

**SAMARA APARECIDA SANTANA**

**PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE FÚNGICA PARA APLICAÇÃO  
BIOTECNOLÓGICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Valéria Monteze Guimarães

**VIÇOSA – MINAS GERAIS**

**2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S232p  
2024  
Santana, Samara Aparecida, 1997-  
Produção de L-asparaginase fúngica para aplicação  
biotecnológica / Samara Aparecida Santana. – Viçosa, MG,  
2024.

1 dissertação eletrônica (73 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Valéria Monteze Guimarães.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2024.

Referências bibliográficas: f. 66-73.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.255>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Asparaginase. 2. Acrilamida. 3. Fungos filamentosos.  
4. *Cladosporium subuliforme*. I. Guimarães, Valéria Monteze,  
1961-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação  
em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 616.994061

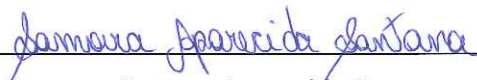
SAMARA APARECIDA SANTANA

PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE FÚNGICA PARA APLICAÇÃO  
BIOTECNOLÓGICA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de fevereiro de 2024.


Assentimento:



---

Samara Aparecida Santana

Autora



---

Valéria Monteze Guimarães

Orientadora

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e à Virgem Maria, pela força e amparo durante minha trajetória.

Aos meus pais Maria do Carmo e Nilson pelo cuidado e ao meu irmão Adnilson, melhor amigo e incentivador em minha jornada.

Ao meu namorado Gustavo, pela leveza, carinho e compreensão.

À minha orientadora Valéria, pela orientação, atenção, conversas e confiança em meu trabalho. Aos professores Gabriela Piccolo Maitan-Alfenas e José Guilherme Prado Martin que além da contribuição para este trabalho, contribuíram para minha formação profissional. Os levarei com muito carinho para a vida.

A todos do Laboratório de Análises Bioquímicas (LABQ), pelos conhecimentos compartilhados, amizades e momentos de descontração durante esse tempo. Em especial, ao Gustavo por todo auxílio e disposição nos períodos de estágio.

Aos amigos do JSC que tornaram a caminhada mais leve me lembrando sempre a não se contentar com o caminho até aqui percorrido.

Ao João Guilherme do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBB), sempre muito solícito e empenhado em me ajudar. E ao professor Humberto Josué de Oliveira Ramos pelo auxílio na análise de dados de espectrometria.

Ao Laboratório de Associações Micorrízicas, Laboratório de Genética Molecular de Fungos e Laboratório de Micologia e Etiologia de Doenças Fúngicas de Plantas, todos localizados na UFV, pelo fornecimento dos fungos. De forma especial, ao professor Olinto Liparini Pereira do departamento de Fitopatologia por toda sua disposição em me ajudar.

Ao Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol/UFV), DBB e Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BioAgro/UFV) pela concessão do espaço para realização dos experimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e às agências de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui.

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

## RESUMO

SANTANA, Samara Aparecida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2024. **Produção de L-asparaginase fúngica para aplicação biotecnológica.** Orientadora: Valéria Monteze Guimarães.

A L-asparaginase catalisa a hidrólise de L-asparagina em ácido aspártico e amônia. É comumente empregada na indústria farmacêutica como agente antitumoral contra leucemia e na indústria de alimentos para reduzir a acrilamida, substância tóxica formada em alimentos ricos em açúcares e L-asparagina, quando processados acima de 120 °C. Há uma crescente demanda por esta enzima e os fungos filamentosos apresentam-se como fontes eficazes e de menor custo para sua produção. Dessa forma, com o objetivo de produzir uma L-asparaginase fúngica com propriedades adequadas para sua aplicação biotecnológica, 25 fungos filamentosos foram previamente selecionados e submetidos a uma triagem em placas para produção de L-asparaginase. Os fungos foram cultivados em meio ágar Czapek Dox contendo vermelho de fenol e L-asparagina durante 5 dias em BOD a 28 °C. Treze isolados apresentaram halo avermelhado ao redor de suas colônias, indicativo da atividade da L-asparaginase. Estes foram selecionados e cultivados em meio líquido contendo caldo Czapek Dox suplementado com L-asparagina (10 g/L) a 28 °C e 150 rpm e, após 7 dias, o extrato bruto foi utilizado para quantificar a atividade asparaginolítica. O ensaio enzimático foi realizado a 37 °C, pH 7,2, por 1 h utilizando L-asparagina 0,04 M como substrato e a amônia liberada no sobrenadante foi determinada espectrofotometricamente pelo método de Nessler. *C. subuliforme* foi o fungo capaz de produzir a enzima de interesse com a maior atividade dentro das condições estabelecidas. Após a caracterização da atividade da L-asparaginase presente no extrato bruto, e com a padronização das condições do ensaio enzimático, a atividade enzimática passou de 0,38 U/mL para 1,048 U/mL. As condições do ensaio padrão foram então definidas como sendo pH 6,0; 50 °C; 0,08 M de L-asparagina e 30 minutos de reação. Por meio da cromatografia de troca iônica, a enzima foi purificada 10,62 vezes, com rendimento de quase 40 %, sendo a atividade específica de 13,64 U/mg. A análise da fração purificada em SDS-PAGE revelou uma banda intensa de 56 kDa, que, ao ser analisada por LC-MS/MS, apresentou homologia com a enzima Acetamidase/Formamidase. A falta de informações em banco de dados sobre a proteína alvo e o *C. subuliforme* podem ter dificultado a identificação da enzima purificada. O máximo desempenho da L-ASNase foi observado nas condições de pH 8,0 e temperatura de 50 - 60 °C. A enzima foi bastante termoestável e apresentou tempos de meio vida de 49,51 h; 46,21 h e 7,29 h à 37 °C, 50 °C e 60 °C, respectivamente. Além disso, a enzima manteve mais de 80 % da

atividade quando pré-incubada em pH 7 a 12 e mais de 60 % da atividade em pH 3 a 6. O efeito inibitório reduzido dos agentes desnaturantes SDS, DTT e ureia sobre a atividade da L-asparaginase também contribuiu para indicar que a enzima possui propriedades bioquímicas interessantes para o setor industrial, podendo se tratar de uma provável enzima com alta estabilidade. Em adição, a enzima mostrou baixa afinidade por L-glutamina, comparada à atividade asparaginolítica, sendo o valor de  $K_M$  para L-asparagina de 0,024 M. A técnica de HPLC foi utilizada para quantificar acrilamida presente em amostras de um modelo de alimento tratado com a enzima purificada, para avaliar a capacidade da enzima em reduzir os níveis de acrilamida. Embora a padronização do ensaio de quantificação de acrilamida e L-asparagina por HPLC tenha sido realizada, os resultados de aplicação da enzima foram inconclusivos, sendo necessária a padronização dos parâmetros de ensaio do tratamento térmico para produção de acrilamida. Este é um dos primeiros estudos sobre a atividade asparaginolítica de *C. subuliforme* e os resultados sugerem que este fungo pode ser um potente candidato para a obtenção de uma L-asparaginase com propriedades adequadas e promissoras para sua aplicação no setor alimentício e com perspectivas para o setor terapêutico.

Palavras-chave: L-asparaginase; Acrilamida; Fungos filamentosos; *Cladosporium subuliforme*.

## ABSTRACT

SANTANA, Samara Aparecida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2024. **Production of fungal L-asparaginase for biotechnological application.** Adviser: Valéria Monteze Guimarães.

L-asparaginase catalyzes the hydrolysis of L-asparagine to aspartic acid and ammonia. It is commonly used in the pharmaceutical industry as an antitumor agent against leukemia and in the food industry to reduce acrylamide, a toxic substance formed in foods rich in sugar and L-asparagine, when processed above 120 °C. There is a growing demand for this enzyme and filamentous fungi present themselves as effective and lower-cost sources for its production. Thus, with the aim of producing a fungal L-asparaginase with properties suitable for its biotechnological application, 25 filamentous fungi were previously selected and subjected to plate screening for the production of L-asparaginase. The fungi were cultivated on Czapek Dox agar medium containing phenol red and L-asparagine for 5 days in BOD at 28 °C. Thirteen isolates presented a reddish halo around their colonies, which indicates L-asparaginase activity. These ones were selected and cultivated in liquid medium containing Czapek Dox broth supplemented with L-asparagine (10 g/L) at 28 °C and 150 rpm and, after 7 days, the crude extract was used to quantify asparaginolytic activity. The enzymatic assay was carried out at 37 °C, pH 7.2, for 1 h using 0.04 M L-asparagine as substrate and the ammonia released in the supernatant was determined spectrophotometrically using Nessler's method. *C. subuliforme* was the fungus capable of producing the enzyme of interest with the highest activity within the established conditions. After characterizing the activity of L-asparaginase present in the crude extract, and with the standardization of the enzymatic assay conditions, the enzymatic activity increased from 0.38 U/mL to 1.048 U/mL. Standard assay conditions were then set to pH 6.0; 50 °C; 0.08 M L-asparagine and 30 minutes of reaction. Using ion exchange chromatography, the enzyme was purified 10.62 times, with a yield of almost 40 %, with a specific activity of 13.64 U/mg. Analysis of the purified fraction in SDS-PAGE revealed an intense band of 56 kDa, which, when analyzed by LC-MS/MS, showed homology with the enzyme Acetamidase/Formamidase. The lack of information in the database about the target protein and *C. subuliforme* may have made it difficult to identify the purified enzyme. The maximum performance of L-ASNase was observed under conditions of pH 8.0 and temperature of 50 - 60 °C. The enzyme was quite thermostable and had half-lives of 49.51 h; 46.21 h and 7.29 h at 37 °C, 50 °C and 60 °C, respectively. Furthermore, the enzyme maintained more than 80 % of activity when pre-incubated at pH 7 to 12 and more than 60% of activity at pH 3 to 6. The

reduced inhibitory effect of the denaturing agents SDS, DTT and urea on enzyme activity L-asparaginase also contributed to indicating that the enzyme has interesting biochemical properties for the industrial sector, and may be a probable enzyme with high stability. In addition, the enzyme showed low affinity for L-glutamine, compared to the asparaginolytic activity, with the  $K_M$  value for L-asparagine being 0.024 M. The HPLC technique was used to quantify acrylamide present in samples of a food model treated with the purified enzyme, to evaluate the enzyme's ability to reduce acrylamide levels. Although the standardization of the acrylamide and L-asparagine quantification assay by HPLC was carried out, the results of applying the enzyme were inconclusive, requiring the standardization of the heat treatment assay parameters for acrylamide production. This is one of the first studies on the asparaginolytic activity of *C. subuliforme* and the results suggest that this fungus may be a powerful candidate for obtaining an L-asparaginase with suitable and promising properties for its application in the food sector and with prospects for the therapeutic sector.

**Keywords:** L-asparaginase; Acrylamide; Filamentous fungi; *Cladosporium subuliforme*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Mecanismo de reação da L-asparaginase (*Nuc: resíduo nucleofílico) .....	18
<b>Figura 2</b> - Mecanismo de ação da L-ASNase como agente antitumoral .....	20
<b>Figura 3</b> - Mecanismo de formação de acrilamida e atenuação da acrilamida através da L-ASNase: (A) Acrilamida gerada entre açúcares redutores e L-asparagina; (B) Redução da acrilamida em alimentos por meio da conversão de L-asparagina em ácido L-aspártico pela L-ASNase .....	24
<b>Figura 4</b> - Níveis de referência de acrilamida estabelecidos para os alimentos .....	25
<b>Figura 5</b> - Resultado positivo para produção de L-ASNase, a partir da triagem em placa contendo ágar Czapek Dox modificado e vermelho de fenol, após cultivo dos fungos por 5 e 7 dias a 28 °C. De cima para baixo: placa teste, placa controle B (meio de cultura com inóculo fúngico e sem L-asparagina) e placa controle C (meio de cultura com inóculo fúngico sem a presença de vermelho de fenol) e em (n) controle negativo A (meio de cultura sem inóculo fúngico). (a) <i>F. velutipes</i> , (b) <i>C. tenuissimum</i> (CCF 102), (c) <i>C. tenuissimum</i> (CCF 131), (d) <i>C. subuliforme</i> , (e) <i>C. pseudocladosporioides</i> (CCF 333), (f) <i>A. flavus</i> , (g) <i>A. tamarii</i> , (h) <i>A. caespitosus</i> , (i) <i>C. karstii</i> , (j) <i>P. brevicompactum</i> , (k) <i>F. oxysporum</i> , (l) <i>P. crustosum</i> e (m) <i>A. oryzae</i> .....	40
<b>Figura 6</b> - Resultado negativo para produção de L-ASNase, a partir da triagem em placa contendo ágar Czapek Dox modificado e vermelho de fenol, após cultivo dos fungos por 5 e 7 dias a 28 °C. De cima para baixo: placa teste, placa controle B (meio de cultura com inóculo fúngico e sem L-asparagina) e placa controle C (meio de cultura com inóculo fúngico sem a presença de vermelho de fenol). (a) <i>A. elegans</i> , (b) <i>A. niger</i> , (c) <i>C. pseudocladosporioides</i> (CCF 330), (d) <i>Ganoderma</i> sp., (e) <i>Trametes</i> sp. (J2), (f) <i>Trametes</i> sp. (J5), (g) <i>Lepista</i> sp., (h) <i>P. eryngii</i> (PLE 01), (i) <i>P. eryngii</i> (PLE 05), (j) <i>P. eryngii</i> (PLE 117), (k) <i>P. ostreatus</i> e (l) <i>P. djamor</i> .....	41
<b>Figura 7</b> - Ensaio quantitativo da atividade de L-ASNase detectada nos extratos brutos dos fungos cultivados sob fermentação submersa por 7 dias, a 28 °C e 150 rpm.....	43
<b>Figura 8</b> - Atividade de L-ASNase detectada no extrato bruto de <i>C. subuliforme</i> cultivado em meio líquido contendo caldo Czapek Dox (meio CCD) e cultivado em meio contendo o substrato sólido farelo de trigo acrescido de solução com L-asparagina 0,05 % (meio FT)....	45

<b>Figura 9</b> - Atividade de L-ASNase detectada no período de 5 a 10 dias de cultivo de <i>C. subuliforme</i> em caldo Czapek Dox.....	46
<b>Figura 10</b> - Caracterização parcial da L-ASNase presente no extrato bruto de <i>C. subuliforme</i> . (A) efeito de pH, (B) efeito da temperatura, (C) tempo de reação e (D) concentração de substrato .....	47
<b>Figura 11</b> - Perfil de eluição da L-ASNase de <i>C. subuliforme</i> em cromatografia líquida de proteína rápida (FPLC), empregando 5 mL de amostra na coluna de troca iônica HiTrap™ DEAE FF, em pH 6,0 .....	50
<b>Figura 12</b> - (A): Eletroforese em gel SDS-PAGE (12 %) das amostras contendo a L-ASNase de <i>C. subuliforme</i> . 1 – Marcador de peso molecular; 2 – Extrato bruto concentrado; 3 – Amostra após a etapa de purificação por cromatografia de troca iônica, DEAE; (B): Regressão linear para estimar a massa molecular da enzima purificada (ponto em destaque).....	53
<b>Figura 13</b> – (A) Efeito da temperatura na atividade da L-ASNase de <i>C. subuliforme</i> e (B) Avaliação da termoestabilidade da L-ASNase de <i>C. subuliforme</i> .....	55
<b>Figura 14</b> - (A) Efeito do pH na atividade da L-ASNase de <i>C. subuliforme</i> e (B) Avaliação da estabilidade ao pH da L-ASNase de <i>C. subuliforme</i> .....	56
<b>Figura 15</b> - Efeito de íons, efetores e agentes desnaturantes na atividade de L-ASNase de <i>C. subuliforme</i> .....	57
<b>Figura 16</b> - Efeito de agentes desnaturantes na atividade de L-ASNase de <i>C. subuliforme</i> ...	58
<b>Figura 17</b> - Especificidade da L-ASNase de <i>C. subuliforme</i> ao substrato L-asparagina 0,08 M e L-glutamina 0,08 M .....	59
<b>Figura 18</b> - (A) Gráfico de Michaelis-Menten e (B) Lineweaver-Burk para determinação dos parâmetros cinéticos $K_M$ e $V_{máx}$ da L-ASNase de <i>C. subuliforme</i> , usando L-asparagina como substrato.....	60
<b>Figura 19</b> - Análise dos padrões de (A) acrilamida (10 µg/mL) e (B) L-asparagina (0,5 g/L) por HPLC.....	62
<b>Figura 20</b> - Análise de acrilamida por HPLC da (A) amostra 1 (controle negativo: modelo de alimento + água), (B) amostra 1 com resolução aumentada, (C) amostra 2 (controle positivo: modelo de alimento + L-ASNase comercial) e (D) amostra 3 (modelo de alimento + L-ASNase purificada de <i>C. subuliforme</i> ) .....	63

**Figura 21** - Análise de acrilamida por HPLC após adição de 10 µg/mL de acrilamida na (A) amostra 1 (controle negativo: modelo de alimento + água), e na (B) amostra 2 (controle positivo: modelo de alimento + enzima comercial) .....64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - L-asparaginases comerciais acessíveis para aplicação na indústria alimentícia e terapêutica.....	22
<b>Tabela 2</b> - Fungos pré-selecionados para o ensaio qualitativo para a produção de L-ASNase	28
<b>Tabela 3</b> - Construção da curva analítica de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .....	31
<b>Tabela 4</b> - Resultado do ensaio qualitativo a partir do cultivo de 25 fungos em placas contendo o meio ágar Czapek Dox e vermelho de fenol, por 5 e 7 dias em BOD a 28 °C.....	38
<b>Tabela 5</b> – Tabela de purificação de L-ASNase de <i>C. subuliforme</i> .....	50

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo geral .....	17
2.2 Objetivos específicos .....	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	18
3.1 L-asparaginase: reação catalisada e fontes produtoras .....	18
3.2 Aplicação industrial da L-ASNase .....	19
3.2.1 Indústria farmacêutica .....	20
3.2.2 Indústria de alimentos .....	20
3.2.3 Biossensor .....	21
3.3 L-ASNases comerciais.....	21
3.4 Redução da acrilamida em alimentos .....	23
3.5 Fungos produtores de L-ASNase.....	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 Seleção do fungo.....	28
4.1.1 Coleta de dados e pré-seleção de fungos filamentosos .....	28
4.1.2 Obtenção dos isolados fúngicos .....	29
4.1.3 Ensaio qualitativo para a produção de L-ASNase.....	29
4.1.4 Ensaio quantitativo: obtenção do extrato bruto.....	29
4.1.5 Ensaio quantitativo: atividade de L-ASNase .....	30
4.2 Padronização do meio de cultivo .....	31
4.3 Padronização do ensaio de reação.....	32
4.3.1 Efeito da concentração de L-asparagina na atividade de L-ASNase .....	32
4.3.2 Efeito da temperatura na atividade de L-ASNase .....	32
4.3.3 Efeito do pH na atividade de L-ASNase .....	32
4.3.4 Efeito do tempo de reação na atividade de L-ASNase.....	32
4.4 Purificação da L-ASNase.....	33
4.4.1 Cromatografia de troca iônica .....	33
4.5 Quantificação de proteínas.....	33

4.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	34
4.7 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS).....	34
4.8 Caracterização da L-ASNase purificada.....	35
4.8.1 Efeito da temperatura na atividade da L-ASNase purificada.....	35
4.8.2 Avaliação da termoestabilidade .....	35
4.8.3 Efeito do pH na atividade da L-ASNase purificada.....	35
4.8.4 Avaliação da estabilidade ao pH .....	36
4.8.5 Influência de íons, efetores e agentes desnaturantes na atividade de L-ASNase .....	36
4.8.6 Especificidade da L-ASNase ao substrato .....	36
4.8.7 Determinação dos parâmetros cinéticos $K_M$ e $V_{m\acute{a}x}$ .....	36
4.9 Avaliação da eficiência da L-ASNase .....	37
4.10 Quantificação de acrilamida .....	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
5.1 Seleção do fungo.....	38
5.1.1 Ensaio qualitativo para a produção de L-ASNase: Triagem em placa.....	38
5.1.2 Ensaio quantitativo para a produção de L-ASNase: cultivo em meio líquido .....	42
5.2 Caracterização parcial do extrato bruto obtido de <i>C. subuliforme</i> .....	44
5.2.1 Padronização do meio de cultivo para <i>C. subuliforme</i> .....	44
5.2.2 Padronização dos parâmetros do ensaio enzimático .....	46
5.3 Purificação da L-ASNase de <i>C. subuliforme</i> .....	49
5.3.1 Cromatografia de troca iônica .....	49
5.3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	52
5.3.3 LC-MS/MS para identificação de L-ASNase de <i>C. subuliforme</i> .....	53
5.4 Caracterização da L-ASNase purificada.....	54
5.4.1 Avaliação da termoestabilidade, estabilidade ao pH, efeito da temperatura e efeito do pH na atividade da L-ASNase purificada.....	54
5.4.2 Efeito de íons, efetores e agentes desnaturantes na atividade de L-ASNase purificada .....	57
5.4.3 Especificidade da L-ASNase purificada ao substrato .....	59
5.4.4 Determinação dos parâmetros cinéticos $K_M$ e $V_{m\acute{a}x}$ .....	60

5.5 Avaliação da eficiência da L-ASNase purificada na redução de acrilamida.....	61
6 CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS.....	66

## 1 INTRODUÇÃO

A enzima L-asparaginase (L-asparagina amidohidrolase, EC 3.5.1.1) catalisa a reação de hidrólise do resíduo de aminoácido L-asparagina em amônia e ácido aspártico. Ela pode ser encontrada em diferentes organismos como as bactérias, fungos, leveduras, actinomicetos, algas, plantas e alguns animais (MUNEER *et al.*, 2020).

Atualmente é amplamente aplicada no setor alimentício e terapêutico. Na indústria de alimentos, a L-asparaginase é empregada no pré-tratamento de alimentos que possuem L-asparagina e açúcares redutores em sua composição (JIA *et al.*, 2021). Esses alimentos, ao serem processados termicamente acima de 120 °C, são suscetíveis à reação de Maillard, reação não enzimática que pode resultar na formação final de acrilamida, onde a L-asparagina atua como a principal precursora para a sua formação (CUNHA *et al.*, 2019). A substância acrilamida é classificada como provável carcinógeno humano pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 1994) e sua redução é necessária para garantir alimentos seguros para os consumidores. O uso de L-asparaginase tem se mostrado eficiente em reduzir os níveis de acrilamida, uma vez que atua reduzindo a quantidade de L-asparagina e não altera as propriedades sensoriais e nutricionais do produto final (WANG *et al.*, 2021).

