



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

MARÍLIA CRIVELARI DA CUNHA

L-ASPARAGINASE FÚNGICA: PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA E APLICAÇÃO EM CAFÉ PARA REDUÇÃO DOS TEORES DE
ACRILAMIDA.

CAMPINAS

2020

MARILIA CRIVELARI DA CUNHA

L-ASPARAGINASE FÚNGICA: PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA E APLICAÇÃO EM CAFÉ PARA REDUÇÃO DOS TEORES DE
ACRILAMIDA.

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de
Alimentos da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do título de Doutora em Ciência
de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Hélia Harumi Sato

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELA ALUNA MARÍLIA CRIVELARI DA
CUNHA E ORIENTADA PELA
PROFESSORA DRA. HÉLIA HARUMI
SATO.

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

C914L Cunha, Marília Crivelari da, 1989-
L-asparaginase fúngica : produção, purificação, caracterização bioquímica e aplicação em café para redução dos teores de acrilamida / Marília Crivelari da Cunha. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Helia Harumi Sato.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. L-asparaginase. 2. *Aspergillus oryzae*. 3. *Aspergillus niger*. 4. Acrilamida. 5. Café. I. Sato, Helia Harumi. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Fungal L-asparaginase : production, purification, biochemical characterization and application in coffee to reduce acrilamide content

Palavras-chave em inglês:

L-asparaginase
Aspergillus oryzae
Aspergillus niger
Acrylamide
Coffee

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutora em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Helia Harumi Sato [Orientador]
Flavio Luis Schmidt
Ruann Janser Soares de Castro
Joelise de Alencar Figueira Angelotti
Marcela Pavan Bagagli

Data de defesa: 15-06-2020

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-5756-8498>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5081982471957819>

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Hélia Harumi Sato
Orientadora- DCA/FEA/UNICAMP

Prof. Dr. Flávio Luís Schmidt
Membro Titular- DTA/FEA/UNICAMP

Prof. Dr. Ruann Janser Soares de Castro
Membro Titular- DCA/FEA/UNICAMP

Prof^ª. Dr^ª. Joelise de Alencar Figueira Angelotti
Membro Titular- UNIFAL/MG

Prof^ª. Dr^ª. Marcela Pavan Bagagli
Membro Titular- IFSP/Avaré

A Ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Dedico este trabalho aos meus pais,
Maria Bernadete Crivelari e José Carlos da Cunha;
à minha irmã, Mariana Crivelari da Cunha e
aos meus avôs, Teresa Consoline Crivelari
e José Crivelari (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela realização de mais um sonho.

À Universidade Estadual de Campinas, ao Departamento de Ciência dos Alimentos e a Faculdade de Engenharia de Alimentos pela oportunidade concedida para a realização do doutorado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À professora Dr^a. Hélia Harumi Sato pela orientação, paciência, amizade e confiança em mim depositada e por proporcionar todas as condições para que este trabalho se realizasse da melhor forma possível.

Ao professor Dr. Ruann Janser Soares de Castro pela amizade, ensinamentos e por poder participar da banca examinadora.

À professora Dr^a. Adriana Pavesi Ariseto Bragotto pelas sugestões para o trabalho e disponibilidade em sanar dúvidas.

Ao professor Dr. Juliano Lemos Bicas por gentilmente autorizar o uso do biorreator no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos.

Ao professor Dr. Flávio Schmidt pela atenção, gentileza em deixar utilizar o Laboratório de Frutas e Hortaliças da FEA-Unicamp e se dispor a participar da banca examinadora.

As demais professoras, Dr^a. Joelise de Alencar Figueira Angelotti da Universidade Federal de Alfenas e Dr^a. Marcela Pavan Bagagli do Instituto Federal de São Paulo pela atenção e disponibilidade em participar da banca de defesa.

Ao Dr. Diego Faustolo do Departamento de Ciência dos Solos da Universidade Federal de Lavras, por ter doado gentilmente as amostras de solo de todo o Brasil para o *screening* de micro-organismos.

À FioCruz pela doação dos micro-organismos utilizados neste trabalho.

Ao Laboratório Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Bioetanol (CTBE), principalmente ao Dr. Ricardo Rodrigues de Melo e a Dr^a. Sheila Nagamatsu pela construção das árvores filogenéticas.

Ao Centro de Tecnologia e Qualidade da Nestlé (NQAC), em especial ao Dr. Fernando Silva, Sérgio Almeida e a Anne Silva pela gentileza em realizar as análises de acrilamida.

Aos donos da cafeteria *Virginia Coffee Roasters*, Francisco e Cristina, pela gentileza em realizar a torra no café, além do aprendizado adquirido.

Às amizades que eu fiz na pós-graduação: Lets, Marina, Ana Paula, Paulinha, Livia Dias, Débora, Isa, Michelle, Bruno, Wellington, Lucas, Michel, Líbia, Tiago, Esther, Thaís, Marcela, Matheus, Livia, Lucas, Joyce, Elenice, Gustavo, Nayara, Laísa e Ana Valéria.

Em especial aos alunos do Laboratório de Bioquímica de Alimentos pela amizade e companheirismo durante esses anos: Gabi, Fran, Luísa Gené, Agnelli, Fábio, Weysser, Paula, Naiane, Karen, Wilson, Letícia, Ana Elisa, Gabi Cavalaro, Ana Luísa, Cássio, Josinei, Pedro, Gabriel, Gabriela Vicensuto, Vitor, Victor, Laura, Ieda, Iuri, Alex, Ana, Marcelo, Karol e Carol. Também às ex-alunas: Vivi, Fernanda, Elaine, Eulália e em especial à Jess pelos conselhos e amizade, além da ajuda em sanar dúvidas da tese.

Às ICs que tive a oportunidade de supervisionar e me ajudaram muito durante a execução do trabalho: Santa Maria e Laura.

Às alunas PIBIC-EM, Ana Beatriz, Gabriela, Thamires e Ariane por terem ajudado na etapa de *screening* de micro-organismos, no início do projeto.

Aos técnicos e funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos, em especial à Bia, Gabi, Val, Angélica, Nadir, Jardete, Karla, Sílvia, Hélio, Jonas, Juliana, Priscilla, Vanessa, Márcia, Laís, Dora, Andrea, Cláudia, Eduardo, Nilson e Jean por toda ajuda prestada.

Aos meus amigos da Universidade Federal de Viçosa, Henrique, Rodolfo e Fabiana, pelo companheirismo durante esses anos.

Às minhas amigas Camila, Jéssica, Camila Uchida, Vanessa, Renata Regina e Laís, pelos conselhos, amizade e compreensão durante todos esses anos.

À Celi pela amizade, carinho e por ter me acolhido, no início dessa jornada, em Campinas.

E por último, mas não menos especial, por todo amor, apoio e compreensão dos meus pais e da minha irmã Mariana.

Muito obrigada!

RESUMO

A L-asparaginase é utilizada em alimentos para diminuir o conteúdo de acrilamida, um carcinógeno formado em alimentos contendo L-asparagina e açúcares redutores submetidos a tratamento térmico a altas temperaturas, sem comprometer os aspectos sensoriais e nutricionais. O objetivo deste trabalho foi selecionar uma linhagem de *Aspergillus* sp. produtora de L-asparaginase, otimizar os componentes do meio de fermentação e as condições de cultivo, para posterior produção, purificação, caracterização e aplicação da L-asparaginase em grãos de café para redução do teor de acrilamida. Quatro linhagens de fungos, *A. niger* IOC 2016, *A. niger* IOC 0203, *A. oryzae* IOC 3924 e *A. oryzae* IOC 3999, apresentaram teste qualitativo positivo indicativo de produção da L-asparaginase. No entanto, verificou-se que somente as linhagens de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203 produziram L-asparaginase, 448,0 U/mL e 85,1 U/mL, respectivamente, por fermentação submersa. Para aumentar a atividade enzimática do processo fermentativo foi utilizado uma estratégia sequencial de otimização dos parâmetros de fermentação obtendo-se 1443,57 U/mL para L-asparaginase de *A. oryzae* IOC 3999 após 48h e 1960,14 U/mL para L-asparaginase de *A. niger* IOC 0203 após 24h de fermentação. As L-asparaginases de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203 foram purificadas 2,11 e 2,43 vezes, respectivamente utilizando ultrafiltração por membrana de 30 kDa e cromatografia em coluna de exclusão molecular Sephadex G100. A L-asparaginase purificada de *A. oryzae* IOC 3999 apresentou atividade específica de 739,73 U/mg de proteína e massa molecular de 25,1 kDa, enquanto a enzima purificada de *A. niger* IOC 0203 apresentou 2304,18 U/mg de proteína e massa molecular de 37,7 kDa estimada por SDS-PAGE. Em relação às características bioquímicas, a L-asparaginase de *A. oryzae* IOC 3999 apresentou atividade ótima a 60 °C e pH 5, enquanto que a enzima de *A. niger* IOC 0203 apresentou atividade ótima a 50 °C e pH 7. Ambas as enzimas apresentaram elevada afinidade com a L-asparagina. Entre os íons metálicos testados, Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} e Mn^{2+} , na concentração final de 1 mMol/L, ativaram a L-asparaginase de *A. oryzae* IOC 3999, enquanto que Mn^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} e Zn^{2+} , na concentração de 1 mMol/L, ativaram a L-asparaginase de *A. niger* IOC 0203. No estudo da aplicação das L-asparaginases, os grãos de café arábica foram submetidos à um pré-tratamento térmico sob vapor a 100°C por 35 minutos. Após o tratamento térmico, as amostras de grãos de café foram misturadas com solução de 80 U/mL de L-asparaginase de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203, separadamente, e incubadas por 60 minutos a 50 °C. Em seguida, os grãos foram secos e torrados. A porcentagem de redução de acrilamida em grãos de café tratados com

as preparações de L-asparaginases purificadas de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203 foram de 9,08% e 7,03%, respectivamente.

Palavras-chaves: L-asparaginase, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, acrilamida, café

ABSTRACT

L-asparaginase is used in foods to decrease the content of acrylamide, a carcinogen formed in foods containing L-asparagine and reducing sugars subjected to heat treatment at high temperatures, without compromising sensory and nutritional. The objective of this work was to select a strain of *Aspergillus* sp. producer of L-asparaginase, optimize the components of the fermentation medium and the cultivation conditions, for later production, purification, characterization and application of L-asparaginase in coffee beans to reduce the acrylamide content. Four fungal strains, *Aspergillus niger* IOC 2016, *A. niger* IOC 0203, *Aspergillus oryzae* IOC 3924, and *A. oryzae* IOC 3999, presented positive for the qualitative test, indicating possible L-asparaginase production. However, under submerged fermentation, only *A. oryzae* IOC 3999 and *A. niger* IOC 0203 produced L-asparaginase presenting 448.0 U/mL and 85.1 U/mL, respectively. To increase the enzymatic activity of the fermentation process, a sequential strategy of optimization was performed. L-asparaginase from *A. oryzae* IOC 3999 and *A. niger* IOC 0203 produced 1443.57 U/mL (after 48 h of fermentation) and 1960.14 U/mL (after 24 h of fermentation), respectively. The L-asparaginases from *A. oryzae* IOC 3999 and *A. niger* IOC 0203 were purified 2.11 and 2.43 fold, respectively using 30 kDa ultrafiltration membrane and Sephadex G100 molecular exclusion column chromatography. The purified L-asparaginase of *A. oryzae* IOC 3999 showed specific activity of 739.73 U/mg protein and molecular mass of 25.1 kDa, while the purified enzyme of *A. niger* IOC 0203 presented 2304.18 U/mg protein and molecular mass of 37.7 kDa estimated by SDS-PAGE. Regarding the biochemical characteristics, the purified enzyme of *A. oryzae* IOC 3999 showed optimal activity at 60 °C and pH 5, while the L-asparaginase from *A. niger* IOC 0203 showed optimal activity at 50 °C and pH 7. Both enzymes showed high affinity for L-asparagine. Among the metal ions tested, Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , and Mn^{2+} , in concentration of 1 mMol/L, activated L-asparaginase from *A. oryzae* IOC 3999, while Mn^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} , and Zn^{2+} , in concentration of 1 mMol/L, activated L-asparaginase from *A. niger* IOC 0203. In the application study, arabica coffee beans were subjected to a thermal pre-treatment under steam at 100 °C for 35 min. After heat treatment, the coffee beans samples were separately mixed with 80 U/mL of purified enzyme solutions and incubated for 60 min at 50 °C. Then, the beans were dried and roasted. The percentage of acrylamide reduction in coffee beans treated with the preparations of purified L-asparaginases from *A. oryzae* IOC 3999 and *A. niger* IOC 0203 was 9.08% and 7.03%, respectively.

Keywords: L-asparaginase, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, acrylamide, coffee

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição da L-asparaginase de acordo com o <i>National Center for Biotechnology Information</i> (NCBI).....	24
Figura 2 – Distribuição filogenética da L-asparaginase em fungos e para fins de comparação utilizou-se a sequência genética de L-asparaginase de <i>E. coli</i>	25
Figura 3 – Mecanismo de formação de acrilamida em alimentos aquecidos.	38
Figura 4 – Mecanismo de atuação da L-asparaginase.	39
Figura 5 – Detecção de fungos produtores de L-asparaginase em placas de Petri contendo meio Czapek Dox suplementado com L-asparagina e corante vermelho de fenol.....	58
Figura 6 – Cinética de fermentação das 4 linhagens fúngicas para a produção de L-asparaginase por fermentação submersa.	60
Figura 7 – Efeito da temperatura na atividade de L-asparaginase de <i>Aspergillus oryzae</i> IOC 3999 e <i>Aspergillus niger</i> IOC 0203.....	63
Figura 8 – Efeito do pH na atividade de L-asparaginase de <i>Aspergillus oryzae</i> IOC 3999 e <i>Aspergillus niger</i> IOC 0203.....	64
Figura 9 – Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de L-asparaginase por <i>Aspergillus oryzae</i> IOC 3999.....	65
Figura 10 – Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de L-asparaginase por <i>Aspergillus niger</i> IOC 0203.....	67
Figura 11 – Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de L-asparaginase por <i>Aspergillus oryzae</i> IOC 3999.	68
Figura 12 – Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na atividade de L-asparaginase de <i>Aspergillus niger</i> IOC 0203.....	69
Figura 13 – Superfície de resposta dos efeitos da concentração de lactose, L-asparagina e caseína hidrolisada (casaminoácidos) na produção de L-asparaginase por <i>A. oryzae</i> IOC 3999 após 48h.....	77
Figura 14 – Superfície de resposta dos efeitos da concentração de sacarose, L-asparagina e temperatura na produção de L-asparaginase por <i>A. niger</i> IOC 0203 após 24h.	86
Figura 15 – Determinação da massa molecular da L-asparaginase de <i>A. oryzae</i> IOC 3999 por cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100.	91
Figura 16 – Determinação da massa molecular da L-asparaginase de <i>A. niger</i> IOC 0203 por cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100.	91

Figura 17 – Eletroforese (SDS-PAGE) das proteínas dos extratos enzimáticos de L-asparaginase de <i>A. oryzae</i> IOC 3999 durante as etapas de purificação.....	92
Figura 18 – Eletroforese (SDS-PAGE) das proteínas dos extratos enzimáticos de L-asparaginase de <i>A. niger</i> IOC 0203, durante as etapas de purificação.	93
Figura 19 – Efeito da temperatura na atividade das L-asparaginases purificadas de <i>A. oryzae</i> IOC 3999, <i>A. niger</i> IOC 0203 e preparação comercial.	94
Figura 20 – Efeito do pH na atividade das L-asparaginases purificadas de <i>A. oryzae</i> IOC 3999, <i>A. niger</i> IOC 0203 e da preparação comercial.....	95
Figura 21 – Efeito da temperatura na estabilidade das L-asparaginases purificadas de <i>A. oryzae</i> IOC 3999, <i>A. niger</i> IOC 0203 e da preparação comercial.....	97
Figura 22 – Efeito do pH na estabilidade das L-asparaginases purificadas de <i>A. oryzae</i> IOC 3999, <i>A. niger</i> IOC 0203 e L-asparaginase comercial.....	98
Figura 23 – Gráfico de Lineweaver-Burk para a determinação de K_m e V_{max} das L-asparaginases purificadas de <i>A. oryzae</i> IOC 3999, <i>A. niger</i> IOC 0203 e L-asparaginase comercial.	100
Figura 24 – Efeito de íons metálicos na atividade da L-asparaginase purificada de <i>A. oryzae</i> IOC 3999.	101
Figura 25 – Efeito de íons metálicos na atividade da L-asparaginase purificada de <i>A. niger</i> IOC 0203.	102
Figura 26 – Efeito de íons metálicos na atividade da L-asparaginase comercial.....	102
Figura 27 – Efeito de inibidores e ativadores na atividade da L-asparaginase purificada de <i>A. oryzae</i> IOC 3999.....	104
Figura 28 – Efeito de inibidores e ativadores na atividade da L-asparaginase purificada de <i>A. niger</i> IOC 0203.....	105
Figura 29 – Efeito de inibidores e ativadores na atividade da L-asparaginase comercial.....	105
Figura 30 – Estudo da atividade das L-asparaginases purificadas de <i>A. oryzae</i> IOC 3999, <i>A. niger</i> IOC 0203 e preparação comercial em diferentes aminoácidos.....	108
Figura 31 – Concentração de acrilamida nas amostras de grãos de café tratados com L-asparaginase de <i>A. oryzae</i> IOC 3999, <i>A. niger</i> IOC 0203 e enzima comercial.	111
Figura 32 – Concentração de L-asparagina em amostras de grão de café tratados com L-asparaginase de <i>A. oryzae</i> IOC 3999, <i>A. niger</i> IOC 0203 e enzima comercial.	112
Figura 33 – Fungos estudados no presente trabalho e obtidos por doação pela Coleção de Culturas de Fungos Filamentos da FioCruz- RJ.....	133
Figura 34 – Curva padrão de determinação da concentração de L-asparaginase.....	134
Figura 35 – Curva padrão para determinação de proteína pelo método de Lowry.	135

Figura 36 – Cromatografia da L-asparaginase de <i>A. oryzae</i> IOC 3999 e proteínas padrões em coluna de Sephadex G-100.	136
Figura 37 – Cromatograma da L-asparaginase de <i>A. niger</i> IOC 0203 e proteínas padrões em coluna de Sephadex G-100.	137
Figura 38 – Curva padrão para determinação da massa molecular de proteínas por SDS-PAGE.	138
Figura 39 – Curva padrão para determinação da concentração de glicose por cromatografia em HPLC-Dionex DX-600.	139
Figura 40 – Curva padrão para determinação da concentração de frutose por cromatografia em HPLC-Dionex DX-600.	140
Figura 41 – Curva padrão para determinação da concentração de sacarose por cromatografia em HPLC-Dionex DX-600.	141
Figura 42 – Curva padrão para determinação da concentração de acrilamida por LC- MS/MS.	142
Figura 43 – Curva padrão para determinação colorimétrica de L-asparagina.	143
Figura 44 – Efeito do tempo do tratamento em vapor a 100 °C e % de umidade dos grãos de café beneficiado da espécie arábica variedade Catuaí amarelo cereja descascado.	144
Figura 45 – Efeito do tempo de secagem em estufa com circulação de ar e % de umidade dos grãos de café beneficiado.	145
Figura 46 – Torra padrão de <i>cupping</i> , com grau de torra médio (R 65) de acordo com a Escala Agtron SCAA.	146
Figura 47 – Amostras de café moído testes (tratadas com L-asparaginase e torradas) e amostras controles (tratadas com tampão e torradas ou não torradas).	147

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção de L-asparaginase por linhagens de fungos por fermentação em estado sólido.	28
Tabela 2 – Produção de L-asparaginase por linhagens de fungos por fermentação submersa.	30
Tabela 3 – Purificação e características bioquímicas de L-asparaginases fúngicas.	34
Tabela 4 – Variáveis reais analisadas no delineamento Plackett-Burman 12 (PB 12) para o estudo da fermentação das linhagens de <i>A. oryzae</i> IOC 3999 e <i>A. niger</i> IOC 0203 e produção de L-asparaginase.	49
Tabela 5 – Índice de atividade enzimática obtido no estudo de triagem de espécies fúngicas produtoras de L-asparaginase cultivadas em placas de Petri contendo meio Czapek Dox suplementado com L-asparagina e vermelho de fenol	59
Tabela 6 – Matriz do Plackett-Burman contendo os valores codificados, reais e a variável resposta L-asparaginase (U/mL) obtida por fermentação submersa de <i>Aspergillus oryzae</i> IOC 3999 após 72h.	71
Tabela 7 – Estimativa dos efeitos das variáveis do processo fermentativo para produção de L-asparaginase por <i>Aspergillus oryzae</i> IOC 3999 após 72h.	72
Tabela 8 – Matriz do DCCR 2 ³ (valores reais e codificados) utilizada para a produção de L-asparaginase por <i>Aspergillus oryzae</i> IOC 3999.	74
Tabela 9 – Estimativa dos efeitos das variáveis do processo fermentativo para produção de L-asparaginase por <i>Aspergillus oryzae</i> IOC 3999 após 48h.	75
Tabela 10 – ANOVA para produção de L-asparaginase por <i>Aspergillus oryzae</i> IOC 3999 após 48h de fermentação.	76
Tabela 11 – Níveis das variáveis utilizadas para o teste de validação experimental do modelo de produção de L-asparaginase por <i>Aspergillus oryzae</i> IOC 3999 após 48h de fermentação.	79
Tabela 12 – Matriz do Plackett-Burman contendo os valores codificados, reais e a variável resposta L-asparaginase (U/mL) obtida por fermentação submersa de <i>Aspergillus niger</i> IOC 0203 após 48h.	80
Tabela 13 – Estimativa dos efeitos das variáveis do processo fermentativo para produção de L-asparaginase por <i>Aspergillus niger</i> IOC 0203 após 48h.	81
Tabela 14 – Matriz do DCCR 2 ³ (valores reais e codificados) utilizada para a produção de L-asparaginase por <i>Aspergillus niger</i> IOC 0203.	83
Tabela 15 – Estimativa dos efeitos das variáveis do processo fermentativo para produção de L-asparaginase por <i>Aspergillus niger</i> IOC 0203 após 24h.	84

Tabela 16 – ANOVA para produção de L-asparaginase por <i>Aspergillus niger</i> IOC 0203 após 24h de fermentação.....	85
Tabela 17 – Níveis das variáveis utilizadas para o teste de validação experimental do modelo de produção de L-asparaginase por <i>Aspergillus niger</i> IOC 0203 após 24h de fermentação....	87
Tabela 18 – Etapas do processo de purificação de L-asparaginase de <i>Aspergillus oryzae</i> IOC 3999.	89
Tabela 19 – Etapas do processo de purificação de L-asparaginase de <i>Aspergillus niger</i> IOC 0203.	89

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo geral	23
2.2. Objetivos específicos.....	23
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1. L-asparaginase fúngica.....	24
3.1.1. Aspectos gerais	24
3.1.2. Produção de L-asparaginase por fungos.....	27
3.1.3. Purificação e propriedades bioquímicas de L-asparaginases fúngicas.....	33
3.1.4. Aplicação de L-asparaginase fúngica na indústria alimentícia	37
3.1.4.1. Batatas fritas	40
3.1.4.2. Biscoitos e pães	41
3.1.4.3. Café.....	42
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1. Micro-organismos.....	44
4.2. Teste qualitativo para a detecção da produção de L-asparaginase em placas de Petri.....	44
4.3. Cinética de fermentação das linhagens de fungos em frascos agitados para produção de L-asparaginase.....	45
4.4. Determinação da atividade de L-asparaginase	45
4.5. Determinação da atividade de protease	46
4.6. Caracterização bioquímica parcial das L-asparaginases dos extratos brutos	47
4.6.1. Determinação da temperatura ótima de atividade da L-asparaginase	47
4.6.2. Determinação do pH ótimo de atividade de L-asparaginase	47
4.7. Triagem de diferentes fontes de carbono e nitrogênio para produção de L-asparaginase por fermentação submersa	47
4.8. Estratégia sequencial de otimização da produção de L-asparaginase pelo processo de fermentação submersa	48
4.8.1. Produção de L-asparaginase pelas linhagens de <i>A. oryzae</i> IOC 3999 e <i>A. niger</i> IOC 0203 por fermentação submersa	50
4.9. Purificação das L-asparaginases de <i>A. oryzae</i> IOC 3999 e <i>A. niger</i> IOC 0203.....	50
4.9.1. Ultrafiltração.....	50

4.9.2. Purificação e determinação da massa molecular das L-asparaginases de <i>A. oryzae</i> IOC 3999 e <i>A. niger</i> IOC 0203 em coluna de Sephadex G-100	50
4.9.3. Eletroforese em gel SDS- poliacrilamida das L-asparaginases	51
4.9.4. Caracterização bioquímica das L-asparaginases purificadas de <i>A. oryzae</i> IOC 3999 e <i>A. niger</i> IOC 0203	52
4.9.4.1. Determinação da temperatura ótima de atividade	52
4.9.4.2. Determinação do pH ótimo de atividade	52
4.9.4.3. Determinação da temperatura de estabilidade	52
4.9.4.4. Determinação do pH de estabilidade	53
4.9.4.5. Determinação dos parâmetros cinéticos	53
4.9.4.6. Efeito de íons metálicos na atividade das L-asparaginases	53
4.9.4.7. Efeito de ativadores e inibidores na atividade das L-asparaginases	54
4.9.4.8. Atividade das L-asparaginases em diferentes aminoácidos	54
4.10. Aplicação da L-asparaginase para redução dos teores de acrilamida em café	54
4.10.1. Grãos de café	54
4.10.2. Tratamento dos grãos de café com L-asparaginase	55
4.10.2.1. Extração de acrilamida das amostras de café	55
4.10.2.2. Separação, identificação e quantificação de acrilamida por LC-MS/MS.....	56
4.10.3. Determinação de açúcares redutores e não redutores	56
4.10.3.1. Extração de açúcares redutores e não redutores do café beneficiado.....	56
4.10.3.2. Extração de açúcares redutores e não redutores no café torrado.....	57
4.10.3.3. Separação por HPLC, identificação e quantificação de glicose, frutose e sacarose..	57
4.10.4. Determinação da concentração de L-asparagina	57
4.10.5. Análise estatística	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1. Teste qualitativo para a detecção da produção de L-asparaginase em placas de Petri.....	58
5.2. Cinética de fermentação das linhagens de fungos em frascos agitados para produção de L-asparaginase.....	60
5.2.1. Determinação da atividade de protease	62
5.3. Caracterização bioquímica parcial das L-asparaginases dos extratos brutos	62
5.3.1. Determinação da temperatura ótima de atividade da L-asparaginase	62
5.3.2. Determinação do pH ótimo de atividade da L-asparaginase	64
5.4. Triagem de diferentes fontes de carbono e nitrogênio para produção de L-asparaginase por fermentação submersa	65

5.5. Estratégia sequencial de otimização da produção de L-asparaginase por fermentação submersa	70
5.6. Purificação das L-asparaginases de <i>A. oryzae</i> IOC 3999 e <i>A. niger</i> IOC 0203.....	88
5.7. Caracterização das L-asparaginases purificadas de <i>A. oryzae</i> IOC 3999 e <i>A. niger</i> IOC 0203.....	94
5.7.1. Temperatura ótima de atividade das L-asparaginases purificadas de <i>A. oryzae</i> IOC 3999 e <i>A. niger</i> IOC 0203.....	94
5.7.2. pH ótimo de atividade das L-asparaginases purificadas de <i>A. oryzae</i> IOC 3999 e <i>A. niger</i> IOC 0203.....	95
5.7.3. Temperatura de estabilidade das L-asparaginases purificadas de <i>A. oryzae</i> IOC 3999 e <i>A. niger</i> IOC 0203	96
5.7.4. pH de estabilidade das L-asparaginases purificadas de <i>A. oryzae</i> IOC 3999 e <i>A. niger</i> IOC 0203.....	98
5.7.5. Determinação dos parâmetros cinéticos das L-asparaginases purificadas de <i>A. oryzae</i> IOC 3999 e <i>A. niger</i> IOC 0203.....	99
5.7.6. Efeito de íons metálicos na atividade das L-asparaginases purificadas de <i>A. oryzae</i> IOC 3999 e <i>A. niger</i> IOC 0203.....	101
5.7.7. Efeito de inibidores e ativadores na atividade das L-asparaginases purificadas de <i>A. oryzae</i> IOC 3999 e <i>A. niger</i> IOC 0203	104
5.7.8. Estudo da atividade da L-asparaginase em diferentes aminoácidos.....	107
5.8. Aplicação da L-asparaginase para redução dos teores de acrilamida em café	109
6. CONCLUSÃO.....	115
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
8. ANEXOS	132
8.1. Anexo 1	132
8.2. Anexo 2	133
8.3. Anexo 3	134
8.4. Anexo 4	135
8.5. Anexo 5	136
8.6. Anexo 6	137
8.7. Anexo 7	138
8.8. Anexo 8	139
8.9. Anexo 9	140
8.10. Anexo 10	141

8.11. Anexo 11	142
8.12. Anexo 12	143
8.13. Anexo 13	144
8.14. Anexo 14	145
8.15. Anexo 15	146
8.16. Anexo 16	147
8.17. Anexo 17	148
8.18. Anexo 18	149
8.19. Anexo 19	155
8.20. Anexo 20	156

1. INTRODUÇÃO

A acrilamida (AC) é conhecida como uma substância neurotóxica, genotóxica e carcinogênica em testes em animais (PENNISI et al., 2013) e foi classificada como um provável carcinógeno humano (IARC, 1994). Esta substância é formada pela reação de *Maillard* em alimentos contendo L-asparagina e açúcares redutores, como glicose e frutose, aquecidos em altas temperaturas e baixa umidade. Esta reação também forma compostos desejáveis de cor, sabor e aroma em alimentos cozidos ou fritos (THOMAS; THOMAS, 2014). Os principais alimentos que contêm altos teores de acrilamida são: batatas fritas com concentração variando de 272 a 570 $\mu\text{g/Kg}$ de AC, produtos de panificação com variação de 75 a 1044 $\mu\text{g/Kg}$ de AC e café variando de 229 a 890 $\mu\text{g/Kg}$ de AC (HU et al., 2015).

Devido às características sensoriais e comprovados benefícios à saúde, o café é uma das bebidas mais consumidas pelo mundo (ANESE, 2016). De acordo com o Relatório sobre o Mercado de Café, o Brasil é o maior produtor de café com uma produção estimada em 58,5 milhões de sacas, responsável por 35% da produção mundial, seguido do Vietnã (18%), Colômbia (9%), Indonésia (5,6%) e Etiópia (5%) (ABIC, 2019). Considerado o segundo maior consumidor de café no mundo, o Brasil apresenta um consumo per capita de 4,82 Kg/ano de café torrado e moído (ABIC, 2018). No entanto, seu consumo diário representa uma fonte significativa de exposição a acrilamida (ŞENYUVA; GÖKMEN, 2005).

O uso da enzima L-asparaginase apresenta alto potencial tecnológico para reduzir o teor de acrilamida em alimentos termicamente tratados, sem comprometer seus aspectos sensoriais e nutricionais (HENDRIKSEN et al., 2009). A L-asparaginase (L-asparagina amido-hidrolase EC 3.5.1.1) é uma enzima capaz de catalisar a hidrólise da L-asparagina em ácido L-aspartico e amônia, reduzindo assim o conteúdo de L-asparagina, o aminoácido precursor deste composto tóxico (CAPUANO; FOGLIANO, 2011).

As L-asparaginases são amplamente distribuídas em plantas, animais e micro-organismos (BATOOL et al., 2016; ZUO et al., 2015). Entretanto, a fonte mais importante de L-asparaginase são os micro-organismos. A L-asparaginase bacteriana é usada como droga injetável para o tratamento de alguns tipos de leucemia e linfoma (BATOOL et al., 2016), sendo obtida, por fermentação, a partir de *Escherichia coli* e *Erwinia carotovora* (CACHUMBA et al., 2016). Contudo, a L-asparaginase de algumas fontes bacterianas pode causar reações alérgicas (IZADPANA et al., 2018). Logo, torna-se necessário buscar outras fontes microbianas de L-asparaginase, como micro-organismos eucarióticos para se obter uma enzima com menor efeito adverso (PATRO; GUPTA, 2012).

Atualmente, as L-asparaginases fúngicas são consideradas seguras pelo *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) desde 2007 e são usadas como aditivos alimentares (XU et al., 2016). Este trabalho visou a seleção de linhagens de *Aspergillus* sp. produtoras de L-asparaginase, otimização dos componentes do meio de cultura e das condições de cultivo por metodologias estatísticas, produção, purificação, caracterização e aplicação da enzima para diminuição do conteúdo de acrilamida em grãos de café torrado.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Selecionar uma linhagem de *Aspergillus oryzae* ou *niger* produtora de L-asparaginase. Aumentar a produção de L-asparaginase utilizando estratégia sequencial de otimização, purificar e aplicar a enzima para diminuição da formação de acrilamida em grãos de café.

2.2. Objetivos específicos

- Selecionar uma linhagem de *Aspergillus* sp. produtora de L-asparaginase entre oito linhagens, obtidas por doação, da Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos da FioCruz-RJ;
- Determinar as características bioquímicas das preparações brutas de L-asparaginase;
- Otimizar a composição do meio e os parâmetros do processo fermentativo submerso da linhagem de fungo selecionada para a produção de L-asparaginase;
- Purificar a L-asparaginase em colunas de filtração em gel;
- Determinar as características bioquímicas da L-asparaginase purificada;
- Aplicar a enzima L-asparaginase purificada para a reduzir a formação de acrilamida em café torrado.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

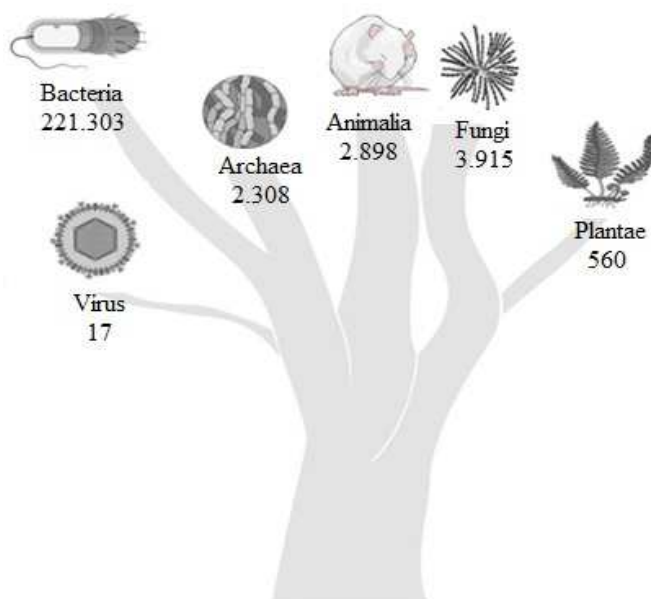
3.1. L-asparaginase fúngica

3.1.1. Aspectos gerais

As L-asparaginases podem ser encontradas em micro-organismos (bactérias, fungos, leveduras, actinomicetos e algas) e organismos superiores (plantas e animais). Na via metabólica dos seres vivos, a L-asparaginase desempenha um papel crítico no metabolismo de aminoácidos, hidrolisando a L-asparagina em ácido aspártico, que após a conversão em oxaloacetato, pode participar do ciclo de Krebs (ZUO et al., 2015).

De acordo com o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), as sequências de L-asparaginase são distribuídas principalmente no reino bacteriano, representando 95,5% das sequências de proteínas depositadas (221.303 de 231.770 sequências de proteínas). No entanto, a L-asparaginase também pode ser encontrada nos reinos *Fungi* (1,68%), *Animalia* (1,25%), *Plantae* (0,24%), *Archaea* (0,88%) e vírus (menos de 0,01%) (Figura 1).

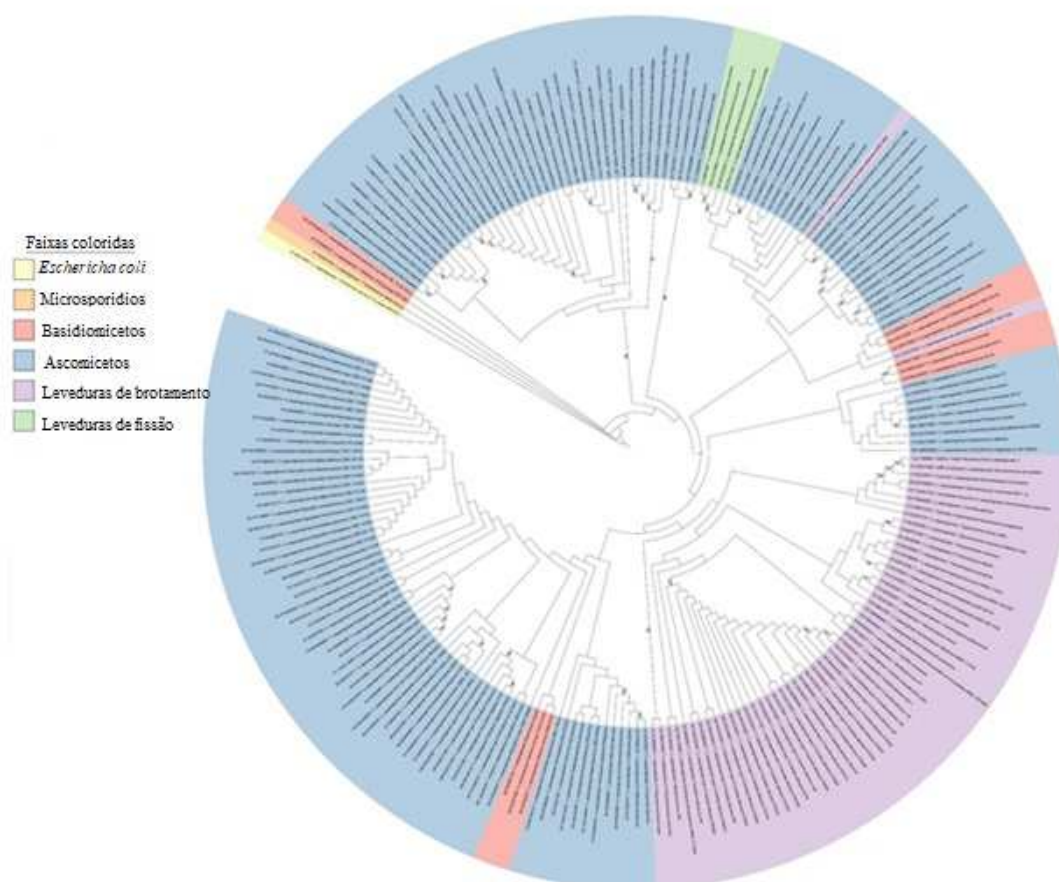
Figura 1 – Distribuição da L-asparaginase de acordo com o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).



A busca por novas fontes de L-asparaginase, por exemplo, micro-organismos eucarióticos é importante para aplicação da enzima na área médica e em processamento de alimentos. Micro-organismos eucarióticos, como leveduras e fungos filamentosos, têm potencial para a produção de L-asparaginase (BASKAR et al., 2010).

As sequências de L-asparaginases de fungos do reino são divididas em seis subclasses: ascomicetos (85,2%), basidiomicetos (11,1%), quitrídeos, glomeromicetos, microsporidianos e blastocladiomicetos (menos de 1% cada). De todo o banco de dados de fungos, foram utilizadas 212 sequências para construir a árvore filogenética com sequências alinhadas a uma L-asparaginase de *Aspergillus niger*, como mostra a Figura 2 (CUNHA et al., 2019).

Figura 2 – Distribuição filogenética da L-asparaginase em fungos e para fins de comparação utilizou-se a sequência genética de L-asparaginase de *E. coli*.



Para a construção das árvores filogenéticas, 3.915 sequências de proteínas foram comparadas com uma L-asparaginase de *Aspergillus niger*, mantendo todas as sequências com alinhamento de valor de $p > 1 \times 10^5$. Em seguida, foram filtrados para eliminar proteínas hipotéticas e manter apenas a sequência mais alta para cada cepa. A sequência de *E. coli* (L-asparaginase 1) foi aplicada como um grupo externo às 212 sequências restantes. Todas as sequências foram alinhadas com o MAFFT (versão 7 - <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) usando a estratégia automática. Para a filogenia, foi utilizado o método de associação do vizinho em todos os sites sem lacunas (30AAs) e 1000 bootstraps no servidor MAFFT. A árvore foi projetada no software iTOL (<https://itol.embl.de/>).

Os micro-organismos são considerados a fonte mais importante de L-asparaginase, uma vez que a atividade antitumoral de L-asparaginase de *Escherichia coli* (MASHBURN; WRISTON, 1964) foi relatada pela primeira vez. Os micro-organismos podem produzir vários tipos de L-asparaginase que diferem em sua localização (intracelular e extracelular) e propriedades em relação à atividade de L-asparaginase e L-glutaminase-asparaginase (ZUO et al., 2015). As L-asparaginases fúngicas tornaram-se importantes porque são excretadas no ambiente extracelular, são fáceis de extrair e processar a jusante (BATOOL et al., 2016; EL-NAGGAR et al., 2014).

Entre os fungos produtores de L-asparaginase, os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma* e *Cladosporium* (LINCOLN et al., 2015; MOHAN KUMAR et al., 2013; PATRO et al., 2014; SHRIVASTAVA et al., 2012) podem ser destacados. Alguns gêneros, no entanto, podem produzir micotoxinas, entre elas aflatoxina, ocratoxina, zearalenona, entre outras. As micotoxinas são metabólitos secundários que têm efeitos tóxicos para os seres humanos (MAZIERO; BERSOT, 2010).

O *Aspergillus oryzae* é conhecido por não ser patogênico, no entanto, algumas linhagens podem produzir micotoxinas de toxicidade baixa à moderada, como por exemplo, o ácido kojico (OLEMPSKA-BEER, 2007). Em relação à segurança do *Aspergillus niger*, cerca de 3 a 10% das linhagens deste micro-organismo são capazes de produzir micotoxinas com propriedades tóxicas, como a ocratoxina A. Deste modo, a síntese desses metabólitos deve ser controlada utilizando condições de fermentação apropriadas, além disso as linhagens utilizadas para produção de enzimas para aplicação em alimentos devem ser testadas quanto à capacidade de produzir micotoxinas (OLEMPSKA-BEER, 2008).

As L-asparaginases fúngicas utilizadas na indústria de alimentos são consideradas GRAS (geralmente reconhecidas como seguras) e são obtidas de *A. oryzae* e *A. niger*. Comercialmente, as preparações PreventASe® (DSM) e Acrylaway® (Novozymes) estão

atualmente disponíveis para a redução da acrilamida na indústria de alimentos. A PreventASe é obtida de *Aspergillus niger*, apresentando atividade em pH ótimo entre 4 e 5 e 50 °C (XU et al., 2016). A PreventASe® reduz a formação de acrilamida em aplicações de alto pH (até 9), como *chips* de milho e biscoitos (DSN, 2018).

A empresa Novozymes S/A desenvolveu a produção da L-asparaginase com base na clonagem de *Aspergillus oryzae*. A L-asparaginase de *A. oryzae* apresenta um pH ótimo entre 6 e 7, com boa atividade na faixa de pH 5 entre 8 e temperatura ideal de 60 °C (PEDRESCHI et al., 2008). Esses produtos podem ser usados como coadjuvantes de tecnologia e atualmente são usados em vários países, como Estados Unidos, Austrália, Nova Zelândia, China, Rússia, México e vários países europeus (XU et al., 2016).

No entanto, a composição dos alimentos pode influenciar a ação das enzimas (XU et al., 2016). Portanto, a enzima L-asparaginase ideal para uso alimentar deve ser estável durante o processamento e não induzir efeitos alérgicos ou tóxicos após o consumo (FRIEDMAN, 2015).

3.1.2. Produção de L-asparaginase por fungos

Diferentes métodos são usados para a produção de L-asparaginase, como fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS) usando diferentes micro-organismos (BATOOL et al., 2016). Os processos de FS estão bem estabelecidos e fornecem um bom rendimento, mas geram grandes quantidades de águas residuais e têm um alto custo de produção (IZADPANA et al., 2018). Por outro lado, a FES é uma alternativa atraente para FS e tem grande potencial para produção de enzimas. A FES alcançou grande relevância em bioprocessos, pois utiliza como substrato o resíduo agroindustrial de baixo custo e oferece potenciais benefícios ambientais (THOMAS et al., 2013). Além disso, esse tipo de fermentação se assemelha ao habitat natural dos micro-organismos e está bem adaptado ao metabolismo dos fungos filamentosos (SINGHANIA et al., 2009).

Existem vários fatores importantes que têm um enorme impacto no sucesso da FES. Estes fatores incluem pH, temperatura, aeração, umidade, natureza do substrato sólido, tamanho e forma das partículas. Entre vários fatores críticos, a umidade e a natureza do substrato sólido são os fatores mais importantes que afetam os processos de FES. A importância da umidade do meio de cultura para a fermentação em estado sólido depende do micro-organismo empregado e também da natureza do substrato. Os fungos necessitam de baixa umidade entre 40 e 60%, no

entanto, a seleção do substrato depende de vários fatores, principalmente relacionados à disponibilidade e custo (SINGHANIA et al., 2009).

Substratos sólidos, principalmente resíduos ou subprodutos agrícolas, estão sendo usados como substratos para a produção de L-asparaginase fúngica (DIAS et al., 2015; MEGHAVARNAM; JANAKIRAMAN, 2017; MISHRA, 2006; MOHAN KUMAR et al., 2013). Esses substratos atuam como suporte físico e fonte de nutrientes para a produção de enzimas. Portanto, para a produção comercial da enzima, a seleção de um substrato apropriado é um passo importante (MEGHAVARNAM; JANAKIRAMAN, 2017). A Tabela 1 mostra diferentes substratos e os parâmetros utilizados na fermentação em estado sólido e a máxima obtenção de L-asparaginase pelos fungos.

Tabela 1 – Produção de L-asparaginase por linhagens de fungos por fermentação em estado sólido.

Micro-organismo	Substrato	pH	Temp. (°C)	Umidade (%)	Atividade de L-asparaginase	Referência
<i>Aspergillus niger</i> LBA 02	Casca de maracujá	-	30	60	3746,78 U/g	Cunha et al., (2018)
<i>Aspergillus</i> sp.	Mistura de torta de sementes de algodão (2/3), farelo de trigo (1/6) e casca de grão de bico vermelho (1/6)	8	35	70	12,57 U/mL	Doriya; Kumar, (2018)
<i>Aspergillus fumigatus</i> WL002	Farelo de trigo	5	37	90	360 IU/ mg de proteína	Dutta et al., (2015)
<i>Aspergillus niger</i> C4	Torta de óleo de gergelim (preto)	6,5	29,31	96,02	355,88 U/g	Uppuluri et al., (2013)
<i>Aspergillus niger</i> LBA 02	Mistura de farelo de trigo (1/3), farelo de soja (1/3) e farelo de algodão (1/3)	-	30	50	89,22 U/g	Dias et al., (2015)
<i>Trichoderma viride</i>	Mistura de casca de arroz e farelo de trigo (3: 2)	5	28	75	71,87 ± 3,19 U/g	Elshafei; El-Ghoney, (2015)
<i>Cladosporium</i> sp	Farelo de trigo	5,8	30	58	3,74 U	Mohan Kumar et al., (2013a)
<i>Fusarium equiseti</i>	Farelo de soja	7	45	70	3,26 IU	Hosamani; Kaliwa, (2011)
<i>Fusarium culmorum</i> (ASP-87)	Farelo de soja	7	30	70	7,21 U/g	Meghavarnam; Janakiraman, (2017)

A produção industrial de L-asparaginase bacteriana e fúngica é realizada principalmente por FS (MOHAN KUMAR; MANONMANI, 2013). A produção de L-asparaginase é fortemente influenciada pela composição do meio de fermentação, especialmente fontes de carbono e nitrogênio, e fatores físicos como temperatura, pH, agitação, concentração de inóculo e tempo de fermentação (BASKAR; RENGANATHAN, 2011; HYMAVATHI et al., 2009; SOUZA et al., 2017). Cada organismo possui suas próprias condições especiais para a máxima produção de enzimas, portanto a otimização de componentes do meio de cultura e parâmetros de cultura é essencial no processo biológico (SOUZA et al., 2017). A Tabela 2 apresenta diferentes substratos e os parâmetros utilizados na fermentação submersa e a máxima obtenção de L-asparaginase por fungos.

Tabela 2 – Produção de L-asparaginase por linhagens de fungos por fermentação submersa.

Micro-organismo	Meio de cultivo	Fonte de carbono (m/v)	Fonte de nitrogênio (m/v)	pH	Temp. (°C)	Taxa de agitação	Concentração de esporos	Atividade de L-asparaginase	Referência
<i>Aspergillus aculeatus</i>	Czapek-Dox	0,2% glicose	1% L-asparagina	6,2	30	-	1% de suspensão de esporos	380,14 IU/mL	Dange; Peshwe, (2011)
<i>Aspergillus oryzae</i> CCT 3940	Czapek-Dox modificado	0,5% glicose	2% L-prolina, 0,2% L-asparagina e 0,5% de extrato de levedura	8	30	150 rpm	3×10^7 esporos/mL	67,49 U/mL	Dias; Sato, (2016)
<i>Aspergillus terreus</i> MTCC 1782	Czapek-Dox modificado	0,2% glicose	1% L-asparagina	6,2	30	180 rpm	5×10^7 esporos/mL	33,59 U/mL	Doriya; Kumar, (2016)
<i>Aspergillus terreus</i> MTCC 1782	Czapek-Dox modificado	1,5% farinha de milho e 0,2% glicose	1% ureia	6,2	30	160 rpm	10^7 a 10^8 esporos/mL	33,25 U/mL	Baskar; Renganathan, (2011a)
<i>Aspergillus terreus</i> MTCC 1782	Czapek-Dox	0,64% glicose	1,8% L-asparagina	5,85	32,08	123,5 rpm	1% suspensão de esporos	38,57 U/mL	Baskar; Renganathan, (2011b)
<i>Mucor hiemalis</i>	Czapek-Dox modificado	0,4% glicose	1,25% L-asparagina	7	30	-	Discos de 5 mm de inóculo	1203,55 U	Thakur et al., (2014)
<i>Trichoderma viride</i> sp.	Czapek-Dox modificado	0,6% maltose	0,5% peptona	6,5	37	-	Discos de 5 mm de inóculo	~ 650 U/mL	Lincoln et al., (2015)

Diferentes substratos para meios de cultura foram explorados para a produção de L-asparaginase. No entanto, os componentes mais importantes no meio de fermentação são a fonte de carbono e a fonte de nitrogênio (CACHUMBA et al., 2016). A influência de várias fontes de carbono, como glicose, sacarose, frutose, lactose, maltose e amido, têm sido estudados e vários estudos sugerem que a glicose é a melhor fonte de carbono para a produção dessa enzima (DORIYA; KUMAR, 2016). Entretanto, sabe-se que a síntese de L-asparaginase requer baixa concentração de fontes de carbono, uma vez que está sob repressão catabólica (MUKHERJEE et al., 2000).

O nitrogênio é um nutriente importante para os micro-organismos (STANBURY et al., 1995). Vários estudos têm mostrado que as melhores fontes de nitrogênio para alcançar altos rendimentos de L-asparaginase são L-asparagina (DORIYA; KUMAR, 2016 ; FARAG et al., 2015), por ser considerada um indutor na produção de L-asparaginase (BASKAR; RENGANATHAN, 2011a), e a L-prolina (SARQUIS et al., 2004). Além desses dois aminoácidos, outras fontes de nitrogênio também foram consideradas importantes para a produção de L-asparaginase, como a ureia (BASKAR; RENGANATHAN, 2011a), extrato de levedura e peptona (BASKAR; RENGANATHAN, 2011b).

O pH do meio de fermentação desempenha um papel vital no transporte de vários nutrientes através da membrana celular e no aumento da produção de L-asparaginase (FARAG et al., 2015). Na maioria dos estudos sobre a produção de L-asparaginase fúngica, o meio de cultura na faixa de pH 6,3 a 9,0 foi usado para a produção ótima da enzima (MOHAN KUMAR et al., 2013; DANGE; PESHWE, 2011).

Em relação à temperatura, um intervalo entre 30 e 37 °C para a produção ótima desta enzima foi relatado para espécies fúngicas (DANGE; PESHWE, 2011; ELSHAFEI et al., 2012; MOHAN KUMAR et al., 2013; THAKUR et al., 2014). A maioria dos estudos utiliza o parâmetro de agitação de cerca de 160 rpm para a produção de L-asparaginase por fungos e a produção foi melhor observada após 4 ou 5 dias de incubação a 30 °C (SOUZA et al., 2017).

A avaliação das necessidades nutricionais e condições físicas é um passo importante no desenvolvimento de bioprocessos (BASKAR; RENGANATHAN, 2011b). Atualmente, métodos de otimização são utilizados para tornar um bioprocessos economicamente viável. Alguns métodos estatísticos de planejamento experimental têm sido utilizados para otimizar o processo de produção de L-asparaginase a partir de fungos (SOUZA et al., 2017). A técnica tradicional de testar um fator de cada vez para otimizar um sistema multivariado leva a erros na interpretação dos resultados, uma vez que negligencia os efeitos das interações entre os fatores (EL-NAGGAR et al., 2014).

O uso do planejamento de experimentos elimina as desvantagens de usar a técnica de um fator por vez (EL-NAGGAR et al., 2014). Esse processo de otimização envolve três etapas principais: (i) realizar os experimentos usando uma matriz projetada estatisticamente, (ii) estimar os coeficientes em um modelo matemático, prever sua resposta e (iii) verificar a adequação do modelo (MOHAN KUMAR et al., 2013b). Esta técnica possui várias vantagens que incluem a necessidade de um menor número de experimentos, aplicação em experimentos com diversos fatores, além de considerar a interação entre estes e, gerar um modelo matemático, facilitando a descoberta da condição mais adequada e a predição de resposta (EL-NAGGAR et al., 2014).

Ferramentas estatísticas como o planejamento de Plackett-Burman e a metodologia de superfície de resposta têm sido usadas em vários estudos de otimização. Outra ferramenta estatística, rede neural artificial acoplada ao algoritmo genético, também tem sido utilizada em estudos de otimização em bioprocessos (BASKAR; RENGANATHAN, 2012a, 2012b). Além disso, outros tipos de métodos estatísticos têm sido utilizados para otimizar a produção de L-asparaginase por fungos, como o Delineamento de Misturas (DIAS et al., 2015) e o delineamento Box-Behnken (UPPULURI et al., 2013).

Baskar e Renganathan (2012b) utilizaram a estratégia de otimização sequencial de experimentos e rede neural artificial acoplada ao algoritmo genético para encontrar os componentes significativos da fermentação e a concentração ótima para a produção de L-asparaginase por *Aspergillus terreus* MTCC 1782 por fermentação submersa. A otimização dos componentes do meio de fermentação utilizando algoritmo genético conectado à rede neural artificial mostrou-se mais eficaz que o modelo de regressão da metodologia de superfície de resposta. A concentração ótima predita dos componentes do meio utilizando a rede neural artificial foi de 1,7% de L-prolina, 1,99% de nitrato de sódio, 1,38% de L-asparagina e 0,65% de glicose com produção experimental de 40,85 UI/mL de L-asparaginase.

Em outro estudo, Doriya e Kumar (2018) usaram uma estratégia sequencial para otimizar a produção de L-asparaginase usando *Aspergillus* sp. Na primeira etapa, por meio de planejamento da mistura, observou-se a atividade máxima da L-asparaginase utilizando uma mistura ternária de torta de algodão (2/3), farelo de trigo (1/6) e casca de feijão-vermelho (1/6). Na etapa seguinte, os parâmetros de cultura foram otimizados usando o delineamento Box-Behnken. Após 6 dias de fermentação utilizando mistura ternária otimizada, a atividade máxima de 12,57 U/mL de L-asparaginase foi obtida a 35 °C, pH 8 e umidade de 70% (p/v). Os autores observaram que, por meio do estudo de otimização sequencial, a produção de L-asparaginase aumentou 1,3 vezes.

Dias et al., (2015) usaram um Delineamento de Misturas para investigar a presença de efeitos sinérgicos ou antagônicos de diferentes resíduos agroindustriais para a produção de L-asparaginase por fermentação em estado sólido por *Aspergillus niger* LBA 02. Os pesquisadores obtiveram a maior atividade de L-asparaginase (89,22 U/g) após 96 horas de fermentação utilizando uma mistura ternária composta por farelo de trigo (1/3), farelo de soja (1/3) e farelo de algodão (1/3). Este processo mostrou maximização da produção de L-asparaginase quando as misturas foram usadas em comparação com aquelas isoladamente.

Uppuluri et al., (2013) otimizaram as condições para a produção de L-asparaginase por *Aspergillus niger* C4 em um biorreator utilizando bagaço de gergelim preto obtido por extração de óleo, como substrato para a fermentação em estado sólido. Os autores utilizaram o modelo Box-Behnken para três variáveis (aeração, espessura do leito e temperatura). A análise estatística revelou um rendimento máximo de L-asparaginase de 310 U/gds de substância seca, onde os parâmetros de aeração, espessura do leito e temperatura foram 0,44 vvm, 17,35 cm e 29,31 °C, respectivamente.

3.1.3. Purificação e propriedades bioquímicas de L-asparaginases fúngicas

A maioria dos procedimentos de purificação é realizada utilizando métodos convencionais, tais como fracionamento com sulfato de amônio combinado com cromatografia de exclusão molecular ou cromatografia em coluna de troca iônica (ZUO et al., 2015). A Tabela 3 apresenta diferentes métodos de purificação e caracterização bioquímica de várias L-asparaginases fúngicas relatados na literatura.

Tabela 3 – Purificação e características bioquímicas de L-asparaginases fúngicas.

Micro-organismo	Método de purificação	Atividade específica (IU/mg de proteína)	Fator de purificação	Massa Molecular	Atividade		K _m	V _{max}	Referência
					pH	Temp. (°C)			
<i>Aspergillus aculeatus</i>	Precipitação com sulfato de amônio, diálise, coluna G-25 e coluna Sephadex G-150	207	267,75	-	9	30	12,5 x 10 ⁻³ Mol/L	104,16 IU/mL	Dange; Peshwe, (2011)
<i>Aspergillus fumigatus</i> WL002	Ultrafiltração (30kDa), precipitação com sulfato de amônio (60%), coluna DEAE-Sepharose e Sephadex G-100	355,03	232,04	35 kDa	9,5	50	7,02 x 10 ⁻³ Mol/L	355,3 µMol/mg. min	Dutta et al., (2015)
<i>Aspergillus niger</i> AKV-MKBU	Precipitação com etanol e coluna DEAE celulose	46,75	10,36	~90 kDa	7	30	0,8141 mMol/L	6,228 µMol/mg.min	Vala et al., (2018)
<i>Aspergillus oryzae</i> CCT 3940	Precipitação com sulfato de amônio (80%), diálise, Q-Sepharose Fast Flow, SP Sepharose Fast Flow e CM Sepharose Fast Flow	282	28,6	115 kDa	8	50	0,66 x 10 ⁻³ Mol/L	313 IU/mL	Dias et al., (2016)
<i>Cladosporium</i> sp.	Precipitação com metanol, coluna de DEAE-celulose e coluna Sepharose 6B	83,3	867,7	121 kDa	6,3	30	0,1 Mol/L	4,44 µMol/mL min	Mohan Kumar; Manonmani, (2013)

Continuação na próxima página

Tabela 3 – Purificação e características bioquímicas de L-asparaginases fúngicas.

