

Caracterización bioinformática y producción de L-asparaginasa de *Bacillus* sp. M62 aislado de las salinas de Maras, Cusco, Perú

Bioinformatic characterization and production of L-asparaginase from *Bacillus* sp. M62 isolated from the Maras saltern, Cusco, Peru

Susana Calderón-Toledo*¹

<https://orcid.org/0000-0001-7401-3291>
susana.calderon2@unmsm.edu.pe

Ysamar Tapia-Bañez¹

<https://orcid.org/0000-0001-6199-254X>
12040032@unmsm.edu.pe

Karim Jiménez-Aliaga¹

<https://orcid.org/0000-0001-8234-8358>
kjimeneza@unmsm.edu.pe

Cynthia Esquerre-Huallpa¹

<https://orcid.org/0000-0002-2727-8884>
cesquerreh@unmsm.edu.pe

Amparo Iris Zavaleta¹

<https://orcid.org/0000-0003-3844-7185>
azavaletap@unmsm.edu.pe

*Corresponding author

1. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Laboratorio de Biología Molecular, Lima, Perú.

Citación

Calderón-Toledo S, Tapia-Bañez Y, Jiménez-Aliaga K, Esquerre-Huallpa C, Iris Zavaleta A. 2023. Caracterización bioinformática y producción de L-asparaginasa de *Bacillus* sp. M62 aislado de las salinas de Maras, Cusco, Perú. Revista peruana de biología 30(1): e22411 001- 010 (Marzo 2023). doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v30i1.22411>

Presentado: 28/02/2022

Aceptado: 26/01/2023

Publicado online: 15/03/2023

Editor: Pedro Romero

Resumen

El objetivo del estudio fue realizar la caracterización bioinformática, así como optimizar la producción de L-asparaginasa extracelular de *Bacillus* sp. M62 aislada de las salinas de Maras (Cusco). Para ello, se verificó la producción de L-asparaginasa mediante el viraje del medio M9 modificado con azul de bromofenol 0.0075%, pH 7.4 a 37 °C por 72 h. A la vez, se extrajo el ADN genómico para amplificar los genes ribosómicos 16S y el gen *ansA3*. La secuencia aminoacídica codificada por el gen *ansA3* se predijo mediante análisis bioinformático. La producción de L-asparaginasa intracelular y extracelular se evaluó a diferentes niveles de glucosa, L-asparagina, NaCl y pH en el medio M9 modificado. Adicionalmente, las actividades enzimáticas de L-asparaginasa y L-glutaminasa se determinaron mediante cuantificación del amonio liberado por el método de Nessler. Así, *Bacillus* sp. M62 produjo el viraje del medio M9 modificado, obtuvo alta similitud y cercanía evolutiva con *Bacillus licheniformis*, se encontró que el gen *ansA3* amplificado codificaba para 319 aa, dentro de la cual se predijo una secuencia patrón del sitio activo (GFVITHGTDTM) y 15 sitios inmunogénicos. La producción de L-asparaginasa extracelular fue superior a la intracelular, la que se optimizó de 0.37 U/mL (0.24 U/mg) a 2.15 ± 0.39 U/mL (0.63 U/mg). Finalmente, se encontró que *Bacillus* sp. M62 presenta L-asparaginasa extracelular con mínima actividad de L-glutaminasa.

Abstract

The aim of this study was to perform bioinformatics characterization and optimize the production of extracellular L-asparaginase from *Bacillus* sp. M62, isolated from the Maras salt ponds (Cusco). To achieve this, the production of L-asparaginase was verified by the change in color of modified M9 medium, containing 0.0075% bromophenol blue, at pH 7.4 and 37°C for 72 hours. Genomic DNA was extracted to amplify the 16S ribosomal genes and the *ansA3* gene. The amino acid sequence encoded by the *ansA3* gene was predicted using bioinformatic analysis. The production of intracellular and extracellular L-asparaginase was evaluated at different levels of glucose, L-asparagine, NaCl, and pH in modified M9 medium. Additionally, the enzymatic activities of L-asparaginase and L-glutaminase were determined by quantifying the released ammonium using the Nessler method. *Bacillus* sp. M62 showed the change in color of the modified M9 medium, high similarity, and evolutionary closeness to *Bacillus licheniformis*. The amplified *ansA3* gene was found to encode for 319 amino acids, with a predicted active site pattern (GFVITHGTDTM) and 15 immunogenic sites. The production of extracellular L-asparaginase was found to be higher than intracellular L-asparaginase and was optimized from 0.37 U/mL (0.24 U/mg) to 2.15 ± 0.39 U/mL (0.63 U/mg). Finally, it was found that *Bacillus* sp. M62 presents extracellular L-asparaginase with minimal L-glutaminase activity.

Palabras clave:

L-asparaginasa; *Bacillus* sp. halotolerante; gen *ansA3*; salinas de Maras.

Keywords:

L-asparaginase; *Bacillus* sp. halotolerant; gen *ansA3*; Maras salt ponds.

Introducción

La L-asparaginasa (E.C.3.5.1.1) hidroliza la L-asparagina a ácido L-aspártico y amonio (Shakambari et al. 2019). Se señala que esta enzima disminuye las concentraciones de L-asparagina sérica en pacientes con leucemia linfoblástica aguda, conllevando a la muerte de células cancerígenas (Cachumba et al. 2016). Sin embargo, también se ha observado reacciones negativas, como las causadas por algunas L-asparaginasa que presentan además actividad de L-glutaminasa, lo cual se relaciona con hepatitis, leucopenia, neurotoxicidad, hiperglicemia y coagulopatías (Offman et al. 2011; Fonseca et al. 2021). Asimismo, las L-asparaginasa comerciales muestran baja biodisponibilidad plasmática, desarrollo de anticuerpos y causan reacciones de hipersensibilidad en el 30% al 70% de los pacientes tratados (Zenatti et al. 2018).

La L-asparaginasa también se usa en la industria alimentaria para disminuir la concentración de acrilamida en alimentos termoprocesados, debido a que los azúcares reductores reaccionan con L-asparagina (Muttukumar et al. 2017; Rifai & Saleh 2020). De esta manera, el tratamiento previo de estos alimentos con L-asparaginasa reduce los niveles de acrilamida en aproximadamente el 90% en papas fritas y productos de panificación, entre otros (Ciesarovát et al. 2009; Mohan et al. 2014).

La L-asparaginasa es producida por microorganismos, vegetales y animales, siendo los primeros la fuente más importante debido a su rápida producción, además de permitir una eficiente purificación de la enzima y su escalamiento (Cachumba et al. 2016). Entre los microorganismos utilizados en la producción de L-asparaginasa se encuentran los *Streptomyces*, *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Staphylococcus*, *Rouxiiella*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* (Erva et al. 2018; Arévalo-Tristancho et al. 2019; Gilavand et al. 2019; Prihanto et al. 2019; Setiawan & Larasati 2019). Sin embargo, para lograr altos niveles de producción se requiere buena estabilidad en condiciones extremas, como la que han demostrado bacterias que mantienen actividad con alta eficiencia y termoestabilidad (Zuo et al. 2015). Así, microorganismos halotolerantes y halófilos poseen mecanismos celulares capaces de resistir elevadas concentraciones salinas y diferentes valores de pH y temperatura; además producen diversos metabolitos y enzimas (Abdelrazek et al. 2020; Aishwariya et al. 2020). Aunque los géneros bacterianos de ambientes halófilos como *Halomonas*, *Marinobacter* y *Bacillus* han sido caracterizados por la producción de L-asparaginasa, sigue pendiente la optimización de su producción y su posterior escalamiento y aplicación en la industria farmacéutica y alimentaria (Zolfaghar et al. 2019).

