

ISABELA VICTORINO DA SILVA AMATTO

**Produção de L-asparaginase por *Aspergillus niveus* em  
Fermentação em Estado Sólido (FES)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia do Instituto de Química, UNESP, Araraquara/SP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães

**ARARAQUARA/SP  
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA

A487p Amatto, Isabela Victorino da Silva  
Produção de L-asparaginase por *Aspergillus niveus* em  
fermentação em estado sólido (FES) / Isabela Victorino da  
Silva Amatto. – Araraquara : [s.n.], 2019  
87 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual  
Paulista, Instituto de Química  
Orientador: Luis Henrique Souza Guimarães

1. Asparaginase. 2. Fungos filamentosos.  
3. Fermentação em estado sólido. 4. *Aspergillus*.  
5. Substratos. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

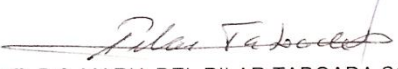
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Produção de L-asparaginase por *Aspergillus niveus* em Fermentação em Estado Sólido"


AUTORA: ISABELA VICTORINO DA SILVA AMATTO

ORIENTADOR: LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES  
Departamento de Biologia / Faculdade de Filosofia Ciências e Letras - USP - Ribeirão Preto

  
Profª. Drª. MARIA DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR  
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

  
Prof. Dr. JORGE FERNANDO BRANDÃO PEREIRA  
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 12 de abril de 2019

## DADOS CURRICULARES

### IDENTIFICAÇÃO

**Nome:** Isabela Victorino da Silva Amatto

**Nome em citações bibliográficas:** AMATTO, I. V. S.

### ENDEREÇO PROFISSIONAL

Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/SP. Avenida Bandeirantes, 3900, Vila Monte Alegre, 14040-901 – Ribeirão Preto/SP – Brasil.

### FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2017 – 2019 – ATUAL – Mestrado em Biotecnologia (Conceito CAPES 6). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Brasil. Título “Produção de L-asparaginase por *Aspergillus niveus* em Fermentação em Estado Sólido (FES)”. Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães.

2012 – 2016 – Graduação em Biomedicina, modalidade Bacharelado. Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL, Brasil. Título “Avaliação da Bioatividade de Fungos de Terra Preta Antropogênica da Amazônia Central”. Orientadora: Marília Caixeta Franco Ariosa.

### FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2012 – Diagnóstico de Parasitas (Carga horária: 7h e 30 min)  
15º Encontro Nacional de Biomedicina (ENBM), UNESP, Brasil.

2014 - Fitoterápicos e Florais na prática da Medicina Tradicional Chinesa (Carga horária: 4h)  
17º Encontro Nacional de Biomedicina (ENBM), UNEPS, Brasil.

2014 - Perícia Criminal (Carga horária:4h)

III Jornada da Biomedicina, Brasil.

2014 - Perfusão Extracorpórea (Carga horária: 2h e 30 min)

III Jornada da Biomedicina, Brasil.

2015 - Atualização em Micologia: Visão Molecular e Morfológica de Fungos Patogênicos (Carga horária: 8h)

28º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Brasil.

2016 - O arsenal terapêutico para as infecções fúngicas (Carga horária: 4h)

VIII Congresso Brasileiro de Micologia, Brasil.

2017 – Escrita Científica (Carga horária: 6h e 30 min)

2º Encontro Nacional de Química Biotecnológica e Agroindustrial, Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2017 - Manipulação Genética de Fungos (Carga horária: 4h)

29º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Brasil.

## **PROJETOS DE PESQUISA/ATUAÇÃO PROFISSIONAL**

2015 – 2016 – Bolsista FAPEMIG, Iniciação Científica: Bioprospecção de Compostos Bioativos e Identificação Molecular de Isolados Fúngicos de Terra Preta Antropogênica da Amazônia Central. Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL, Brasil.

2017 – 2019 – Projeto de Mestrado: Produção de L-asparaginase por *Aspergillus niveus* em Fermentação em Estado Sólido (FES). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Brasil.

## PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

### Resumos publicados em anais de congressos

**AMATTO, I. V. S.**; GUIMARÃES, L. H. S. Produção de L-Asparaginase por *A. niveus* em Fermentação em Estado Sólido (FES). In: XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología, 2018, Santiago – Chile. Anais do XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología, 2018.