Micro-organismo	Método de purificação	Atividade específica (IU/mg de proteína)	Fator de purificação	Massa Molecular	Atividade		K _m	V _{max}	Referência
					pH	Temp. (°C)			
<i>Mucor hiemalis</i>	Precipitação com acetona e cromatografia de afinidade em coluna de lectina-agarose	69,43	4,59	96,32 kDa	7	37	4,3 mMol/L	625 U/mL	Thakur et al., (2014)
<i>Penicillium brevicompactum</i> NRC 829	Tratamento térmico por 20 min a 50 °C, coluna Sephadex G-100 e coluna Sephadex G-200	574,24	151,12	94 kDa	8	37	1,05 mMol/L	-	Elshafei et al., (2012)
<i>Penicillium digitatum</i>	Precipitação com sulfato de amônio e coluna Sephadex G-100	833,15	60,94	-	7	30	1 x 10 ⁻⁵ Mol/L	-	Shrivastava et al., (2012)
<i>Penicillium</i> sp.	Precipitação com sulfato de amônio, cromatografia em coluna de Sephadex G100-120 e coluna DEAE-celulose	13,97	1,9	66 kDa	7	37	4,00 x 10 ⁻³ Mol/L	-	Patro; Gupta, (2012)
<i>Rhizomucor miehei</i>	Coluna de ácido níquel-iminodiacético	1.984,8	2,6	133,7 kDa	7	45	0,0253 ± 0,0024 mg/mL	3.380,0 ± 133,4 μMol/min.mg	Huang et al., (2014)
<i>Trichoderma viride</i>	Precipitação com acetona e coluna de DEAE-celulose	78,2	13,0	99 ± 1 kDa	7	37	2,56 μMol/L	279,27 U/mL	Lincoln et al., (2015)

Na maioria dos estudos de purificação de L-asparaginase foram utilizados $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para precipitar a enzima (DANGE; PESHWE, 2011, DIAS et al., 2016, DUTTA et al., 2015; MISHRA, 2006). A concentração de sal variou de 35% a 100% dependendo da fonte da L-asparaginase (LOPES et al., 2017). Álcoois de cadeia curta como metanol e etanol (TUNDISI et al., 2016) e também agentes precipitantes como acetona (LINCOLN et al., 2015; THAKUR et al., 2014) foram também utilizados para a precipitação de L-asparaginase.

Os métodos cromatográficos são frequentemente usados para obter enzimas purificadas. A cromatografia de troca iônica com DEAE celulose é o método cromatográfico mais popular (TUNDISI et al., 2016). Lincoln et al., (2015) ao purificar a L-asparaginase de *Trichoderma viride* em coluna de DEAE celulose obtiveram um fator de purificação de 13, enquanto Vala et al., (2018) purificaram a L-asparaginase de *Aspergillus niger* AKV-MKBU cerca de 10,36 vezes usando essa resina.

Outra técnica comumente utilizada é a cromatografia de filtração em gel ou exclusão molecular com Sephadex (TUNDISI et al., 2016). A L-asparaginase de *Penicillium digitatum* foi purificada cerca de 60,95 vezes após precipitação com sulfato de amônio a 70-80% e cromatografia em coluna de Sephadex G-100 obtendo 833,15 UI/mg de atividade específica e 4,35% de recuperação (SHRIVASTAVA et al., 2012) enquanto Ahmed et al., (2015) purificaram dois tipos de L-asparaginase (AYA-1 e AYA-2) do sobrenadante de cultura de *Aspergillus* sp. ALAA-2000 por precipitação com sulfato de amônio e posterior aplicação em coluna Sephadex G-200 e obtiveram fator de purificação por 8,3.

De acordo com a literatura, L-asparaginases de diferentes micro-organismos variam em suas propriedades bioquímicas. Geralmente, a temperatura ótima para a atividade da L-asparaginase é entre 30 e 50 °C (HUANG et al., 2014; LINCOLN et al., 2015; MOHAN KUMAR; MANONMANI, 2013). Em relação ao pH ótimo, a L-asparaginase apresenta atividade em uma ampla faixa de pH, com atividade ótima na faixa de 6,0 a 9,5 (DIAS et al., 2016; DUTTA et al., 2015; VALA et al., 2018). No entanto, a maioria das L-asparaginases fúngicas apresenta atividade ótima em pH alcalino, enquanto apenas algumas L-asparaginases de fungos apresentam pH ótimo abaixo de pH 7,0 (AHMED et al., 2015; MOHAN KUMAR; MANONMANI, 2013).

A L-asparaginase purificada de *Aspergillus aculeatus* apresentou atividade máxima em pH 9,0 e 30 °C. A enzima reteve mais de 70% de atividade após 10 minutos a 50 °C, enquanto foi inativada a 90 °C (DANGE; PESHWE, (2011). A L-asparaginase purificada de *Aspergillus oryzae* CCT 3940 mostrou alta estabilidade sob condições fisiológicas,

permanecendo estável na faixa de pH de 7,0-8,0 após 1h de incubação na faixa de temperatura de 30 a 45 °C (DIAS et al., 2016).

Íons, assim como substâncias ativadoras e inibidoras, podem afetar a atividade da L-asparaginase de diferentes fontes fúngicas. A L-asparaginase de *Mucor hiemalis* foi ativada 100% por Mn^{2+} na concentração de 2 mMol/L, após incubação a 37 °C por 30 minutos e também foi ativada cerca de 100 a 150% na presença dos íons Ba^{2+} , K^+ , Cu^{2+} , Mn^{2+} e Hg^{2+} . A enzima foi inibida cerca de 50 a 100% na presença de Fe^{2+} e Na^+ (2 mMol/L). No entanto, o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) na concentração de 2 mMol/L não afetou a atividade enzimática, sugerindo que L-asparaginase de *Mucor hiemalis* não é uma metaloenzima. Os surfactantes Tween 80 e Triton X-100 (2 mMol/L) ativaram cerca de 350% a atividade da L-asparaginase enquanto o sulfato docetil de sódio (SDS) (2 mMol/L) inibiu a enzima, sendo obtido 17% da atividade residual (THAKUR et al., 2014).

Lincoln et al., (2015) analisaram o efeito de diferentes compostos na atividade da L-asparaginase de *Trichoderma viride*. A enzima foi testada com íons metálicos, inibidores e ativadores na concentração de 5 mMol/L e incubada por 30 minutos a 37 °C. A L-asparaginase foi ativada cerca de 140 e 160% por Mg^{2+} e Na^+ e inibida por Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} e Mn^{2+} . A enzima foi fortemente inibida por EDTA enquanto N-etilemaleimida e o fenilmetilsulfonilfluoreto não alteraram a atividade enzimática.

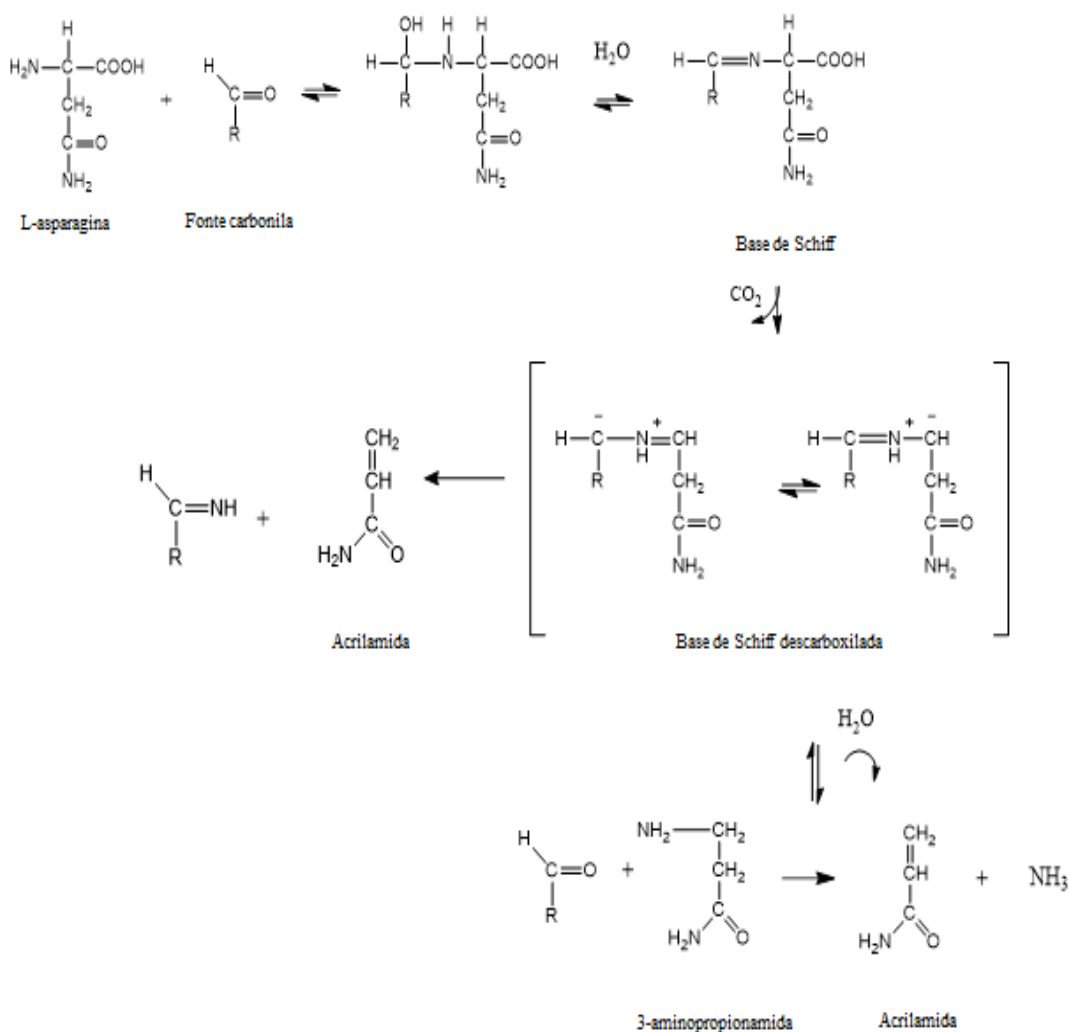
3.1.4. Aplicação de L-asparaginase fúngica na indústria alimentícia

Em 2002, a Administração Nacional de Alimentos da Suécia (SNFA) relatou a presença de acrilamida em alimentos com alto teor de carboidratos submetidos a temperaturas elevadas (MOTTRAM et al., 2002; TAREKE et al., 2002). Desde então, instituições de pesquisa e agências de alimentos vêm investigando a toxicidade, formação, mitigação e detecção de acrilamida em alimentos (HU et al., 2015).

Os alimentos relacionados à exposição humana à acrilamida são produtos de panificação (biscoitos e pão), batata frita e café (EFSA, 2015). A estimativa da ingestão alimentar foi estudada em várias populações com diferentes hábitos alimentares (DYBING et al., 2005; HILBIG et al., 2004; HILBIG; KERSTING, 2006). Estima-se que a ingestão de acrilamida na dieta esteja entre 0,3 e 1,9 µg/Kg por via oral (EFSA, 2015). No entanto, os alimentos com maior contribuição para ingestão de acrilamida variam de país para país, de acordo com padrões alimentares e métodos de preparação (CLAUS et al., 2008).

O principal mecanismo aceito pelos pesquisadores para explicar a formação de acrilamida nos alimentos envolve a reação de *Maillard* com os componentes L-asparagina e açúcares redutores durante tratamento térmico a alta temperatura (CLADIÈRE; CAMEL 2017; MOTTRAM et al., 2002; PEDRESCHI, 2009; YAYLAYAN; STADLER, 2005). O primeiro passo nesta reação é a formação intermediária da base de Schiff. Posteriormente, essa base de Schiff pode ser hidrolisada para formar 3-aminopropionamida, precursora de acrilamida ou sofrer eliminação de um grupo de amidas para formar diretamente acrilamida (CLAUS et al., 2008), conforme Figura 3 (CUNHA et al., 2019).

Figura 3 – Mecanismo de formação de acrilamida em alimentos aquecidos.



Outros mecanismos de formação de acrilamida por rotas alternativas também foram relatados na literatura, através da formação de acroleína, a partir de degradação de lipídeos à

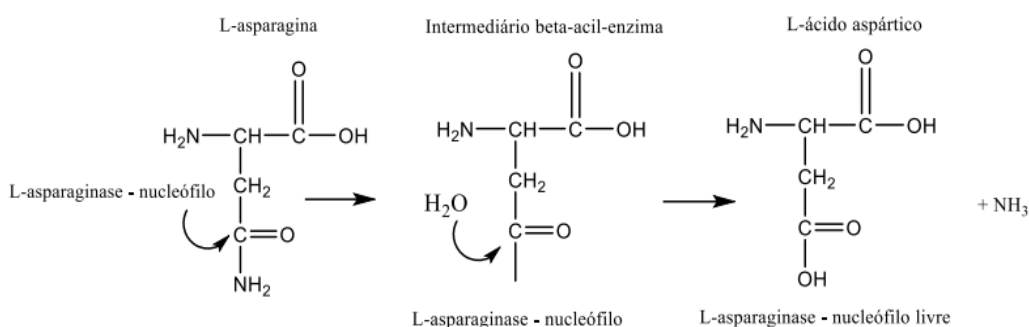
altas temperaturas, e também pela decomposição térmica de alguns aminoácidos como glutamina, cisteína e ácido aspártico. No entanto, sabe-se que a formação de acrilamida é baixa a partir dessas rotas (KRISHNAKUMAR; VISVANANTHAN, 2014).

Os fatores que influenciam a formação de acrilamida nos alimentos são: condições de processamento (temperatura, umidade, tempo de cozimento e matriz do produto) e precursores como açúcares redutores e aminoácidos livres (principalmente L-asparagina) (ZUO et al., 2015). A maioria dos métodos utilizados para atenuar a formação de acrilamida busca remover seus precursores ou inibir ou reduzir a intensidade da reação de *Maillard* por diferentes modificações de processo (PEDRESCHI, 2009). Entretanto, estes métodos utilizados para reduzir o conteúdo desse composto tóxico tem um impacto negativo no sabor e na aparência do produto final (BATOOL et al., 2016).

O uso da L-asparaginase fúngica é uma técnica promissora e ótima para reduzir os níveis de acrilamida nos alimentos. Essa enzima contribui para a mitigação por dois meios: interferência com a reação de *Maillard* ou remoção de precursores, convertendo L-asparagina em ácido L-aspártico sem alterar o valor nutricional, aparência ou sabor do produto final (BATOOL et al., 2016; HENDRIKSEN et al., 2009; SWANSTON, 2018).

O mecanismo reacional da atuação da L-asparaginase sobre a L-asparagina ocorre em duas etapas: No primeiro passo, o resíduo nucleofílico da enzima é ativado por uma base forte (NH_2), que em seguida atua sobre o carbono da função amida da L-asparagina, gerando um produto intermediário denominado de β -acil-enzima. A segunda etapa consiste na produção do L- ácido aspártico por meio da atuação de um nucleófilo, ativado por uma molécula de água, sobre o carbono éster do intermediário β -acil-enzima, com a liberação de amônia (CACHUMBA et al., 2016), como representado na Figura 4.

Figura 4 – Mecanismo de atuação da L-asparaginase.



As L-asparaginases oriundas de alguns micro-organismos também possuem a capacidade de catalisar outras reações como a hidrólise da L-glutamina, devido à similaridade estrutural dos aminoácidos L-glutamina e L-asparagina, entretanto o rendimento desta reação é considerado baixo (CACHUMBA et al., 2016).

A L-asparaginase pode ser usada como coadjuvante de tecnologia para atingir um objetivo tecnológico durante a fabricação. A enzima deve ser removida do alimento ou inativada; no entanto, é permitida a presença de vestígios da substância ou de seus derivados. Os resíduos da enzima, incluindo L-asparaginase desnaturada, podem variar de 0,14 a 428 mg/Kg de alimento (JECFA, 2009).

3.1.4.1. Batatas fritas

Produtos derivados de batatas (*Solanum tuberosum*), batatas fritas e batatas chips, são amplamente consumidos em muitos países. Os produtos da batata frita contribuíram para 50% da ingestão humana de acrilamida nos países europeus (KERAMAT et al., 2011; MESIAS et al., 2018). O aminoácido L-asparagina é reconhecido como o principal precursor para a formação de acrilamida em produtos derivados de batatas, sendo importante verificar o desempenho da enzima na diminuição deste composto, uma vez que o alto teor deste aminoácido em batatas também pode estar relacionado ao aumento da formação de acrilamida (BECALSKI et al., 2003, 2004).

De acordo com um estudo de Mesias et al., (2018), o potencial de formação de acrilamida em batatas está relacionado a vários fatores como: teor de L-asparagina e açúcares redutores, cor e umidade (em batatas frescas), óleo e utensílios usados para fritar, conteúdo de compostos polares no óleo de fritura (durante o processo de fritura), cor, espessura e cor visual (após a fritura). Outros fatores limitantes relacionados à formação de acrilamida em batatas são: variedade de batata, tipo de solo, fertilização, clima, armazenamento, corte, branqueamento e secagem e uso de aditivos (VINCI et al., 2012; MUTTUCUMARU et al., 2017). Embora todos esses fatores estejam relacionados à formação de acrilamida, açúcares redutores e L-asparagina são os fatores limitantes para a formação de acrilamida em produtos de batata (MUTTUCUMARU et al., 2017; WILLIAMS, 2005).

A redução de acrilamida em batatas fritas foi testada em diferentes condições utilizando, além dos tratamentos isolados, combinações de branqueamento e L-asparaginase de *Aspergillus oryzae*. A maior redução (90%) foi alcançada quando o branqueamento (85°C/3,5 min) foi aplicado, seguido de imersão em solução de L-asparaginase (50°C/20 min). O

tratamento térmico foi capaz de causar alterações na estrutura das batatas, facilitando a difusão da enzima nos tecidos e, consequentemente, favorecendo e potencializando sua ação (PEDRESCHI et al., 2011). Outro estudo sobre o uso de L-asparaginase de *Aspergillus oryzae* CCT 3940 (50 U/mL) para diminuir o teor de acrilamida de batatas fritas mostrou uma redução de 72% de acrilamida (após o processo de fritura a 180°C por 7 min) comparado com a amostra controle (DIAS et al., 2017).

Uma L-asparaginase produzida por *Fusarium culmorum* (ASP-87) foi usada para reduzir a acrilamida em produtos de batata. As batatas fritas foram tratadas com a enzima a 40 °C durante 30 min, seguidas de fritura a 170-180 °C durante 90s. Foi observado que 300 U/L de L-asparaginase foi necessário para reduzir 85% os níveis de acrilamida em batatas fritas. A L-asparaginase foi eficiente na inibição da formação de acrilamida, assim como na diminuição da L-asparagina. Os autores também encontraram altos níveis de acrilamida em diferentes tipos de produtos obtidos no mercado local (Bengaluru, Índia). O valor encontrado de acrilamida foi 4475 µg/Kg para batatas fritas (MEGHAVARNAM; JANAKIRAMAN, 2018).

3.1.4.2. Biscoitos e pães

A cor dos produtos de panificação é um dos atributos mais importantes que, além de afetar a qualidade dos alimentos, influencia a aceitação do consumidor (BARTKIENE et al., 2016; LU; ZHENG, 2012). A reação de *Maillard* está envolvida na formação dos atributos sensoriais específicos desses produtos, e a acrilamida também é formada durante a reação (THOMAS; THOMAS, 2014).

Segundo Nguyen et al., (2016), a L-asparagina livre na farinha de trigo foi o principal fator responsável pela formação da acrilamida em biscoitos com teor reduzido de açúcar, e a L-asparagina livre pode ser um fator limitante para a formação de acrilamida em produtos derivados de cereais como biscoitos.

Alguns estudos foram realizados sobre a aplicação de L-asparaginase fúngica para reduzir a acrilamida em biscoitos e pães. Hendriksen et al., (2009) aplicaram L-asparaginase de *Aspergillus oryzae* em biscoitos doces e salgados, os autores obtiveram uma redução de 34-92% nos níveis de acrilamida desses produtos. Resultado semelhante foi descrito por Ciesarová et al., (2009), que obtiveram uma redução de mais de 97% no teor de acrilamida, aplicando a enzima L-asparaginase comercial ao pão de gengibre sem prejudicar a qualidade sensorial do produto final. Vass et al., (2004) foram capazes de reduzir o conteúdo de acrilamida em

biscoitos em até 70% usando L-asparaginase comercial. Esses autores também não observaram alteração de cor ou sabor.

Anese et al., (2011a) estudaram a influência da composição do biscoito na capacidade da L-asparaginase (Novozymes®) de minimizar a formação de acrilamida. Diferentes formulações de biscoitos foram testadas, variando a quantidade de água e o tipo de gordura e adicionando 900 U/Kg de farinha em todos os tratamentos. Os autores concluíram que diferenças na eficiência da L-asparaginase podem estar relacionadas às diferentes composições dos alimentos avaliados. Apesar de ser capaz de remover a acrilamida, a L-asparaginase apresentou uma melhor redução da acrilamida em biscoitos com alto teor de água; no entanto, a redução da acrilamida diminuiu com o aumento do teor de gordura nos biscoitos.

Em outro estudo, foi avaliado o efeito da L-asparaginase na formação de acrilamida em biscoitos usando delineamento experimental. Anese et al., (2011b) constataram que o uso de concentração de L-asparaginase de 500 U/Kg, a formação de acrilamida era mínima, assim como no menor tempo e na menor temperatura de incubação. O parâmetro importante do biscoito, cor, não foi afetado pela aplicação da enzima.

O gene da L-asparaginase de *Rhizomucor miehei* foi clonado, expresso em *Escherichia coli* por Huang et al., (2014), e a enzima (10 U/mg de farinha) foi utilizada para reduzir o teor de acrilamida nos biscoitos, atingindo uma redução de aproximadamente 80%. Além disso, a enzima foi útil na redução da acrilamida presente nos pães e também demonstrou potencial para uso no tratamento da leucemia.

Existe uma forte correlação entre a intensidade da cor da crosta do pão e a formação de acrilamida, principalmente quando o pão é assado em temperaturas acima de 200 °C (KERAMAT et al., 2011). Mohan Kumar et al., (2014) aplicaram L-asparaginase produzida a partir de *Cladosporium* sp. em diferentes concentrações (50-300 U) em pão doce. Os autores não observaram alterações nas características físico-sensoriais do pão com o tratamento com L-asparaginase. No tratamento com 300 U, houve redução de 97% e 73% na formação de acrilamida nas regiões da crosta e do miolo, respectivamente. Estes resultados indicaram o potencial da L-asparaginase para aplicações industriais e domésticas na redução da acrilamida.

3.1.4.3. Café

O café é um dos três principais alimentos que contribuem para ingestão de acrilamida (MUCCI et al., 2003), por isso, torna-se importante os estudos de mitigação de acrilamida neste produto, já que o seu consumo diário representa uma fonte significativa de

exposição à acrilamida (ŞENYUVA; GÖKMEN, 2005). No entanto, a ingestão de acrilamida proveniente do consumo de café, varia de país para país, idade e sexo do consumidor, grau de torra, volume de café ingerido e etc. (ANESE, 2016).

As duas principais espécies de café usadas na preparação da bebida são arábica e robusta. A qualidade da bebida depende da proporção de cada grão (ALVES et al., 2010). Altas concentrações de acrilamida foram encontradas no café robusta (*Coffea canefora robusta*) torrado em relação ao café arábica (*Coffea arabica*) torrado (ANESE, 2016). Como a acrilamida é uma molécula polar, a preparação de café moído com água quente pode permitir a extração completa deste composto presente nos grãos de café torrados (GUENTHER et al., 2007).

De acordo com os resultados do Painel de Contaminantes na Cadeia Alimentar (CONTAM) da EFSA, entre 2010 e 2013, mais de 1500 produtos à base de café foram analisados e a concentração média de acrilamida encontrada foi de 578 ng/g em café torrado (EFSA, 2015). Em 2017, a Comissão Europeia estabeleceu uma recomendação (2017/2158/EU) para concentração de acrilamida em café torrado de 400 µg/Kg (COMISSÃO EUROPEIA, 2017). No entanto, o Brasil não estabelece um limite para o teor de acrilamida em alimentos, a Portaria de Consolidação nº 5 do Ministério da Saúde de 2017 estabelece concentração limite de acrilamida apenas para água potável de cerca de 0,5 µg/L (BRASIL, 2017).

Como a formação da acrilamida é induzida pelo calor juntamente com a formação das características sensoriais desejáveis no café como cor, sabor e aroma, torna-se muito difícil minimizar a formação deste composto tóxico sem afetar a qualidade sensorial deste alimento (ANESE, 2016). Uma das medidas preventivas de formação de acrilamida é o uso da L-asparaginase que visa manter a menor concentração possível deste composto durante a torração, atuando no precursor L-asparagina, criando condições reacionais menos favoráveis (ANESE, 2016). No estudo de Hendriksen et al., (2013) foi avaliado o efeito da L-asparaginase na redução da acrilamida no café. Amostras de café arábica beneficiado foram cozidas no vapor com água por 45 minutos a 100 °C e tratado com L-asparaginase a 60 °C por 60 min. Os autores observaram maior redução quando usaram a concentração de 6.000 ASU/Kg de grãos, observando uma redução de 80% no teor de L-asparagina e 74% na formação de acrilamida.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Micro-organismos

Foram testadas oito linhagens de *Aspergillus* sp. obtidas da Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos da Fundação Oswaldo Cruz- FioCruz, Rio de Janeiro, Brasil. As linhagens utilizadas foram: *Aspergillus niger* IOC 2016, *Aspergillus niger* IOC 0203, *Aspergillus niger* IOC 4470, *Aspergillus niger* IOC 0933, *Aspergillus niger* IOC 4606, *Aspergillus niger* IOC 4573, *Aspergillus oryzae* IOC 3999 e *Aspergillus oryzae* IOC 3924 (Anexo 2). As linhagens foram cultivadas em tubos inclinados contendo meio Agar Batata Dextrose (PDA), incubados a 30 °C durante 7 dias e armazenadas a 4 °C em óleo mineral, com repicagem a cada 4 meses.

4.2. Teste qualitativo para a detecção da produção de L-asparaginase em placas de Petri

Para a seleção dos fungos produtores de L-asparaginase foi utilizado o método proposto por Gulati et al., (1997). Os micro-organismos foram repicados em placas de Petri contendo meio Czapek Dox modificado (2 g de glicose, 10 g de L-asparagina, 1,52 g de KH_2PO_4 , 0,52 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,52g de KCl , 0,001 g de $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0,001 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 g de ágar por litro e foi ajustado para pH 6,2 com NaOH 0,1 Mol/L ou HCl 0,1 Mol/L). Ao meio de cultura foi adicionado 4,5 mL de solução 2% de vermelho de fenol em etanol por litro. Para o meio controle foi feita a repicagem dos mesmos micro-organismos em placas de Petri contendo o meio Czapek Dox sem o aminoácido L-asparagina em sua formulação. Foi também testado meio controle de nitrogênio, onde foi adicionado NaNO_3 no lugar da L-asparagina, na mesma concentração (10g/L). As linhagens dos fungos foram inoculadas no centro da placa para determinar o índice de atividade enzimática. Após 48h de incubação a 30 °C foi observada a formação de halo de coloração rosa indicativo de possível produção da L-asparaginase. O índice de atividade enzimática foi determinada pela Equação 1 (GULATI et al., 1997). As medidas foram feitas com paquímetro (duas medidas na perpendicular) e todos os experimentos foram realizados em triplicata.

$$\text{Índice de atividade enzimática} = \frac{\text{Diâmetro do halo de coloração rosada}}{\text{Diâmetro da colônia}} \quad (1)$$

4.3. Cinética de fermentação das linhagens de fungos em frascos agitados para produção de L-asparaginase

As linhagens de fungos que apresentaram resultado positivo no teste qualitativo foram testadas quanto à sua capacidade de produção de L-asparaginase por fermentação submersa. Para o cultivo e obtenção de esporos, os micro-organismos foram repicados em tubos inclinados contendo Ágar Batata Dextrose (PDA) e incubados por 7 dias a 30 °C. Os esporos dos fungos foram produzidos pela inoculação de 1 mL da suspensão de esporos de micro-organismos em um meio constituído por 10 g de farelo de trigo e 4 mL de uma solução contendo Na_2HPO_4 a 1,7% (m/v) e 2,0% (m/v) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, incubados durante 72 horas a 30 °C. Para a extração dos esporos de fungos foi adicionado aos frascos Erlenmeyer 40 mL de solução 0,3% de Tween 80 esterilizada e foi realizada a contagem dos esporos em câmara de Neubauer usando microscópio ótico (CUNHA et al., 2018).

As culturas foram inoculadas assepticamente em frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de meio de fermentação Czapek Dox modificado por Gulati et al., (1997) sendo composto por: 2 g de glicose, 10 g de L-asparagina, 1,52 g de KH_2PO_4 , 0,52 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,52 g de KCl, 0,01 g de $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por litro e ajustado para pH 6,2 com NaOH 0,1 Mol/L ou HCl 0,1 Mol/L. Aos frascos foram adicionados uma concentração de esporos de 10^7 esporos/mL e incubados em incubador rotatório (*New Brunswick Scientific series 25*, NJ, EUA) a 30 °C por 150 rpm durante 5 dias e a atividade enzimática foi mensurada a cada 24h. As culturas de fungos foram filtradas em papel de filtro *Whatman* nº 1 e o filtrado denominado extrato enzimático bruto foi armazenado a -15 °C e a atividade de L-asparaginase foi determinada posteriormente, como descrito no item 4.4. Após 120 h de fermentação, o pH final dos extratos brutos foi medido em pHmêtro DM-22 (Digimed, SP, BR) e a atividade de protease foi determinada conforme descrito no item 4.5.

4.4. Determinação da atividade de L-asparaginase

A atividade de L-asparaginase foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Imada et al., (1973) modificada por Dias e Sato (2016). O meio reacional contendo 0,5 mL de solução 0,04 Mol/L de L-asparagina, 0,8 mL de solução tampão fosfato 50 mM pH 8 e 0,2 mL do extrato enzimático foi incubado a 40 °C por 30 minutos. A reação foi paralisada com a adição de 0,5 mL de solução 1,5 Mol/L de ácido tricloroacético. Para quantificar a amônia liberada, uma alíquota de 125 µL da mistura reacional foi transferida para microtubo de 2 mL

e em seguida foi adicionada 1 mL de água destilada e 125 µL do reagente de Nessler (Merck®). A absorbância foi medida a 450 nm em espectrofotômetro DU 640 (Beckman Coutler, CA, EUA). Para o ajuste do zero de absorbância foi preparado tubo branco composto de 0,5 mL de solução 0,04 Mol/L de L-asparagina, 0,8 mL de solução tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 8 e 0,2 mL de água destilada. Após incubação a 40 °C por 30 minutos foi adicionado 0,5 mL de solução 1,5 Mol/L de ácido tricloroacético. Uma alíquota de 125 µL da mistura foi transferida para microtubo de 2 mL e em seguida foi adicionado 1 mL de água destilada e 125 µL de reagente de Nessler (Merck®). Foi preparado tubo controle composto de 0,5 mL de solução de 0,04 Mol/L de L-asparagina, 0,8 mL de solução de tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 8, 0,2 mL de extrato enzimático e 0,5 mL de solução 1,5 Mol/L de ácido tricloroacético e incubado a 40 °C por 30 minutos. Uma alíquota de 125 µL da mistura foi transferida para microtubo e em seguida foi adicionado 1 mL de água destilada e 125 µL do reagente de Nessler (Merck®). Foi feita uma curva analítica de sulfato de amônio (10 a 225 µMol/L) para a quantificação de amônia liberada (Anexo 3). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A atividade enzimática foi expressa em U/mL, sendo 1 unidade definida como a quantidade de enzima que libera 1 µMol de amônia por minuto sob as condições de ensaio.

4.5. Determinação da atividade de protease

A atividade de protease foi medida nos extratos brutos enzimáticos das culturas obtidas após 120h de fermentação, como descrito no item 4.3. A atividade de protease foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Charney e Tomarelli (1947) modificado por Castro e Sato (2014). O meio reacional contendo 0,5 mL de solução 0,5% (m/v) de azocaseína em tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 6 e 0,5 mL do extrato bruto enzimático foi incubado por 40 minutos a 60 °C. A reação foi paralisada com a adição de 0,5 mL de solução 10% de ácido tricloroacético. Para o ajuste do zero da absorbância utilizou água destilada. Foi preparado um tubo controle composto por 0,5 mL de solução 0,5% (m/v) de azocaseína em tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 6, seguido da adição de 0,5 mL do extrato bruto enzimático e 0,5 mL de solução 10% de ácido tricloroacético incubado por 40 minutos a 60 °C. Os tubos foram centrifugados a 17000 x g durante 15 minutos a 25 °C em centrífuga Allegra™ X-22R (Beckman Coutler, CA, EUA). Uma alíquota de 1,0 mL do sobrenadante foi neutralizada com a adição de 1 mL de solução 5 Mol/L de KOH. Uma unidade enzimática (U/mL) foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar em 0,01 a absorbância medida em 428 nm em espectrofotômetro DU 640 (Beckman Coutler, CA, EUA).

4.6. Caracterização bioquímica parcial das L-asparaginases dos extratos brutos

As características bioquímicas pH e temperatura ótima de atividade das L-asparaginases dos extratos brutos foram testadas visando à escolha da linhagem produtora da enzima com melhores características para aplicação em alimentos.

4.6.1. Determinação da temperatura ótima de atividade da L-asparaginase

Para a determinação da temperatura ótima de atividade da L-asparaginase, os ensaios enzimáticos foram realizados como descrito no item 4.4 na faixa de temperatura entre 20 a 80 °C e utilizando solução tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 8. Após a realização dos ensaios enzimáticos foi determinada a atividade enzimática relativa, considerando a maior atividade como sendo 100%. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.6.2. Determinação do pH ótimo de atividade de L-asparaginase

Para a determinação do pH ótimo de atividade da L-asparaginase o ensaio enzimático, descrito no item 4.4, foi realizado em diferentes valores de pH (2 a 10), utilizando as seguintes soluções tampão: glicina-HCl 0,05 Mol/L (pH 2,0 - 3,5), acetato de sódio 0,05 Mol/L (pH 4,0-5,5), fosfato 0,05 Mol/L (pH 5,6-8,0) e glicina-NaOH 0,05 Mol/L (pH 9,0-10,0) na temperatura ótima de cada enzima. Após a realização dos ensaios enzimáticos foi determinada a atividade enzimática relativa, considerando a maior atividade como sendo 100%. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.7. Triagem de diferentes fontes de carbono e nitrogênio para produção de L-asparaginase por fermentação submersa

Após a seleção e caracterização das enzimas foi estudada a influência da composição do meio de cultivo e dos parâmetros de fermentação para a máxima produção de L-asparaginase em meio submerso. Seis fontes de carbono foram testadas em um estudo univariado: glicose (Synth[®]), frutose (Synth[®]), maltose (Vetec[®]), lactose (Vetec[®]), sacarose (Êxodo Científica[®]) e amido solúvel (Synth[®]) a 0,5% (m/v) de concentração, e as demais variáveis do meio Czapek Dox modificado (10,0 g L-asparagina, 1,52 g de KH₂PO₄, 0,52 g de KCl, 0,52 g de MgSO₄.7 H₂O, 0,01 g de CuNO₃. 3H₂O, 0,01 g de ZnSO₄. 7H₂O e 0,01 g FeSO₄.

7H₂O por litro) e pH inicial ajustado para 6,2 com NaOH 0,1 Mol/L ou HCl 0,1 Mol/L, proposto por Gulati et al., (1997) foram mantidos fixos. O micro-organismo foi inoculado a uma concentração de 10⁷ esporos/mL, incubado em incubador rotatório (*New Brunswick Scientific* series 25, NJ, EUA) a 30 °C por 150 rpm nos tempos de 48h para a L-asparaginase de *A. niger* IOC 0203 e 72h para L-asparaginase de *A. oryzae* IOC 3999. Após o período de incubação, as amostras foram filtradas através de papel de filtro *Whatman* nº 1 e o filtrado foi utilizado como extrato bruto enzimático e armazenado a -15 °C. Foi determinada a atividade de L-asparaginase como descrito no item 4.4. A fonte de carbono que proporcionou a maior produção de L-asparaginase foi escolhida e fixada, assim como os demais componentes do meio e os parâmetros do processo fermentativo, e então as fontes de nitrogênio foram estudadas.

Oito fontes de nitrogênio foram investigadas: peptona (Biobrás®), triptona (Difco®), extrato de levedura (Oxoid®), extrato de carne (Oxoid®), caseína hidrolisada (casaminoácidos, Difco®), base nitrogenada de levedura (YNB, Difco®), L-asparagina (Synth®) e L-prolina (Synth®) na concentração fixa de 1,0% (m/v). O micro-organismo foi inoculado a uma concentração de 10⁷ esporos/mL, incubado em incubador rotatório (*New Brunswick Scientific* series 25, NJ, EUA) a 30 °C por 150 rpm nos tempos de 48h para a L-asparaginase de *A. niger* IOC 0203 e 72h para L-asparaginase de *A. oryzae* IOC 3999. Após o período de incubação, as amostras foram filtradas através de papel de filtro *Whatman* nº 1 e o filtrado, isento de células, foi utilizado como extrato bruto enzimático e armazenado a -15 °C. Foi determinada a atividade de L-asparaginase como descrito no item 4.4.

4.8. Estratégia sequencial de otimização da produção de L-asparaginase pelo processo de fermentação submersa

A produção da enzima foi estudada em meio submerso e foram analisadas diferentes concentrações de fonte de carbono e de fonte de nitrogênio, assim, como também foi analisado diferentes faixas de temperatura, pH, taxa de agitação e concentração de inóculo.

Para este estudo, primeiramente, foi utilizado um delineamento experimental empregando uma matriz do tipo Plackett & Burman (PB) de 12 ensaios mais três pontos centrais. A Tabela 4 mostra as variáveis reais que foram analisadas no delineamento PB.

Tabela 4 – Variáveis reais analisadas no delineamento Plackett-Burman 12 (PB 12) para o estudo da fermentação das linhagens de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203 e produção de L-asparaginase.

Variáveis	-1	0	1
X₁= Fonte de carbono % (m/v)	0,5	1,25	2
X₂= L-asparagina % (m/v)	0	1	2
X₃= Fonte de nitrogênio % (m/v)	0	1	2
X₄= pH	6	7	8
X₅= Temperatura (°C)	25	30	35
X₆= Taxa de agitação (rpm)	100	150	200
X₇=Concentração de inóculo (esporos/mL)	1x10 ⁵	5,05x10 ⁶	1x10 ⁷

Para o crescimento dos fungos e a obtenção dos esporos foi utilizado a metodologia de Cunha et al., (2018). Uma alíquota de concentração conhecida da suspensão de esporos foi transferida assepticamente para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo o meio de fermentação, conforme a matriz do delineamento. Foi determinada a atividade de L-asparaginase como variável resposta, conforme o item 4.4. Depois de concluído o planejamento experimental (PB 12), as análises estatísticas foram feitas com auxílio do software *Statistica* 13.3 a 5% de significância.

As variáveis independentes que apresentaram efeitos significativos estatisticamente sobre as variáveis respostas foram utilizadas no delineamento composto central rotacional (DCCR). Após a conclusão do DCCR, foram ajustados modelos (Equação 2) e geradas superfícies de resposta e curvas de contorno, segundo metodologia preconizada por Rodrigues e Iemma (2014).

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 \quad (2)$$

Em que β_0 é o termo de interceptação; β_1 , β_2 e β_3 são os coeficientes lineares; são β_{12} , β_{13} e β_{23} os coeficientes de interação; β_{11} , β_{22} e β_{33} os coeficientes quadráticos e x_1 , x_2 e x_3 são as variáveis codificadas. As análises estatísticas foram feitas com auxílio do software *Statistica* 13.3 a 5% de significância. A validação do modelo foi realizada por meio da repetição de um ensaio em triplicata das condições de produção de L- asparaginase. A concentração de L-asparaginase prevista foi, então, comparada com dados resultantes dos experimentos.

4.8.1. Produção de L-asparaginase pelas linhagens de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203 por fermentação submersa

A produção de L-asparaginase de *A. oryzae* IOC 3999 foi realizada em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 2,9% de lactose, 2,9% de L-asparagina e 0,7% de caseína hidrolisada (casaminoácidos), 0,152% de KH_2PO_4 , 0,052% de KCl, 0,052% de MgSO_4 , 0,001% de $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0,001% de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,001% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ajustado para pH 7,0 e adicionado uma concentração de $5,05 \times 10^6$ esporos/mL a 30 °C, por 100 rpm durante 48h de fermentação. A produção de L-asparaginase de *A. niger* IOC 0203 em condições otimizadas foi realizada utilizando meio Czapeck modificado composto de 2,9% de sacarose, 0,35% de L-asparagina, 0,152% de KH_2PO_4 , 0,052% de KCl, 0,052% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001% de $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0,001% de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,001% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ajustados para pH 7,0 a 22,5 °C, 150 rpm durante 24h e adicionando uma concentração de $5,05 \times 10^6$ esporos/mL.

4.9. Purificação das L-asparaginases de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203

4.9.1. Ultrafiltração

Os extratos enzimáticos brutos obtidos de acordo com o item 4.8.1 foram ultrafiltrados em membrana de 30 kDa da Dioflo® Ultrafilters para remoção de proteínas de baixa massa molecular utilizando sistema de ultrafiltração Amicon modelo TCF2/TCF2A (Grace Company, SC, EUA). Após a ultrafiltração os extratos enzimáticos foram analisados quanto ao teor de proteína utilizando o método de Lowry et al., (1951) e a atividade L-asparaginase foi determinada segundo o método descrito no item 4.4. Foi construído uma curva analítica de 0 a 0,2 mg/mL de ovo albumina (Sigma-Aldrich®) para quantificação do conteúdo de proteína (Anexo 4).

4.9.2. Purificação e determinação da massa molecular das L-asparaginases de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203 em coluna de Sephadex G-100

Amostras de 3 mL do extrato enzimático ultrafiltrados foram aplicadas em coluna de exclusão molecular Sephadex G-100 (100 cm x 1,5 cm de diâmetro). Foi utilizado solução tampão fosfato 50 mM pH 7 e KCl 100 mM, como fase móvel, em um fluxo de 0,2 mL/min, temperatura de 17 °C e volume de fração coletada de 3 mL. A coluna foi calibrada com blue

dextrana (2.000 kDa), β -amilase de batata doce (200 kDa), álcool desidrogenase (150 kDa), albumina de soro bovino (66 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), citocromo C (12,4 kDa) (Sigma-Aldrich®). A eluição da proteína foi estimada por medida da absorbância a 280 nm em espectrofotômetro DU 640 (*Beckman Coutler*, CA, EUA). A concentração de proteína foi determinada usando o método de Lowry et al., (1951) e a atividade L-asparaginase foi determinada segundo a metodologia descrita no item 4.4. O volume de eluição (V_e) de cada proteína e o volume vazio (V_0) da coluna foram determinados, para estimar a massa molecular da L-asparaginase.

4.9.3. Eletroforese em gel SDS- poliacrilamida das L-asparaginases

A homogeneidade e a massa molecular das L-asparaginases foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), de acordo com o método descrito por Laemmli (1970). A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida (12%) e gel de empilhamento (4%), a 120 v por 1 h e 10 minutos. Após eletroforese, o gel foi tratado com solução de fixação de proteínas (400 mL de etanol e 100 mL de ácido acético) por 30 minutos, em seguida corado com solução de 0,1% de *Coomassie* brilhante G 250 por 24h. Em seguida, o gel foi descorado, por meio de várias lavagens, em ácido acético/metanol/água (1/4/5) e corado com prata utilizando o método de Blum et al., (1987). O gel foi lavado 3 vezes com uma solução de enxaguamento (50% de etanol) durante 20 minutos cada. Em seguida, o gel foi tratado com solução de 0,02% de tiosulfato de sódio por 1 minuto e, posteriormente, lavado três vezes com água destilada. Em seguida, o gel foi tratado com uma solução de 0,2% AgNO_3 + 0,02% formaldeído e deixado no escuro por 20 minutos, sendo novamente lavado com água destilada. Posteriormente, o gel foi tratado com uma solução de 3% de carbonato de sódio + 0,05% de formaldeído. Após o aparecimento das bandas, o gel foi tratado com solução de 13% ácido acético glacial, e em seguida fotografado.

Após coloração com gel de prata, a massa molecular foi estimada utilizando-se o gráfico logaritmo da massa dos marcadores de proteína versus a mobilidade relativa de cada proteína do marcador (Anexo 7). Foram utilizados marcadores de massa molecular: fosforilase b (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovo albumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa) (Pharmacia®, Uppsala, Suécia).

4.9.4. Caracterização bioquímica das L-asparaginases purificadas de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203

As características bioquímicas de pH e temperatura ótima de atividade, pH e temperatura de estabilidade, parâmetros cinéticos, presença de sais, presença de ativadores e inibidores sobre atividade das L-asparaginases purificadas de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203 foram determinadas. Para efeito de comparação, também foram realizadas as mesmas determinações para a enzima comercial (*Acrylaway*®).

4.9.4.1. Determinação da temperatura ótima de atividade

Para a determinação da temperatura ótima da atividade da L-asparaginase, os ensaios enzimáticos foram realizados, como descrito no item 4.4, na faixa de temperatura entre 20 a 80 °C, utilizando tampão fosfato 0,05 Mol/L pH 6. Após a realização dos ensaios enzimáticos foi determinada a atividade enzimática relativa, considerando a maior atividade como sendo 100%. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.9.4.2. Determinação do pH ótimo de atividade

Para a determinação do pH ótimo da atividade de L-asparaginase o ensaio enzimático, descrito no item 4.4, foi realizado em diferentes valores de pH (2 a 10), utilizando as seguintes soluções tampão: glicina-HCl 0,05 Mol/L (pH 2,0 - 3,0), acetato de sódio 0,05 Mol/L (pH 4,0-5,0), fosfato 0,05 Mol/L (pH 6,0-8,0) e glicina-NaOH 0,05 Mol/L (pH 9,0-10,0) na temperatura ótima de cada enzima. Após a realização dos ensaios enzimáticos foi determinada a atividade enzimática relativa, considerando a maior atividade como sendo 100%. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.9.4.3. Determinação da temperatura de estabilidade

Para o estudo da termoestabilidade da L-asparaginases purificadas e da enzima L-asparaginase comercial, 0,2 mL da enzima e 0,8 mL de solução tampão, com concentração de 0,05 Mol/L no pH ótimo de atividade de L-asparaginase de cada linhagem, foram adicionados em microtubos e pré-incubados em diferentes temperaturas de 20 a 80 °C durante 1h, sendo

imediatamente transferidos para banho de gelo após o período de incubação. Após a realização dos ensaios foi determinada a atividade enzimática residual (Equação 3), definida como:

$$\text{Atividade residual (\%)} = \frac{A_f}{A_o} \times 100 \quad (3)$$

Onde A_f é atividade enzimática final após 1h de incubação e A_o é a atividade enzimática inicial. A determinação de L-asparaginase foi medida nas condições ótimas de temperatura e pH de cada enzima, como descrito no item 4.4. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.9.4.4. Determinação do pH de estabilidade

O efeito do pH de estabilidade das L-asparaginases purificadas e comercial foi avaliado incubando-se 0,2 mL das enzimas em 0,8 mL de diferentes soluções tamponantes na concentração de 0,1 Mol/L em valores de pH (2 a 10) por 1 h a 10 °C na ausência de substrato. A atividade de L-asparaginase foi determinada conforme descrito no item 4.4. Os resultados foram expressos em atividade residual, como descrito no item 4.9.4.3, medida nas condições ótimas de temperatura e pH de cada enzima. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.9.4.5. Determinação dos parâmetros cinéticos

Para obtenção dos parâmetros cinéticos, K_m e V_{max} , por meio do gráfico de *Lineweaver-Burk*, os ensaios de atividade enzimática foram realizados utilizando-se concentrações crescentes (0 a 0,05 Mol/L) do substrato L-asparagina. A determinação de L-asparaginase foi realizada como descrito no item 4.4, no pH e na temperatura ótima de atividade enzimática. Os resultados obtidos foram utilizados para determinar K_{cat} e K_{cat}/K_m .

4.9.4.6. Efeito de íons metálicos na atividade das L-asparaginases

Foram analisados os efeitos dos seguintes íons metálicos sobre a atividade da enzima L-asparaginase: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} nas concentrações necessárias para a obtenção de 1 mMol/L de concentração final no meio

reacional. A determinação de L-asparaginase foi realizada como descrito no item 4.4, no pH e na temperatura ótima de atividade enzimática. A atividade enzimática relativa foi determinada pela correlação com a atividade da enzima não submetida aos tratamentos, a qual foi considerada como sendo 100% de atividade. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.9.4.7. Efeito de ativadores e inibidores na atividade das L-asparaginases

Foram analisados os efeitos de inibidores e ativadores na atividade da enzima L-asparaginase: Tween 80 (0,01%), Triton X-100 (0,01%), SDS (0,1%) de concentração final no meio reacional e β -mercaptoetanol, ureia, EDTA, azida de sódio, L-cisteína, iodoacetamida e o ácido *p*-cloromercuribenzóico nas concentrações necessárias para a obtenção de 1 mMol/L de concentração final no meio reacional. A determinação de L-asparaginase foi realizada como descrito no item 4.4, no pH e na temperatura ótima de atividade enzimática. A atividade enzimática relativa foi determinada pela correlação com a atividade da enzima não submetida aos tratamentos, a qual foi considerada como sendo 100% de atividade. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.9.4.8. Atividade das L-asparaginases em diferentes aminoácidos

Foram analisadas a atividade das L-asparaginases em diferentes aminoácidos: L-glutamina, L-ácido aspártico, L-arginina, L-asparagina, L-prolina e L-metionina na concentração final de 0,01 Mol/L no meio reacional. A determinação de L-asparaginase foi realizada como descrito no item 4.4, no pH e na temperatura ótima de atividade enzimática. Após a realização dos ensaios enzimáticos foi determinada a atividade enzimática relativa, considerando a maior atividade como sendo 100%. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.10. Aplicação da L-asparaginase para redução dos teores de acrilamida em café

4.10.1. Grãos de café

Grãos verdes de café arábica (*Coffea arabica*) foram obtidos da cidade de Sarutaiá-SP- Brasil, variedade Catuaí amarelo cereja descascado.

4.10.2. Tratamento dos grãos de café com L-asparaginase

Os tratamentos dos grãos de café com as L-asparaginases purificadas foram realizados segundo Hendriksen et al., (2013), com algumas adaptações. Amostras de 50 g de grãos de café arábica beneficiado foram cozidos no vapor por 35 minutos a 100 °C até a obtenção de 25% de umidade. Após o tratamento térmico, as amostras dos grãos de café foram misturados com 34,5 mL de solução contendo 80 U de L-asparaginase de *Aspergillus oryzae* IOC 3999 e *Aspergillus niger* IOC 0203 e incubadas por 60 minutos a 50 °C. Foi realizado o mesmo procedimento com a enzima comercial *Acrylaway*® para efeito de comparação. Após o tratamento enzimático, os grãos de café foram secos em estufa com circulação de ar a 40 °C até atingir 10 a 11% de umidade e, finalmente torrados em torrador convectivo *Fresh Roast* SR 500 (*Fresh Beans* Inc., UT, EUA). Foi utilizado um sistema de classificação da cor padronizado para grãos de café torrados (*Roast Color Classification System Agtron* –SCAA, 1995), anexo 15. Foi escolhido uma torra padrão de *cupping* e a coloração do café foi comparada atribuindo-se a numeração da cor correspondente (R 65). As amostras de café foram moídas em moedor Hamilton Beach (*Hamilton Beach Brands*, Inc., VA, EUA) em granulação fina, em seguida, foram armazenadas em sacos plásticos PEBD 13 cm x 21 cm x 0,15 mm sob vácuo, mantidas em temperatura de refrigeração até o momento das análises. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata (anexo 16).

4.10.2.1. Extração de acrilamida das amostras de café

Amostras de $1,0 \pm 0,1$ g de café moído foram pesadas em tubos de polipropileno de 50 mL e foi adicionado 20 mL de água MiliQ (Milipore, Itália), 100 µL de solução de acrilamida – D₃ (padrão interno) com concentração de 4 µg/mL (Sigma Aldrich®) e 5 mL de isoctano. Em seguida, os tubos foram agitados em agitador rotatório a 300 rpm por 60 minutos. Os tubos foram centrifugados por 20 min, 4500 rpm a 10 °C (Rotanta 460 R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Alemanha) em seguida foi retirado uma alíquota de 3 mL da fase aquosa. Os cartuchos SPE Multi Mode Mixed (500 mg/3 mL, Biotage, Suécia) foram pré-condicionados com 3 mL de metanol 60%, 10 mL de água e depois foi adicionado 2 mL da amostra e 1 mL de água. O extrato recolhido foi aplicado em cartucho SPE ENV+ (500 mg/6 mL, Biotage, Suécia) após pré-condicionamento com 3 mL de metanol 60% e 3 mL de água. Dois mL do extrato foi eluído com metanol 60% e utilizado para identificação e quantificação de acrilamida.

4.10.2.2. Separação, identificação e quantificação de acrilamida por LC-MS/MS

Para a determinação do conteúdo de acrilamida das amostras de café foi utilizado um sistema constituído por um UHPLC 1290 Agilent + API 5500 acoplado a um Espectrômetro de Massa Tripo Quadrupolo com uma fonte de ionização por eletrospray positivo LC – MS/MS 5500 Q-Trap, da marca AB Sciex. Foi utilizada uma coluna analítica Shodex RSpak DE- 413 (150 x 4,6 nm i.d.) e uma pré-coluna Shodex RSpak DE-SG (10 x 4,6 nm i.d.). O volume de injeção foi de 10 µL. A temperatura do forno foi mantida a 20 ± 5 °C. A fase móvel A consistiu em uma solução de ácido fórmico a 0,1% (v/v) em água; e a fase móvel B utilizada foi metanol HPLC (Sigma-Aldrich®). As amostras foram eluídas com uma vazão de 0,6 mL/min, de acordo com os seguintes gradientes (v/v) das fases móveis: 0 - 2 min, 90% de A e 10% de B; 2 - 5 min, 60% de A e 40% de B; 5- 6 min 10% A e 90% B; 6 - 12 minutos, 10% A e 90% B; 12,1 - 16 min, 90% de A e 10% de B. O nitrogênio foi utilizado como gás de dessolvatação (110 psi) e também foi usado como gás de colisão (60 psi). A temperatura da fonte foi mantida em 600 °C, aproximadamente. A tensão do capilar foi ajustada para 42.000 volts e a tensão do cone em 10.000 volts. Para as transições m/z $72 \rightarrow 55$, $72 \rightarrow 44$, $72 \rightarrow 54$, $72 \rightarrow 27$, $75 \rightarrow 58$ e $75 \rightarrow 39$ de acrilamida, a energia de colisão foi ajustada para 23.000 volts. Foi feita uma curva analítica de 0 a 100 ng/mL de padrão de acrilamida (Sigma-Aldrich®) para a quantificação (Anexo 11). Todas as análises foram realizadas em duplicata. O método utilizado foi validado em PTC Orbe conforme Nestlé *Guidelines* e os limites descritos de acordo com a Comissão da União Europeia 2002/657/EC.

4.10.3. Determinação de açúcares redutores e não redutores

4.10.3.1. Extração de açúcares redutores e não redutores do café beneficiado

Amostras de 300 mg de café moído em 70 mL de água MilliQ foram aquecidas a 70 °C por 30 min e em seguida foram resfriadas a temperatura ambiente. O volume foi completado para 100 mL e as amostras foram filtradas em papel de filtro *Whatman* n°1. Posteriormente, 2 mL do filtrado foi centrifugado a 3000 x g durante 10 minutos a 25 °C em centrífuga Allegra™ X-22R (*Beckman Coulter*, CA, EUA), segundo Rogers et al., (1999) com modificações.

4.10.3.2. Extração de açúcares redutores e não redutores no café torrado

Amostras de 300 mg de café torrado e moído foram diluídas em 100 mL de água MilliQ, sob agitação. As misturas foram filtradas em papel de filtragem em *Whatman* n° 1. Posteriormente, 2 mL do filtrado foi centrifugado a 3000 x g durante 10 minutos a 25 °C em centrífuga Allegra™ X-22R (*Beckman Coulter*, CA, EUA), segundo Prodolliet et al., (1995) com modificações.

