

ASPARAGINASAS FÚNGICAS: ENZIMAS CON FUTURO

M. Martínez⁽¹⁾, L. Levin⁽²⁾, P. Babay⁽³⁾, S. Pereira⁽²⁾

memartinez@inti.gov.ar

⁽¹⁾ Dto. de Ingredientes Activos y Biorrefinería-GODTEI-SOlyS – INTI.

⁽²⁾ Laboratorio de Micología Experimental-Dpto. de Biodiversidad y Biología Experimental- Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, InMiBo, CONICET.

⁽³⁾ Gerencia Química – CNEA

Palabras Clave: Asparaginasas, enzimas fúngicas, acrilamidas

INTRODUCCIÓN

La L-asparaginasa (E.C. 3.5.1.1: L-asparagina amidohidrolasa) es una enzima que cataliza la hidrólisis de L-asparagina en L-aspartato y amonio. Además de su uso farmacológico como anticancerígeno [1], tiene aplicación en la industria alimenticia para reducir los niveles de acrilamida en alimentos [2].

Fue descubierta a mediados de los '50. Hoy se emplea para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda (LLA), la leucemia mieloblástica aguda (LMA) y otros tipos de linfomas [3].

Por otra parte, su uso en la industria alimenticia reduce los niveles de acrilamida en los alimentos. Esta sustancia, genotóxica y carcinogénica, se forma por la reacción de la asparagina con los carbohidratos a temperaturas superiores a 120°C durante la elaboración de productos alimenticios como panes, galletas, *snacks*, cereales, cacao, café, etc.

Las L-asparaginasas que se utilizan en el tratamiento de linfomas son de origen bacteriano (*Escherichia coli* (EcA) y *Erwinia chrysanthemi* (ErA)) y se utilizan en combinación con otros agentes quimioterapéuticos. Estas enzimas son efectivas, pero producen varias reacciones adversas, ejemplo: hipofibrinogenemia, hipoalbuminemia, hiperglicemia, hiperlipidemia, pancreatitis aguda, eventos trombóticos y reacciones alérgicas.

Debido a estos inconvenientes el mercado farmacéutico se encuentra en una constante búsqueda de nuevas fuentes de asparaginasas.

OBJETIVOS

Explorar e identificar nuevas cepas fúngicas como fuentes alternativas para la producción de L-asparaginasa. Seleccionar las condiciones de cultivo que incrementen su producción.

Aislar, purificar y caracterizar a la enzima y finalmente escalar su producción.

DESARROLLO

De acuerdo a una búsqueda bibliográfica se seleccionaron cepas de distintas colecciones, entre ellas BAFCCult (FCEN-UBA) y algunas cepas comerciales y se evaluó su capacidad para producir esta enzima en medio agarizado.

Actividad asparaginasa en medio agarizado

Para la determinación de dicha capacidad se consideró la reacción de desaminación catalítica que produce la L-asparaginasa convirtiendo al aminoácido esencial asparagina en ácido aspártico y amoníaco, la detección (halo de hidrólisis azul en la placa verde por la alcalinización del medio) de algunos de los productos mencionados implican que existe actividad asparaginasa.

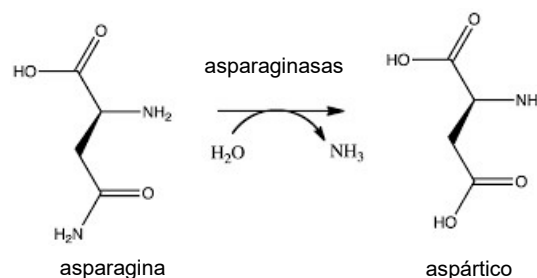


Figura 1: esquema de la reacción de L-asparaginasas

Se evaluó la producción enzimática (37 cepas) en placas de Petri con medio agarizado Czapek-Dox modificado (compuesto por 2 g de glucosa, 10 g L-asparagina, 1,52 g KH₂PO₄, 0,52 g KCl, 0,52 g MgSO₄·7H₂O, CuNO₃·3H₂O (trazas), ZnSO₄·7H₂O (trazas), FeSO₄·7H₂O (trazas), 20 g agar por litro de cultivo, pH inicial=6,2). También se empleó el medio GA [4], compuesto por 10 g de glucosa, 4 g de asparagina, medio basal: MgSO₄·7H₂O, HK₂PO₄, H₂KPO₄, solución de micro y

macronutrientes, tiamina y biotina, 20 g de agar por litro de cultivo, pH inicial=6,2.