Já na área farmacêutica, essa enzima atua como principal agente antitumoral contra a leucemia linfoblástica aguda. Ao ser injetada na corrente sanguínea, a L-asparaginase hidrolisa a L-asparagina tornando-a indisponível para as células cancerosas que obtém esse importante aminoácido para suas necessidades metabólicas somente por essa via. Dessa forma, as células tumorais, por privação de aminoácidos, sofrem apoptose (NUNES *et al.*, 2020).

As L-asparaginases comerciais disponíveis são oriundas de fontes bacterianas (*Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*) e de fontes fúngicas (*Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*). Porém, elas não são suficientes para atender à demanda do mercado e aquelas de origem bacteriana são relatadas por causarem efeitos colaterais que comprometem a saúde humana como reações de hipersensibilidade, trombose, sangramento, choque anafilático, pancreatite, disfunção hepática, imunossupressão e resistência geral à L-asparaginase (LUBKOWSKI e WLODAWER, 2021; SOUZA *et al.*, 2017).

Diante deste cenário, fontes alternativas para obtenção de L-asparaginase se mostram necessárias e os isolados fúngicos vem ganhando notoriedade não somente por causarem menos danos à saúde, mas também por possuírem algumas vantagens em relação às bactérias. Dentre elas, destaca-se a capacidade dos fungos de crescer facilmente em matrizes sólidas com menor

atividade de água, possibilitando o uso de diferentes resíduos agro industriais no meio de cultivo, o que diminui o custo para a produção enzimática e gera um menor impacto ambiental (BATOOL *et al.*, 2016). Além disso, a maior parte das enzimas produzidas por fungos são extracelulares, facilitando o processo de extração e purificação dessas enzimas.

Visto que os fungos se apresentam como ótimas fontes de L-asparaginase, nota-se a importância de se realizar estudos que visem à exploração de variados isolados fúngicos com intuito de encontrar espécies com potencial de produção desta enzima. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi produzir uma L-asparaginase fúngica que apresentasse as propriedades adequadas para sua aplicação biotecnológica.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Produzir uma L-asparaginase fúngica com propriedades adequadas para ser explorada na indústria alimentícia e terapêutica.

### **2.2 Objetivos específicos**

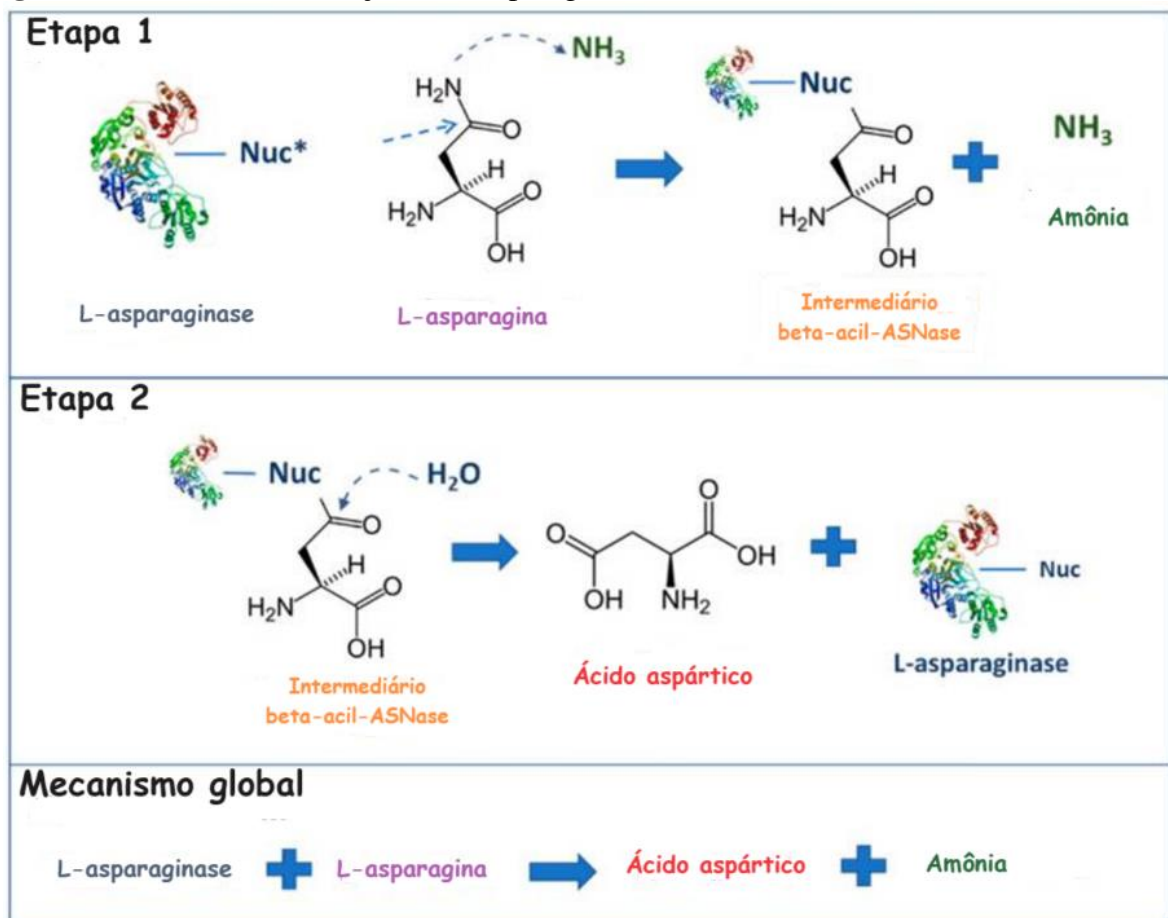
- Avaliar o potencial de fungos filamentosos para a produção de L-asparaginase;
- Selecionar um fungo promissor para a produção de L-asparaginase;
- Determinar as melhores condições de cultivo do fungo para a produção de L-asparaginase;
- Caracterizar parcialmente o extrato bruto obtido a partir do fungo selecionado;
- Purificar a L-asparaginase;
- Caracterizar a enzima purificada;
- Avaliar a eficiência da L-asparaginase na redução da acrilamida em um modelo de alimento.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 L-asparaginase: reação catalisada e fontes produtoras

A L-asparaginase (L-asparagina amidohidrolase, EC 3.5.1.1) é a enzima responsável pela catálise da hidrólise do aminoácido L-asparagina em amônia e ácido aspártico. Essa hidrólise ocorre por meio do ataque ao átomo de carbono ligado ao grupo amino presente na cadeia lateral da L-asparagina por um resíduo nucleofílico presente na L-asparaginase, que leva à formação de uma beta-acil-enzima. Esse intermediário é posteriormente alvo de uma molécula de água que atua atacando o átomo de carbono do éster, gerando os produtos da reação (Figura 1). Essa enzima está ausente nos seres humanos, mas presente em uma variedade de organismos e microrganismos como bactérias, leveduras, fungos, actinomicetos, algas, plantas e alguns animais (CUNHA *et al.*, 2019).

**Figura 1** - Mecanismo de reação da L-asparaginase (\*Nuc: resíduo nucleofílico)



Fonte: Adaptado de NUNES *et al.* (2020).

Mesmo diante de variadas fontes de L-asparaginases, são os microrganismos os mais profundamente explorados devido ao seu baixo custo e baixa complexidade para obtenção, purificação e otimização do produto de interesse (FAZELI *et al.*, 2021).

As L-asparaginases (L-ASNases) são classificadas em três famílias de acordo com suas proximidades em relação às suas sequências de resíduos de aminoácidos, estrutura e função. Podem ser do tipo bacteriano (subdivididas em tipo I e II), do tipo vegetal (tipo III) e do tipo rizóbio. As do tipo bacteriano, as mais bem estudadas, são classificadas dependendo da sua localização e afinidade para o substrato L-asparagina. Em *Escherichia coli* a ASNase tipo I (EcA I) é encontrada na forma homodimérica no citosol da célula e possui maior afinidade para o aminoácido L-glutamina do que para a L-asparagina. Já a ASNase tipo II (EcA II), geralmente é encontrada no periplasma na sua forma homotetramérica e, diferentemente da EcA I, possui maior afinidade para o aminoácido L-asparagina. Devido à sua maior afinidade específica para L-asparagina, a EcA II é a mais comumente usada como agente antitumoral (CASTRO *et al.*, 2021; JIA *et al.*, 2021; MUNEER *et al.*, 2020). Sua primeira aplicação na área medicinal aconteceu em 1978 após ter seu uso aprovado e liberado pela agência “Food and Drug Administration” (FDA). A L-ASNase foi a primeira enzima a ser utilizada no tratamento contra o câncer (LUBKOWSKI e WLODAWER, 2021).

As L-ASNases do tipo vegetal podem depender de  $K^+$  para sua funcionalidade e por essa razão são subdivididas em dependentes e independentes de  $K^+$  (JIA *et al.*, 2021). Já as do tipo rizóbio são incluídas nesse grupo em específico devido ao fato de que suas sequências possuem homologia com a L-ASNase tipo II de *Rhizobium etli*, encontrada em leguminosas (MORENO-ENRÍQUEZ *et al.*, 2012).

Em se tratando das L-ASNases fúngicas, com base na sequência de seus aminoácidos, afinidade pelo substrato e homologia estrutural, geralmente são classificadas dentro da família das bactérias. As L-ASNases de *Fusarium proliferatum* e *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, já foram estudadas e classificadas dentro do grupo bacteriano como L-ASNases do tipo II (CARDOSO *et al.*, 2023; SOUZA, 2019).

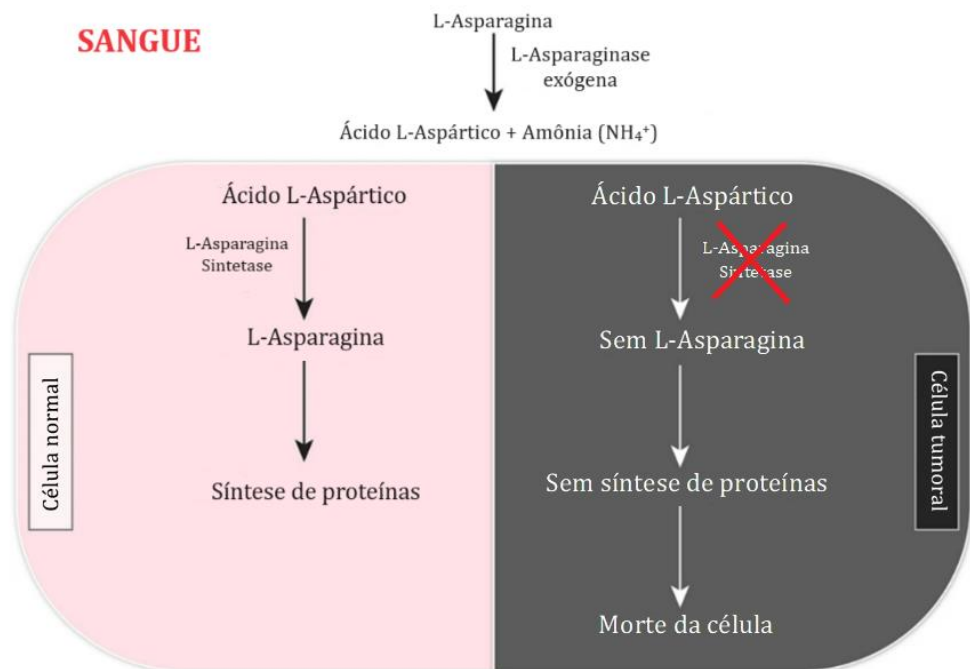
### **3.2 Aplicação industrial da L-ASNase**

Devido à sua propriedade hidrolítica, a ASNase é alvo de diferentes áreas industriais sendo mais comumente empregada na indústria de alimentos, farmacêutica e como biossensor, principalmente para diagnóstico clínico.

### 3.2.1 Indústria farmacêutica

Na área farmacêutica, essa enzima atua no tratamento de câncer, mais precisamente a leucemia linfoblástica aguda (LLA), que afeta principalmente crianças até os 14 anos de idade. Sua ação como fármaco antitumoral se baseia na privação de aminoácidos. Isso acontece porque diferente das células normais, as células cancerosas carecem da enzima L-asparagina sintetase e por essa razão, dependem da L-asparagina exógena presente na corrente sanguínea, resíduo de aminoácido essencial para o seu metabolismo, sobrevivência e proliferação. Sendo assim, ao administrar ASNase no corpo do paciente, a L-asparagina, necessária para síntese de RNA e proteínas, se torna indisponível no sangue, levando à parada do ciclo celular e consequente morte das células cancerosas (Figura 2) (PARASHIVA *et al.*, 2023a).

**Figura 2** - Mecanismo de ação da L-ASNase como agente antitumoral



Fonte: Adaptado de PARASHIVA *et al.* (2023a).

### 3.2.2 Indústria de alimentos

Alguns alimentos ricos em carboidratos e que possuem L-asparagina em sua composição, quando são processados em temperaturas acima de 120 °C, são suscetíveis à reação

de Maillard e podem apresentar altos teores de acrilamida. Dessa forma, o uso de L-ASNase ocorre com o intuito de atenuar os níveis de acrilamida por meio da mitigação dos níveis de L-asparagina, principal precursor para formação dessa substância tóxica ao organismo (CUNHA *et al.*, 2019).

Na indústria alimentícia, o comitê de especialistas da FAO/OMS (Food and Agriculture Organization of the United Nations) recomenda o uso de somente duas preparações enzimáticas de L-ASNase como aditivos alimentares (JIA *et al.*, 2021). Essas preparações são advindas de fontes fúngicas consideradas GRAS (geralmente reconhecidas como seguras): PreventASe® (a partir de *Aspergillus niger*) e Acrylaway® (a partir de *Aspergillus oryzae*) (ALAM *et al.*, 2019).

### 3.2.3 Biossensor

Além das aplicações na indústria alimentícia e farmacêutica, a L-ASNase vem sendo explorada como biossensor, principalmente para diagnóstico clínico. A atuação do biossensor é baseada na mudança de pH ocasionada pela liberação da amônia, produto da hidrólise de L-asparagina. Em comparação com outros métodos de detecção já utilizados, como os espectroscópicos, a ASNase se mostra como uma tecnologia simples, direta, promissora e específica para monitorar e quantificar tanto os níveis de L-asparagina presente em vários alimentos quanto os níveis de L-asparagina presente em amostras de sangue de pacientes portadores de LLA e linfossarcoma (NUNES *et al.*, 2020). A sensibilidade dos biossensores a base de ASNase microbiana permite que uma ampla faixa de detecção de L-asparagina entre  $10^{-10}$  e  $10^{-1}$  M seja possível de ser alcançada (NUNES *et al.*, 2021).

### 3.3 L-ASNases comerciais

O aumento da demanda por L-ASNase no setor industrial em todo o mundo pode torná-la um importante insumo no mercado de enzimas (SANTOS, 2014). Segundo o relatório realizado por “Global Asparaginase Sales Market Report” (2018), em 2017 a demanda global de asparaginase foi de 380 milhões de dólares e há uma previsão de que este valor possa alcançar 420 milhões de dólares até 2025. As ASNases atualmente disponíveis no mercado podem ser conferidas na Tabela 1.

**Tabela 1 - L-asparaginases comerciais acessíveis para aplicação na indústria alimentícia e terapêutica**

<b>Campos de aplicação</b>	<b>Forma da L-ASNase</b>	<b>Fonte de L-ASNase</b>	<b>Nome do produto</b>	<b>Corporação</b>
<b>Indústria alimentícia</b>	L-ASNase nativa	<i>A. niger</i>	PreventAse®	DSM Food Specialties, Dinamarca
		<i>A. niger</i>	PreventAse®XR	DSM Food Specialties, Dinamarca
	L-ASNase nativa	<i>A. oryzae</i>	Acrylaway™	Novozymes, Dinamarca
		<i>E. coli</i>	Elspar®	Ovation Pharmaceuticals, EUA
		<i>E. coli</i>	Kidrolase®	EUSA Pharma, Reino Unido
		<i>E. coli</i>	Leunase®	Sanofi-Aventis, França
<b>Aplicações farmacêuticas</b>	L-ASNase recombinante	<i>E. coli</i>	Medac®	Kyowa Hakkō, Japão
		<i>E. coli</i>	Spectrila®	Medac GmbH, Dinamarca
	L-ASNase PEGuilada	<i>E. coli</i>	Erwinase®	EUSA Pharma, Reino Unido
		<i>E. coli</i>	Oncaspar®	Enzon Pharmaceuticals Inc., EUA
		<i>E. coli</i>	Pegaspargase®	Jiang Su Heng Rui Medicine Co. Ltd., China
		NR	Leucoginase	VHB Life Science Inc., Índia

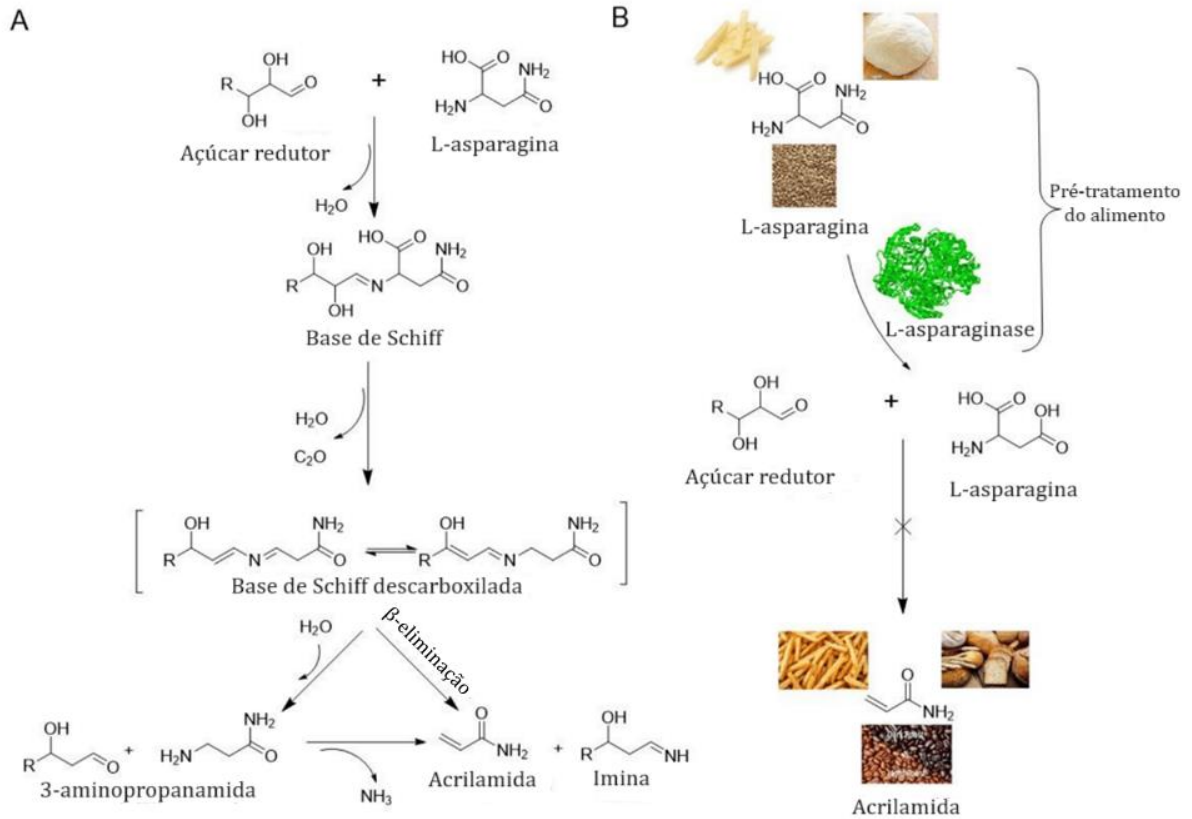
NR: Não relatado

Fonte: Adaptado de WANG *et al.* (2021).

### 3.4 Redução da acrilamida em alimentos

A acrilamida é considerada carcinogênica, genotóxica e neurotóxica em testes com animais (PENNISI *et al.*, 2013) e, em 1994, foi classificada como provável carcinógeno humano pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 1994). Ela é formada durante cozimento, grelha e/ou fritura de alimentos que apresentam em sua composição L-asparagina e açúcares redutores. Em condições de baixa umidade e temperaturas acima de 120 °C, esses dois compostos, por meio da reação de Maillard, formam acrilamida por uma rota que inclui formação de uma base de Schiff, descarboxilação e  $\beta$ -eliminação (Figura 3A). Os principais fatores que influenciam na formação de acrilamida são a presença de aminoácidos livres, em especial a L-asparagina, açúcares redutores e as condições de processamento como: umidade, temperatura e tempo de cozimento. De acordo com a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos, os produtos de panificação, aqueles à base de batata e o café são os maiores responsáveis pela exposição humana à acrilamida (EFSA, 2015; TAVARES, 2015).

**Figura 3** - Mecanismo de formação de acrilamida e atenuação da acrilamida através da L-ASNase: (A) Acrilamida gerada entre açúcares redutores e L-asparagina; (B) Redução da acrilamida em alimentos por meio da conversão de L-asparagina em ácido L-aspártico pela L-ASNase



Fonte: Adaptado de JIA *et al.* (2021).

Os primeiros relatos sobre a existência de acrilamida em alimentos foram realizados por pesquisadores da Universidade de Estocolmo, na Suécia, em 2002. Eles determinaram a quantidade dessa substância em diferentes matrizes alimentares como batatas, pães, biscoitos e café, e chegaram à conclusão de que, dependendo da dieta da pessoa, esta poderia estar ingerindo algumas dezenas de microgramas de acrilamida por dia (TAREKE *et al.*, 2002). Após essa data, vários órgãos responsáveis pela segurança alimentar se empenharam em mobilizar as indústrias de alimentos para que buscassem alternativas que pudessem contornar essa situação. Agências europeias estabeleceram que a dose de acrilamida em alimentos é de 25 - 35  $\mu\text{g}$  de acrilamida por dia para uma pessoa com cerca de 68 kg (ALAM *et al.*, 2019). Em complemento, em 2017 a Comissão Europeia tornou público os níveis de referência aceitáveis para os principais gêneros alimentícios (Figura 4) (REGULAMENTO (UE), 2017). Atualmente, o estado da Califórnia, Estados Unidos, é o único local do mundo em que há uma legislação que

determina que valores acima de 275 ppb de acrilamida para distintas matrizes alimentares devem ser expostos no rótulo do produto informando ao consumidor a presença da substância (IGNACIO, 2022; FOOD SAFETY BRAZIL, 2014).