4.10.3.3. Separação por HPLC, identificação e quantificação de glicose, frutose e sacarose

As análises de determinação de açúcares redutores foram realizadas em cromatógrafo DIONEX DX-600 (Dionex Corporation, 1228 Titan Way Sunnyvale, CA, EUA) equipado com bomba isocrática IP25 e detector eletroquímico de ouro ED50. A separação dos açúcares foi realizada utilizando-se coluna CarboPac™ PA 1 (4mm x 250 mm), coluna de guarda CarboPac™ PA 1 (4 mm x 50 mm) e solução de hidróxido de sódio 220 mMol/L como fase móvel, com fluxo de 1 mL/min, a 20 °C. Foram feitas curvas analíticas de 0 a 50 mg/mL de padrão de glicose, frutose e sacarose (Sigma-Aldrich®) para a quantificação (Anexo 8, 9 e 10). Os carboidratos foram analisados pelo tempo de retenção, por comparação com padrões. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.10.4. Determinação da concentração de L-asparagina

A concentração de L-asparagina foi determinada utilizando kit rápido da Megazyme® (Megazyme Inc., IL, EUA). A curva padrão para determinação colorimétrica de L-asparagina foi fornecida pelo fabricante (Anexo 12). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.10.5. Análise estatística

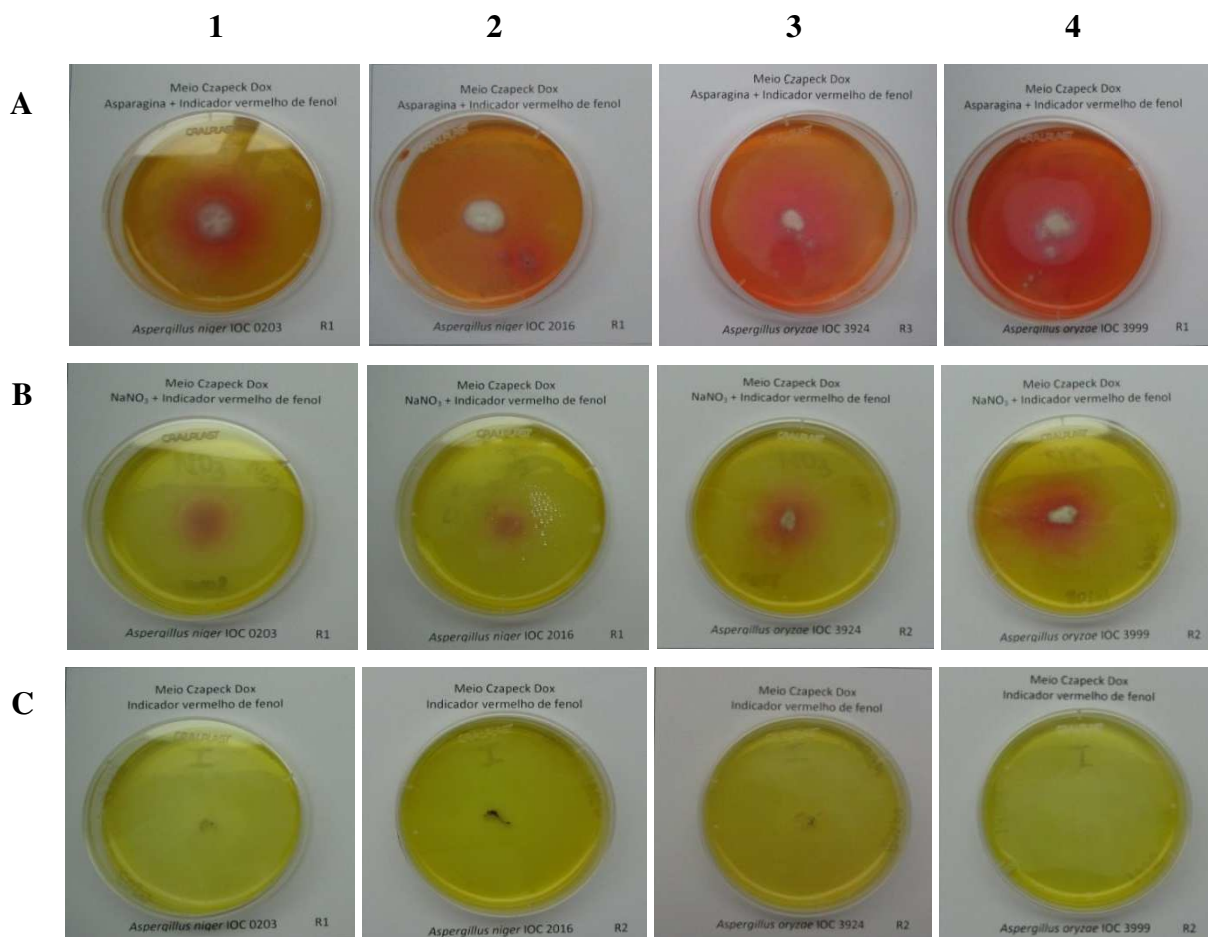
Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão de 3 repetições. As diferenças foram analisadas por meio de análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey e os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos com o auxílio do software *Minitab Statistical* 16.0 (Minitab Inc., PA, EUA). Todos os gráficos foram construídos com o auxílio do software *SigmaPlot* 12.0 (Systat Software, CA, EUA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Teste qualitativo para a detecção da produção de L-asparaginase em placas de Petri

Para a seleção de micro-organismos produtores de L-asparaginases as oito linhagens de *Aspergillus* foram testadas em placas contendo meio Czapek Dox suplementado com L-asparagina e corante vermelho de fenol. A produção de L-asparaginase resulta na hidrólise de L-asparagina em L-ácido aspártico e amônia alterando a coloração amarela do meio de cultura (ácido) para rosa (alcalino) (GULATI et al., 1997). As Figuras 5 A1, A2, A3 e A4 ilustram que as linhagens *A. niger* IOC 0203, *A. niger* IOC 2016, *A. oryzae* IOC3924 e *A. oryzae* IOC 3999 apresentaram teste positivo de L-asparaginase em meio Czapek Dox suplementado com L-asparagina e indicador vermelho de fenol.

Figura 5 – Detecção de fungos produtores de L-asparaginase em placas de Petri contendo meio Czapek Dox suplementado com L-asparagina e corante vermelho de fenol.



(A) meio contendo L-asparagina e indicador, (B) meio contendo NaNO_3 e indicador e (C) meio contendo indicador vermelho de fenol. Enquanto, as colunas indicam o micro-organismo avaliado: (1) *A. niger* IOC 0203, (2) *A. niger* IOC 2016, (3) *A. oryzae* IOC 3924 e (4) *A. oryzae* IOC 3999.

Essas linhagens apresentaram valores de índice de atividade enzimática, razão entre diâmetro do halo rosa (cm) e o diâmetro da colônia (cm), iguais a 1,3, 1,4, 1,7 e 1,6, respectivamente, não exibindo diferença estatística significativa, como apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 – Índice de atividade enzimática obtido no estudo de triagem de espécies fúngicas produtoras de L-asparaginase cultivadas em placas de Petri contendo meio Czapek Dox suplementado com L-asparagina e vermelho de fenol.

Micro-organismo	Índice de atividade enzimática
<i>Aspergillus niger</i> IOC 4470	$0,0 \pm 0,0$ b
<i>Aspergillus niger</i> IOC 2016	$1,3 \pm 0,2$ a
<i>Aspergillus niger</i> IOC 0203	$1,4 \pm 0,1$ a
<i>Aspergillus niger</i> IOC 4573	$0,0 \pm 0,0$ b
<i>Aspergillus niger</i> IOC 0933	$0,0 \pm 0,0$ b
<i>Aspergillus niger</i> IOC 4606	$0,0 \pm 0,0$ b
<i>Aspergillus oryzae</i> IOC 3924	$1,7 \pm 0,2$ a
<i>Aspergillus oryzae</i> IOC 3999	$1,6 \pm 0,1$ a

Valores com letras diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

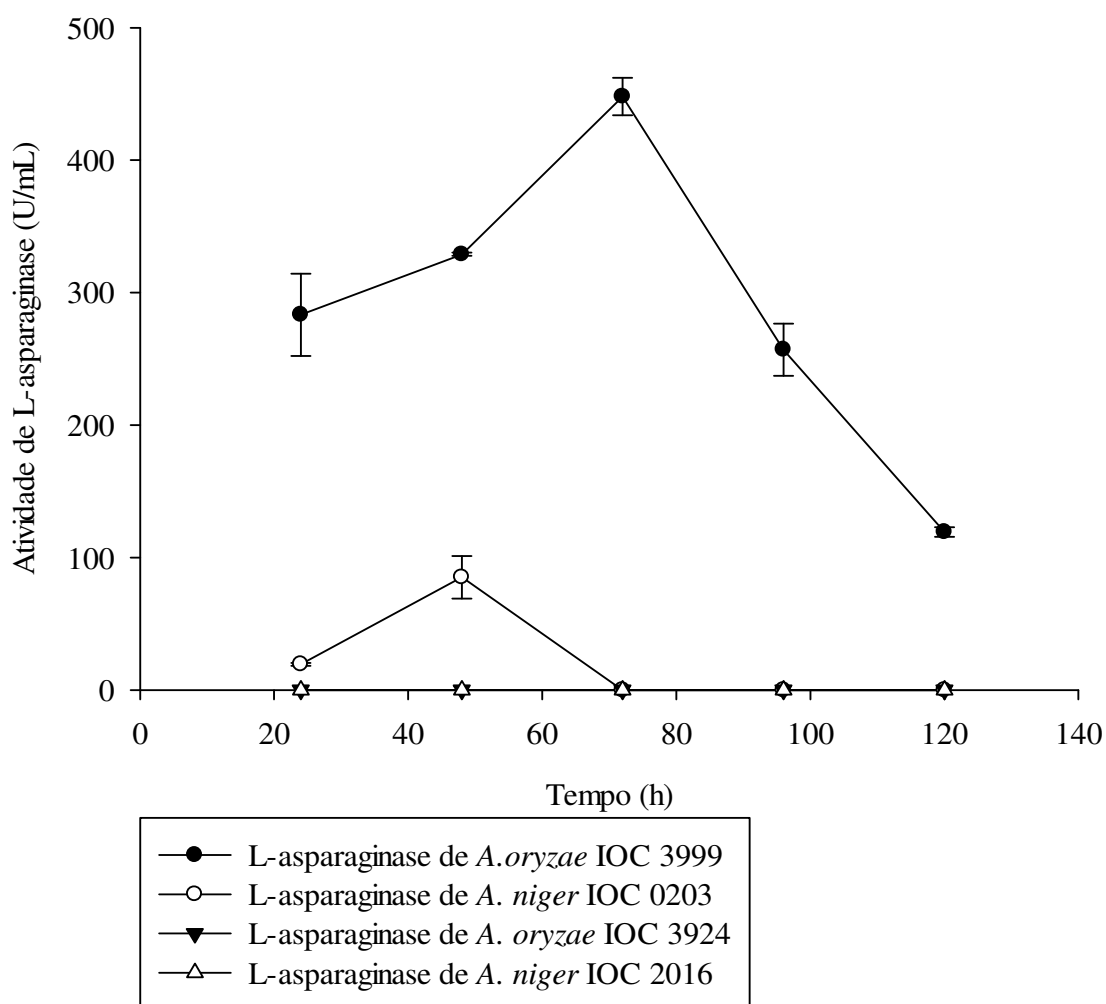
Vimal e Kumar (2017) relataram que quanto maior o índice de atividade enzimática, maior o potencial de produção da enzima. Esta metodologia qualitativa em placa de Petri contendo L-asparagina e vermelho de fenol é convencionalmente utilizada, no entanto, as vezes o contraste da zona obtida, entre o amarelo e rosa, não é muito nítido (MAHAJAN et al., 2013).

Como o método é qualitativo, há necessidade de determinar quantitativamente a atividade enzimática (VIMAL; KUMAR, 2017). A metodologia espectrofotométrica mais comumente empregada para a determinação de L-asparaginase utiliza o reagente de Nessler (solução alcalina de K_2HgI_4) e, por meio da quantificação de amônia liberada, a atividade enzimática pode ser calculada (MASHBURN; WRISTON, 1964).

5.2. Cinética de fermentação das linhagens de fungos em frascos agitados para produção de L-asparaginase

A Figura 6 ilustra a cinética de fermentação em frascos Erlenmeyer agitados e produção de L-asparaginase pelas 4 linhagens de fungos pré-selecionadas pelo teste qualitativo em placas de Petri, realizado de acordo com o item 4.3.

Figura 6 – Cinética de fermentação das 4 linhagens fúngicas para a produção de L-asparaginase por fermentação submersa.



O tempo de produção de L-asparaginase é um critério importante para avaliação do potencial de produção da linhagem fúngica produtora (AHMED et al., 2015). A análise dos extratos brutos das linhagens de *Aspergillus oryzae* IOC 3924 e *Aspergillus niger* IOC 2016 não mostraram atividade enzimática de L-asparaginase nos tempos de incubação analisados.

Enquanto que o extrato bruto da linhagem de *Aspergillus oryzae* IOC 3999 apresentou atividade enzimática máxima de 448,0 U/mL após 72h de fermentação em incubador rotatório e, a atividade enzimática máxima obtida do extrato bruto de *Aspergillus niger* IOC 0203 foi de 85,1 U/mL após 48h de incubação.

Ahmed et al., (2015) relataram que a linhagem *Aspergillus* sp. ALAA-2000 apresentou maior produção de L-asparaginase (30,64 U/mL) por fermentação submersa após 6 dias utilizando o meio Czapek Dox suplementado com 10 g/L de glicose e 10 g/L de L-asparagina a 120 rpm a 27 °C.

Há necessidade de selecionar espécies de micro-organismos que apresentem elevada atividade de L-asparaginase, por meio de estudos de bioprospecção (SAXENA et al., 2015). Mohan Kumar et al., (2013) analisaram 70 isolados de fungos em meio Czapek Dox suplementado com corante vermelho de fenol e 2,5% de L-asparagina, dentre estes, 50 isolados apresentaram halo rosa em ensaio de placa de Petri. Os autores utilizaram o reagente de Nessler para a quantificação do teor de amônia liberada do substrato L-asparagina. Dentre os fungos pré-selecionados, seis não apresentaram produção da enzima por fermentação em estado sólido usando farelo de trigo como substrato. O isolado identificado como *Cladosporium* sp. foi selecionado por apresentar alta atividade enzimática (1,2 U/mg de proteína) dentre as linhagens fúngicas estudadas.

Observou-se também, de acordo com a Figura 6, diminuição na atividade de L-asparaginase após o período de produção máxima dos extratos brutos de *Aspergillus oryzae* IOC 3999 e *Aspergillus niger* IOC 0203. Elshafei e El-Ghonemy, (2015) sugeriram que a diminuição de atividade enzimática durante a cinética de fermentação pode ser devido ao micro-organismo ter atingido uma fase de crescimento a partir da qual não consegue equilibrar o crescimento com a disponibilidade de nutrientes ou também devido à presença de proteases que podem inativar a enzima no decorrer do tempo de fermentação.

Após 120 h de fermentação foi observado que os extratos brutos de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203 apresentaram pH de 9,0 e 8,8, respectivamente. Resultado similar foi obtido por Gulati et al., (1997) ao analisarem o pH dos extratos brutos de L-asparaginase obtidos pela fermentação de diversas linhagens fúngicas. Os pesquisadores observaram que o pH 6,2 (inicial) aumentou para pH 9,1 após 96h de fermentação. Geralmente, a produção de L-asparaginase é acompanhada com o aumento do pH dos extratos brutos (DE JONG, 1972). A diminuição da atividade de L-asparaginase durante a fermentação pode ser devido à inativação da enzima em pH alcalino.

Para a produção de L-asparaginase por fermentação submersa, o pH do meio de fermentação desempenha um importante papel no aumento da atividade enzimática e no transporte de nutrientes e sais pela membrana, além de manter as atividades metabólicas normais da célula (FARAG et al., 2015). Com raras exceções, a produção de L-asparaginase por fungos filamentosos foi realizada em meio de fermentação com pH inicial inferior a 7,0 (DANGE; PESHWE, 2011; DORIYA; KUMAR, 2016; LINCOLN; MORE, 2014; THAKUR et al., 2014).

5.2.1. Determinação da atividade de protease

A diminuição da atividade de L-asparaginase, durante a fermentação, pode ser devido à produção de proteases (SARQUIS et al., 2004). Os extratos brutos de *Aspergillus oryzae* IOC 3999 e *Aspergillus niger* IOC 0203 apresentaram atividade de protease de 1,9 U/mL e 2,6 U/mL, respectivamente, após 120h de incubação em frascos Erlenmeyer.

Sarquis et al., (2004) relataram que a produção de protease pelas linhagens *Aspergillus tamarri* (~50 U/L) e *Aspergillus niger* (~65 U/L) após 60h de fermentação foi responsável pelo decaimento da atividade de L-asparaginase no meio de cultura.

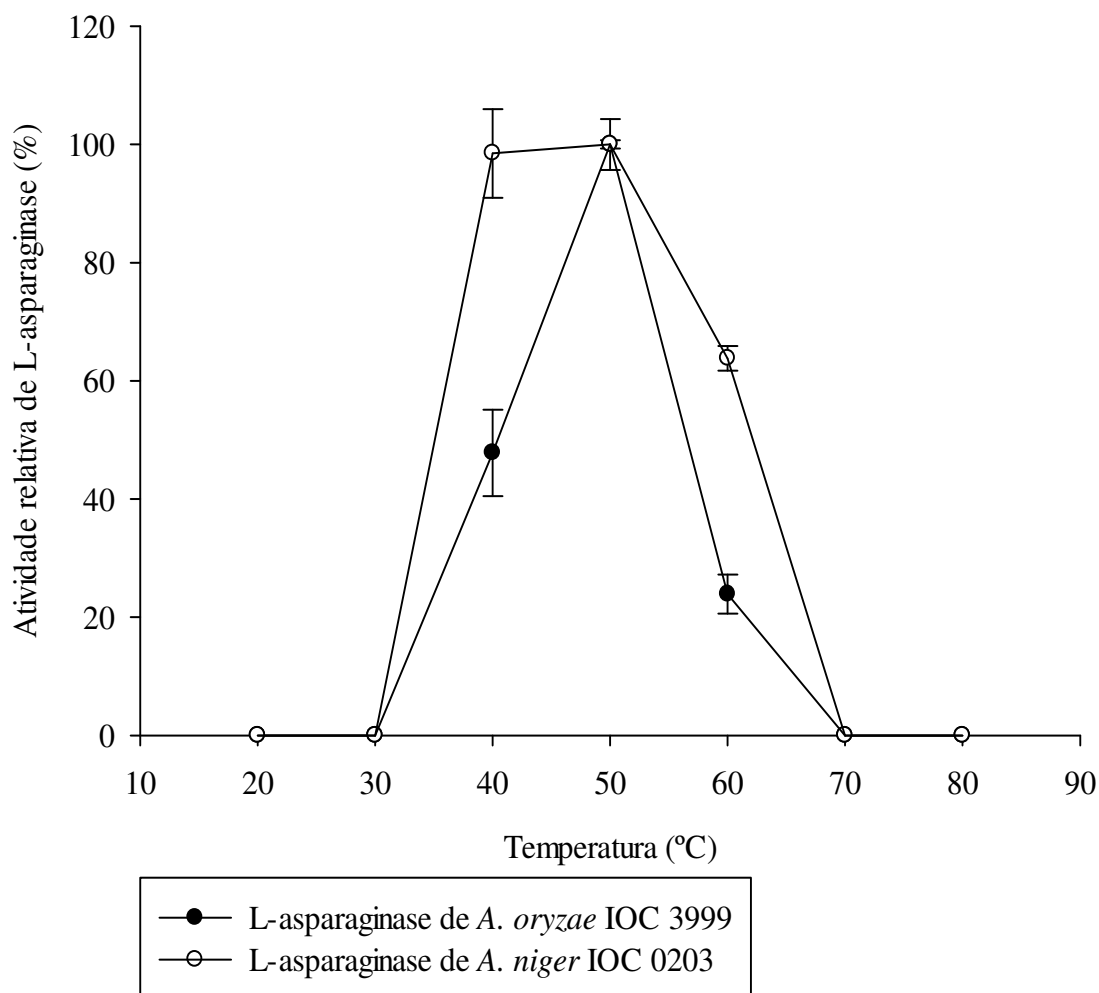
5.3. Caracterização bioquímica parcial das L-asparaginases dos extratos brutos

Para a caracterização bioquímica das L-asparaginases foram utilizados os extratos brutos das linhagens *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203 obtidos após 72h e 48h de fermentação, respectivamente, como descrito no item 4.6.

5.3.1. Determinação da temperatura ótima de atividade da L-asparaginase

A L-asparaginase do extrato bruto de *A. oryzae* IOC 3999 apresentou atividade ótima a 50 °C, enquanto que a L-asparaginase do extrato bruto de *A. niger* IOC 0203 apresentou atividade ótima entre 40 a 50°C, sendo que a 60 °C as enzimas apresentaram atividade relativa igual a 20,6% e 63,8%, respectivamente, como demonstrado na Figura 7.

Figura 7 – Efeito da temperatura na atividade de L-asparaginase de *Aspergillus oryzae* IOC 3999 e *Aspergillus niger* IOC 0203.

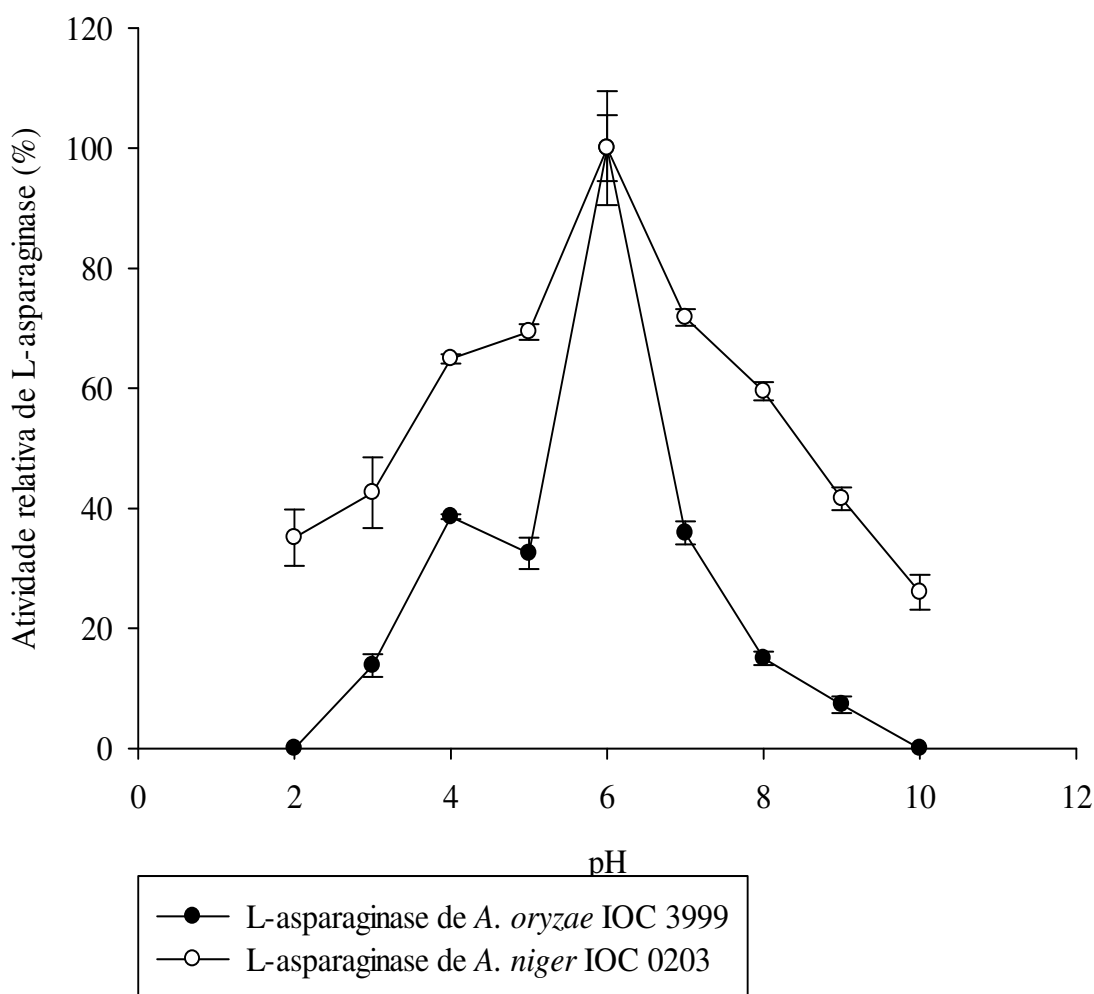


As L-asparaginases de diferentes organismos apresentam variações em relação às propriedades bioquímicas (ZUO et al., 2015). Geralmente, a temperatura ótima de L-asparaginase do gênero *Aspergillus* sp. varia entre 30 e 50 °C (DANGE; PESHWE, 2011; DIAS et al., 2016; VALA et al., 2018). L-asparaginases bacterianas oriundas dos gêneros *Bacillus* sp. e *E.coli* apresentam temperatura ótima entre 37 e 40 °C (RAHIMZADEH et al., 2016; VIDYA et al., 2017). Enquanto que L-asparaginases termoestáveis de archaea *Thermococcus kodakarensis* K0D1 e *Thermococcus gammatolerans* EJ3 apresentaram temperatura ótima de 85,85 e 80 °C, respectivamente (CHOHAN; RASHID, 2013; ZUO et al., 2014).

5.3.2. Determinação do pH ótimo de atividade da L-asparaginase

As L-asparaginases do extrato bruto de *Aspergillus oryzae* IOC 3999 e *Aspergillus niger* IOC 0203 apresentaram atividade ótima em pH 6,0, de acordo com a Figura 8.

Figura 8 – Efeito do pH na atividade de L-asparaginase de *Aspergillus oryzae* IOC 3999 e *Aspergillus niger* IOC 0203.



Resultado semelhante também foi encontrado ao caracterizar a enzima L-asparaginase de *Aspergillus* sp. ALAA-2000 e *Cladosporium* sp. (AHMED et al., 2015; MOHAN KUMAR; MANONMANI 2013). No entanto, a maioria das L-asparaginases fúngicas tem um pH ótimo na faixa alcalina (DIAS et al., 2016; DUTTA et al., 2015; ELSHAFEI et al., 2012).

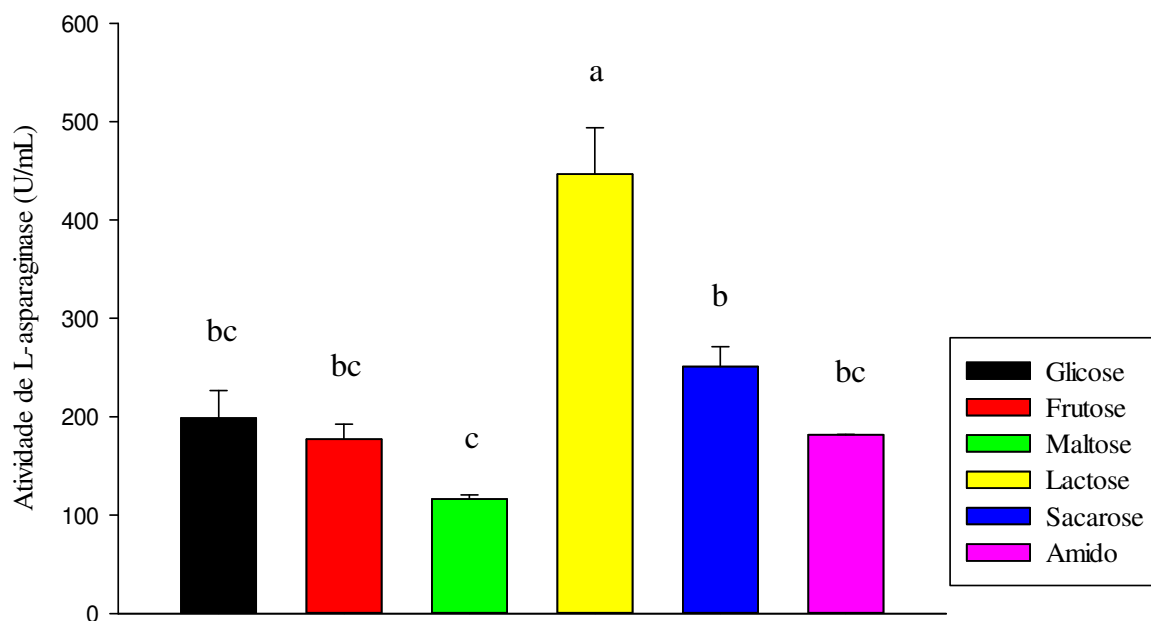
A L-asparaginase do extrato bruto de *A. oryzae* IOC 3999 não apresentou atividade em pH muito ácido (pH 2) ou muito alcalino (pH 10). No entanto, o extrato bruto de *Aspergillus*

niger IOC 0203 apresentou valores de atividade relativa de L-asparaginase de 35,1% em pH 2 e 26,0% em pH 10. Thakur et al., (2014) obtiveram resultado semelhante para L-asparaginase de *Mucor hiemalis* e atribuiu o fato da enzima, por apresentar atividade máxima em pH neutro, ser afetada no local do sítio ativo por mudanças no pH, resultando em um declínio da atividade enzimática em pH ácido ou alcalino.

5.4. Triagem de diferentes fontes de carbono e nitrogênio para produção de L-asparaginase por fermentação submersa

A influência de várias fontes de carbono como glicose, frutose, maltose, lactose, sacarose e amido foram estudadas para produção de L-asparaginase de *Aspergillus oryzae* IOC 3999 e *Aspergillus niger* IOC 0203 durante 72h e 48h, respectivamente, utilizando o meio Czapek Dox modificado. A Figura 9 apresenta o efeito de diferentes fontes de carbono na produção de L-asparaginase por *A. oryzae* IOC 3999.

Figura 9 – Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de L-asparaginase por *Aspergillus oryzae* IOC 3999.



Valores com letras diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

A síntese de L-asparaginase extracelular é regulada por fontes de carbono e nitrogênio, sendo produzida durante a fase pós-exponencial e de crescimento estacionário por fungos (THAKUR et al., 2014). No entanto, a síntese microbiana de L-asparaginase requer menor quantidade de fonte de carbono, devido à repressão catabólica (MUKHERJEE et al., 2000). Por isso, o efeito de diferentes fontes de carbono foi testado em concentrações de 0,5%, conforme o item 4.7.

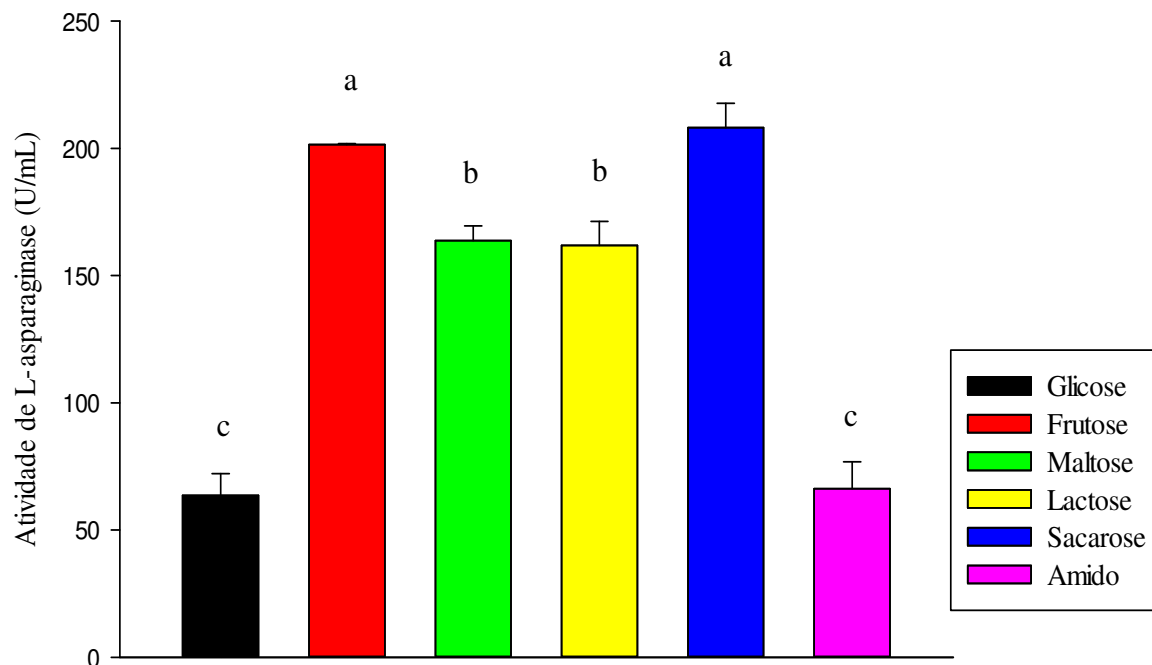
Foi obtido maior produção de L-asparaginase (446,7 U/mL) por *Aspergillus oryzae* IOC 3999 utilizando-se lactose como fonte de carbono, diferindo estatisticamente a 5% de significância, em relação aos demais carboidratos estudados (Figura 9). A utilização de 0,5% (m/v) de sacarose como fonte de carbono apresentou a segunda maior atividade 250,9 U/mL e a menor atividade (116,4 U/mL) foi observada com adição de maltose 0,5% (m/v) no meio de fermentação. Os demais carboidratos estudados glicose, frutose e amido não apresentaram diferença significativa na produção de L-asparaginase no meio de fermentação na concentração avaliada.

Resultado semelhante foi obtido por Kenari et al., (2011) ao selecionar a melhor fonte de carbono para a produção de L-asparaginase de *E. coli* ATCC 11303. Os autores testaram os seguintes carboidratos: sacarose, lactose, frutose, glicose e maltose, na concentração de 1% (m/v) e obtiveram maior atividade enzimática utilizando a lactose (0,26 U/mL) como fonte de carbono, seguido da sacarose (0,21 U/mL), maltose (0,22 U/mL), frutose (0,2 U/mL) e glicose (0,09 U/mL).

Em outro estudo, Baskar e Renganathan (2011a) obtiveram o máximo de atividade de L-asparaginase (19,04 U/mL) ao utilizar 0,2% (m/v) de glicose no meio Czapek-Dox modificado por *Aspergillus terreus* MTCC 1782, seguida de frutose (13,65 U/mL) e lactose (10,45 U/mL). Ao avaliarem o efeito da adição de glicose na faixa de 0,1 a 0,6% (p/v) observaram que a atividade de L-asparaginase aumentou utilizando as concentrações de 0,2% a 0,4% e diminuiu usando 0,6% de glicose após 72h de fermentação.

Para a seleção da melhor fonte de carbono para produção de L-asparaginase de *Aspergillus niger* IOC 0203, como demonstrado na Figura 10, pode-se observar que não houve diferença significativa entre a frutose (201,5 U/mL) e a sacarose (208,2 U/mL) na atividade de L-asparaginase a nível de 5% de significância. As fontes de carbono maltose (163,7 U/mL) e lactose (161,8 U/mL) não diferiram entre si estatisticamente, assim como amido (66,2 U/mL) e glicose (63,6 U/mL).

Figura 10 – Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de L-asparaginase por *Aspergillus niger* IOC 0203.



Valores com letras diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

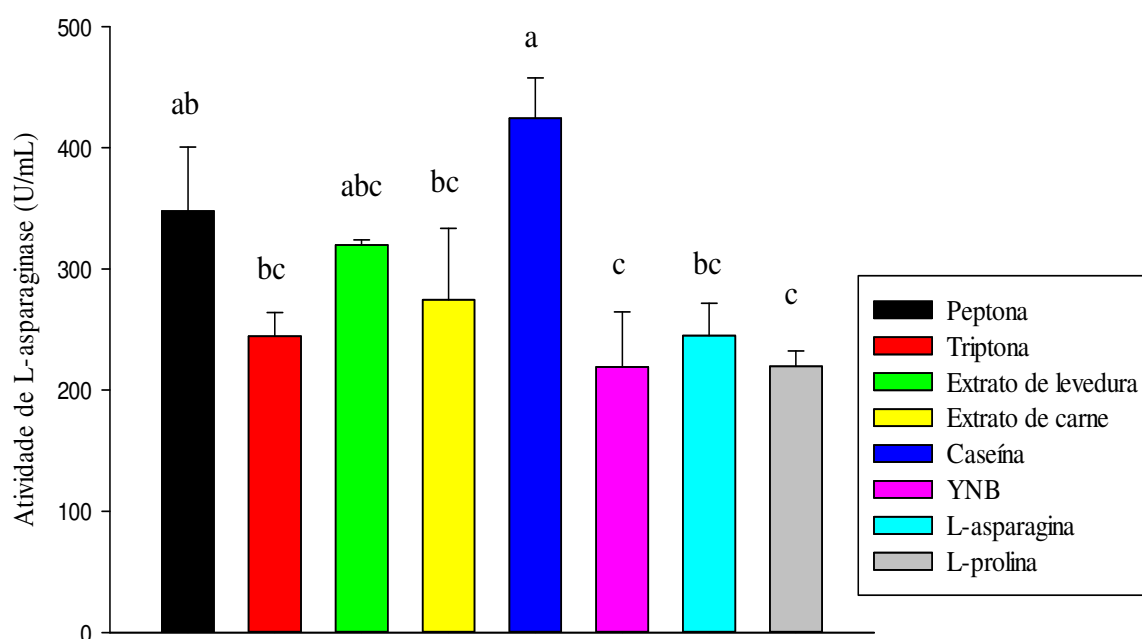
Resultado similar foi obtido por Farag et al., (2015) ao estudarem o efeito da fonte de carbono na produção de L-asparaginase por *Aspergillus terreus*. Dentre as fontes de carbono testadas, foi obtido alta produção de L-asparaginase (8,26 U/mg de proteína) usando sacarose (2g/L) em meio Czapek Dox modificado composto de 10g/L de L-asparagina, 1,52 g/L de KH_2PO_4 , 0,52 g/L de KCl, 0,52 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20g/L de NaCl e quantidades traços de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ após 5 dias de incubação.

Resultado distinto foi obtido por Doriya e Kumar (2016) ao testarem as mesmas fontes de carbono com concentração de 0,2% (m/v) para a produção de L-asparaginase por um isolado fúngico C7 em meio Czapek Dox modificado composto de 10g/L de L-asparagina, 1,52 g/L de KH_2PO_4 , 0,52 g/L de KCl, 0,52 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e quantidades traços de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. A produção máxima da L-asparaginase (16,2 U/mL) foi obtida quando a glicose foi usada como fonte de carbono, seguida de sacarose (~12,5 U/mL) e frutose (~7,5 U/mL). Os demais carboidratos (maltose, frutose e amido) apresentaram menor produção de enzima.

Em algumas espécies do gênero *Aspergillus* sp. a síntese de L-asparaginase é suprimida na presença de glicose a 0,5% de concentração, devido à inibição catabólica dos componentes envolvidos no transporte de lactato e na síntese de L-asparaginase (WARANGKAR; KHOBRADE, 2009). No entanto, em diferentes micro-organismos a exigência nutricional para a síntese máxima de L-asparaginase pode variar, assim como a taxa de síntese da enzima varia em função das condições do meio de fermentação (PATRO et al., 2013).

Foi testada a influência de diferentes fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico como peptona, triptona, extrato de levedura, extrato de carne, caseína hidrolisada (casaminoácidos), YNB, L-asparagina e L-prolina adicionados, individualmente, ao meio Czapek Dox a 1% (m/v), após a seleção da melhor fonte de carbono. Para a produção de L-asparaginase por *A. oryzae* IOC 3999 a utilização de caseína hidrolisada (424,35 U/mL) apresentou melhor resultado, seguido da peptona (347,80 U/mL) e extrato de levedura (319,7 U/mL) e as menores atividades foram obtidas utilizando L-prolina (219,6 U/mL) e YNB (219,3 U/mL) como fonte de nitrogênio, conforme Figura 11.

Figura 11 – Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de L-asparaginase por *Aspergillus oryzae* IOC 3999.

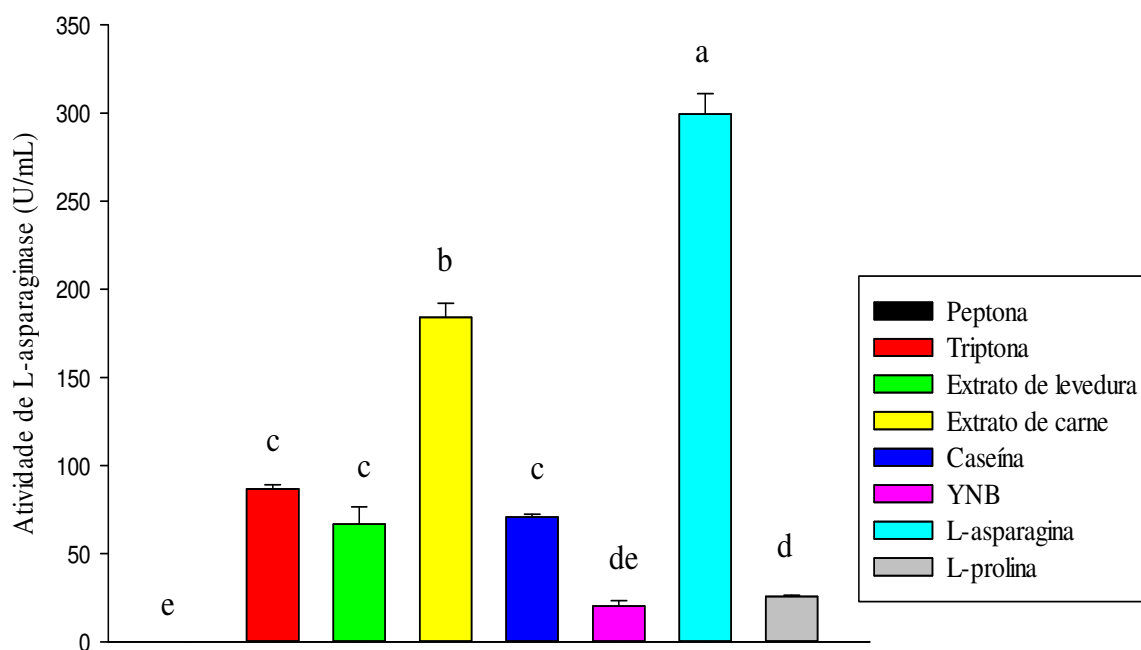


Valores com letras diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Resultado similar foi obtido por Elshafei e El-Ghonemy (2015) ao suplementar com 0,5% (m/v) de caseína (172, 67 U/g), seguida de peptona (107,32 U/gds) no meio de fermentação em estado sólido para produção de L-asparaginase de *Trichoderma viride* F2. Os autores também avaliaram diferentes concentrações de caseína no meio de fermentação, entre 0,25 a 2,5% (m/v), e observaram que na concentração de 1,5% (m/v), o micro-organismo apresentou maior produção da enzima com 186,56 U/gds e concentrações acima desse valor foi observado a diminuição da atividade.

A L-asparagina foi a melhor fonte de nitrogênio para a produção de L-asparaginase (299,4 U/mL) pela linhagem *A. niger* IOC 0203, diferindo estatisticamente a 5% de significância, em relação às demais fontes de nitrogênio estudadas, como demonstrado na Figura 12.

Figura 12 – Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na atividade de L-asparaginase de *Aspergillus niger* IOC 0203.



Valores com letras diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Doriya e Kumar (2016) avaliaram o efeito de diferentes fontes de nitrogênio (L-asparagina, extrato de levedura, peptona e nitrato de sódio) a 1% (m/v) no meio Czapek Dox modificado composto de 2 g/L de glicose, 1,52 g/L de KH_2PO_4 , 0,52 g/L de KCl , 0,52 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e quantidades traços de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ para

produção de L-asparaginase por um isolado fúngico denominado C7. Os autores observaram que a L-asparagina favoreceu a produção máxima da L-asparaginase (~15 U/mL), atuando como fonte de nitrogênio, seguido por peptona (~ 12,5 U/mL) e extrato de levedura (5 U/mL).

Logo, a fonte de nitrogênio desempenha um papel fundamental na produção de L-asparaginase, considerado um nutriente limitante. O micro-organismo pode utilizar fontes de nitrogênio tanto nas formas orgânica ou a inorgânica ou às vezes ambas (ELSHAFEI; ELGHONEMY, 2015). De acordo com Souza et al., (2017) os aminoácidos L-asparagina e L-prolina foram os mais utilizados como fonte de nitrogênio para produção de L-asparaginase fúngica. Em sua revisão, os autores observaram que a L-asparagina foi o componente do meio de fermentação que mais influenciou a produção de L-asparaginase utilizando fungos.

Embora haja muitas pesquisas sobre a seleção das melhores de fontes de carbono e nitrogênio, nenhum meio específico foi estabelecido para a produção de L-asparaginase por fungos, uma vez que cada organismo possui suas próprias exigências nutricionais para a produção de L-asparaginase (EL-NAGGAR, 2015; SOUZA et al., 2017).

Os efeitos das condições do processo (pH inicial, temperatura, agitação e concentração do inóculo) juntamente com a composição do meio de cultivo influenciam a produção de enzimas por fungos filamentosos e, a utilização de estudos estatísticos de otimização são aplicados para aumentar a produção de enzimas, além de desenvolver um bioprocessamento economicamente viável (SOUZA et al., 2017).

Após a seleção das melhores fontes de carbono e nitrogênio para a produção de L-asparaginase por *Aspergillus oryzae* IOC 3999 e *Aspergillus niger* IOC 0203, uma estratégia sequencial de otimização foi aplicada para a obtenção da máxima produção da enzima.

5.5. Estratégia sequencial de otimização da produção de L-asparaginase por fermentação submersa

A etapa de avaliação das exigências nutricionais e dos parâmetros da fermentação é importante para o desenvolvimento de bioprocessos (KUMAR et al., 2009). Para estudar o efeito e selecionar as melhores variáveis do processo fermentativo para a produção de L-asparaginase por *Aspergillus oryzae* IOC 3999 foi selecionado como fonte de carbono a lactose e como fonte de nitrogênio a caseína hidrolisada (casaminoácidos), por apresentarem maior produção de L-asparaginase em delineamento univariado e os demais parâmetros foram mantidos como apresentado na Tabela 4. A produção correspondente de L-asparaginase pela linhagem de *A. oryzae* IOC 3999, durante 72h de fermentação, é mostrada na Tabela 6.

Tabela 6 – Matriz do Plackett-Burman contendo os valores codificados, reais e a variável resposta L-asparaginase (U/mL) obtida por fermentação submersa de *Aspergillus oryzae* IOC 3999 após 72h.

Ensaio	Lactose	L-asparagina	Caseína hidrolisada	pH	Temperatura	Taxa de agitação	Concentração de inóculo	L-asparaginase
	% (m/v)	% (m/v)	% (m/v)		(°C)	(rpm)	(esporos/mL)	(U/mL)
1	1(2)	-1(0)	1 (1)	-1(6)	-1(25)	-1(100)	1(10 ⁷)	667,25 ± 78,76^{ab}
2	1(2)	1(2)	-1(0)	1(8)	-1(25)	-1(100)	-1(10 ⁵)	568,42 ± 17,37^{abc}
3	-1(0,5)	1(2)	1(1)	-1(6)	1(35)	-1(100)	-1(10 ⁵)	797,08 ± 156,85^a
4	1(2)	-1(0)	1(1)	1(8)	-1(25)	1(200)	-1(10 ⁵)	386,55 ± 66,09^{cde}
5	1(2)	1(2)	-1(0)	1(8)	1(35)	-1(100)	1(10 ⁷)	710,53 ± 132,60^{ab}
6	1(2)	1(2)	1(1)	-1(6)	1(35)	1(200)	-1(10 ⁵)	472,51 ± 69,34^{bcd}
7	-1(0,5)	1(2)	1(1)	1(8)	-1(25)	1(200)	1(10 ⁷)	671,93 ± 65,81^{ab}
8	-1(0,5)	-1(0)	1(1)	1(8)	1(35)	-1(100)	1(10 ⁷)	152,05 ± 18,07^f
9	-1(0,5)	-1(0)	-1(0)	1(8)	1(35)	1(200)	-1(10 ⁵)	195,61 ± 35,98^{ef}
10	1(2)	-1(0)	-1(0)	-1(6)	1(35)	1(200)	1(10 ⁷)	282,89 ± 66,37^{def}
11	-1(0,5)	1(2)	-1(0)	-1(6)	-1(25)	1(200)	1(10 ⁷)	284,50 ± 47,45^{def}
12	-1(0,5)	-1(0)	-1(0)	-1(6)	-1(25)	-1(100)	-1(10 ⁵)	116,93 ± 14,02^f
13	0(1,25)	0(1)	0(0,5)	0(7)	0(30)	0(150)	0(5,05x 10 ⁶)	714,04 ± 62,65^{ab}
14	0(1,25)	0(1)	0(0,5)	0(7)	0(30)	0(150)	0(5,05x 10 ⁶)	745,61 ± 22,33^a
15	0(1,25)	0(1)	0(0,5)	0(7)	0(30)	0(150)	0(5,05x 10 ⁶)	698,25 ± 76,91^{ab}

Estudos utilizando o método de “uma variável por vez” para otimização da produção de enzimas tendem a negligenciar os efeitos de interação entre as variáveis envolvidas, além de ser muito laborioso. Uma alternativa é a utilização de metodologias estatísticas que minimizam o erro de interação na determinação de parâmetros, além de ser um método mais econômico, por realizar menor quantidade de experimentos (SHARMA; SATYANARAYANA, 2006).

O planejamento estatístico Plackett-Burman é um delineamento fatorial que identifica os parâmetros críticos necessários para a máxima produção de determinado composto, além de ser uma ferramenta estatística importante para a triagem dos principais componentes do processo (PLACKETT; BURMAN, 1946).

A atividade máxima de L-asparaginase (797,08 U/mL) foi alcançada no ensaio 3, enquanto a atividade mínima de L-asparaginase (116,93 U/mL) foi obtida no ensaio 12. A Tabela 7 apresenta os efeitos e o *p*-valor de cada componente do processo fermentativo.

Tabela 7 – Estimativa dos efeitos das variáveis do processo fermentativo para produção de L-asparaginase por *Aspergillus oryzae* IOC 3999 após 72h.

Variável	Efeitos	<i>p</i> -valor
Curvatura	17,7992	0,0031
Lactose % (m/v)	10,4136	0,0090
L-asparagina % (m/v)	20,3918	0,0023
Caseína hidrolisada % (m/v)	11,8309	0,0070
pH	0,7650	0,5242
Temperatura (°C)	-1,0163	0,4164
Taxa de agitação (rpm)	-8,5965	0,0132
Concentração de inóculo (esporos/mL)	2,7773	0,1088

$$R^2 = 0,7664$$

Na análise dos efeitos dos componentes do meio e dos parâmetros do bioprocessos, as variáveis lactose, L-asparagina, caseína hidrolisada (casaminoácidos), pH e concentração de inóculo apresentaram efeito positivo, enquanto as variáveis temperatura e taxa de agitação mostraram efeito negativo na produção de L-asparaginase por *Aspergillus oryzae* IOC 3999.

Um efeito positivo indica que a variável de nível mais alto resulta em maior atividade de L-asparaginase, enquanto que um efeito negativo significa que a variável em seu

nível mínimo resulta em maior produção da enzima (KUMAR et al., 2009). Embora não inclua as interações, o delineamento PB é rápido e apresenta os principais fatores efetivos de um bioprocesso. As variáveis positivas seriam selecionadas para uma otimização adicional, enquanto as variáveis que apresentarem efeito negativo no bioprocesso podem ser descartadas em experimentos posteriores (ABDEL-FATTAH; OLAMA, 2002).

O coeficiente de determinação (R^2) encontrado no processo fermentativo para produção de L-asparaginase por *A. oryzae* IOC 3999 foi de 0,7664, o que explica até 76,64% da variabilidade dos dados. As três variáveis que apresentaram efeito significativo com ($p \leq 0,05$) foram lactose, L-asparagina e caseína hidrolisada (casaminoácidos). Estas variáveis foram selecionadas para a etapa de otimização por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Contudo, apesar do parâmetro taxa de agitação ter sido significativo, este não foi selecionado para o DCCR. No entanto, para essa variável foi fixado no nível mínimo do delineamento para os experimentos seguintes e, para as variáveis não significativas foram utilizadas, em todos os experimentos posteriores, o nível médio (ponto central) do delineamento PB 12.

Dias e Sato (2016) utilizaram o delineamento Plackett-Burman para a obtenção da máxima produção de L-asparaginase de *Aspergillus oryzae* CCT 3940 em fermentação submersa. Dentre nove parâmetros avaliados no processo fermentativo, somente as variáveis pH e concentração de inóculo apresentaram efeito positivo e significativo ($p \leq 0,05$) e foram selecionadas para um DCCR 2².

Abdel-Fattah e Olama (2002) usaram o delineamento fatorial PB para selecionar quinze variáveis do meio de cultura para posterior otimização da produção de L-asparaginase por *Pseudomonas aeruginosa* 50071 em meio sólido. As variáveis pH, caseína hidrolisada e água de maceração de milho apresentaram efeito positivo significativo ($p < 0,1$) para a atividade de L-asparaginase e, em seguida, foram avaliadas a concentração ideal de cada uma dessas variáveis para a máxima produção da enzima utilizando delineamento Box Behnken.

A suplementação do meio de fermentação com caseína hidrolisada pode contribuir para o aumento da produção de L-asparaginase devido à sua composição conter aminoácidos (ABDEL-FATTAH; OLAMA, 2002). Resultado semelhante foi obtido no presente estudo em relação à suplementação de caseína hidrolisada (casaminoácidos) ao meio de cultivo de *A. oryzae* IOC 3999 para obtenção de L-asparaginase. Em relação ao aminoácido L-asparagina, o mesmo pode atuar como indutor da produção de L-asparaginase para alguns micro-organismos (EL-NAGGAR, 2015; NAGARAJAN et al., 2014). Em seguida, os resultados do DCCR, para estudar o efeito das três variáveis independentes selecionadas, são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Matriz do DCCR 2³ (valores reais e codificados) utilizada para a produção de L-asparaginase por *Aspergillus oryzae* IOC 3999.

Ensaio	Lactose % (m/v)	L-asparagina % (m/v)	Caseína % (m/v)	L-asparaginase (U/mL)			
				24h	48h	72h	96h
1	-1 (1,1)	-1 (1,1)	-1 (0,7)	283,92 ± 48,61 ^{def}	279,82 ± 31,01 ^{hij}	395,61 ± 6,20 ^{efg}	346,20 ± 41,20 ^{efg}
2	1 (2,9)	-1 (1,1)	-1 (0,7)	0,00 ± 2,53 ^h	617,11 ± 76,29 ^{def}	445,61 ± 18,85 ^{def}	300,00 ± 47,14 ^{fgh}
3	-1(1,1)	1 (2,9)	-1 (0,7)	77,63 ± 14,27 ^{fgh}	202,63 ± 2,48 ^{ij}	164,00 ± 40,94 ^h	101,32 ± 21,71 ^h
4	1 (2,9)	1 (2,9)	-1 (0,7)	679,53 ± 74,00 ^{ab}	1143,86 ± 30,02 ^b	858,50 ± 66,98 ^b	657,46 ± 45,28 ^{ab}
5	-1 (1,1)	-1 (1,1)	1 (1,3)	126,32 ± 18,61 ^{efgh}	146,93 ± 21,71 ^j	394,44 ± 22,54 ^{efg}	299,12 ± 37,35 ^{fgh}
6	1 (2,9)	-1 (1,1)	1 (1,3)	568,42 ± 43,41 ^{bc}	815,79 ± 120,90 ^{cd}	635,09 ± 60,59 ^c	512,28 ± 64,51 ^{abcde}
7	-1 (1,1)	1(2,9)	1 (1,3)	269,01 ± 39,24 ^{def}	325,44 ± 59,55 ^{ghij}	401,17 ± 67,59 ^{ef}	175,88 ± 6,82 ^{gh}
8	1 (2,9)	1 (2,9)	1 (1,3)	665,79 ± 117,85 ^{ab}	758,51 ± 99,86 ^{cde}	469,30 ± 18,61 ^{def}	646,20 ± 46,14 ^{ab}
9	-1,68 (0,5)	0 (2)	0 (1)	24,56 ± 4,96 ^{gh}	277,19 ± 14,76 ^{hij}	227,63 ± 37,84 ^{gh}	189,47 ± 28,53 ^{gh}
10	1,68 (3,5)	0 (2)	0 (1)	846,05 ± 159,41 ^a	566,08 ± 43,60 ^{efg}	525,73 ± 52,52 ^{cde}	536,40 ± 115,99 ^{abcd}
11	0 (2)	-1,68 (0,5)	0 (1)	286,26 ± 52,19 ^{def}	479,53 ± 74,76 ^{fgh}	567,84 ± 26,90 ^{cd}	463,16 ± 29,77 ^{bcdef}
12	0 (2)	1,68 (3,5)	0 (1)	366,67 ± 75,67 ^{cd}	352,19 ± 53,96 ^{fghij}	858,33 ± 50,24 ^b	578,07 ± 11,16 ^{abc}
13	0 (2)	0 (2)	-1,68 (0,5)	232,16 ± 34,92 ^{defg}	989,77 ± 133,02 ^{bc}	1140,79 ± 21,71 ^a	714,47 ± 1,86 ^a
14	0 (2)	0 (2)	1,68 (1,5)	75,88 ± 9,30 ^{fgh}	1443,57 ± 111,36 ^a	817,54 ± 67,32 ^b	678,65 ± 37,03 ^a
15	0 (2)	0 (2)	0 (1)	333,33 ± 27,91 ^{de}	440,80 ± 62,65 ^{fghi}	379,82 ± 80,63 ^{efg}	395,20 ± 70,09 ^{cdef}
16	0 (2)	0 (2)	0 (1)	397,37 ± 24,81 ^{cd}	435,96 ± 1,24 ^{fghi}	349,12 ± 15,13 ^{fg}	376,90 ± 85,60 ^{cdef}
17	0 (2)	0 (2)	0 (1)	357,02 ± 28,53 ^{cde}	459,94 ± 26,90 ^{fghi}	364,50 ± 21,71 ^{fg}	410,53 ± 43,42 ^{def}

A atividade enzimática variou de 0 U/mL em 24h para 1443,57 U/mL em 48h. Essa ampla variação na atividade de L-asparaginase reflete a importância da otimização das variáveis envolvidas na fermentação submersa de *Aspergillus oryzae* IOC 3999 para produção de L-asparaginase.

A máxima atividade de L-asparaginase foi obtida no ensaio 14 após 48h de fermentação quando o fungo *A. oryzae* IOC 3999 foi cultivado utilizando as condições de 2% (m/v) de lactose, 2% (m/v) de L-asparagina, 1,5% (m/v) de caseína hidrolisada (casaminoácidos) em pH 7, em uma concentração de esporos de $5,05 \times 10^6$ esporos/mL a 30 °C, 100 rpm e mantendo-se fixas as concentrações de sais utilizadas no meio modificado Czapek Dox. Observou-se que a otimização do processo resultou em um aumento de 223% na produção de L-asparaginase se comparado com os valores iniciais obtidos no meio não otimizado.

Foi realizada uma análise de regressão múltipla para a atividade de L-asparaginase por *Aspergillus oryzae* IOC 3999 em 48h de fermentação submersa. A Tabela 9 apresenta os efeitos e o *p*-valor de cada componente do processo fermentativo estudado e as variáveis independentes foram consideradas significativas com ($p \leq 0,05$).

Tabela 9 – Estimativa dos efeitos das variáveis do processo fermentativo para produção de L-asparaginase por *Aspergillus oryzae* IOC 3999 após 48h.

Variável	Efeitos	<i>p</i> -valor
Média/Interação	5,5305	0,0000
Lactose % (m/v) (L)	3,8581	0,0019
Caseína hidrolisada % (m/v) (L)	0,7624	0,4593
Caseína hidrolisada % (m/v) (Q)	4,6193	0,0004

L: termo linear de uma equação matemática de segundo grau, Q: termo quadrático de uma equação matemática de segundo grau.

Em seguida, a Equação 4 foi desenvolvida com base na análise de regressão.

$$\text{Atividade de L-asparaginase (U/mL)} = 365,97 + 209,87 X_1 + 41,47 X_3 + 257,27 X_3^2 \quad (4)$$

Onde X_1 é lactose e X_3 é caseína. O modelo matemático foi analisado utilizando a análise de variância (ANOVA), como demonstrado na Tabela 10.

Tabela 10 – ANOVA para produção de L-asparaginase por *Aspergillus oryzae* IOC 3999 após 48h de fermentação.

