shankaranaya RT. Production , purification and characterisation of extracellular L-asparaginase from a soil isolate of *Bacillus* sp. *African J Microbiol Res Res.* 2010;4(18):1862–7.
37. Makky EA, Ong JJ, Karim R, Lee CM. Production and optimization of L-asparaginase by *Bacillus* sp . KK2S4 from corn cob. *African J Biotechnol.* 2013;12(19):2654–8.
38. Chan WK, Lorenzi PL, Anishkin A, Purwaha P, Rogers DM, Sukharev S, et al. The glutaminase activity of L -asparaginase is not required for anticancer activity against ASNS-negative cells. *Blood.* 2014;123(23):3596–606.
39. Wikman LEK, Krasotkina J, Kuchumova A, Sokolov N, Papageorgiou A. crystallization communications Crystallization and preliminary crystallographic analysis of L -asparaginase from *Erwinia carotovora* crystallization communications. *Acta Crystallogr F Struct Biol Cryst Commun.* 2005;61:407–9.

40. Fonseca MHG, Fiúza T da S, Bath de Moraes S, Brasil de Souza T, Trevizani R. Circumventing the side effects of L-asparaginase. *Biomed Pharmacother.* 2021;139:1–7.
41. Mukherjee J, Joeris K, Riechel P, Scheper T. A Simple Method for the Isolation and Purification of L-Asparaginase from *Enterobacter aerogenes*. *Folia Microbiol.* 1999;44(1):15–8.
42. Dako E, Bernier A-M, Dadie A, Jankowski C. The Problems Associated with Enzyme Purification. In: Ekinci PD, editor. *Chemical Biology* [Internet]. 2012. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/28766>
43. Duval M, Suciú S, Ferster A, Riolland X, Nelken B, Lutz P, et al. Comparison of *Escherichia coli* – asparaginase with *Erwinia*- asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer - Children's Leukemia Group phase 3 trial. *Clin Obs Interv Ther trials.* 2017;99(8):2734–40.
44. Nawaz MS, Zhang D, Khan AA, Cerniglia CE. Isolation and characterization of *Enterobacter cloacae* capable of metabolizing asparagine. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1998;50(5):568–72.
45. Doriya K, Kumar DS. Isolation and screening of L-asparaginase free of glutaminase and urease from fungal sp. 3 *Biotech.* 2016;6(2):1–10.
46. Ashok A, Doriya K, Rao JV, Qureshi A, Tiwari AK, Kumar DS. Microbes Producing L-Asparaginase free of Glutaminase and Urease isolated from Extreme Locations of Antarctic Soil and Moss. *Sci Rep* [Internet]. 2019;9(1):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-38094-1>

