

# ASPARAGINASAS FÚNGICAS: ENZIMAS CON FUTURO

M. Martínez <sup>(1)</sup>, L. Levin <sup>(2)</sup>, P. Babay <sup>(3)</sup>, S. Pereira <sup>(2)</sup>

[memartinez@inti.gov.ar](mailto:memartinez@inti.gov.ar)

<sup>(1)</sup> Dto. de Ingredientes Activos y Biorrefinería-GODTEI-SOlyS – INTI.

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

<sup>(3)</sup> 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-asparaginasas. 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 asparaginasas 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 asparaginasas.

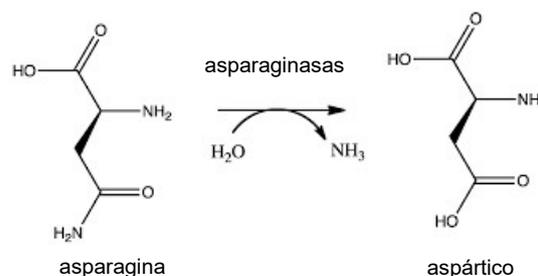
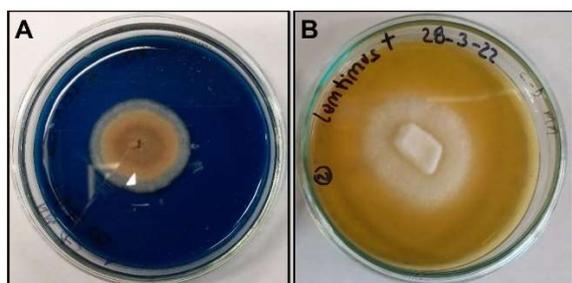


Figura 1: esquema de la reacción de L-asparaginasas

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 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,52 g KCl, 0,52 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, CuNO<sub>3</sub>·3H<sub>2</sub>O (trazas), ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (trazas), FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (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: MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, HK<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>KPO<sub>4</sub>, 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  $\text{NH}_3$ ) [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* BAFC 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 ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) 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.