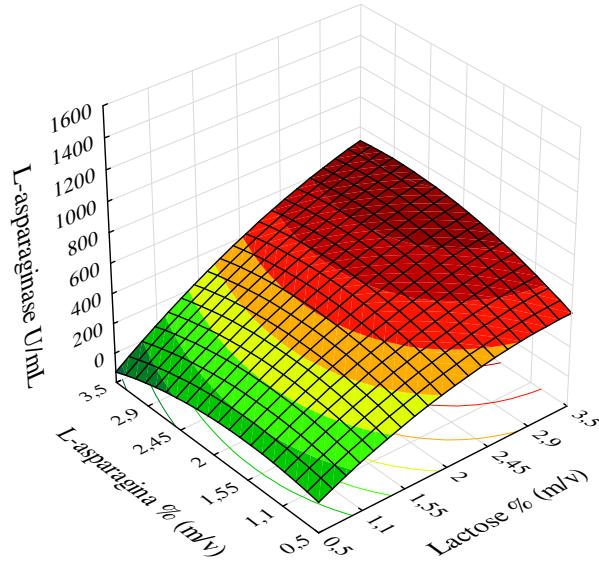
Fonte de variação	SQ	GL	QM	F calculado	F tabelado	p-valor
Regressão	1487426,37	3	495808,79	12,27	3,41	0,0004
Resíduo	525368,28	13	40412,94			
Total	201295,65	16				
R²	0,7389					

SQ: Soma de quadrados, GL: Graus de liberdade, QM: Quadrado médio. F: Função de Fishers, *p*- valor: corresponde ao nível de significância.

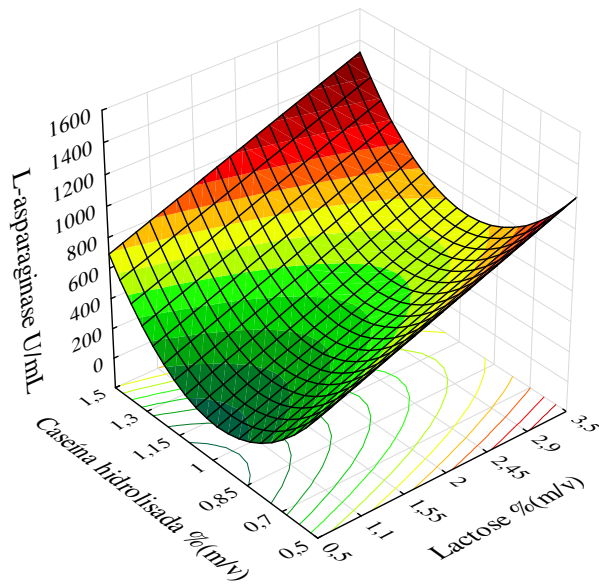
Ao analisar a regressão quadrática obtida, pode ser observado um efeito positivo e significativo, considerando ($p \leq 0,05$), do termo linear da lactose e da caseína hidrolisada e o termo quadrático da caseína hidrolisada, indicando que o aumento desses fatores aumenta a produção da enzima. De acordo com a ANOVA da regressão quadrática, o modelo é significativo, devido ao F calculado $>$ F tabelado, o *p*- valor $\leq 0,05$ e o coeficiente de regressão explicar 73,89% da variabilidade da resposta para a produção de L-asparaginase por *A. oryzae* IOC 3999.

Os gráficos de superfície de resposta foram construídos para prever a produção de L-asparaginase para diferentes valores das variáveis testadas. As superfícies de respostas foram construídas traçando a resposta (atividade de L-asparaginase U/mL) no eixo Z contra duas variáveis independentes, mantendo a terceira variável independente no nível 0, como mostrado nas Figuras 13a a 13c.

Figura 13 – Superfície de resposta dos efeitos da concentração de lactose, L-asparagina e caseína hidrolisada (casaminoácidos) na produção de L-asparaginase por *A. oryzae* IOC 3999 após 48h.



(a)



(b)

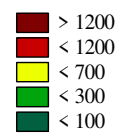
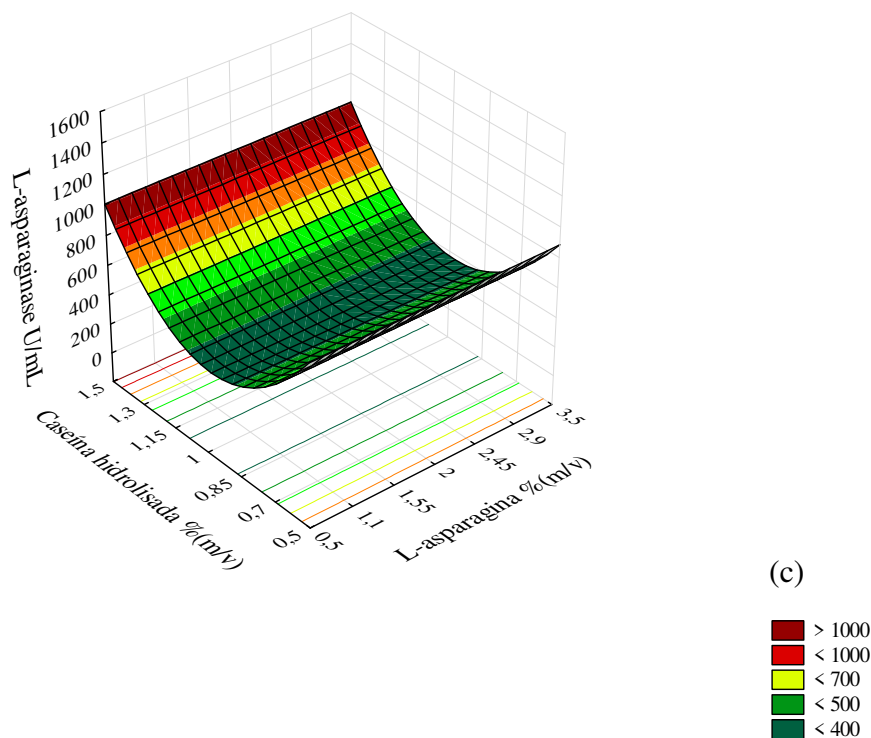


Figura 13c – Superfície de resposta dos efeitos da concentração de lactose, L-asparagina e caseína hidrolisada (casaminoácidos) na produção de L-asparaginase por *A. oryzae* IOC 3999 após 48h.



Na Figura 13a pode-se observar um aumento acentuado na produção de L-asparaginase com o aumento da concentração de lactose entre 2,9 a 3,5% (m/v) e com a concentração de L-asparagina variando entre 0,5 a 3,5% (m/v). Na Figura 13b, observou-se que a maior concentração da variável caseína (1,5 % m/v) e a maior concentração da variável lactose (2,45 a 3,5 % m/v) proporcionou maior atividade de L-asparaginase por *Aspergillus oryzae* IOC 3999 em fermentação submersa. Enquanto que na Figura 13c observou-se que independente da concentração de L-asparagina estudada no DCCR, entre 0,5 a 3,5 % (m/v), juntamente com a maior concentração de caseína hidrolisada (1,3 a 1,5 % m/v) proporcionou a maior atividade de L-asparaginase por *A. oryzae* IOC 3999.

Resultado semelhante foi obtido por Dias e Sato (2016) ao usarem um DCCR 2² para otimizar a produção de L-asparaginase de *Aspergillus oryzae* CCT 3940 em fermentação submersa, obtendo uma atividade máxima da enzima de 67,49 U/mL utilizando o meio otimizado Czapek Dox composto por 2% de L-prolina, 0,5% de glicose, 0,2% de L-asparagina (indutor), 0,5% de extrato de levedura, 0,152% de KH₂PO₄, 0,052% de KCl, 0,052% de MgSO₄.7H₂O, 0,0001% de CuNO₃.3H₂O, 0,0001% de ZnSO₄.7H₂O e 0,0001% de FeSO₄.7H₂O

em pH ajustado para 8, usando uma concentração de 3×10^7 esporos/mL durante 72h, a 150 rpm por 30 °C. Foi observado um aumento de 225% em relação às condições iniciais não otimizadas.

Para a obtenção da síntese máxima de L-asparaginase, os requisitos nutricionais variam de um micro-organismo para outro (BARNES et al., 1977). Por isso, torna-se importante estudar, para cada micro-organismo, quais são os principais componentes do meio de fermentação e parâmetros do processo fermentativo para a máxima obtenção do produto desejado.

Para verificar a validade do modelo, os experimentos foram realizados em triplicata nas concentrações em que se obteve uma boa produção de L-asparaginase por *A. oryzae* IOC 3999, como demonstrado na Tabela 11.

Tabela 11 – Níveis das variáveis utilizadas para o teste de validação experimental do modelo de produção de L-asparaginase por *Aspergillus oryzae* IOC 3999 após 48h de fermentação.

Variáveis independentes			L-asparaginase (U/mL) 48h		
Lactose % (m/v)	L-asparagina % (m/v)	Caseína hidrolisada % (m/v)	Resultado prevista	Resultado experimental	Erro (%)
1 (2,9)	-1 (1,1)	-1 (0,7)	791,34 ^a	831,32 ± 40,2 ^a	4,81

Os resultados são apresentados como média ($n = 3$) ± desvio padrão. Valores com letras diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

A atividade prevista de L-asparaginase nessas condições foi de 791,34 U/mL e o resultado experimental obtido foi de 831,32 U/mL. Não houve diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) entre a atividade prevista e o valor experimental observado, indicando que os resultados obtidos no teste de validação foram satisfatórios.

Para o estudo da L-asparaginase de *Aspergillus niger* IOC 0203, foi utilizada a mesma estratégia sequencial de otimização para o processo fermentativo. Baseando-se nos resultados do estudo univariado anterior, item 5.5, foi selecionado como fonte de carbono a sacarose e como fonte de nitrogênio o aminoácido L-asparagina. O delineamento Plackett-Burman foi utilizado para analisar o efeito de seis variáveis (concentração da fonte de carbono, concentração da fonte de nitrogênio, pH, temperatura, agitação e concentração de inóculo) na produção de L-asparaginase utilizando a linhagem *A. niger* IOC 0203 após 48h. A Tabela 12 mostra a atividade de L-asparaginase de *A. niger* IOC 0203 obtida no delineamento PB 12.

Tabela 12 – Matriz do Plackett-Burman contendo os valores codificados, reais e a variável resposta L-asparaginase (U/mL) obtida por fermentação submersa de *Aspergillus niger* IOC 0203 após 48h.

Ensaio	Sacarose	L-asparagina	pH	Temperatura	Taxa de	Concentração	L-asparaginase
	% (m/v)	% (m/v)		(°C)	agitação	de inóculo	
					(rpm)	(esporos/mL)	(U/mL)
1	1(2)	-1(0)	-1(6)	-1(25)	-1(100)	-1(10 ⁵)	982,22 ± 82,658^b
2	1(2)	1(2)	1(8)	-1(25)	-1(100)	-1(10 ⁵)	180,12 ± 5,84^{efg}
3	-1(0,5)	1(2)	-1(6)	1(35)	1(200)	-1(10 ⁵)	150,00 ± 13,65^{efg}
4	1(2)	-1(0)	1(8)	-1(25)	-1(100)	1(10 ⁷)	754,39 ± 60,79^c
5	1(2)	1(2)	1(8)	1(35)	1(200)	-1(10 ⁵)	265,79 ± 13,65^{def}
6	1(2)	1(2)	-1(6)	1(35)	1(200)	1(10 ⁷)	320,61 ± 21,71^{de}
7	-1(0,5)	1(2)	1(8)	-1(25)	-1(100)	1(10 ⁷)	50,88 ± 3,72^g
8	-1(0,5)	-1(0)	1(8)	1(35)	1(200)	-1(10 ⁵)	427,78 ± 80,14^d
9	-1(0,5)	-1(0)	1(8)	1(35)	1(200)	1(10 ⁷)	82,46 ± 11,16^{fg}
10	1(2)	-1(0)	-1(6)	1(35)	1(200)	1(10 ⁷)	1166,23 ± 53,96^a
11	-1(0,5)	1(2)	-1(6)	-1(25)	-1(100)	1(10 ⁷)	38,16 ± 1,18^g
12	-1(0,5)	-1(0)	-1(6)	-1(25)	-1(100)	-1(10 ⁵)	801,93 ± 95,03^c
13	0(1,25)	0(1)	0(7)	0(30)	0(150)	0(5,05x 10 ⁶)	82,46 ± 3,72^{fg}
14	0(1,25)	0(1)	0(7)	0(30)	0(150)	0(5,05x 10 ⁶)	90,64 ± 3,58^g
15	0(1,25)	0(1)	0(7)	0(30)	0(150)	0(5,05x 10 ⁶)	81,58 ± 2,85^{fg}

Pode-se observar que as menores atividades de L-asparaginase de *A. niger* IOC 0203 alcançadas foram de 38,16 U/mL e 50,90 U/mL e a maior atividade enzimática obtida foi de 1166,2 U/mL após 48h de fermentação. A análise estatística está apresentada na Tabela 13, onde são mostrados os efeitos e o *p*-valor de cada variável estudada no PB 12 para a produção de L-asparaginase por *A. niger* IOC 0203.

Tabela 13 – Estimativa dos efeitos das variáveis do processo fermentativo para produção de L-asparaginase por *Aspergillus niger* IOC 0203 após 48h.

Variável	Efeitos	<i>p</i> -valor
Curvatura	-3,3123	0,0129
Sacarose % (m/v)	3,7334	0,0073
L-asparagina % (m/v)	-5,6572	0,0007
pH	0,2665	0,7975
Temperatura (°C)	-2,9923	0,0201
Taxa de agitação (rpm)	-0,6959	0,5089
Concentração de inóculo (esporos/mL)	-0,6962	0,5087

$$R^2 = 0,9052$$

O coeficiente de determinação (R^2) fornece uma medida da variabilidade da resposta obtida. Para produção de L-asparaginase de *A. niger* IOC 0203 o coeficiente de determinação do delineamento PB 12 explica 90,52% dos resultados, indicando boa correlação entre os valores experimentais obtidos.

Os parâmetros do meio de fermentação foram selecionados com base no valor absoluto dos efeitos e com *p*-valor $\leq 0,05$. A variável sacarose apresentou efeito positivo significativo, enquanto que as variáveis L-asparagina e temperatura apresentaram efeito negativo significativo na produção de L-asparaginase por *A. niger* IOC 0203. Os demais parâmetros não apresentaram efeito significativo no processo fermentativo.

Sabe-se que a regulação do metabolismo microbiano para a obtenção de L-asparaginase é mediada por fontes de carbono e nitrogênio (HYMAVATHI et al., 2010). Alguns micro-organismos podem produzir a enzima constitutivamente ou por indução (SAVITRI; AZMI, 2003) e as condições físico-químicas para a produção de L-asparaginase também pode variar conforme a espécie microbiana estudada (EL-NAGGAR et al., 2015; SAVITRI; AZMI, 2003).

Alguns autores utilizaram somente o delineamento experimental Plackett-Burman para o aumento da produção de L-asparaginase, como Farag et al., (2015) ao avaliar sete variáveis (glicose, L-asparagina, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl, concentração de inóculo) na produção de L-asparaginase por *Aspergillus terreus*. Esses autores observaram que somente três fatores foram significativos e positivos na produção: L-asparagina, cloreto de sódio e concentração de inóculo, obtendo 10,49 U/mg de L-asparaginase.

Hymavathi et al., (2010) estudaram o impacto de onze diferentes fontes de carbono e quinze diferentes fontes de nitrogênio sobre o aumento da produção de L-asparaginase por *Bacillus circulans* utilizando somente uma metodologia estatística, o delineamento PB. Na avaliação das melhores fontes de carbono e nitrogênio a atividade enzimática máxima alcançada foram 105 e 164 U/mL, respectivamente. Entre os vinte e seis componentes avaliados, os compostos: glicose, manose, ribose e gelatina apresentaram efeito negativo significativo ($p < 0,1$). Enquanto os compostos: amido, maltose, lactose, cloreto de amônio, sulfato de amônio, nitrato de amônio, triptona, ureia e água de maceração de milho exibiram efeito positivo e significativo ($p < 0,1$) na atividade de L-asparaginase.

Em outros estudos, entretanto, foi utilizado uma estratégia sequencial de otimização e o delineamento PB foi usado para uma triagem inicial dos principais componentes do processo fermentativo. No estudo de Baskar e Renganathan (2012b) os componentes L-prolina, nitrato de sódio, L-asparagina e glicose foram significativos ($p < 0,1$) na produção da L-asparaginase por *Aspergillus terreus* MTCC 1782. Em seguida, as variáveis significativas foram selecionadas para um posterior DCCR 2⁴.

No presente trabalho, como etapa subsequente, o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi aplicado para determinar os níveis das variáveis críticas, pré-selecionadas no delineamento PB 12, para aumentar a produção de L-asparaginase. No entanto, as variáveis não significativas foram utilizadas em todos os experimentos usando o nível médio (ponto central) do delineamento PB 12. A Tabela 14 apresenta os valores de atividade de L-asparaginase de *A. niger* IOC 0203 obtida no DCCR durante uma cinética de 96h de fermentação.

Tabela 14 – Matriz do DCCR 2³ (valores reais e codificados) utilizada para a produção de L-asparaginase por *Aspergillus niger* IOC 0203.

Ensaio	Sacarose % (m/v)	L-asparagina % (m/v)	Temperatura (°C)	L-asparaginase (U/mL)			
				24h	48h	72h	96h
1	-1 (1,1)	-1 (0,35)	-1 (22,5)	61,40 ± 4,71 ^e	49,53 ± 8,86 ^{fgh}	54,74 ± 8,43 ^{cde}	110,00 ± 9,68 ^{bcd}
2	1 (2,9)	-1 (0,35)	-1 (22,5)	1906,14 ± 95,52 ^a	718,42 ± 0,74 ^a	38,16 ± 1,86 ^{de}	105,15 ± 1,07 ^{bcd}
3	-1(1,1)	1 (0,65)	-1 (22,5)	131,14 ± 10,54 ^{de}	48,42 ± 4,96 ^{fgh}	93,16 ± 2,23 ^{abc}	0,00 ± 0,00 ^e
4	1 (2,9)	1 (0,65)	-1 (22,5)	1750,29 ± 283,32 ^a	251,93 ± 55,58 ^c	43,68 ± 3,23 ^{cde}	59,65 ± 7,44 ^{cde}
5	-1 (1,1)	-1 (0,35)	1 (27,5)	77,19 ± 3,99 ^e	35,79 ± 1,24 ^{gh}	57,31 ± 5,36 ^{cde}	55,61 ± 6,70 ^{de}
6	1 (2,9)	-1 (0,35)	1 (27,5)	1039,42 ± 30,43 ^b	601,75 ± 33,47 ^b	113,22 ± 17,73 ^{ab}	17,19 ± 0,50 ^e
7	-1 (1,1)	1(0,65)	1 (27,5)	135,32 ± 7,50 ^e	122,57 ± 16,06 ^{de}	107,02 ± 7,44 ^{ab}	13,68 ± 1,49 ^e
8	1 (2,9)	1 (0,65)	1 (27,5)	1028,77 ± 131,46 ^b	81,87 ± 7,50 ^{efgh}	19,21 ± 0,37 ^e	30,35 ± 5,21 ^e
9	-1,68 (0,5)	0 (0,5)	0 (25)	11,75 ± 2,73 ^e	80,88 ± 1,74 ^{efgh}	122,28 ± 19,60 ^a	358,07 ± 63,76 ^a
10	1,68 (3,5)	0 (0,5)	0 (25)	1033,45 ± 149,41 ^b	168,54 ± 31,13 ^d	14,21 ± 0,74 ^{de}	27,72 ± 5,46 ^e
11	0 (2)	-1,68 (0,25)	0 (25)	640,12 ± 61,82 ^c	109,04 ± 0,37 ^{defg}	109,01 ± 19,06 ^{ab}	61,23 ± 11,16 ^{cde}
12	0 (2)	1,68 (0,75)	0 (25)	568,77 ± 67,98 ^c	90,18 ± 18,26 ^{efgh}	84,21 ± 5,95 ^{abcd}	122,46 ± 1,49 ^{bc}
13	0 (2)	0 (0,5)	-1,68 (20,8)	611,93 ± 92,30 ^c	26,32 ± 3,97 ^h	45,26 ± 4,95 ^{cde}	26,32 ± 3,47 ^e
14	0 (2)	0 (0,5)	1,68 (29,2)	468,95 ± 41,55 ^{cd}	56,67 ± 8,68 ^{efgh}	42,98 ± 9,18 ^{de}	158,71 ± 16,16 ^b
15	0 (2)	0 (0,5)	0 (25)	574,56 ± 1,24 ^c	102,57 ± 10,95 ^{efg}	71,23 ± 2,53 ^{bcd}	100,88 ± 11,16 ^{bcd}
16	0 (2)	0 (0,5)	0 (25)	530,88 ± 76,90 ^c	97,31 ± 1,71 ^{efg}	73,68 ± 1,63 ^{abcd}	109,82 ± 5,17 ^{bcd}
17	0 (2)	0 (0,5)	0 (25)	530,53 ± 5,46 ^c	116,14 ± 3,47 ^{def}	80,60 ± 1,87 ^{abcd}	107,02 ± 2,48 ^{bcd}

As maiores atividades de L-asparaginase (1960,14 U/mL e 1750, 29 U/mL) foram obtidas nos ensaios 2 e 4, respectivamente, utilizando-se meio modificado Czapek Dox contendo 2,9% (m/v) de sacarose + 0,35% (m/v) de L-asparagina e 2,9% (m/v) de sacarose + 0,65% (m/v) de L-asparagina, com adição de concentração de $5,05 \times 10^6$ esporos/mL e concentrações fixas de sais ajustado para pH 7,0, sendo incubado a 22,5°C por 150 rpm durante 24h.

Em seguida, foi realizada uma análise de regressão múltipla para a atividade de L-asparaginase por *Aspergillus niger* IOC 0203 em 24h de fermentação submersa. A Tabela 15 apresenta os efeitos e o *p*-valor de cada componente do processo fermentativo estudado e as variáveis independentes foram consideradas significativas com ($p \leq 0,05$).

Tabela 15 – Estimativa dos efeitos das variáveis do processo fermentativo para produção de L-asparaginase por *Aspergillus niger* IOC 0203 após 24h.

Variável	Efeitos	<i>p</i> -valor
Média/Interação	9,1615	0,0000
Sacarose % (m/v) (L)	6,4811	0,0000

L: termo linear de uma equação matemática de primeiro grau.

Uma função polinomial (Equação 5) de primeira ordem foi ajustada, podendo prever a atividade de L-asparaginase de *A. niger* IOC 0203 para 24h de fermentação nas condições avaliadas.

$$\text{Atividade de L-asparaginase (U/mL)} = 652,91 + 515,33 X_1 \quad (5)$$

Onde X_1 corresponde a concentração de sacarose. De acordo com a equação, um efeito positivo pode ser observado no termo linear da sacarose, indicando que o aumento dessa variável aumenta a produção da enzima. No entanto, as outras variáveis e as interações entre os fatores analisados, não apresentaram efeito significativo ($p \leq 0,05$) para a atividade de L-asparaginase de *A. niger* IOC 0203. O teste estatístico (ANOVA) do modelo de regressão foi aplicado para testar a significância e adequação do modelo, como demonstrado na Tabela 16.

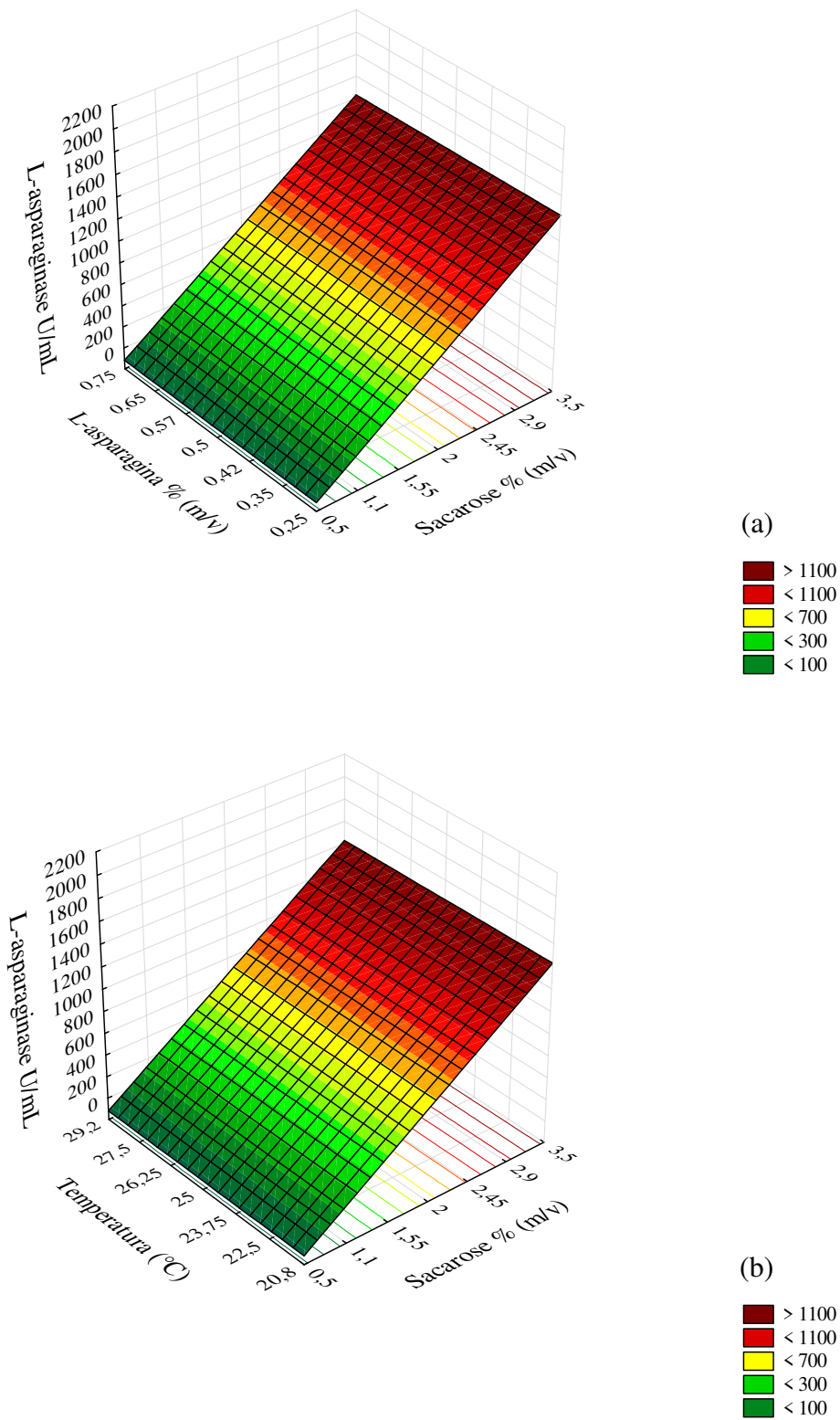
Tabela 16 – ANOVA para produção de L-asparaginase por *Aspergillus niger* IOC 0203 após 24h de fermentação.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	F calculado	F tabelado	p-valor
Regressão	3626839,88	1	3626839,88	42,0	4,54	0,00001
Resíduo	1295155,29	15	86343,69			
Total	4921995,17	16				
R²	0,7368					

SQ: Soma de quadrados, GL: Graus de liberdade, QM: Quadrado médio. F: Função de Fishers, *p*- valor: corresponde ao nível de significância.

O resultado da ANOVA revelou que a equação matemática obtida foi significativa para prever a atividade de L-asparaginase de *A. niger* IOC 0203, de acordo com o *p*-valor ($p \leq 0,05$) e com o teste F (F calculado > F tabelado). O modelo da regressão apresentou um coeficiente de determinação satisfatório ($R^2 = 0,7368$). Assim, foram construídos os gráficos de superfície de resposta traçando a resposta (atividade de L-asparaginase U/mL) no eixo Z contra duas variáveis independentes, mantendo a terceira variável independente no nível 0, de acordo com a Figura 14a e 14b.

Figura 14 – Superfície de resposta dos efeitos da concentração de sacarose, L-asparagina e temperatura na produção de L-asparaginase por *A. niger* IOC 0203 após 24h.



A Figura 14a ilustra que nos ensaios do DCCR a produção de L-asparaginase aumentou com o aumento da concentração de sacarose (2,45 a 3,5% m/v) independente da concentração de L-asparagina estudada (0,25 a 0,75% m/v). Mesmo comportamento pode ser observado para a atividade de L-asparaginase de *A. niger* IOC 0203 quando a concentração de sacarose variou entre 2,45 a 3,5% (m/v) enquanto a temperatura variou entre 20,8 a 29,2 °C (Figura 14b).

A estratégia sequencial de otimização proporcionou um aumento de 815,5% na produção de L-asparaginase quando comparado com os valores iniciais obtidos no experimento univariado. A linhagem de *A. niger* IOC 0203 mostrou alto potencial de produção de L-asparaginase se comparado a outros estudos utilizando outras linhagens de *Aspergillus* sp.

Baskar e Renganathan (2012b) aplicaram um DCCR 2⁴ para determinar o meio de fermentação para a produção máxima de L-asparaginase por *Aspergillus terreus* MTCC 1782. A concentração ótima prevista dos componentes do meio foi de 2,8% (m/v) de L-prolina, 1,44% (m/v) de nitrato de sódio, 1,34% (m/v) de L-asparagina e 0,63% (m/v) de glicose sendo obtido atividade de L-asparaginase igual a 38,08 IU/mL. Ahmed et al., (2015) isolaram a linhagem *Aspergillus* sp. ALAA-2000 e testaram a produção de L-asparaginase em fermentação submersa para otimização dos parâmetros físico-químicos utilizando metodologia de “um fator por vez”. Os autores obtiveram atividade máxima de 30,64 U/mL utilizando 1% (m/v) glicose como fonte de carbono e 1% (m/v) L-asparagina como fonte de nitrogênio.

A validação do modelo de regressão obtido foi realizada utilizando os seguintes parâmetros: 2,9% (m/v) de sacarose, 0,35% de L-asparagina e temperatura de 22,5 °C (Ensaio 2), que produziu maior atividade em 24h de fermentação. A atividade prevista de L-asparaginase foi de 1168,24 U/mL e o valor médio foi de 1206,57 U/mL (Tabela 17).

Tabela 17 – Níveis das variáveis utilizadas para o teste de validação experimental do modelo de produção de L-asparaginase por *Aspergillus niger* IOC 0203 após 24h de fermentação.

Variáveis independentes			L-asparaginase (U/mL) 24h		
Sacarose % (m/v)	L-asparagina % (m/v)	Temperatura °C	Resultado previsto	Resultado experimental	Erro (%)
1 (2,9)	-1 (0,35)	-1 (22,5)	1168,24 ^a	1206,57 ^a	3,17

Os resultados são apresentados como média (n = 3) ± desvio padrão. Valores com letras diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Não houve diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) entre a atividade prevista e o valor experimental observado, indicando que os resultados obtidos foram satisfatórios.

Após ter estabelecido os parâmetros do processo fermentativo, assim como a concentração dos nutrientes para a melhoria da produção de L-asparaginase por *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203 foi realizada a purificação das enzimas para posterior caracterização bioquímica e aplicação.

5.6. Purificação das L-asparaginases de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203

A maioria dos procedimentos de purificação é composta por métodos convencionais, tais como fracionamento com sulfato de amônio combinado com cromatografia de exclusão molecular ou cromatografia em coluna de troca iônica (ZUO et al., 2015). Para a purificação parcial de bioprodutos, o fracionamento de proteínas por precipitação com sais é um método tradicional. No entanto, este método pode ser agressivo à proteína, devido ao potencial de modificação da sua estrutura tridimensional, resultando em deformação e possível inativação da enzima (TUNDISI et al., 2016).

A ultrafiltração é uma técnica eficaz para concentrar ou separar moléculas de diferentes tamanhos. Uma vantagem da técnica é que não há mudanças no pH ou força iônica no meio e, portanto, o ambiente em que a proteína se encontra em relação a tampões e sais permanece inalterado (WHEELWRIGHT, 1991). Processos que utilizam membranas são mais vantajosos, pois diminuem o tempo de processamento em larga escala; é um método barato, rápido, de alto rendimento e ambientalmente correto (TUNDISI et al., 2016).

Após as primeiras etapas da purificação, as técnicas cromatográficas são amplamente utilizadas para atingir um determinado grau de purificação (MILNE, 2010). A cromatografia de filtração em gel ou exclusão molecular é um método baseado no fracionamento de proteínas de acordo com o seu tamanho molecular. Este tipo de técnica utiliza grânulos porosos como fase estacionária, onde as proteínas com alta massa molecular eluem primeiro porque não conseguem penetrar nos poros dos grânulos e as proteínas pequenas conseguem acessar o caminho interno dos grânulos, eluindo posteriormente (TUNDISI et al., 2016).

As L-asparaginases de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203 foram purificadas utilizando ultrafiltração por membrana de 30 kDa e coluna de exclusão molecular Sephadex G100. As etapas de purificação das L-asparaginases de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0202 são apresentadas na Tabela 18 e 19, respectivamente.

Tabela 18 – Etapas do processo de purificação de L-asparaginase de *Aspergillus oryzae* IOC 3999.

Etapas de purificação	Quantidade (mL)	Atividade (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade total (U)	Proteína total	Atividade específica (U/mg de proteína)	Rendimento (%)	Fator de purificação
Extrato bruto	100	1358,48	3,87	135848,00	387,00	351,02	100	1
Ultrafiltração 30 kDa	10	2013,16	4,08	20131,16	40,82	493,41	14,82	1,40
Sephadex G-100	3	133,60	0,18	400,80	0,54	742,22	0,30	2,11

Tabela 19 – Etapas do processo de purificação de L-asparaginase de *Aspergillus niger* IOC 0203.

Etapas de purificação	Quantidade (mL)	Atividade (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade total (U)	Proteína total	Atividade específica (U/mg de proteína)	Rendimento (%)	Fator de purificação
Extrato bruto	100	999,12	1,06	99912,00	106,00	942,56	100	1
Ultrafiltração 30 kDa	10	1914,04	1,21	19140,40	121,00	1581,85	19,16	1,68
Sephadex G-100	3	802,46	0,35	2407,38	1,05	2292,74	2,41	2,43

Neste estudo, foi utilizado o método de ultrafiltração em membranas de 30 kDa para concentrar e purificar parcialmente os extratos brutos de L-asparaginase de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203 que apresentavam baixa concentração de proteína, 3,87 mg/mL e 1,06 mg/mL, respectivamente.

Para ambas as enzimas, pode-se observar que a atividade específica da enzima aumentou a cada passo de purificação. Para a enzima purificada de *A. oryzae* IOC 3999 após a etapa de filtração em gel, observou-se uma atividade específica de 742,22 U/mg de proteína, apresentando um fator de purificação de 2,11 e para a enzima purificada de *A. niger* IOC 0203 de 2292,74 U/mg de proteína, com fator de purificação de 2,43.

Diferentes atividades específicas e fatores de purificação foram relatados para várias L-asparaginases provenientes de fungos. Patro e Gupta (2012) purificaram 1,9 vezes a L-asparaginase de *Penicillium* sp. por precipitação com sulfato de amônio, cromatografia em coluna de Sephadex G100-120 e coluna de DEAE-celulose obtendo preparação contendo 13,97 U/mg de proteína.

A L-asparaginase de *Rhizomucor miehei* foi purificada 2,6 vezes, em uma única etapa de purificação, utilizando-se coluna de ácido níquel-iminodiacético, sendo obtido preparação com 1.984,8 U/mg de proteína (HUANG et al., 2014). Em outro estudo, a L-asparaginase de *Mucor hiemalis* foi purificada 4,59 vezes, por precipitação com acetona e cromatografia de afinidade em coluna de lecitina-agarose, sendo obtido preparação com 69,43 U/mg de proteína (THAKUR et al., 2014).

A massa molecular das L-asparaginase de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203 foram estimadas em 20,8 kDa e 19,1 kDa por filtração em coluna de Sephadex G-100 (Figuras 14 e 15), respectivamente. Os cromatogramas de filtração em gel obtido plotando a absorbância a 280 nm com o volume de eluição correspondente (V_e) às frações dos padrões utilizados e das frações com atividade de L-asparaginase de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203, se encontram nos anexos 5 e 6, respectivamente.

As Figuras 15 e 16 ilustram a relação entre log da massa molecular das proteínas e K_{av} (razão do volume de eluição das proteínas e volume vazio da coluna de Sephadex G-100).

Figura 15 – Determinação da massa molecular da L-asparaginase de *A. oryzae* IOC 3999 por cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100.

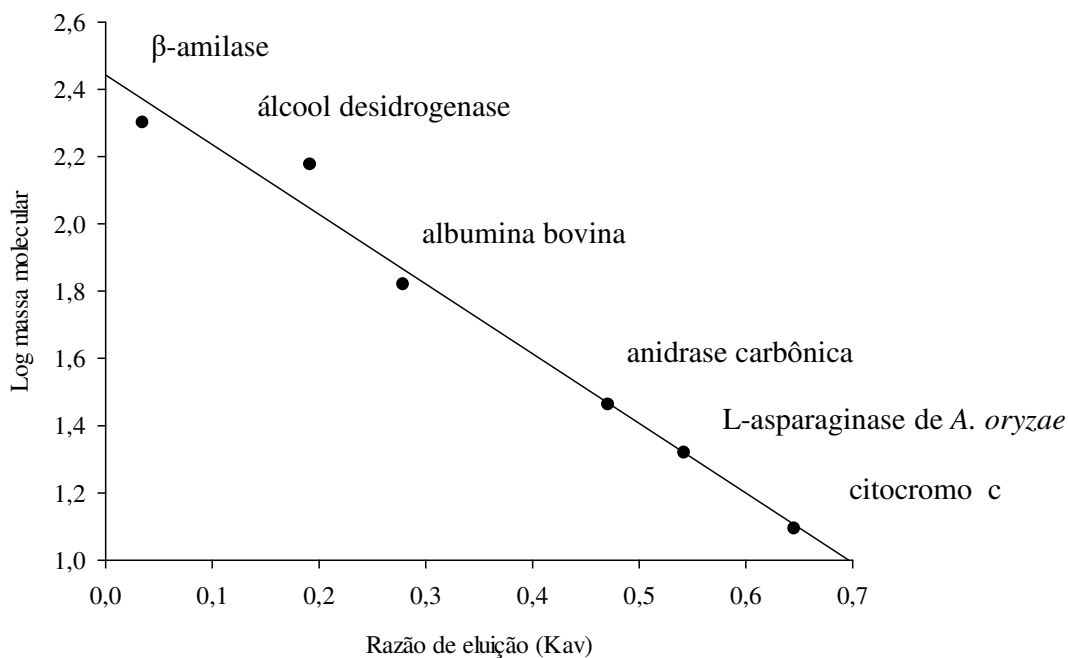
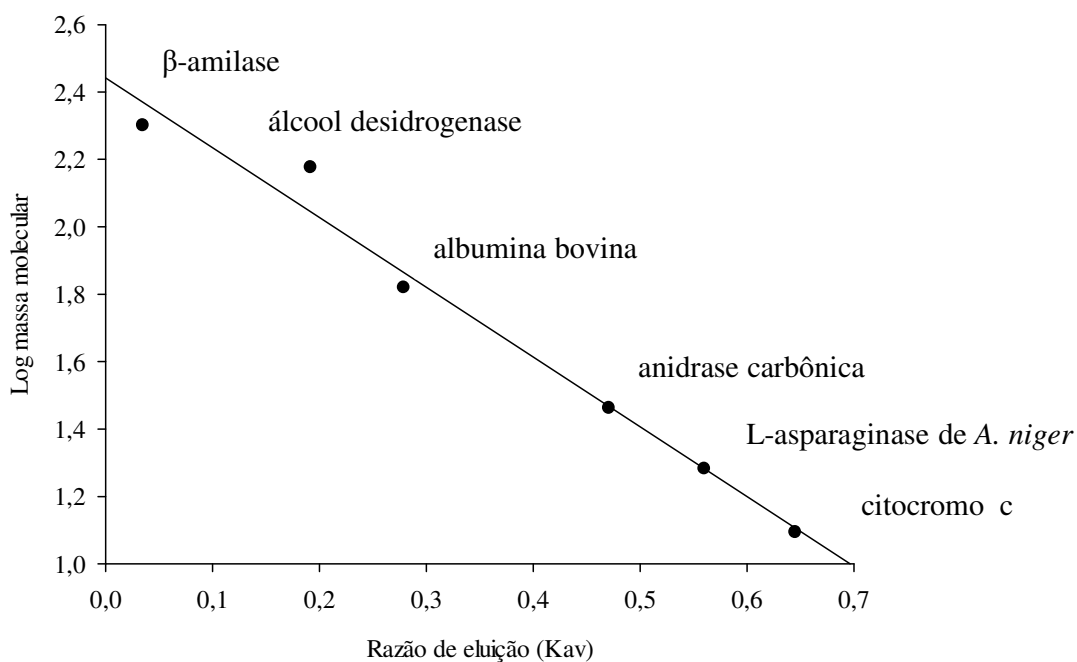


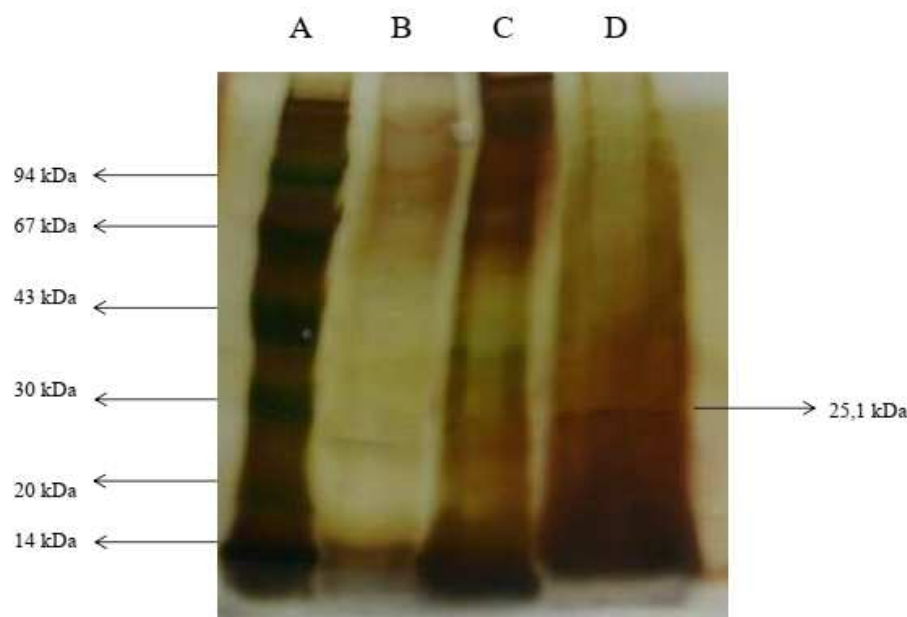
Figura 16 – Determinação da massa molecular da L-asparaginase de *A. niger* IOC 0203 por cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100.



Singh et al., (2013) estimaram a massa molecular da L-asparaginase de *Bacillus aryabhattai* ITBHU02, por cromatografia de exclusão molecular (Superdex-200) em 155 kDa. A massa molecular de L-asparaginase de *Vibrio cholerae* foi estimada em 132 kDa por cromatografia em gel Superdex-200 (RADHA et al., 2018). Geralmente, a massa molecular da L-asparaginase varia dependendo do micro-organismo produtor (DUTTA et al., 2015; THAKUR et al., 2014).

A remoção de proteínas contaminantes usando a resina Sephadex G-100 de coluna de filtração em gel foi considerada uma etapa adequada para ambas enzimas estudadas. Após cada procedimento de purificação, as frações com atividade enzimática foram analisadas usando SDS-PAGE. As Figuras 17 e 18 apresentam o gel de eletroforese das frações de L-asparaginases (extrato bruto, extrato concentrado e enzima purificada) dos micro-organismos estudados.

Figura 17 – Eletroforese (SDS-PAGE) das proteínas dos extratos enzimáticos de L-asparaginase de *A. oryzae* IOC 3999 durante as etapas de purificação.

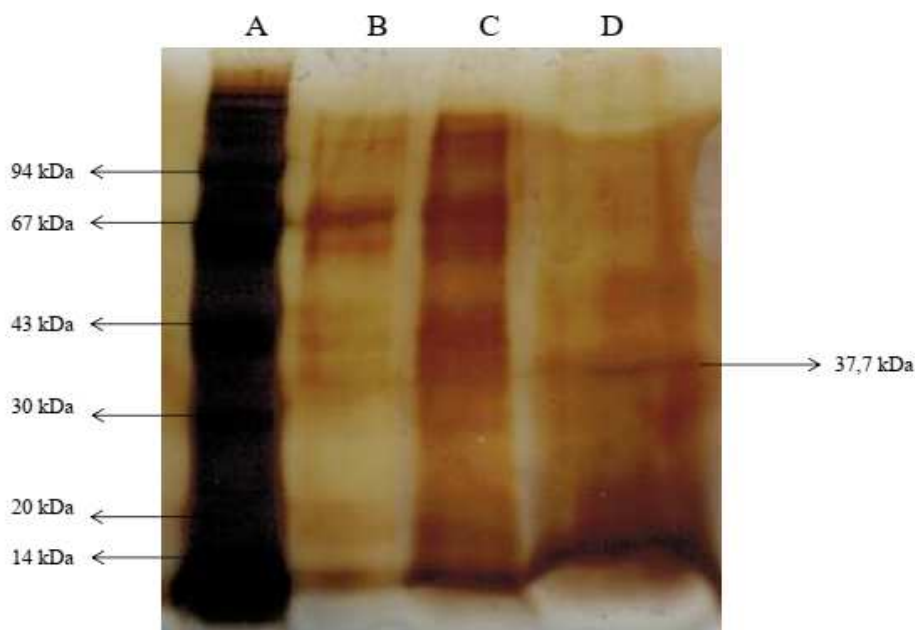


(A) padrões de proteínas, (B) extrato bruto, (C) extrato concentrado por ultrafiltração com membrana de 30 kDa e (D) L-asparaginase purificada.

A L-asparaginase purificada de *A. oryzae* IOC 3999 apresentou uma única banda na SDS-PAGE, de massa molecular estimada em 25,1 kDa (Figura 17). Resultado semelhante foi alcançado por Ahmed et al., (2015) ao purificar a L-asparaginase de *Aspergillus* sp. ALAA-

2000 utilizando as etapas de fracionamento a 80% com sulfato de amônio, em seguida a cromatografia de gel filtração usando Sephadex G-200 obtiveram um fator de purificação de 8,3 com uma atividade específica de 0,4 U/mg. A enzima apresentou duas bandas de proteína na eletroforese de SDS-PAGE de massa molecular 25 kDa e 31 kDa.

Figura 18 – Eletroforese (SDS-PAGE) das proteínas dos extratos enzimáticos de L-asparaginase de *A. niger* IOC 0203, durante as etapas de purificação.



(A) padrões de proteínas, (B) extrato bruto, (C) extrato concentrado por ultrafiltração com membrana de 30 kDa e (D) L-asparaginase purificada.

A L-asparaginase de *A. niger* IOC 0203 purificada por ultrafiltração em membrana de 30 kDa e coluna de Sephadex G-100 apresentou homogeneidade exibindo massa molecular de 37,7 kDa por eletroforese SDS-PAGE (Figura 18). Dutta et al., (2015) purificaram a L-asparaginase bruta de *A. fumigatus* WL002 cerca de 232 vezes utilizando membrana de ultrafiltração de 30 kDa, seguido do fracionamento com sulfato de amônio; cromatografia em coluna de troca-iônica DEAE-Sepharose FF e coluna Sephadex G-100. A enzima apresentou específica de 355,03 IU/mg de proteína e massa molecular de 35 kDa.

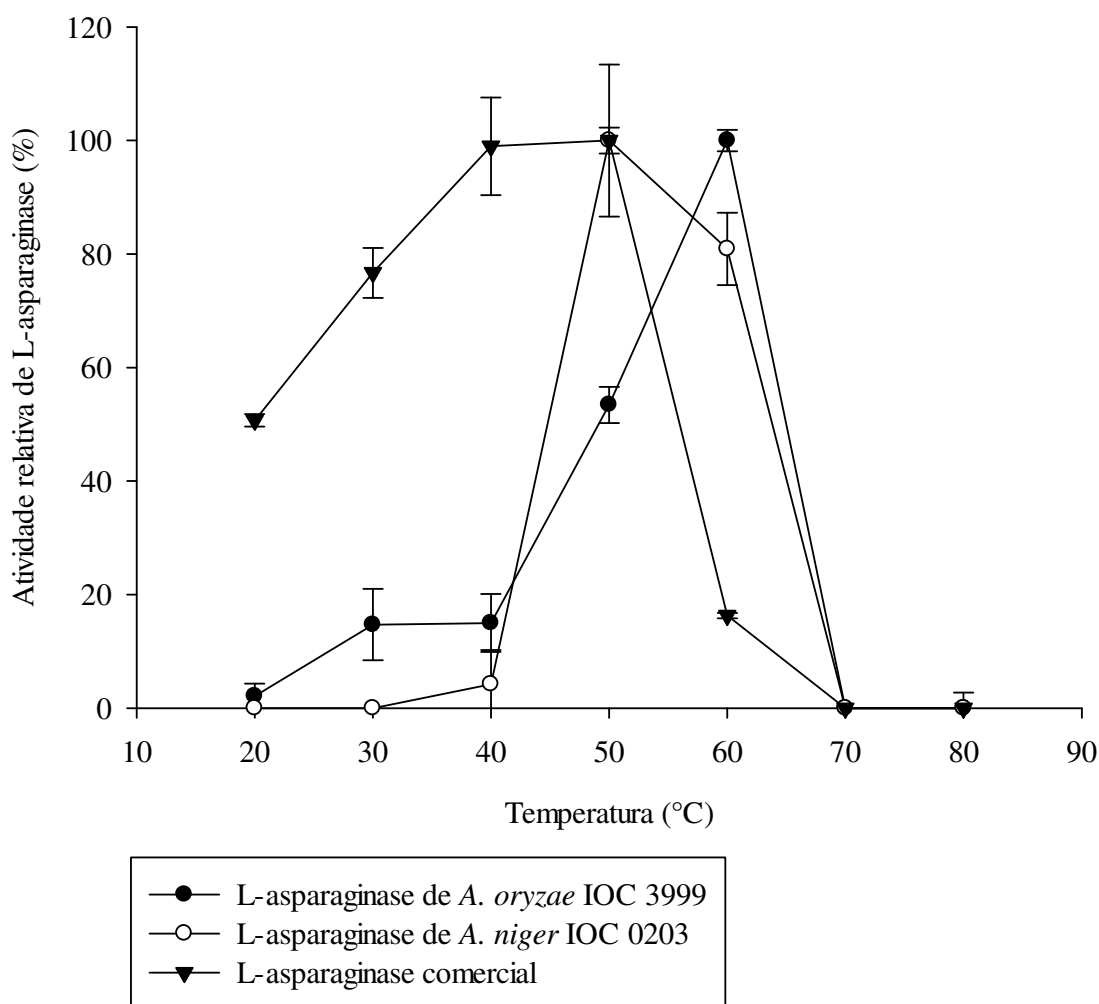
As metodologias eletroforese em gel de SDS-PAGE e a cromatografia de exclusão molecular, são rápidas, simples e resultam em valores com precisão de $\pm 5-10\%$ para determinação da massa molecular de proteínas (WILSON; WALKER, 2010).

5.7. Caracterização das L-asparaginases purificadas de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203

5.7.1. Temperatura ótima de atividade das L-asparaginases purificadas de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203

A Figura 19 apresenta o efeito da temperatura na atividade das L-asparaginases purificadas e da enzima comercial. A enzima purificada do *A. oryzae* IOC 3999 apresentou atividade ótima de 60 °C, enquanto que a L-asparaginase de *A. niger* IOC 0203 e a enzima comercial apresentaram atividade ótima em 50 °C.

Figura 19 – Efeito da temperatura na atividade das L-asparaginases purificadas de *A. oryzae* IOC 3999, *A. niger* IOC 0203 e preparação comercial.

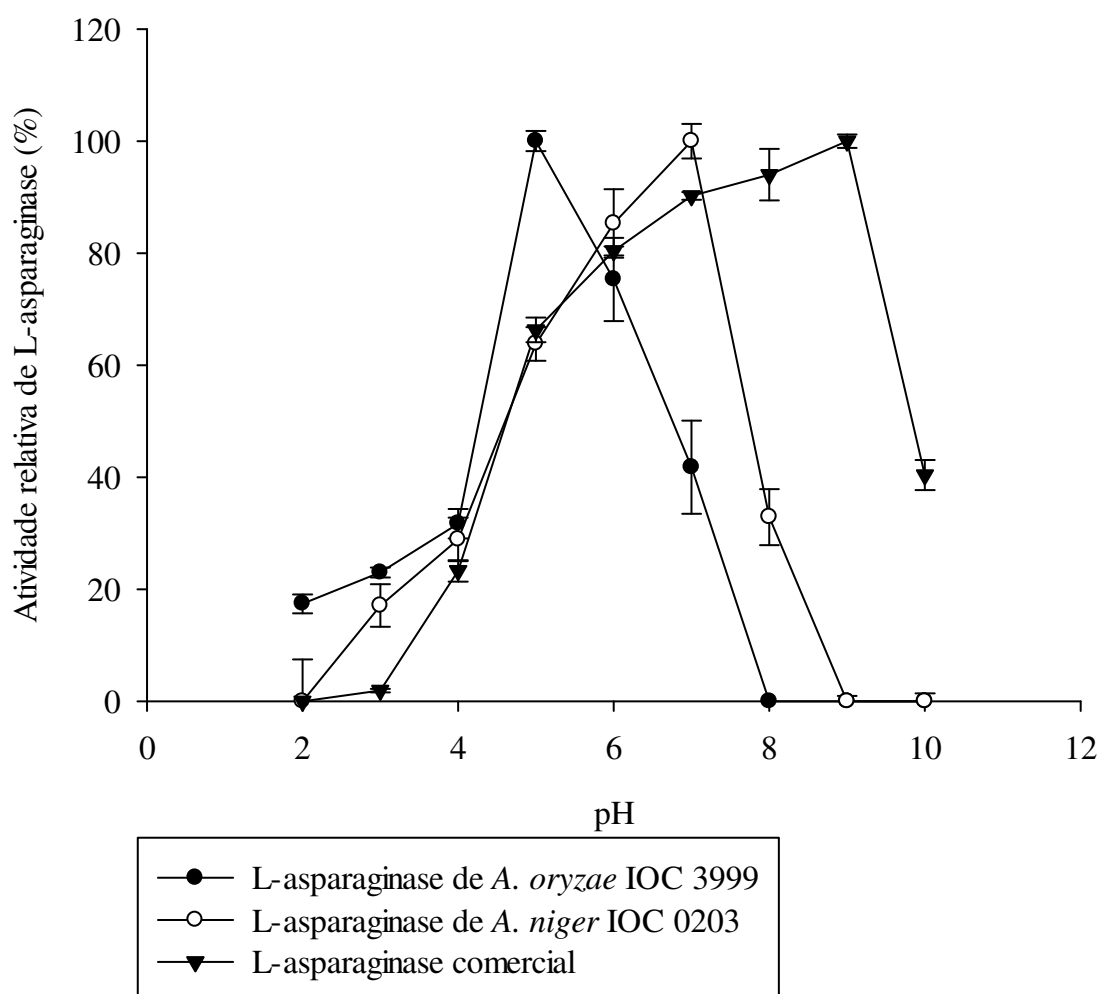


A temperatura ótima de 50 - 60 °C também foi relatada para L-asparaginases de várias espécies de *Aspergillus* (AHMED et al., 2015; DIAS et al., 2016; DUTTA et al., 2015).

5.7.2. pH ótimo de atividade das L-asparaginases purificadas de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203

O efeito do pH na atividade das enzimas purificadas de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203, assim como para a enzima comercial, foi avaliado como descrito no item 4.9.4.2. As L-asparaginases purificadas de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203 apresentaram atividade ótima em pH 5,0 e 7,0, respectivamente, enquanto que a L-asparaginase comercial mostrou atividade ótima em pH 9,0 (Figura 20).

Figura 20 – Efeito do pH na atividade das L-asparaginases purificadas de *A. oryzae* IOC 3999, *A. niger* IOC 0203 e da preparação comercial.



As L-asparaginases fúngicas apresentam atividade ótima na faixa de pH 6 a 9,5 (AHMED et al., 2015; DANGE; PESHWE, 2011; DUTTA et al., 2015).

A L-asparaginase de *A. oryzae* IOC 3999 apresentou atividade relativa igual a 41,8% em pH 7 e não mostrou atividade em pH 8,0 enquanto que a L-asparaginase de *A. niger* IOC 0203 mostrou atividade relativa igual a 32,9% em pH 8 e não apresentou atividade em pH 9,0. A L-asparaginase comercial apresentou atividade relativa igual a 40,4% em pH 10,0. Em pH mais ácidos (pH 3,0 e pH 4,0), tanto as enzimas purificadas quanto a enzima comercial apresentaram atividade enzimática relativa na faixa de 23 a 31,7%.

Mohan Kumar e Manonmani, (2013) relataram que a L-asparaginase de *Cladosporium* sp. mostrou-se ativa em pH entre 4-6 com o ótimo de 6,3, e em pH elevados, a atividade decrescia. Em outro estudo, Vala et al., (2018) observaram que a L-asparaginase purificada de *Aspergillus niger* AKV-MKBU mostrou-se ativa na faixa de pH entre 4 a 10, com atividade máxima em pH 7.

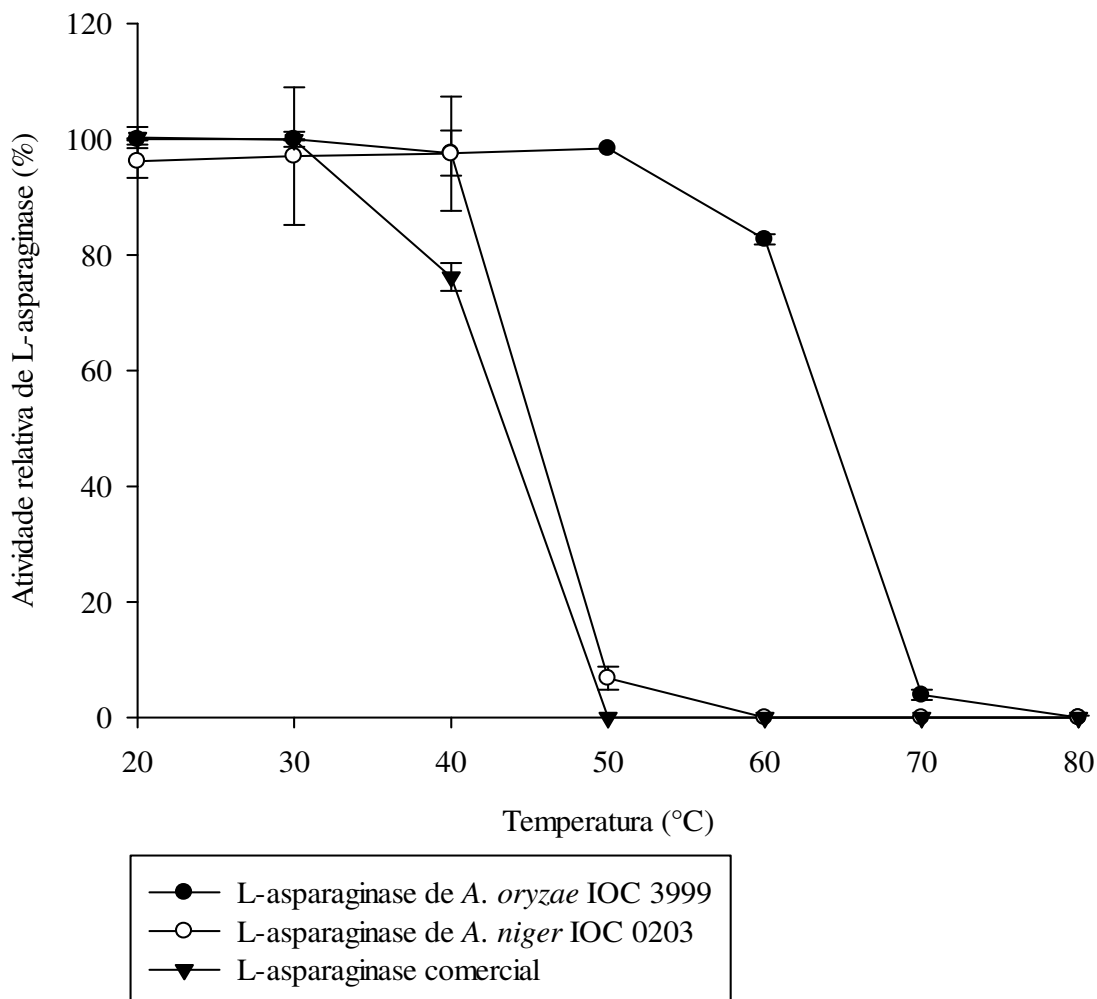
A L-asparaginase deve atender alguns dos pré-requisitos para o tratamento de leucemia linfoblástica aguda, como apresentar atividade enzimática máxima em pH fisiológico (BADOEI-DALFARD, 2015). Dentre as L-asparaginases purificadas, a L-asparaginase de *A. niger* IOC 0203 pode ser uma alternativa promissora para fins farmacológicos, por apresentar pH ótimo de atividade em pH neutro.