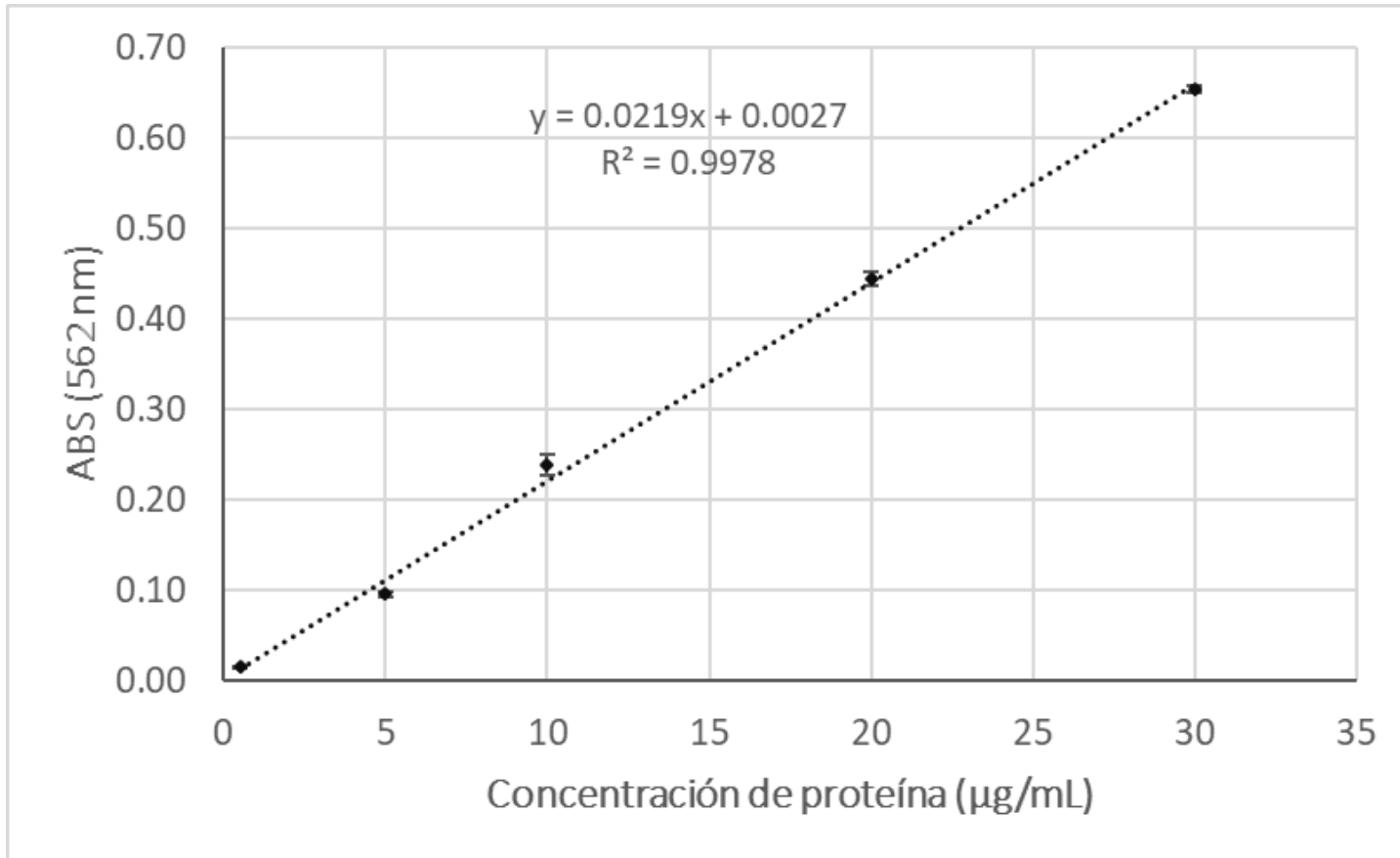
47. Lee H, Torres J, Truong L, Chaudhuri R, Mittal A, Johnson M. Reducing agents affect inhibitory activities of compounds: Results from Multiple Drug Targets. 2013;423(1):46–53.