**Figura 4** - Níveis de referência de acrilamida estabelecidos para os alimentos

Gênero alimentício	Nível de referência [µg/kg]
Batatas fritas (prontas a comer)	500
Batatas fritas de pacote fabricadas com batatas frescas e com massa de batata	750
Bolachas salgadas à base de batata	
Outros produtos de batata à base de massa de batata	
Pão fresco	
a) Pão à base de trigo	50
b) Pão fresco excluindo pão à base de trigo	100
Cereais para pequeno-almoço (exceto papas)	
— produtos à base de farelo e cereais integrais, grãos tufados pelo processo de <i>gun puffing</i>	300
— produtos à base de trigo e de centeio <sup>(1)</sup>	300
— produtos à base de milho, aveia, espelta, cevada e arroz <sup>(1)</sup>	150
Bolachas e <i>wafers</i>	350
Bolachas salgadas com exceção das bolachas à base de batata	400
Pão estaladiço ( <i>knäckebrot</i> )	350
Pão-de-espécie	800
Produtos semelhantes aos outros produtos desta categoria	300
Café torrado	400
Café instantâneo (solúvel)	850
Sucedâneos do café	
a) Sucedâneos do café exclusivamente a partir de cereais	500
b) Sucedâneos do café obtidos a partir de uma mistura de cereais e chicória	<sup>(2)</sup>
c) Sucedâneos do café obtidos exclusivamente a partir de chicória	4 000
Alimentos para bebés, alimentos à base de cereais transformados destinados a lactentes e crianças pequenas, exceto bolachas e tostas <sup>(3)</sup>	40
Bolachas e tostas para lactentes e crianças pequenas <sup>(3)</sup>	150

<sup>(1)</sup> Cereais não integrais e/ou não à base de farelo. O cereal presente em maior quantidade determina a categoria.

<sup>(2)</sup> O nível de referência a aplicar aos sucedâneos do café obtidos a partir de uma mistura de cereais e chicória tem em conta a proporção relativa destes ingredientes no produto final.

<sup>(3)</sup> Conforme definidos no Regulamento (UE) n.º 609/2013.

Fonte: Regulamento Europeu (2017).

Estratégias de atenuação da acrilamida foram recomendadas, como por exemplo: a mudança da composição do produto, a adição de inibidores de acrilamida, a seleção de matérias-primas, a diminuição da temperatura durante o processamento térmico, além de alguns outros procedimentos de pré-tratamento. Porém, aquele que melhor atendeu à indústria de forma simples e eficaz, sem comprometer as propriedades nutricionais e sensoriais dos alimentos, foi o tratamento enzimático com L-ASNase, em uma etapa que antecede o processamento térmico (WANG *et al.*, 2021). Sendo assim, com a atuação da ASNase, a L-asparagina é hidrolisada e

o ácido aspártico formado, diferente da L-asparagina, não é capaz de desencadear a formação de acrilamida (Figura 3B).

### 3.5 Fungos produtores de L-ASNase

Grande parte das ASNases acessíveis comercialmente são de origem bacteriana e já estão há mais de 40 anos no mercado (LUBKOWSKI e WLODAWER, 2021). Porém, relatos de efeitos colaterais como reações imunogênicas graves, reações de hipersensibilidade, trombose, sangramento, choque anafilático, pancreatite, disfunção hepática, imunossupressão e resistência geral à ASNase tem sido reportados (NUNES *et al.*, 2020; SOUZA *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2021). Em contraste, as L-ASNases de origem fúngica não são notificadas como causadoras de tais efeitos adversos. Isso porque, ao contrário das bactérias, as células fúngicas conseguem glicosilar proteínas como as células humanas e, por essa razão, imagina-se que as enzimas isoladas de fungos provoquem menos imunogenicidade (CASTRO *et al.*, 2021).

Por essa razão, devido ao esforço de se encontrar fontes alternativas para obtenção de L-ASNase, os fungos vêm ganhando notoriedade não somente por causar menos danos à saúde, mas também por se apresentarem como fontes de menor custo já que crescem facilmente em matrizes sólidas, com menor atividade de água, possibilitando o uso de diferentes resíduos agro industriais, causando menor impacto ambiental. Além disso, a grande maioria das enzimas produzidas por fungos são extracelulares, simplificando o processo de extração e purificação dessas enzimas (BATOOL *et al.*, 2016).

Por se mostrar uma excelente fonte alternativa às bactérias, vários estudos buscaram explorar o potencial dos fungos para sua aplicação biotecnológica. Segundo CUNHA *et al.* (2019), GARCIA *et al.* (2023) e PATEL *et al.* (2022), os principais gêneros fúngicos conhecidos por serem produtores desta enzima são *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma* e *Cladosporium*, com ênfase em *Aspergillus* e *Penicillium*, gêneros já bem conhecidos por sua vasta variedade de enzimas extracelulares (GOLGERI M. *et al.*, 2024).

Os fungos pertencentes ao filo Ascomycota são os mais reportados pela produção considerável de L-ASNase. Além de *A. niger* e *A. oryzae*, que são os microrganismos fonte das L-ASNases comerciais usadas como aditivo alimentar (JIA *et al.*, 2021), pode-se destacar *Aspergillus terreus* (ROCHA *et al.*, 2019), *Aspergillus fumigatus* (DUTTA *et al.*, 2015), *Aspergillus tamarii* (BEDAIWY *et al.*, 2016), *Penicillium crustosum* (KHALIL *et al.*, 2021), *Penicillium brevicompactum* (ELSHAFEI *et al.*, 2012), *Penicillium digitatum* (SHRIVASTAVA *et al.*, 2012), *Fusarium oxysporum* (ALI *et al.*, 2018), *Fusarium equiseti*

(EL-GENDY *et al.*, 2021), *Fusarium culmorum* (MEGHAVARNAM e JANAKIRAMAN, 2017), *Trichoderma viride* (LINCOLN *et al.*, 2015), *Cladosporium tenuissimum* (HAMED *et al.*, 2021) dentre outras espécies.

Os fungos do filo Basidiomycota são menos explorados e, por essa razão, carecem de pesquisas que foquem exclusivamente nessa classe de microrganismos. Em 2011, EISELE e colaboradores detectaram pela primeira vez a atividade de L-ASNase de um basidiomiceto, o *Flammulina velutipes* (EISELE *et al.*, 2011). Mais tarde também foram descritos trabalhos envolvendo *Pleurotus ostreatus* (BEDAIWY *et al.*, 2019) e *Ganoderma australe* (CHAKRABORTY e SHIVAKUMAR, 2021). Muito comuns na cultura asiática, esses isolados são comumente empregados na culinária e na área medicinal, devido às suas propriedades nutricionais e farmacológicas, respectivamente e, por essa razão, tornam-se alvos atrativos para área industrial (BERGER e ERSOY, 2022; DERKACH e KLYMENKO, 2023).

Com a crescente demanda de L-ASNase no setor industrial, os fungos filamentosos se apresentam como fontes eficazes para sua produção. Sendo assim, estudos mais aprofundados podem levar à exploração e à descoberta de novas espécies fúngicas com potencial de produção de L-ASNase para sua aplicação tanto na indústria de alimentos quanto na indústria farmacêutica.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Seleção do fungo

#### 4.1.1 Coleta de dados e pré-seleção de fungos filamentosos

Um levantamento de dados foi realizado com o intuito de averiguar quais são os principais fungos filamentosos já conhecidos na literatura que produzem a L-ASNase em níveis consideráveis para sua aplicação na área industrial. Para uma maior cobertura da pesquisa, gêneros fúngicos conhecidos, mas pouco estudados quanto à sua produção de L-ASNase, foram verificados pela plataforma “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) e foram selecionados aqueles que contém o gene com a sequência predita da enzima a ser estudada. Ao todo, foram pré-selecionados 25 fungos filamentosos pertencentes ao filo Ascomycota e Basidiomycota (Tabela 2).

**Tabela 2** - Fungos pré-selecionados para o ensaio qualitativo para a produção de L-ASNase

<b>Fungos</b>
<b>FILO ASCOMYCOTA</b>
<i>Aspergillus caespitosus</i>
<i>Aspergillus elegans</i>
<i>Aspergillus flavus</i>
<i>Aspergillus niger</i>
<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>Aspergillus tamarii</i>
<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i> (CCF 330)
<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i> (CCF 333)
<i>Cladosporium subuliforme</i>
<i>Cladosporium tenuissimum</i> (CCF 102)
<i>Cladosporium tenuissimum</i> (CCF 131)
<i>Colletotrichum karstii</i>
<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>Penicillium brevicompactum</i>
<i>Penicillium crustosum</i>
<b>FILO BASIDIOMYCOTA</b>
<i>Flammulina velutipes</i>
<i>Ganoderma</i> sp.
<i>Lepista</i> sp.
<i>Pleurotus djamor</i>
<i>Pleurotus eryngii</i> (PLE 01)
<i>Pleurotus eryngii</i> (PLE 05)
<i>Pleurotus eryngii</i> (PLE 117)
<i>Pleurotus ostreatus</i>
<i>Trametes</i> sp. (J2)
<i>Trametes</i> sp. (J5)

Fonte: A autora.

#### 4.1.2 Obtenção dos isolados fúngicos

Os fungos previamente selecionados foram fornecidos pelo Laboratório de Associações Micorrízicas, Laboratório de Genética Molecular de Fungos e pelo Laboratório de Micologia e Etiologia de Doenças Fúngicas de Plantas, todos localizados na Universidade Federal de Viçosa (UFV). Esses isolados fúngicos foram repicados em placas de Petri estéreis contendo batata dextrose ágar (BDA) e foram mantidos de 7 - 15 dias em BOD a 28 °C. Após o crescimento das colônias fúngicas, as placas foram mantidas sob refrigeração até seu uso nos experimentos.

#### 4.1.3 Ensaio qualitativo para a produção de L-ASNase

Todos os fungos crescidos em meio BDA foram submetidos a uma triagem em placas contendo ágar Czapek Dox modificado (ACDM) (SAXENA e SINHA, 1981) para selecionar os possíveis fungos produtores de L-ASNase. As placas continham os seguintes componentes: L-asparagina (10,0 g/L), glicose (2,0 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,52 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,52 g/L), KCl (0,52 g/L),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,001 g/L),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,001 g/L),  $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (0,001 g/L) e vermelho de fenol 0,009 % (indicador de pH). Antes de ser autoclavado a 121 °C por 15 minutos, o meio foi aferido para pH 6,2. Um disco de 7 mm de micélio fúngico foi transferido para essas placas e foi verificada a produção de L-ASNase pela mudança de cor do meio de cultura. A amônia, um dos produtos gerados a partir da reação catalisada pela L-ASNase, quando é liberada basicifica o meio. Dessa forma, devido à presença do vermelho de fenol, o meio passará de amarelo (condição ácida) para rosa (condição básica) indicando produção da L-ASNase (SANTOS, 2014). Todas as placas foram incubadas em BOD a 28 °C por 7 dias, sendo que a mudança de cor do meio de cultura foi monitorada no quinto e sétimo dia. Três controles negativos foram feitos: controle A, contendo o meio de cultura sem inóculo fúngico; controle B, meio de cultura com inóculo fúngico sem a presença de L-asparagina e controle C, meio de cultura com inóculo fúngico sem a presença de vermelho de fenol (MOHARRAM *et al.*, 2016). O ensaio foi feito em triplicata.

#### 4.1.4 Ensaio quantitativo: obtenção do extrato bruto

Os fungos que testaram positivo para o ensaio qualitativo foram submetidos ao ensaio quantitativo que foi realizado por cultivo submerso. Dois discos de 7 mm de micélio fúngico

foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de caldo Czapek Dox modificado (CDM), que se difere do meio ACDM pela presença de caldo em vez do ágar e ausência do vermelho de fenol. Os frascos foram mantidos a 28 °C sob agitação a 150 rpm por 7 dias. Passado esse período, o conteúdo do frasco foi filtrado em filtro de Nylon e centrifugado a 10000 g durante 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado como extrato bruto no ensaio de reação enzimática.

#### **4.1.5 Ensaio quantitativo: atividade de L-ASNase**

A atividade de L-ASNase foi determinada segundo IMADA *et al.* (1973) com algumas modificações. Para o ensaio enzimático, microtubos de 1,5 mL contendo 100 µL de 0,04 M de L-asparagina, 100 µL de extrato bruto (extrato enzimático), 100 µL de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,2 e 100 µL de água destilada foram mantidos em banho-maria a 37 °C. Após 1 hora de ensaio, 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) 1,5 M foi adicionado para paralisar a reação. Para o controle negativo (branco), o mesmo ensaio enzimático foi realizado, exceto que o TCA foi adicionado antes da incubação por 1 h. Os microtubos foram centrifugados a 6000 g a 4 °C por 5 minutos (SANTOS, 2014). O volume de 20 µL do sobrenadante foi coletado e transferido para outro microtubo contendo 40 µL do reagente de Nessler e 740 µL de água destilada. Após 20 minutos de reação em temperatura ambiente, a amônia liberada foi mensurada em espectrofotômetro a 450 nm (MEGHAVARNAM e JANAKIRAMAN, 2017). O ensaio foi realizado em triplicata.

Uma curva padrão previamente construída com diferentes concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  foi utilizada para estimar a quantidade de amônia produzida (Tabela 3) (FARAG *et al.*, 2015). Uma unidade de enzima (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de gerar 1 µmol de amônia por minuto, nas condições do ensaio. O fungo que apresentou a maior atividade de L-ASNase presente em seu extrato bruto diante das condições estabelecidas foi selecionado para as próximas etapas.

**Tabela 3** - Construção da curva analítica de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 

Solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g/L ( $\mu\text{L}$ )	Reagente de Nessler ( $\mu\text{L}$ )	Água destilada ( $\mu\text{L}$ )	Volume total ( $\mu\text{L}$ )	Quantidade de $\text{NH}_3$ ( $\mu\text{mol}$ )
0	40	760	800	0,00
10	40	750	800	0,08
20	40	740	800	0,15
40	40	720	800	0,30
60	40	700	800	0,46
80	40	680	800	0,61
100	40	660	800	0,76

Fonte: A autora.

#### 4.2 Padronização do meio de cultivo

Para definir as melhores condições de cultivo para produção da L-ASNase, o fungo produtor selecionado foi cultivado em meio líquido e em meio contendo farelo de trigo como substrato sólido. Para o cultivo em meio líquido, 2 discos de 7 mm de micélio fúngico foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio CDM. Os frascos foram mantidos sob agitação a 150 rpm e a 28 °C. Alíquotas foram coletadas do dia 5 ao dia 10 de cultivo, centrifugadas a 10000 g durante 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado como extrato bruto no ensaio de reação.

Já no cultivo em meio com substrato sólido, 1 disco de 7 mm de micélio fúngico foi transferido para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 5 g de farelo de trigo acrescido de 7,5 mL de meio mineral (correspondente a 60 % de umidade). O meio mineral era composto por extrato de levedura (2,0 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,5 g/L),  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (1,0 g/L),  $\text{CuSO}_4$  (0,25 g/L),  $\text{MgSO}_4$  (0,5 g/L),  $\text{ZnSO}_4$  (3,5 mg/L),  $\text{FeCl}_3$  (1,0 mg/L),  $\text{MnCl}_2$  (0,1 mg/L),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (0,075 mg/L) e  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  (0,02 mg/L) (MORGAN, 2018). Os frascos foram mantidos em BOD a 28 °C e o extrato bruto foi coletado do dia 5 ao dia 10 de cultivo. O extrato bruto foi obtido a partir da adição de 50 mL de água destilada (proporção 10:1, água/farelo de trigo) nos meios de cultivo dos frascos Erlenmeyer. Os frascos permaneceram sob agitação a 150 rpm e 28 °C por 1 h e o conteúdo dos frascos foi filtrado em filtros de Nylon e posteriormente centrifugado a 10000 g durante 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado como extrato bruto no ensaio de reação.

A partir da análise da atividade de L-ASNase foi determinado o melhor meio de cultivo e o melhor tempo para o crescimento do fungo e para a produção da enzima de interesse.

### **4.3 Padronização do ensaio de reação**

O ensaio de L-ASNase, utilizando o extrato bruto, foi padronizado, a partir das variações de concentração de L-asparagina, temperatura, pH e de tempo de reação, com a finalidade de padronizar os parâmetros do ensaio enzimático e avaliar as condições para obtenção da maior atividade.

#### **4.3.1 Efeito da concentração de L-asparagina na atividade de L-ASNase**

O ensaio de atividade de L-ASNase foi realizado de acordo com o item 4.1.5 alterando somente o parâmetro concentração de substrato para avaliar seu efeito sobre a atividade enzimática. As soluções de L-asparagina testadas foram: 0,04; 0,08; 0,12; 0,16; 0,20; 0,24; 0,28; 0,32; 0,36 e 0,40 M.

#### **4.3.2 Efeito da temperatura na atividade de L-ASNase**

O ensaio de atividade de L-ASNase foi realizado de acordo com o item 4.1.5, alterando o parâmetro temperatura para avaliar seu efeito sobre a atividade enzimática. Foram testadas as seguintes temperaturas: 28, 37, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 e 80 °C.

#### **4.3.3 Efeito do pH na atividade de L-ASNase**

O ensaio de atividade de L-ASNase foi realizado de acordo com o item 4.1.5, alterando o parâmetro pH para avaliar seu efeito sobre a atividade enzimática. Para isso, diferentes tampões com diferentes faixas de pH foram testados: pH 2,2; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0 com o tampão de McIlvaine (tampão feito com soluções de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M e ácido cítrico 0,1 M); pH 7,2; 8,0; 8,6 e 9,0 usando o tampão Tris-HCl 0,1 M e pH 8,0; 9,0 e 10,0 utilizando o tampão glicina-NaOH 0,1 M.

#### **4.3.4 Efeito do tempo de reação na atividade de L-ASNase**

O ensaio de atividade de L-ASNase foi realizado de acordo com o item 4.1.5, alterando o tempo do ensaio de reação. Para isso, a reação foi paralisada em diferentes intervalos de tempo

com intuito de avaliar seu efeito sobre a atividade enzimática. Os intervalos de tempo testados foram 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos.

#### **4.4 Purificação da L-ASNase**

O extrato bruto obtido foi ultrafiltrado com o auxílio de Amicon® Ultra-15 30 kDa Millipore em centrífuga refrigerada (4 °C) a 4000 g. Esse processo foi realizado para concentrar a amostra 10 vezes antes de prosseguir para etapa de purificação.

##### **4.4.1 Cromatografia de troca iônica**

O extrato bruto concentrado foi submetido à cromatografia líquida de proteína rápida (FPLC - AKTAprime plus), empregando a coluna de troca iônica HiTrap™ DEAE FF 5 mL. Aplicou-se 5 mL da amostra enzimática na coluna previamente equilibrada com tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0 a um fluxo de 4 mL/min. Após a eluição das proteínas não aderidas na coluna, foi aplicado um gradiente salino de 0 a 1 M de NaCl, para eluição diferencial das proteínas aderidas à coluna.

Ao final da cromatografia, todas as frações coletadas foram analisadas quanto à concentração proteica, por meio de espectrofotometria a 280 nm (PATRO e GUPTA, 2012) e quanto a atividade de L-ASNase, de acordo com o ensaio padrão.

As frações contendo maior atividade de L-ASNase foram reunidas e a amostra purificada foi avaliada quanto a concentração de proteínas e atividade de L-ASNase.

#### **4.5 Quantificação de proteínas**

Na amostra purificada contendo a L-ASNase, foi feita a determinação da atividade enzimática, de acordo com o ensaio padrão definido, e a quantificação de proteínas seguindo a metodologia descrita por Bradford (1976), a fim de determinar a atividade específica da enzima e avaliar se a purificação foi bem sucedida. Uma curva padrão foi precedentemente feita usando diferentes concentrações de soro albumina bovina (BSA) e a leitura de cada amostra analisada foi feita em espectrofotômetro a 595 nm.

#### 4.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Amostras do extrato bruto concentrado e da enzima purificada foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (gel de separação 12 % e gel de empilhamento 5 %), segundo LAEMMLI (1970), em condições desnaturantes utilizando dodecil sulfato de sódio (SDS). Após aproximadamente 3 horas de corrida a 80 volts, o gel foi fixado em solução contendo 50 mL de metanol 95 %, 12 mL de ácido acético e 38 mL de água destilada. Após 3 lavagens consecutivas em etanol 50 % por 10 minutos, o gel foi incubado por 1 minuto em solução de tiosulfato de sódio 0,02 %, lavado rapidamente 3 vezes em água destilada e deixado por 20 minutos em solução de nitrato de prata. As bandas foram visualizadas após adição da solução contendo 2 g de carbonato de sódio, 1 mL de solução de tiosulfato de sódio 0,02 %, 0,025 mL de formaldeído e 48,975 mL de água destilada. Quando as bandas atingiram o padrão necessário, adicionou-se 3 mL de ácido acético a mistura a fim de paralisar a reação de revelação das bandas (adaptado de GOLDBERG e WARNER, 1997). Por meio da análise das bandas oriundas do marcador de peso molecular (Bio-Rad, faixa de peso molecular de 10 a 250 kDa) e das amostras, foi possível fazer uma relação entre log da massa molecular (log MM) e a distância percorrida no gel e, assim, estimar o peso molecular da L-ASNase purificada.

#### 4.7 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)

A amostra coletada na cromatografia de troca iônica contendo a maior atividade específica foi usada para análise em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). Previamente, a amostra foi digerida por tripsina em solução pelo método FASP (Filter Aided Sample Preparation) (adaptado de WIŚNIEWSKI *et al.*, 2009) e dessalinizada por cromatografia líquida de fase reversa usando ziptip C18 (Milipore, Darmstadt, Alemanha) seguindo as orientações do fabricante. Após essa preparação, 4 µL da solução de peptídeos trópicos gerados foi injetada no sistema LC-MS/MS (Waters Corporation, Massachusetts, USA) e os solventes água acidificada com ácido fórmico 0,1 % e acetonitrila acidificada com ácido fórmico 0,1 % foram usados como fases móveis. Utilizou-se nanoAcquity UPLC® Peptide BEH C18 1,7 µm; 100 µm x 100 mm como fase estacionária e um fluxo de 14 µL/min.