Em relação à L-asparaginase purificada de *A. oryzae* IOC 3999, esta enzima pode ser mais adequada para redução de acrilamida em alimentos, por apresentar atividade enzimática em pH ácido na faixa de 5 a 6.

5.7.3. Temperatura de estabilidade das L-asparaginases purificadas de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203

A temperatura de estabilidade foi determinada incubando-se as enzimas no pH ótimo da L-asparaginase purificada de *A. oryzae* (pH 5), L-asparaginase purificada de *A. niger* (pH 7) e da enzima comercial (pH 9), em diferentes temperaturas por 1h como descrito no item 4.9.4.3. A estabilidade térmica das três L-asparaginases estudadas é mostrada na Figura 21.

Figura 21 – Efeito da temperatura na estabilidade das L-asparaginases purificadas de *A. oryzae* IOC 3999, *A. niger* IOC 0203 e da preparação comercial.



A L-asparaginase de *A. oryzae* IOC 3999 mostrou-se estável a 50 °C por 1h no pH ótimo da enzima (pH 5,0), reteve 82,7% da atividade inicial após 1h a 60 °C e foi inativada após 1h a 70 °C mantendo somente 3,9% da atividade inicial.

A L-asparaginase de *A. niger* IOC 0203 mostrou-se estável a 40 °C retendo 97,5% de atividade residual após 1h no pH ótimo da enzima (pH 7,0), sendo que reteve 6,8% de atividade residual após 1h a 50 °C.

A L-asparaginase comercial apresentou-se estável após 1h a 30 °C no pH ótimo de atividade (pH 9,0). A enzima reteve-se 76,2% de atividade residual após 1h a 40 °C, sendo inativada em temperaturas superiores.

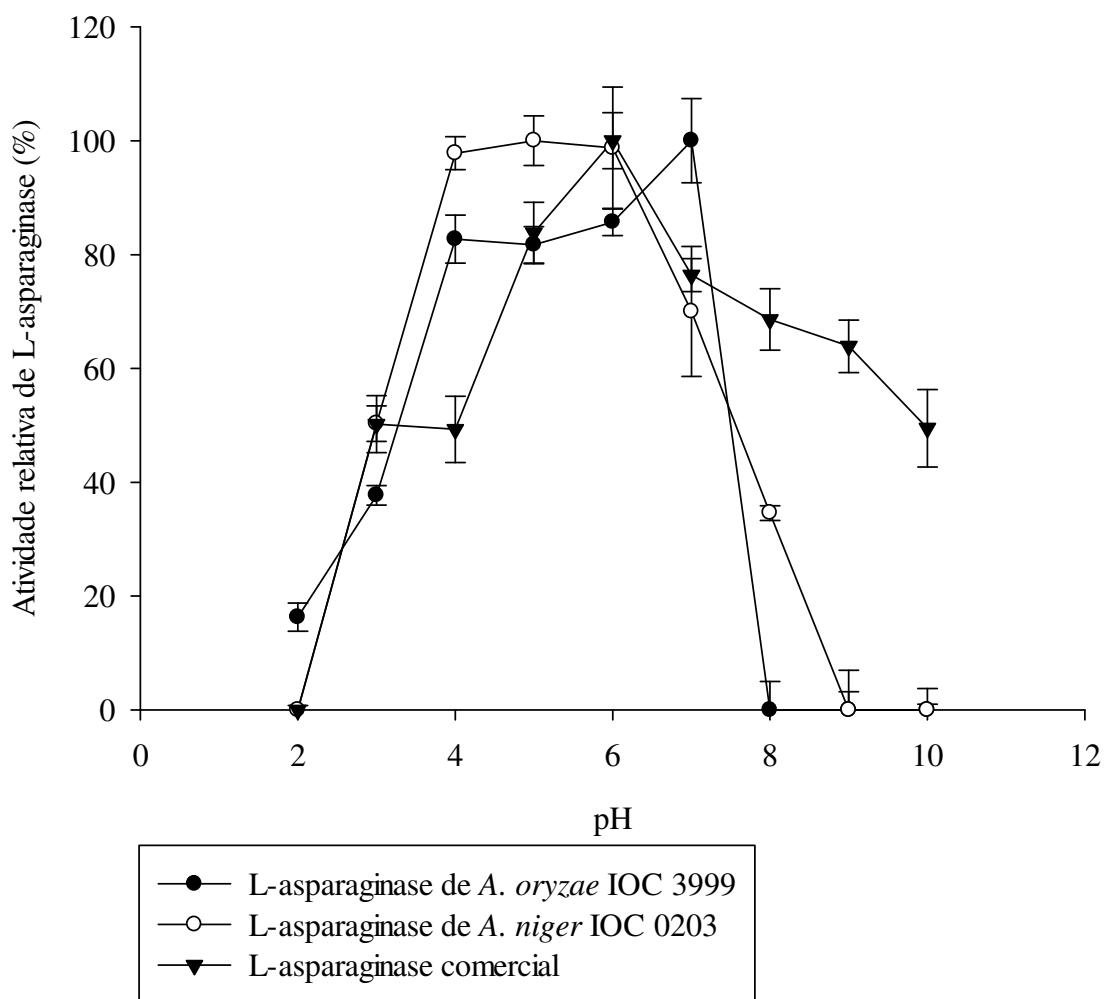
Dutta et al., (2015) verificaram que a L-asparaginase purificada de *A. fumigatus* WL 002 apresentaram 98,8% de atividade residual após 1 h de incubação a 50 °C em pH 9. A

L-asparaginase de *Rhizomucor miehei* estudada por Huang et al., (2014) manteve-se estável após incubação a 45 °C em pH 7 por 30 minutos.

5.7.4. pH de estabilidade das L-asparaginases purificadas de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203

Para a determinação do pH de estabilidade, as L-asparaginases purificadas e a L-asparaginase comercial foram incubadas durante 1h a 10 °C em pH 2 -10 como descrito no item 4.9.4.4. A Figura 22 mostra o perfil do pH de estabilidade das enzimas estudadas.

Figura 22 – Efeito do pH na estabilidade das L-asparaginases purificadas de *A. oryzae* IOC 3999, *A. niger* IOC 0203 e L-asparaginase comercial.



A L-asparaginase purificada de *A. oryzae* IOC 3999 apresentou maior estabilidade em pH 7,0 após 1h de incubação a 10 °C. A enzima reteve cerca de 81,7 a 85,7% de atividade residual na faixa de pH 4 a 6 e foi inativada em pH 8,0.

A L-asparaginase purificada de *A. niger* IOC 0203 apresentou maior estabilidade na faixa de pH 4 a 6 após 1h a 10 °C. A enzima reteve 70% e 34,6% da atividade residual em pH 7 e 8, respectivamente, e foi inativada em pH 2 e pH 9.

A L-asparaginase comercial apresentou maior estabilidade em pH 6,0 após 1h a 10 °C. A enzima reteve 83,8% e 49,3% de atividade residual em pH 5 e 4, respectivamente. A L-asparaginase comercial mostrou-se estável em pH alcalino retendo 68,6%, 63,9% e 49,5% em pH 8, 9 e 10, respectivamente.

Thakur et al., (2014) verificaram que a L-asparaginase de *Mucor hiemalis* apresentou maior estabilidade em pH 7 por 4h a 30 °C. A L-asparaginase de *A. fumigatus* WL 002 apresentou maior estabilidade na faixa de pH 8-9 após 1h à temperatura ambiente (DUTTA et al., 2015).

5.7.5. Determinação dos parâmetros cinéticos das L-asparaginases purificadas de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203

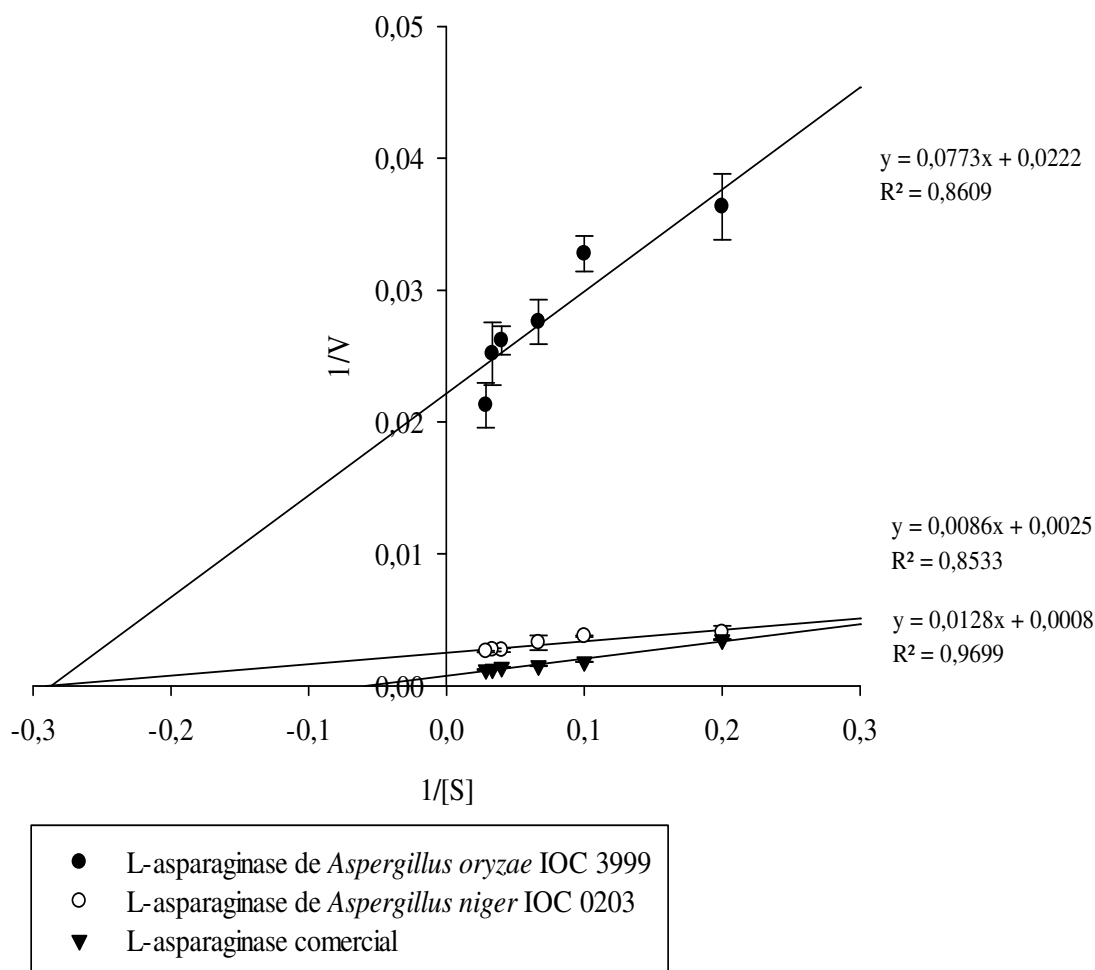
A constante de Michaelis Menten (K_m) e velocidade máxima (V_{max}) das L-asparaginases de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203 purificadas e da L-asparaginase comercial foram determinadas como descrito no item 4.9.4.5.

Foram também determinados o valor de K_{cat} e a constante de especificidade enzimática (K_{cat}/K_m). O K_{cat} ou número de renovação (*turnover number*) é o número máximo de moles de substrato que podem ser convertidos em produto por Mol de enzima em uma unidade de tempo (WILSON; WALKER, 2010). A relação K_{cat}/K_m tem sido amplamente utilizada como medida do desempenho enzimático (CARRILLO et al., 2010). É uma medida que avalia o quanto uma enzima é eficiente para a conversão do substrato, em baixa concentração, em determinado produto (WILSON; WALKER, 2010).

O K_m , V_{max} , o K_{cat} e a constante de especificidade da L-asparaginase purificada de *A. oryzae* IOC 3999 foram estimados em 3,28 mMol/L, 45,04 U/mL, 0,93/s, 0,28 mMol/L.s, respectivamente. Para a L-asparaginase de *A. niger* IOC 0203, o K_m , V_{max} , o K_{cat} e a constante de especificidade foram 3,44 mMol/L, 400 U/mL, 1,01/s, 0,29 mMol/L.s, respectivamente. Já para a enzima comercial, o K_m foi de 16 mMol/L, o V_{max} foi de 1250 U/mL, o K_{cat} foi de 1,48/s e a constante de especificidade foi estimada em 0,09 mMol/L.s.

L-asparaginases de diferentes micro-organismos diferem entre si em sua afinidade com a L-asparagina (BHAGAT et al., 2016). As enzimas purificadas apresentaram baixo K_m comparado com a enzima comercial, indicando uma alta afinidade pela L-asparagina. A Figura 23 apresenta o gráfico de Lineweaver-Burk para a determinação K_m e V_{max} das L-asparaginases de *A. oryzae* IOC 3999, *A. niger* IOC 0203 e da preparação comercial, para o substrato L-asparagina.

Figura 23 – Gráfico de Lineweaver-Burk para a determinação de K_m e V_{max} das L-asparaginases purificadas de *A. oryzae* IOC 3999, *A. niger* IOC 0203 e L-asparaginase comercial.



Thakur et al., (2014) obtiveram como K_m e V_{max} da L-asparaginase purificada de *Mucor hiemalis* valores de 4,3 mMol/ L e 625 U/mL, respectivamente. Os valores de K_m e o V_{max} da L-asparaginase purificada de *Pseudomonas oryzihabitans* foram estimados em 10

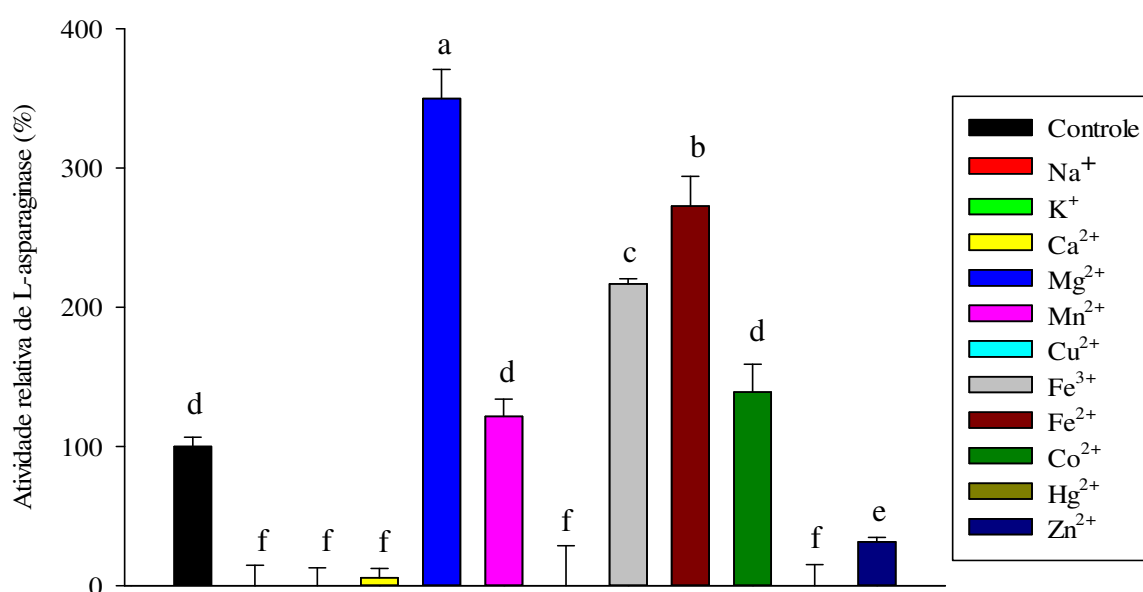
mMol/L e $0,92 \times 10^{-2}$ Mol/mg de proteína, respectivamente. Além disso, o K_{cat} e a eficiência catalítica (K_{cat}/K_m) para a L-asparaginase foram determinados em 76,7/s e 7,6 mMol/L.s, respectivamente (BHAGAT et al., 2016).

5.7.6. Efeito de íons metálicos na atividade das L-asparaginases purificadas de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203

Os íons metálicos influenciam diretamente nas funções biológicas das enzimas (BADOEI-DALFARD, 2015). Por isso, torna-se importante estudar o efeito dos íons sobre a atividade de L-asparaginase, principalmente durante o uso terapêutico, devido à presença de íons na corrente sanguínea, e também no processamento de alimentos, por causa da complexidade da matriz alimentícia (KRISHNAPURA; BELUR, 2016).

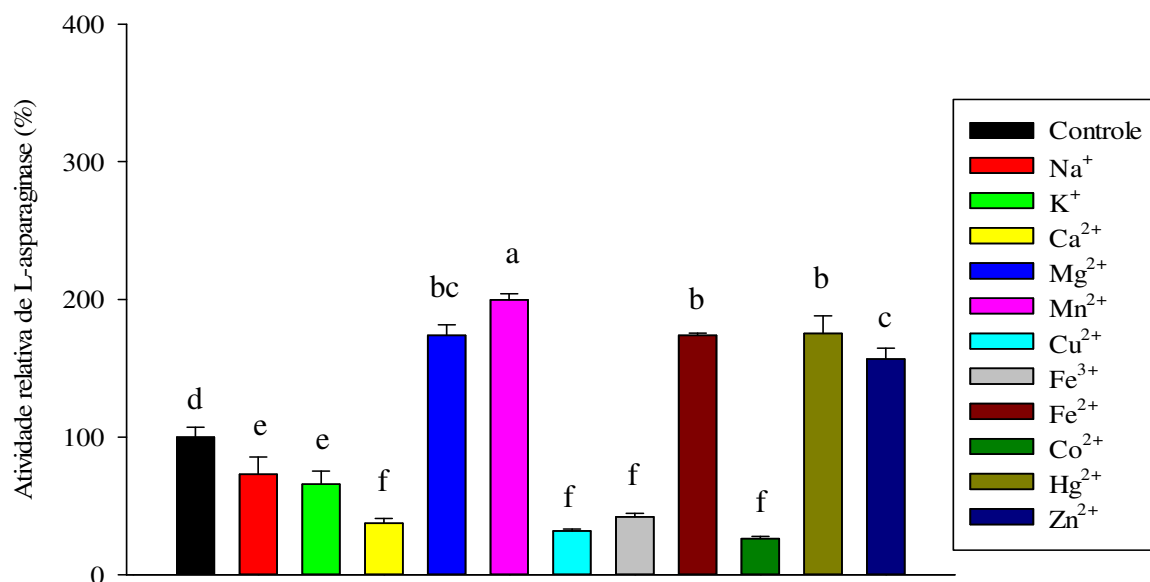
A fim de estimar os efeitos de vários íons metálicos na atividade das L-asparaginases purificadas e da L-asparaginase comercial, o ensaio enzimático foi realizado conforme o item 4.9.4.6. As Figuras 24, 25 e 26 ilustram respectivamente os efeitos dos íons metálicos, na concentração final de 1 mMol/L, na atividade da L-asparaginase de *A. oryzae* IOC 3999, *A. niger* IOC 0203 e da preparação comercial.

Figura 24 – Efeito de íons metálicos na atividade da L-asparaginase purificada de *A. oryzae* IOC 3999.



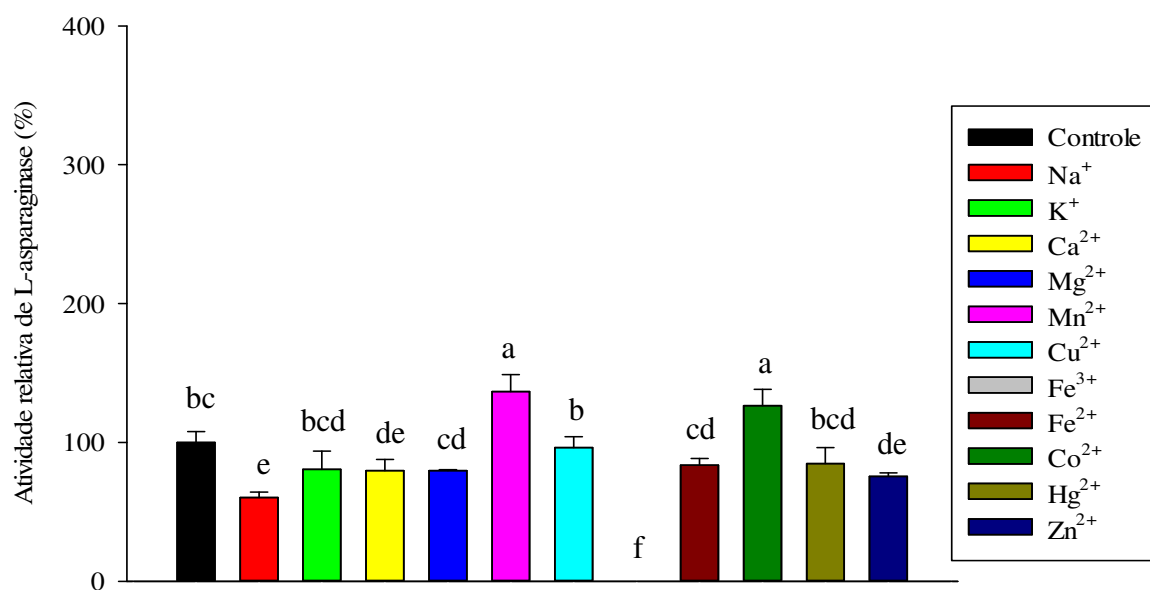
Valores com letras diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Figura 25 – Efeito de íons metálicos na atividade da L-asparaginase purificada de *A. niger* IOC 0203.



Valores com letras diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Figura 26 – Efeito de íons metálicos na atividade da L-asparaginase comercial.



Valores com letras diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

O íon Mn^{2+} , na concentração final de 1 mMol/L, ativou as três L-asparaginases obtidas de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203 e enzima comercial, aumentando a atividade cerca de 20%, 100% e 40%, respectivamente. Thakur et al., (2014) observaram que o íon Mn^{2+} (2 mMol/L) ativou 100% a L-asparaginase purificada de *Mucor hiemalis* e Huang et al., (2014) também relataram que o íon Mn^{2+} na concentração 2 mMol/L aumentou 183% a atividade de L-asparaginase purificada de *Rhizomucor miehei*.

O íon Fe^{3+} , na concentração final de 1 mMol/L, ativou 120% a L-asparaginase de *A. oryzae* IOC 3999, mas inibiu 60% e 100% as L-asparaginases de *A. niger* IOC 0203 e da preparação comercial, respectivamente. Enquanto que o íon Fe^{2+} , na concentração final de 1 mMol/L, ativou 160% e 75% as L-asparaginases de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203, respectivamente, mas inibiu 15% a L-asparaginase comercial. Já, o íon Co^{2+} , na concentração final de 1 mMol/L, ativou 40% e 30% as L-asparaginases de *A. oryzae* IOC 3999 e preparação comercial, respectivamente, mas inibiu 70% a L-asparaginase de *A. niger* IOC 0203.

Dange e Peshwe (2011) relataram que os íons Fe^{2+} e Co^{+} na concentração 5 mMol/L aumentaram em aproximadamente 50% e 100%, respectivamente, a atividade de L-asparaginase purificada de *Aspergillus aculeatus* purificada. Os autores também observaram que o íon Mn^{+} (5 mMol/L) não alterou a atividade enzimática, resultado similar foi observado para a L-asparaginase de *A. oryzae* IOC 3999.

Os íons Hg^{2+} e Zn^{2+} , na concentração final de 1 mMol/L, ativaram 160% e 60% a L-asparaginase de *A. niger* IOC 0203. No entanto, o íon Hg^{2+} (1 mMol/L) inibiu 100% e 17% a L-asparaginase de *A. oryzae* IOC 3999 e da preparação comercial, respectivamente, enquanto que o íon Zn^{2+} (1 mMol/L) inibiu 60% e 25% as L-asparaginases de *A. oryzae* IOC 3999 e da preparação comercial. De acordo com Mohan Kumar e Manonmani (2013) e Badoei-Dalfard (2015) a inibição da atividade de L-asparaginase na presença dos íons Hg^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} pode ser indicativo da presença de grupos sulfidril na molécula enzimática.

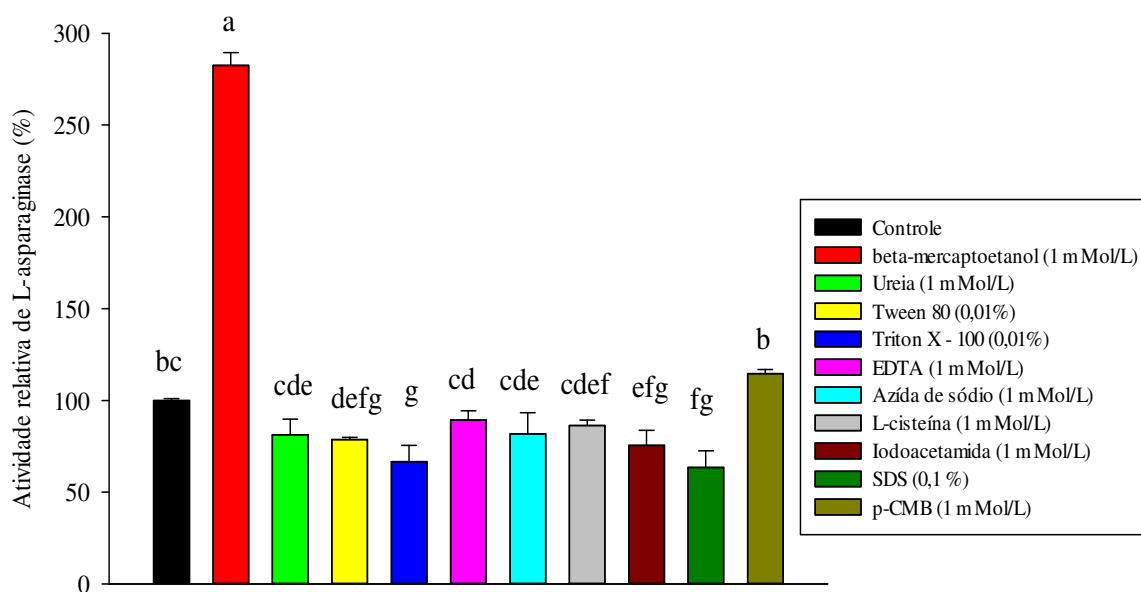
Os íons Na^{+} , K^{+} e Ca^{2+} , na concentração final de 1 mMol/L, inibiram as três L-asparaginases estudadas. Os íons Na^{+} , K^{+} inibiram completamente a L-asparaginase de *A. oryzae* IOC 3999 enquanto que o íon Ca^{2+} inibiu 98% a enzima. Os íons Na^{+} , K^{+} e Ca^{2+} inibiram 25%, 30% e 40% a L-asparaginase de *A. niger* IOC 0203, respectivamente. Enquanto que os íons Na^{+} , K^{+} e Ca^{2+} inibiram 40%, 20% e 21% a L-asparaginase comercial.

Geralmente, as preparações clínicas de L-asparaginase envolvem a diluição com NaCl ou KCl para administrações intravenosas e também o sangue humano apresenta uma concentração de NaCl de 0,9% (m/v) (KRISHNAPURA; BELUR, 2016).

5.7.7. Efeito de inibidores e ativadores na atividade das L-asparaginases purificadas de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203

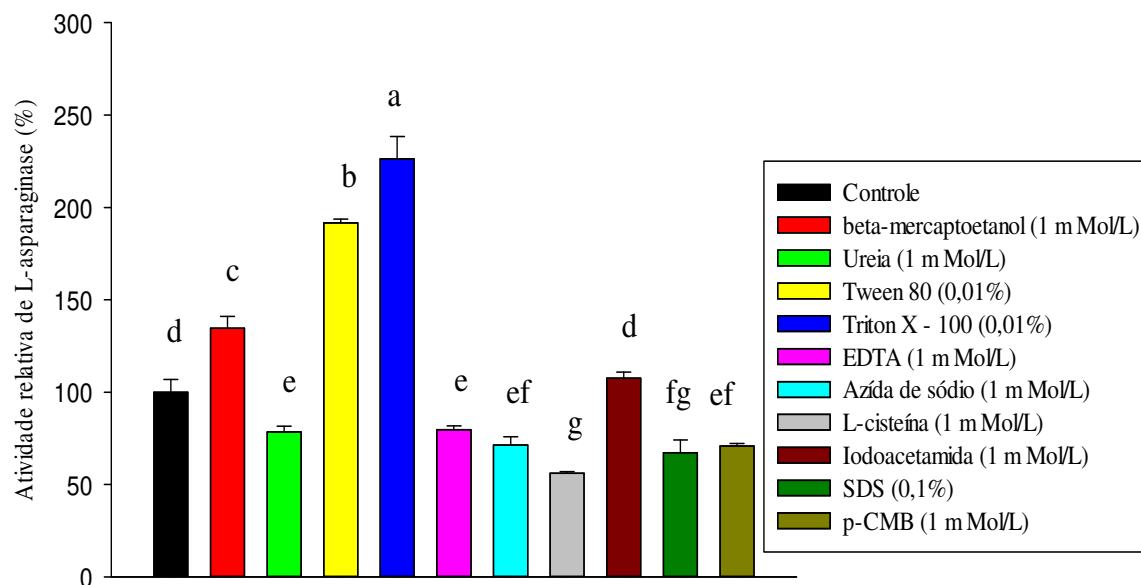
Os estudos de inibição e ativação fornecem uma compreensão dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima, responsáveis pela atividade de L-asparaginase (LINCOLN et al., 2015). Os efeitos de ativadores e inibidores na atividade das L-asparaginases purificadas e da preparação comercial foi realizado como descrito no item 4.9.4.7. As Figuras 27, 28 e 29 ilustram os efeitos dos inibidores e ativadores na atividade de L-asparaginase de *A. oryzae* IOC 3999, *A. niger* IOC 0203 e da L-asparaginase comercial, respectivamente.

Figura 27 – Efeito de inibidores e ativadores na atividade da L-asparaginase purificada de *A. oryzae* IOC 3999.



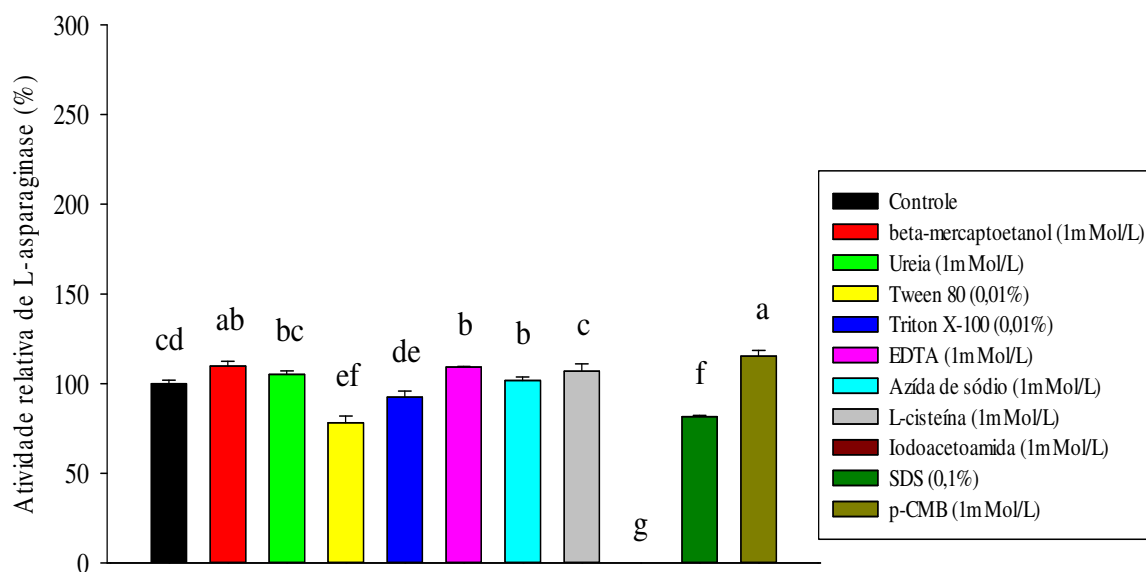
Valores com letras diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Figura 28 – Efeito de inibidores e ativadores na atividade da L-asparaginase purificada de *A. niger* IOC 0203.



Valores com letras diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Figura 29 – Efeito de inibidores e ativadores na atividade da L-asparaginase comercial.



Valores com letras diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

O β -mercaptoetanol, na concentração final de 1 mMol/L, aumentou cerca de 185,8%, 38,2% e 12,3% a atividade da L-asparaginases de *A. oryzae* IOC 3999, *A. niger* IOC 0203 e da preparação comercial, respectivamente. O β -mercaptoetanol, em baixas concentrações atua como protetor de grupos sulfidrilas de enzimas. No entanto, em altas concentrações, pode ocasionar a perda da atividade enzimática (KRISHNAPURA; BELUR, 2016). Manna et al., (1995) observaram que 2-mercaptoetanol na concentração 0,5 mMol/L aumentou 10% a atividade da L-asparaginase purificada de *Pseudomonas stutzeri* MB-45.

O EDTA na concentração 1 mMol/L inibiu cerca de 7,85% e 20,4% as L-asparaginases purificadas de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203 respectivamente, no entanto aumentou cerca de 10,4% a atividade de L-asparaginase comercial. A L-asparaginase de *Trichoderma viride* SF Grey foi fortemente inibida por EDTA na concentração 5 mMol/L e ativada por Mg^{2+} e Na^{+} (LINCOLN et al., 2015). Bhagat et al., (2016) observaram que a L-asparaginase purificada de *Pseudomonas oryzihabitans* foi fortemente inibida na presença de EDTA na concentração 10 mMol/L e verificaram que a presença de íons Fe^{3+} e Na^{+} , são essenciais para a atividade catalítica.

A ureia na concentração 1 mMol/L inibiu 14,4% e 23,1% respectivamente as L-asparaginases purificadas de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203, no entanto aumentou cerca de 10,4% a atividade de L-asparaginase comercial. A perda da atividade enzimática devido à ureia pode ser devido a alteração da conformação das enzimas devido ao rompimento das ligações intramoleculares de hidrogênio (RAJAGOPALAN et al., 1961).

O 4-p-cloromercuribenzoato, na concentração final de 1 mMol/L, aumentou respectivamente cerca de 14,6% e 18,2% a atividade das L-asparaginases de *A. oryzae* IOC 3999 e da preparação comercial, porém, a L-asparaginase de *A. niger* IOC 0203 inibiu cerca de 30,8%. A iodoacetamida, na concentração de 1 mMol/L, inibiu completamente a L-asparaginase comercial, no entanto inibiu 28,8% a L-asparaginase de *A. oryzae* IOC 3999 e apresentou pequeno efeito na L-asparaginase de *A. niger* IOC 0203 aumentando cerca de 5,7% a atividade da enzima.

O p-cloromercuribenzoato e a iodoacetamida são inibidores de enzimas contendo grupos sulfidrilas no sítio ativo. Manna et al., (1995) verificaram que a L-asparaginase de *Pseudomonas stutzeri* não apresenta grupamentos sulfidrilas em seu centro catalítico. Krishnapura e Belur (2016) testaram o efeito de três bloqueadores de grupos sulfidrilas na atividade de L-asparaginase de *Talaromyces pinophilus*, e verificaram que somente o p-hidroximercuribenzoato (p-HMB) na concentração 0,5 mMol/L causou a máxima redução na atividade enzimática.

A L-cisteína, na concentração final de 1 mMol/L, inibiu 15,6% e 43,8% a atividade das L-asparaginase de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203, respectivamente e ativou 8% a L-asparaginase comercial. Mohan Kumar e Manonmani, (2013) relataram que a L-asparaginase de *Cladosporium* sp foi inibida por cinco inibidores não competitivos: N-acetil-cisteína, glutadiona reduzida, β -mercaptoetanol, L-cisteína e SDS, indicando a presença de grupos sulfidríla na enzima. Os grupos sulfidríla ou tiol desempenham um papel importante na preservação da estrutura da enzima, de regulação catalítica e de transporte de elétrons (ICIEK et al., 2004).

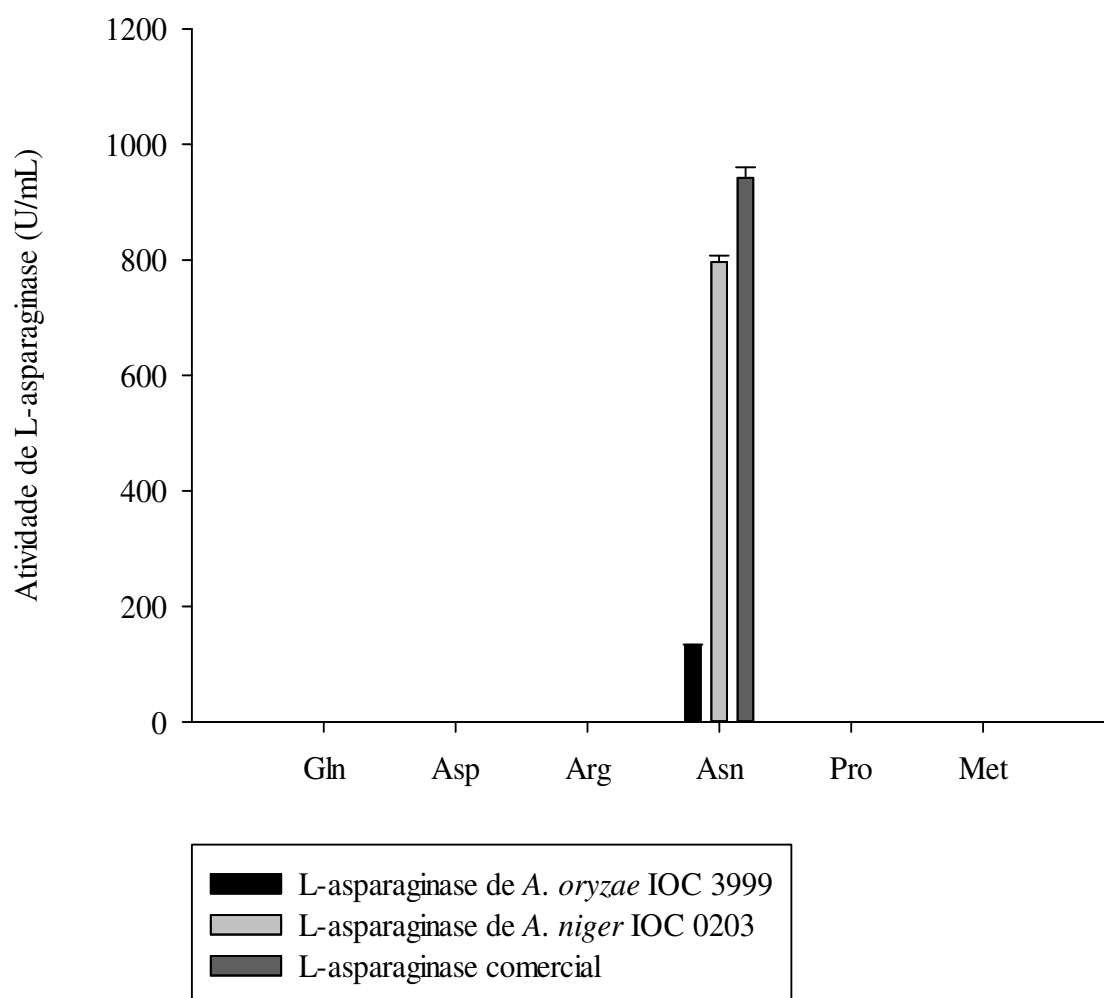
O surfactante aniônico SDS, na concentração de 0,1%, inibiu 32,3%, 38% e 17,5% as L-asparaginases de *Aspergillus oryzae* IOC 3999, *Aspergillus niger* IOC 0203 e da preparação comercial, respectivamente. Thakur et al., (2014) avaliaram o efeito de ativadores e inibidores na atividade de L-asparaginase purificada de *Mucor hiemalis* e uma perda de atividade de 75% foi observada na atividade enzimática na presença de SDS na concentração de 2 mMol/L.

Os surfactantes Triton X-100 e Tween 80, na concentração de 0,01%, ativaram 133% e 91,6% a L-asparaginase de *A. niger* IOC 0203, no entanto inativaram 6,6% e 11,3% a L-asparaginase comercial e cerca de 33,5% e 21,5% a L-asparaginase de *A. oryzae* IOC 3999, respectivamente. Os surfactantes promovem um contato direto e rápido do centro ativo da enzima com o substrato (EL-NAGGAR et al., 2018). Vala et al., (2018) também observaram que a L-asparaginase purificada de *A. niger* AKV-MKBU foi ativada cerca de 20% e 2% na presença de 1% de Triton X-100 e 1% de Tween 80, respectivamente.

5.7.8. Estudo da atividade da L-asparaginase em diferentes aminoácidos

A atividade das L-asparaginases purificadas e da L-asparaginase comercial em diferentes aminoácidos a 0,01 Mol/L foi testada como descrito no item 4.9.4.8. A atividade das L-asparaginases purificadas e da L-asparaginase comercial em relação a vários aminoácidos a 0,01 Mol/L são apresentados na Figura 30.

Figura 30 – Estudo da atividade das L-asparaginases purificadas de *A. oryzae* IOC 3999, *A. niger* IOC 0203 e preparação comercial em diferentes aminoácidos.



As L-asparaginases de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203 e da preparação comercial apresentaram atividade sobre o aminoácido L-asparagina e não mostraram atividade sobre L- glutamina, L- ácido aspártico, L-arginina, L- prolina e L- metionina.

As características alta afinidade por L-asparagina e ausência de atividade sobre L- glutamina conferem uso potencial das L-asparaginases purificadas tanto para fins alimentícios quanto para usos clínicos (SINGH et al., 2013). Este resultado corrobora com estudos anteriores, onde L-asparaginases fúngicas exibiram maior afinidade por L-asparagina do que outros substratos (LINCOLN et al., 2015; PATRO; GUPTA, 2012).

Duval et al., (2002) relataram que a atividade de L-glutaminase é intrínseca à algumas L-asparaginases, e pode dificultar o tratamento de alguns tipos de câncer, devido

algumas disfunções que o paciente possa apresentar, como: pancreatite, convulsões neurológicas, anormalidades de coagulação que podem levar a hemorragia ou trombose intracraniana.

5.8. Aplicação da L-asparaginase para redução dos teores de acrilamida em café

O grão de café beneficiado, ou seja, sem ter passado pelo processo de torra, apresenta uma estrutura pouco porosa e cerca de 7% do volume dos poros do café beneficiado possui um diâmetro de aproximadamente 10 nm ou mais. Entretanto, o diâmetro de muitas enzimas é cerca de 5 a 10 nm, desta forma, apenas uma parte do grão é acessível à ação enzimática (KORNBRUST et al., 2010). Assim, os grãos de café arábica variedade Catuaí amarelo cereja descascado foram submetidos ao pré-tratamento térmico sob vapor a 100 °C por 35 minutos até os grãos apresentarem cerca de 25% de umidade (Anexo 13).

Existem vários tipos de pré-tratamentos que podem ser aplicados em grãos de café: secagem, hidratação, enxaguamento com ou sem ação mecânica, pressurização, vaporização, branqueamento, processamento sob pressão reduzida (vácuo), redução do tamanho do grão ou aplicação de diversos tipos de celulasas (DRIA et al., 2007). Esses autores relataram que a hidratação dos grãos de café entre 25 a 40% de umidade, antes da aplicação da enzima, pode facilitar o contato da L-asparaginase com a L-asparagina, por meio da formação de caminhos internos ocasionados pelo inchamento do grão.

Anese, (2016) relatou que além da estrutura rígida do grão de café dificultar a difusão da enzima internamente, outro fator que também pode prejudicar o tratamento enzimático é devido principalmente à grande quantidade de lipídeos presentes que podem formar zonas hidrofóbicas, limitando a ação enzimática. A autora sugere que estas barreiras citadas podem ocasionar a hidrólise incompleta do conteúdo de L-asparagina e uma redução parcial da formação de acrilamida.

Hendriksen et al., (2013) também aplicaram um pré-tratamento aos grãos de café beneficiados, submetendo-os ao cozimento sob vapor por 45 °C por 100 minutos. Os autores, porém, não informaram o teor de umidade final alcançado nos grãos de café após esta fase. Em relação ao presente trabalho, o tempo em que o grão ficou exposto ao vapor foi diminuído em 10 minutos. Este pré-tratamento dos grãos de café beneficiado se assemelha à primeira etapa do processo de descafeinação de café e, com modestas alterações no processo, pode ser implementado o uso da L-asparaginase (HENDRIKSEN et al., 2013). Métodos de pulverização, imersão ou aspersão podem ser utilizados para aplicar a solução enzimática (DRIA et al., 2007).

Após os grãos de café terem atingido a umidade de 25%, as L-asparaginases purificadas de *A. oryzae* IOC 3999, *A. niger* IOC 0203 e a L-asparaginase comercial foram aplicadas, submergindo os grãos em cada preparação enzimática, conforme o item 4.10.2. As condições de pH e temperatura foram mantidas iguais para as três enzimas avaliadas, pois apresentam atividade catalítica nestas condições. O mesmo foi estipulado em relação ao tempo, para permitir que as enzimas atuem por um período suficiente para resultar em grãos de café com nível de L-asparagina reduzido. Em geral, quanto maior o tempo em que é permitido a enzima reagir, maior o nível de redução de L-asparagina e maior será a redução de acrilamida (DRIA et al., 2007).

Após o tratamento com as L-asparaginases, os grãos de café foram submetidos à secagem em estufa com circulação de ar, a uma temperatura de 40 °C, para atingirem novamente cerca de 10 a 11% de umidade. Segundo o Illy e Viani (2005) a temperatura de secagem não pode ultrapassar a faixa de 40-45 °C para evitar a formação de compostos de odor desagradáveis, e esta etapa é de importância crítica para a segurança e qualidade do café. Após a secagem, os grãos de café devem apresentar teores finais de umidade em torno de 12%.

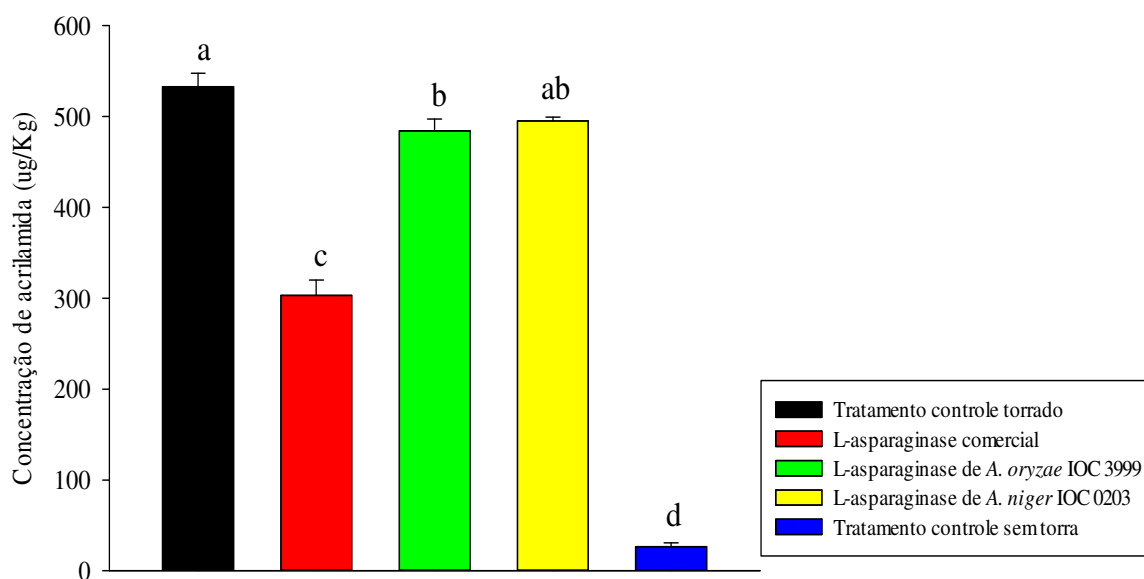
Após 12h a 40 ± 5 °C as amostras de grãos de café atingiram o valor de 10,5% de umidade, conforme anexo 14. Um processo de secagem ideal precisa garantir a uniformidade da umidade nos grãos e economia da operação, assim, o procedimento de secagem dos grãos verdes não deve ser muito rápido, podendo variar entre 24 a 36h (Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura do Café, 2004).

Posteriormente, os grãos de café beneficiados foram torrados em torrador convectivo para obtenção de um grau de torra médio (Anexo 15). A torrefação do café usualmente é realizada em temperaturas superiores a 200 °C, podendo-se obter diferentes graus de torra: clara, média e escura, conforme o tempo em que o grão fica exposto ao calor (ANESE, 2016). Nesta etapa do processamento de café, a enzima é inativada devido às altas temperaturas (DRIA et al., 2007). Em paralelo, a Reação de *Maillard* também ocorre nesta fase, sendo responsável pelas mudanças nas propriedades sensoriais, como também na formação de acrilamida (MESÍAS; MORALES, 2016).

Nos primeiros estágios da torrefação, a concentração de acrilamida aumenta exponencialmente, atingindo um máximo, e depois diminui à medida que a taxa de degradação excede a taxa de formação (KNOL et al., 2005). Assim, cafés com grau de torra clara apresentam concentrações de acrilamida superiores se comparados aos cafés com torra escura (TAEYMANS et al., 2004).

A Figura 31 apresenta a concentração de acrilamida em grãos de café tratados com L-asparaginases.

Figura 31 – Concentração de acrilamida nas amostras de grãos de café tratados com L-asparaginase de *A. oryzae* IOC 3999, *A. niger* IOC 0203 e enzima comercial.



Valores com letras diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

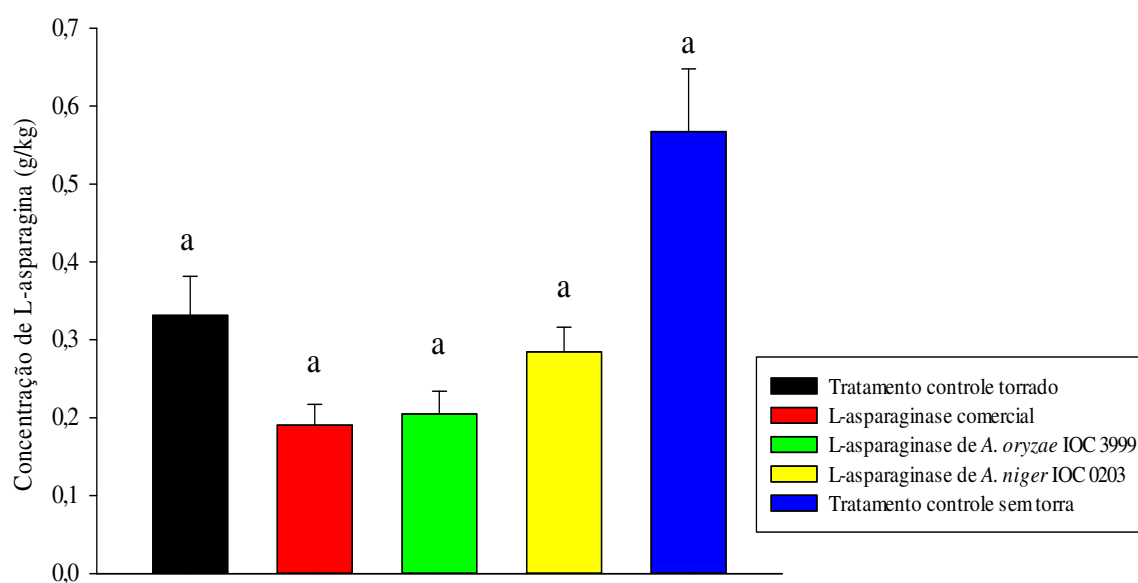
A amostra de grãos de café do tratamento controle sem torra apresentou concentração de acrilamida igual à 26,43 $\mu\text{g/Kg}$, enquanto a amostra de grãos de café do tratamento controle torrado continha 532,50 $\mu\text{g/Kg}$. As amostras de grãos de café tratados com L-asparaginases comercial, de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203, e em seguida torrados apresentaram teor de acrilamida de 303 $\mu\text{g/Kg}$, 484,13 $\mu\text{g/Kg}$ e 495 $\mu\text{g/Kg}$, respectivamente. Pode-se observar que a concentração de acrilamida obtida foi superior, em todos os tratamentos submetidos à torra, ao estabelecido pela Comissão Europeia. No entanto, os teores de acrilamida variam muito, geralmente entre 35 a 540 $\mu\text{g/Kg}$ de café torrado (ALVES et al., 2010).

O tratamento dos grãos de café com L-asparaginase comercial resultou em diminuição de 43,09% de acrilamida, enquanto os tratamentos com as L-asparaginases purificadas de *A. oryzae* e *A. niger* resultaram em redução de 9,08% e 7,03% de acrilamida, respectivamente. Os resultados obtidos se encontram dentro das estimativas da literatura, em torno de 10 a 30%, em relação à diminuição de acrilamida em café com o uso de L-asparaginase (GUENTHER et al., 2007). Entretanto, melhores resultados foram obtidos por Hendriksen et

al., (2013) utilizando a L-asparaginase comercial *Acrylaway*[®] nas concentrações de 0, 2000, 4000 e 6000 ASNU/Kg de café submetidos à torra clara. Os autores conseguiram reduzir a formação de acrilamida em torno de 55 a 74%.

Sabe-se que os açúcares e a L-asparagina presentes no grão de café beneficiado atuam como precursores na reação de *Maillard*, para a formação de acrilamida (MOTTRAM et al., 2002). O conteúdo de L-asparagina presente nos grãos de café beneficiado varia de 0,2 a 1,0 g/Kg de café tanto para as espécies botânicas Arábica e Robusta (GUENTHER et al., 2007). A Figura 32 apresenta o conteúdo de L-asparagina em amostras de grãos de café após os tratamentos com L-asparaginases.

Figura 32 – Concentração de L-asparagina em amostras de grão de café tratados com L-asparaginase de *A. oryzae* IOC 3999, *A. niger* IOC 0203 e enzima comercial.



Valores com letras diferentes são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

A amostra de grãos de café do tratamento controle sem torra apresentou concentração de L-asparagina igual à 0,57 g/Kg, enquanto que a amostra de grãos de café do tratamento controle torrado continha 0,33 g/Kg. As amostras de grãos de café tratadas com L-asparaginases comercial, de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203 apresentaram teor de L-asparagina de 0,19 g/Kg, 0,21 g/Kg e 0,28 g/Kg, respectivamente. Foi verificado que as amostras não apresentaram diferença estatística quanto aos teores de L-asparagina.

Lantz et al., (2006) analisaram a concentração de L-asparagina em café beneficiado e encontraram uma fraca correlação positiva entre este aminoácido com a concentração de acrilamida formada após a torra. O mesmo resultado foi encontrado por Guenther et al., (2007) para a variedade Arábica após o processo de torrefação. Os autores sugeriram que a perda significativa de acrilamida durante a torrefação pode ser a razão pela baixa correlação entre a asparagina e a acrilamida, do que em outros alimentos.

Na literatura, os grãos de café beneficiados apresentam como açúcar predominante a sacarose e, no processo de torração, as altas temperaturas catalisam a degradação deste dissacarídeo em glicose e frutose, que podem então reagir para formar acrilamida (KORNBRUST et al., 2010). No presente estudo, a amostra de grãos de café beneficiados apresentou 76,48 mg/g de sacarose, e os carboidratos glicose e frutose, devido à baixa concentração, não foram detectados por HPLC-Dionex. Em relação aos grãos de café tratados com as enzimas e depois torrados, não foram quantificadas concentrações significativas de sacarose, glicose e frutose nas amostras.

Murkovic e Derler, (2006) determinaram a concentração de açúcares presentes em grãos de café beneficiados da espécie Arábica, e a sacarose foi o carboidrato predominante apresentando a concentração de 73 mg/g de café, enquanto os demais carboidratos (galactose, glicose e frutose) apresentaram concentrações extremamente baixas. Pimenta et al., (2018) relataram que há muita variação no conteúdo de carboidratos em grãos de café e depende da espécie, local de cultivo e estágio de maturação do fruto.

Claeys et al., (2005) analisaram a cinética de formação de acrilamida em um sistema modelo simples (glicose, frutose, sacarose, L-asparagina e temperatura) e observaram que não apenas a natureza dos reagentes, mas também a razão molar, a atividade de água, a matriz alimentar, o equipamento de aquecimento e etc., influenciaram o teor final de acrilamida. Os autores sugeriram que somente por meio da extrapolação da cinética de sistemas modelo em condições *in situ* ou em matrizes alimentares poderá ser compreendido a formação de acrilamida. Knol et al., (2005) observaram que a acrilamida é um intermediário da reação de *Maillard* e não um produto final, estando sujeita à reações de degradação.

Desta forma, como a reação de *Maillard* ainda não foi totalmente elucidada e o modelo de formação acrilamida em café não está totalmente compreendido, este trabalho também não encontrou uma correlação positiva entre L-asparagina e açúcares na formação do composto tóxico acrilamida após a torra do café. Contudo, uma etapa adicional de tratamento com L-asparaginases pode ser introduzida, principalmente, no processamento de café descafeinado, com poucas alterações no processo. No entanto, é necessário investigar maior

concentração de L-asparaginase para obtenção de melhores resultados de redução de acrilamida.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho dentre os oito fungos testados, as linhagens *A. niger* IOC 2016, *A. niger* IOC 0203, *A. oryzae* IOC 3924 e *A. oryzae* IOC 3999 apresentaram teste qualitativo positivo, indicativo de produção da L-asparaginase e, observou-se que somente as linhagens de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203 produziram L-asparaginase por fermentação submersa. A L-asparaginase do extrato bruto de *A. oryzae* IOC 3999 apresentou atividade ótima em pH 6,0 e 50 °C, enquanto que a L-asparaginase do extrato bruto de *A. niger* IOC 0203 apresentou atividade ótima entre em pH 6,0 e na faixa de 40 a 50°C.