En ambos casos se agregó 0,009 % azul de bromotimol como indicador de pH (amarillo a pH ácido y azul pH alcalino). La actividad asparaginasa se detectó como un halo azul en la placa amarilla - verdosa (presencia de NH_3) [5] (Fig. 2. A). Se determinó la velocidad de crecimiento midiendo el diámetro de colonia a distintos tiempos.

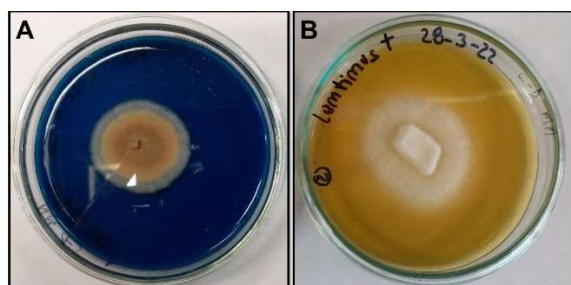


Figura 2: descripción del medio de cultivo sólido. **A.** Presencia de asparaginasa. Detección de una cepa productora de L- asparaginasa: placa inoculada con una cepa de *Aspergillus sp. 2-LET-A-153* en medio agarizado Czapek-Dox modificado, suplementado con 0,009% azul de bromotimol (BTB).

B. Ausencia de asparaginasa. *Lentinus tigrinus* BAF 197 en medio agarizado Czapek-Dox modificado, suplementado con 0,009% azul de bromotimol (BTB). La ausencia de color azul evidencia la falta de actividad asparaginasa.

Actividad asparaginasa en medio líquido:

Las distintas cepas fúngicas fueron también cultivadas en medio Czapek-Dox líquido con el objetivo de corroborar su capacidad para producir asparaginasa. Se incubaron en condiciones estáticas a 28°C durante 15 días y luego el sobrenadante de cultivo se separó por filtración y se utilizó como fuente de enzima. Para evidenciar la actividad asparaginasa se empleará un reactivo que detecta el producto de la reacción enzimática (NH_4OH) mediante la reacción de Berthelot [6]. El amoníaco producido reacciona con el hipoclorito de sodio y el fenol para producir el indofenol de color azul, el cual se valora espectrofotométricamente. Alternativamente se empleará electroforesis capilar para determinar los productos de la reacción.

RESULTADOS

En la revisión bibliográfica realizada se verificó que distintas especies fúngicas son capaces de producir asparaginasa, pertenecientes a las divisiones Ascomycota (ej. *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Penicillium*) y Basidiomycota (*Ganoderma lucidum* y *Flammulina velutipes*: ambas productoras de basidiocarpos

comestibles y polisacáridos con diversas propiedades medicinales).

Tomando como base la información bibliográfica se seleccionaron y probaron 37 cepas fúngicas de Asco y Basidiomycota, para la detección de la actividad asparaginasa. quince de estas cepas dieron resultados positivos en el ensayo en medio agarizado y los 22 restantes no evidenciaron actividad (Fig. 2. B). Estos resultados serán corroborados en los ensayos en medio líquido.

CONCLUSIONES

En base al relevamiento realizado se pudieron identificar distintas cepas fúngicas con capacidad para producir asparaginasa. En una etapa posterior se propone identificar a los más activos productores de dicha enzima (cepas que produzcan mayor actividad enzimática), optimizar las condiciones de cultivo para incrementar los títulos secretados y caracterizar y purificar la enzima.

Por último, cabe destacar que este proyecto es de interés institucional y contribuye al desarrollo tecnológico, a la promoción de la innovación y a la sustitución de importaciones, dado que esta enzima no se produce ni en Argentina ni en América Latina.

Índice TRL:3

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo es parte de una tesis doctoral presentada en el Dpto. de Biodiversidad y Biología Experimental (DBBE) -FCEyN.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Salzer, *et al.*, "Erwinia asparaginase achieves therapeutic activity after asparaginase allergy: a report from the Children's Oncology Group". *Blood*, J Am Soc Hematol. (122), 2013, 507-514.
- [2] Ray; *et al.* "Isolation and characterization of microbial asparaginase to mitigate acrylamide formation in food". *Adv Plant Microb Biotechnol.* 2019,95-100.
- [3] Castro *et al.*, "L-asparaginase production review: bioprocess design and biochemical characteristics", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(11), junio 2021, 4515-4534.
- [4] Levin *et al.*, "Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes troglodytes*". *Mycologia*, 94(3), 2002, 377-383.
- [5] Gulati *et al.* "A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing micro-organisms". *Letters in applied microbiology*, 24(1), 1997, 23-26.
- [6] Park *et al.*, "Improvement of the ammonia analysis by the phenate method in water and wastewater". *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 30(9), 2009, 2032-2038.