O espectrômetro de massas Ion Trap, modelo Amazon (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), fonte eletrospray foi utilizado para aquisição de dados de MS1 e MS2 com faixa

de detecção de 100 a 3000 m/z. O programa DataAnalysis, versão 4.0 (Bruker Daltonics, Alemanha) foi utilizado para processamento dos dados obtidos na análise.

Um controle positivo usando BSA foi utilizado na mesma concentração e preparado conforme a amostra em análise.

#### **4.8 Caracterização da L-ASNase purificada**

A amostra da enzima purificada foi submetida a testes que avaliaram os efeitos de pH, temperatura e de íons e efetores sobre a atividade enzimática. Foram mensurados os parâmetros cinéticos e, além disso, a termoestabilidade e a estabilidade ao pH foram investigados com a finalidade de averiguar as condições ideais para atuação da enzima. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

##### **4.8.1 Efeito da temperatura na atividade da L-ASNase purificada**

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi verificado a partir da realização do ensaio padrão de reação definido em diferentes temperaturas: 28, 37, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 e 80 °C.

##### **4.8.2 Avaliação da termoestabilidade**

Para investigar a termoestabilidade, 8 mL de L-ASNase purificada foi pré-incubada nas temperaturas de 37, 50 e 60 °C. Aliquotas de 100 µL foram retiradas em diferentes intervalos de tempo para realizar o ensaio padrão de atividade enzimática, até que fosse verificada a perda significativa da atividade da enzima. O tempo de meia vida, definido como o tempo em que a enzima atinge 50 % de sua atividade a partir da atividade inicial, foi mensurado. A atividade inicial (100 %) foi determinada no tempo zero de incubação.

##### **4.8.3 Efeito do pH na atividade da L-ASNase purificada**

O efeito do pH sobre a atividade enzimática foi aferido a partir da realização do ensaio padrão de reação definido em diferentes tampões com diferentes faixas de pH: pH 2,2; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0 com o tampão de McIlvaine; pH 7,2; 8,0; 8,6 e 9,0 usando o tampão Tris-HCl

0,1 M; pH 8,0; 9,0 e 10,0 utilizando o tampão glicina-NaOH 0,1 M e pH 11,0; 12,0 e 13,0 com o tampão fosfato de potássio 0,1 M.

#### **4.8.4 Avaliação da estabilidade ao pH**

Para investigar a estabilidade da enzima ao pH, 250  $\mu$ L de L-ASNase purificada foram mantidos por 1 hora em banho de gelo contendo diferentes tampões em diferentes valores de pH: pH 2,2; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0 (tampão de McIlvaine); pH 7,2; 8,0; 8,6 e 9,0 (tampão Tris-HCl 0,1 M); pH 8,0; 9,0 e 10,0 (tampão glicina-NaOH 0,1 M) e pH 11,0; 12,0 e 13,0 (tampão fosfato de potássio 0,1 M). A proporção enzima/tampão foi 1:1. Aliquotas de 100  $\mu$ L foram retiradas para realizar o ensaio de atividade padrão nas condições pré-estabelecidas.

#### **4.8.5 Influência de íons, efetores e agentes desnaturantes na atividade de L-ASNase**

Diferentes agentes desnaturantes, íons e efetores foram avaliados quanto à sua influência sobre a atividade de L-ASNase. Para isso, foram adicionados ao ensaio de reação, a uma concentração final de 5 mM, os seguintes compostos: FeSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, KI, ZnSO<sub>4</sub>, AlCl<sub>3</sub>, NaCl, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ditioneitol (DTT), sódio dodecil sulfato (SDS), e ureia (JIAO *et al.*, 2020; SIMAS *et al.*, 2021). A atividade de L-ASNase foi comparada com a atividade realizada na ausência de efetores, considerada como 100 %.

#### **4.8.6 Especificidade da L-ASNase ao substrato**

Para verificar a especificidade da enzima purificada, determinou-se a atividade enzimática de acordo com o ensaio padrão, utilizando os substratos L-asparagina 0,08 M e a outro ensaio, L-glutamina na mesma concentração.

#### **4.8.7 Determinação dos parâmetros cinéticos $K_M$ e $V_{m\acute{a}x}$**

Os parâmetros  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foram determinados medindo as atividades enzimáticas de acordo com o ensaio padrão, em diferentes concentrações de substrato L-asparagina: 0,04; 0,06; 0,08; 0,10; 0,12; 0,16 e 0,20 M. A partir da obtenção dos valores de velocidade da reação ( $V_0$ )

e da concentração do substrato [S], uma curva menteliana foi construída com auxílio do software “SigmaPlot 15” usando como modelo matemático a equação proposta por Michaelis-Menten.

Os valores de  $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_M$  foram determinados por meio da equação de Michaelis-Menten e também pelo gráfico duplo recíproco proposto por Lineweaver e Burk (1934).

#### 4.9 Avaliação da eficiência da L-ASNase

Um modelo de alimento, definido como uma mistura contendo solução de amido 2 % (p/v) e solução de L-asparagina 2 % (p/v) na proporção 1:1, foi empregado para avaliar a eficiência da L-ASNase em reduzir os níveis de acrilamida. Assim sendo, um pré-tratamento do modelo de alimento foi realizado utilizando tubos com 1 mL da mistura amido/L-asparagina e 2 mL da enzima purificada (1 U) que foram mantidos em banho maria a 50 °C por 60 min. Foram feitos um controle negativo, contendo 1 mL da mistura amido/L-asparagina e 2 mL de água destilada e um controle positivo contendo 1 mL da mistura amido/L-asparagina e 2 mL da enzima comercial (L-ASNase de *E. coli*, Sigma-Aldrich) (1 U). Após os 60 minutos de pré-tratamento, prosseguiu-se para o tratamento térmico, onde os tubos foram aquecidos a 180 °C em bloco digestor, por 5 minutos, para formação de acrilamida (ALAM *et al.*, 2018). O ensaio foi feito em triplicata.

#### 4.10 Quantificação de acrilamida

Posteriormente, as amostras foram filtradas em vials com filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  e um volume de 20  $\mu\text{L}$  foi injetado em um cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC – Shimadzu) acoplado a um detector UV/VIS. Foi utilizada a coluna VP-ODS C-18 (150 x 4,6 mm). O processo ocorreu utilizando água/acetonitrila/metanol (90:5:5) como fase móvel, a um fluxo de 1mL/min. A acrilamida foi detectada pelo detector UV/VIS a 203 nm (ALAM *et al.*, 2018; OROIAN *et al.*, 2015). A quantidade de acrilamida foi determinada por meio da construção de uma curva analítica variando a concentração de acrilamida de 0,5  $\mu\text{g/mL}$  a 10  $\mu\text{g/mL}$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Seleção do fungo

#### 5.1.1 Ensaio qualitativo para a produção de L-ASNase: Triagem em placa

O resultado da triagem em placa pode ser conferido na Tabela 4. O símbolo “-” representa resultado negativo e o símbolo “+” representa resultado positivo, sendo que a quantidade de “+” está relacionado com a intensidade da cor rosa verificada na placa.

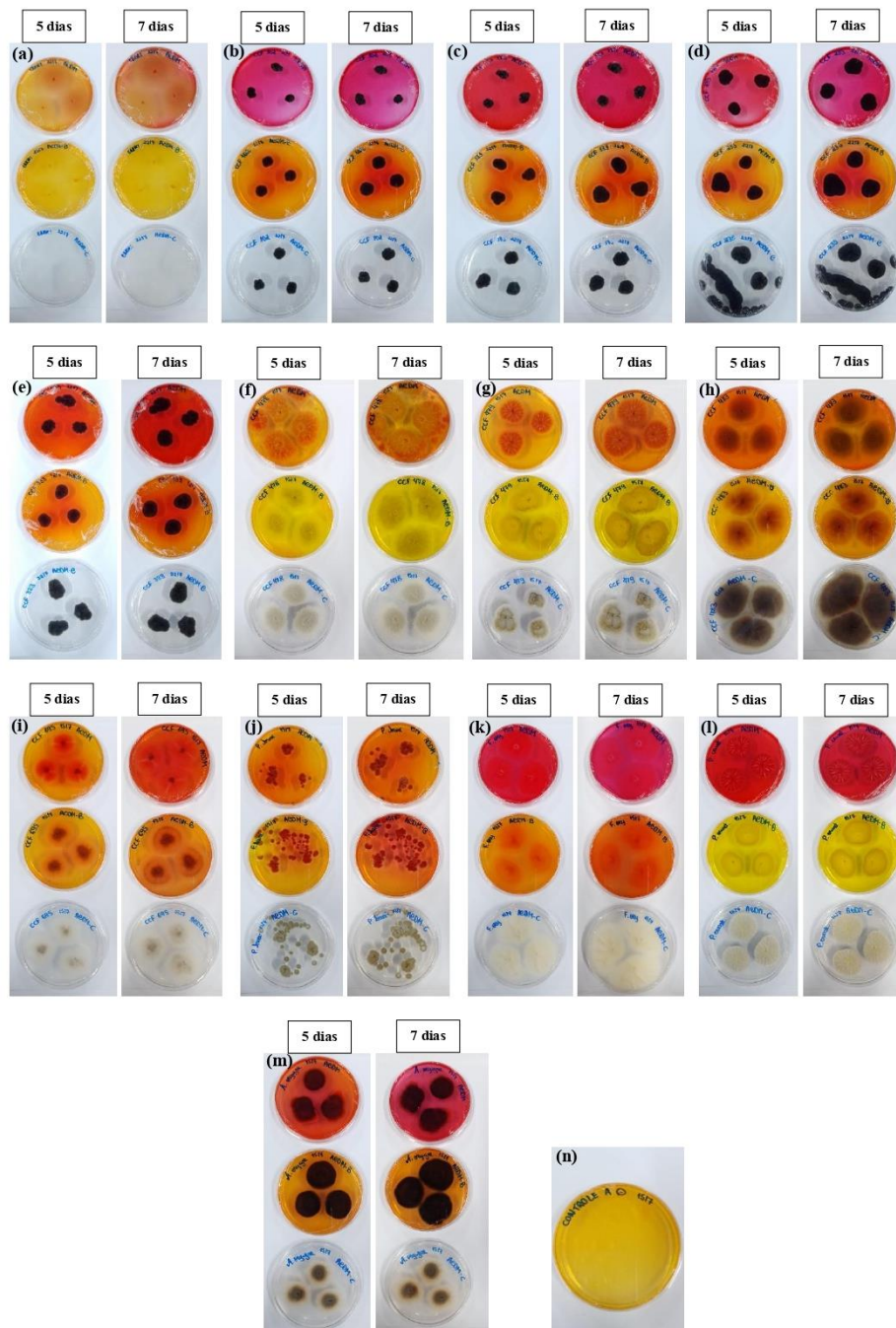
**Tabela 4** - Resultado do ensaio qualitativo a partir do cultivo de 25 fungos em placas contendo o meio ágar Czapek Dox e vermelho de fenol, por 5 e 7 dias em BOD a 28 °C

<b>ASCOMYCOTA</b>		
<b>Fungos</b>	<b>Dia 5</b>	<b>Dia 7</b>
<i>Aspergillus caespitosus</i>	+	++
<i>Aspergillus elegans</i>	-	-
<i>Aspergillus flavus</i>	+	++
<i>Aspergillus niger</i>	-	-
<i>Aspergillus oryzae</i>	+++	+++++
<i>Aspergillus tamaritii</i>	+	++
<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i> (CCF 330)	-	-
<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i> (CCF 333)	++	++++
<i>Cladosporium subuliforme</i>	++++	+++++
<i>Cladosporium tenuissimum</i> (CCF 102)	++++	+++++
<i>Cladosporium tenuissimum</i> (CCF 131)	++++	+++++
<i>Colletotrichum karstii</i>	+	++
<i>Fusarium oxysporum</i>	+++++	+++++
<i>Penicillium brevicompactum</i>	+	++
<i>Penicillium crustosum</i>	+++++	+++++
<b>BASIDIOMYCOTA</b>		
<b>Fungos</b>	<b>Dia 5</b>	<b>Dia 7</b>
<i>Flammulina velutipes</i>	+	++
<i>Ganoderma</i> sp.	-	-
<i>Lepista</i> sp.	-	-
<i>Pleurotus djamor</i>	-	-
<i>Pleurotus eryngii</i> (PLE 01)	-	-
<i>Pleurotus eryngii</i> (PLE 05)	-	-
<i>Pleurotus eryngii</i> (PLE 117)	-	-
<i>Pleurotus ostreatus</i>	-	-
<i>Trametes</i> sp. (J2)	-	-
<i>Trametes</i> sp. (J5)	-	-

Fonte: A autora.

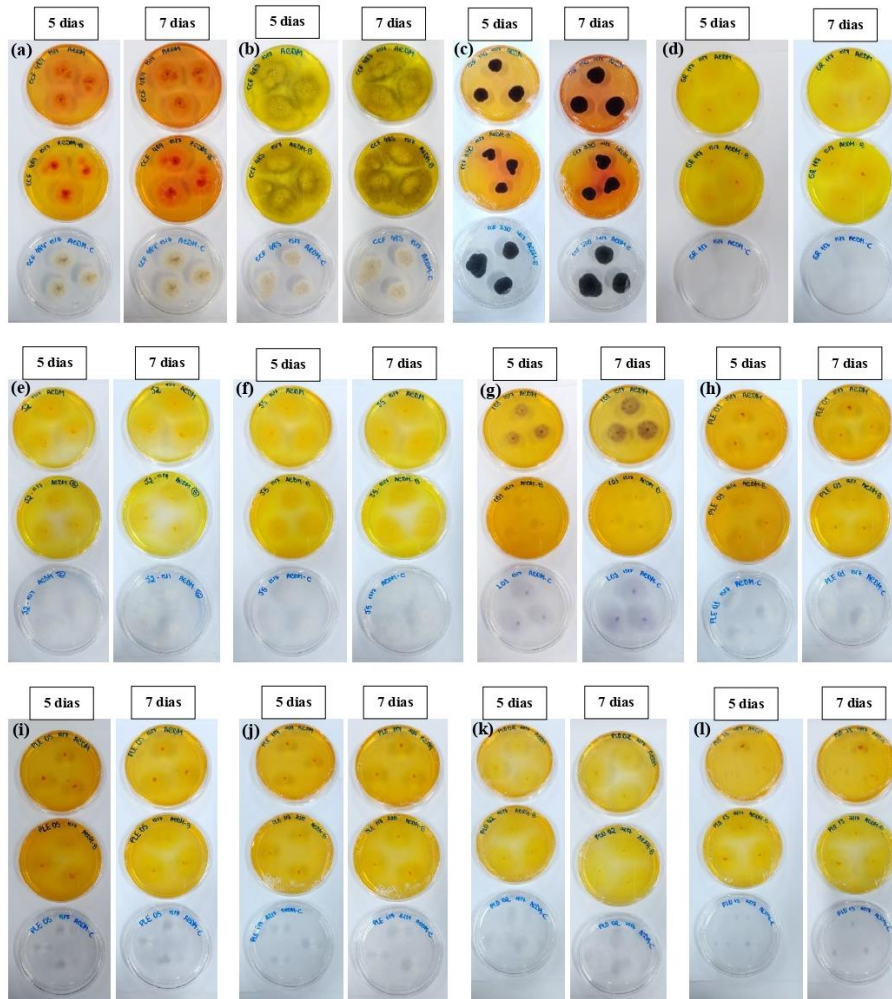
Dos 25 isolados testados, 13 forneceram resultados positivos a partir do ensaio qualitativo, realizado em placa (Figura 5): *A. caespitosus*, *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. tamaritii*, *C. pseudocladosporioides* (CCF 333), *C. subuliforme*, *C. tenuissimum* (CCF 102), *C. tenuissimum* (CCF 131), *C. karstii*, *F. oxysporum*, *P. brevicompactum*, *P. crustosum* e *F. velutipes*. Quando comparado à placa controle sem a presença de L-asparagina, foi possível observar que esses fungos apresentaram diferentes intensidades da cor rosa na placa teste, indicando resultado positivo para a produção de L-ASNase. A amônia, um dos produtos gerados a partir da reação catalisada pela L-ASNase, basicifica o meio e, na presença do vermelho de fenol, o meio passará de amarelo para rosa, o que indica a produção da L-ASNase (SANTOS, 2014). Os 12 fungos que forneceram resultados negativos (Figura 6) foram: *A. elegans*, *A. niger*, *C. pseudocladosporioides* (CCF 330), *Ganoderma* sp., *Lepista* sp., *P. djamor*, *P. eryngii* (PLE 01), *P. eryngii* (PLE 05), *P. eryngii* (PLE 117), *P. ostreatus*, *Trametes* sp. (J2) e *Trametes* sp. (J5).

**Figura 5** - Resultado positivo para produção de L-ASNase, a partir da triagem em placa contendo ágar Czapek Dox modificado e vermelho de fenol, após cultivo dos fungos por 5 e 7 dias a 28 °C. De cima para baixo: placa teste, placa controle B (meio de cultura com inóculo fúngico e sem L-asparagina) e placa controle C (meio de cultura com inóculo fúngico sem a presença de vermelho de fenol) e em (n) controle negativo A (meio de cultura sem inóculo fúngico). (a) *F. velutipes*, (b) *C. tenuissimum* (CCF 102), (c) *C. tenuissimum* (CCF 131), (d) *C. subuliforme*, (e) *C. pseudocladosporioides* (CCF 333), (f) *A. flavus*, (g) *A. tamarii*, (h) *A. caespitosus*, (i) *C. karstii*, (j) *P. brevicompactum*, (k) *F. oxysporum*, (l) *P. crustosum* e (m) *A. oryzae*



Fonte: A autora.

**Figura 6** - Resultado negativo para produção de L-ASNase, a partir da triagem em placa contendo ágar Czapek Dox modificado e vermelho de fenol, após cultivo dos fungos por 5 e 7 dias a 28 °C. De cima para baixo: placa teste, placa controle B (meio de cultura com inóculo fúngico e sem L-asparagina) e placa controle C (meio de cultura com inóculo fúngico sem a presença de vermelho de fenol). (a) *A. elegans*, (b) *A. niger*, (c) *C. pseudocladosporioides* (CCF 330), (d) *Ganoderma* sp., (e) *Trametes* sp. (J2), (f) *Trametes* sp. (J5), (g) *Lepista* sp., (h) *P. eryngii* (PLE 01), (i) *P. eryngii* (PLE 05), (j) *P. eryngii* (PLE 117), (k) *P. ostreatus* e (l) *P. djamor*



Fonte: A autora.

O ensaio de seleção em placa é considerado um rápido método de detecção da produção de L-ASNase fúngica. A atuação da L-ASNase leva ao aumento do pH do meio de cultura, devido à liberação da amônia, produto da reação catalisada pela enzima, promovendo a mudança da coloração amarela (condição ácida) para rosa (condição alcalina), o que pode ser visualmente detectado pela presença do indicador de pH vermelho de fenol.

Com 5 dias de cultivo dos fungos em placa, já foi perceptível a mudança da coloração do meio de cultura, que foi ainda mais evidente após 7 dias de cultivo. Do filo Basidiomycota, somente *F. velutipes* testou positivo. Essa espécie em questão já foi reportada por sua produção tanto de L-ASNase quanto de L-glutaminase (EISELE *et al*, 2011). Já do filo Ascomycota, 12 dos 15 isolados testados apresentaram resultado positivo.

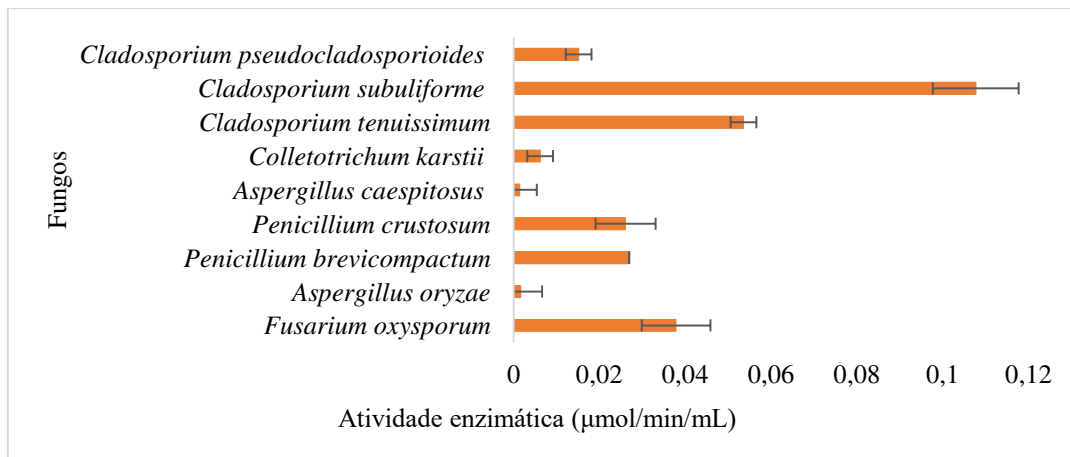
Segundo RANI *et al.* (2012), trinta e oito isolados de fungos do solo foram cultivados a 30 °C e, a partir de 48 h, foi evidenciado um halo rosado ao redor das colônias de 23 fungos, sendo *Aspergillus* sp. aquele que apresentou o maior diâmetro do halo. *A. caespitosus*, *A. oryzae* e *Penicillium solitum* também foram selecionados por FERNANDES *et al.* (2021) devido ao seu resultado satisfatório na triagem em placa. Já HATAMZADEH *et al.* (2020) destacou 38 dos 84 isolados inicialmente avaliados que exibiram zona rosada nas placas contendo meio Czapek Dox. Dentre eles *Fusarium* sp., *F. oxysporum* e *C. tenuissimum* foram mencionados. Os fungos endofíticos *Penicillium chrysogenum*, *P. brevicompactum* e *C. cladosporioides* também apresentaram mudança de coloração da placa quando estudados por SANTOS (2014). Um outro gênero identificado como produtor de L-ASNase no ensaio qualitativo em placa foi o *Colletrotrichum* (CHOW e TING, 2015). Esses achados demonstram que todas as espécies que se mostraram prováveis fontes de L-ASNase no estudo aqui realizado pertencem a gêneros já reportados como produtores dessa enzima.