A estratégia sequencial de otimização dos parâmetros de fermentação para a produção L-asparaginase de *A. oryzae* IOC 3999 após 48h proporcionou um aumento de 223%, sendo obtido 1443,57 U/mL de atividade enzimática. Enquanto que a estratégia de otimização da produção de L-asparaginase de *A. niger* IOC 0203 após 24h de fermentação, proporcionou um aumento de 815%, sendo obtido 1960,14 U/mL. Para ambos estudos de otimização, foi possível uma diminuição em 24h do processo fermentativo, em relação às condições iniciais.

As L-asparaginases de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203 foram purificadas 2,11 e 2,43 vezes, respectivamente, utilizando ultrafiltração por membrana de 30 kDa e cromatografia em coluna de exclusão molecular Sephadex G100. A L-asparaginase purificada de *A. oryzae* IOC 3999 apresentou atividade ótima a 60 °C e pH 5, estabilidade térmica a 60°C por 1 hora e estabilidade na faixa de pH entre 4 a 7, sendo indicada para fins alimentícios. Entre os íons metálicos testados, Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} e Mn^{2+} , na concentração final de 1 mMol/L, atuaram como ativadores da atividade da L-asparaginase de *A. oryzae* IOC 3999.

A L-asparaginase purificada de *A. niger* IOC 0203 apresentou atividade ótima a 50 °C e pH 7, estabilidade térmica à 40°C por 1 hora e estabilidade na faixa de pH 4 a 7, sendo indicada para estudos futuros para aplicações farmacológicas. Entre os íons metálicos testados, Mn^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} e Zn^{2+} , na concentração de 1 mMol/L, ativaram a L-asparaginase de *A. niger* IOC 0203. Ambas enzimas purificadas apresentaram alta afinidade sobre a L-asparagina.

A aplicação de L-asparaginases purificadas de *A. oryzae* IOC 3999 e *A. niger* IOC 0203 em grãos de café arábica Catuaí resultaram respectivamente em 9,08% e 7,03% de redução de acrilamida após a torra média. Neste trabalho foi observado que não houve correlação positiva entre o teor de L-asparagina e açúcares na formação de acrilamida.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-FATTAH, Y. R.; OLAMA, Z. A. L-asparaginase production by *Pseudomonas aeruginosa* in solid-state culture: Evaluation and optimization of culture conditions using factorial designs. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 115–122, 2002.

ABIC. Indicadores da indústria de café 2018. Disponível em: <<http://abic.com.br/estatisticas/indicadores-da-industria/indicadores-da-industria-de-cafe-2018/>>. Acesso em: 2/11/2019.

ABIC. Consumo mundial de café atinge 165 milhões de sacas no ano cafeeiro 2018-2019. Disponível em: <<http://abic.com.br/consumo-mundial-de-cafe-atinge-165-milhoes-de-sacas-no-ano-cafeeiro-2018-2019/>>. Acesso em: 2/11/2019.

AHMED, M. M. A.; DAHAB, N. A. F.; M, T. T.; SM, F. H. Production, purification and characterization of L-asparaginase from marine endophytic *Aspergillus* sp. ALAA-2000 under submerged and solid state fermentation. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 7, n. 3, p. 165–172, 2015.

ALVES, R. C.; SOARES, C.; CASAL, S.; FERNANDES, J. O.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Acrylamide in espresso coffee: Influence of species, roast degree and brew length. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 929–934, 2010.

ANESE, M. Acrylamide in coffee and coffee substitutes. **Acrylamide in Food**. p.181–195, 2016.

ANESE, M.; QUARTA, B.; PELOUX, L.; CALLIGARIS, S. Effect of formulation on the capacity of L-asparaginase to minimize acrylamide formation in short dough biscuits. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 2837–2842, 2011a.

ANESE, M.; QUARTA, B.; FRIAS, J. Modelling the effect of asparaginase in reducing acrylamide formation in biscuits. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 435–440, 2011b.

BADOEI-DALFARD, A. Purification and characterization of L-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* strain SN004: Production optimization by statistical methods. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 388–397, 2015.

BARNES, W. R.; DORN, G. L.; VELA, G. R. Effect of culture conditions on synthesis of L-

asparaginase by *Escherichia coli* A 1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 257–261, 1977.

BARTKIENE, E.; JAKOBSONE, I.; PUGAJEVA, I.; BARTKEVICS, V.; ZADEIKE, D., JUODEIKIENE, G. Reducing of acrylamide formation in wheat biscuits supplemented with flaxseed and lupine. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 275–282, 2016.

BASKAR, G.; SRIHARINI, C.; SRIPRIYA, R.; RENGANATHAN, S. Statistical screening of supplementary nitrogen source for enhanced production of L-asparaginase by *Aspergillus terreus* 1782. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 24, n. 4, p. 467–472, 2010.

BASKAR, G.; RENGANATHAN, S. Optimization of media components and operating conditions for exogenous production of fungal L-asparaginase. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 38, n. 2, p. 270–279, 2011a.

BASKAR, G.; RENGANATHAN, S. Statistical and evolutionary optimization of operating conditions for enhanced production of fungal L-asparaginase. **Chemical Papers**, v. 65, n. 6, p. 798–804, 2011b.

BASKAR, G.; RENGANATHAN, S. Optimization of culture conditions and bench-scale production of L-asparaginase by submerged fermentation of *Aspergillus terreus* MTCC 1782. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 7, p. 923–929, 2012a.

BASKAR, G.; RENGANATHAN, S. Optimization of L-asparaginase production by *Aspergillus terreus* MTCC 1782 using response surface methodology and artificial neural network-linked genetic algorithm. **Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering**, v. 7, p. 212–220, 2012b.

BATOOL, T.; MAKKY, E.; JALAL, M.; YUSOFF, M. A comprehensive review on L-asparaginase and its applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, p. 900–923, 2016.

BECALSKI, A.; LAU, B.P.Y.; LEWIS, D., SEAMAN, S.W.; HAYWARD, S.; SAHAGIAN, M.; RAMESH, M.; LECLERC, Y. Acrylamide in french fries: Influence of free amino acids and sugars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 12, p. 3801–3806, 2004.

BECALSKI, A.; LAU, B. P. Y.; LEWIS, D.; SEAMAN, S. W. Acrylamide in foods:

Occurrence, sources, and modeling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 802–808, 2003.

BHAGAT, J.; KAUR, A.; CHADHA, B. S. Single step purification of asparaginase from endophytic bacteria *Pseudomonas oryzihabitans* exhibiting high potential to reduce acrylamide in processed potato chips. **Food and Bioproducts Processing**, v. 99, p. 222–230, 2016.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, n. 2, p. 93–99, 1987.

CACHUMBA, J.J.M.; ANTUNES, F.A.F.; PERES, G.F.D.; BRUMANO, L.P.; SANTOS, J.C.; SILVA, S. S. Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47S, p. 77–85, 2016.

CAPUANO, E.; FOGLIANO, V. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 4, p. 793–810, 2011.

CARRILLO, N.; CECCARELLI, E. A.; ROVERI, O. A. Usefulness of kinetic enzyme parameters in biotechnological practice. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 27, n. 1, p. 367–382, 2010.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Production and biochemical characterization of protease from *Aspergillus oryzae*: An evaluation of the physical-chemical parameters using agroindustrial wastes as supports. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 20–25, 2014.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 171, p. 501–505, 1947.

CHOHAN, S. M.; RASHID, N. TK1656, a thermostable L-asparaginase from *Thermococcus kodakaraensis*, exhibiting highest ever reported enzyme activity. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, n. 4, p. 438–443, 2013.

CIESAROVÁ, Z.; KUKUROVÁ, K.; BEDNÁRIKOVÁ, A.; MARKOVÁ, L.; BAXA, S. Improvement of cereal product safety by enzymatic way of acrylamide mitigation. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 27, n. special issue, p. S96–S98, 2009.

CLADIÈRE, M.; CAMEL, V. Réaction de Maillard et sécurité des aliments: Focus sur

l'acrylamide. **Environnement, Risques et Sante**, v. 16, n. 1, p. 31–43, 2017.

CLAEYS, W. L.; DE VLEESCHOUWER, K.; HENDRICKX, M. E. Kinetics of acrylamide formation and elimination during heating of an asparagine-sugar model system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 26, p. 9999–10005, 2005.

CLAUS, A.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. Acrylamide in cereal products: A review. **Journal of Cereal Science**, v. 47, n. 2, p. 118–133, 2008.

COMISSÃO EUROPEIA. **Regulamento da Comissão Europeia 2017/2158 de 20 de novembro de 2017 que estabelece medidas de mitigação e níveis de referência para a redução da presença de acrilamida em gêneros alimentícios**. 2017.

CUNHA, M. C.; SANTOS AGUILAR, J. G.; MELO, R. R.; et al. Fungal L-asparaginase: Strategies for production and food applications. **Food Research International**, v. 126, p. 1–10, 2019.

CUNHA, M. C.; SILVA, L. C.; SATO, H. H.; DE CASTRO, R. J. S. Using response surface methodology to improve the L-asparaginase production by *Aspergillus niger* under solid-state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 31–36, 2018.

DANGE, V. U.; PESHWE, S. A. Production, purification and characterization of fungal L-asparaginase. **Bionano Frontier**, v. 4, p. 162–167, 2011.

DIAS, F.F.G.; BOGUSZ, S.; HANTAO, L.; AUGUSTO, F.; SATO, H. H. Acrylamide mitigation in French fries using native L-asparaginase from *Aspergillus oryzae* CCT 3940. **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, p. 222–229, 2017.

DIAS, F.F.G.; CASTRO, R.J.S.; OHARA, A.; NISHIDE, T.G.; BAGAGLI, M.P.; SATO, H. H. Simplex centroid mixture design to improve L-asparaginase production in solid-state fermentation using agroindustrial wastes. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 528–534, 2015.

DIAS, F. F. G.; RUIZ, A. L. T. G.; TORRE, A. DELLA; SATO, H. H. Purification, characterization and antiproliferative activity of L-asparaginase from *Aspergillus oryzae* CCT 3940 with no glutaminase activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 9, p. 785–794, 2016.

DIAS, F. F. G.; SATO, H. H. Sequential optimization strategy for maximum L-asparaginase

production from *Aspergillus oryzae* CCT 3940. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 33–39, 2016.

DORIYA, K.; KUMAR, D. S. Isolation and screening of L-asparaginase free of glutaminase and urease from fungal sp. **3 Biotech**, v. 6, p. 1–10, 2016.

DORIYA, K.; KUMAR, D. S. Optimization of solid substrate mixture and process parameters for the production of L-asparaginase and scale-up using tray bioreactor. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 13, n. 2017, p. 244–250, 2018.

DRIA, G.J.; ZYZAK, D.V.; GUTWEIN, R.W.; VILLAGRAN, F.V.; YOUNG, H.T.; BUNKE, P.R.; LIN, P.Y.T.; HOWIE, J.K.; SCHAFERMEYER, R. G. Method for reduction of acrylamide in roasted coffee beans, roasted coffee beans having reduced levels of acrylamide, and article of commerce. US Patent 7,220,440 B2. , 2007.

DSM. DSM introduces PreventASe® XR to extend use of enzymatic acrylamide-reduction solution to more snacks and baked goods. Disponível em: <<https://www.dsm.com/corporate/media/informationcenter-news/2018/07/2018-07-10-dsm-introduces-preventase-xr-to-extend-use-of-enzymatic-acrylamide-reduction-solution-to-more-snacks-and-baked-goods1.html>>. Acesso em: 24/1/2019.

DUTTA, S.; GHOSH, S.; PRAMANIK, S. L-asparaginase and L-glutaminase from *Aspergillus fumigatus* WL002: Production and some physicochemical properties. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 425–431, 2015.

DYBING, E.; FARMER, P. B.; ANDERSEN, M.; FENNELL, T. R.; LALLJIE, S. P.D.; MÜLLER, D. J.G.; OLIN, S.; PETERSEN, B. J.; SCHLATTER, J.; SCHOLZ, G.; SCIMECA, J. A.; SLIMANI, N.; TÖRNQVIST, M.; TUIJTELAARS, S.; VERGER, P. Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 3, p. 365–410, 2005.

EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **Outcome of the public consultation on the draft Scientific Opinion of the EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) on acrylamide in food**. 2015.

EL-NAGGAR, N. Extracellular production of the oncolytic enzyme, L-asparaginase, by newly isolated *Streptomyces sp. strain* NEAE-95 as potential microbial cell factories: Optimization of culture conditions using response surface methodology. **Current Pharmaceutical**

Biotechnology, v. 16, n. 2, p. 162–178, 2015.

EL-NAGGAR, N. E. A.; DERAZ, S. F.; EL-EWASY, S. M.; SUDDEK, G. M. Purification, characterization and immunogenicity assessment of glutaminase free L-asparaginase from *Streptomyces broollosae* NEAE-115. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 19, n. 1, p. 1–15, 2018.

EL-NAGGAR, N. E. A.; EL-EWASY, S. M.; EL-SHWEIHY, N. M. Microbial L-asparaginase as a potential therapeutic agent for the treatment of acute lymphoblastic leukemia: The pros and cons. **International Journal of Pharmacology**, v. 10, n. 4, p. 182–199, 2014.

EL-NAGGAR, N. E. A.; MOAWAD, H.; EL-SHWEIHY, N. M.; EL-EWASY, S. M. Optimization of culture conditions for production of the anti-leukemic glutaminase free L-asparaginase by newly isolated *Streptomyces olivaceus* NEAE-119 using response surface methodology. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–17, 2015.

ELSHAFEI, A.M.; HASSAN, M.M.; ABOUZEID, M.A.E.; MAHMOUD, D.A.; ELGHONEMY, D. H. Purification, characterization and antitumor activity of L-asparaginase from *Penicillium brevicompactum* NRC 829. **Bristih Microbiology Research Journal**, v. 2, p. 158–174, 2012.

ELSHAFEI, A.; EL-GHONEMY, D. Screening and media optimization for enhancing L-asparaginase production, an anticancer agent, from different filamentous fungi in solid state fermentation. **British Biotechnology Journal**, v. 9, n. 3, p. 1–15, 2015.

FARAG, A. M.; HASSAN, S.W.; BELTAGY, E. A.; EL-SHENAWY, M. A. Optimization of production of anti-tumor L-asparaginase by free and immobilized marine *Aspergillus terreus*. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 41, n. 4, p. 295–302, 2015.

FRIEDMAN, M. Acrylamide: Inhibition of formation in processed food and mitigation of toxicity in cells, animals, and humans. **Food and Function**, v. 6, n. 6, p. 1752–1772, 2015.

GUENTHER, H.; ANKLAM, E.; WENZL, T.; STADLER, R. H. Acrylamide in coffee: Review of progress in analysis, formation and level reduction. **Food Additives and Contaminants**, v. 24(S1), n. SUPPL. 1, p. 60–70, 2007.

GULATI, R.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing micro-organisms. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 23–26, 1997.

HENDRIKSEN, H. V.; KORNBRUST, B. A.; ØSTERGAARD, P. R.; STRINGER, M. A. Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 10, p. 4168–4176, 2009.

HENDRIKSEN, H.V.; BUDOLFSEN, G.; BAUMANN, M. J. Asparaginase for acrylamide mitigation in food. **Aspects of Applied Biology**, v. 116, p. 41–50, 2013.

HILBIG, A.; FREIDANK, N.; KERSTING, M.; WILHELM, M.; WITTSIEPE, J. Estimation of the dietary intake of acrylamide by German infants, children and adolescents as calculated from dietary records and available data on acrylamide levels in food groups. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 207, n. 5, p. 463–471, 2004.

HILBIG, A.; KERSTING, M. Dietary acrylamide exposure, time trends and the intake of relevant foods in children and adolescents between 1998 and 2004: Results of the DONALD study. **Journal of Consumer Protection and Food Safety**, v. 1, p. 10–18, 2006.

HOSAMANI, R.; KALIWAL, B. B. Isolation, molecular identification and optimization of fermentation parameters for the production of L-asparaginase, an anticancer agent by *Fusarium equiseti*. **International Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 2, p. 108–119, 2011.

HU, Q.; XU, X.; FU, Y.; LI, Y. Rapid methods for detecting acrylamide in thermally processed foods: A review. **Food Control**, v. 56, p. 135–146, 2015.

HUANG, L.; LIU, Y.; SUN, Y.; YAN, Q.; JIANG, Z. Biochemical characterization of a novel L-asparaginase with low glutaminase activity from *Rhizomucor miehei* and its application in food safety and leukemia treatment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 5, p. 1561–1569, 2014.

HYMAVATHI, M.; SATHIST, T.; RAO, C.S.; PRAKASHAM, R. S. Enhancement of L-asparaginase production by isolated *Bacillus circulans* (MTCC 8574) using response surface methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 159, n. 1, p. 191–198, 2009.

HYMAVATHI, M.; SATHISH, T.; BRAHMAIAH, P.; PRAKASHAM, R. S. Impact of carbon and nitrogen sources on L-asparaginase production by isolated *Bacillus circulans* (MTCC 8574): Application of saturated Plackett-Burman design. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 24, n. 4, p. 473–480, 2010.

IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. **World Health Organization International Agency for Research on Cancer**, 1994.

ICIEK, M.; CHWATKO, G.; LORENC-KOCI, E.; AL., E. Plasma levels of total, free and protein bound thiols as well as sulfane sulfur in different age groups of rats. **Acta Biochimica Polonica**, v. 51, n. 3, p. 815–824, 2004.

ILLY, A.; VIANI, R. **Espresso coffee: The science of quality**. Elsevier Academic Press, 2005.

IMADA, A.; IGARASI, S.; NAKAHAMA, K.; ISONO, M. Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. **Journal of General Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 85–99, 1973.

IZADPANAH, F.; HOMAEI, A.; FERNANDES, P.; JAVADPOUR, S. Marine microbial L-asparaginase: Biochemistry, molecular approaches and applications in tumor therapy and in food industry. **Microbiological Research**, v. 208, p. 99–112, 2018.

JECFA. **Evaluation of certain food additives. WHO Technical Report 952. Sixty-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. 2009.

DE JONG, P. J. L-asparaginase production by *Streptomyces griseus*. **Applied Microbiology**, v. 23, n. 6, p. 1163–1164, 1972.

KENARI, S. L. D.; ALEMZADEH, I.; MAGHSODI, V. Production of L-asparaginase from *Escherichia coli* ATCC 11303: Optimization by response surface methodology. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 4, p. 315–321, 2011.

KERAMAT, J.; LEBAIL, A.; PROST, C.; JAFARI, M. Acrylamide in baking products: a review article. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 530–543, 2011.

KNOL, JEROEN J.; VAN LOON, WIL A. M.; LINSSEN, J.P.H.; RUCK, A. L.; VAN BOEKEL, M.A.J.S.; VORAGEM, A. G. J. Toward a kinetic model for acrylamide formation in a glucose-asparagine reaction system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 15, p. 6133–6139, 2005.

KORNBRUST, B. A. .; STRINGER, M. A.; LANGE, N. E. K.; HENDRIKSEN, H. V. Asparaginase – an enzyme for acrylamide reduction in food products. **Enzymes in Food Technology**. 2^o ed, p.59–80, 2010.

KRISHNAKUMAR, T.; VISVANANTHAN, R. Acrylamide in Food Products: A Review.

Journal of Food Processing & Technology, v. 5, n. 7, 2014.

KRISHNAPURA, P. R.; BELUR, P. D. Partial purification and characterization of L-asparaginase from an endophytic *Talaromyces pinophilus* isolated from the rhizomes of *Curcuma amada*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 124, p. 83–91, 2016.

KUMAR, S.; PAKSHIRAJAN, K.; VENKATA DASU, V. Development of medium for enhanced production of glutaminase-free L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, p. 477–486, 2009.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LANTZ, I.; TERNITÉ, R.; WILKENS, J.; HOENICKE, K.; GUENTHER, H.; VAN DER STEGEN, G. H. D. Studies on acrylamide levels in roasting, storage and brewing of coffee. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 50, n. 11, p. 1039–1046, 2006.

LINCOLN, L.; MORE, S. S. Isolation and production of clinical and food grade L- asparaginase enzyme from fungi. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 3, n. 3, p. 177–183, 2014.

LINCOLN, L.; NIYONZIMA, F. N.; MORE, S. S. Purification and properties of a fungal L-asparaginase from *Trichoderma viride* pers: SF Grey. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 9, n. 1, p. 310–316, 2015.

LOPES, A. M.; OLIVEIRA-NASCIMENTO, L.; RIBEIRO, A.; TAIRUM JR., C. A.; BREYER, A. C.; OLIVEIRA, M. A.; MONTEIRO, G.; SOUZA-MOTTA, M.; MAGALHÃES, P. O.; AVENDAÑO, J. G. F.; CAVACO- PAULO, A. M.; MAZZOLA, P. G.; RANGEL-YAGUI, C. O.; SETTE, L. D.; PESSOA, A. Therapeutic L-asparaginase: upstream, downstream and beyond. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 82–99, 2017.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

LU, H.; ZHENG, H. Fractal colour: A new approach for evaluation of acrylamide contents in biscuits. **Food Chemistry**, v. 134, n. 4, p. 2521–2525, 2012.

MAHAJAN, R. V.; SARAN, S.; SAXENA, R. K.; SRIVASTAVA, A. K. A rapid, efficient and sensitive plate assay for detection and screening of L-asparaginase-producing microorganisms.

FEMS Microbiology Letters, v. 341, n. 2, p. 122–126, 2013.

MANNA, S.; SINHA, A.; SADHUKHAN, R.; CHAKRABARTY, S. L. Purification, characterization and antitumor activity of l-asparaginase isolated from *Pseudomonas stutzeri* MB-405. **Current Microbiology**, v. 30, n. 5, p. 291–298, 1995.

Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura do Café. Brasília: EMBRAPA/SEDE, 2004.

MASHBURN, L. T.; WRISTON, J. C. Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 105, n. 2, p. 450–453, 1964.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 89–99, 2010.

MEGHAVARNAM, A. K.; JANAKIRAMAN, S. Solid state fermentation: An effective fermentation strategy for the production of L-asparaginase by *Fusarium culmorum* (ASP-87). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 124–130, 2017.

MEGHAVARNAM, A. K.; JANAKIRAMAN, S. Evaluation of acrylamide reduction potential of L-asparaginase from *Fusarium culmorum* (ASP-87) in starchy products. **LWT - Food Science and Technology**, v. 89, p. 32–37, 2018.

MESIAS, M.; DELGADO-ANDRADE, C.; HOLGADO, F.; MORALES, F. J. Acrylamide content in french fries prepared in households: A pilot study in Spanish homes. **Food Chemistry**, v. 260, p. 44–52, 2018.

MESÍAS, M.; MORALES, F. J. Acrylamide in coffee: Estimation of exposure from vending machines. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 48, p. 8–12, 2016.

MILNE, J. J. Scale-Up of protein purification: Downstream processing issues. **Protein chromatography: Methods and protocols, methods in molecular biology**. p.73–85, 2010.

MISHRA, A. Production of L-asparaginase, an anticancer agent, from *Aspergillus niger* using agricultural waste in solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 135, n. 1, p. 33–42, 2006.

MOHAN KUMAR, N. S.; MANONMANI, H. K. Purification, characterization and kinetic properties of extracellular L-asparaginase produced by *Cladosporium* sp. **World Journal of**

Microbiology and Biotechnology, v. 29, n. 4, p. 577–587, 2013.

MOHAN KUMAR, N. S.; RAMASAMY, R.; MANONMANI, H. K. Production and optimization of L-asparaginase from *Cladosporium* sp. using agricultural residues in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 43, n. 1, p. 150–158, 2013.

MOHAN KUMAR, N. S.; SHIMRAY, C. A.; INDRANI, D.; MANONMANI, H. K. Reduction of acrylamide formation in sweet bread with L-asparaginase treatment. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, p. 741–748, 2014.

MOTTRAM, D.S.; WEDZICHA, B.L.; DODSON, A. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. **Nature**, v. 419, p. 448–449, 2002.

MUCCI, L. A.; DICKMAN, P. W.; STEINECK, G.; ADAMI, H. O.; AUGUSTSSON, K. Reply: Dietary acrylamide and cancer risk: Additional data on coffee. **British Journal of Cancer**, v. 89, n. 4, p. 774–776, 2003.

MUKHERJEE, J.; MAJUMDAR, S.; SCHEPER, T. Studies on nutritional and oxygen requirements for production of L- asparaginase by *Enterobacter aerogenes*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 2, p. 180–184, 2000.

MURKOVIC, M.; DERLER, K. Analysis of amino acids and carbohydrates in green coffee. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 69, n. 1–2, p. 25–32, 2006.

MUTTUCUMARU, N.; POWERS, S.J.; ELMORE, J.S.; DODSON, A.; BRIDDON, A.; MOTTRAM, D.S.; HALFORD, N. G. 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 Chemistry**, v. 220, p. 76–86, 2017.

NAGARAJAN, A.; THIRUNAVUKKARASU, N.; SURYANARAYANAN, T. S.; GUMMADI, S. N. Screening and isolation of novel glutaminase free L-asparaginase from fungal endophytes. **Research Journal of Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 163–176, 2014.

NGUYEN, H.T.; VAN DE FELS-KLERX, H.J.; PETERS, R.J.B.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural formation during baking of biscuits: Part I: Effects of sugar type. **Food Chemistry**, v. 192, p. 575–585, 2016.

OLEMPСКА-BEER, Z. Asparaginase from *Aspergillus oryzae* encoded by the asparaginase gene from *A. oryzae*. **Chemical & Technical Assessment**, p. 1-7, 2007.

OLEMPСКА-BEER, Z. Asparaginase from *Aspergillus niger* expressed in *A. niger*. **Chemical & Technical Assessment prepared for the sixty-ninth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committte on Food Additives**, p. 1-7, 2008.

PATRO, K.; GUPTA, N. Extraction, purification and characterization of L-asparaginase from *Penicillium* sp. by submerged fermentation. **International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research**, v. 3, n. 3, p. 30–34, 2012.

PATRO, K. R.; BASAK, U. C.; MOHAPATRA, A. K.; GUPTA, N. Development of new medium composition for enhanced production of L-asparaginase by *Aspergillus flavus*. **Journal of Environmental Biology**, v. 35, n. 1, p. 295–300, 2013.

PEDRESCHI, F. Acrylamide formation and reduction in fried potatoes. **Processing Effects on Safety and Quality of Foods**. p.231–251, 2009.

PEDRESCHI, F.; KAACK, K.; GRANBY, K. The effect of asparaginase on acrylamide formation in French fries. **Food Chemistry**, v. 109, n. 2, p. 386–392, 2008.

PEDRESCHI, F.; MARIOTTI, S.; GRANBY, K.; RISUM, J. Acrylamide reduction in potato chips by using commercial asparaginase in combination with conventional blanching. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 1473–1476, 2011.

PENNISI, M.; MALAGUARNERA, G.; PUGLISI, V.; VINCIGUERRA, L.; VACANTE, M.; MALAGUARNERA, M. Neurotoxicity of acrylamide in exposed workers. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, p. 3843–3854, 2013.

PIMENTA, C. J.; ANGÉLICO, C. L.; CHALFOUN, S. M. Challenges in coffee quality: Cultural, chemical and microbiological aspects. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 42, n. 4, p. 337–349, 2018.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika Trust**, v. 33, n. 4, p. 305–325, 1946.

PRODOLLIET, J.; BUGNER, E.; FEINBERG, M. Determination of carbohydrates in soluble coffee by anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection: interlaboratory study. **Journal of AOAC International**, v. 78, p. 768–782, 1995.

RADHA, R.; ARUMUGAM, N.; GUMMADI, S. N. Glutaminase free L-asparaginase from *Vibrio cholerae*: Heterologous expression, purification and biochemical characterization.

International Journal of Biological Macromolecules, v. 111, p. 129–138, 2018.

RAHIMZADEH, M.; POODAT, M.; JAVADPOUR, S.; QESHMI, F.I.; SHAMSIPOUR, F. Purification, characterization and comparison between two new L-asparaginases from *Bacillus* PG03 and *Bacillus* PG04. **The Open Biochemistry Journal**, v. 10, p. 35–45, 2016.

RAJAGOPALAN, K. V.; FRIDOVICH, I.; HANDLER, P. Competitive inhibition of enzyme activity by urea. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 236, n. 4, p. 1059–1065, 1961.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Experimental design and process optimization**. CRC Press, 2014.

ROGERS, W. J.; MICHAUX, S.; BASTIN, M.; BUCHELI, P. Changes to the content of sugars, sugar alcohols, myo-inositol, carboxylic acids and inorganic anions in developing grains from different varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and Arabica (*C. arabica*) coffees. **Plant Science**, v. 149, n. 2, p. 115–123, 1999.

SARQUIS, M. I. M.; OLIVEIRA, E. M. M.; SANTOS, A. S.; COSTA, G. L. Production of L-asparaginase by filamentous fungi. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 489–492, 2004.

SAVITRI, N. A.; AZMI, W. Microbial L-asparaginase: A potent antitumor enzyme. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 184–194, 2003.

SAXENA, A.; UPADHYAY, R.; KANGO, N. Isolation and identification of actinomycetes for production of novel extracellular glutaminase free L-asparaginase. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 53, n. 12, p. 786–793, 2015.

ŞENYUVA, H. Z.; GÖKMEN, V. Study of acrylamide in coffee using an improved liquid chromatography mass spectrometry method: Investigation of colour changes and acrylamide formation in coffee during roasting. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 3, p. 214–220, 2005.

SHARMA, D. C.; SATYANARAYANA, T. A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by *Bacillus pumilus* dcsr1 in submerged fermentation by using statistical methods. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 727–733, 2006.

SHRIVASTAVA, A.; KHAN, A. A.; SHRIVASTAV, A.; JAIN, S. K.; SINGHAL, P. K. Kinetic studies of L-asparaginase from *Penicillium digitatum*. **Preparative Biochemistry and**

Biotechnology, v. 42, n. 6, p. 574–581, 2012.

SINGH, Y.; GUNDAMPATI, R. K.; JAGANNADHAM, M. V.; SRIVASTAVA, S. K. Extracellular L-asparaginase from a protease-deficient *Bacillus aryabhattai* ITBHU02: Purification, biochemical characterization, and evaluation of antineoplastic activity in vitro. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 7, p. 1759–1774, 2013.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13–18, 2009.

SOUZA, P. M.; FREITAS, M. M.; CARDOSO, S.L.; PESSOA, A.; GUERRA, E.N.S.; MAGALHÃES, P. O. Optimization and purification of L-asparaginase from fungi: A systematic review. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 120, p. 194–202, 2017.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of fermentation technology**. Pergamon, 1995.

SWANSTON, J. Acrylamide mitigation in foods – An update. Disponível em: <<https://www.leatherheadfood.com/files/2018/01/White-paper-59-Acrylamide-in-foods-an-update.pdf>>. Acesso em: 7/7/2018.

TAEYMANS, D.; WOOD, J.; ASHBY, P.; BLANK, I.; STUDER, A.; STADLER, R. H.; GONDÉ, P.; VAN EIJCK, P.; LALLJIE, S.; LINGNERT, H.; LINDBLOM, M. ; MATISSEK, R.; MÜLLER, D.; TALLMADGE, D.; O'BRIEN, J.; THOMPSON, S.; SILVANI, D.; WHITMORE, T. A review of acrylamide: An industry perspective on research, analysis, formation, and control. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 5, p. 323–347, 2004.

TAREKE, E.; RYDBERG, P.; KARLSSON, P.; ERIKSSON, S.; TÖRNQVIST, M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 17, p. 4998–5006, 2002.

THAKUR, M.; LINCOLN, L.; NIYONZIMA, F. N.; SUNIL, S. M. Biotransformation isolation, purification and characterization of fungal extracellular L-asparaginase from *Mucor hiemalis*. **Journal of Biocatalysis & Biotransformation**, v. 2, n. 2, p. 1–9, 2014.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146–161, 2013.

THOMAS, A.; THOMAS, A. Acrylamide - A potent carcinogen in food. **International Journal of Science and Research**, v. 3, n. 7, p. 2319–7064, 2014.

TUNDISI, L. L.; COELHO, D. F.; ZANCHETTA, B.; MORIEL, P.; PESSOA-JR., A.; TAMBOURGI, E. B.; SILVEIRA, E. L-asparaginase purification. **Separation and Purification Reviews**, v. 46, n. 1, p. 35–43, 2016.

UPPULURI, K.B.; DASARI, R.K.V.R.; SAJJA, V.; JACOB, A.S.; REDDY, D. S. R. Optimization of L-asparaginase production by isolated *Aspergillus niger* C4 from sesame (black) oil cake under SSF using Box-Behnken design in column bioreactor. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, v. 11, n. 1, p. 103–109, 2013.

VALA, A. K.; SACHANIYA, B.; DUDHAGARA, D.; PANSERIYA, H. Z.; GOSAI, H.; RAWAL, R.; DAVE, B. P. Characterization of L-asparaginase from marine-derived *Aspergillus niger* AKV-MKBU, its antiproliferative activity and bench scale production using industrial waste. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 41–46, 2018.

VASS, M.; AMREIN, T.M.; SCHÖNBÄCHLER, B.; ESCHER, F.; AMADO, R. Ways to reduce the acrylamide formation in cracker products. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 22, p. 19–21, 2004.

VIDYA, J.; SAJITHA, S.; USHASREE, M. V.; BINOD, P.; PANDEY, A. Therapeutic Enzymes: L-Asparaginases. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products**, p. 249–265, 2017.

VIMAL, A.; KUMAR, A. In vitro screening and in silico validation revealed key microbes for higher production of significant therapeutic enzyme L-asparaginase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 98, p. 9–17, 2017.

VINCI, R.M.; MESTDAGH, F.; MEULENAER, B. Acrylamide formation in fried potato products - Present and future, a critical review on mitigation strategies. **Food Chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1138–1154, 2012.

WARANGKAR, S. C.; KHOBRADE, C. N. Screening, enrichment and media optimization for L-asparaginase production. **Journal of Cell and Tissue Research**, v. 9, n. 3, p. 1963–1968, 2009.

WHEELWRIGHT, S. M. **Protein purification: Design and scale up of downstream processing**. John Wiley & Sons, 1991.

WILLIAMS, J. S. E. Influence of variety and processing conditions on acrylamide levels in fried potato crisps. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 875–881, 2005.

WILSON, K.; WALKER, J. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**. Cambridge University Press, 2010.

XU, F.; ORUNA-CONCHA, M. J.; ELMORE, J. S. The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food. **Food Chemistry**, v. 210, p. 163–171, 2016.

YAYLAYAN, V. A.; STADLER, R. H. Acrylamide formation in food: A mechanistic perspective. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 1, p. 262–267, 2005.

ZUO, S.; XUE, D.; ZHANG, T.; JIANG, B.; MU, W. . Biochemical characterization of an extremely thermostable L-asparaginase from *Thermococcus gammatolerans* EJ3. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 109, p. 122–129, 2014.

ZUO, S.; ZHANG, T.; JIANG, B.; MU, W. Recent research progress on microbial L-asparaginases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 1069–1079, 2015.

8. ANEXOS

8.1. Anexo 1



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Certidão
Cadastro nº A35225D**

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro:	A35225D
Usuário:	UNICAMP
CPF/CNPJ:	46.068.425/0001-33
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

Espécie

Aspergillus niger IOC 4470
Aspergillus niger IOC 2016
Aspergillus niger IOC 0203
Aspergillus niger IOC 4573
Aspergillus niger IOC 0933
Aspergillus niger IOC 4606
Aspergillus oryzae IOC 3924
Aspergillus oryzae IOC 3999

Título da Atividade:	L-asparaginase: seleção de micro-organismos produtores, caracterização bioquímica, purificação e aplicação em alimentos
----------------------	--

Equipe

Marília Crivelari da Cunha	UNICAMP
Santa Maria Del Rosário Orrillo Lindo	Unicamp
Ruann Janser Soares de Castro	Unicamp
Hélia Harumi Sato	Unicamp
Ana Beatriz Avelino Correia de Sá	Unicamp
Gabriela Raissa Machado	Unicamp
Laura Carvalho Silva	Unicamp
Ariane Machado de Souza	Unicamp
Thamiris Roberta Alves de Almeida	Unicamp

Data do Cadastro:	26/04/2018 12:19:40
-------------------	----------------------------

Situação do Cadastro:	Concluído
-----------------------	------------------



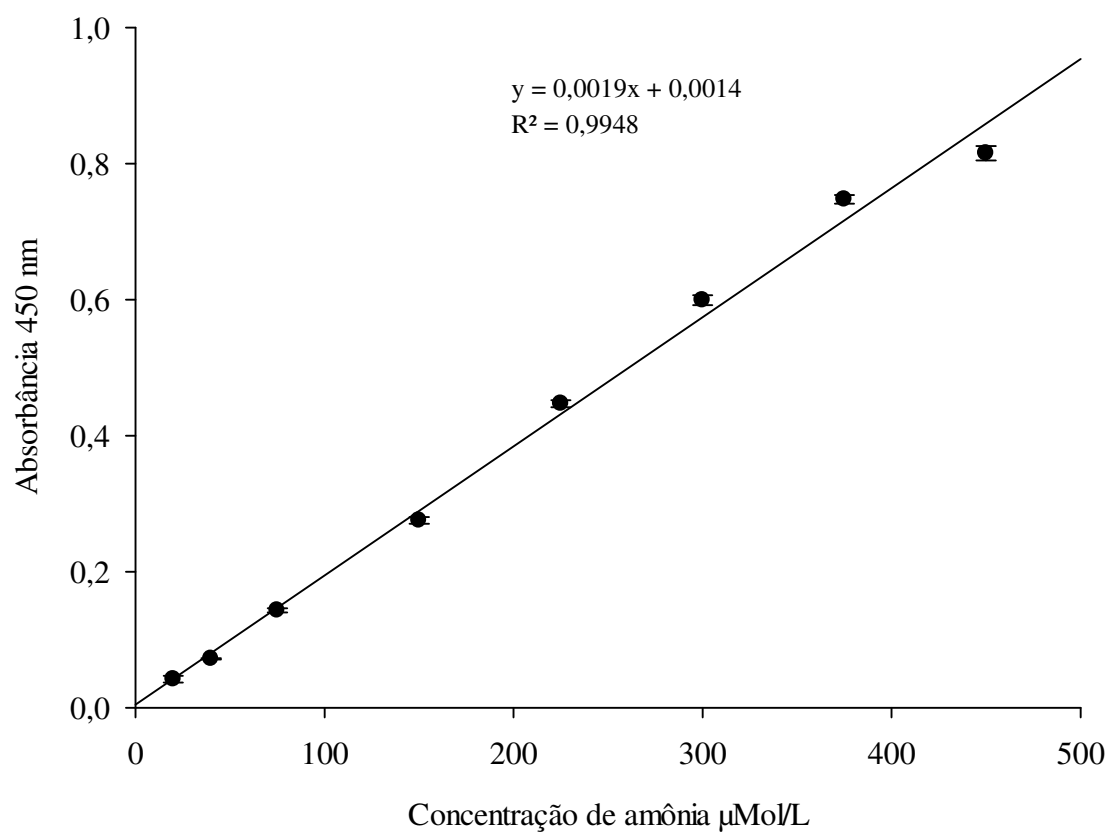
8.2. Anexo 2

Figura 33 – Fungos estudados no presente trabalho e obtidos por doação pela Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos da FioCruz- RJ.



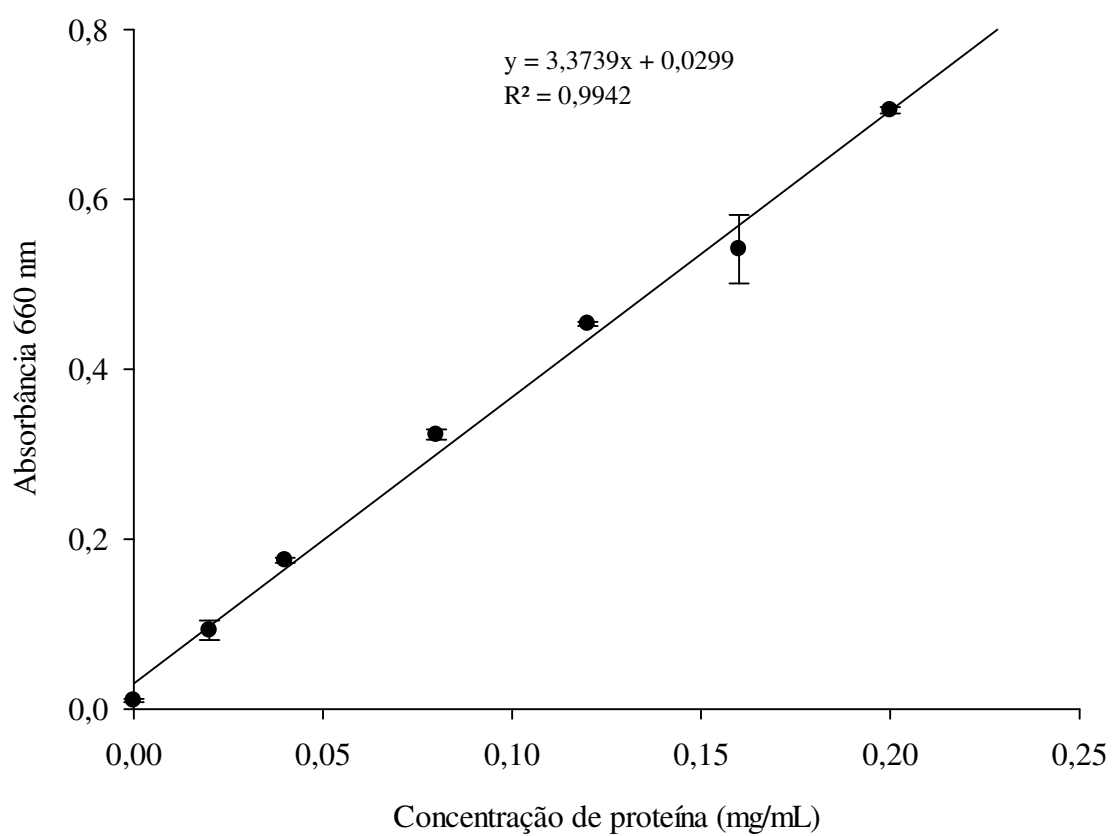
8.3. Anexo 3

Figura 34 – Curva padrão de determinação da concentração de L-asparaginase.



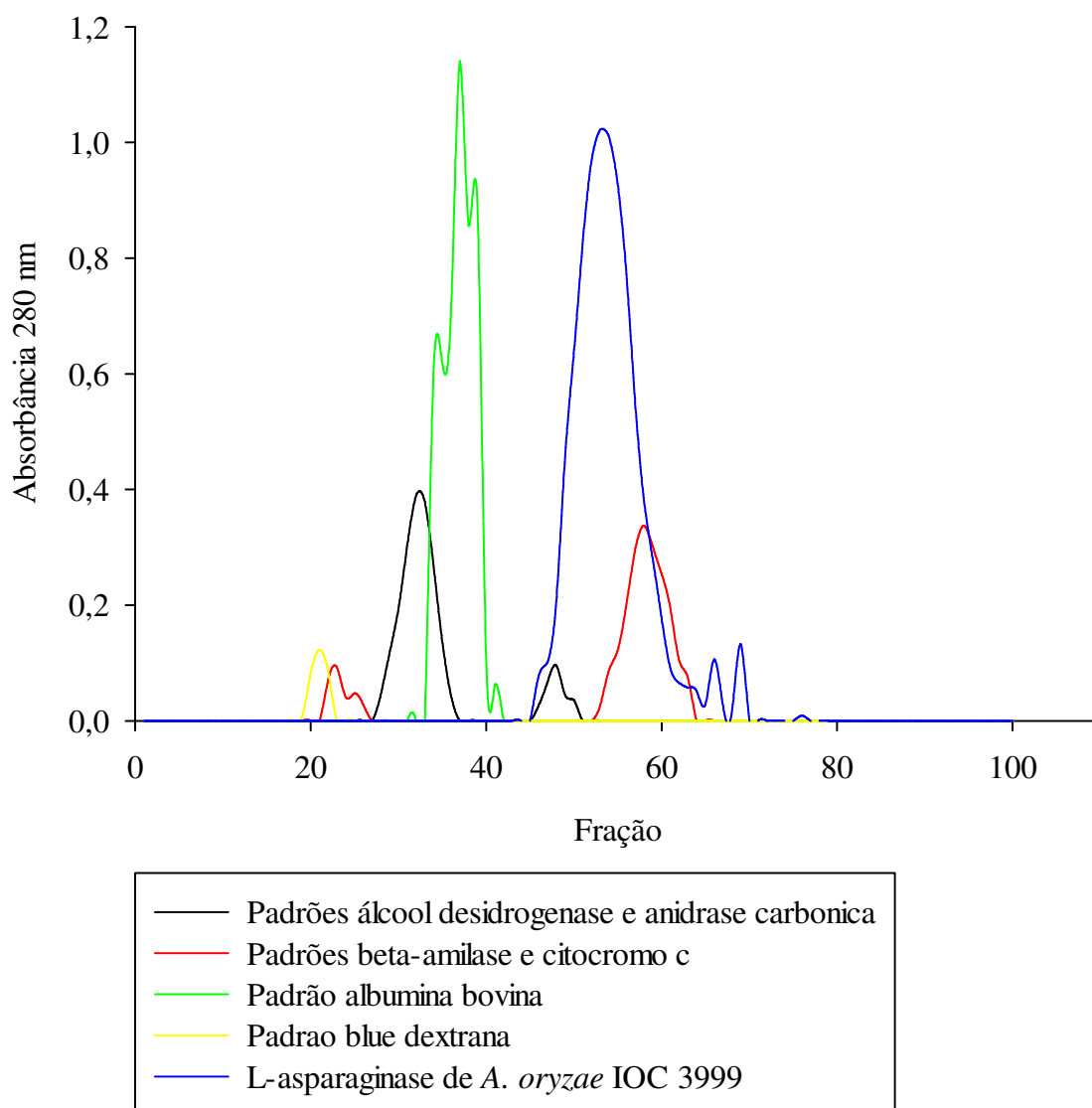
8.4. Anexo 4

Figura 35 – Curva padrão para determinação de proteína pelo método de Lowry.



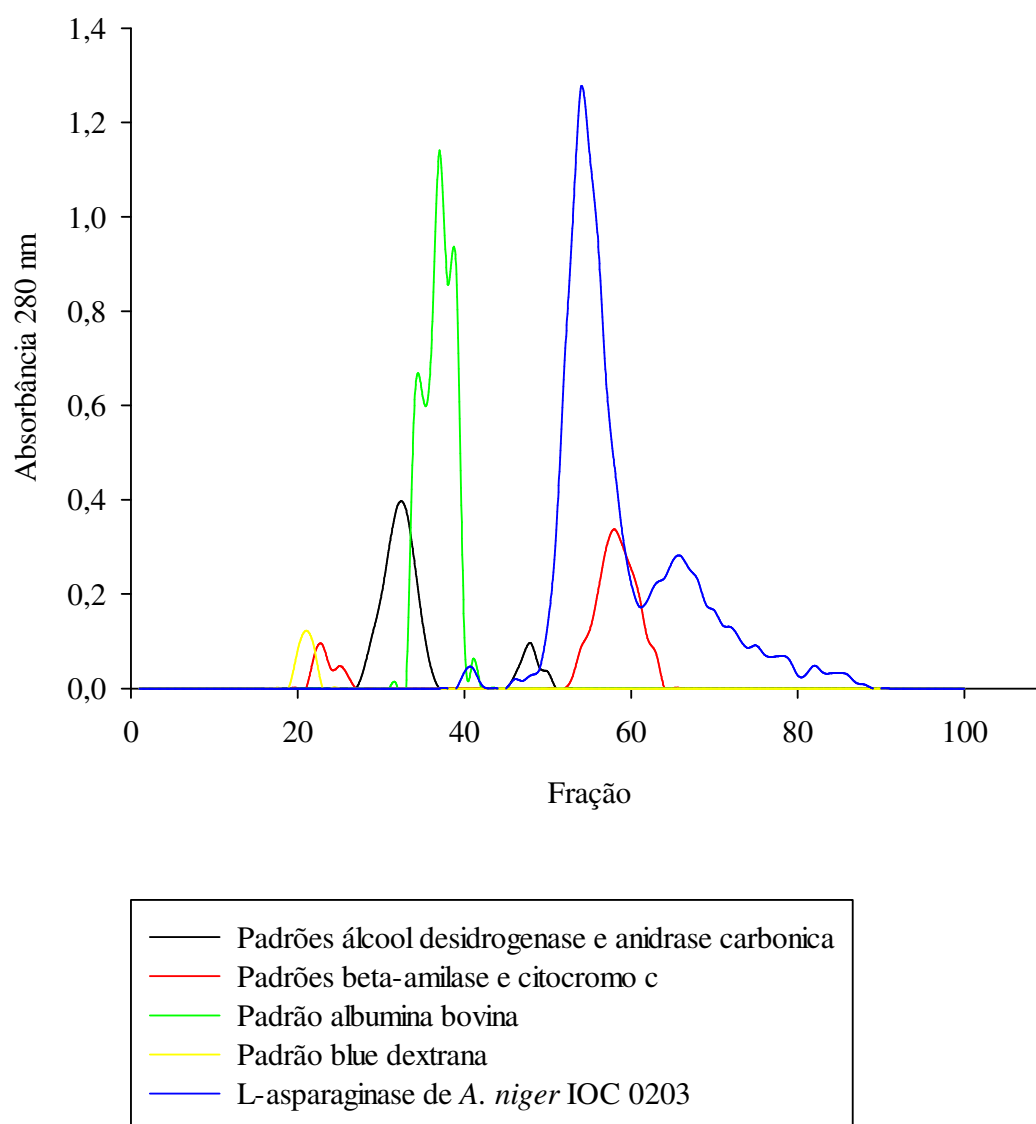
8.5. Anexo 5

Figura 36 – Cromatografia da L-asparaginase de *A. oryzae* IOC 3999 e proteínas padrões em coluna de Sephadex G-100.



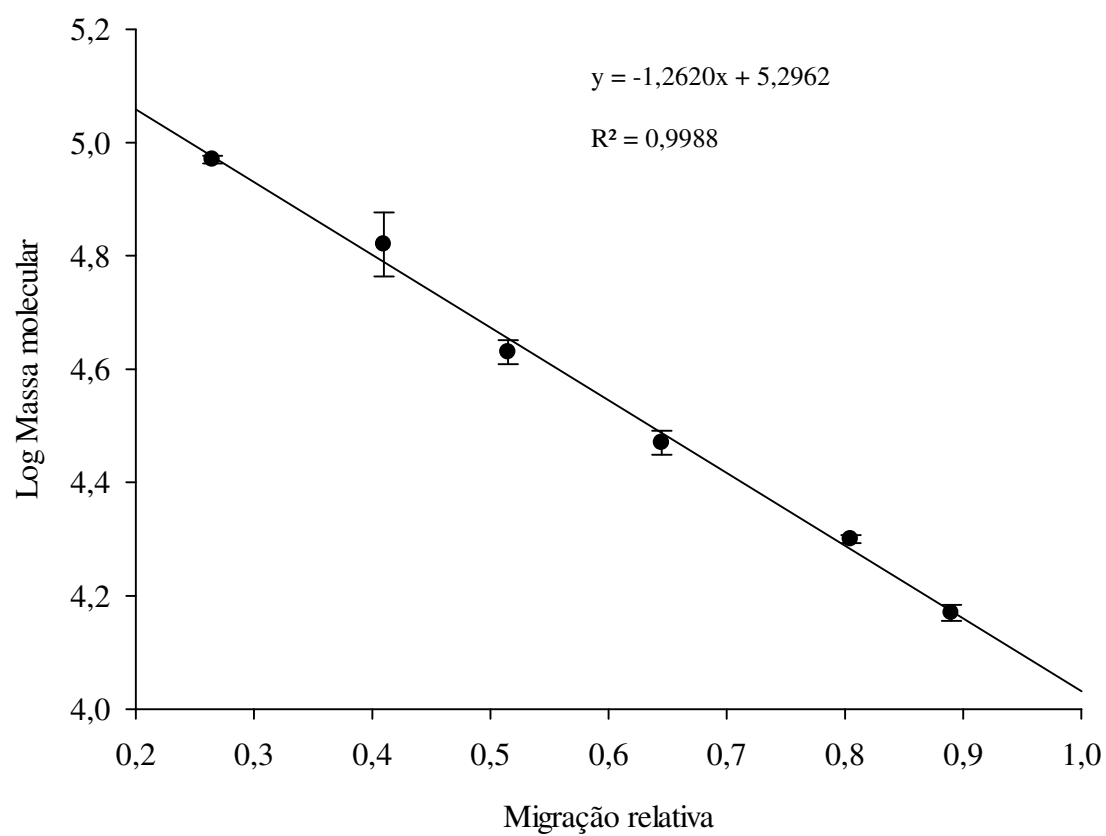
8.6. Anexo 6

Figura 37 – Cromatograma da L-asparaginase de *A. niger* IOC 0203 e proteínas padrões em coluna de Sephadex G-100.



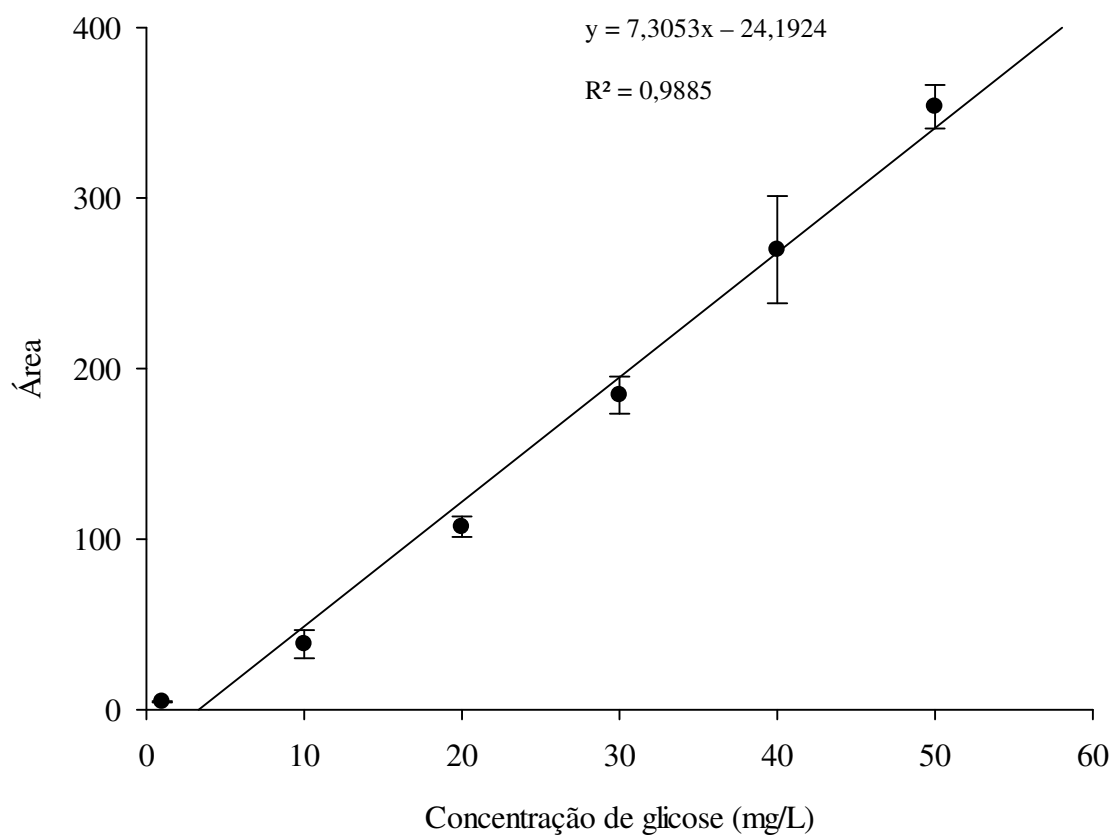
8.7. Anexo 7

Figura 38 – Curva padrão para determinação da massa molecular de proteínas por SDS-PAGE.



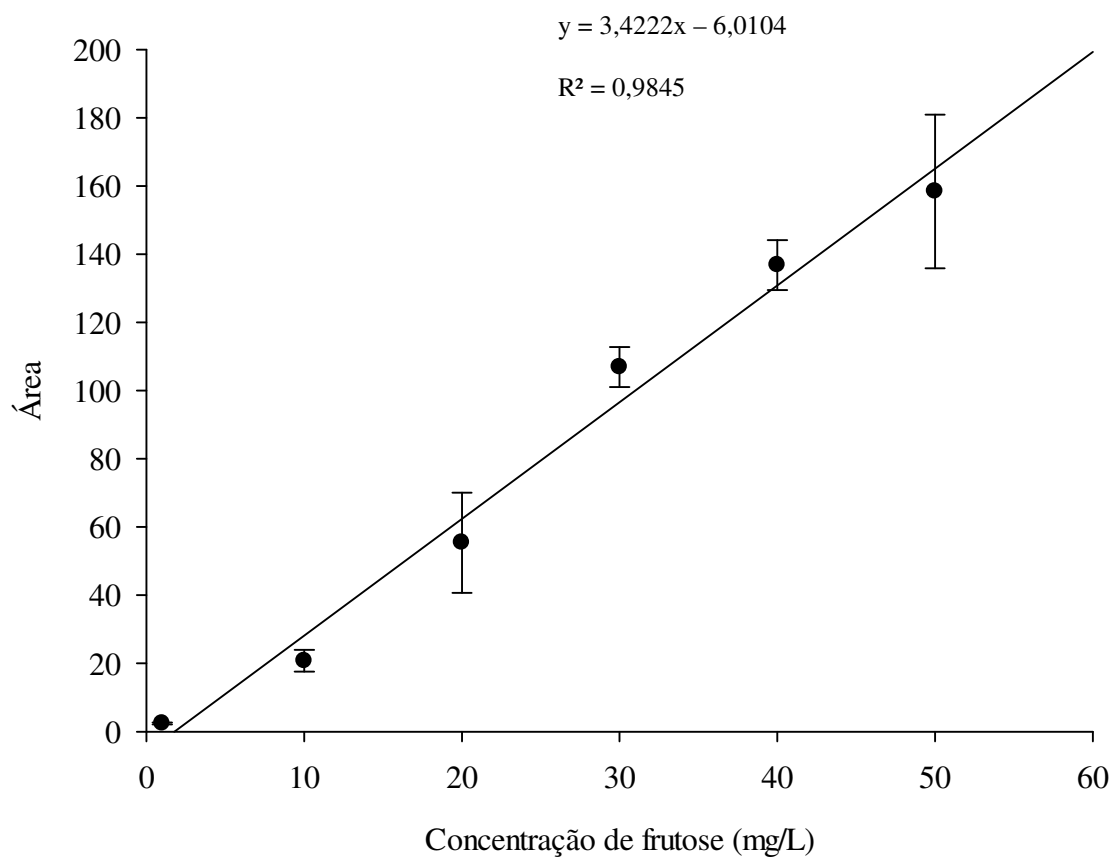
8.8. Anexo 8

Figura 39 – Curva padrão para determinação da concentração de glicose por cromatografia em HPLC-Dionex DX-600.