Por la importancia de la L-asparaginasa, en este trabajo se da a conocer la caracterización bioinformática y la optimización de la producción de L-asparaginasa producida por la cepa *Bacillus* sp. M62 aislada de las salinas de Maras (Cusco, Perú).

Material y métodos

Material biológico. La cepa *Bacillus* sp. M62 fue aislada de las salinas de Maras (13.303646°S, 72.154182°W),

pertenece al cepario del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Esta cepa es conservada a -20 °C en caldo tripticosa soya (NaCl 50 g, MgCl₂·6H₂O 5 g, MgSO₄·7H₂O 5.8 g, KCl 1.2 g, Tris 8 mM y CaCl₂·2H₂O 8 mM para 1 L, y glicerol 30% (v/v)) (Dyall-Smith et al. 2009).

Detección de producción de L-asparaginasa. *Bacillus* sp. M62 se cultivó a 37 °C por 72 h en medio M9 modificado: Na₂HPO₄ 6 g/L, KH₂PO₄ 2 g/L, NaCl 30 g/L, L-asparagina 5 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L, CaCl₂·2H₂O 0.15 g/L y glucosa 2 g/L, con azul de bromofenol 0.0075% a pH 7.4 (Gulati et al. 1997).

Producción enzimática. *Bacillus* sp. M62 se sembró en medio M9 modificado en proporción área/volumen de 5, inóculo 2% (v/v) (DO:1.0), se incubó a 37 °C con agitación a 120 RPM y cultivó por 24, 48, 72 y 96 h. Después, se centrifugó a 7942 rcf por 15 min y se separó el sobrenadante (extracto crudo) que se usó para la cuantificación de la actividad enzimática extracelular. Asimismo, la biomasa fue lavada y resuspendida en buffer conteniendo Tris 50 mM, EDTA 10 mM, pH 7.5, sonicada durante 80 ciclos de 2 s activos y 5 s de descanso. Luego, se centrifugó a 9928 rcf por 25 min y el sobrenadante se usó para la cuantificación de la actividad enzimática intracelular.

Determinación de las actividades L-asparaginasa y L-glutaminasa. Se llevó a cabo según Shiffrin y Parrott (1974). La determinación de ambas actividades se realizó mediante cuantificación del amonio liberado usando L-asparagina o L-glutamina 189 mM en buffer Tris 50 mM pH 8.6, que reaccionó con el reactivo de Nessler y se midió su absorbancia en un espectrofotómetro UV-visible (Eppendorf, Alemania) a 436 nm. Además, se realizó una curva de calibración usando sulfato de amonio, y se consideró una unidad internacional (UI) de actividad como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μmol de amonio por mL por min a pH 8.6 y 37 °C.

Cuantificación de proteínas. El método del ácido bicíncónico fue utilizado para la cuantificación de proteínas. Las muestras fueron incubadas en microplacas de 96 pocillos por 30 min a 37 °C, después se leyó en un lector de microplacas (Infinite M200PRO, TECAN) a 562 nm.

Identificación molecular de la cepa. El ADN genómico se extrajo usando proteinasa K (0.3 μg/μL) y SDS (9 μg/μL), luego del cual fue purificado con una solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y precipitado en etanol absoluto y acetato de sodio 3 M (Calderón-Toledo et al. 2021). El gen ribosómico 16S se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los primers F:5'-AGAGTTTGTATCATGGCTCAG-3' y R:5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'. Las condiciones de la PCR fueron: desnaturalización inicial a 94 °C por 4 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 45 s, hibridación a 55 °C por 1 min, extensión a 72 °C por 45 s; finalizando con una extensión a 72 °C por 7 min (Canales et al. 2014). Los productos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 1% con buffer

TBE 1X. Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante los programas Bioedit y Cap3, luego se identificó la similitud con las secuencias nucleotídicas del NCBI mediante el algoritmo BLAST (Huang and Madan 1999; Hall et al. 2011).

Obtención del gen que codifica para la L-asparaginasa y análisis bioinformático. El gen *ansA3* se amplificó usando los primers *ansA3* FP (5'-GAA CTC TGG GGA TCC ATG AAA AAG TTA CTG CTG TTG-3') y *ansA3* RP (5'-AGG TTC CAA GAATTC TTATAT GAT GATATC GTC TGC-3') (Sudhir et al. 2014). Las condiciones de la reacción de PCR fueron similares a lo descrito para la identificación molecular con la diferencia en la etapa de hibridación a 59 °C por 30 s. El producto fue secuenciado y analizado utilizando los programas Bioedit, Cap3, GeneMark para determinar la secuencia aminoacídica, y el algoritmo BLASTP. Se realizó un alineamiento múltiple con las secuencias tipo pertenecientes al género *Bacillus* y se identificó el modelo evolutivo con mejor ajuste utilizando el programa MEGA (Kumar et al. 2018). Luego, se utilizó el método de inferencia filogenética de máxima verosimilitud utilizando el soporte estadístico Bootstrap con 1000 réplicas. Asimismo, se determinaron las regiones antigénicas mediante el programa predictor ANTIGENIC diseñado por EMBOSS (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/antigenic>). Además, el programa ExPasy Prosite (<https://prosite.expasy.org/cgi-bin/prosite>) fue usado para identificar el sitio activo de la enzima. La estructura secundaria fue predicha usando el programa PSIPRED.

El gen *ansA3* amplificado fue de aproximadamente 1000 pb y depositado en GenBank con el código 2601072.

Optimización de producción de L-asparaginasa. Se analizó el impacto de las concentraciones de: glucosa (1, 2, 3, 4 y 5 g/L), asparagina (5, 10, 15, 20 y 25 g/L), NaCl (10, 20, 30, 40 y 50 g/L) y el efecto del pH (5, 6, 7, 8 y 9). Para ello, se utilizó un inóculo de 2% (v/v) en medio M9 modificado, el cual tuvo una DO:1.0. Para el diseño experimental se mantuvo un medio salino: Na₂HPO₄ 6 g/L, KH₂PO₄ 2 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L y CaCl₂·2H₂O 0.15 g/L; y las condiciones de cultivo fueron a 37 °C, 180 RPM por 24 h.

Análisis estadístico. Las corridas experimentales fueron realizadas por triplicado, analizados estadísticamente con GraphPad Prism 8.0.1; los gráficos se construyeron con la representación de la media y la desviación estándar.

Resultados y discusión

Producción enzimática. En los ambientes salinos habitan diversos microorganismos caracterizados por la producción de metabolitos que sirven para equilibrar su presión osmótica ante las condiciones salinas extremas y su efecto desnaturalizante (Ebrahiminezhad et al. 2011). En estos ambientes como el Mar Rojo, se ha podido aislar bacterias que logran producir L-asparaginasa entre 1.56 y 8.10 U/mL (Alrumman et al. 2019). En Perú, bacterias con tolerancia hasta de 20% de salinidad y productoras de L-asparaginasa han sido encontradas en las salinas de Maras (Cusco), Pilluana (departamento de San Martín)

y Chilca (Lima) (Montes et al. 2021). La cepa *Bacillus* sp. M62 aislada de la salina de Maras demostró tener actividad L-asparaginasa, como ha sido reportado para otros *Bacillus* como *B. licheniformis*, *B. alvei*, *B. subtilis*, *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. cereus*, adaptados a sobrevivir en condiciones de altas salinidad y producir elevados niveles de L-asparaginasa (Shirazian et al. 2016; Patil & Jadhav 2017).