**AMATTO, I. V. S.**; GUIMARÃES, L. H. S. Produção de L-asparaginase por *Aspergillus niveus* utilizando uma mistura de substratos. In: VIII Congresso Farmacêutico da UNESP e IV Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2018, Araquara – SP. Anais do VIII Congresso Farmacêutico da UNESP e IV Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2018.

**AMATTO, I. V. S.**; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Screening of Filamentous Fungi for Production of L-Asparaginase. In: 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2017, Foz do Iguaçu – PR. Anais do 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2017.

**AMATTO, I. V. S.**; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Seleção de Fungos Filamentosos Produtores de L-Asparaginase. In: 2º Encontro Nacional de Química Biotecnológica e Agroindustrial, 2017, Ribeirão Preto – SP. Anais do 2º Encontro Nacional de Química Biotecnológica e Agroindustrial, 2017.

**AMATTO, I. V. S.**, CARVALHO, P. N. L., TERCETI, M. S., VIEIRA, D. C. M., ARIOSOSA, M. C. F. Antimicrobial Potencial of Isolated Fungi from Amazonian Dark Earth from Central Amazon Region. In: 5th Brazilian Conference on Natural Products - BCNP and XXXI Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology – RESEM, 2015, Atibaia – SP. Anais do 5th Brazilian Conference on Natural Products - BCNP and XXXI Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology – RESEM, 2015.

**AMATTO, I. V. S.**, CARVALHO, P. N. L., ARIOSOSA, M. C. F., TERCETI, M. S., VIEIRA, D. C. M. Antimicrobial Potencial of Isolated Fungi from Anthropogenic Dark

Earth from Central Amazon Region. In: 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2015, Florianópolis – SC. Anais do 28º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2015.

### **Apresentação de Trabalhos**

**AMATTO, I. V. S.**; GUIMARÃES, L. H. S. Produção de L-Asparaginase por *A. niveus* em Fermentação em Estado Sólido (FES). 2018. (Apresentação de trabalho/Congresso).

**AMATTO, I. V. S.**; GUIMARÃES, L. H. S. Produção de L-asparaginase por *Aspergillus niveus* utilizando uma mistura de substratos. 2018. (Apresentação de trabalho/Congresso).

**AMATTO, I. V. S.**; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Screening of Filamentous Fungi for Production of L-Asparaginase. 2017. (Apresentação de trabalho/Congresso).

**AMATTO, I. V. S.**; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Seleção de Fungos Filamentosos Produtores de L-Asparaginase. 2017. (Apresentação de trabalho/Congresso).

**AMATTO, I. V. S.**, CARVALHO, P. N. L, SENA, L. M. F., TERCETI, M. S., PADOVAN, A. C. B., ARIOSSA, M. C. F. Potencial Bioativo e Estudo Antagônico de *Penicillium* sp. Isolado de Terra Preta Antropogenica da Amazonia Central. 2016. (Apresentação de trabalho/Workshop).

**AMATTO, I. V. S.**, CARVALHO, P. N. L, PADOVAN, A. C. B., ARIOSSA, M. C. F. Potencial Bioativo e Estudo Antagônico de *Penicillium* sp. Isolado de Terra Preta Antropogenica da Amazonia Central. 2016. (Apresentação de trabalho/Congresso).

**AMATTO, I. V. S.**, CARVALHO, P. N. L, TERCETI, M. S., VIEIRA, D. C. M., ARIOSSA, M. C. F. Antimicrobial Potencial of Isolated Fungi from Amazonian Dark Earth from Central Amazon Region. 2015. (Apresentação de trabalho/Congresso).

**AMATTO, I. V. S.**, CARVALHO, P. N. L., ARIOSIA, M. C. F., TERCETI, M. S., VIEIRA, D. C. M. Antimicrobial Potencial of Isolated Fungi from Anthropogenic Dark Earth from Central Amazon Region. 2015. (Apresentação de trabalho/Congresso).

**AMATTO, I. V. S.**, CARVALHO, P. N. L. Identificação Molecular de Fungos Isolados de Terra Preta Antropogênica da Amazônia Central e Bioprospecção de Compostos Bioativos. 2015. (Apresentação de trabalho/Simpósio).

### **PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS, CONGRESSOS, EXPOSIÇÕES E FEIRAS**

I Workshop do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. 2016. (Congresso).

III Jornada de Biomedicina - Unifal-MG. 2014. (Congresso).

17º Encontro Nacional de Biomedicina. 2014. (Encontro).