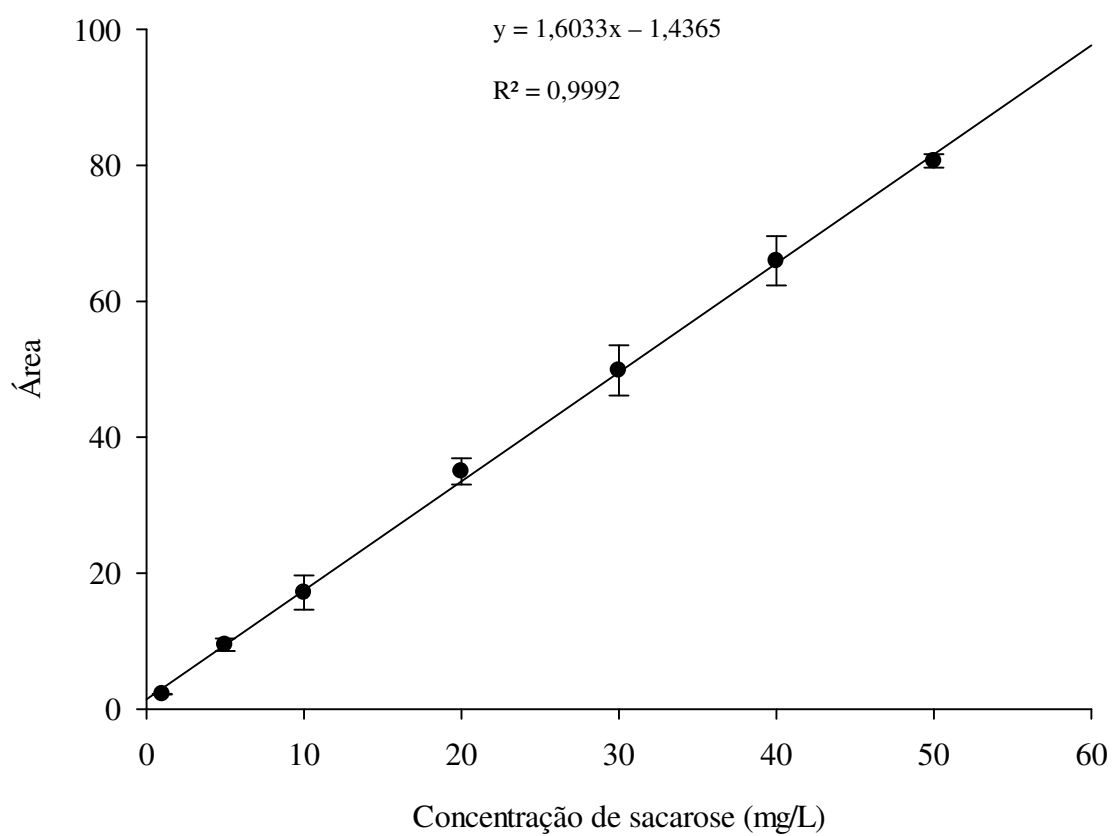
8.9. Anexo 9

Figura 40 – Curva padrão para determinação da concentração de frutose por cromatografia em HPLC-Dionex DX-600.



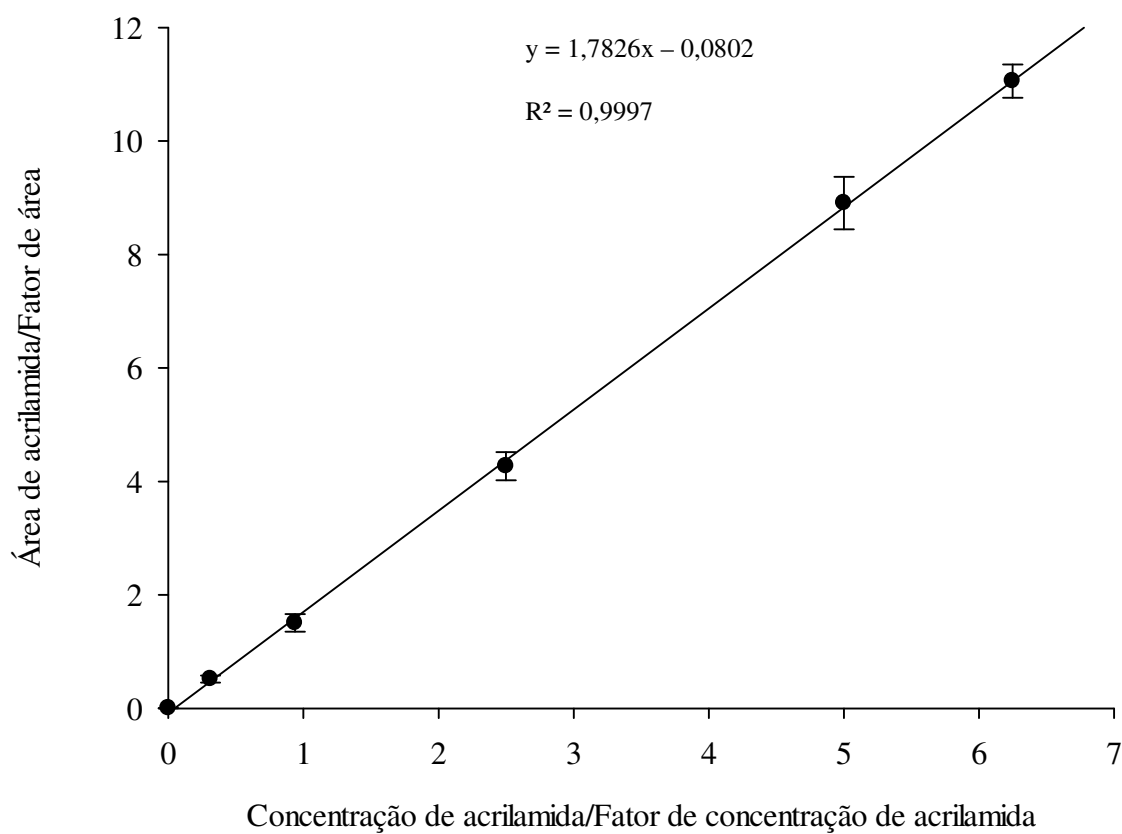
8.10. Anexo 10

Figura 41 – Curva padrão para determinação da concentração de sacarose por cromatografia em HPLC-Dionex DX-600.



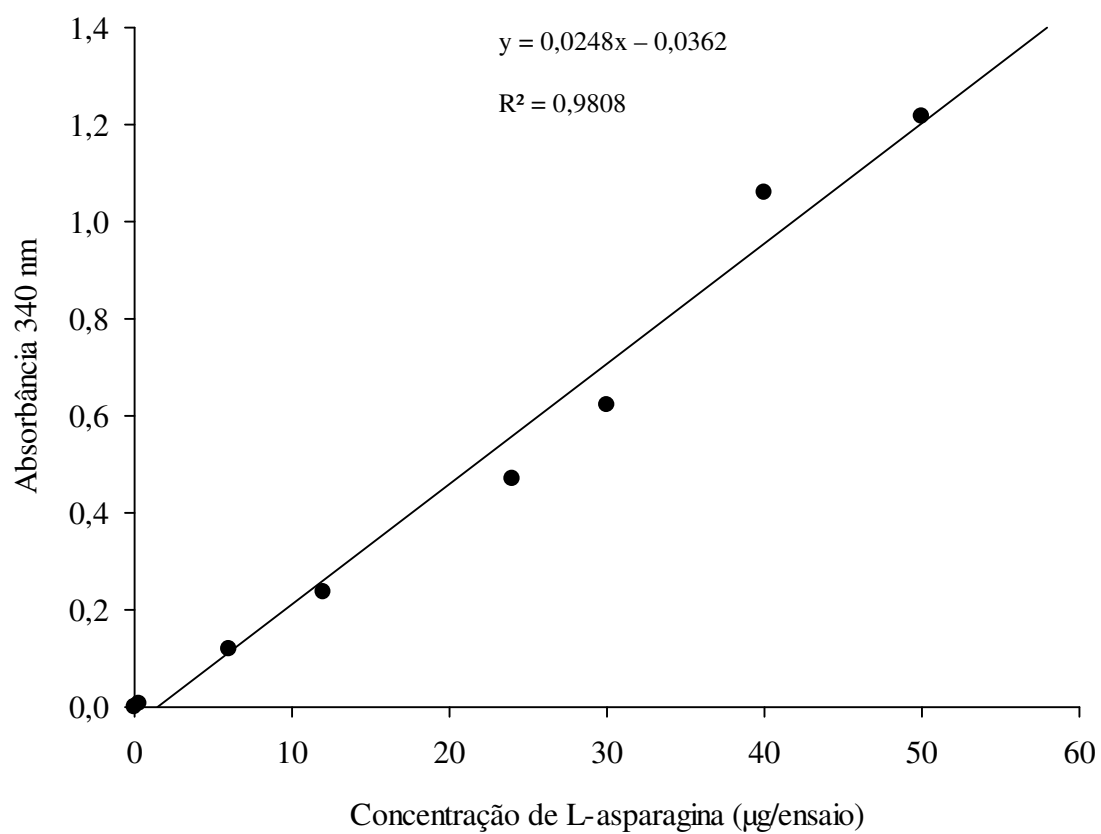
8.11. Anexo 11

Figura 42 – Curva padrão para determinação da concentração de acrilamida por LC-MS/MS.



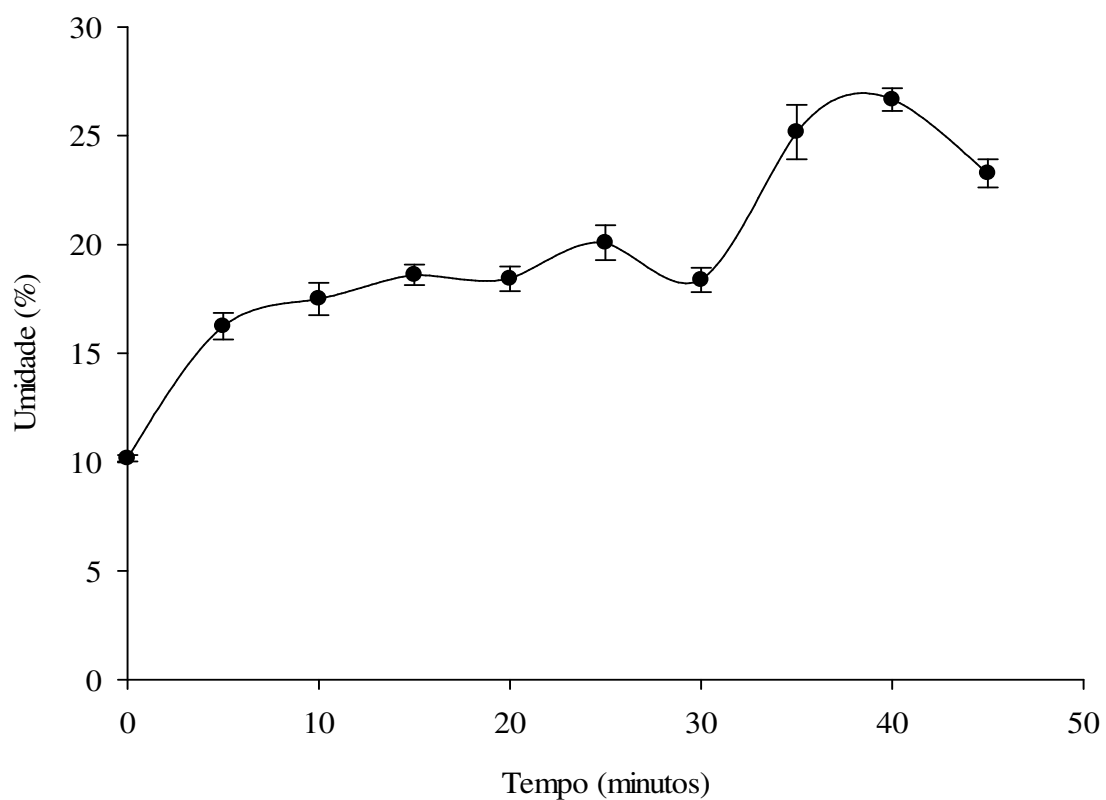
8.12. Anexo 12

Figura 43 – Curva padrão para determinação colorimétrica de L-asparagina.



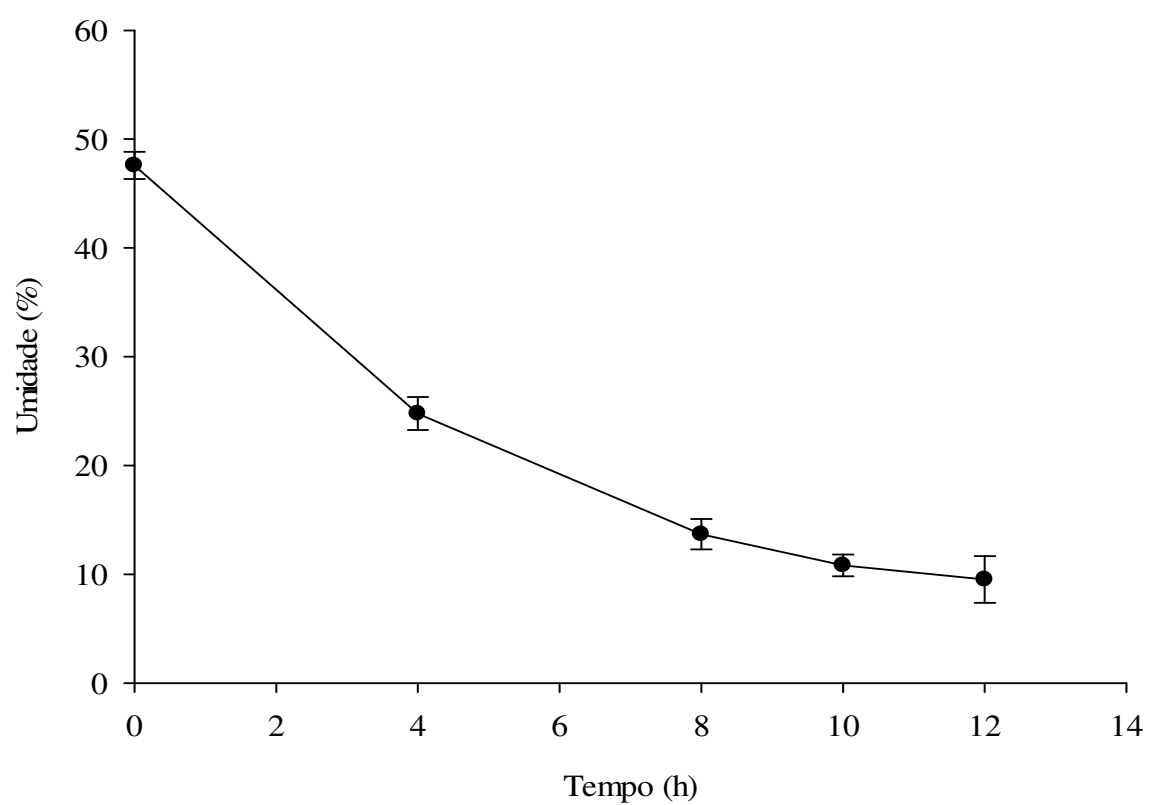
8.13. Anexo 13

Figura 44 – Efeito do tempo do tratamento em vapor a 100 °C e % de umidade dos grãos de café beneficiado da espécie arábica variedade Catuai amarelo cereja descascado.



8.14. Anexo 14

Figura 45 – Efeito do tempo de secagem em estufa com circulação de ar e % de umidade dos grãos de café beneficiado.



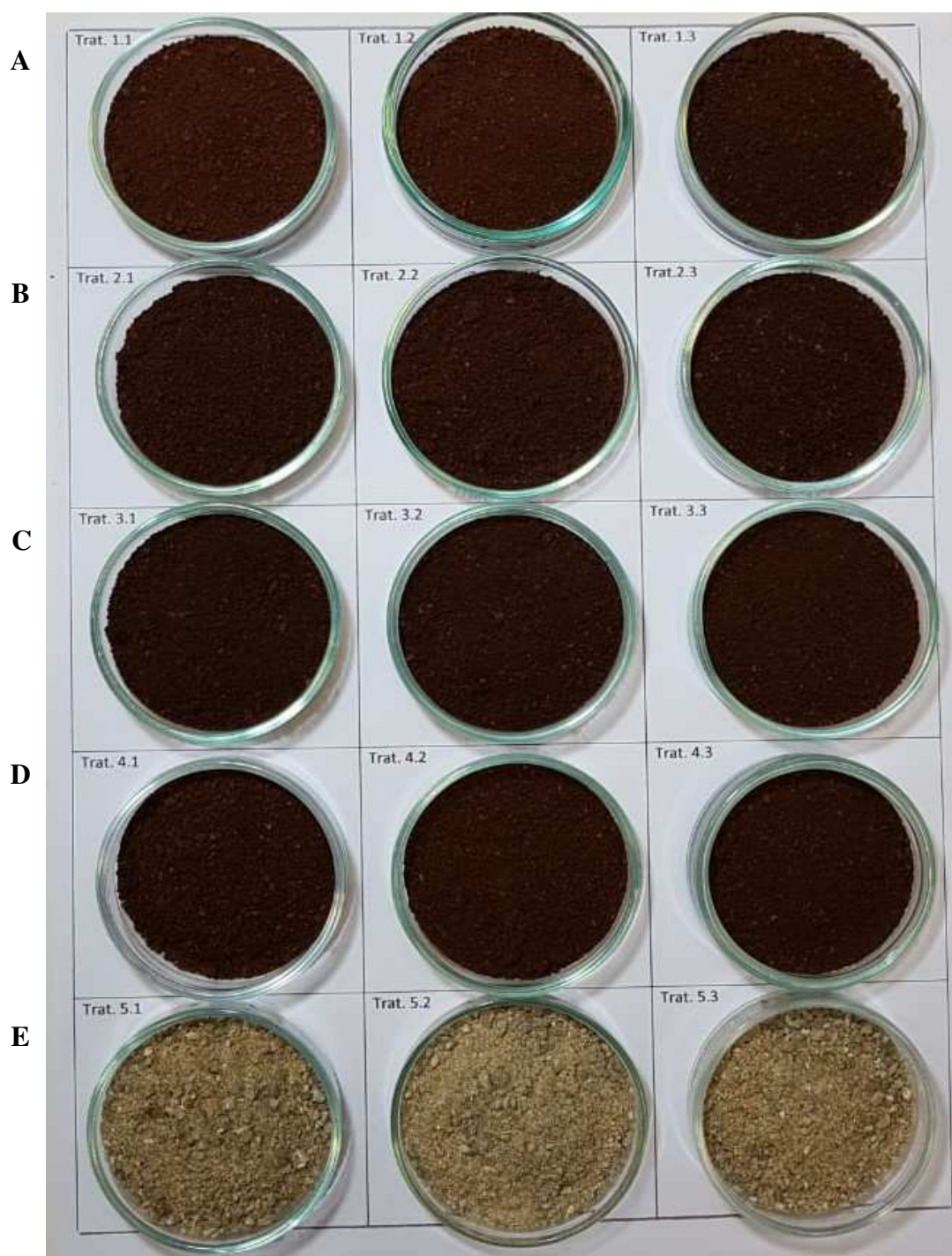
8.15. Anexo 15

Figura 46 – Torra padrão de *cupping*, com grau de torra médio (R 65) de acordo com a Escala Agtron SCAA.



8.16. Anexo 16

Figura 47 – Amostras de café moído testes (tratadas com L-asparaginase e torradas) e amostras controles (tratadas com tampão e torradas ou não torradas).



8.17. Anexo 17




 Home
  Help
  Email Support
  Sign in
  Create Account



Using response surface methodology to improve the L-asparaginase production by *Aspergillus niger* under solid-state fermentation

Author:
Marília Crivelari da Cunha, Laura Carvalho Silva, Hélia Harumi Sato, Ruann Janser Soares de Castro

Publication: Biocatalysis and Agricultural Biotechnology

Publisher: Elsevier

Date: October 2018

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

BACK

CLOSE WINDOW

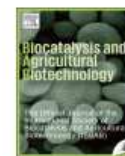
8.18. Anexo 18

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 16 (2018) 31–36



Contents lists available at ScienceDirect

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/babUsing response surface methodology to improve the L-asparaginase production by *Aspergillus niger* under solid-state fermentationMarília Crivelari da Cunha^{a,*}, Laura Carvalho Silva^b, Hélia Harumi Sato^a, Ruann Janser Soares de Castro^a^a Department of Food Science, School of Food Engineering, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil^b Biology Institute, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

L-asparaginase
Agro-industrial wastes
CCRD
Aspergillus niger
Solid-state fermentation

ABSTRACT

Microbial L-asparaginase have been used as a therapeutic agent in the treatment of acute lymphoblastic leukemia and Hodgkin's disease. In addition to clinical use, L-asparaginases have been used in foods to reduce the formation of acrylamide. L-asparaginase production is carried out mainly by submerged fermentation (SmF). However, solid-state fermentation (SSF) offers potential benefits compared with submerged fermentation, such as the use of low-cost agro-industrial residues as the substrate, which is very attractive for bioprocessing. The main objective of this study was to evaluate the use of agro-industrial wastes, including wheat bran, soybean meal, rice meal, chicken feather meal, chicken viscera meal and passion fruit peel flour, for L-asparaginase production by *Aspergillus niger* LBA 02 under solid-state fermentation. Among the substrates, the highest L-asparaginase activity was obtained using passion fruit peel flour (2380.11 U/gds) after 48 h of fermentation at 30 °C. The effects of temperature, initial moisture content (%) and inoculum concentration (spores/g) on the L-asparaginase production were evaluated using passion fruit peel meal as a substrate using Central Composite Rotatable Design (CCRD) with 17 runs. An increase in L-asparaginase activity (3746.78 U/gds) was obtained using the optimized conditions of passion fruit peel flour with an initial moisture content of 60% and inoculum concentration of 2.1×10^6 spores/g after 24 h of fermentation at 25 °C. It was observed that the process optimization resulted in a 57% increase in enzyme production compared with the initial values obtained in the "one-factor-at-a-time" method.

1. Introduction

L-asparaginase (L-asparagine amidohydrolase E.C.3.5.1.1) is an enzyme belonging to the amidase group, which catalyzes the hydrolysis of the amino acid L-asparagine to L-aspartic acid and ammonia (Gurunathan and Sahadevan, 2012). This enzyme has been used for chemotherapy of lymphoid system malignancies and leukemia for over four decades (Zuo et al., 2015). Apart from its clinical usage, L-asparaginase has great potential for use in food processing, reducing acrylamide formation in foods rich in carbohydrates and L-asparagine (cereals, potatoes and coffee) subjected to high temperatures (Mottram et al., 2002). Acrylamide is classified as a probable human carcinogen (IARC, 1994).

This enzyme is widely distributed among living organisms, including animals, plants, and microorganisms (Zuo et al., 2015; Batool et al., 2016). Microorganisms are considered to be the most important

source of L-asparaginase since the anti-tumor activity of asparaginase from *Escherichia coli* (Mashburn and Wriston, 1964) was first reported. However, L-asparaginase from fungal sources has gained much attention because of its stability, high productivity and easy culture conditions (Meghavarman and Janakiraman, 2017). Fungi genera, such as *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Cladosporium*, are commonly reported in previous studies to produce L-asparaginase (Patro et al., 2014; Kumar et al., 2013; Shrivastava et al., 2012). The history of safe use for *Aspergillus niger* stems primarily from its use in the food industry for the production of many enzymes such as amylase, amyloglucosidase, cellulases, lactase, invertase, pectinases and acid proteases (Bennett, 1985).

Industrial production of L-asparaginase by fungi throughout the world is carried out mainly by submerged fermentation (SmF) (Meghavarman and Janakiraman, 2017; Kumar et al., 2013). Solid-state fermentation (SSF) has the potential for the production of enzymes and

* Corresponding author.

E-mail addresses: marilia.crivelari@gmail.com (M.C. da Cunha), lauracarvalho95@gmail.com (L.C. Silva), heliah@unicamp.br (H.H. Sato), ruann@unicamp.br (R.J.S. de Castro).<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.07.018>

Received 26 March 2018; Received in revised form 30 May 2018; Accepted 12 July 2018

Available online 18 July 2018

1878-8181/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

has emerged as an attractive alternative to submerged fermentation. SSF has attained much relevance during the past decade to offer potential environmental benefits, as it utilizes low-cost agro-industrial residues as the substrate, which is attractive for bioprocessing (Thomas et al., 2013). These substrates act as both a source of nutrients and physical support for enzyme production. Therefore, screening and selection of an appropriate substrate is an important step for commercial production of an enzyme (Meghavarman and Janakiraman, 2017).

Recently, many statistical experimental have been employed in bioprocess optimization. Optimization of the fermentation process can be conducted either by changing one-factor-at-a-time or by varying several factors at the same time and looking for interactions using statistical analysis. Optimization studies involving a one-factor-at-a-time approach is tedious and tend to overlook the effects of interacting factors but might lead to misinterpretations of results. In contrast, statistically planned experiments effectively tackle the problem which involves the specific design of experiments which minimizes the error in determining the effect of parameters and the results are achieved in an economical manner (Balakrishnan and Pandey, 1996).

Statistically based optimization is a proven tool for overcoming the limitations of the “one-factor-at-a-time” method. It is a more efficient technique since it can provide statistical data with a relatively small number of experiments (Uppuluri et al., 2013). Basically, this optimization process involves three major steps: performing the statistically designed experiments, estimating the coefficients in a mathematical model, predicting its response and checking the adequacy of the model (Kumar et al., 2013). Several researchers in biotechnology have applied these techniques for optimization of different parameters (El-Naggar et al., 2014; Kumar et al., 2013; Uppuluri et al., 2013; Hymavathi et al., 2009). Considering the importance of L-asparaginase, the present investigation was aimed to optimize L-asparaginase production using agro-industrial wastes by *A. niger* LBA 02 through response surface methodology.

2. Material and methods

2.1. Substrates and chemicals

Different agro-industrial wastes, such as wheat bran, rice meal, and passion fruit peel flour, were purchased from the local market of Campinas, São Paulo, Brazil. Soybean meal was provided by Bunge Foods S/A, Campinas, São Paulo, Brazil. Chicken feather meal and chicken viscera meal were provided by Ad'oro S/A, Várzea Paulista, São Paulo, Brazil. All chemicals used in the present study were of analytical grade and were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Merck (Darmstadt, Germany) and Difco (Kansas, USA).

2.2. Microorganism and culture conditions

The filamentous fungi *Aspergillus niger* LBA 02 was previously selected by Dias et al. (2015) as an L-asparaginase producer strain from the culture collection of the Laboratory of Food Biochemistry, School of Food Engineering, University of Campinas, Campinas SP, Brazil. The strain was maintained on slants containing potato dextrose agar (PDA) medium, incubated at 30 °C for 7 days, and stored at 4 °C.

2.3. Inoculum preparation

The fungal spores were produced by inoculating 1 mL of the microorganism spore suspension into a medium comprising 10 g wheat bran and 4 mL of a solution containing 1.7% (w/v) Na_2HPO_4 and 2.0% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and incubating for 3 days at 30 °C. The fungal spores were extracted in 40 mL of the sterile 0.3% Tween 80 solution, and a Neubauer cell-counting chamber was used to determine the number of spores per mL in the spore suspension using an optical microscope.

2.4. Screening of different agro-industrial wastes for the production of L-asparaginase by the method of one-factor-at-a-time

Ten grams of each substrate (wheat bran, rice meal, passion fruit peel flour, soybean meal, chicken feather meal and chicken viscera meal) was taken separately in 125 mL Erlenmeyer flasks and moistened with water (60% moisture). The contents were thoroughly mixed, and the flasks were sterilized at 121 °C for 45 min and cooled to room temperature before use, accordance with the modified methodology of Kumar et al. (2013).

The approximate thickness of the bed formed by the agricultural wastes was averaged using a pachymeter and the measurements is presented as follows: wheat bran (9.44 ± 0.88), rice bran (6.00 ± 0.49), (9.41 ± 0.93), soybean meal (7.23 ± 1.23), chicken feather meal (5.01 ± 0.00), and viscera flour of chicken (3.60 ± 0.34).

The crude extract was obtained by the addition of 40 mL of distilled water. After 1 h at rest the solution was filtered through a filter membrane to obtain an enzyme solution free of any solid material. The enzyme extract was store at -15°C .

2.5. Determination of L-asparaginase activity

The activity of L-asparaginase was determined according to the methodology described by Imada et al. (1973) and modified by Dias and Sato (2016). The reaction mixture, composed of 0.5 mL of 0.04 M L-asparagine, 0.8 mL of 0.1 M pH 8.0 Tris-HCl buffer, and 0.2 mL of crude enzyme extract, was incubated at 40 °C for 30 min. The reaction was stopped by adding 0.5 mL of 1.5 M trichloroacetic acid. A 125- μL aliquot of the reaction mixture was diluted with 1 mL of distilled water and 125 μL of Nessler's reagent (Merck®). The absorbance was measured at 450 nm in a DU 640 spectrophotometer (Beckman Coulter, CA, USA). A standard curve with ammonium sulfate was used to quantify the released ammonia. The enzyme activity was expressed in U/gds of the dried substrate. One unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of enzyme that liberates 1.0 μmol of ammonia per minute under standard assay conditions.

2.6. Optimization of L-asparaginase production through response surface methodology

A central composite rotational design (CCRD) for three variables was employed to determine the optimum conditions for L-asparaginase activity. Three independent variables were studied in 17 experiments: temperature, moisture, and inoculum concentration. The relationship between the coded and real values of the independent variables for the CCRD is shown in Table 1.

Upon completion of the CCRD, the models were adjusted (Eq. (1)), and the response surfaces and contour curves were determined according to the methodology recommended by Rodrigues and Iemma (2014).

Table 1
Relationship between the coded and real values of the independent variables for L-asparaginase activity by *A. niger* LBA 02.

Variables	- 1.68	- 1	0	1	1.68
Temperature (°C)	22	25	30	35	39
Moisture (%)	33	40	50	60	67
Inoculum concentration (spores / g)	10^5	2.1×10^6	5.05×10^6	7.99×10^6	10^7

The “- 1.68” and the “+ 1.68” sign corresponds to the α -value.

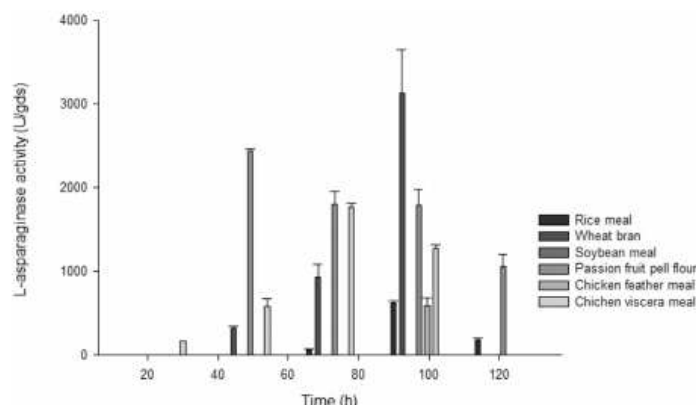


Fig. 1. Effect of various agro-industrial wastes on L-asparaginase production by *Aspergillus niger* LBA 02.

Table 2

Matrix of CCD 2³ (real and coded values) used for the L-asparaginase production by *Aspergillus niger* LBA 02 using passion fruit peel flour.

Run	Temperature (°C)	Moisture (%)	Inoculum concentration (spores / g)	L- asparaginase (U/gds)		
				24 h	48 h	72 h
1	– 1 (25)	– 1 (40)	– 1 (2.10 × 10 ⁶)	1607.50	1659.45	1921.96
2	1 (35)	– 1 (40)	– 1 (2.10 × 10 ⁶)	345.33	1185.99	1343.03
3	– 1 (25)	1 (60)	– 1 (2.10 × 10 ⁶)	3746.78	2497.66	1490.69
4	1 (35)	1 (60)	– 1 (2.10 × 10 ⁶)	33.33	1660.23	1250.45
5	– 1 (25)	– 1 (40)	1 (7.99 × 10 ⁶)	910.59	598.86	1536.79
6	1 (35)	– 1 (40)	1 (7.99 × 10 ⁶)	2016.89	1968.45	1806.73
7	– 1 (25)	1 (60)	1 (7.99 × 10 ⁶)	1315.79	1598.83	1511.40
8	1 (35)	1 (60)	1 (7.99 × 10 ⁶)	836.84	3384.80	1431.32
9	– 1.68(22)	0 (50)	0 (5.05 × 10 ⁶)	2317.19	1789.01	603.15
10	1.68 (39)	0 (50)	0 (5.05 × 10 ⁶)	269.94	943.63	1084.43
11	0 (30)	– 1.68 (33)	0 (5.05 × 10 ⁶)	1714.81	394.55	298.06
12	0 (30)	1.68 (67)	0 (5.05 × 10 ⁶)	2230.18	3458.95	844.57
13	0 (30)	0 (50)	– 1.68 (10 ⁵)	250.29	1124.21	1057.47
14	0 (30)	0 (50)	1.68 (10 ⁷)	551.58	1221.05	1433.27
15	0 (30)	0 (50)	0 (5.05 × 10 ⁶)	363.04	1991.58	364.86
16	0 (30)	0 (50)	0 (5.05 × 10 ⁶)	405.61	1936.84	367.99
17	0 (30)	0 (50)	0 (5.05 × 10 ⁶)	324.68	1739.42	379.71

Table 3

ANOVA for L-asparaginase production by *Aspergillus niger* LBA 02 using passion fruit peel flour.

Source of variation	SS	df	MS	F calculated	F tabulated	p
Regression	16180990	7	231157	4.54 × 10 ⁷	2.54	3.14 × 10 ^{–33}
Residue	239552	9	0.0509			
Total	16420542	16				
R ²	0.97					

^{SS} Sum of squares, ^{df} Degrees of freedom, ^{MS} Mean square.

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 \quad (1)$$

where β_0 is the intercept term, β_1, β_2 and β_3 are the linear coefficients; $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ are the quadratic coefficients; β_{12}, β_{13} and β_{23} are the interaction coefficients; and x_1, x_2 e x_3 are the coded variables. The model validation was performed through the repetition of a test in triplicate under conditions for the maximum L-asparaginase activity. The predicted L-asparaginase activity was then compared with the experimental data. The coefficient of determination R^2 and the F test (analysis of variance or ANOVA) were used to verify the quality of the equation-of-fit second-order model.

2.7. Statistical analysis

The statistical analyses were performed using the Statistica 13.3 software from TIBCO Software Inc. (Palo Alto, California, USA).

3. Results and discussion

3.1. Screening of various agro-industrial wastes for L-asparaginase production

Selection of appropriate substrate and optimum fermentation conditions is crucial to develop a selected microbial strain at the commercial level (Hymavathi et al., 2009). In the present study, different

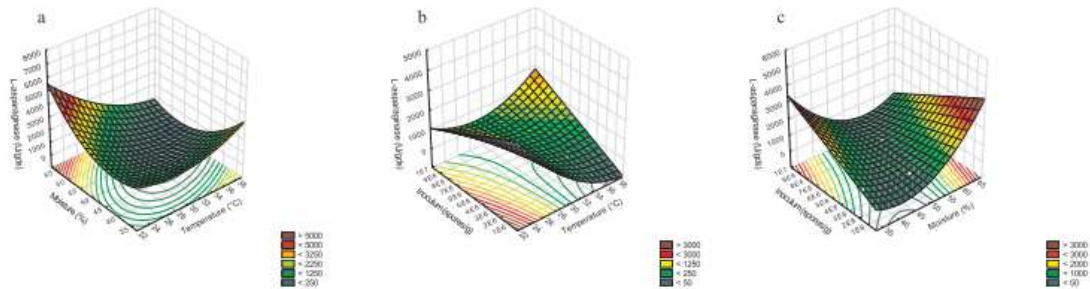


Fig. 2. Response surface plots showing the effect of temperature, inoculum concentration and moisture and their interactions on the production of L-asparaginase by *A. niger* LBA 02 under SSF using passion fruit peel flour as substrate.

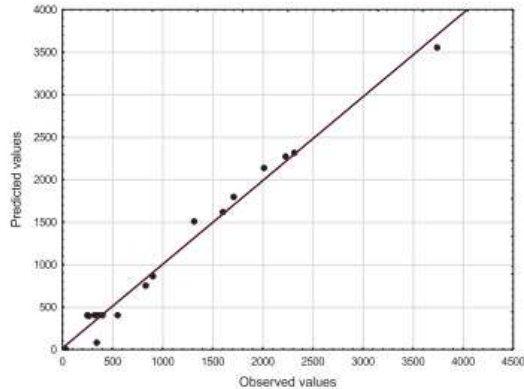


Fig. 3. The normal probability plot of the residuals of CCDF for L-asparaginase production by *A. niger* LBA 02 under SSF with passion fruit peel flour as substrate.

agro materials, wheat bran, soybean meal, rice meal, chicken feather meal, chicken viscera meal and passion fruit peel flour, were used for growth and L-asparaginase production by *Aspergillus niger* LBA 02 with an initial moisture content of 60% at $30 \pm 1^\circ\text{C}$ for 5 days. Among the agro materials, passion fruit peel flour, wheat bran, chicken viscera meal appeared to be the best substrates for L-asparaginase production (Fig. 1). Passion fruit peel flour proved to be the most suitable substrate for the growth and maximum production of L-asparaginase (2380.11 U/gds) at 48 h, demonstrating a productivity of 49.6 U/gds.h, followed by wheat bran (2264.91 U/gds) and viscera meal (2213.45 U/gds) at 96 h of fermentation, with a productivity of 23.6 U/gds.h and 23.0 U/gds.h, respectively.

Hymavathi et al. (2009) evaluated L-asparaginase production among different agricultural materials, red gram husk, Bengal gram husk, coconut, and groundnut cake. Among the selected materials, red gram husk supported the maximum asparaginase production (780 U/gds) followed by Bengal gram husk (600 U/gds). Groundnut (360 U/gds) and coconut oil cake (380 U/gds) demonstrated the importance of

the nature of agro-materials in enzyme production by *Bacillus circulans* (MTCC 8574). Meghavarnam et al., (2017) studied the production of L-asparaginase by *Fusarium culmorum* (ASP-87) under solid-state fermentation on a laboratory scale using sixty-five (65) agro-based materials. Among the different agro-based materials evaluated, soybean meal supported maximum L-asparaginase production (7.21 U/gds).

In another study, Kumar et al. (2013) tested the production of L-asparaginase from *Cladosporium* sp. under solid-state fermentation (SSF) using agro-industrial residues, wheat bran, rice bran, bagasse, paddy straw, ragi straw, corn pith, maize straw, maize cob, dry leaves. Wheat bran, as the sole source for growth in SSF, supported maximum enzyme production of 11 U/mg/min by *Cladosporium* sp. followed by rice bran (7.8 U/mg/min) and bagasse (4 U/mg/min). Swathi et al. (2014) studied different substrates, rice husk, wheat bran, coconut oilcake, black gram husk, and green gram husk, which were used as carbon sources; fermentation studies were carried out separately for each agro-material. Among all these agro-materials, wheat bran produced the maximum asparaginase titer (33.2 U/gds), whereas minimum production (7.19 U/gds) was noticed with black gram husk.

The screening of the best agro-waste as a substrate for maximum enzyme production in the SSF process mainly depends upon its easy degradation into nutrients and uptake by the fungus to synthesize the targeted metabolite and its cost-effectiveness and availability in nature (Dutta et al., 2015). Wheat bran was considered as the universal substrate among various substrates because it acts as a complete nutritious feed for microorganisms, has all the ingredients and remains loose even under moist conditions, thus providing a large surface area (Archana and Satyanarayana, 1997).

However, our study revealed that passion fruit peel flour was the most suitable substrate for the enhanced production of L-asparaginase. Brazil is of prominence in the production and export of coffee, sugar cane, soybeans, fruit and other products. Passionfruit processing generates a significant amount of residues, including peel. It is estimated that the residue from the production of passion fruit juice reaches 52% of the amount of processed fruits (Zilly et al., 2012). Brazil is the world leader in the production of yellow passion fruit, with volumes reaching 694,539 t in 2015 (IBGE, 2015). As consequence, a large quantity of passion fruit waste is generated. Currently, its main use in Brazil is as a supplement to animal feed, which presents several transport and storage problems due its high moisture content (Almeida et al., 2015). In

Table 4
The levels of variables used for the experimental validation test of the model.

Independent variables			L-asparaginase activity (U / gds) 24 h		
Temperature	Moisture	Inoculum concentration	Predicted result	Experimental result	Error (%)
- 1 (25 °C)	1 (60%)	- 1 (2.10×10^6 spores/g)	3412.90 ^a	3023.98 $\pm$ 30.82 ^a	- 12.86

The results are presented as mean (n = 3) $\pm$ SD. The results with same letters are not significantly different as determined by Tukey's test, with $p < 0.05$.

recent years, some applications suggested for these residues are their utilization as substrates for microbial fermentation bioprocesses as a medium for the production of enzymes such as proteases (Barbosa et al., 2014), cellulases (Costa et al., 2017) and pectinases (Damásio et al., 2011). Therefore, further optimization studies were performed using passion fruit peel flour as solid support/substrate medium for L-asparaginase production.

3.2. Optimization and validation of the experimental model for L-asparaginase production

Experiments were performed according to the design matrix with coded levels of variables, as shown in Table 1. The experimental responses of L-asparaginase production for the different trials are shown in Table 2.

According to Table 2, a variation in L-asparaginase activity was observed from 33.33 U/gds (Treatment 4) to 3746.78 U/gds (Treatment 3) in 24 h of fermentation. This wide variation of L-asparaginase production reflects the importance of the optimization of medium constituents by *Aspergillus niger* LBA 02 using agro-industrial wastes. A comparison of the parameters studied in these experiments showed that the maximum L-asparaginase activity was obtained when *Aspergillus niger* LBA 02 was grown using the optimized conditions of passion fruit peel flour with an initial moisture content of 60%, inoculum concentration of 2.1×10^6 spores/g, after 24 h of fermentation at 25 °C.

Hymavathi et al. (2009) evaluated the L-asparaginase production by *Bacillus circulans* (MTCC 8574) under solid-state fermentation (SSF). For optimization the authors analyzed the factors as incubation temperature, moisture content, inoculum level, glucose, and L-asparagine using fractional factorial central composite design (FFCCD). Only L-asparagine and incubation temperature were significant, and the L-asparaginase yield improved from 780 to 2322 U/gds, which is more than 300% using FFCCD as a means of optimizing conditions.

The *Aspergillus niger* LBA 02 showed a higher potential in L-asparaginase production compared with previous studies in other microorganisms.

From the experimental data presented in Table 2, a multiple regression analysis was conducted for L-asparaginase activity in 24 h of fermentation. The parameters were considered significant at $p < 0.05$. An equation for L-asparaginase activity (Eq. (2)) was developed based on regression analysis, and the statistical significance of the model equation was assessed by ANOVA (Table 3), where: x_1 , temperature, x_2 , moisture and x_3 , inoculum concentration.

$$L = \text{asparaginase activity (U/g)} = 359.42 - 579.74 x_1 + 346.00 x_1^2 + 140.86 x_2 + 586.54 x_2^2 - 504.56 x_1 x_2 + 700.37 x_1 x_3 - 325.26 x_2 x_3 \quad (2)$$

Through regression analysis, a negative effect could be observed in the linear temperature term, indicating that the increase of this factor decreased the production of the enzyme. Moisture had a significant positive effect on the linear term of the equation, indicating that an increase in this variable increases the production of the enzyme. It can be also observed that all interactions between the factors were significant ($p < 0.05$).

Among the several factors that are important for microbial growth and enzyme production under SSF, the initial moisture content of the substrate is the most important factor influencing the growth, biosynthesis, and secretion of different metabolites (Pandey et al., 2000). However, according to Singhania et al., (2009) moisture contents ranging from 40% to 60% are sufficient for fungi development. High moisture content can affect oxygen transfer, reduction in substrate porosity and decrease fungal growth (Baysal et al., 2003).

The interaction effects and optimal levels of the factors were determined by plotting the three-dimensional response surface (Figs. 2a – 2c). It is possible to observe that the L-asparaginase production

increased with increase in moisture content when incubation temperature was maintained at the lower level (Fig. 2a). Fig. 2b represents the L-asparaginase activity as a function of temperature and inoculum concentration; in this case, the production of L-asparaginase increased with the decrease in inoculum concentration and at the lower values of incubation temperature. Fig. 2c showed that the maximum L-asparaginase production was reached with increasing moisture content and inoculum concentration.

The outcome of ANOVA analysis revealed that the adjusted model was significant, according to the analysis of the F test. The regression model for L-asparaginase production was highly significant ($p < 0.05$) with a satisfactory value of determination coefficient ($R^2 = 0.97$). In the Fig. 3, a plot of normal probability of the experimental results was presented. The normal probability plot of the residuals showed the points close to a diagonal line; therefore, the residuals appear to be approximately normally distributed. This was an indicative that the model was well fitted with the experimental results.

Validation experiments were performed using the following parameters: 60% moisture, inoculum of 2.1×10^6 spores/g an incubation temperature of 25 °C (Run 3), which yielded higher enzymatic activity at 24 h of fermentation. The predicted L-asparaginase activity in these conditions was 3412.90 U/gds, and the observed mean value of the experimental assays was 3023.98 U/gds (Table 4).

There was no statistically significant difference ($p < 0.05$) between the predicted activity and the observed experimental value, indicating that the results obtained in the validation test were satisfactory. The optimized medium showed a marked increase of 57% in L-asparaginase production compared with the initial values obtained in the “one-factor-at-a-time” method to L-asparaginase production by *A. niger* under SSF using passion fruit peel flour as substrate.

4. Conclusion

The sequential strategy for optimization of bioprocesses using the “one-factor-at-a-time” method and the Central Composite Rotatable Design (CCRD) proved to be effective in improving L-asparaginase production by *Aspergillus niger* LBA 02. Among the substrates analyzed, the highest L-asparaginase activity was obtained using passion fruit peel flour. It was observed that the process optimization resulted in a 57% increase in enzyme production compared with the initial values obtained using the “one-factor-at-a-time” method. The use of passion fruit peel, an abundant and low-cost substrate, in these biotechnological processes, promises not only to add value and decrease the amount of this waste, but also to reduce L-asparaginase production cost.

Acknowledgments

The authors are grateful to CAPES and CNPQ for financial support.

References

- Almeida, J.M., Lima, V.A., Giloni-Lima, P.C., Knob, A., 2015. Passion fruit peel as novel substrate or enhanced β -glucosidases production by *Penicillium verrucosum*: potential of the crude extract for biomass hydrolysis. *Biomass Bioenergy* 72, 216–226.
- Archana, S., Satyanarayana, T., 1997. Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A99 in solid-state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 21, 12–17.
- Balakrishnan, K., Pandey, A., 1996. Production of biologically active secondary metabolites in solid state fermentation. *J. Sci. Ind. Res.* 55, 365–372.
- Batool, T., Makky, E., Jalal, M., Yusoff, M.A., 2016. Comprehensive review on L-asparaginase and its applications. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 178, 900–923.
- Barbosa, J.B., Gentil, N.O., Ladeira, S.A., Martins, M.L.L., 2014. Cheese whey and passion fruit rind flour as substrates for protease production by *Bacillus* sp. SMIA-2 strain isolated from Brazilian soil. *Biocatal. Biotransformation* 32, 244–250.
- Baysal, Z., Uyar, F., Aytekin, C., 2003. Solid state fermentation for production of α -amylase by a thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot-spring water. *Process Biochem.* 38, 1665–1668.
- Bennett, J.W., 1985. *Molds, manufacturing and molecular genetics*. In: Timberlake, W.E. (Ed.), *Molecular Genetics of Filamentous Fungi*. Alan R. Liss, Inc, New York.
- Costa, E.A., Nunes, R., Cruz, E., Ladeira, S.A., Moraes, L.P., Carvalho, R.V., Martins, M.L.L., 2017. Sugarcane bagasse and passion fruit rind flour as substrates for

- cellulose production by *Bacillus* sp. SMIA-2 strain isolated from Brazilian soil. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2, 1–8.
- Damásio, A.R.L., Maller, A., Silva, T.M., Jorge, J.A., Terenzi, H.F., Polizeli, M.L.T.M., 2011. Biotechnological potential of alternative carbon sources production of pectinases by *Rhizopus microporus* var. *rhizopodiformis*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 54, 141–148.
- Dias, F.F.G., Castro, R.J.S., Ohara, A., Nishide, T.G., Bagagli, M.P., Sato, H.H., 2015. Simplex centroid mixture desing to improve L-asparaginase production in solid-state fermentation using agroindustrial wastes. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 4, 528–534.
- Dias, F.F.G., Sato, H.H., 2016. Sequential optimization strategy for maximum L-asparaginase production from *Aspergillus oryzae* CCT 3940. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 6, 33–39.
- Dutta, S., Ghosh, S., Pramanik, S., 2015. L-asparaginase and L-glutaminase from *Aspergillus fumigatus* WL002: production and some physicochemical properties. *Appl. Biochem. Microbiol.* 51, 425–431.
- El-Naggar, N. El-A., Moawad, H., El-Shweihy, N.M., El-Ewasy, S.M., 2014. Optimization of culture conditions for production of anti-leukemic glutaminase free L-asparaginase by newly isolated *Streptomyces olivaceus* NEAE-119 using response surface methodology. *Biomed. Res. Int.* 2015, 1–17.
- Gurunathan, B., Sahadevan, R., 2012. Optimization of culture conditions and bench-scale production of L-asparaginase by submerged fermentation of *Aspergillus terreus* MTCC 1782. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 923–929.
- Hymavathi, M., Sathish, T., Rao, C.S., Prakasham, R.S., 2009. Enhancement of L-asparaginase production by isolated *Bacillus circulans* (MTCC 8574) using response surface methodology. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 159, 191–198.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), 1994. Acrylamide. In: IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans.
- IBGE, 2015. Brazilian Institute of Geography and Statistics Municipal agricultural production e temporary and permanent crops. Rio de Janeiro (Brazil): IBGE. Available from: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2015_v42_br.pdf>.
- Imada, A., Igarasi, S., Nalkahama, K., Isono, M., 1973. Asparaginase and glutaminase activities of microorganisms. *J. Gen. Microbiol.* 76, 85–99.
- Kumar, N.S.M., Ramasamy, R., Manonmani, H.K., 2013. Production and optimization of L-asparaginase from *Cladosporium* sp. using agricultural residues in solid state fermentation. *Ind. Crops Prod.* 43, 150–158.
- Mashburn, L.T., Wriston Jr., J.C., 1964. Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 105, 450–453.
- Meghavarnam, A.K., Janakiraman, S., 2017. Solid state fermentation: an effective fermentation strategy for the production of L-asparaginase by *Fusarium culmorum* (ASP-87). *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 11, 124–130.
- Mottram, D.S., Wedzicha, B.L., Dodson, A., 2002. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* 419, 448–449.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Mitchell, D., 2000. New development in solid state fermentation: bioprocesses and products. *Process Biochem.* 35, 1153–1169.
- Patro, K., Basak, U., Mohapatra, A., Gupta, N., 2014. Development of new medium composition for enhanced production of L-asparaginase by *Aspergillus flavus*. *J. Environ. Biol.* 35, 295–300.
- Rodrigues, M.L., Iemma, A.F., 2014. Experimental Design and Process Optimization. CRC Press, Campinas.
- Swathi, N., Kamalakumari, P.V., Girija, S.G., Prabhakar, T., 2014. Production of L-asparaginase by solid substrate fermentation using marine fungus. *BMR Biochem.* 1, 1–9.
- Shrivastava, A., Khan, A.A., Shrivastav, A., Jain, S.K., Singhal, P.K., 2012. Kinetics studies of L-asparaginase from *Penicillium digitatum*. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 42, 574–581.
- Thomas, L., Larroche, C., Pandey, A., 2013. Current developments in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 61, 146–161.
- Uppuluri, K.B., Dasari, R.K.V.R., Sajja, V., Jacob, A.S., Reddy, D.S.R., 2013. Optimization of L-asparaginase production by isolated *Aspergillus niger* C4 from sesame (black) oil cake under SSF using Box-Behnken design in column bioreactor. *Int. J. Chem. React. Eng.* 11, 103–109.
- Zilly, A., Bazanella, G.C.S., Helm, C.V., Araujo, C.A.V., Souza, C.G.M., Bracht, A., Peralta, R.M., 2012. Solid-state bioconversion of passion fruit waste by white-rot fungi for production of oxidative and hydrolytic enzymes. *Food Bioprocess Technol.* 5, 1573–1580.
- Zuo, S., Zhang, T., Jiang, B., Mu, W., 2015. Recent research progress on microbial L-asparaginases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 1069–1079.

8.19. Anexo 19




 Home
  Help
  Email Support
  Sign in
  Create Account



Fungal L-asparaginase: Strategies for production and food applications

Author:
 Marília Crivelari da Cunha, Jessica Gonçalves dos Santos Aguiar, Ricardo Rodrigues de Melo, Sheila Tiemi Nagamatsu, Faraat Ali, Ruann Janser Soares de Castro, Hélia Harumi Sato

Publication: Food Research International

Publisher: Elsevier

Date: December 2019

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

BACK

CLOSE WINDOW

© 2020 Copyright - All Rights Reserved | Copyright Clearance Center, Inc. | [Privacy statement](#) | [Terms and Conditions](#)
 Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customer@copyright.com

8.20. Anexo 20

Food Research International 126 (2019) 108658



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

Review

Fungal L-asparaginase: Strategies for production and food applications

Marília Crivelari da Cunha^{a,*}, Jessika Gonçalves dos Santos Aguilar^a, Ricardo Rodrigues de Melo^b, Sheila Tiemi Nagamatsu^c, Faraat Ali^d, Ruann Janser Soares de Castro^a, Hélia Harumi Sato^a^a Department of Food Science, School of Food Engineering, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil^b Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory (CTBE), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Campinas, SP, Brazil^c Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil^d Pharmaceutical Chemistry Division, Indian Pharmacopoeia Commission, Ministry of Health & Family Welfare, Government of India, Sector-23, Rajnagar, Ghaziabad, Uttar Pradesh 201002, India

ABSTRACT

L-asparaginase (L-asparagine amidohydrolase EC 3.5.1.1) is of great importance in pharmaceutical and food applications. This review aims to describe the production and use of fungal L-asparaginase focusing on its potential as an effective reducer of acrylamide in different food applications. Fungal asparaginases have been used as food additives and have gained importance due to some technical advantages, for example, fungi can grow using low-cost culture mediums, and the enzyme is extracellular, which facilitates purification steps. Research aimed at the discovery of new L-asparaginases, mainly those produced by fungi, have great potential to obtain cheaper enzymes with desirable properties for application in food aiming at the reduction of acrylamide.

1. Introduction

Acrylamide is known to be a neurotoxic, genotoxic, and carcinogenic substance in animal tests (Pennisi et al., 2013) and it was classified as a probable human carcinogen (IARC, 1994). This substance is formed by the Maillard reaction in food containing L-asparagine and reducing sugars, such as glucose and fructose, heated at high temperatures and low humidity. This reaction also forms desirable compounds of color, flavor, and aroma (Thomas & Thomas, 2014) in cooked or fried food. According to the European Food Safety Authority, the most important food groups contributing to exposure to acrylamide are French fries, bakery products, and coffee (EFSA, 2015).

To mitigate acrylamide levels in bread, biscuits, potato chips, coffee, and others food containing L-asparagine and reducing sugars, the food industry faces the challenges of changing pre-set process parameters without compromising the texture, taste, or appearance of its products (Friedman, 2015). The use of the enzyme L-asparaginase presents high technological potential to reduce the acrylamide content in thermally treated food without compromising their sensorial or nutritional aspects (Hendriksen, Kornbrust, Østergaard, & Stringer, 2009). L-asparaginase (L-asparagine amidohydrolase, EC 3.5.1.1) is an enzyme capable of catalyzing the hydrolysis of L-asparagine into L-aspartic acid and ammonia, thereby reducing the content of L-asparagine, the precursor amino acid of this toxic compound (Capuano & Fogliano, 2011).

L-asparaginases are widely distributed in plants, animals, and microorganisms (Batool, Makky, Jalal, & Yusoff, 2016; Zuo, Zhang, Jiang,

& Mu, 2015). However, the most important source of L-asparaginase is microorganisms (Lopes, Oliveira-Nascimento, Ribeiro, Breyer, et al., 2017). To treat of some types of leukemia and lymphoma, bacterial L-asparaginase is used as an injectable drug (Batool et al., 2016), particularly in children with acute lymphoblastic leukemia (Izadpanah, Homaei, Fernandes, & Javadpour, 2018). For pharmaceutical uses, L-asparaginase is obtained from *Escherichia coli* and *Erwinia carotovora* (also known as *Erwinia chrysanthemi*) (Cachumba et al., 2016). However, the bacterial source of this enzyme may cause allergic reactions (Izadpanah et al., 2018). Therefore, it is necessary to search for other microbial sources of L-asparaginase, such as eukaryotic microorganisms, thus obtaining an enzyme with fewer adverse effects (Patro & Gupta, 2012).

Currently, fungal L-asparaginases are considered safe by JECFA (2007) and are used as food additives (Xu, Oruna-Concha, & Elmore, 2016). However, the yield of L-asparaginase produced is not enough to meet the demand (Jha et al., 2012) creating the need for new techniques to increase the yield, such as the use of statistical tools. For enzyme production, other fermentation methods have been adopted, such as the solid-state fermentation, since it has more advantages than the submerged fermentation, industrially used (Thomas, Larroche, & Pandey, 2013). In the present review, fungal sources of L-asparaginase are discussed: general aspects, methods for enzyme production, purification, and applications in food.

* Corresponding author.

E-mail addresses: marilia.crivelari@gmail.com (M.C. da Cunha), ruann@unicamp.br (R.J.S. de Castro), heliah@unicamp.br (H.H. Sato).<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108658>

Received 24 March 2019; Received in revised form 30 August 2019; Accepted 6 September 2019

Available online 09 September 2019

0963-9969/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

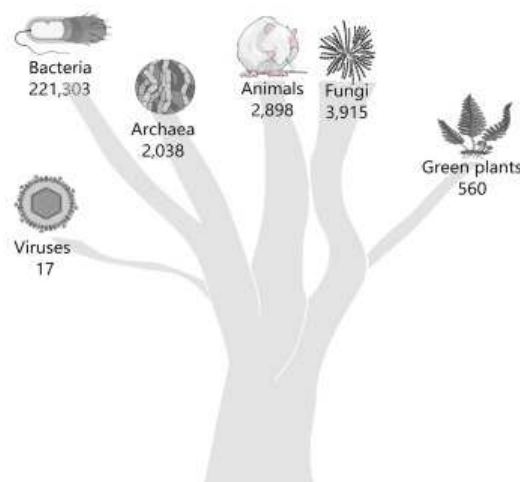


Fig. 1. Distribution of L-asparaginase according to the National Biotechnology Information Center (NCBI).