Algunas bacterias requieren altas condiciones de salinidad, como *Bacillus aryabhatai* A3, aislado del lago Urmia, que produjo asparaginasa en medio M9 con NaCl 10% (Moghadam & Khadivi 2019). Así, estudios de la microbiota de sedimentos del golfo pérsico han reportado que las bacterias halotolerantes en ambientes salinos y productores de L-asparaginasa pertenecen a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Zobellella*, *Oceanimonas*, entre otros (Izadpanah et al. 2014). Por otra parte, *Lactobacillus salivarius*, aislado del mar de la India, demostró producir L-asparaginasa mediante fermentación sumergida, obteniendo máximos valores (11.02 μmol amonio/mL) a los cinco días de cultivo (Bhargavi & Jayamadhuri 2016). En este trabajo la actividad L-asparaginasa evidenciada mediante el viraje del indicador en el medio M9 se presentó después de 72 h de fermentación, lo que concuerda con lo reportado en otras bacterias endofíticas (War Nongkhaw & Joshi 2015).

Especies de *Bacillus* han demostrado que pueden producir L-asparaginasa ya sea a nivel intracelular o extracelular; sin embargo, la producción extracelular presenta ventajas por su facilidad de purificación y escalamiento, además de menor presencia de proteasas (Pradhan et al. 2013). De suelos de Arabia se identificaron *Bacillus* spp. y *Staphylococcus* spp. con alta producción de L-asparaginasas extracelulares en fermentación sumergida (El-Dein et al. 2019). En el presente estudio, *Bacillus* sp. M62 produjo 0.37 U/mL (0.24 U/mg) de L-asparaginasa extracelular a las 96 h de fermentación y 0.22 U/mL (0.03 U/mg) a nivel intracelular a las 48 h con agitación a 120 RPM (Fig. 1).

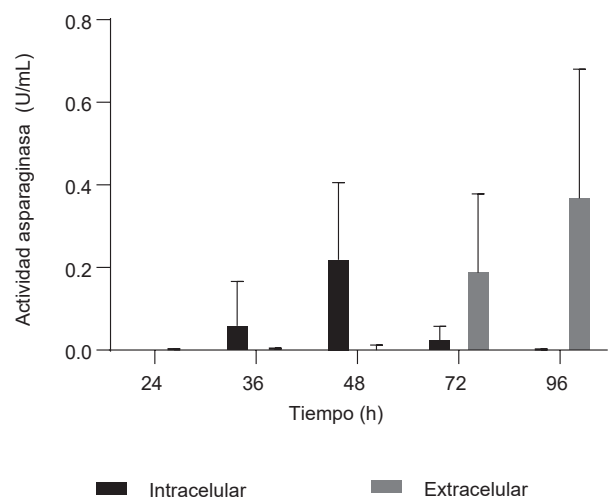


Figura 1. Actividad L-asparaginasa intracelular y extracelular de *Bacillus* sp. M62 mediante método Nessler en relación con el tiempo de fermentación.

De forma similar, se ha reportado que *B. licheniformis* MG665995 produjo actividades que superan en 305% a la intracelular, además, esta cepa produce L-asparaginasas de los tipos I y II a nivel intracelular y extracelular respectivamente, el tipo II posee alta afinidad por el sustrato a comparación de la intracelular (Abdelrazek et al. 2019). Además, *Staphylococcus* sp. MGM1 aislado de suelos; *Pseudomonas aeruginosa* 50071 y *Acinetobacter baumannii* S4 obtenidos de muestras clínicas producen L-asparaginasas extracelulares (El-Bessoumy et al. 2004; Muslim et al. 2016; Ebrahimipour et al. 2020).

Identificación molecular y análisis bioinformático. El ensamblado de las secuencias de los genes ribosómicos 16S se realizó a fin de obtener la secuencia consenso, que mediante el algoritmo BLASTN presentó 99.86% de similitud (1413/1415) con *Bacillus licheniformis*. El gen *ansA3* amplificado fue de aproximadamente 1000 pb (Fig. 2), depositado en GenBank con el código 2601072, codifica para una proteína de 326 aa, la cual presentó 99.69% de similitud con otras L-asparaginasas del género *Bacillus*.

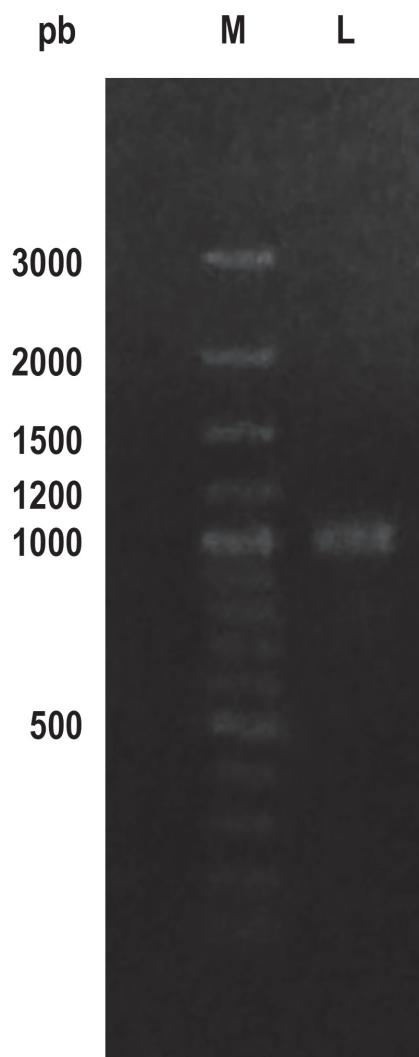


Figura 2. Gen *ansA3* amplificado (L) de *Bacillus* sp. M62 y marcador de peso molecular Ladder 100 pb (M) en gel de agarosa 1%.

El análisis *in silico* indica que el gen *ansA3* codifica una proteína de 35.4 kDa, la cual posee un sitio activo de *O*-isoaspartil treonina intermedio. Además, se identificó el dominio de 319 aa, así como el centro activo descrito con el patrón PS00917, GFVITHGDTM, localizado entre los residuos 75 y 85, así como los aminoácidos treonina y ácido aspártico aledaños que se unen al sustrato (Material suplementario 1). La estructura secundaria (Fig. 3) está conformada por alfa hélices (29.75%, 97 aa) y hojas beta (18.40%, 60 aa). El predictor de topología identificó 286 aa pertenecientes a la zona extracelular; 16 residuos de hélice transmembrana, formando el revestimiento del poro y 24 en la región intracelular. Asimismo, se identificaron 15 sitios inmunogénicos (Material suplementario 2), similar a la enzima de *Erwinia chrysanthemi* DB08886 y menor número a los identificados para la de *E. coli* DB00023 (que tiene 18 sitios), por lo cual su aplicación terapéutica podría presentar menor grado de inmunogenicidad y mejores valores de biodisponibilidad plasmática.

Se consideró el mejor modelo evolutivo al de Le y Gascuel (2008) con distribución discreta gamma. El análisis filogenético identificó que la enzima de *Bacillus* sp. M62 presenta una alta similitud de secuencia aminoácida con L-asparaginasa de *B. licheniformis* ATCC 14580 (Fig. 4).

Optimización de la producción de L-asparaginasa. La productividad de L-asparaginasa está relacionada a los factores físicos y químicos que afectan su cultivo, como el pH. En nuestro trabajo, *Bacillus* sp. M62 produjo 0.91 U/mL de L-asparaginasa a pH 8.0 (Fig. 5). En otros casos, *B. subtilis* VUVD001 mejoró su producción hasta 2.88 U/mL (3.2 veces) a pH 7.56 (Erva et al. 2018), y *B. licheniformis* PPD37 halotolerante incrementó seis veces su producción a pH 7.5 en medio M9 (Patel et al. 2021).