48. Hermanson GT. Functional Targets for Bioconjugation. In: Bioconjugate Techniques. Third Edit. 2013.

## CAPÍTULO VIII. ANEXOS

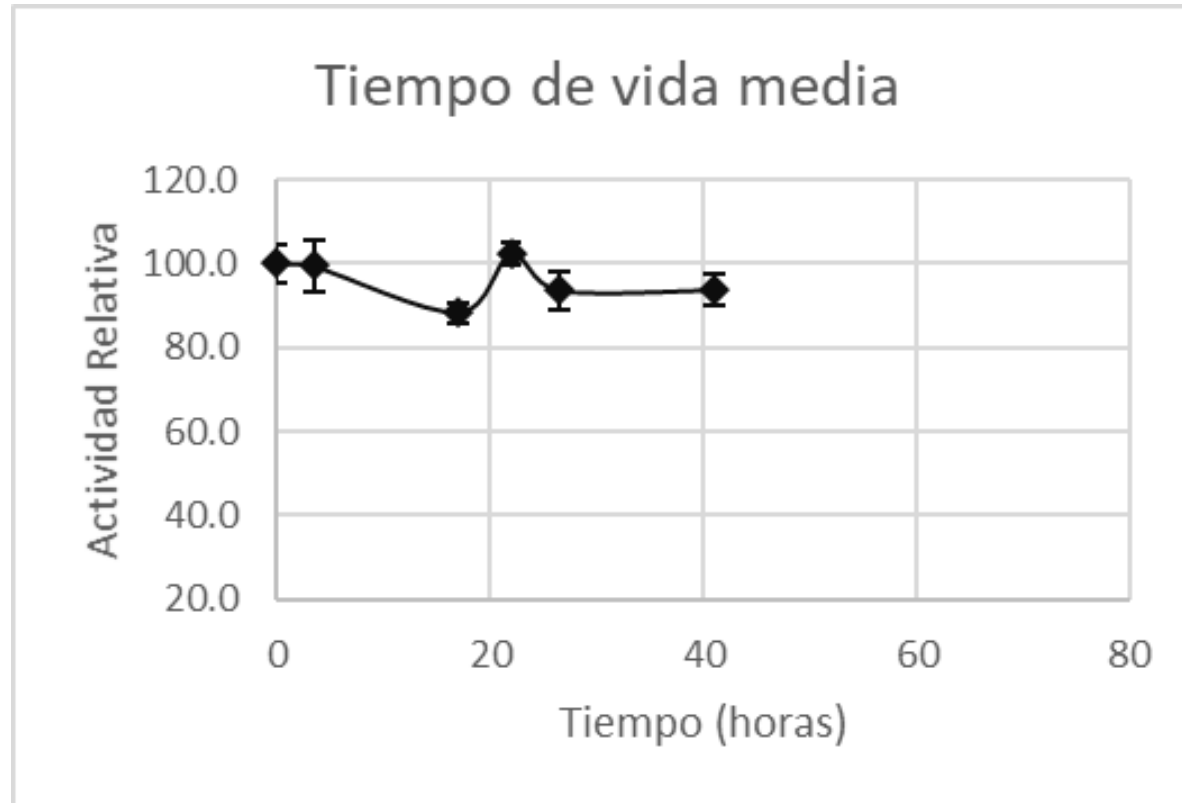
Curva de calibración del método ácido L-aspartil- $\beta$ -hidroxámico