2. Fungal L-asparaginase

2.1. General aspects

L-asparaginase (L-asparagine amidohydrolase, EC 3.5.1.1) can be found from microorganisms (bacteria, fungi, yeasts, actinomycetes and algae) to higher organisms (plants, vertebrates and animal tissues) (Zuo et al., 2015). According to the National Center for Biotechnology Information (NCBI), L-asparaginase sequences are mainly distributed in the bacterial kingdom, accounting for 95.5% of deposited protein sequences (221,303 of 231,770 protein sequences). However, L-asparaginase can also be found in the fungi (1.68%), animal (1.25%), plant (0.24%), archaea (0.88%), and virus (< 0.01%) kingdoms (Fig. 1).

The search for other sources of L-asparaginase, for instance eukaryotic microorganisms, becomes important. Eukaryotic microorganisms such as yeasts and filamentous fungi have potential for the production of L-asparaginase (Baskar, Sriharini, Sripriya, & Renganathan, 2010). The L-asparaginases sequences from kingdom fungi are divided into six subclasses: ascomycetes (85.2%), basidiomycetes (11.1%), chytrids, glomeromycetes, microsporidians, and blastocladiomycetes (< 1% each). From all fungi database, 212 sequences were used to construct the phylogenetic tree (Fig. 2) with sequences that aligned to an *Aspergillus niger* L-asparaginase. The distribution shifts the percentage of sequences by subclass basidiomycetes to ascomycetes, with 11 basidiomycetes (5.1%), and 199 ascomycetes (divided into ascomycetes, budding yeasts and fission yeasts). This difference can be explained by an increase in the proportion of well annotated L-asparaginase in budding yeasts strains, mainly of the genus *Candida* which represent 12.7% of the proteins used in phylogeny.

Microorganisms are considered the most important source of L-asparaginase, since the anti-tumor L-asparaginase activity of *Escherichia coli* (Mashburn & Wriston Jr., 1964) was first reported. Microorganisms can produce several types of L-asparaginase that differ in their location (intracellular and extracellular) and properties (Zuo et al., 2015). Fungal L-asparaginases have become important because they are excreted in the extracellular environment, are easy to extract, and process downstream (Batoool et al., 2016; El-Naggar, El-Ewasy, & El-Shweihy, 2014). Among the fungi producing L-asparaginase, the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, and *Cladosporium* (Kumar & Manonmani, 2013; Lincoln, Niyonzima, & More, 2015; Patro, Basak,

Mohapatra, & Gupta, 2014; Shrivastava, Khan, Shrivastav, Jain, & Singhal, 2012) can be highlighted. Some genera, however, may produce mycotoxins, among them aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, among others. Mycotoxins are secondary metabolites that have toxic effects for humans (Maziero & Bersot, 2010).

Fungal L-asparaginases used in the food industry are considered GRAS (Generally Recognized as Safe) and are obtained from *A. oryzae* and *A. niger*. Commercially, PreventAse® (DSM) and Acrylaway® (Novozymes) preparations are currently available for the reduction of acrylamide in the food industry. PreventAse was obtained by *Aspergillus niger*, presenting an optimal pH between 4 and 5 and an optimum temperature of 50 °C (Xu et al., 2016). PreventAse® reduces the formation of acrylamide in high pH (up to 9) applications such as corn chips, biscuits, and crackers (DSM, 2018).

The company Novozymes S/A developed the production of the L-asparaginase based on the cloning of *Aspergillus oryzae*. L-asparaginase from *A. oryzae* presents an optimum pH between 6 and 7, with good activity in the range between pH 5 and 8 and optimum temperature of 60 °C (Pedreschi, Kaack, & Granby, 2008). These products can be used as co-adjuvants of the technology and are currently used in several countries, such as the United States, Australia, New Zealand, China, Russia, Mexico, and several European countries (Xu et al., 2016).

However, food composition may influence the action of enzymes (Xu et al., 2016). Therefore, the ideal L-asparaginase enzyme for food use should be stable during food processing and proteolysis and not induce allergic or toxic effects after consumption (Friedman, 2015).

2.2. Production of L-asparaginase by fungi

Different methods are used for production of L-asparaginase, such as solid-state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SF) using different microorganisms (Batoool et al., 2016). The SF processes are well established and provide good yield, but generate large amounts of wastewater and have a high production cost (Izadpanah et al., 2018). On the other hand, SSF is an attractive alternative for SF and has great potential for enzyme production. SSF has achieved great relevance in bioprocesses, as it uses low cost agroindustrial waste as a substrate and offers potential environmental benefits (Thomas et al., 2013). In addition, this type of fermentation resembles the natural habitat of microorganisms and is well adapted to the metabolism of fungi (Singhania, Patel, Soccol, & Pandey, 2009).

There are several important factors that have a huge impact on SSF success. These factors include pH, temperature, aeration, water and moisture activity, origin of the solid substrate, and particle size and shape. Among several critical factors, the moisture and origin of the solid substrate are the most important factors affecting SSF processes. The selection of moisture depends on the microorganism employed and on the origin of the substrate. The fungi need low humidity between 40 and 60%, however, the selection of the substrate depends on several factors, mainly related to availability and cost (Singhania et al., 2009).

Solid substrates, mainly residues or agricultural by-products, are being used as substrates for fungal L-asparaginase production (Dias et al., 2015; Kumar & Manonmani, 2013; Meghavarnam & Janakiraman, 2017; Mishra, 2006). These substrates act as physical support and source of nutrients for the production of enzymes. Therefore, for the commercial production of the enzyme the selection of an appropriate substrate is an important step (Meghavarnam & Janakiraman, 2017). Table 1 shows different substrates, the parameters used in the solid-state fermentation, and the maximum activity of L-asparaginase by the fungi.

The industrial production of bacterial and fungal L-asparaginase worldwide is mainly performed by SF (Kumar & Manonmani, 2013). L-asparaginase production is strongly influenced by the composition of the fermentation medium, especially carbon and nitrogen sources, and physical factors such as temperature, pH, agitation, inoculum concentration, and fermentation time (Baskar et al., 2010; Hymavathi,

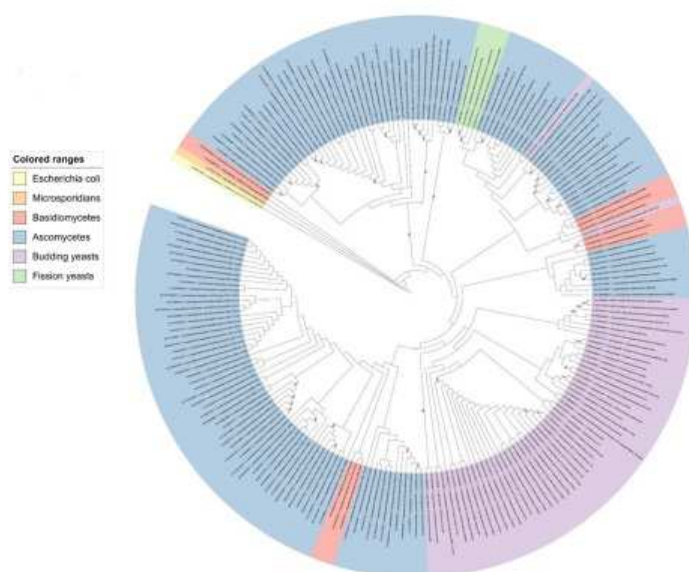


Fig. 2. Phylogenetic distribution of L-asparaginase in kingdom fungi. In the phylogenetic tree construction, 3915 protein sequences were blasted against an *Aspergillus niger* L-asparaginase, being keeping all sequences with p -value alignment $> 1.e-05$. Then, were filtered to eliminate hypothetical proteins, and maintain only the highest sequence for each strain. The sequence of *E.coli* (L-asparaginase 1) was applied as an external group to those 212 sequences remained. All sequences were aligned with MAFFT (version 7 - <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) using auto strategy. To phylogeny tree was used Neighbor joining method to all gap-free sites (30AAs) and 1000 bootstraps in MAFFT server. The Tree was design in iTOL software (<https://itol.embl.de/>).

Sathist, Rao, & Prakasham, 2009; Souza et al., 2017). Each organism has its own special conditions for the maximum production of enzymes, so the optimization of average components and culture parameters is essential in the biological process (Souza et al., 2017). Table 2 shows different substrates for culture medium and the parameters used in the submerged fermentation and the maximum activity of L-asparaginase by the fungi.

Different substrates for culture medium have been exploited to produce L-asparaginase. However, the most important components in the fermentation medium are the carbon source and the nitrogen source (Cachumba et al., 2016). The influence of various carbon sources such as glucose, sucrose, fructose, lactose, maltose, and starch have been studied and several studies have suggested that glucose is the best carbon source to produce this enzyme (Doriya & Kumar, 2016). However, it is known that the synthesis of L-asparaginase requires low concentration of carbon sources since it is under catabolic repression (Mukherjee, Majumdar, & Scheper, 2000). Some studies suggest that, in the case of L-asparaginase biosynthesis, the depressive effect of carbohydrates may be a function of the ability to lower pH of the fermentation medium (Heinemann & Howard, 1969; Mukherjee et al., 2000).

Nitrogen is an important nutrient for microorganisms (Stanbury, Whitaker, & Hall, 1995). Several studies have shown that the best nitrogen sources to achieve high yields of L-asparaginase are L-asparagine (Doriya & Kumar, 2016; Farag, Hassan, Beltagy, & El-Shenawy, 2015), and L-proline (Sarquis, Oliveira, Santos, & Costa, 2004). In addition to these two amino acids, other nitrogen sources were also considered important for the production of L-asparaginase, such as urea (Baskar et al., 2010), yeast extract, and peptone (Baskar & Renganathan, 2010). Although L-asparagine is an inducer in the production of L-asparaginase, this amino acid can also be considered a limiting factor for the production of this enzyme (Baskar & Renganathan, 2011).

The pH of the fermentation medium plays a vital role in the transport of several nutrients through the cell membrane and in the increase of L-asparaginase production (Farag et al., 2015). In most studies on fungal L-asparaginase production, culture medium in the range of pH 6.3 to 9.0 was used for optimum enzyme production (Kumar & Manonmani, 2013; Dange & Peshwe, 2011). In relation to the

temperature, a range between 30 and 37 °C for the optimum production of this enzyme was reported for fungal species (Dange & Peshwe, 2011; Elshafei, Hassan, Abouzeid, Mahmoud, & Elghonemy, 2012; Kumar & Manonmani, 2013; Thakur, Lincoln, Niyonzima, & More, 2014). Most studies have shown that using agitation around 160 rpm and 4 or 5 days of incubation, at temperatures of 30 °C, the production of fungal L-asparaginase is easily observed (Souza et al., 2017).

The evaluation of nutritional requirements and physical conditions is an important step in the development of bioprocesses (Baskar & Renganathan, 2011). Currently, optimization methods are used to make a bioprocess economically viable. Some statistical methods of experimental planning have been used to optimize the process of L-asparaginase production from fungi (Souza et al., 2017). The traditional technique of one factor at a time used to optimize a multivariate system leads to errors in interpretation of results, since it neglects the effects of interactions among factors (El-Naggar et al., 2014).

The use of experimental planning eliminates the disadvantages of using the one factor at a time technique (El-Naggar et al., 2014). This optimization process involves three main steps: (i) performing the experiments using a statistically designed matrix, (ii) estimating the coefficients in a mathematical model, predicting their response, and (iii) verifying the suitability of the model (Kumar & Manonmani, 2013). This technique has several advantages that include requiring a smaller number of experiments, application in experiments with several factors, besides considering the interaction between these, and to generate a mathematical model, facilitating the discovery of the most adequate condition and the prediction of response (El-Naggar et al., 2014).

Statistical tools such as Plackett-Burman planning and surface response methodology have been used in several optimization studies. Another statistical tool, artificial neural network coupled to the genetic algorithm, has also been used in optimization studies in bioprocesses (Baskar & Renganathan, 2012). In addition, other types of statistical methods have been used to optimize L-asparaginase production by fungi, such as Simplex Mixture design (Dias et al., 2015), Box-Behnken design (Uppuluri, Dasari, Sajja, Jacob, & Reddy, 2013), and Latin Square design (Baskar et al., 2010).

Baskar and Renganathan (2012) used the strategy of sequential

Table 1
Types of solid substrates, parameters used in solid state fermentation and maximum L-asparaginase activity.

Microorganism	Solid substrate	pH	Temp. (°C)	Moisture (%)	L-asparaginase activity	Reference
<i>Aspergillus niger</i>	Soybean bran	6.5	30 ± 2	70	46.9 ± 3.35 U/g	Mishra (2006)
<i>Aspergillus niger</i> LEA 02	Passion fruit peel meal	–	30	60	3746.78 U/gds	Cunha, Silva, Sato, and Castro (2018)
<i>Aspergillus</i> sp.	Mixture of cotton seed cake (2/3), wheat bran (1/6), and red gram husk (1/6)	8	35	70	12.57 U/mL	Deyra and Kumar (2018)
<i>Aspergillus fumigatus</i> W1002	Wheat bran	5	37	90	360 IU/mg of protein	Datta et al. (2015)
<i>Aspergillus niger</i> C4	Sesame (black) oil cake	6.5	29.31	96.02	355.88 U/gds	Lipuluri et al. (2013)
<i>Aspergillus niger</i> LEA 02	Mixture of wheat bran (1/3), soybean meal (1/3) and cottonseed meal (1/3)	–	30	50	89.22 U/g	Das et al. (2015)
<i>Trichoderma viride</i>	Mixture of rice husk and wheat bran (3/2)	5	28	75	71.87 ± 3.19 U/gds	Ebrahimi and El-Ghosemy (2015)
<i>Cladosporium</i>	Wheat bran	5.8	30	58	3.74 U	Kumar and Manohari (2013)
<i>Fusarium equiseti</i>	Soybean meal	7	45	70	3.26 IU	Kalwal and Hosamani (2011)
<i>Fusarium culmorum</i> (ASP-87)	Soybean meal	7	30	70	7.21 U/gds	Megharani and Janakiraman (2017)

Table 2
Types of culture media, C and N sources, parameters used in submerged fermentation and maximum L-asparaginase activity.

Microorganism	Medium	Carbon source (w/v)	Nitrogen source (w/v)	pH	Temp. (°C)	Agitation rate	Spore concentration	L-asparaginase activity	Reference
<i>Aspergillus oryzae</i>	Capeck-Dox	0.2% glucose	1% L-asparagine	6.2	30	–	1% spore suspension	386.14 IU/mL	Dange and Pendhwe (2011)
<i>Aspergillus oryzae</i> OCT 3940	Modified Capeck-Dox	0.5% glucose	2% L-proline, 0.2% L-asparagine and 0.5% yeast extract	8	30	150 rpm	3 × 10 ⁷ spores	67.49 U/mL	Dias and Sato (2016)
<i>Aspergillus terreus</i> MTCC 1782	Modified Capeck-Dox	0.2% glucose	1% L-asparagine	6.2	30	180 rpm	5 × 10 ⁷ spores	33.59 U/mL	Doritya and Kumar (2016)
<i>Aspergillus terreus</i> MTCC 1782	Modified Capeck-Dox	1.5% corn flour and 0.2% glucose	1% urea	6.2	30	160 rpm	10 ⁷ to 10 ⁸ spores/mL	33.25 U/mL	Basak et al. (2010)
<i>Aspergillus terreus</i> MTCC 1782	Capeck-Dox	0.64% glucose	1.8% L-asparagine	5.85	32.08	123.5 rpm	1% spore suspension	38.57 U/mL	Bankar and Rengnathan (2011)
<i>Macrorhizella</i>	Modified Capeck-Dox	0.4% glucose	1.25% L-asparagine	7	30	–	5 mm disc of inoculum	1203.55 U	Thakur et al. (2014)
<i>Trichoderma viride</i> sp.	Modified Capeck-Dox	0.6% maltose	0.5% peptone	6.5	37	–	5 mm disc of inoculum	~650 U/mL	Lincoln et al. (2015)

Table 3
Purification and properties of some fungal L-asparaginases.

Microorganism	Method of purification	Specific activity (IU/mg of protein)	Purification fold	Molecular weight	Activity		Km	Vmax	Reference
					pH	Temp (°C)			
<i>Aspergillus oryzae</i>	Ammonium sulfate precipitation, Dialysis, G-25 column, G-150 column	207	267.75	–	9	30	12.5×10^{-3} M	104.16 IU/ mL	Dange and Benschow (2011)
<i>Aspergillus fumigatus</i> W1002	Ultrafiltration (30 kDa), Ammonium sulfate precipitation (60%), DEAE-Sephacrose column, Sephadex G-100	355.03	232.04	35 kDa	9.5	50	7.02×10^{-3} M	355.3 μ mol/ mg. min	Datta et al. (2015)
<i>Aspergillus niger</i> AKV-MKEU	Barbit precipitation, DEAE cellulose	46.75	10.36	~90 kDa	7	30	0.8141 mM	6.228 μ mol/ mg. min	Vaha et al. (2018)
<i>Aspergillus oryzae</i> CCT 3940	Ammonium sulfate precipitation (80%), dialysis, Q-Sepharose Fast Flow, SP Sepharose Fast Flow, CM Sepharose Fast Flow	282	28.6	115 kDa	8	50	0.66×10^{-3} M	3131 IU/mL	Dias et al. (2016)
<i>Aspergillus</i> sp. ALAA-2000	Ammonium sulfate precipitation, Sephadex G-200	0.4	8.3	25 kDa (AY-A-1) 31 kDa (AY-A-2)	6 (AY-A-1) 10 (AY-A-2)	47 (AY-A-1) 67 (AY-A-2)	–	–	Ahmed et al. (2015)
<i>Cladosporium</i> sp.	Methanol precipitation, DEAE-cellulose column, Sepharose 6B	83.3	867.7	121 kDa	23	23	0.1 M	4.44 μ mol/ mL.min	Kumar and Moosamani (2013)
<i>Mucor</i> <i>Hansenii</i>	Acetone precipitation, Affinity chromatography with lectin-agarose	69.43	4.59	96.32 kDa	7	37	4.3 mM	625 IU/mL	Thakur et al. (2014)
<i>Penicillium brevicompactum</i> NRC 829	Heat treatment for 20 min at 50 °C, Sephadex G-100 and G-200	574.24	151.12	94 kDa	8	37	1.05 mM	–	Ekhafe et al. (2012)
<i>Penicillium digitatum</i>	Ammonium sulfate precipitation, G-100 column	833.15	60.94	–	7	30	1×10^{-5} M	–	Shrivastava et al. (2012)
<i>Penicillium</i> sp.	Ammonium sulfate precipitation, Sephadex G100-120, DEAE-cellulose column	13.97	1.9	66 kDa	7	37	4.00×10^{-3} M	–	Patro and Gupta (2012)
<i>Rhizomucor miedii</i>	Nickel-Imidodiacetic acid column	1984.8	2.6	133.7 kDa	7	45	0.0253 mg/mL	3380.0 μ mol/ min.mg	Huang et al. (2014)
<i>Trichoderma viride</i>	Acetone precipitation, DEAE-cellulose column	78.2	13.0	99 ± 1 kDa	7	37	2.56 μ M	279.27 IU/mL	Lineidin et al. (2015)

optimization of experiments design and artificial neural network coupled with a genetic algorithm to find the significant components of the fermentation and optimum concentration for L-asparaginase production by *Aspergillus terreus* MTCC 1782 by submerged fermentation. The optimization of the components of the fermentation medium using genetic algorithm connected to an artificial neural network was shown to be more effective than the regression model of the response surface methodology. The optimum predicted concentration of the components of the medium using the artificial neural network was 1.7% of L-proline, 1.99% of sodium nitrate, 1.38% of L-asparagine, and 0.65% of glucose with the experimental production of 40.85 IU/mL of L-asparaginase.

In another study, Dorya and Kumar (2018) used a sequential strategy to optimize L-asparaginase production using *Aspergillus* sp. In the first stage, through blending planning, maximum L-asparaginase activity was observed using a ternary mixture of cotton seed cake (2/3), wheat bran (1/6) and red bean skin (1/6). In the next step, the culture parameters were optimized using the Box-Behnken design. After 6 days of fermentation using optimized ternary mixture, the maximum activity of 12.57 U/mL L-asparaginase was obtained at 35 °C, pH 8, and humidity of 70% (w/v). The authors observed that through the sequential optimization study the production of L-asparaginase increased 1.3 fold.

Dias et al. (2015) used a Simplex Mixture design to investigate the presence of synergistic or antagonistic effects of different agroindustrial residues to produce L-asparaginase under solid-state fermentation by *Aspergillus niger* LBA 02. The researchers obtained the highest L-asparaginase activity (89.22 U/g) after 96 h of fermentation using a ternary mixture composed of wheat bran (1/3), soybean meal (1/3), and cottonseed (1/3). This process showed maximization of L-asparaginase production when the blends were used in comparison with those in isolation.

Uppuluri et al. (2013) optimized the conditions to produce L-asparaginase by *Aspergillus niger* C4 in a bioreactor using black sesame oil bagasse as a substrate for solid-state fermentation. The authors used the Box-Behnken design for three variables (aeration, bed thickness, and temperature). Statistical analysis revealed a maximal L-asparaginase yield of 310 U/gds. Where the aeration parameters, bed thickness, and temperature were 0.44 vvm, 17.35 cm and 29.31 °C, respectively.

Baskar et al. (2010) applied the Latin Square design to find the best nitrogen source for the extracellular production of L-asparaginase by *Aspergillus terreus* MTCC 1782 using corn flour as substrate in submerged fermentation. Urea was identified as the best nitrogen source with a mean L-asparaginase production of 33.25 IU/mL.

2.3. Purification and biochemical properties of fungal L-asparaginase

Most purification procedures are performed using conventional methods, such as ammonium sulfate fractionation combined with molecular exclusion chromatography or ion exchange column chromatography (Zuo et al., 2015). Most studies use $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ to precipitate the L-asparaginase (Dange & Peshwe, 2011; Dias, Ruiz, Torre, & Sato, 2016; Dutta, Ghosh, & Pramanik, 2015; Mishra, 2006). The salt concentration ranges from 35% to 100% depending on the L-asparaginase source (Lopes et al., 2017). The use of organic solvents or short chain alcohols, such as methanol and ethanol, are also used for the precipitation of L-asparaginase (Tundisi et al., 2016). Other precipitating agents, such as acetone, are also used (Lincoln et al., 2015; Thakur et al., 2014).

Chromatographic methods are frequently used to achieve maximum purification. The ion exchange chromatography with DEAE cellulose is the most popular chromatographic method (Tundisi et al., 2016). Lincoln et al. (2015) when purifying *Trichoderma viride* L-asparaginase using DEAE-cellulose had purification fold of 13, while Vala et al. (2018) purified L-asparaginase obtained from *Aspergillus niger* AKV-MKBU and obtained 10.36 of purification fold.

Another commonly used technique is gel filtration chromatography

or molecular exclusion with Sephadex (Tundisi et al., 2016). The L-asparaginase from *Penicillium digitatum* was purified about 60.95 fold after precipitation with ammonium sulfate 70–80% saturation and Sephadex G-100 column chromatography obtaining 833.15 IU/mg of specific activity and 4.35% of recovery (Shrivastava et al., 2012) whereas Ahmed, Dahab, M., and SM, (2015) purified two types of L-asparaginase (AYA-1 and AYA-2) from the culture supernatant of *Aspergillus* sp. ALAA-2000 through ammonium sulfate precipitation and Sephadex G-200 column, obtaining purification factor of 8.3 fold.

Affinity chromatography using a column of nickel-iminodiacetic acid has also been used for the purification of fungal L-asparaginase and the purification yield obtained was 2.6 protein specific activity of 1984.8 IU/mg (Huang, Liu, Sun, Yan, & Jiang, 2014). In Table 3, different methods of purification and biochemical characterization for various fungal L-asparaginases are reported according to the literature.

L-asparaginases from different microorganisms vary in their biochemical properties. Generally, the optimum temperature for L-asparaginase activity is between 30 and 50 °C (Huang et al., 2014; Kumar & Manonmani, 2013; Lincoln et al., 2015). In relation to the optimum pH, L-asparaginase presents activity in a wide range of pH, with optimum activity in the range of 6.0 to 9.5 (Dias et al., 2016; Dutta et al., 2015; Vala et al., 2018). However, most fungal L-asparaginases show optimum activity at alkaline pH, while only a few strains have optimum pH below pH 7.0 (Ahmed, Dahab, M., & SM, 2015; Kumar & Manonmani, 2013).

Purified L-asparaginase from *Aspergillus aculeatus* showed maximum activity at pH 9.0 and 30 °C. The enzyme retained more than 70% activity after 10 min at 50 °C while it was inactivated at 90 °C (Dange & Peshwe, 2011). Purified L-asparaginase from *Aspergillus oryzae* CCT 3940 showed high stability under physiological conditions, remaining stable in the pH range of 7.0 to 8.0 after 1 h incubation in the temperature range of 30 to 45 °C (Dias et al., 2016).

Ions, as well as activating and inhibiting substances, can affect the activity of L-asparaginase from different fungal sources. L-asparaginase from *Mucor hiemalis* was activated 100% by Mn^{2+} at 2 mM concentration, after incubation at 37 °C for 30 min and around 100 to 150% activation in the presence of the ions Ba^{2+} , K^+ , Cu^{2+} , Mn^{2+} , and Hg^{2+} . The enzyme was inhibited by around 50 to 100% in the presence of Fe^{2+} and Na^+ . However, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) at 2 mM concentration did not affect the enzymatic activity, suggesting that the enzyme is not metalloenzyme. Tween 80 and Triton X-100 surfactants (2 mM) activated about 350% of the residual activity of L-asparaginase while sodium docetyl sulfate (SDS) (2 mM) inhibited the enzyme, obtaining 17% of the residual activity (Thakur et al., 2014).

Vala et al. (2018) found that 1% Tween 80 and Triton X-100 increased around 100 and 120% of L-asparaginase activity from *Aspergillus niger* AKV-MKBU, respectively. The enzyme was inhibited by As^+ , Ca^{6+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , and Sn^{2+} at the concentration of 10 mM. L-asparaginase was completely inhibited by 2-mercaptoethanol (2 mM) and heavily inhibited by urea (2 mM), thiourea (2 mM), SDS (2%), and EDTA (2 mM). Lincoln et al. (2015) analyzed the effect of different compounds on *Trichoderma viride* L-asparaginase activity. The enzyme was tested with metal ions, inhibitors, and activators at 5 mM concentration and incubated for 30 min at 37 °C. L-asparaginase was activated at about 140 and 160% by Mg^{2+} and Na^+ and inhibited by Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , and Mn^{2+} . The enzyme was strongly inhibited by EDTA. N-ethylemaleimide and phenylmethylsulfonyl fluoride did not alter the enzyme activity.

2.4. Formation of acrylamide and application of fungal L-asparaginase in food industry

In 2002, the Swedish National Food Administration (SNFA) reported the presence of acrylamide in food with high carbohydrate content subjected to elevated temperatures (Motttram, Wedzicha, & Dodson, 2002; Tareke, Rydberg, Karlsson, Eriksson, & Törnqvist, 2002).

Since then, research institutions and food agencies have been investigating the toxicity, formation, mitigation, and detection of acrylamide in food (Hu, Xu, Fu, & Li, 2015).

Food related to human exposure to acrylamide are potato, coffee, and bakery products (biscuits and bread) (EFSA, 2015). The estimate of dietary intake was studied in several populations with different eating habits (Dybing et al., 2005; Hilbig, Freidank, Kersting, Wilhelm, & Wittsiepe, 2004; Hilbig & Kersting, 2006). The intake of acrylamide in the diet is estimated to be between 0.3 and 1.9 µg/kg orally (EFSA, 2015). However, food with the highest contribution of acrylamide intake varies from country to country, according to dietary patterns and preparation methods (Claus, Carle, & Schieber, 2008).

The main mechanism that has been accepted by researchers to explain the formation of acrylamide in food involves the Maillard reaction, from the reaction between the food components as amino acids and reducing sugars under heat treatment (Cladiere & Camel, 2017; Mottram et al., 2002; Pedreschi, 2009; Yaylayan & Stadler, 2005). The first step in this reaction is the intermediate formation of the Schiff base. Subsequently, this Schiff base can be hydrolyzed to form 3-aminopropionamide, precursor of acrylamide or undergo elimination of an amide grouping to directly form acrylamide (Claus et al., 2008), according to Fig. 3.

Several observations have led to the hypothesis that food heating could be an important source of human exposure to acrylamide. Heating processes such as frying and baking promote the formation of acrylamide, whereas this compound was not detected in cooked food (Keramat, LeBail, Prost, & Jafari, 2011).

The factors that influence the formation of acrylamide in food are: processing conditions (temperature, humidity, cooking time, and product matrix) and precursors such as reducing sugars and free amino acids (mainly L-asparagine) (Zuo et al., 2015). However, most of the methods used to attenuate the formation of acrylamide seek to remove

its precursors or to inhibit or reduce the intensity of the Maillard reaction by different process modifications (Pedreschi, 2009).

Most of the methods used to reduce this toxic compound have a negative impact on both taste and appearance of the final product (Batool et al., 2016). The use of fungic L-asparaginase presents a relatively new, promising, and great technique to reduce the acrylamide levels in food. This enzyme helps with mitigation strategies from two aspects, interference with the Maillard reaction or the removal of precursors by converting L-asparagine into L-aspartic acid (non-toxic) without altering the nutritional value, appearance, or flavor of the final product (Batool et al., 2016; Hendriksen et al., 2009; Swanston, 2018).

L-asparaginase may be used as a food additive to achieve a technological purpose during manufacture. The enzyme should be removed from the food or inactivated, however, the presence of traces of the substance or its derivatives is permitted. Residues of the enzyme, including denatured L-asparaginase, may range from 0.14 to 428 mg/kg of food (JECFA, 2009).

2.4.1. French fries

Products derived from potatoes (*Solanum tuberosum*), French fries are widely consumed in many countries. Fried potato products have contributed to 50% of the human ingestion of acrylamide in European countries (Keramat et al., 2011; Mesias, Delgado-Andrade, Holgado, & Morales, 2018). The amino acid L-asparagine is recognized as the main precursor for the formation of acrylamide in products derived from potatoes, so it is important to verify the performance of the enzyme in the decrease of this compound, since a high content of this amino acid in potatoes may be also related to the increase of the acrylamide formation (Becalski et al., 2004; Becalski, Lau, Lewis, & Seaman, 2003).

According to a study by Mesias et al. (2018), the potential of acrylamide formation in potatoes is related to several factors such as: L-asparagine content and reducing sugars, color, and moisture (in fresh

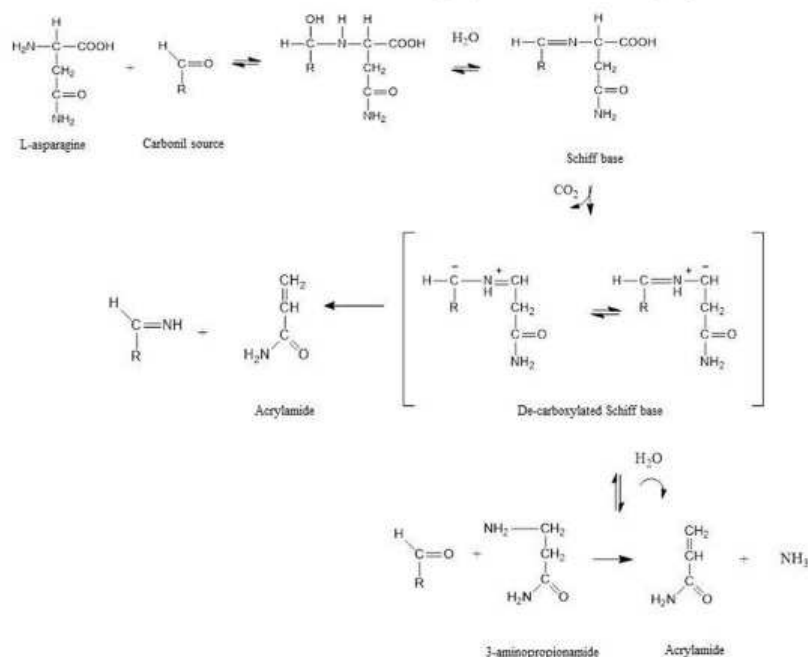


Fig. 3. Mechanism of acrylamide formation in heated foods.

potatoes), oil and utensils used for frying, content of polar compounds in the frying oil (during the frying process), color, thickness, and visual color (after frying). Other relevant factors related to the formation of acrylamide in potatoes are: potato variety, soil type, fertilization, weather, storage, cutting, blanching, and drying process, and use of additives (Muttucumaru et al., 2017; Vinci, Mestdagh, & de Meulenaer, 2012). Though all those factors are related to acrylamide formation, reducing sugars and L-asparagine are the limiting factor for acrylamide formation in potato products (Muttucumaru et al., 2017; Williams, 2005).

Acrylamide reduction in potato chips was tested under different conditions using, in addition to the treatments alone, combinations of bleaching and L-asparaginase from *Aspergillus oryzae*. The largest reduction (90%) was achieved when bleaching (85 °C/3.5 min) was applied followed by immersion in L-asparaginase solution (50 °C/20 min). The heat treatment was able to cause changes in the structure of the potatoes, facilitating the diffusion of the enzyme into the tissues and, consequently, favoring and enhancing its action (Pedreschi, Mariotti, Granby, & Risum, 2011). Another study that reported the use of the fungi L-asparaginase from *Aspergillus oryzae* CCT 3940 (50 U/mL) to mitigate acrylamide from French fries showed a 72% acrylamide reduction (after a frying process at 180 °C for 7 min) compared to a control sample (Dias, Bogusz, Hantao, Augusto, & Sato, 2017).

An L-asparaginase produced by *Fusarium culmorum* (ASP-87) was used to reduce acrylamide in potato products. The potato chips were treated with the enzyme at 40 °C for 30 min, followed by frying at temperatures of 170–180 °C for 90 s. It was observed that 300 U/L of L-asparaginase was required to reduce 85% and 94% of acrylamide levels in potato chips and French fries, respectively. L-asparaginase was efficient in inhibiting the formation of acrylamide as well as L-asparagine decrease. The authors also found high levels of acrylamide in different types of products obtained in the local market (Bengaluru, India). Values higher than 3020 µg/kg were observed for potato chips and 4475 µg/kg for French fries (Meghavarnam & Janakiraman, 2018).

2.4.2. Bakery products

The color of bakery products is one of the most important attributes that, in addition to affecting food quality, influences consumer acceptance (Bartkiene et al., 2016; Lu & Zheng, 2012). Maillard's reaction is involved in the formation of the specific sensory attributes of these products, and acrylamide is also formed during the reaction (Thomas & Thomas, 2014).

In Europe, 20% of the intake of acrylamide has been attributed to bakery products (Keramat et al., 2011). In 2013, the Brazilian Association of Consumer Protection (Proteste, 2013) evaluated the amount of acrylamide in 51 products from eight categories of food - potato chips, sweet and savory biscuits, cream crackers, French bread, snacks and toast - and found that French bread and sweet and biscuits presented the highest values in acrylamide content. Sweet biscuits, for example, presented values between 1100 mg/kg and < 100 mg/kg acrylamide.

According to Nguyen, Fels-Klerx, Peters, and Boekel (2016), free L-asparagine in wheat flour was the main factor responsible for the formation of acrylamide in biscuits with reduced sugar content, and free L-asparagine can be a limiting factor for the formation of acrylamide in cereal products.

Some studies have been carried out on the application of fungal L-asparaginase to reduce acrylamide in starch products. Hendriksen et al. (2009) applied *Aspergillus oryzae* L-asparaginase in sweet and savory biscuits, the authors obtained a 34–92% reduction in the acrylamide levels of these products. A similar result was obtained by Ciesarova, Kukuřová, Bednářiková, Marková, and Baxa (2009) who obtained a reduction of > 97% in the acrylamide content, by applying the commercial L-asparaginase enzyme to gingerbread without damaging the sensorial quality of the final product. Vass, Amrein, Schönbächler, Escher, and Amado (2004) have been able to reduce the contents of

acrylamide in biscuits by up to 70% using commercial L-asparaginase. These authors also did not observe alteration of color or flavor.

Anese, Quarta, Peloux, and Calligaris (2011) studied the influence of biscuit composition on the ability of L-asparaginase (Novozymes®) to minimize the formation of acrylamide. Different formulations of biscuits were tested, varying the water composition and fat type and adding 900 U/Kg of flour in all treatments. The authors concluded that differences in the efficiency of L-asparaginase, may be related to the different compositions of the evaluated food. Despite being able to remove acrylamide, L-asparaginase showed a better reduction of acrylamide in biscuits with high water content, however, the reduction of acrylamide decreased with increasing fat content in biscuits.

In another study, the effect of L-asparaginase on the formation of acrylamide in biscuits using experimental modeling models was evaluated. Anese, Quarta, and Frias (2011) found that the use of intermediate concentrations of L-asparaginase (500 U/Kg), the formation of acrylamide was minimal, as well as in the shortest time and the lowest incubation temperature. The important parameter of the cookie, color, was not affected by the application of the enzyme.

The L-asparaginase gene from *Rhizomucor miehei* was cloned and expressed in *Escherichia coli* by Huang et al. (2014), the enzyme (10 U/mg flour) was used to reduce the level of acrylamide in biscuits, reaching approximately 80% reduction. In addition, the enzyme was useful in reducing the acrylamide present in breads and also demonstrated potential for use in the treatment of leukemia.

There is a strong correlation between color intensity of the crust and formation of acrylamide, particularly when bread is baked at temperatures above 200 °C (Keramat et al., 2011). Mohan Kumar, Shimray, Indrani, and Manonmani (2014) applied L-asparaginase produced from *Cladosporium* sp. in sweet bread at different concentrations (50–300 U). The authors did not observe changes in the physical-sensorial characteristics of the bread with treatment with L-asparaginase. In the treatment with 300 U, there were 97% and 73% reduction of the formation of acrylamide in the crust and crumb bread regions, respectively. These results indicated the potential of L-asparaginase for industrial and domestic applications for acrylamide reduction.

2.4.3. Coffee

Together with potatoes and cereal products, roasted coffee is one of the products that have high concentration of acrylamide (Mesias et al., 2018). The two main coffee species used in the preparation of the beverage are arabica (*Coffea arabica*) and robusta (*Coffea canephora robusta*). The quality of the drink depends on the proportion of each coffee bean (Alves, Soares, Casal, Fernandes, & Oliveira, 2010). High concentrations of acrylamide are found in roasted robusta coffee beans in relation to roasted arabica coffee beans (Anese, 2016).

According to the results of the EFSA Contaminants Panel in the Food Chain (CONTAM) between 2010 and 2013 > 1500 coffee-based products were analyzed, and the average acrylamide concentration found was 578 ng/g in roasted coffee (EFSA, 2015). Coffee has high levels of acrylamide due to the roasting process. Storage conditions may also contribute to the formation of acrylamide (Mesias & Morales, 2016).

Exposure to acrylamide, from roasted coffee consumption, varies from country to country, age, and sex of the consumer, roast grade and volume of coffee ingested, and so on (Anese, 2016). Consequently, daily intake of this product represents a significant source of exposure to acrylamide (Şenyuva & Gökmen, 2005). Another problem is related to the fact that acrylamide is a polar molecule. The preparation of ground coffee with hot water may allow the complete extraction of the acrylamide present in the roasted coffee beans (Guenther, Anklaam, Wenzl, & Stadler, 2007).

One of the preventive measures of acrylamide formation is the use of L-asparaginase to maintain the lowest concentration of this compound during roasting, acting on precursors such as L-asparagine, creating less favorable reaction conditions (Anese, 2016). In the study by Hendriksen, Budolfsen, and Baumann (2013), the effect of L-

asparaginase on reduction of acrylamide in coffee was evaluated. Green arabica beans were steamed with water for 45 min at 100 °C and treated with L-asparaginase at 60 °C for 60 min. The authors observed the greatest reduction when they used the concentration of 6000 ASU/kg of grains, observing a reduction of 70–80% in the content of L-asparagine and 55–74% in the formation of acrylamide.

3. Conclusion

L-asparaginase is of great importance in food applications. Research aimed at the discovery of new L-asparaginases, mainly those produced by fungi, associated with the use of statistical methodologies of optimization and the use of less laborious fermentative processes, have great potential to obtain cheaper enzymes with desirable properties for application in food aiming at the reduction of acrylamide and in the future, for the treatment of some types of cancer.

Acknowledgments

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) - Finance Code 001 (PROEX process number 23038.000795/2018-61). The authors would like to the Department of Food Science, School of Food Engineering, University of Campinas, which are gratefully acknowledged.

References

- Ahmed, M. M. A., Dhab, N. A., M. T. T., & SM, F. H. (2015). Production, purification and characterization of L-asparaginase from marine endophytic *Aspergillus* sp. ALAA-2000 under submerged and solid state fermentation. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 7, 165–172.
- Alves, R. C., Soares, C., Casal, S., Fernandes, J. O., & Oliveira, M. B. P. P. (2010). Acrylamide in espresso coffee: Influence of species, roast degree and brew length. *Food Chemistry*, 119, 929–934.
- Anese, M. (2016). Acrylamide in coffee and coffee substitutes. *Acrylamide in Food*, 181–195.
- Anese, M., Quarta, B., & Frias, J. (2011). Modelling the effect of asparaginase in reducing acrylamide formation in biscuits. *Food Chemistry*, 126, 435–440.
- Anese, M., Quarta, B., Peloux, L., & Calligaris, S. (2011). Effect of formulation on the capacity of L-asparaginase to minimize acrylamide formation in short dough biscuits. *Food Research International*, 44, 2837–2842.
- Bartkieni, E., Jakobsone, I., Pugajeva, I., Bartkevics, V., Zadeike, D., & Juodeikiene, G. (2016). Reducing of acrylamide formation in wheat biscuits supplemented with flaxseed and lupine. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 275–282.
- Basak, G., & Renganathan, S. (2010). Optimization of media components and operating conditions for exogenous production of fungal L-asparaginase. *Chiang Mai Journal of Science*, 38, 270–279.
- Basak, G., & Renganathan, S. (2011). Statistical and evolutionary optimization of operating conditions for enhanced production of fungal L-asparaginase. *Chemical Papers*, 65, 798–804.
- Basak, G., & Renganathan, S. (2012). Optimization of L-asparaginase production by *Aspergillus terreus* MTCC 1782 using response surface methodology and artificial neural network-linked genetic algorithm. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 7, 212–220.
- Basak, G., Sriharini, C., Sriprajya, R., & Renganathan, S. (2010). Statistical screening of supplementary nitrogen source for enhanced production of L-asparaginase by *Aspergillus terreus* 1782. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 24, 467–472.
- Batool, T., Makky, E., Jalal, M., & Yusoff, M. (2016). A comprehensive review on L-asparaginase and its applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 178, 900–923.
- Becalski, A., Lau, B. P. Y., Lewis, D., & Seaman, S. W. (2003). Acrylamide in foods: Occurrence, sources, and modeling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 802–808.
- Becalski, A., Lau, B. P. Y., Lewis, D., Seaman, S. W., Hayward, S., ... Leclerc, Y. (2004). Acrylamide in French fries: Influence of free amino acids and sugars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3801–3806.
- Cachumba, J. J. M., Antunes, F. A. F., Peres, G. F. D., Brumano, L. P., Santos, J. C., & Silva, S. S. (2016). Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 77–85.
- Capuano, E., & Fogliano, V. (2011). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 793–810.
- Ciesarova, Z., Kukurkova, K., Bednarikova, A., Markova, L., & Baxa, L. (2009). Improvement of cereal product safety by enzymatic way of acrylamide mitigation. *Czech Journal of Food Sciences*, 27, 96–98.
- Cladiere, M., & Camel, V. (2017). The Maillard reaction and food safety: Focus on acrylamide. *Environnement, Risques & Santé*, 16, 31–43.
- Claus, A., Carle, R., & Schieber, A. (2008). Acrylamide in cereal products: A review. *Journal of Cereal Science*, 47, 118–133.
- Cunha, M. C., Silva, L. C., Sato, H. H., & Castro, R. J. S. (2018). Using response surface methodology to improve the L-asparaginase production by *Aspergillus niger* under solid-state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 31–36.
- Dange, V. U., & Peshwe, S. A. (2011). Production, purification and characterization of fungal L-asparaginase. *Boiano Frontier*, 4, 162–167.
- Dias, F. F. G., Bogusz, S., Hantao, L., Augusto, F., & Sato, H. H. (2017). Acrylamide mitigation in French fries using native L-asparaginase from *Aspergillus oryzae* CCT 3940. *LWT - Food Science and Technology*, 76, 222–229.
- Dias, F. F. G., Castro, R. J. S., Ohara, A., Nishide, T. G., Bagagli, M. P., & Sato, H. H. (2015). Simplex centroid mixture design to improve L-asparaginase production in solid-state fermentation using agroindustrial wastes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4, 528–534.
- Dias, F. F. G., Ruiz, A. L. T., Torre, A. D., & Sato, H. H. (2016). Purification, characterization and antiproliferative activity of L-asparaginase from *Aspergillus oryzae* CCT 3940 with no glutaminase activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6, 785–794.
- Dias, F. F. G., & Sato, H. H. (2016). Sequential optimization strategy for maximum L-asparaginase production from *Aspergillus oryzae* CCT 3940. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 6, 33–39.
- Doriya, K., & Kumar, D. S. (2016). Isolation and screening of L-asparaginase free of glutaminase and urease from fungal sp. 3. *Biotech*, 6, 229–239.
- Doriya, K., & Kumar, D. S. (2018). Optimization of solid substrate mixture and process parameters for the production of L-asparaginase and scale-up using tray bioreactor. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 12, 244–250.
- DSM (2018). DSM introduces PreventAse® XR to extend use of enzymatic acrylamide-reduction solution to more snacks and baked goods. Retrieved 2019-01-24. Home Page <https://www.dsm.com/corporate/media/informationcenter-news/2018/07/2018-07-10-dsm-introduces-preventase-xr-to-extend-use-of-enzymatic-acrylamide-reduction-solution-to-more-snacks-and-baked-goods.html>.
- Dutta, S., Ghosh, S., & Pramanik, S. (2015). L-asparaginase and L-glutaminase from *Aspergillus fumigatus* WL002: Production and some physicochemical properties. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51, 425–431.
- Dybing, E., Farmer, P. B., Andersen, M., Fennell, T. R., Lalljie, S. P. D., ... Verger, P. (2005). Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 365–410.
- El-Naggar, N. E. A., El-Ewasy, S., & El-Shweihy, N. M. (2014). Microbial L-asparaginase as a potential therapeutic agent for the treatment of acute lymphoblastic leukemia: The pros and cons. *International Journal of Pharmaceutics*, 10, 182–199.
- Elshafei, A. M., & El-Ghoniemy, D. H. (2015). Screening and media optimization for enhancing L-asparaginase production, an anticancer agent, from different filamentous fungi in solid-state fermentation. *British Biotechnology Journal*, 9, 1–15.
- Elshafei, A. M., Hassan, M. M., Abouzeid, M. A. E., Mahmoud, D. A., & Elghoniemy, D. H. (2012). Purification, characterization and antitumor activity of L-asparaginase from *Penicillium brevicompactum* NRC 829. *British Microbiology Research Journal*, 2, 158–174.
- European Food Safety Authority. EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain) (2015). Scientific opinion on acrylamide in food. *EFSA Journal*, 2015. Retrieved 2017-01-26. Home Page <http://www.efsa.europa.eu/efsajournal>.
- Farag, A. M., Hassan, S. W., Beltagy, E. A., & El-Shenawy, M. A. (2015). Optimization of production of anti-tumor L-asparaginase by free and immobilized marine *Aspergillus terreus*. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 41, 295–302.
- Friedman, M. (2015). Acrylamide: Inhibition of formation in processed food and mitigation of toxicity in cells, animals, and humans. *Food & Function*, 6, 1752–1772.
- Guenther, H., Anklam, E., Wenzl, T., & Stadler, R. H. (2007). Acrylamide in coffee: Review of progress in analysis, formation and level reduction. *Food Additives and Contaminants*, 24, 60–70.
- Heinemann, B., & Howard, A. J. (1969). Production of tumor-inhibitory L-asparaginase by submerged growth of *Serratia marcescens*. *Applied Microbiology*, 18, 550–554.
- Hendriksen, H. V., Budolfson, G., & Baumann, M. J. (2013). Asparaginase for acrylamide mitigation in food. *Aspects of Applied Biology*, 116, 41–50.
- Hendriksen, H. V., Kornbrust, B. A., Østergaard, P. R., & Stringer, M. A. (2009). Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4168–4176.
- Hilbig, A., Freidank, N., Kersting, M., Wilhelm, M., & Wittsiepe, J. (2004). Estimation of the dietary intake of acrylamide by German infants, children and adolescents as calculated from dietary records and available data on acrylamide levels in food groups. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 207, 463–471, 2004.
- Hilbig, A., & Kersting, M. (2006). Dietary acrylamide exposure, time trends and the intake of relevant foods in children and adolescents between 1998 and 2004: Results of the DONALD study. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 1, 10–18, 2006.
- Hu, Q., Xu, X., Fu, Y., & Li, Y. (2015). Rapid methods for detecting acrylamide in thermally processed foods: A review. *Food Control*, 56, 135–146.
- Huang, L., Liu, Y., Sun, Y., Yan, Q., & Jiang, Z. (2014). Biochemical characterization of a novel L-asparaginase with low glutaminase activity from *Rhizomucor miehei* and its application in food safety and leukemia treatment. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 1561–1569.
- Hymavathi, M., Sathish, T., Rao, C. S., & Prakasham, R. S. (2009). Enhancement of L-asparaginase production by isolated *Bacillus circulans* (MTCC 8574) using response surface methodology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 159, 191–198.
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (1994). Acrylamide. IARC

- monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 60.
- Izadpanah, F., Homaei, A., Fernandes, P., & Javadpour, S. (2018). Marine microbial L-asparaginase: Biochemistry, molecular approaches and applications in tumor therapy and in food industry. *Microbiological Research*, 208, 99–112.
- JECFA (2007). Compendium of food additive specifications. Monograph N°. 4. Rome: FAO.
- JECFA (2009). Evaluation of certain food additives: Sixty-ninth report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. WHO Technical Report SeriesFAO: Rome.
- Jha, S. K., Pasrija, D., Sinha, R. K., Singh, H. S., Nigan, V. K., & Vidyarthi, A. S. (2012). Microbial L-asparaginase: A review on current scenario and future prospects. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3, 3076–3090.
- Kaliwal, B. R., & Hosamani, R. (2011). Isolation, molecular identification and optimization of fermentation parameters for the production of L-asparaginase, an anticancer agent by *Fusarium equiseti*. *International Journal of Microbiology Research*, 3, 108–119.
- Keramat, J., LeBail, A., Prost, C., & Jafari, M. (2011). Acrylamide in baking products: A review article. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 530–543.
- Kumar, N. S., & Manonmani, H. K. (2013). Purification, characterization and kinetic properties of extracellular L-asparaginase produced by *Cladosporium* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, 577–587.
- Lincoln, L., Niyonzima, F. N., & More, S. S. (2015). Purification and properties of a fungal L-asparaginase from *Trichoderma viride* pers: *st* grey. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 4, 310–316.
- Lopes, A. M., Oliveira-Nascimento, L., Ribeiro, A., Tairum, C. A., Jr., Breyer, A. C., ... Pessoa, A. (2017). Therapeutic L-asparaginase: Upstream, downstream and beyond. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37, 82–99.
- Lui, H., & Zheng, H. (2012). Fractal colour: A new approach for evaluation of acrylamide contents in biscuits. *Food Chemistry*, 134, 2521–2525.
- Mashburn, L. T., & Weston, J. C., Jr. (1964). Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 105, 450–453, 1964.
- Maziero, M., & Bersot, L. (2010). Mycotoxins in food produced in Brazil. *Brazilian Journal of Agroindustrial Products*, 12, 89–99.
- Meghavarnam, A. K., & Janakiraman, S. (2017). Solid-state fermentation: An effective fermentation strategy for the production of L-asparaginase by *Fusarium culmorum* (ASP-87). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 11, 124–130.
- Meghavarnam, A. K., & Janakiraman, S. (2018). Evaluation of acrylamide reduction potential of L-asparaginase from *Fusarium culmorum* (ASP-87) in starchy products. *LWT - Food Science and Technology*, 89, 32–37.
- Mesias, M., Delgado-Andrade, C., Holgado, F., & Morales, F. J. (2018). Acrylamide content in French fries prepared in households: A pilot study in Spanish homes. *Food Chemistry*, 260, 44–52.
- Mesias, M., & Morales, F. J. (2016). Acrylamide in coffee: Estimation of exposure from vending machines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 48, 8–12.
- Mishra, A. (2006). Production of L-asparaginase, an anticancer agent, from *Aspergillus niger* using agricultural waste in solid state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 135, 33–42.
- Mohan Kumar, N. S., Shimray, C. A., Indrani, D., & Manonmani, H. K. (2014). Reduction of acrylamide formation in sweet bread with L-Asparaginase treatment. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 741–748.
- Mottram, D. S., Wedzicha, B. L., & Dodson, A. (2002). Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, 419, 448–449.
- Mukherjee, J., Majumdar, T., & Scheper, T. (2000). Studies on nutritional and oxygen requirements for production of L-asparaginase by *Enterobacter aerogenes*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 180–184.
- Muttucumaru, N., Powers, S. J., Elmore, J. S., Dodson, A., Bridson, A., ... Halford, N. G. (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 Chemistry*, 220, 76–86.
- Nguyen, H. T., van de Fels-Klerx, H. J., Peters, R. J. B., & van Boekel, M. A. J. S. (2016). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural formation during baking of biscuits: Part I: Effects of sugar type. *Food Chemistry*, 192, 575–585.
- Patro, K., Basak, U., Mohapatra, A., & Gupta, N. (2014). Development of new medium composition for enhanced production of L-asparaginase by *Aspergillus flavus*. *Journal of Environmental Biology*, 35(1), 295–300.
- Patro, K., & Gupta, N. (2012). Extraction, purification and characterization of L-asparaginase from *Penicillium* sp. by submerged fermentation. *International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research*, 3, 30–34.
- Pedreschi, F. (2009). Acrylamide formation and reduction in fried potatoes. In E. Ortega-Rivas (Vol. Ed.), *Processing effects on safety and quality of foods*. Vol. 310. *Processing effects on safety and quality of foods* (pp. 231–251). USA: Taylor and Francis.
- Pedreschi, F., Kaack, K., & Granby, K. (2008). The effect of asparaginase on acrylamide formation in French fries. *Food Chemistry*, 109(2), 386–392.
- Pedreschi, F., Mariotti, S., Granby, K., & Risum, J. (2011). Acrylamide reduction in potato chips by using commercial asparaginase in combination with conventional blanching. *LWT - Food Science and Technology*, 44(6), 1473–1476.
- Pennisi, M., Malaguarnera, G., Puglisi, V., Vinciguerra, L., Vacante, M., & Malaguarnera, M. (2013). Neurotoxicity of acrylamide in exposed workers. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10, 3843–3854.
- Proteste (2013). Acrilamida: consuma a menor quantidade possível. Retrieved 2017-03-02. Home Page <https://www.proteste.org.br/pt/nc/artigo/acrilamida-27>.
- Sarquis, M. I. M., Oliveira, E. M. M., Santos, A. S., & Costa, G. L. (2004). Production of L-asparaginase by filamentous fungi. *Memories of the Oswaldo Cruz Institute*, 99, 489–492.
- Şenyuva, H. Z., & Gökmen, V. (2005). Study of acrylamide in coffee using an improved liquid chromatography mass spectrometry method: Investigation of colour changes and acrylamide formation in coffee during roasting. *Food Additives and Contaminants*, 22(3), 214–220.
- Shrivastava, A., Khan, A. A., Shrivastav, A., Jain, S. K., & Singhal, P. K. (2012). Kinetics studies of L-asparaginase from *Penicillium digitatum*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 42, 574–581.
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 44, 13–18.
- Souza, P. M., Freitas, M. M., Cardoso, S. L., Pessoa, A., Guerra, E. N. S., & Magalhães, P. O. (2017). Optimization and purification of L-asparaginase from fungi: A systematic review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 120, 194–202.
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (1995). *Principles of fermentation technology* (2nd ed.). Oxford: Butterworth Heinemann.
- Swanston, J. (2018). Acrylamide mitigation in foods—an update. Retrieved 2018-06-07. Home Page: <https://www.leatherheadfood.com/files/2018/01/White-paper-59-Acrylamide-in-foods-an-update.pdf>.
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., & Törnqvist, M. (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4998–5006.
- Thakur, M., Lincoln, L., Niyonzima, F. N., & More, S. S. (2014). Isolation, purification and characterization of fungal extracellular L-asparaginase from *Mucor hiemalis*. *Journal of Biocatalysis & Biotransformation*, 2, 1–9.
- Thomas, A., & Thomas, A. (2014). Acrylamide—a potent carcinogen in food. *International Journal of Science and Research*, 3, 177–180.
- Thomas, L., Larroche, C., & Pandey, A. (2013). Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 81, 146–161.
- Tundisi, L. L., Coelho, D. F., Zanchetta, B., Moriel, P., Pessoa, A., Jr., ... Silveira, E. (2016). L-asparaginase purification. *Separation and Purification Reviews*, 46, 35–43.
- Uppuluri, K. B., Dasari, R. K. V. R., Sajja, V., Jacob, A. S., & Reddy, D. S. R. (2013). Optimization of L-asparaginase production by isolated *Aspergillus niger* C4 from sesame (black) oil cake under SSF using Box-Behnken design in column bioreactor. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 11, 103–109.
- Vala, A. K., Sachaniya, B., Dudhagara, D., Pameriya, H. Z., Gosai, H., ... Dave, B. P. (2018). Characterization of L-asparaginase from marine derived *Aspergillus niger* AKV-MKB, its antiproliferative activity and bench scale production using industrial waste. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 41–46.
- Vass, M., Anreim, T. M., Schönbächler, B., Escher, F., & Amado, R. (2004). Ways to reduce acrylamide formation in cracker products. *Czech Journal of Food Science*, 22, 19–21.
- Vinci, R. M., Mestdagh, F., & de Meulenaer, B. (2012). Acrylamide formation in fried potato products—present and future, a critical review on mitigation strategies. *Food Chemistry*, 133(4), 1138–1154.
- Williams, J. S. E. (2005). Influence of variety and processing conditions on acrylamide levels in fried potato crisps. *Food Chemistry*, 90(4), 875–881.
- Xu, F., Oruna-Concha, M.-J., & Elmore, J. S. (2016). The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food. *Food Chemistry*, 210, 163–171.
- Yaylayan, V. A., & Stadler, R. H. (2005). Acrylamide formation in food: A mechanistic perspective. *Journal of AOAC International*, 88, 262–267.
- Zuo, S., Zhang, T., Jiang, B., & Mu, W. (2015). Recent research progress on microbial L-asparaginases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 1069–1079.