La mejor producción a niveles alcalinos se explicaría por que el aspartato liberado a partir de L-asparagina posee baja afinidad por el sitio catalítico, mientras que a valores ácidos genera ácido aspártico e impide la unión de la L-asparaginasa a L-asparagina (Abdelrazek et al. 2019). Así, valores de pH 7.0 permitieron la producción óptima de L-asparaginasa en *B. megaterium* MG1 (Pal et al. 2019). De forma similar, *Serratia marcescens* NCIM 2919 mejoró su producción a pH 7.0, y bacterias aisladas de suelos de Solapur (India) produjeron hasta 103.70 U/mL optimizando su fermentación a pH 7.0, luego del cual se evidenció decrecimiento y mínima productividad a partir de pH 10 (Ghosh et al. 2013; Shaikh Khaled & Khobragade 2016). No obstante, *B. licheniformis* KCU-KH14 y *B. velezensis* KB-9, aislados del mar Rojo en Arabia Saudita, revelaron máxima producción a pH 6.5, luego del cual disminuyó considerablemente, en tanto *B. australimaris* NJB19 produjo 37.93 U/mL a pH 6.77 (Alrumman et al. 2019; Mostafa et al. 2019; Chakravarty et al. 2021). Por el contrario, Shakambari et al. (2020) y Venil et al. (2009), demostraron que el pH no es un factor significativo para la producción en *Pseudomonas plecoglossicida* RS1 y *Serratia marcescens* SB08.

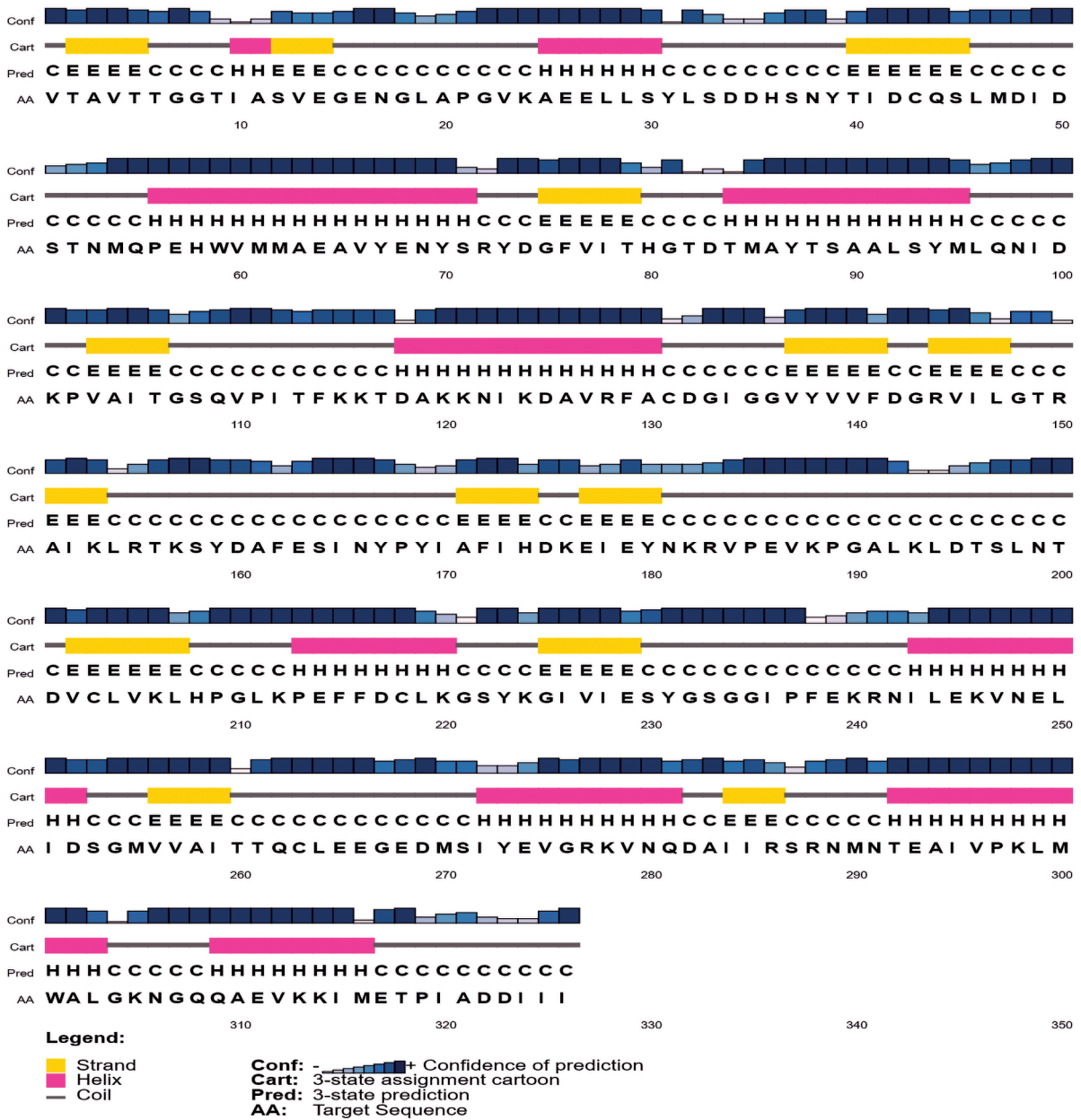


Figura 3. Estructura secundaria de L-asparaginasa de *Bacillus* sp. M62 predicha mediante PSIPRED.

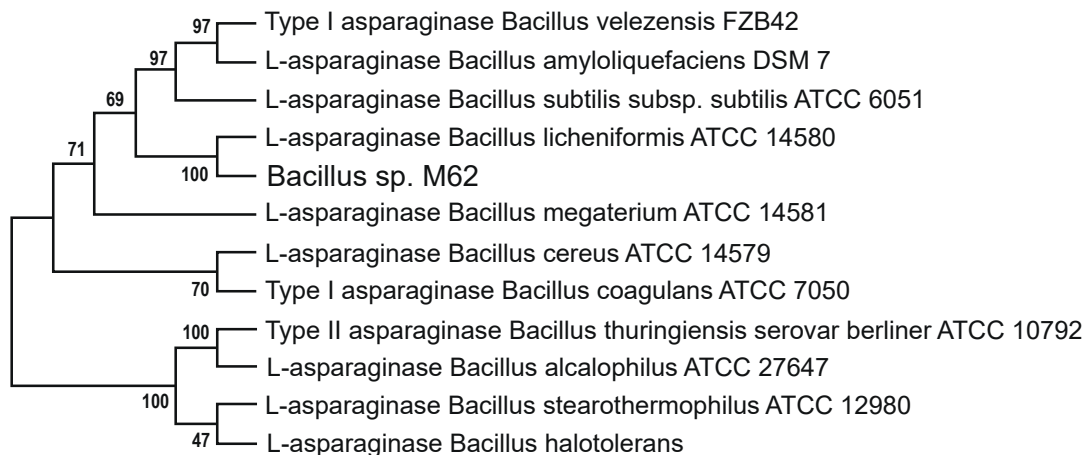


Figura 4. Árbol filogenético con base a los genes *ansA3* de *Bacillus* sp. M62 y otras especies según soporte Bootstrap.