### **5.1.2 Ensaio quantitativo para a produção de L-ASNase: cultivo em meio líquido**

Os 13 isolados fúngicos que testaram positivo no teste qualitativo foram cultivados em meio líquido (caldo Czapek Dox). Transcorridos 7 dias de cultivo a 28 °C e 150 rpm, o extrato bruto obtido foi utilizado no ensaio de reação para detecção da atividade de L-ASNase, pelo método de Nesslerização. Foi possível detectar a atividade de L-ASNase nos extratos brutos produzidos por 9 fungos (Figura 7). O fungo *C. subuliforme* se destacou quanto à produção da enzima e apresentou a maior atividade enzimática, aproximadamente 0,11 U/mL, mais que o dobro da atividade verificada pelo segundo maior produtor, *C. tenuissimum* (0,05 U/mL), seguido de *F. oxysporum* (0,04 U/mL). Sendo assim, *C. subuliforme* foi selecionado para ser

investigado sobre seu potencial como fonte de produção de L-ASNase com propriedades interessantes para aplicação industrial.

**Figura 7** - Ensaio quantitativo da atividade de L-ASNase detectada nos extratos brutos dos fungos cultivados sob fermentação submersa por 7 dias, a 28 °C e 150 rpm



Fonte: A autora.

O gênero *Cladosporium* é amplamente distribuído em todo o mundo, podendo ser encontrado em distintos tipos de hospedeiros. Algumas espécies desse gênero, devido à sua capacidade de causar podridões pós-colheita, manchas nas folhas e outras doenças de plantas, são geralmente associadas a perdas de numerosas culturas agrícolas e consequente perda econômica (ROSADO *et al.*, 2019). Algumas espécies são endofíticas, saprófitas e outras ainda são capazes de infectar insetos e, desse modo, são usadas como agentes de controle de pragas por causa de seu potencial bioinseticida (BENSCH *et al.*, 2012; BENSCH *et al.*, 2015; NICOLETTI *et al.*, 2024; WANG *et al.*, 2023).

Dentro do contexto industrial, espécies de *Cladosporium* são descritas como produtoras de importantes metabólitos bioativos (ALMATAR e MAKKY, 2016) e antibióticos com ação inibitória para as bactérias *E. coli*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans* (GALLO *et al.*, 2004). Ademais, enzimas lipolíticas (CHINAGLIA *et al.*, 2014), proteases, amilases, pectinases, celulases (SAHA *et al.*, 2023), lacases, peroxidases de manganês e peroxidases de lignina (LIU *et al.*, 2019), além de outras, vem sendo relatadas.

HATAMZADEH *et al.* (2020) identificaram dezenas de fungos endofíticos produtores dessa enzima, isolados a partir da raiz, caule, folha e flor de algumas plantas medicinais. A ação asparaginolítica foi avaliada e os pesquisadores salientaram *Cladosporium limoniforme*,

*Cladosporium ramotenellum* e *C. tenuissimum* como algumas espécies de *Cladosporium* capazes de produzir L-ASNase.

*C. subuliforme*, usado neste estudo, foi isolado de maracujás provenientes de um mercado local de Viçosa - MG, Brasil, que estavam aparentemente infectados por fungos (ROSADO *et al.*, 2019). Essa espécie, em específico, é pouco estudada quanto à sua habilidade de produzir enzimas extracelulares e, até o momento, não foram relatados na literatura estudos sobre a produção de L-ASNase por *C. subuliforme* e nem a caracterização da atividade asparaginolítica nesse fungo. Essas características fomentam ainda mais a necessidade de se explorar o potencial desse fungo, especialmente quanto à produção de L-ASNase, visto sua importância biotecnológica.

## 5.2 Caracterização parcial do extrato bruto obtido de *C. subuliforme*

### 5.2.1 Padronização do meio de cultivo para *C. subuliforme*

Ao ser selecionado, *C. subuliforme* foi investigado quanto à sua forma de crescimento em dois tipos de meios de cultivo: o primeiro, em meio líquido (CML), utilizando o caldo Czapek Dox e, o segundo, em meio contendo substrato sólido (CMSS), utilizando o farelo de trigo acrescido de solução de L-asparagina. Essas são as duas maneiras comumente empregadas no cultivo de fungos para a produção de enzimas e cada uma delas trazem consigo vantagens e desvantagens em relação ao seu uso para essa finalidade (MATHEW *et al.*, 2024).

O CML possibilita uma melhor difusão dos nutrientes e disseminação do microrganismo, podendo ser desenvolvido em escala laboratorial e industrial (MATHEW *et al.*, 2024). Como os parâmetros físicos e químicos são mais fáceis de controlar, é possível usar desta técnica como uma forma de otimizar algumas condições do processo biotecnológico. Além disso, o pré-tratamento do substrato, que muitas vezes é uma etapa envolvida no CMSS, não é necessário. Em contrapartida, como é imprescindível controlar a aeração e outras condições como pH e temperatura, o processo é laborioso e de alto custo e há uma considerável quantidade de resíduos gerados (CASTRO *et al.*, 2021).

O caldo Czapek Dox é um meio muito utilizado para o cultivo de diferentes microrganismos. Por possuir L-asparagina como principal fonte de nitrogênio, o caldo se torna atraente para ser aplicado como fonte de nutriente para o crescimento de microrganismos produtores de L-ASNase (PATEL *et al.*, 2022).

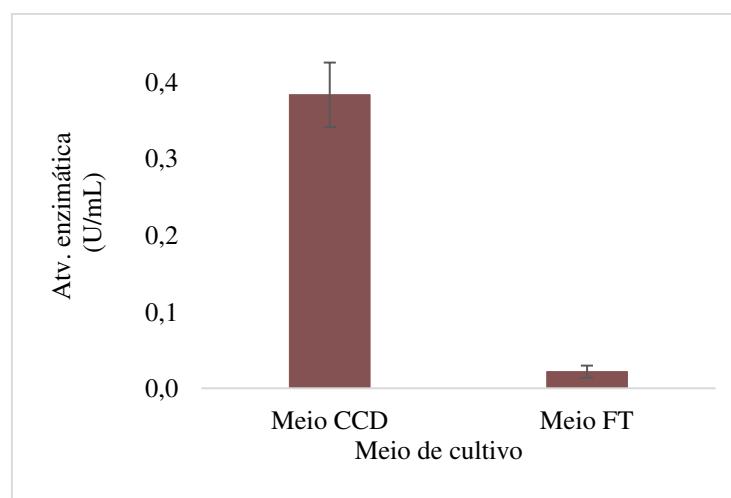
O CMSS é usualmente destinado para fungos, uma vez que esses microrganismos exigem uma menor atividade de água para se desenvolverem. Esse fato permite que a

contaminação microbiana seja drasticamente reduzida. É considerado uma técnica simples, de baixo custo e com menor impacto ambiental, uma vez que o uso de distintos resíduos agrícolas é possibilitado (PATEL *et al.*, 2022). Ademais, o final do CMSS fornece soluções mais concentradas da enzima de interesse. As principais limitações encontradas para o CMSS são a dificuldade de se ampliar a escala e controlar o crescimento microbiano homogêneo e os parâmetros do processo (DORIYA *et al.*, 2016; FRAGA, 2018).

Dentre os substratos sólidos aplicados, o farelo de trigo é um dos mais usualmente empregados. Possui características interessantes como baixo custo e riqueza de nutrientes como carboidratos, lignina e proteínas, que favorecem a produção de diversas enzimas de interesse industrial (LEITE *et al.*, 2021; USMAN *et al.*, 2021). Devido à baixa quantidade de lignina e à maior abundância de proteínas, o farelo de trigo se torna atraente para a produção de L-ASNase quando comparado a outros substratos (KUMAR *et al.*, 2013).

Como pode ser observado na Figura 8, a maior atividade de L-ASNase foi detectada quando *C. subuliforme* foi cultivado em meio líquido, cerca de 0,38 U/mL. Já no CMSS, a atividade foi de 0,02 U/mL, mostrando que a produção de L-ASNase por *C. subuliforme* ocorreu preferencialmente quando o fungo foi cultivado em meio líquido utilizando o caldo Czapek Dox. O farelo de trigo suplementado com L-asparagina não se mostrou um bom indutor da produção de L-ASNase por *C. subuliforme*, nas condições testadas.

**Figura 8** - Atividade de L-ASNase detectada no extrato bruto de *C. subuliforme* cultivado em meio líquido contendo caldo Czapek Dox (meio CCD) e cultivado em meio contendo o substrato sólido farelo de trigo acrescido de solução com L-asparagina 0,05 % (meio FT)

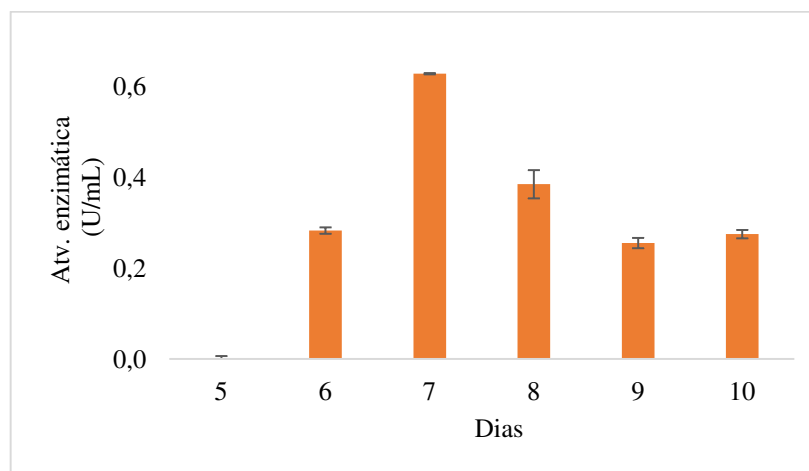


Fonte: A autora.

Para verificar qual o melhor tempo, em dias, para obtenção de uma maior atividade de L-ASNase, *C. subuliforme* foi cultivado em meio líquido contendo caldo Czapek Dox e a

atividade enzimática foi medida do quinto ao décimo dia. A maior atividade asparaginolítica foi detectada no sétimo dia de cultivo (Figura 9). Dependendo da forma como é cultivado, cada fungo apresentará uma maior atividade enzimática em diferentes tempos de incubação (BEDAIWY *et al.*, 2019). O tempo de maior atividade de L-ASNase encontrado para *C. subuliforme* está dentro do esperado e se iguala a outros fungos como *F. equiseti* (EL-GENDY *et al.*, 2021) e *Fusarium foetens* (PARASHIVA *et al.*, 2023b).

**Figura 9** - Atividade de L-ASNase detectada no período de 5 a 10 dias de cultivo de *C. subuliforme* em caldo Czapek Dox



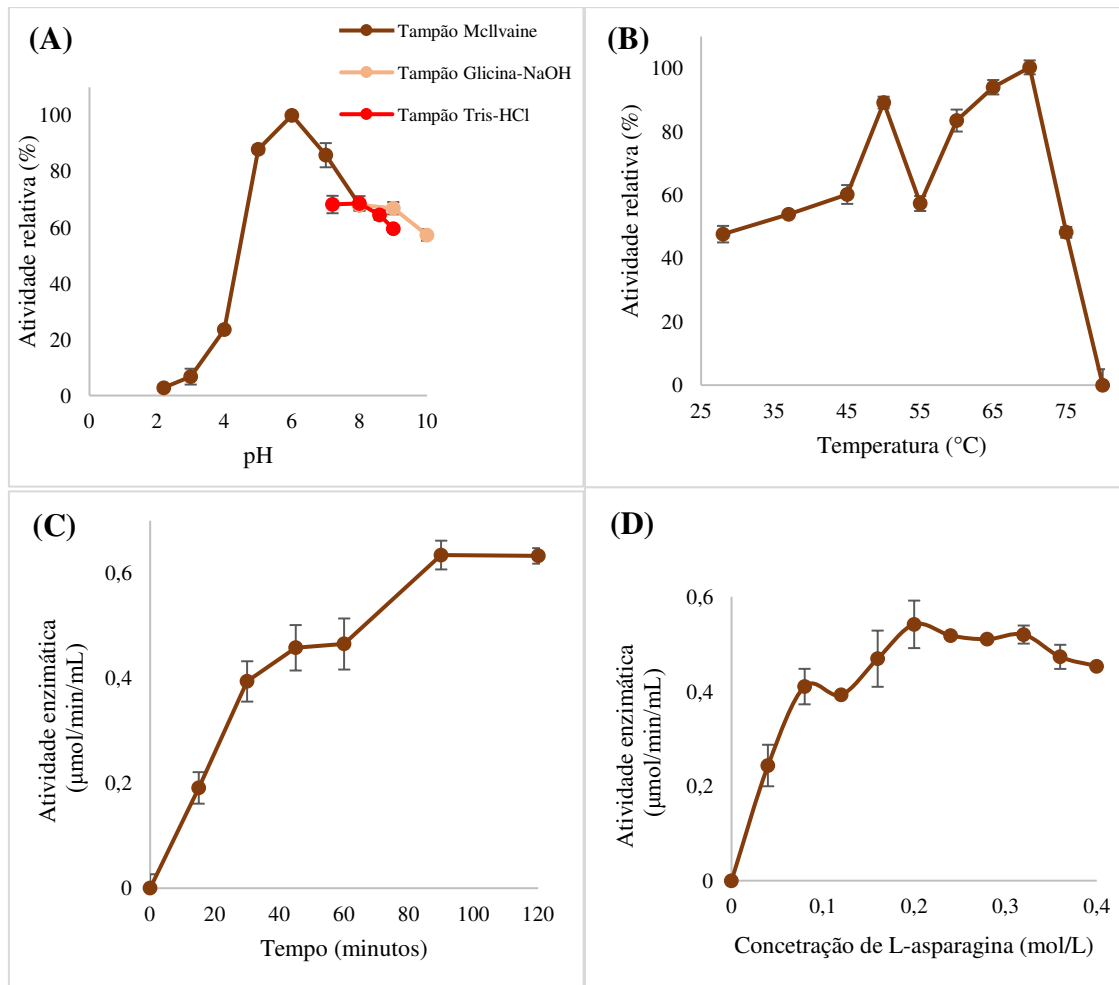
Fonte: A autora.

### 5.2.2 Padronização dos parâmetros do ensaio enzimático

É sabido que inúmeros fatores podem influenciar o ensaio de atividade enzimática e que cada enzima comportará de uma forma diante desses determinados fatores. No trabalho em questão, com o intuito de conhecer as condições ótimas da L-ASNase de *C. subuliforme*, que proporcionam os melhores valores de atividade asparaginolítica, os parâmetros efeito de pH, efeito de temperatura, tempo de reação e concentração de substrato foram avaliados e podem ser conferidos na Figura 10.

De acordo com a Figura 10A a faixa de pH 5 - 7, utilizando o tampão de McIlvaine, foi a que propiciou uma atividade acima de 80 %, sendo o pH 6,0 o que garantiu o maior desempenho da enzima. Percebe-se ainda que valores de pH mais básicos (7-10), independente do tampão utilizado, garantiram uma atividade acima de 50 % e que nos valores de pH 2,2 – 4,0 a enzima provavelmente se encontrava desnaturada.

**Figura 10** - Caracterização parcial da L-ASNase presente no extrato bruto de *C. subuliforme*. (A) efeito de pH, (B) efeito da temperatura, (C) tempo de reação e (D) concentração de substrato



Fonte: A autora.

Na Figura 10B foram observados dois picos de maior atividade da L-ASNase, a 50 e 70 °C. Este resultado pode indicar a presença de duas isoformas que se diferem em relação à melhor temperatura para sua atuação. Uma possível explicação seria que a primeira isoforma, quando exposta à temperatura acima da sua ideal (50 °C) poderia iniciar sua desnaturação (NELSON e COX, 2021) e por isso houve um decaimento da atividade observada em 55 °C. Com o aumento da temperatura, a outra isoforma estaria mais ativa, e alcançaria seu desempenho máximo em 70 °C, sendo logo depois desnaturada, devido às altas temperaturas, acima de 75 °C. Essa hipótese é fomentada quando se analisa a Figura 10C, na qual a atividade de L-ASNase foi avaliada em diferentes tempos de reação. Foi observado que nos 30 minutos iniciais houve um aumento linear da atividade em função do tempo, e que depois a atividade ficou estabilizada entre 40 e 60 min. Isso seria esperado, considerando que uma das isoformas, de menor estabilidade, estaria ativa nos tempos iniciais, e após sua desnaturação, provavelmente entre 40

e 60 min de reação, não haveria formação de produto e assim, a atividade não seria alterada, como foi observado. Entretanto, também foi observado que a atividade enzimática voltou a aumentar linearmente dos 60 aos 90 minutos, o que pode ser indicativo de uma outra suposta isoforma mais estável, que exigiria um maior tempo para atuar adequadamente. Após os 90 min de reação, a segunda isoforma provavelmente estaria desnaturada, e assim não haveria mais formação de produto e a atividade novamente ficaria constante, como também foi observado.

Para assegurar que o fornecimento do substrato L-asparagina estava sendo adequado para a performance da L-ASNase, diferentes concentrações desse substrato foram utilizadas no meio reacional. Como mostrado na Figura 10D, 0,08 M de L-asparagina foi suficiente para possibilitar uma boa atividade da enzima. Acima desses valores, por mais que houvesse um leve aumento na atividade, provavelmente toda a enzima já estaria complexada com o substrato e um platô de atividade seria alcançado, como observado. Neste caso, o fornecimento de mais L-asparagina não seria necessário e condições muito saturadas desse substrato não seriam viáveis, além de mais onerosas. Portanto, a concentração de 0,08 M de L-asparagina foi definida para padronização das condições do ensaio.

Com esses estudos, foi possível realizar a padronização dos parâmetros do ensaio enzimático da L-ASNase presente no extrato bruto de *C. subuliforme* e definir as condições do ensaio padrão. Além disso, realizar essa investigação com a enzima ainda em extrato bruto permite conhecer antecipadamente o seu comportamento diante de diferentes fatores e evitar o uso de condições muito distantes da ideal que poderiam levar a conclusões equivocadas sobre a enzima em estudo.

Assim, as condições do ensaio padrão foram definidas: pH 6,0; 50 °C, 30 minutos de reação e 0,08 M de L-asparagina. A temperatura de 50 °C foi escolhida ao invés de 70 °C, porque atualmente, na indústria alimentícia, os ingredientes alimentares são processados a 37 °C e 50 °C durante o tratamento enzimático com as L-ASNases comerciais disponíveis no mercado (WANG *et al.*, 2021; XU *et al.*, 2016). Nessas condições padronizadas a atividade da L-ASNase presente no extrato bruto de *C. subuliforme* foi de 1,048 U/mL, sendo que nas condições do ensaio enzimático, antes da padronização, a atividade detectada era de 0,38 U/mL. Esse resultado confirma que as análises para determinação das condições ótimas de atuação da enzima foram eficientes e que o ensaio padrão definido está adequado para detecção da atividade da L-ASNase presente no extrato bruto de *C. subuliforme*.

### 5.3 Purificação da L-ASNase de *C. subuliforme*

#### 5.3.1 Cromatografia de troca iônica

Antes de ser submetido à etapa de purificação por cromatografia líquida, o extrato bruto foi concentrado por ultrafiltração usando Amicon® Ultra-15 30 kDa Millipore. Sabe-se que durante a cromatografia líquida, a amostra aplicada é diluída devido à passagem da fase móvel durante o processo e, por essa razão, concentrar a amostra evita que ela se dilua significativamente a ponto de não ser possível a detecção da atividade enzimática (ACIKARA, 2013).

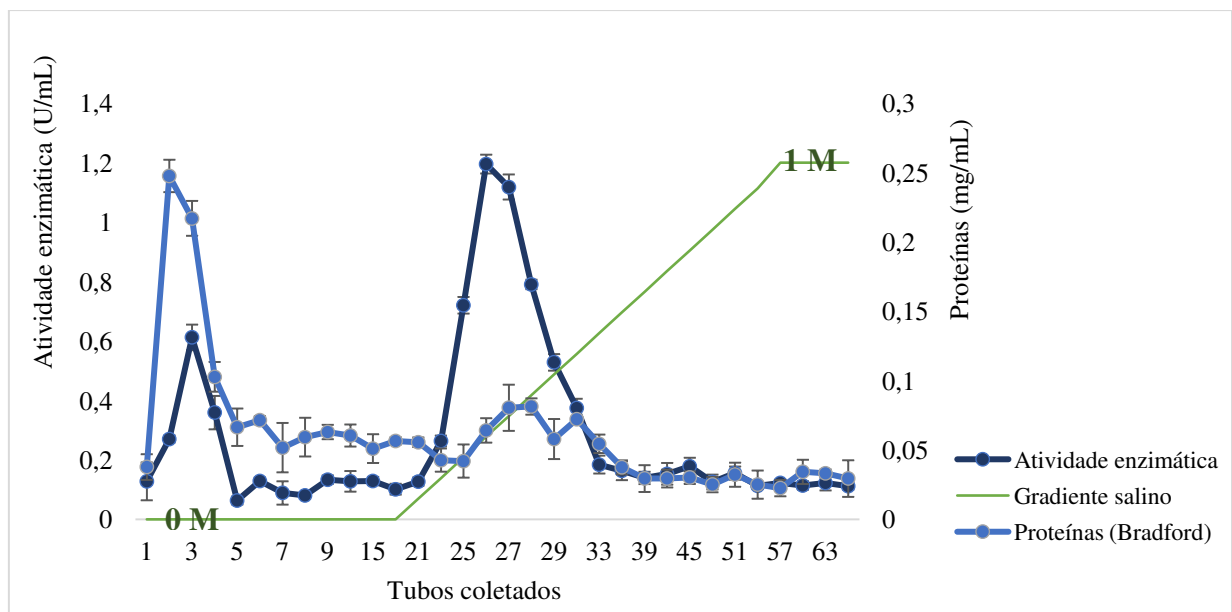
Na cromatografia de troca iônica, variadas moléculas ionizáveis são separadas com base em suas diferenças de carga. É considerada uma das mais versáteis e utilizadas dentre as cromatografias líquidas conhecidas, sendo uma técnica de referência para avaliação da heterogeneidade de carga de proteínas (CUMMINS *et al.*, 2017). Seu princípio se baseia no uso de uma fase móvel, que normalmente é um tampão com pH específico, e uma fase estacionária, usualmente representada por resinas com carga negativa (trocadoras de cátions) ou com carga positiva (trocadoras de ânions). Em determinado valor de pH podemos encontrar tanto moléculas com carga líquida positiva quanto moléculas com carga líquida negativa. Desse modo, um gradiente salino linear (método clássico) é aplicado e à medida que a concentração de sal é aumentada, íons  $\text{Na}^+$  ou  $\text{Cl}^-$  começam a interagir com a fase estacionária. Se alguma molécula estiver ligada a essa fase estacionária, uma competição entre molécula e íons  $\text{Na}^+$  ou  $\text{Cl}^-$  é iniciada até o momento que a concentração de sal se torna tão alta que as proteínas ligadas se desconectam da resina e são eluídas (CUMMINS *et al.*, 2017; FEKETE *et al.*, 2015).