I Encontro de Pesquisadores em Biologia da Reprodução (I Meeting of Reproduction Biology Researchers). 2014. (Encontro).

VI Ciclo de Seminários - PET Biologia. 2014. (Seminário).

15º Encontro Nacional de Biomedicina. 2012. (Encontro).

IV Ciclo de Seminários – PET Biologia. 2012. (Seminário).



## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a todos que torceram por mim e acreditaram no meu potencial. Em especial a minha mãe, Cristina, minha irmã, Isadora e meu namorado, William. Obrigada por estarem comigo nesta jornada.

## AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus e ao meu anjo da guarda, por estarem sempre ao meu lado, me abençoando e me guiando no caminho certo. Obrigada por, nos momentos de incerteza, sempre me intuírem a tomar a melhor decisão. Obrigada por me darem forças para não desistir. Obrigada por fazerem desta minha vida, uma vida tão abençoada.

Sou grata a minha mãe, Cristina, que sempre acreditou em mim, no meu potencial e na minha missão nesta vida. Obrigada mãe, por ter me proporcionado uma vida tão privilegiada. Obrigada por todo o sacrifício que fez para me proporcionar uma educação de qualidade. Obrigada por todo o amor que me dá. Obrigada por me incentivar a lutar pelos meus sonhos e a trabalhar com o que amo. Obrigada por ser uma inspiração de mulher batalhadora e guerreira. Amo você.

Sou grata ao meu namorado, William, por ser o meu maior admirador. Obrigada, Mozão, por ter essa fé imensa em mim. Obrigada por acreditar no meu potencial, mesmo quando eu mesma não acreditei. Obrigada por comemorar comigo cada vitória, e por ser meu ombro para chorar nos momentos de desespero. Obrigada por me inspirar a ser uma pessoa melhor. Obrigada me fazer rir. Com você, meus dias têm mais cor. Amo você.

Sou grata a minha irmã, Isadora, por enxergar em mim algo muito maior do que eu mesma vejo. Obrigada por me incentivar, por acreditar em mim. Obrigada pelos empurrões, tão necessários, que me deu algumas vezes. Obrigada pelos conselhos e por me fazer ver as coisas de uma maneira diferente, sempre positiva. Sou muito grata por ter você como irmã. Amo você.

Sou grata aos meus gatos, Sirius e Maya, pelo amor incondicional que me dão. Obrigada bebês, por encherem minha vida de luz e alegria. Obrigada por tornarem meus dias mais leves. Amo vocês.

Sou grata ao meu pai, Luiz Gonzaga, por acreditar no meu potencial e pelo apoio financeiro que me deu, o qual possibilitou a realização deste sonho. Amo você.

Sou grata a minha avó, Elza, por ter sido uma segunda mãe para mim, por todo o amor que me deu. Obrigada por ter ajudado na minha criação e por tudo o que me ensinou. Amo você.

Sou grata a minha avó, Odete, pela fé que tem em mim e no meu potencial. Obrigada por apoiar meus sonhos. Amo você.

Sou grata a todos da minha família, que sempre torceram por mim. Obrigada por me incentivarem e por todo amor que me dão. Obrigada pelas orações e pela fé que têm em mim. Amo vocês.

Sou grata ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães, por ter acreditado no meu potencial e me dado oportunidade de desenvolver este projeto. Obrigada por contribuir para o meu crescimento profissional.

Sou grata a minha amiga Rayza Cavalcanti, por ser para mim uma inspiração de profissional dedicada e mulher forte e batalhadora. Aprendi muito com você durante esta jornada, obrigada por me ensinar tanto sobre enzimas, quanto sobre política e feminismo. Você contribuiu para eu me tornar a mulher que sou hoje. Te admiro demais!

Sou grata ao meu amigo Pedro Henrique Ornela, por ter compartilhado comigo um pouquinho da sua grande inteligência. Obrigada por ter me ensinado desde estatística, até as histórias dos super-heróis. Obrigada por ser tão detalhista em suas explicações. É admirável ver sua paixão pela pesquisa e tenho certeza que seu futuro será brilhante!

Sou grata a minha amiga Chadia Maestrello, por ser esta pessoa de coração tão bom. Obrigada por sempre estar disposta a me ajudar. Obrigada por todas as vezes que me hospedou em sua casa e por sempre me tratar tão bem e com tanto carinho. Você é uma pessoa da paz e resiliente, te admiro muito!