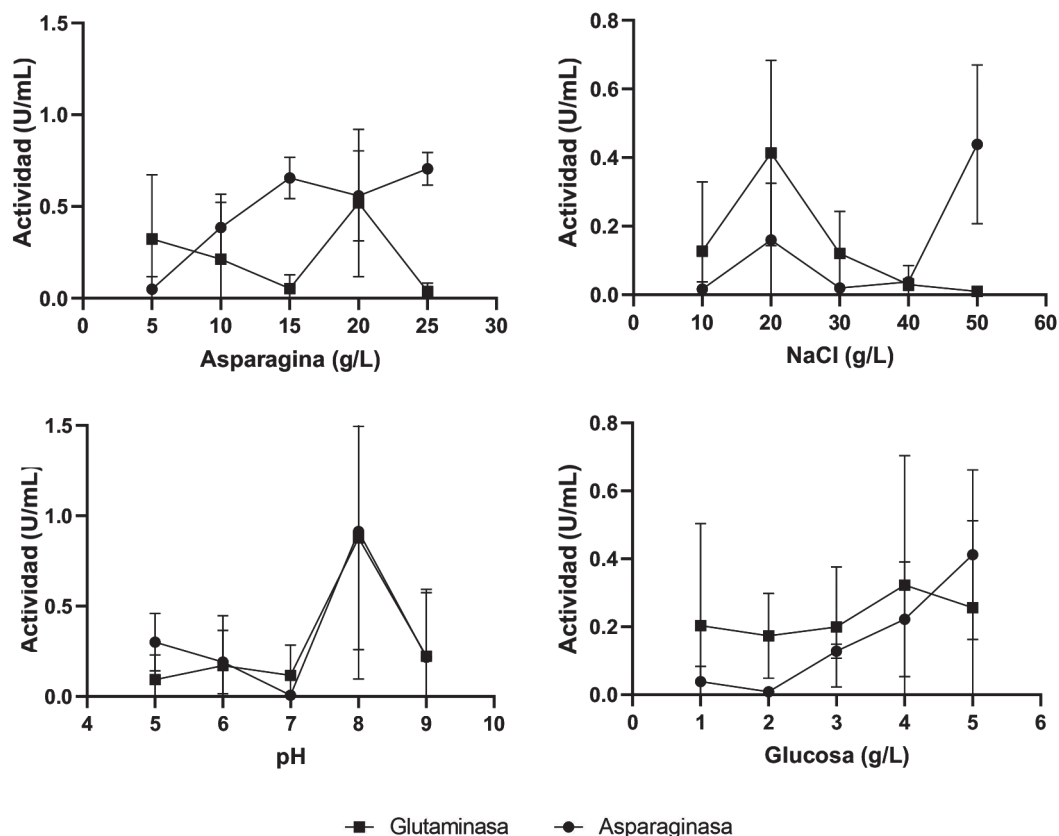


Figura 5. Efectos de L-asparagina, glucosa, NaCl y pH sobre la producción de L-asparaginasa y L-glutaminasa por *Bacillus* sp. M62.

Otro factor significativo es el nivel de salinidad, así, se ha reportado que *B. licheniformis* PPD37 produjo hasta 17 U/mL con una concentración de NaCl de 0.8 g/L (Patel et al. 2021). No obstante, con un aumento a 29.20 g/L se incrementa la actividad en 48%, debido a la flexibilidad estructural de L-asparaginasa estimulada por la salinidad (Abdelrazek et al. 2019). También, *Bacillus aryabhatai* B8W22, obtenido del lago salado de Urmia, produjo 61.70 U/mL con NaCl 30 g/L (Shirazian et al. 2016). De igual forma, Gilavand et al. (2019) reportaron mejores niveles de producción a NaCl 30 g/L usando *Rouxiella* AF1. Sin embargo, en el presente estudio se obtuvo 0.44 U/mL con mínima actividad L-glutaminasa a NaCl 50 g/L. Por el contrario, *Arthrospira platensis* NIES-39 mejoró su producción de 0.17 a 0.28 U/mg con 10 g/L (Prihanto & Wakayama 2014). A la vez, Mahajan et al. (2012) y Shakambari et al. (2020), determinaron que este factor no es significativo en la producción de L-asparaginasa de *B. licheniformis* RAM-8, y *Pseudomonas plecoglossicida* RS1.

La L-asparagina fue la única fuente de nitrógeno usada para la producción de L-asparaginasa por *Bacillus* sp. M62, debido a la mayor actividad L-asparaginasa obtenida en comparación con L-arginina, NaNO_3 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en otras cepas de *Bacillus* (Rahimzadeh et al. 2016). Su efecto como inductor de L-asparaginasa se verificó en *P. aeruginosa* WCHPA075019 con la obtención de 170.70 U/mg, superior a lo obtenido con extrac-

to de levadura, peptona, glutamina y arginina (Amany et al. 2021). También, Jetty et al. (2017), reportaron como significativo el uso de L-asparagina en *Pectibacterium carotovorum* MTCC 1428, por la cual se obtuvo hasta 26 U/mL. En el presente estudio se alcanzó la mejor producción (0.71 U/mL) con L-asparagina 25 g/L, menor a lo requerido por *B. licheniformis* RAM-8, que utilizó L-asparagina 40 g/L para producir 32.26 U/mL (Mahajan et al. 2012). Así mismo, *Bacillus altitudinis* BITHSP010 aumentó su producción usando L-asparagina 20 g/L, luego del cual se observó disminución en su actividad (Prakash et al. 2020). No obstante, *Lactobacillus* sp. produjo 131 U/mg usando L-asparagina 17.5 g/L, suplementado con extracto de levadura 12.5 g/L (Dinarvand et al. 2020). De igual forma, *Pseudonocardia endophytica* VUK-10 registró 7.42 U/mL con L-asparagina 10 g/L y *B. australimaris* NJB19 37.93 U/mL con 24.4 g/L de este aminoácido, mientras que *Lysinobacterium fusiformis* B27 produjo 9.47 U/mL con 20 g/L (Kiranmayi et al. 2014; Prihanto et al. 2019; Chakravarty et al. 2021). También, Golbabaie et al. (2020), predijeron utilizando un diseño compuesto central hasta 1.73 U/mL usando L-asparagina 10 g/L en *Sarocladium strictum* AG90, sin considerarlo significativo, además, *Bacillus* sp. GH5 incrementó su producción de 9.57 a 45.37 U/mL usando L-asparagina 5 g/L y gelatina 5 g/L como fuentes de nitrógeno (Gholamian et al. 2013).

La glucosa es la fuente de carbono que induce mayor actividad de L-asparaginasa en comparación con maltosa en *Bacillus* DKMBT10 y sacarosa en coliformes, con máximos valores a las 24 h de fermentación (Moorthy et al. 2010; Shah et al. 2010). Así, la mejor producción (0.41 U/mL) fue obtenida con 5 g/L, ya que mayores concentraciones generan fermentación incompleta al no ser metabolizados todos los azúcares. Su efecto represor se basa en la disminución de AMPc y la inhibición de catabolitos de los componentes de transporte de lactato ligados a la síntesis de L-asparaginasa (Garaev & Golub 1977). En consecuencia, cepas coliformes obtuvieron mejor producción (650 U/mL) con 10 g/L y valores superiores evidenciaron su efecto represor (Shah et al. 2010). *Zymomonas mobilis* ATCC 35001 registró mejor producción con una relación 1:0.025 para sacarosa y extracto de levadura como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente, donde la actividad tuvo una relación directamente proporcional a la biomasa producida (Menegat et al. 2016). Así mismo, *Pseudomonas aeruginosa* SN004 produjo L-asparaginasa 785 U/mL, con glucosa 2 g/L mientras que *P. fluorescens* NCIM 2100 obtuvo 28.71 U/mL con glucosa 1.5 g/L (Jha et al. 2014; Badoei-Dalfard 2015).