Como podemos visualizar no perfil do cromatograma da Figura 11, foram detectados dois picos proteicos com atividade de L-ASNase. O primeiro pico, contendo as proteínas não ligadas à resina, foi eluído no início da corrida cromatográfica e poderia ser decorrente do excesso de proteínas aplicadas, ou poderia conter uma possível isoforma da L-ASNase, de menor atividade e com carga positiva, em pH 6,0. Com a aplicação do gradiente salino, que teve início no tubo 19 e se estendeu até os tubos 57 e 58, foi verificado que nos tubos 26 e 27, foi eluído um segundo pico com atividade enzimática, e nestes, as proteínas determinadas por Bradford estavam em baixa concentração. Nesses tubos, portanto, foram determinadas as maiores atividades específicas, indicando que ali a enzima de interesse estava em maior abundância em relação às outras proteínas presentes. Como a maior concentração de proteínas foi eluída nos primeiros tubos coletados, pode-se constatar que a cromatografia de troca iônica

usando a coluna DEAE foi eficiente para obtenção de um extrato proteico enriquecido com a enzima de interesse.

Também, devido ao fato de a enzima ter sido eluída após o gradiente salino, pode-se concluir que no valor de pH 6,0 (pH do tampão eluente) a L-ASNase interagiu com a resina positiva DEAE, se ligando a ela. Sendo assim, a enzima apresentava carga líquida negativa em pH 6,0, indicando que seu ponto isoelétrico se encontra abaixo deste valor de pH.

**Figura 11** - Perfil de eluição da L-ASNase de *C. subuliforme* em cromatografia líquida de proteína rápida (FPLC), empregando 5 mL de amostra na coluna de troca iônica HiTrap™ DEAE FF, em pH 6,0



Fonte: A autora.

Baseando-se nos resultados de quantificação de proteínas e atividade de L-ASNase, uma tabela de purificação (Tabela 5) foi construída para se avaliar a eficiência da purificação.

**Tabela 5** – Tabela de purificação de L-ASNase de *C. subuliforme*

Amostra/Etapa	Proteínas totais (mg)	Atividade total (U)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação (x)	Rendimento (%)
Extrato bruto concentrado	11,05	14,19	1,28	1	100
Troca iônica (DEAE)	0,40	5,42	13,64	10,62	38,23

Fonte: A autora.

Por meio de uma única etapa de purificação obteve-se um rendimento de 38,23 % e um fator de purificação de quase 11 vezes, ou seja, a enzima foi enriquecida ao longo do processo e inúmeras proteínas indesejáveis foram removidas.

O fator de purificação está relacionado com o grau de pureza da proteína, portanto, quanto maior seu valor, mais pura ela se encontra. Um recente estudo, mostrou que a enzima L-ASNase de *Colletotrichum gloeosporioides* foi purificada por meio de duas técnicas, ultrafiltração e cromatografia de exclusão molecular, que resultou em um fator de purificação de 6,12 vezes e rendimento de 34,63 % (YAP *et al.*, 2023). Em outro trabalho sobre a enzima L-ASNase de *P. crustosum* foi conseguido um rendimento de 36,3 % e fator de purificação de 6,47 quando a enzima foi purificada por meio da precipitação com sulfato de amônio (80 %) seguida da cromatografia de troca iônica e de gel filtração (KHALIL *et al.*, 2021). Já AL YOUSEF (2022) submeteu o extrato bruto obtido de *Fusarium* sp. ao procedimento de precipitação com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e cromatografia de gel filtração e obteve um fator de purificação da L-ASNase de 6,30 vezes com rendimento de 42,65 %.

Ademais, DIAS *et al.* (2016) adotou a estratégia de precipitar o extrato bruto contendo L-ASNase de *A. oryzae* CCT 3940 em sulfato de amônio, executando, posteriormente, a cromatografia de troca iônica três vezes consecutivas utilizando diferentes resinas (Q-Sepharose seguida de SP-Sepharose e CM-Sepharose) e obteve um fator de purificação considerável de 28,6 vezes, mas com um rendimento de apenas 6 %. Percebe-se ainda que o pico de atividade enzimática encontrado por DIAS *et al.* (2016) é acompanhado de um alto pico de proteínas, isso explica o porquê do uso de quatro etapas de purificação. Esse comportamento de pico de atividade enzimática acompanhado de alto pico de proteínas também foi observado por HASSAN *et al.* (2018) que usou da precipitação com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (65 %), cromatografia de exclusão molecular e cromatografia de troca iônica para obter uma L-ASNase de *A. terreus* com 14,22 % de rendimento e fator de purificação de 11,96 vezes. Outros pesquisadores, apesar de terem obtido valor de 48 % de rendimento de L-ASNase de *F. equiseti* AHMF4, acabou obtendo um pequeno fator de purificação, de apenas 2,67 vezes, mesmo aplicando precipitação com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (80 %), cromatografia de troca iônica e cromatografia de exclusão molecular (EL-GENDY *et al.*, 2021).

Assim, os resultados descritos no presente trabalho mostraram que o rendimento de 38,23 % e o grau de pureza alcançado para L-ASNase foram consideráveis, estando acima de vários relatos da literatura. Além disso, o uso de uma única etapa de purificação para obtenção desses valores é relevante, além de que o uso de precipitação salina como uma das primeiras etapas de purificação, visualizada em vários trabalhos já discutidos, foi evitado. Isso é

interessante porque a precipitação com sal requer etapas adicionais para sua retirada e o aumento dos estágios para purificação, que pode resultar em baixo rendimento enzimático (NELSON e COX, 2021).

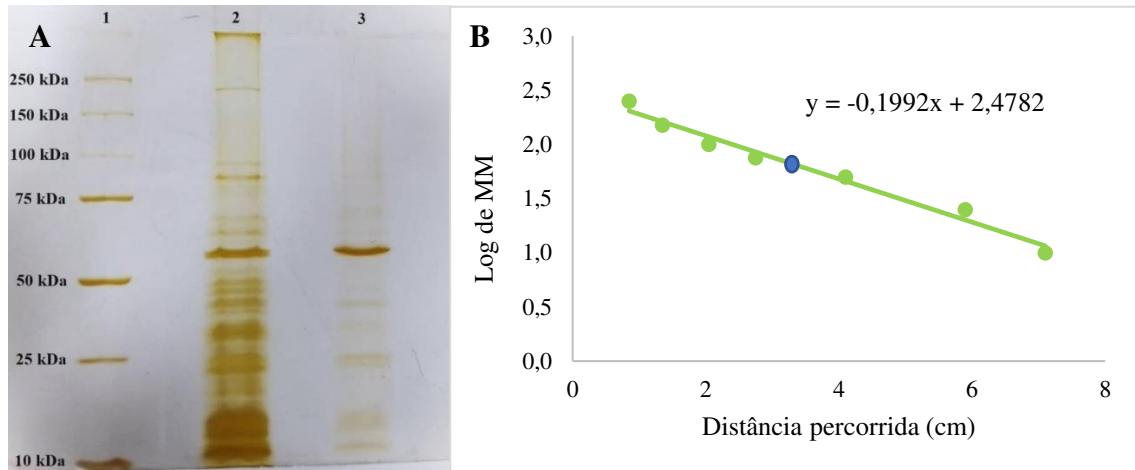
### 5.3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O método clássico proposto por LAEMMLI (1970) pressupõe que ao utilizar o detergente SDS todas as proteínas adquirem carga negativa. Dessa forma, ao aplicar uma corrente elétrica, elas serão migradas pela malha do gel de poliacrilamida do polo negativo ao polo positivo de acordo com o seu tamanho: proteínas maiores percorrem uma menor distância no gel, enquanto proteínas menores percorrem uma distância maior. Sendo assim, as proteínas, em condições desnaturantes, são separadas por massa.

As L-ASNases possuem uma diversidade estrutural muito grande e por essa razão, são descritos variados pesos moleculares para essas enzimas produzidas por diferentes microrganismos (KRISHNAPURA *et al.*, 2016). A partir do SDS-PAGE, a L-ASNase purificada de *Talaromyces pinophilus* se apresentou como um heterodímero com 62 kDa e 39 kDa (KRISHNAPURA e BELUR, 2016) enquanto que a encontrada em *Cladosporium* sp. (KUMAR e MANONMANI, 2013) se apresentou como um heterotrímero com duas subunidades de 37 kDa e uma com 47 kDa. Outros pesquisadores ainda descreveram uma L-ASNase de *Penicillium* sp. de 66 kDa (PATRO e GUPTA, 2012), uma hexamérica de *F. velutipes* de 85 kDa (EISELE *et al.*, 2011) e uma homodimérica de *Rhizomucor miehei*, cada subunidade com 72 kDa (HUANG *et al.*, 2014). Quando o somatório das massas das subunidades é feito, é possível identificar L-ASNases com o tamanho variando de 66 kDa a aproximadamente 140 kDa.

A análise das bandas proteicas presentes no gel SDS-PAGE (Figura 12A), e a visualização de apenas uma banda mais evidente após a etapa cromatográfica, reforçam o alto grau de purificação da enzima L-ASNase de *C. subuliforme*, e confirmam os resultados obtidos na tabela de purificação. O peso molecular da L-ASNase purificada foi estimado em gel, relacionando as propriedades log da massa molecular e distância percorrida no gel, a partir das proteínas padrão (Figura 12B). A banda mais intensa, que possivelmente representa a L-ASNase, possui cerca de 56 kDa de peso molecular. Caso ela seja homodimérica, esse valor passa a ser de 112 kDa, valor próximo a outras L-ASNases fúngicas.

**Figura 12 - (A):** Eletroforese em gel SDS-PAGE (12 %) das amostras contendo a L-ASNase de *C. subuliforme*. 1 – Marcador de peso molecular; 2 – Extrato bruto concentrado; 3 – Amostra após a etapa de purificação por cromatografia de troca iônica, DEAE; (B): Regressão linear para estimar a massa molecular da enzima purificada (ponto em destaque)



Fonte: A autora.

### 5.3.3 LC-MS/MS para identificação de L-ASNase de *C. subuliforme*

A amostra que apresentou maior atividade específica, coletada na cromatografia de troca iônica, foi devidamente preparada para análise em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). A partir do software PEAKS, versão 7.0 (Bioinformatics Solutions Inc., Canadá) e do método PEAKS DB (ZHANG *et al.*, 2012) os dados brutos coletados pelo espectrômetro de massas foram processados para identificar as proteínas presentes na amostra.

As sequências dos peptídeos detectados foram devidamente dispostas no programa BLASTP contra o banco de dados do NCBI. O resultado da pesquisa apontou homologia com a enzima Acetamidase/Formamidase, ou seja, as sequências que produziram pares de segmentos com a mais alta pontuação foram apontadas como pertencentes à enzima Acetamidase/Formamidase. Com base no “BRENDA Enzyme Database” a enzima Acetamidase/Formamidase e a L-ASNase são da mesma classe de enzimas: amidohidrolases.

Vale ressaltar que o *C. subuliforme* carece de informações sobre suas proteínas e não tem seu genoma depositado, o que dificulta a busca da proteína alvo independentemente do banco de dados utilizado. Sendo assim, apesar dos indícios de atividade enzimática de que há uma forte possibilidade de ser a enzima de interesse, o método de análise utilizando LC-MS/MS não possibilitou confirmar se a proteína purificada e visualizada no gel SDS-PAGE de fato corresponde a L-ASNase. A confecção de um gel nativo (zimograma) e/ou sequenciamento da

região N-terminal (CANTÚ *et al.*, 2008) podem ser estratégias que possibilitarão um resultado conclusivo em relação a identidade da proteína aqui estudada.

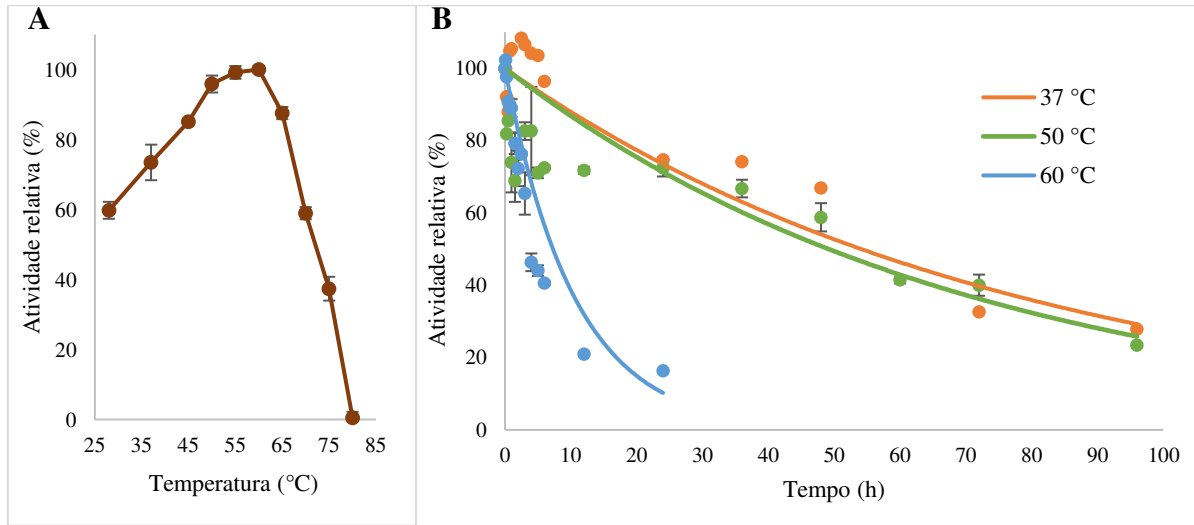
## **5.4 Caracterização da L-ASNase purificada**

### **5.4.1 Avaliação da termoestabilidade, estabilidade ao pH, efeito da temperatura e efeito do pH na atividade da L-ASNase purificada**

O efeito da temperatura do ensaio de reação sob a atividade da L-ASNase foi avaliado em uma faixa de 28 a 80 °C (Figura 13A). A enzima apresentou 60 % da atividade máxima a 28 °C e, com o aumento da temperatura, a atividade enzimática também aumentou. Entre 50 e 60 °C, o desempenho enzimático foi o melhor, e por isso, conclui-se que foi a melhor condição para atuação asparaginolítica. Em temperaturas acima de 60 °C, a atividade foi reduzida, até que em 80 °C, a atividade foi nula.

Analisando o efeito da estabilidade térmica sobre a enzima, percebe-se que ela apresentou uma termoestabilidade expressiva diante das temperaturas avaliadas (Figura 13B). Em 37 e 50 °C, o comportamento da enzima foi muito semelhante, sendo que a 37 °C a atividade se manteve acima de 90 % nas primeiras 6 h, enquanto que a 50 °C ela se manteve acima de 90 % nas primeiras 2 h e acima de 80 % até 6 h de incubação. Por outro lado, quando a termoestabilidade foi avaliada na temperatura de 60 °C, houve um decaimento mais rápido da atividade. Mesmo assim, a atividade enzimática se manteve acima de 80 % com um pouco mais de 1 h de incubação, o que é muito relevante para fins de aplicação biotecnológica da enzima. Os valores de tempo de meio vida da L-ASNase foram de 49,51; 46,21 e 7,29 h nas temperaturas de 37, 50 e 60 °C, respectivamente.

**Figura 13** – (A) Efeito da temperatura na atividade da L-ASNase de *C. subuliforme* e (B) Avaliação da termoestabilidade da L-ASNase de *C. subuliforme*

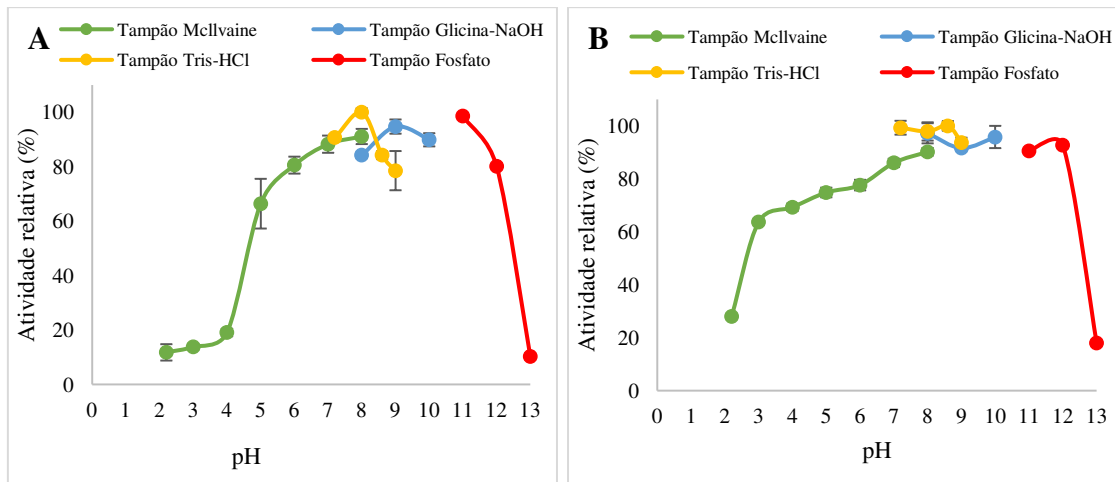


Fonte: A autora.

O efeito do pH na atividade da L-ASNase purificada foi avaliado utilizando diferentes tampões: pH 2,2 a 8,0 (tampão de McIlvaine); pH 7,2 a 9,0 (tampão Tris-HCl 0,1 M); pH 8,0 a 10,0 (tampão glicina-NaOH 0,1 M) e pH 11,0 a 13,0 (tampão fosfato de potássio 0,1 M). A maior atividade de L-ASNase foi observada ao utilizar o tampão Tris-HCl pH 8,0, sendo que na faixa de pH de 6 – 12 foi observada mais de 80 % da atividade residual (Figura 14A). Esse resultado é bastante promissor, uma vez que a enzima mostrou atividade considerável em uma ampla faixa de pH.

Os ensaios de estabilidade da enzima em variados valores de pH foram realizados incubando-se previamente a L-ASNase purificada em diferentes tampões por 1h. A enzima revelou ser bem resistente a variações do pH do meio externo, conseguindo se manter ativa após a realização do ensaio padrão nas condições ideais. Foi observado mais de 80 % da atividade na faixa de pH 7- 12 e mais de 60 % em pH 3- 6 (Figura 14B). Essa ampla faixa de estabilidade ao pH permite que essa enzima possa ser explorada em meios com valores de pH diversos para distintas finalidades.

**Figura 14** - (A) Efeito do pH na atividade da L-ASNase de *C. subuliforme* e (B) Avaliação da estabilidade ao pH da L-ASNase de *C. subuliforme*



Fonte: A autora.

Grande parte das L-ASNases de microrganismos apresentam melhor atuação quando sujeitas a temperaturas de 37 e 40 °C e em valores de pH de 6,0 – 10,0 (MUNEER *et al.*, 2020).

DIAS *et al.* (2019) descreveram que diferentes isolados de *Aspergillus* exibiram atividade ótima de L-ASNase a 50 °C e pH 9,0 (*A. niger* LBA 02), a 40 e 50 °C e pH 7,0 - 8,0 (*A. oryzae* CCT 3940) e a 40 °C e pH 7,0 (*A. oryzae* LBA 01). De acordo com OSAMA *et al.* (2023), ao testar diferentes valores de temperatura e pH na atividade de L-ASNase, a máxima atuação enzimática foi observada em 40 °C e pH 8,0 para L-ASNase produzida por *Fusarium solani*. NURÇE *et al.* (2023) também encontraram as condições de 40 °C e pH 8,0 como temperatura e pH ideais para L-ASNase purificada de *A. flavus*, porém, ao pré-incubar a enzima por 1 h em diferentes temperaturas e em diferentes tampões com valores de pH variados, os resultados de estabilidade enzimática não foram tão satisfatórios. Foi verificado que a enzima apresentou estabilidade a 20 °C, mas sua atividade caiu drasticamente com o aumento da temperatura e, em relação ao pH, a faixa de estabilidade foi pequena, englobando somente os valores de pH 7,0 e 8,0. Outros estudos de caracterização de atividade asparaginolítica mostraram pH 7,0 e 45 °C como parâmetros ideais para L-ASNase de *R. miehei*. A estabilidade térmica foi verificada apenas em valores abaixo de 50 °C e com um tempo de incubação curto de 30 minutos. Já a estabilidade do pH foi significativa em pH 4,0 – 8,0, mantendo mais de 80 % de sua atividade residual (HUANG *et al.* 2014).

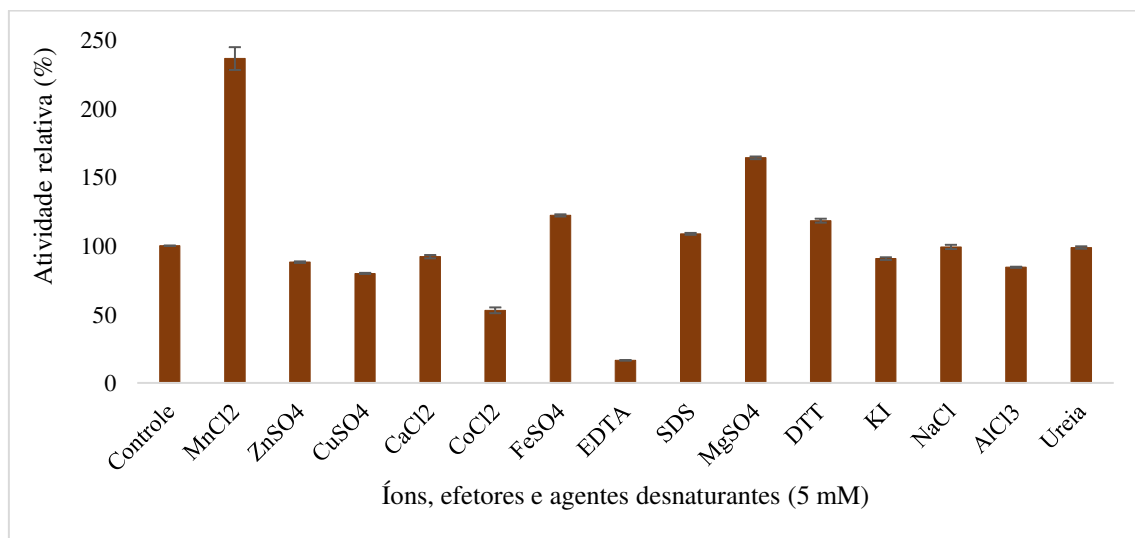
De acordo com os trabalhos discutidos, percebe-se uma preferência das L-ASNases por valores mais básicos de pH, assim como foi observado no presente estudo. Além disso, a expressiva termoestabilidade da L-ASNase de *C. subuliforme* a 50 e a 37 °C, que são as

temperaturas usualmente utilizadas para sua aplicação no processamento de alimentos e para fins medicinais, respectivamente, (NURÇE *et al.*, 2023) sugerem que essa enzima purificada consegue atender os principais critérios para sua aplicação biotecnológica.