Sou grata a minha amiga Fernanda Mansano, pela paciência e carinho. Obrigada, amiga, por ser esta companheira para todas as h. Obrigada pelos momentos reven-

do todos os filmes de Harry Potter e por compartilhar comigo um pouquinho da sua alegria e luz!

Sou grata ao meu amigo Luiz Felipe Moraes, por ter trazido ainda mais alegria na minha vida. Engraçado como eu sinto que te conheço minha vida toda. Obrigada por compartilhar comigo os mesmos gostos musicais e referências pop. Obrigada por confiar em mim para pedir conselhos. Te admiro muito como pessoa e profissional.

Você vai longe!

Sou grata a minha amiga Camila Guedes, por ter me dado à honra de ser sua amiga. Obrigada por ser este exemplo de mulher forte e guerreira. Sou grata por ter compartilhado um pouco desta jornada com você!

Sou grata a Thais Barboni, por ser esta mulher brincalhona e ao mesmo tempo esta profissional excepcional, eu ensinou tanto a todos nós do laboratório. Obrigada pelos seus ensinamentos e por sua paciência.

Sou grata a Larissa Todero, pelo companheirismo e toda a ajuda que me deu. Obrigada pelos momentos que compartilhamos juntas.

Sou grata ao José Carlos Salgado, pela paciência que teve em me ajudar sempre que precisei.

Sou grata ao técnico Maurício, por todo o auxílio que me deu desde o meu primeiro dia no laboratório.

Sou grata aos funcionários do Instituto de Química da Unesp de Araraquara, principalmente a equipe da Pós-graduação. Obrigada pela paciência e atenção que sempre tiveram em me ajudar.

Sou grata a Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da USP de Ribeirão Preto, por ser o local que possibilitou a realização desta pesquisa.

Sou grata a CAPES e FAPESP por, através do apoio financeiro, possibilitar a realização deste projeto.

*celebre a mulher  
que você está se tornando  
não tape os ouvidos  
ela está te chamando  
ela dança com o fogo  
ela é pancada mas também é doce  
ela sempre foi sua melhor escolha*

*ela é tudo aquilo  
que sobreviveu*

*(Ryane Leão)*

## RESUMO

A enzima L-asparaginase (L-asparagina amidohidrolase, EC 3.5.1.1) promove a hidrólise do aminoácido L-asparagina em ácido aspártico e amônia. Esta enzima é utilizada atualmente para o tratamento de leucemias, principalmente a Leucemia Linfóide Aguda (LLA), e na indústria de alimentos para minimizar a formação de acrilamida. Apesar de sua importância, a L-asparaginase tem alto custo de mercado e requer elevado grau de pureza para aplicação terapêutica. Além disso, a L-asparaginase disponível para uso terapêutico é de origem bacteriana, o que causa uma série de efeitos adversos, diminuindo a eficácia do tratamento. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi a obtenção de L-asparaginase a partir do cultivo de fungos filamentosos utilizando diferentes métodos de fermentação (submersa e estado sólido), selecionando as melhores condições para a sua produção e caracterizando a atividade da L-asparaginase presente no extrato bruto. A partir do rastreamento em meio solidificado em placa de Petri, o maior índice de hidrólise (IH = 2,8) foi obtido com o fungo *Aspergillus niveus*, o qual foi selecionado para conduzir a produção de L-asparaginase em fermentação submersa (FSbm) e em estado sólido (FES). A FES foi a fermentação selecionada uma vez que não foi detectada atividade L-asparaginolítica no filtrado obtido da FSbm. Desta forma, as influências de diferentes parâmetros (substrato, solução umidificante e tempo de cultivo) sobre a produção enzimática em FES foram analisadas. A mistura M1 constituída de farelo de trigo, soja moída e casca de laranja (1:0,5:1 m/m/m), umidificada com solução de sais Czapek Dox na proporção 1:0,5 (m/v) proporcionou maior produção enzimática (0,22 U/g de substrato), em 48 h de cultivo. A L-asparaginase presente no extrato bruto apresentou maior atividade na faixa de pH de 4,0-5,0 e de temperatura de 30-45°C. A enzima foi estável por 2 h quando mantida no pH 5,0 e em uma ampla faixa de temperatura (30-65°C) por 50 min. Alguns compostos favoreceram a atividade enzimática como  $\text{CoCl}_2$  e os solventes butanol, etanol, isopropanol e metanol. Já o surfactante SDS causou total inibição da atividade enzimática. Com este estudo foi possível constatar que o fungo *A. niveus* é uma potencial fonte de L-asparaginase, indicando que a FES pode ser utilizada para selecionar uma enzima mais específica e estável, a qual pode beneficiar tanto a indústria alimentícia, quanto a farmacêutica.