La optimización de la producción de L-asparaginasa ha conllevado la búsqueda de diferentes tipos de métodos como la obtenida por Prihanto et al. (2014), mediante exposición de la cepa a radiación UV por 120 min, de esta forma mejoraron la producción de L-asparaginasa de 3.18 a 8.02 U/mL en *B. subtilis* RM-1. No obstante, *Bacillus* sp. M62 demostró mejorar la producción a 2.15 ± 0.39 U/mL (0.63 U/mg) de L-asparaginasa extracelular usando los niveles optimizados de cada uno de los factores, además de evidenciar mínima actividad glutaminasa (0.02 U/mL). Por lo cual, se propone mayores estudios como el clonaje y expresión del gen *ansA3* extracelular para su purificación y escalamiento como alternativa promisorio al tratamiento de pacientes con leucemia.

Literatura citada

- Abdelrazek NA, Elkhatib WF, Raafat MM, Aboulwafa MM. 2019. Experimental and bioinformatics study for production of l-asparaginase from *Bacillus licheniformis*: a promising enzyme for medical application. *AMB Express*. 9(1):39. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0751-3>
- Abdelrazek NA, Elkhatib WF, Raafat MM, Aboulwafa MM. 2020. Production, characterization and bioinformatics analysis of L-asparaginase from a new *Stenotrophomonas maltophilia* EMCC2297 soil isolate. *AMB Express*. 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01005-7>
- Aishwariyaa Lakshmi V, Sheeja L, Devi Mari S. 2020. Screening and Identification of Asparaginase and Glutaminase Producing Halophilic Bacteria from Natural Saline Habitats. *Int J Recent Adv Biotechnol Nanotechnol*. 3(1):34-53.
- Alrumman SA, Mostafa YS, Al-izran KA, Alfai MY, Taha TH, El-behairi SE. 2019. Production and Anticancer Activity of an L-Asparaginase from *Bacillus licheniformis* Isolated from the Red Sea, Saudi Arabia. *Sci Rep*. 9(1):1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40512-x>
- Amany BAE, Wesam AH, Zakaria AM, Rabab AED. 2021. Production of Chemotherapeutic agent L-asparaginase from Gamma-Irradiated *Pseudomonas aeruginosa* WCH-PA075019. *Jordan J Biol Sci*. 14(3):403-412. <https://doi.org/10.54319/jjbs/140304>
- Arévalo-Tristancho E, Díaz LE, Cortázar JE, Valero MF. 2019. Production and characterization of L-Asparaginases of *Streptomyces* isolated from the Arauca riverbank (Colombia). *Open Microbiol J*. 13(1):204-215. <https://doi.org/10.2174/1874285801913010204>
- Badoei-Dalfard A. 2015. Purification and characterization of l-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* strain SN004: Production optimization by statistical methods. *Biocatal Agric Biotechnol*. 4(3):388-397. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.06.007>
- Bhargavi M, Jayamadhuri R. 2016. Isolation and screening of marine bacteria producing anti-cancer enzyme L-asparaginase. *Am J Mar Sci*. 4(1):1-3. <https://doi.org/10.12691/marine-4-1-1>
- Cachumba JJM, Antunes FAF, Peres GFD, Brumano LP, Santos JC Dos, Da Silva SS. 2016. Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. *Brazilian J Microbiol*. 47:77-85. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.004>
- Calderón-Toledo S, Horue M, Alvarez VA, Castro GR, Zavaleta AI. 2021. Isolation and partial characterization of *Komagataeibacter* sp. SU12 and optimization of bacterial cellulose production using *Mangifera indica* extracts. *J Chem Technol Biotechnol*. (June). <https://doi.org/10.1002/jctb.6839>
- Canales PE, Chávez-hidalgo EL, Zavaleta AI. 2014. Caracterización de bacterias halófilas productoras de amilasas aisladas de las Salinas de San Blas en Junín. *Rev Colomb Biotecnol*. XVI(2). <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v16n2.43763>
- Chakravarty N, Priyanka, Singh J, Singh RP. 2021. A potential type-II L-asparaginase from marine isolate *Bacillus australimaris* NJB19: Statistical optimization, in silico analysis and structural modeling. *Int J Biol Macromol*. 174:527-539. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.130>
- Ciesarovát Z, Kukurová K, Bednářiková A, Marková L, Baxa S. 2009. Improvement of cereal product safety by enzymatic way of acrylamide mitigation. *Czech J Food Sci*. 27(SPEC. ISS.):1-3. <https://doi.org/10.17221/1061-cjfs>
- Dinarvand B, Rezaei PF, Akbari N, Branch A. 2020. Optimization of L-asparaginase production from a *Lactobacillus* sp. isolated from traditional dairy products. *Biol J Microorg*. 9(34):71-86. <http://doi.org/10.22108/bjm.2020.121143.1283>
- Dyall-Smith M, Holmes M, Kamekura M, Lam W, Nuttall S, Bath C, Pfeiffer M, Santos F, Eichler J, Mcalpine T. 2009. *The Halohandbook*. Dyall-Smith M, editor.
- Ebrahiminezhad A, Rasoul-Amini S, Ghasemi Y. 2011. L-Asparaginase production by moderate halophilic bacteria isolated from Maharloo Salt Lake. *Indian J Microbiol*. 51(3):307-311. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0158-6>
- Ebrahimipour G, Yaghoobi Avini M, Ghorbanmovahhed M. 2020. Isolation and characterization of glutaminase-free L-asparaginase produced by *Staphylococcus* sp. MGM1. *SciMedicine J*. 2(2):46-55. <https://doi.org/10.28991/scimedj-2020-0202-1>