#### 5.4.2 Efeito de íons, efetores e agentes desnaturantes na atividade de L-ASNase purificada

Para investigar o comportamento da L-ASNase purificada, diante de variados compostos, íons, efetores e agentes desnaturantes, estes foram adicionados ao ensaio de reação na concentração final de 5 mM e o efeito dessas substâncias sobre a atividade foi determinado (Figura 15). Em comparação com o controle, MnCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub> e MgSO<sub>4</sub> foram capazes de estimular a atividade enzimática, enquanto que CoCl<sub>2</sub> e CuSO<sub>4</sub> inibiram quase 50 % e 20 % da atividade, respectivamente. Os compostos ZnSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, KI e AlCl<sub>3</sub> promoveram a manutenção de mais de 80 % da atividade residual e a presença NaCl não afetou a atividade da enzima. O agente EDTA promoveu a redução de mais de 80 % da atividade, sugerindo que a sua presença pode estar quelando íons metálicos, importantes para atuação e/ou estabilidade da L-ASNase (HUANG *et al.*, 2014). Esse resultado é coerente ao se observar o resultado ativador de MnCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub> e MgSO<sub>4</sub>, sugerindo que a presença desses íons possa estar contribuindo para a atividade enzimática, e o efeito quelante do EDTA estaria retirando íons da solução.

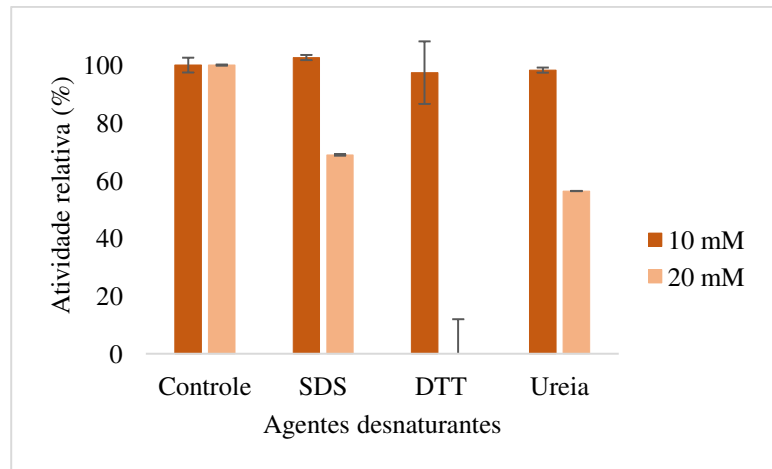
**Figura 15** - Efeito de íons, efetores e agentes desnaturantes na atividade de L-ASNase de *C. subuliforme*



Fonte: A autora.

Os agentes desnaturantes SDS, ureia e DTT, na concentração de 5 mM, não promoveram qualquer efeito inibitório na atividade asparaginolítica. Por conta disso, maiores concentrações dessas substâncias foram testadas, para conhecer o grau de estabilidade da enzima frente a estes agentes desnaturantes (Figura 16). Como notado, somente na concentração de 20 mM foi observada redução na atividade enzimática, aproximadamente 30 % com SDS e um pouco mais de 40 % com ureia, enquanto DTT foi o único que resultou em inibição total da enzima.

**Figura 16** - Efeito de agentes desnaturantes na atividade de L-ASNase de *C. subuliforme*



Fonte: A autora.

Pesquisas relataram resultados parecidos com os que foram aqui encontrados. HUANG *et al.* (2014) demonstraram que o desempenho da L-ASNase de *R. miehei* foi inibido pela presença de íons  $\text{Co}^+$  e estimulado por  $\text{Mn}^{2+}$ . Enquanto isso, KUMAR e MANONMANI (2013) encontraram um aumento considerável da atividade na presença de  $\text{FeSO}_4$ , quando avaliaram as propriedades bioquímicas da enzima purificada de *Cladosporium* sp. Já DIAS *et al.* (2016), ao usarem separadamente  $\text{MgSO}_4$  e  $\text{MnSO}_4$  no ensaio de reação, na concentração final de 5 mM, perceberam um aumento de atividade, enquanto que o decréscimo foi observado para  $\text{CuSO}_4$ . O agente EDTA foi capaz de reduzir expressivamente a atividade da L-ASNase de *F. foetens* (PARASHIVA *et al.*, 2023b), de *P. crustosum* (KHALIL *et al.*, 2021) e de *Fusarium* sp. (AL YOUSEF, 2022). Ademais, a L-ASNase de diferentes espécies de *Aspergillus* estudadas por DIAS *et al.* (2019), não tiveram suas atividades inibidas pela presença de NaCl, característica considerada relevante para aplicação na indústria de alimentos, para mitigar os teores de acrilamida.

Sendo assim, os resultados da termoestabilidade, estabilidade ao pH e dos efeitos dos agentes desnaturantes SDS, DTT e ureia na L-ASNase de *C. subuliforme*, indicam que a enzima

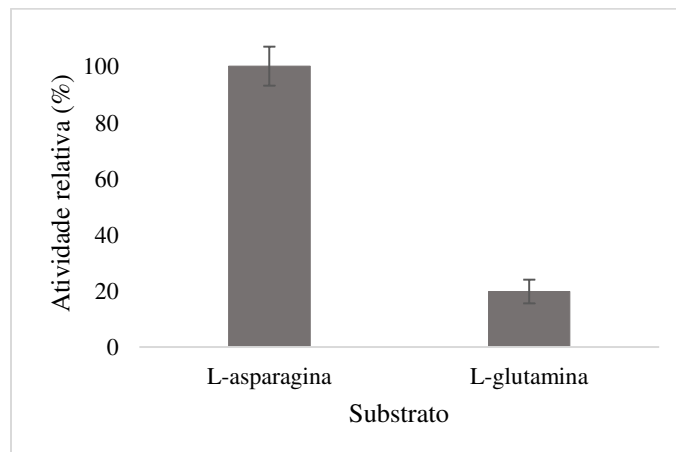
aqui trabalhada apresenta uma grande estabilidade em diferentes temperaturas, faixas de pH e na presença de diversos compostos, indicando que a enzima possui características bioquímicas atrativas para o setor industrial (CUNHA *et al.*, 2022).

#### 5.4.3 Especificidade da L-ASNase purificada ao substrato

É sabido que algumas L-ASNases microbianas possuem atividade de L-glutaminase, que as vezes pode até ser maior do que a própria atividade de L-ASNase (LUBKOWSKI e WLODAWER, 2021). Esse aspecto em questão, quando se trata do setor farmacêutico, não é desejado, uma vez que a atividade de L-glutaminase é geralmente acompanhada por efeitos colaterais indesejáveis para pacientes em tratamento oncológico (MATHEW *et al.*, 2023). Sendo assim, a busca por fontes de L-ASNase com baixa afinidade pela glutamina é requerida (EL-SHANSHOURY *et al.*, 2023).

Para avaliar se a enzima purificada de *C. subuliforme* apresentava ação sobre a L-glutamina, um ensaio de especificidade foi realizado usando L-asparagina e L-glutamina nas mesmas concentrações como substratos. Como pode ser visto na Figura 17, foi possível detectar atividade de L-glutaminase, porém essa se encontrava mais de 5 vezes abaixo da atividade asparaginolítica, indicando que a especificidade pela L-asparagina era bem maior, como esperado. Essa especificidade baixa para L-glutamina também foi verificada para L-ASNase de *R. miehei* (HUANG *et al.*, 2014), de *P. crustosum* (KHALIL *et al.*, 2021) e de alguns fungos endofíticos isolados por ANDRADE *et al.*, (2023).

**Figura 17** - Especificidade da L-ASNase de *C. subuliforme* ao substrato L-asparagina 0,08 M e L-glutamina 0,08 M



Fonte: A autora.

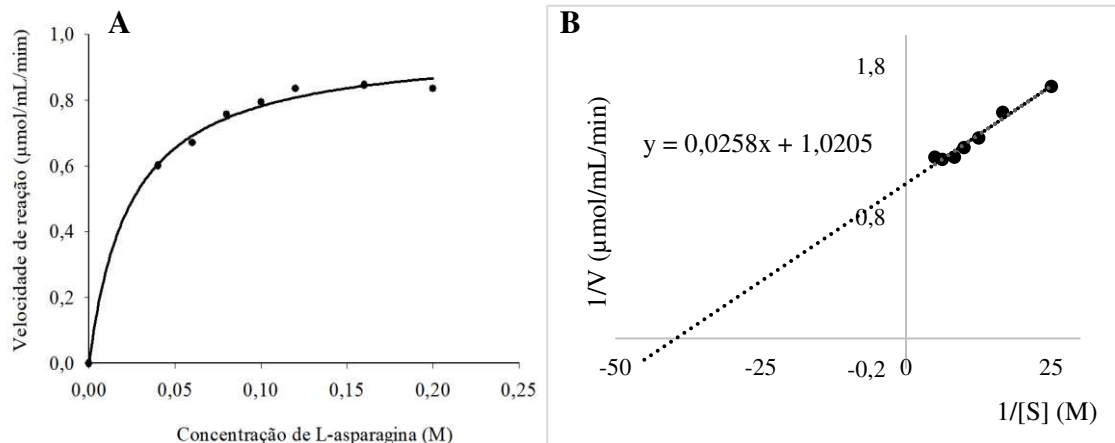
#### 5.4.4 Determinação dos parâmetros cinéticos $K_M$ e $V_{m\acute{a}x}$

Os parâmetros  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  são usados para avaliar a eficiência da atividade enzimática. Para uma mesma enzima, oriunda de um mesmo microrganismo, o valor de  $V_{m\acute{a}x}$  pode ser variado, dependendo da carga enzimática aplicada durante o ensaio de reação, diferente de  $K_M$ , definida como constante de Michaelis e Menten, que é uma constante específica de uma enzima por um dado substrato, usada normalmente para definir a afinidade da enzima pelo substrato. Dessa forma, quanto menor o valor de  $K_M$  maior é a afinidade, já que com pouco substrato presente no meio reacional a enzima consegue atuar e alcançar níveis consideráveis de velocidade (NELSON e COX, 2021).

Com o intuito de determinar esses valores, concentrações de 0,04 a 0,2 M de L-asparagina foram aplicados no ensaio de reação asparaginolítica. A velocidade de reação enzimática foi aferida e os valores de  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  puderam ser calculados tanto com o auxílio do software “SigmaPlot 15” quanto pelo gráfico de Lineweaver-Burk. O perfil da curva gerada pode ser consultado na Figura 18.

Pelo gráfico de Lineweaver-Burk, os valores obtidos para  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foram 0,025 M e 0,98  $\mu\text{mol/mL/min}$ , respectivamente. Usando o software “SigmaPlot 15”, observou-se que a enzima segue a cinética de Michaelis- Menten (NELSON e COX, 2021) e os valores de  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foram 0,024 M e 0,97  $\mu\text{mol/mL/min}$ . Pode-se notar que utilizando os dois métodos, os valores foram bem próximos, indicando que os parâmetros cinéticos aqui avaliados foram determinados com precisão.

**Figura 18** - (A) Gráfico de Michaelis-Menten e (B) Lineweaver-Burk para determinação dos parâmetros cinéticos  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  da L-ASNase de *C. subuliforme*, usando L-asparagina como substrato



Fonte: A autora.

Na literatura são descritos valores de  $K_M$  para L-ASNase fúngica que divergem na grandeza de  $10^{-4}$  M a  $10^{-1}$  M (GARCIA *et al.*, 2023; MUNEEER *et al.*, 2020). Algumas L-asparaginas de espécies fúngicas foram caracterizadas quanto as suas propriedades cinéticas e foram obtidos os seguintes valores de  $K_M$ : 0,024 M (*F. foetens*); 0,031 M (*Fusarium* sp.); 0,0315M (*A. terreus*); 0,100 M (*Cladosporium* sp.) e 0,444 M (*Fusarium* sp.) (AL YOUSEF, 2022; ASHA e PALLAVI, 2012; HASSAN *et al.*, 2018; KUMAR e MANONMANI, 2013; PARASHIVA *et al.*, 2023b). Esses valores de  $K_M$  corroboram com aquele encontrado para a L-ASNase de *C. subuliforme* apontando que a afinidade dessa enzima para com L-asparagina está dentro dos níveis conhecidos.

### 5.5 Avaliação da eficiência da L-ASNase purificada na redução de acrilamida

Para se avaliar a eficiência da L-ASNase purificada em reduzir os níveis de acrilamida em alimentos, foi utilizado um ensaio de um modelo de alimento (solução de amido + solução de L-asparagina). Após pré-tratar o modelo de alimento com a L-ASNase purificada de *C. subuliforme*, a amostra foi termicamente tratada a 180 °C por 5 min para avaliar a redução da produção de acrilamida nas amostras tratadas enzimaticamente. O teor de acrilamida foi determinado por HPLC, e os cromatogramas gerados, incluindo as amostras do controle negativo (amostra 1) e positivo (amostra 2), estão dispostos nas Figuras 19, 20 e 21.

Uma amostra padrão de acrilamida 10 µg/mL e de L-asparagina 0,5 g/L foram aplicadas separadamente no HPLC, utilizando água/acetonitrila/metanol como fase móvel, com o intuito de determinar o tempo de retenção de cada um desses compostos. Por meio da análise dos cromatogramas gerados (Figura 19) foi determinado que o tempo de retenção da acrilamida e da L-asparagina foi de aproximadamente 2,5 e 1,7 minutos, respectivamente.

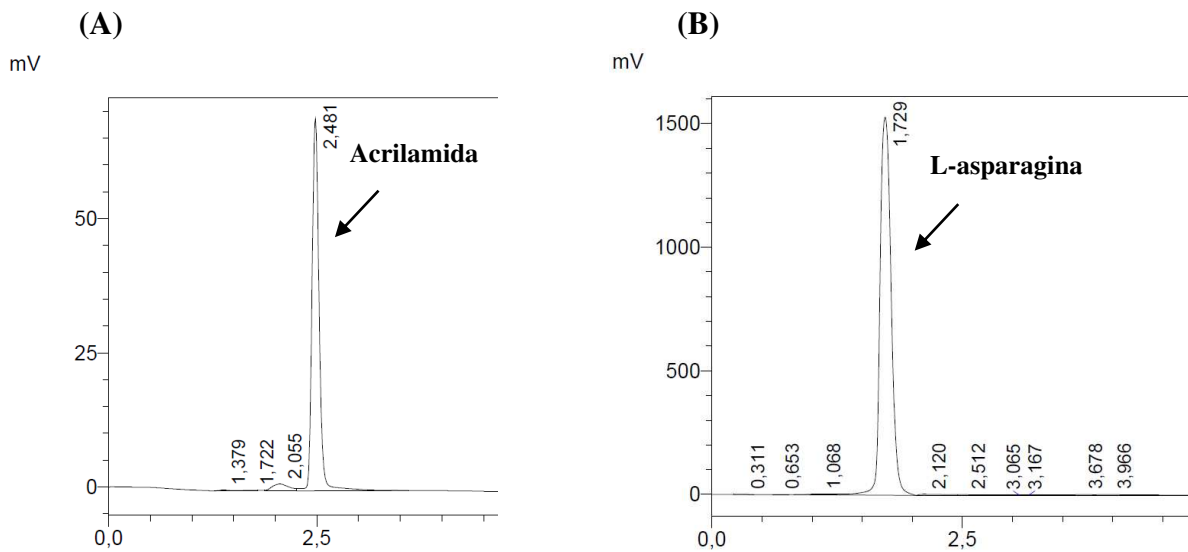
A partir destes dados, pudemos observar nos cromatogramas da Figura 20, correspondentes as amostras em estudo, que o provável pico de acrilamida se encontrava baixíssimo e muito próximo da linha de base. Com base no limite de detecção (LD) e no limite de quantificação (LQ) determinados, foi observado que o valor da área do pico de acrilamida realmente estava abaixo desses parâmetros, sendo impossível a sua quantificação de forma precisa e confiável. Esse resultado indica que o tratamento térmico no tempo realizado, não foi suficiente para a reação de formação de acrilamida, a partir do amido e L-asparagina. Isso, porque o pico de L-asparagina se encontrava elevado, indicando que provavelmente a L-asparagina não foi adequadamente convertida no composto acrilamida. Neste caso, a realização do tratamento térmico por mais tempo, poderá melhor assegurar que todo o processo de

hidrólise do amido em açúcares redutores, reação de Maillard e consequente geração de acrilamida aconteça devidamente.

Para afirmar que de fato o pico que foi visualizado próximo ao tempo de 2,5 minutos pertencia realmente ao composto alvo acrilamida, adicionou-se o padrão de acrilamida (10 µg/mL) nas amostras 1 e 2. E como esperado, a área do pico correspondente foi aumentada (Figura 21).

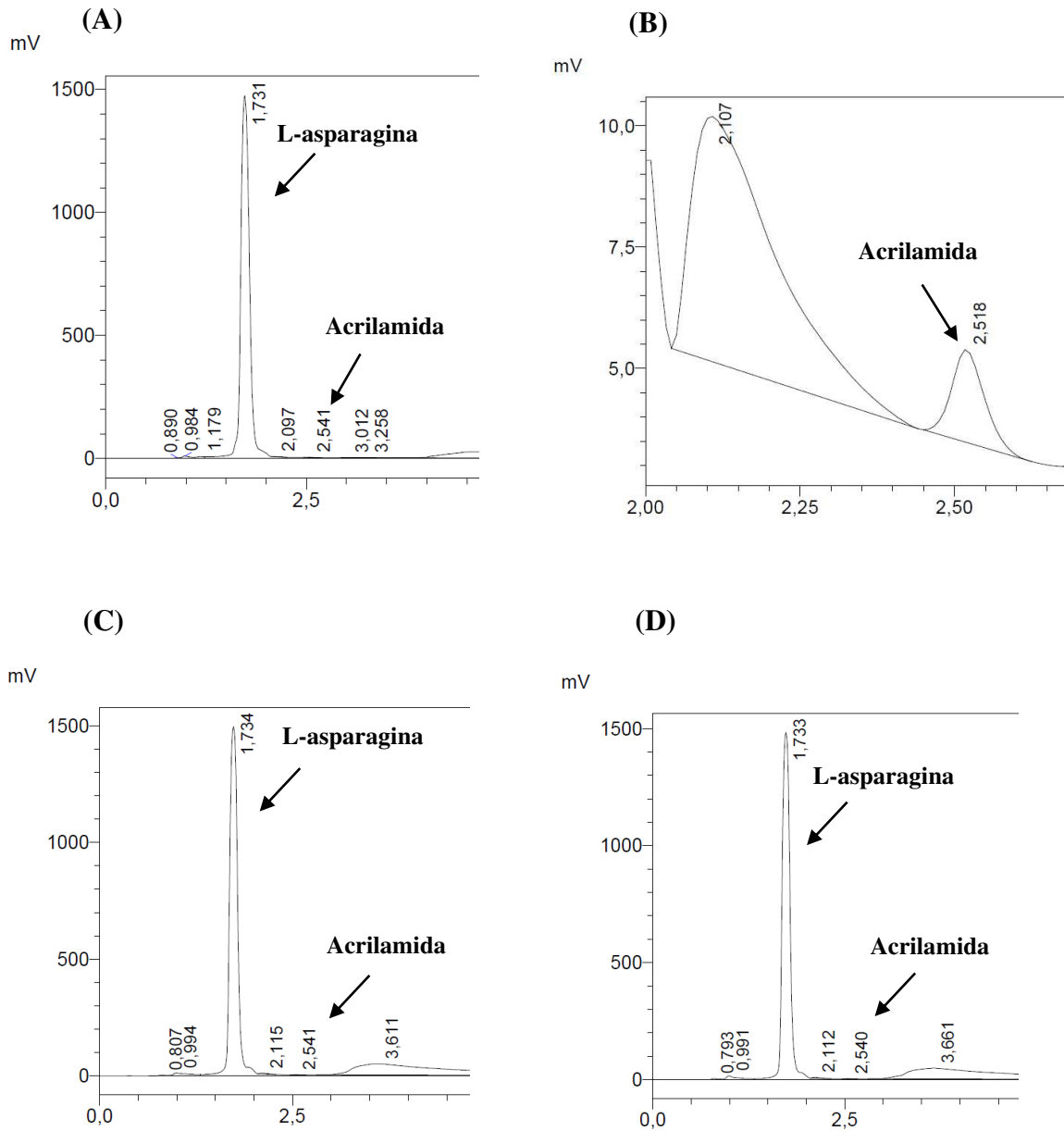
Diante disso, foi observado que em todas as amostras a L-asparagina estava presente, indicando que possivelmente esta não foi convertida em acrilamida durante o processo de tratamento térmico. Portanto, o resultado da eficiência da L-ASNase de *C. subuliforme* em mitigar os níveis de produção de acrilamida foi inconclusivo, sendo necessária a padronização dos parâmetros de ensaio do tratamento térmico para garantir a conversão da L-asparagina em acrilamida.