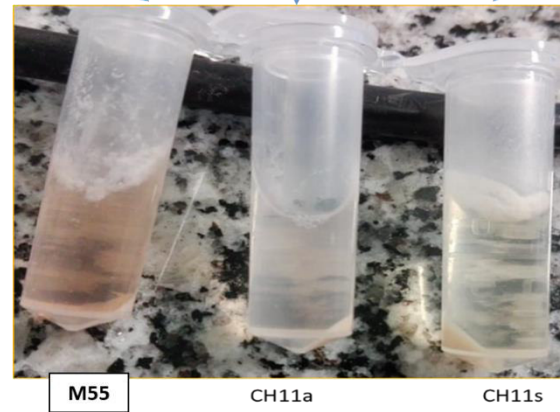
Curva de calibración BSA



**Tiempo de vida de la L-ASNasa en horas.**

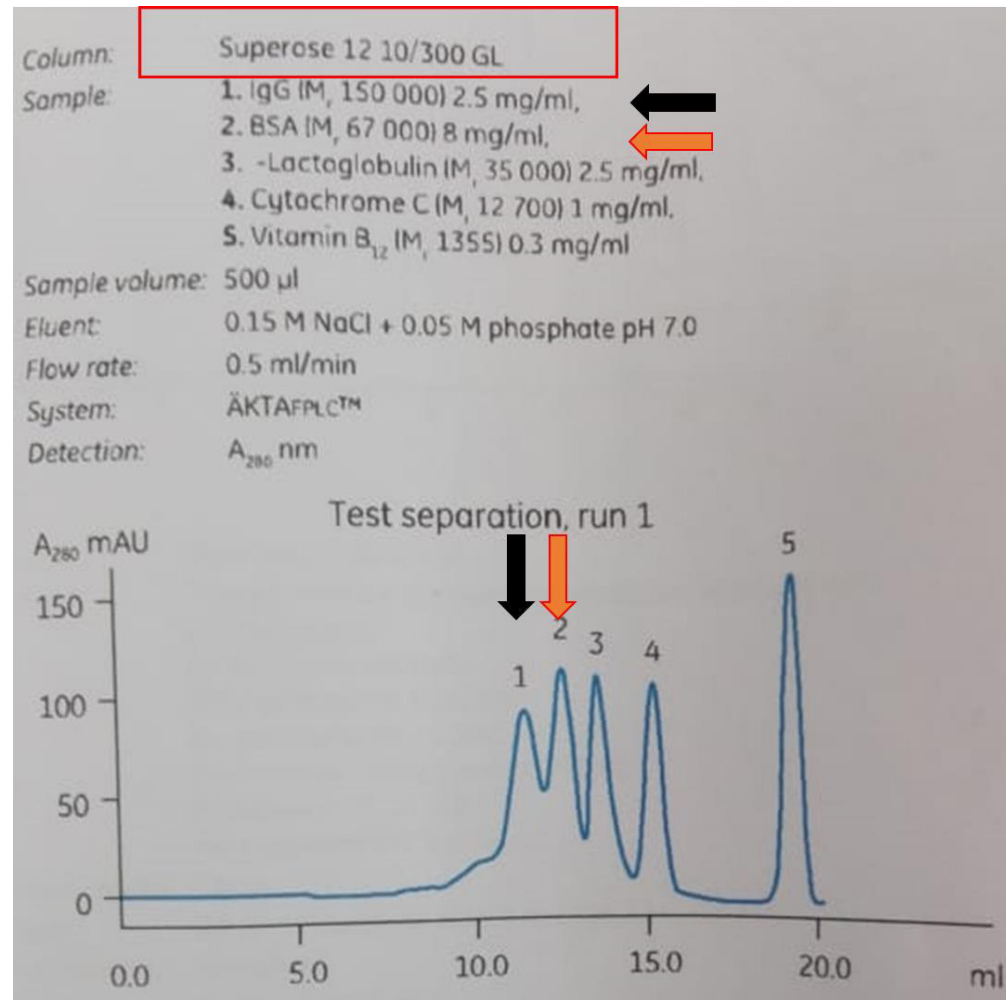


**Actividad L-asparaginasa de las cepas potenciales *Enterobacter* sp M55, CH11a y CH11s**

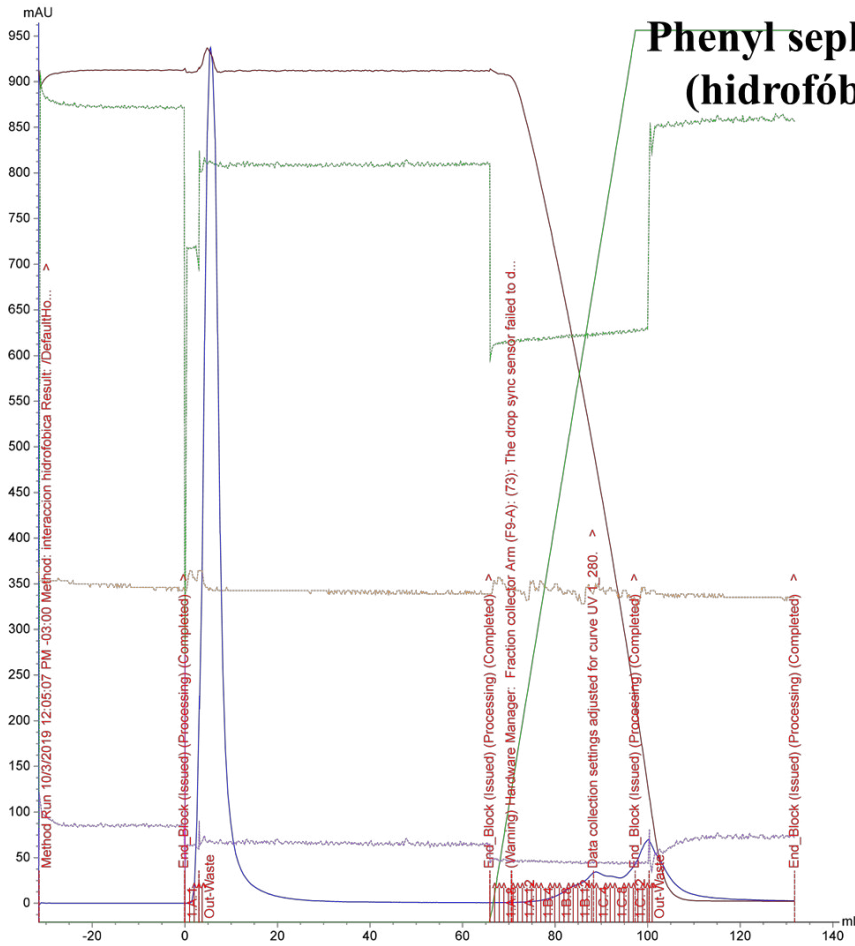




### Test de separación en Superose 12 10/300 GL



## Cromatografía en Phenyl sepharose



### Phenyl sepharose (hidrofóbica)

#### Buffer de equilibrio

- TRIS 50mM,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.5M (35%) pH 7.5

#### Buffer elusión

- TRIS 50mM pH 7.5

#### Muestra

- A saturación de 35 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$