- El-Bessoumy AA, Sarhan M, Mansour J. 2004. Production and purification of L-Asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* 50071 using solid-state fermentation. *J Biochem Mol Biol.* 37(4):387–393. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2004.37.4.387>
- El-Dein MMN, Mousa MM, Metwally NE. 2019. Isolation and survey of L-asparaginase producing bacteria from soil. *J Egypt Acad Soc Environ Dev.* 20(1):19–29. <https://doi.org/10.21608/jades.2019.67651>
- Erva RR, Venkateswarulu TC, Pagala B. 2018. Multi level statistical optimization of l-asparaginase from *Bacillus subtilis* VUVD001. *3 Biotech.* 8(1). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-1020-2>
- Fonseca MHG, Fiúza TDS, Morais SB, Souza TACB, Trevizani R. 2021. Circumventing the side effects of L-asparaginase. *Biomed Pharmacother.* 139:111616. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111616>
- Garaev MM, Golub EI. 1977. Mechanism of action of glucose on L-asparaginase synthesis by *Escherichia coli* bacteria. *Mikrobiologiya.* 46(3):433–439
- Gholamian S, Gholamian S, Nazemi A, Miri Nargesi M. 2013. Optimization of culture media for L-asparaginase production by newly isolated bacteria, *Bacillus* sp. GH5. *Microbiology* 82(6):856–863. <https://doi.org/10.1134/S0026261714010032>
- Ghosh S, Murthy S, Govindasamy S, Chandrasekaran M. 2013. Optimization of L-asparaginase production by *Serratia marcescens* (NCIM 2919) under solid state fermentation using coconut oil cake. *Sustain Chem Process.* 1(1):1–8. <https://doi.org/10.1186/2043-7129-1-9>
- Gilavand F, Marzban A, Kavayanifard A. 2019. L-Asparaginase-producing *Rouxiiella* species isolation, antileukemia activity evaluation, and enzyme production optimization. *Res Mol Med.* 6(3):40–59. <https://doi.org/10.18502/rmm.v6i3.4608>
- Golbabaie A, Nouri H, Moghimi H, Khaleghian A. 2020. l-asparaginase production and enhancement by *Sarocladium strictum*: In vitro evaluation of anti-cancerous properties. *J Appl Microbiol.* 129(2):356–366. <https://doi.org/10.1111/jam.14623>
- Gulati R, Saxena RK, Gupta R. 1997. A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing micro-organisms. *Lett Appl Microbiol.* 24(1):23–26. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1997.00331.x>
- Hall T, Biosciences I, Carlsbad C. 2011. BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bull Biosci.* 2:60–61. <https://doi.org/10.4236/ajmb.2013.32010>
- Huang X, Madan A. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research* 9(9):868–877. <https://doi.org/10.1101/gr.9.9.868>
- Izadpanah Qeshmi F, Javadvpour S, Malekzadeh K, Tamadoni Jahromi S, Rahimzadeh M. 2014. Persian Gulf is a bioresource of potent L-asparaginase producing bacteria: Isolation & molecular differentiating. *Int J Environ Res.* 8(3):813–818. <https://doi.org/10.22059/ijer.2014.774>
- Jetti J, Jetti A, Perla R. 2017. Production of L-Asparaginase by Using *Pectobacterium carotovorum*. *J Probiotics Heal.* 5(01):1–6. <https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000168>
- Jha SK, Pasrija D, Singh HR, Nigam VK, Vidyarthi AS. 2014. Batch production and media optimization of anti-leukemic L-asparaginase from *Pseudomonas fluorescens* by Taguchi DOE methodology. *J Appl Pharm Sci.* 4(12):085–089. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2014.4.1215>
- Kiranmayi MU, Poda S, Vijayalakshmi M. 2014. Production and optimization of L-asparaginase by an Actinobacterium isolated from Nizampatnam mangrove ecosystem. *J Environ Biol.* 35(5):799–805.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* 35(6):1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Le SQ, Gascuel O. 2008. An improved general amino acid replacement matrix. *Mol Biol Evol.* 25(7):1307–1320. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn067>
- Mahajan RV, Saran S, Kameswaran K, Kumar V, Saxena RK. 2012. Efficient production of l-asparaginase from *Bacillus licheniformis* with low-glutaminase activity: Optimization, scale up and acrylamide degradation studies. *Bioresour Technol.* 125:11–16. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.086>
- Menegat FB, Baldo C, Colabone Celligoi MAP, Buzato JB. 2016. Optimization of asparaginase production from *Zymomonas mobilis* by continuous fermentation. *Acta Sci Biol Sci.* 38(2):163–168.
- Moghadam P, Khadivi Derakhshan F. 2019. Isolation and Identification of Halophilic Bacteria Producing Asparaginase Enzyme from Urmia Lake. *Pathobiol Res.* 22(4):197–202.
- Mohan Kumar NS, Shimray CA, Indrani D, Manonmani HK. 2014. Reduction of acrylamide formation in sweet bread with L-asparaginase treatment. *Food Bioprocess Technol.* 7(3):741–748. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1108-6>
- Montes J, Canales PE, Flores-Santos JC, Saavedra S, Hurtado-Gómez A, Esquerre-Huallpa C, Zavaleta AI. 2021. Bacteria producing L-asparaginase isolated from Peruvian saline environments. *Manglar.* 18(2):193–199. <https://doi.org/10.17268/manglar.2021.026>
- Moorthy V, Ramalingam A, Sumantha A, Shankaranaya RT. 2010. Production, purification and characterisation of extracellular L-asparaginase from a soil isolate of *Bacillus* sp. *African J Microbiol Res.* 4(18):1862–1867.
- Mostafa Y, Alrumman S, Alamri S, Hashem M, Al-izran K, Alfaifi M, Elbehairi SE, Taha T. 2019. Enhanced production of glutaminase-free L-asparaginase by marine *Bacillus velezensis* and cytotoxic activity against breast cancer cell lines. *Electron J Biotechnol.* 42:6–15. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2019.10.001>
- Muslim SN, AL-Kadmy IMS, Hussein NH, Mohammed Ali AN, Dwaish AS. 2016. Extraction and Purification of L-asparaginase produced by *Acinetobacter baumannii* and their antibiofilm activity against some pathogenic bacteria. *Int J Biotechnol.* 5(1):7–14. <https://doi.org/10.18488/journal.57/2016.5.1/57.1.7.14>
- Muttucumar N, Powers SJ, Elmore JS, Dodson A, Bridson A, Mottram DS, Halford NG. 2017. Acrylamide-forming potential of potatoes grown at different locations, and the ratio of free asparagine to reducing sugars at which free asparagine becomes a limiting factor for acrylamide formation. *Food Chem.* 220:76–86. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.199>
- Offman MN, Krol M, Patel N, Krishnan S, Liu J, Saha V, Bates PA. 2011. Rational engineering of L-asparaginase reveals importance of dual activity for cancer cell toxicity. *Blood.* 117(5):1614–21. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-298422>