**Figura 19** - Análise dos padrões de (A) acrilamida (10 µg/mL) e (B) L-asparagina (0,5 g/L) por HPLC



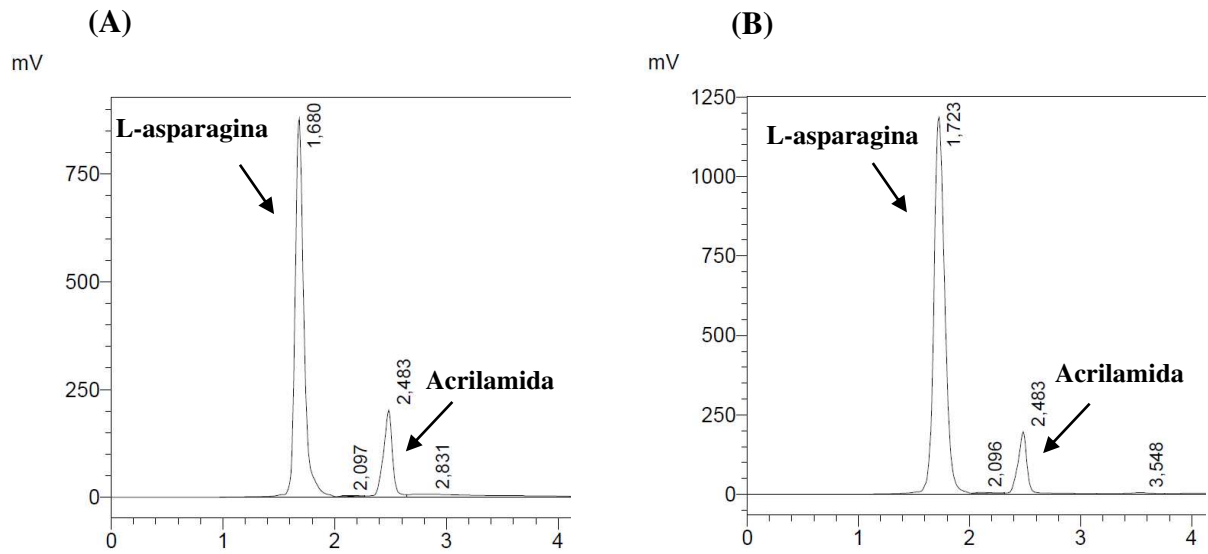
Fonte: A autora.

**Figura 20** - Análise de acrilamida por HPLC da (A) amostra 1 (controle negativo: modelo de alimento + água), (B) amostra 1 com resolução aumentada, (C) amostra 2 (controle positivo: modelo de alimento + L-ASNase comercial) e (D) amostra 3 (modelo de alimento + L-ASNase purificada de *C. subuliforme*)



Fonte: A autora.

**Figura 21** - Análise de acrilamida por HPLC após adição de 10 µg/mL de acrilamida na (A) amostra 1 (controle negativo: modelo de alimento + água), e na (B) amostra 2 (controle positivo: modelo de alimento + enzima comercial)



Fonte: A autora.

## 6 CONCLUSÃO

A avaliação de fungos filamentosos como fontes alternativas para produção de L-ASNase com potencial de aplicação biotecnológica mostrou que dos 25 isolados fúngicos avaliados, 13 apresentaram resultado positivo para a triagem em placa, sendo que *C. subuliforme* se destacou no ensaio quantitativo, devido sua maior capacidade de produção da enzima dentro das condições estabelecidas. O fungo *C. subuliforme* é pouco relatado quanto à sua habilidade de produzir enzimas extracelulares e um dos primeiros estudos sobre sua atividade asparaginolítica foram aqui relatados.

A maior produção de L-ASNase de *C. subuliforme* foi observada quando o fungo foi cultivado em meio líquido contendo caldo Czapek Dox a 28 °C e 150 rpm por 7 dias. A enzima produzida foi purificada atingindo um grau de pureza de mais de 10 vezes e rendimento de quase 40 % com a aplicação de uma única etapa de purificação, o que evita maiores perdas da proteína alvo ao longo dos estágios de purificação.

As condições ótimas para o ensaio padrão com a enzima purificada foram a 50 – 60 °C e pH 8,0. Os ensaios de termoestabilidade, estabilidade ao pH e efeito dos agentes desnaturantes SDS, DTT e ureia revelaram características bioquímicas surpreendentes, sugerindo que a enzima aqui trabalhada apresenta uma alta estabilidade. Ademais, a enzima mostrou baixa afinidade por L-glutamina, incrementando ainda mais suas características atrativas para o setor industrial.

Apesar do resultado do ensaio de aplicação da L-ASNase de *C. subuliforme* na redução de acrilamida ter sido inconclusivo, os parâmetros para detecção de L-asparagina e acrilamida por HPLC foram padronizados, como por exemplo, o uso da fase móvel e o tempo de retenção. Deste modo, conclui-se que a técnica de HPLC foi eficaz para detectar e quantificar acrilamida e que ajustes nas condições do tratamento térmico, como aumento do tempo e/ou temperatura do processo, permitirão confirmar o potencial do uso da enzima estudada na indústria de alimentos.

Portanto, os resultados sugerem que *C. subuliforme* pode ser um candidato potente para a obtenção de L-ASNase com propriedades adequadas e promissoras para sua aplicação biotecnológica, onde estudos adicionais mais aprofundados permitirão ampliar sua aplicação nos setores alimentício e terapêutico.

## REFERÊNCIAS

- ACIKARA, Ö. B. Ion-exchange chromatography and its applications. **Column chromatography**, v. 10, p. 55744, 2013.
- AL YOUSEF, S. A. *Fusarium* sp. L-asparaginases: purification, characterization, and potential assessment as an antileukemic chemotherapeutic agent. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 8, p. 11243-11254, 2022.
- ALAM, S. *et al.* Asparaginase conjugated magnetic nanoparticles used for reducing acrylamide formation in food model system. **Bioresource technology**, v. 269, p. 121-126, 2018.
- ALAM, S. *et al.* Recent development in the uses of asparaginase as food enzyme. In: **Green bio-processes**. Springer, Singapore, p. 55-81, 2019.
- ALI, D. *et al.* Optimization of L-asparaginase production from some filamentous fungi with potential pharmaceutical properties. **Egyptian Journal of Botany**, v. 58, n. 3, p. 355-369, 2018.
- ALMATAR, M.; MAKKY, E. A. *Cladosporium cladosporioides* from the perspectives of medical and biotechnological approaches. **3 Biotech**, v. 6, p. 1-8, 2016.
- ANDRADE, G. Af. K. *et al.* Screening of endophytic fungi from Antarctic mosses: Potential production for L-asparaginase free of glutaminase and urease activity. **Journal of Biotechnology**, v. 377, p. 1-12, 2023.
- ASHA, A.; PALLAVI, B. Production, purification and characterization of extra cellular l-asparaginase having anti neoplastic activity from *Fusarium* sp. **Journal of Advance Researches in Biological Sciences**, v. 4, n. 4, p. 293-301, 2012.
- BATOOL, T. *et al.* A comprehensive review on L-asparaginase and its applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, p. 900-923, 2016.
- BEDAIWY, M. Y. A. Production, optimization, and anti-cancer activity of L-asparaginase of *Pleurotus ostreatus* under solid state fermentation. **International Journal of Biosciences**, v. 14, n. 2, p. 251-263, 2019.
- BEDAIWY, M. Y. *et al.* Optimal conditions for production of L-asparaginase from *Aspergillus tamarii*. **The Egyptian Journal of Experimental Biology (Botany)**, v. 12, p. 229-237, 2016.
- BENSCH, K. *et al.* Common but different: The expanding realm of *Cladosporium*. **Studies in Mycology**, v. 82, n. 1, p. 23-74, 2015.
- BENSCH, K. *et al.* The genus *Cladosporium*. **Studies in mycology**, v. 72, p. 1-401, 2012.
- BERGER, R. G.; ERSOY, F. Improved Foods Using Enzymes from Basidiomycetes. **Processes**, v. 10, n. 4, p. 726, 2022.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CANTÚ, M. D. *et al.* Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, v. 31, p. 669-675, 2008.

CARDOSO, S. L. *et al.* L-Asparaginase Type II from *Fusarium proliferatum*: Heterologous Expression and In Silico Analysis. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 9, p. 2352, 2023.

CASTRO, D. *et al.* L-asparaginase production review: bioprocess design and biochemical characteristics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 4515-4534, 2021.

CHAKRABORTY, M.; SHIVAKUMAR, S. Bioprospecting of the agaricomycete *Ganoderma australe* GPC191 as novel source for L-asparaginase production. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 6192, 2021.

CHINAGLIA, S. *et al.* Biochemistry of lipolytic enzymes secreted by *Penicillium solitum* and *Cladosporium cladosporioides*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 78, n. 2, p. 245-254, 2014.

CHOW, Y.; TING, A. S. Y. Endophytic L-asparaginase-producing fungi from plants associated with anticancer properties. **Journal of advanced research**, v. 6, n. 6, p. 869-876, 2015.

CUMMINS, P. M.; ROCHFORT, K. D.; O'CONNOR, B. F. Ion-exchange chromatography: basic principles and application. **Protein chromatography: methods and protocols**, p. 209-223, 2017.

CUNHA, M. C. *et al.* L-asparaginase from *Aspergillus oryzae* spp.: Effects of production process and biochemical parameters. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 52, n. 3, p. 253-263, 2022.

CUNHA, M. *et al.* Fungal L-asparaginase: Strategies for production and food applications. **Food Research International**, v. 126, p. 108658, 2019.

DERKACH, I.; KLYMENKO, S. Current state of scientific research and prospects for using basidiomycetes in veterinary medicine: A literature review. **Ukrainian Journal of Veterinary Sciences**, v. 14, n. 2, 2023.

DIAS, F. F. G. *et al.* 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. *et al.* 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.; AGUILAR, J. G. S.; SATO, H. H. L-Asparaginase from *Aspergillus* spp.: production based on kinetics, thermal stability and biochemical characterization. **3 Biotech**, v. 9, p. 1-10, 2019.

DORIYA, K. *et al.* Solid-state fermentation vs submerged fermentation for the production of l-asparaginase. **Advances in food and nutrition research**, v. 78, p. 115-135, 2016.

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, p. 425-431, 2015.

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific opinion on acrylamide in food. **Efsa Journal**, v. 13, n. 6, p. 4104, 2015.

EISELE, N. *et al.* The first characterized asparaginase from a basidiomycete, *Flammulina velutipes*. **Bioresource technology**, v. 102, n. 3, p. 3316-3321, 2011.

EL-GENDY, M. M. A. A. *et al.* Production, purification, characterization, antioxidant and antiproliferative activities of extracellular L-asparaginase produced by *Fusarium equiseti* AHMF4. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 4, p. 2540-2548, 2021.

ELSHAFEI, A. M. *et al.* Purification, characterization and antitumor activity of L-asparaginase from *Penicillium brevicompactum* NRC 829. **British Microbiology Research Journal**, v. 2, n. 3, p. 158, 2012.

EL-SHANSHOURY, A. E. R.; ABOSAMRA, H. H.; ELSAKHAWY, T. A. Optimizing the Production of Glutaminase-Free L-Asparaginase by Halotolerant *Penicillium* sp. Isolated from Halophyte Cogongrass Rhizosphere. **Delta Journal of Science**, v. 46, n. 2, p. 44-66, 2023.

FARAG, A. M. *et al.* Optimization of production of anti-tumor l-asparaginase by free and immobilized marine *Aspergillus terreus*. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 41, n. 4, p. 295-302, 2015.

FAZELI, N.; ALIMADADI, N.; NASR, S. Screening and optimization of process parameters for the production of L-asparaginase by indigenous fungal-type strains. **Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science**, v. 45, n. 2, p. 409-416, 2021.

FEKETE, S. *et al.* Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 113, p. 43-55, 2015.

FERNANDES, M. L. P. *et al.* Low-cost agro-industrial sources as a substrate for the production of l-asparaginase using filamentous fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 34, p. 102037, 2021.

FOOD SAFETY BRASIL. **Legislação sobre limite de acrilamida em alimentos**. 2014. Disponível em: <https://foodsafetybrazil.org/legislacao-sobre-limite-de-acrilamida-em-alimentos/>. Acesso em: 10 out 2023.

FRAGA, H. B. **Disponibilização de nutrientes através da fermentação em estado sólido do bagaço de cana-de-açúcar adicionado de farelo de arroz com diferentes fungos**. 2018. 52 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia Agroindustrial – Indústrias alimentícias) - Universidade Federal do Rio Grande, Santo Antônio da Patrulha, MS, 2018.

GALLO, M. L.; SELDES, A. M.; CABRERA, G. M. Antibiotic long-chain and  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated aldehydes from the culture of the marine fungus *Cladosporium* sp. **Biochemical systematics and ecology**, v. 32, n. 6, p. 545-551, 2004.

GARCIA, P. H. D. *et al.* Anticancer Asparaginases: Perspectives in Using Filamentous Fungi as Cell Factories. **Catalysts**, v. 13, n. 1, p. 200, 2023.

Global Asparaginase Sales Market Report (2018)  
<https://www.marketinsightsreports.com/reports/0709674345/Global-Asparaginase-Sales-Market-Report-2018?source=thefreenewsman&Mode=15> Acesso em 23/06/2023.

GOLDBERG, H. A.; WARNER, K. J. The staining of acidic proteins on polyacrylamide gels: enhanced sensitivity and stability of “Stains-all” staining in combination with silver nitrate. **Analytical biochemistry**, v. 251, n. 2, p. 227-233, 1997.

GOLGERI M., D. B. *et al.* A systematic review on potential microbial carbohydrases: current and future perspectives. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 64, n. 2, p. 438-455, 2024.

HAMED, M.; OSMAN, A. A.; ATEŞ, M. Statistical optimization of L-asparaginase production by *Cladosporium tenuissimum*. **Egyptian Pharmaceutical Journal**, v. 20, n. 1, p. 51-58, 2021.

HASSAN, S. W. M.; FARAG, A. M.; BELTAGY, E. A. Purification, characterization and anticancer activity of L-asparaginase produced by marine *Aspergillus terreus*. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 1845-1854, 2018.

HATAMZADEH, S. *et al.* Isolation and identification of L-asparaginase-producing endophytic fungi from the *Asteraceae* family plant species of Iran. **PeerJ**, v. 8, p. e8309, 2020.

HUANG, L. *et al.* 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.

IARC (International Agency for Research on Cancer) (1994) Acrylamide. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *Ind Chem* 60:389–434 (France: Lyon).

IGNACIO, A. H. S. **Identificação e quantificação de acrilamida em grãos de café torrado e moído por análise cromatográfica**. 2022. 68 f Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2022.

IMADA, A. *et al.* Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. **Journal of General Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 85-99, 1973.

JIA, R. *et al.* Microbial L-asparaginase for application in acrylamide mitigation from food: Current research status and future perspectives. **Microorganisms**, v. 9, n. 8, p. 1659, 2021.

JIAO, L. *et al.* Characterization of a novel type I L-asparaginase from *Acinetobacter soli* and its ability to inhibit acrylamide formation in potato chips. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 129, n. 6, p. 672-678, 2020.

KHALIL, N. M.; RODRÍGUEZ-COUTO, S.; EL-GHANY, M. N. A. Characterization of *Penicillium crustosum* l-asparaginase and its acrylamide alleviation efficiency in roasted coffee beans at non-cytotoxic levels. **Archives of Microbiology**, v. 203, p. 2625-2637, 2021.

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.

KRISHNAPURA, P. R.; BELUR, P. D.; SUBRAMANYA, S. A critical review on properties and applications of microbial l-asparaginases. **Critical reviews in microbiology**, v. 42, n. 5, p. 720-737, 2016.

KUMAR, N. S. M.; MANONMANI, H. K. Purification, characterization and kinetic properties of extracellular L-asparaginase produced by *Cladosporium* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 577-587, 2013.

KUMAR, N. S. M.; 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, p. 150-158, 2013.

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

LEITE, P. *et al.* Recent advances in production of lignocellulolytic enzymes by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 27, p. 100407, 2021.

LINCOLN, L.; NIYONZIMA, F. N.; MORE, S. S. Purification and properties of a fungal L-asparaginase from *Trichoderma viride* pers: SF GREY. **The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 4, n. 4, p. 310, 2015.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of American Chemical Society**, v. 56, p. 658–666, 1934.

LIU, Y. *et al.* Carbonaceous nanomaterials stimulate extracellular enzyme release by the fungus *Cladosporium* sp. and enhance extracellular electron transfer to facilitate lignin biodegradation. **Science of The Total Environment**, v. 696, p. 134072, 2019.

LUBKOWSKI, J.; WLODAWER, A. Structural and biochemical properties of L-asparaginase. **The FEBS Journal**, v. 288, n. 14, p. 4183-4209, 2021.

MATHEW, D. E. *et al.* A Potent Drug l-Asparaginase from Marine Origins: A Comprehensive Review. **Marine Bioactive Molecules for Biomedical and Pharmacotherapeutic Applications**, p. 141-159, 2024.

MATHEW, D. E. *et al.* Performance evaluation and yield optimization of L-glutaminase free L-asparaginase from seaweed-associated bacteria. **Bioresource Technology Reports**, v. 23, p. 101534, 2023.

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.

MOHARRAM, A. M.; ZOHRI, A. A.; SEDDEK, N. H. L-Asparaginase production by endophytic fungi isolated from *Withania Somnifera* in Egypt. **SS International Journal of Multidisciplinary Research**, v. 2, p. 30-40, 2016.

MORENO-ENRÍQUEZ, A. *et al.* Biochemical characterization of recombinant L-asparaginase (AnsA) from *Rhizobium etli*, a member of an increasing rhizobial-type family of L-asparaginases. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 22, n. 3, p. 292-300, 2012.

MORGAN, T. **Avaliação genômica, proteômica e funcional de monooxigenases líticas de polissacarídeo do fungo *Chrysosporthe cubensis***. 2018. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Aplicada) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2018.

MUNEER, F. *et al.* Microbial L-asparaginase: purification, characterization and applications. **Archives of Microbiology**, v. 202, p. 967-981, 2020.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 8th Edition. Macmillan Learning, 2021.

NICOLETTI, R.; RUSSO, E.; BECCHIMANZI, A. *Cladosporium* - Insect Relationships. **Journal of Fungi**, v. 10, n. 1, p. 78, 2024.

NUNES, J. C. F. *et al.* L-Asparaginase-based biosensors. **Encyclopedia**, v. 1, n. 3, p. 848-858, 2021.

NUNES, J. C. F. *et al.* Recent strategies and applications for L-asparaginase confinement. **Molecules**, v. 25, n. 24, p. 5827, 2020.

NURÇE, Z.; GEZGIN, Y.; HAMEŞ, E. E. Antitumor activity of urease-free l-asparaginase with low glutaminase coactivity produced by marine-derived *Aspergillus flavus*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 54, p. 102958, 2023.

OROIAN, M.; AMARIEI, S.; GUTT, G. Acrylamide in Romanian food using HPLC-UV and a health risk assessment. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 8, n. 2, p. 136-141, 2015.

OSAMA, S. *et al.* Optimization and characterization of antileukemic L-asparaginase produced by *Fusarium solani* endophyte. **AMB Express**, v. 13, n. 1, p. 96, 2023.

PARASHIVA, J. *et al.* Endophytic Fungi as a Promising Source of Anticancer L-Asparaginase: A Review. **Current Microbiology**, v. 80, n. 9, p. 282, 2023.

PARASHIVA, J. *et al.* Response surface methodology based optimized production, purification, and characterization of L-asparaginase from *Fusarium foetens*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 9, p. 252, 2023.

PATEL, P. G. *et al.* Exploring current scenario and developments in the field of microbial L-asparaginase production and applications: A review. **Process Biochemistry**, v. 121, p. 529-541, 2022.

PATRO, K. R.; 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, 2012.

PENNISI, M. *et al.* Neurotoxicity of acrylamide in exposed workers. **International journal of environmental research and public health**, v. 10, n. 9, p. 3843-3854, 2013.

RANI, S. A.; SUNDARAM, L.; VASANTHA, P. B. Isolation and screening of L-asparaginase producing fungi from soil samples. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 279-282, 2012.

REGULAMENTO (UE) 2017/2158 DA COMISSÃO de 20 de novembro de 2017 que estabelece medidas de mitigação e níveis de referência para a redução da presença de acrilamida em géneros alimentícios. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R2158&from=EN>. Acesso em: 10 out. 2023.

ROCHA, W. R. V. *et al.* Screening and optimizing fermentation production of l-asparaginase by *Aspergillus terreus* strain S-18 isolated from the Brazilian Caatinga Biome. **Journal of applied microbiology**, v. 126, n. 5, p. 1426-1437, 2019.

ROSADO, A. WC. *et al.* *Cladosporium* species associated with disease symptoms on *Passiflora edulis* and other crops in Brazil, with descriptions of two new species. **Phytotaxa**, v. 409, n. 5, p. 239–260-239–260, 2019.

SAHA, S. *et al.* Pre-harvest occurrence and physico-chemical characterization of *Cladosporium cladosporioides* on grape in India. **Journal of Environmental Biology**, v. 44, n. 4, p. 623-629, 2023.

SANTOS, M. G. S. **Seleção de fungos endofíticos de cactaceae quanto à capacidade de produzir L-asparaginase**. 2014. 58 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) - Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, PE, 2014.

SAXENA, R. K.; SINHA, U. L-asparaginase and glutaminase activities in the culture filtrates of *Aspergillus nidulans*. **Current science**, 1981.

SHRIVASTAVA, A. *et al.* Kinetic studies of L-asparaginase from *Penicillium digitatum*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 42, n. 6, p. 574-581, 2012.

SIMAS, R. G. *et al.* An improved method for simple and accurate colorimetric determination of l-asparaginase enzyme activity using Nessler's reagent. **Journal of Chemical Technology e Biotechnology**, v. 96, n. 5, p. 1326-1332, 2021.

SOLER, M. F. C. R. **Aspectos da produção de L-asparaginase por leveduras**. 2015. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Lorena, SP, 2015.

SOUZA, N. P. **Otimização da extração da enzima asparaginase II de *Saccharomyces cerevisiae* expressa em *Pichia pastoris***. 2019. 109 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica) - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, 2019.

SOUZA, P. M. *et al.* Optimization and purification of L-asparaginase from fungi: A systematic review. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 120, p. 194-202, 2017.

TAREKE, E. *et al.* Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 17, p. 4998-5006, 2002.

TAVARES, E. F. L. **Identificação e quantificação de acrilamida em alimentos por métodos voltamétricos e espectroscópicos na região do infravermelho**. 2015. 116 f. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2015.

USMAN, A. *et al.* Production, optimization, and characterization of an acid protease from a filamentous fungus by solid-state fermentation. **International journal of microbiology**, v. 2021, 2021.

WANG, N. *et al.* Novel isolate of *Cladosporium* subuliforme and its potential to control Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 33, n. 1, p. 1-9, 2023.

WANG, Y. *et al.* Microbial production, molecular modification, and practical application of L-asparaginase: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 186, p. 975-983, 2021.

WIŚNIEWSKI, J. R. *et al.* Universal sample preparation method for proteome analysis. **Nature methods**, v. 6, n. 5, p. 359-362, 2009.

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.

YAP, L. S.; LEE, W. L.; TING, A. S. Y. Bioprocessing and purification of extracellular L-asparaginase produced by endophytic *Colletotrichum gloeosporioides* and its anticancer activity. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 53, n. 6, p. 653-671, 2023.