- Pal Roy M, Das V, Patra A. 2019. 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*. 65(3):137-144. <https://doi.org/10.2323/jgam.2018.07.004>
- Patel P, Panseriya H, Dave B. 2021. Development of Process and Data Centric Inference System for Enhanced Production of L-Asparaginase From Halotolerant *Bacillus licheniformis* PPD37. *Appl Biochem Biotechnol*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-651645/v1>
- Patil RC, Jadhav LB. 2017. Screening and optimization of L-asparaginase production from *Bacillus* species. *IOSR J Biotechnol Biochem*. 03(03):32-36. <https://doi.org/10.9790/264x-03033236>
- Pradhan B, Dash SK, Sahoo S. 2013. Screening and characterization of extracellular L-asparaginase producing *Bacillus subtilis* strain hswx88, isolated from Taptapani hot spring of Odisha, India. *Asian Pac J Trop Biomed*. 3(12):936-941. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60182-3](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60182-3)
- Prakash P, Singh HR, Jha SK. 2020. Production, purification and kinetic characterization of glutaminase free anti-leukemic L-asparaginase with low endotoxin level from novel soil isolate. *Prep Biochem Biotechnol*. 50(3):260-271. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1692221>
- Prihanto AA, Wakayama M. 2014. Combination of environmental stress and localization of l-asparaginase in *Arthrospira platensis* for production improvement. *3 Biotech*. 4(6):647-653. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0215-z>
- Prihanto AA, Yanti I, Murtazam MA, Jatmiko YD. 2019. Optimization of glutaminase-free L-asparaginase production using mangrove endophytic *Lysinibacillus fusiformis* B27. *F1000Research*. 8:1938. <https://doi.org/10.12688/f1000research.21178.1>
- Rahimzadeh M, Poodat M, Javadpour S, Qeshmi FI, Shamsipour F. 2016. Purification, Characterization and Comparison between Two New L-asparaginases from PG03 and PG04. *Open Biochem J*. 10(1):35-45. <https://doi.org/10.2174/1874091x01610010035>
- Rifai L, Saleh FA. 2020. A Review on Acrylamide in Food: Occurrence, Toxicity, and Mitigation Strategies. *International Journal of Toxicology* 39(2):93-102. <https://doi.org/10.1177/1091581820902405>
- Setiawan R, Larasati DR. 2019. Screening of bacteria producing asparaginase free of glutaminase and urease from hot springs in west Sulawesi. *Biosaintifika J Biol Biol Educ*. 11(2):218-225. <https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v11i2.17435>
- Shah AJ, Karadi RV, Parekh PP. 2010. Isolation, optimization and production of L-asparaginase from coliform bacteria. *Asian J Biotechnol*. 2(3):169-177. <https://doi.org/10.3923/ajbkr.2010.169.177>
- Shaikh Khaleed AN, Khobragade RM. 2016. Screening and Optimization of L-Asparaginase Produced by Bacteria Isolated from Soil of Solapur Region. *Int J Sci Res*. 5(9):231-235.
- Shakambari G, Ashokkumar B, Varalakshmi P. 2019. L-asparaginase – A promising biocatalyst for industrial and clinical applications. *Biocatal Agric Biotechnol*. 17(October 2018):213-224. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.018>
- Shakambari G, Sumia BM, Ashokkumar B, Palanivelu P, Varalakshmi P. 2020. Industrial effluent as a substrate for glutaminase free L-asparaginase production from *Pseudomonas plecoglossicida* strain RS1; media optimization, enzyme purification and its characterization. *RSC Adv*. 10:31205. <https://doi.org/10.1039/b000000x>
- Shifrin S, Parrott CL. 1974. In vitro assembly of L asparaginase subunits. *J Biol Chem*. 249(13):4175-4180. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)42499-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)42499-x)
- Shirazian P, Asad S, Amoozegar MA. 2016. The potential of halophilic and halotolerant bacteria for the production of antineoplastic enzymes: L-Asparaginase and L-glutaminase. *EXCLI J*. 15:268-279. <https://doi.org/10.17179/excli2016-146>
- Sudhir AP, Dave BR, Prajapati AS, Panchal K, Patel D, Subramanian RB. 2014. Characterization of a recombinant glutaminase-free L-Asparaginase (ansA3) enzyme with high catalytic activity from *Bacillus licheniformis*. *Appl Biochem Biotechnol*. 174(7):2504-2515. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1200-z>
- Venil CK, Nanthakumar K, Karthikeyan K, Lakshmanaperumalsamy P. 2009. Production of L-asparaginase by *Serratia marcescens* SB08: Optimization by response surface methodology. *Iran J Biotechnol*. 7(1):10-18.
- War Nongkhaw FM, Joshi SR. 2015. L-Asparaginase and antioxidant activity of endophytic bacteria associated with ethnomedicinal plants. *Indian J Biotechnol*. 14(1):59-64.
- Zenatti PP, Migita NA, Cury NM, Mendes-Silva RA, Gozzo FC, de Campos-Lima PO, Yunes JA, Brandalise SR. 2018. Low Bioavailability and High Immunogenicity of a New Brand of *E. coli* L-Asparaginase with Active Host Contaminating Proteins. *EBioMedicine*. 30:158-166. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.03.005>
- Zolfaghar M, Amoozegar MA, Khajeh K, Babavalian H, Tebyanian H. 2019. Isolation and screening of extracellular anticancer enzymes from halophilic and halotolerant bacteria from different saline environments in Iran. *Mol Biol Rep*. 46(3):3275-3286. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04787-7>
- Zuo S, Zhang T, Jiang B, Mu W. 2015. Reduction of acrylamide level through blanching with treatment by an extremely thermostable L-asparaginase during French fries processing. *Extremophiles*. 19(4):841-851. <https://doi.org/10.1007/s00792-015-0763-0>

Agradecimientos / Acknowledgments:

Nuestro agradecimiento a Pessoa Jr. por motivarnos al estudio de nuevas fuentes de L-asparaginasa.

Conflicto de intereses / Competing interests:

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Fuentes de financiamiento / Funding:

Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT- Peru), convenio N° 169- 2017.

Aspectos éticos / legales; Ethics / legals:

Los autores declaran no haber violado u omitido normas éticas o legales al realizar la investigación y esta obra.

Rol de los autores / Authors Roles:

SC: Metodología; Análisis formal; Escritura-Preparación del borrador original.

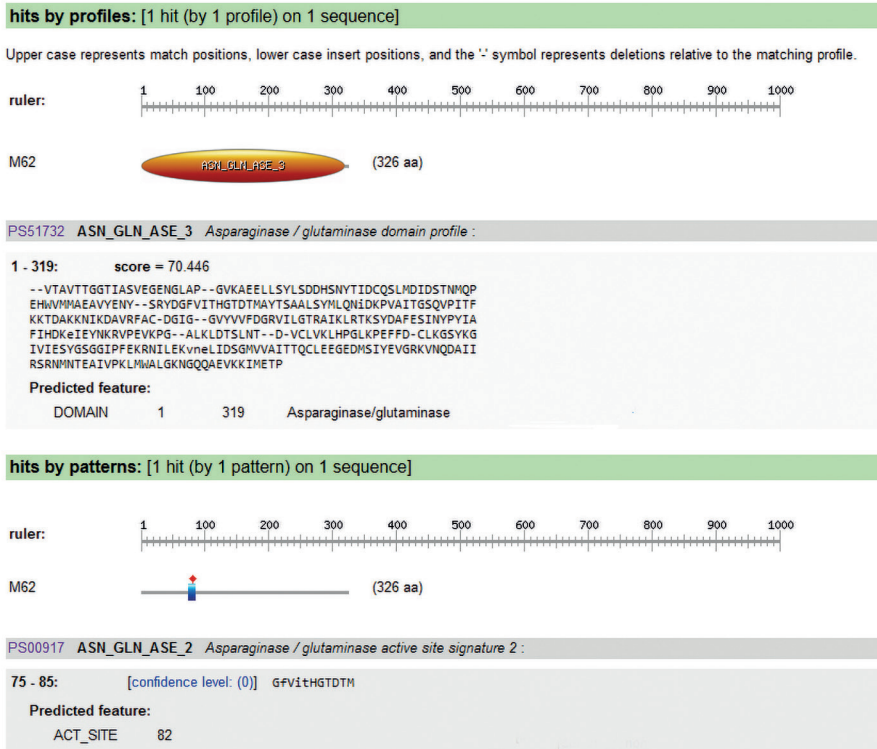
YT: Investigación; Metodología.

CE: Curacion de datos; Redacción-revisión y edición.

KJ: Curacion de datos; Redacción-revisión y edición.

AZ: Conceptualización; Supervisión; Adquisición de fondos; Redacción-revisión y edición.

Material suplementario 1. Reporte de sitio activo de L-asparaginasa producida por *Bacillus* sp. M62 según PROSITE.



Material suplementario 2. Regiones inmunogénicas de L-asparaginasa de *Bacillus* sp. M62 predichas por ANTIGENIC-EMBOSS.

Inicio	Fin	Puntaje	Secuencia
199	222	1.245	NTDVCLVKLHPGLKPEFFDCLKGS
124	157	1.173	KDAVRFACDGIGGVYVFDGRVILGTRAIKLRK
164	175	1.121	SINYPYIAFIHD
253	265	1.121	SGMVVAITTCLE
20	34	1.114	APGVKAEELLSYLS
294	302	1.099	AIVPKLMWA
224	230	1.095	KGIVIES
88	97	1.09	TSAALSYMLQ
99	113	1.089	IDKPVAITGSQVPIT
40	46	1.088	TIDCQSL
181	195	1.078	NKRVPVEKPGALKLD
272	278	1.065	IYEVGRK
73	80	1.062	YDGFVITH
63	69	1.058	AEAVYEN
244	250	1.042	LEKVNEL