**Palavras-chave:** L-asparaginase, fermentação em estado sólido, *Aspergillus*, fungos filamentosos, mistura de substratos.

## ABSTRACT

The L-asparaginase enzyme (L-asparagine amidohydrolase, EC 3.5.1.1) promotes the hydrolysis of the L-asparagine amino acid in aspartic acid and ammonia. This enzyme is currently used in the treatment of leukemias, mainly acute lymphoblastic leukemia (ALL), and in food industry to prevent the formation of acrylamide. Despite its importance, L-asparaginase has a high market cost and a high degree of purity is required for its therapeutic application. In addition, the L-asparaginase available for therapeutic use comes from bacteria which causes a number of adverse effects, decreasing the effectiveness of the treatment. In this context, the aim of this study was the obtainment of a L-asparaginase from filamentous fungi culture using different fermentation methods (submerged and solid state), selecting the best conditions for its production and the characterization of the L-asparaginase activity present in the crude extract. After screening on solid medium in Petri dishes, the highest hydrolysis index (HI = 2.8) was obtained with the fungus *Aspergillus niveus*, which was selected for the production of L-asparaginase using both submerged fermentation (SF) and solid state fermentation (SSF). The SSF was the chosen fermentation since no L-asparaginolytic activity was detected in the SF. Thus, the influences of some parameters (as substrate, moisturizing solution and incubation time) on the enzymatic production in SSF were analyzed. The M1 mixture consisting of wheat bran, ground soybeans and orange peel (1:0.5:1 w/w/w), humidified with Czapek Dox salts solution in the ratio of 1:0.5 (w/v) provided the highest enzymatic activity (0.22 U/g of substrate) with 48 h of fermentation. The L-asparaginase present in the crude extract showed a higher activity in the pH range of 4.0-5.0 and temperature of 30-45°C. The enzyme was stable at pH 5.0 for 2 h of incubation and under temperatures ranging from 30 to 65°C for 50 min. Some compounds increased the enzyme activity such as CoCl<sub>2</sub> and the solvents: butanol, ethanol, isopropanol and methanol. However, the SDS surfactant caused total enzymatic inhibition. It was possible to verify with this study that the fungus *A. niveus* is a potential source of L-asparaginase, indicating that the SSF can be used to select a more specific and stable enzyme, which can benefit both the food industry and the pharmaceutical industry.

**Keywords:** L-asparaginase, solid state fermentation, *Aspergillus*, filamentous fungi, mixture of substrate.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismo de ação da L-asparaginase .....	23
<b>Figura 2.</b> Estrutura da L-asparaginase II periplasmática de <i>Escherichia coli</i> (A) e estrutura da L-asparaginase de <i>Erwinia chrysanthemi</i> (B) .....	24
<b>Figura 3.</b> Estrutura 3D prevista de L-asparaginase recombinante de <i>Aspergillus terreus</i> .....	25
<b>Figura 4.</b> Atuação da L-asparaginase na corrente sanguínea no tratamento da LLA .....	28
<b>Figura 5.</b> Formação da acrilamida na reação de Maillard .....	31
<b>Figura 6.</b> Esquema de alguns processos que ocorrem durante a Fermentação em Estado Sólido. ....	37
<b>Figura 7.</b> Fluxograma simplificado dos experimentos realizados neste trabalho. ....	39
<b>Figura 8.</b> Rastreamento em caldo Czapek Dox modificado .....	52
<b>Figura 9.</b> Influência de diferentes subprodutos agroindustriais usados como substrato na produção de L-asparaginase por <i>A. niveus</i> em FES umidificados (1:0,5; m/v) com solução de asparagina (A e C) ou água de torneira (B e D).. ....	55
<b>Figura 10.</b> Influência de diferentes agentes umectantes (1:0,5; m/v) sobre a produção de L-asparaginase em FES, utilizando casca de mandioca como substrato, por <i>A. niveus</i> . ....	59
<b>Figura 11.</b> Influência de diferentes agentes umectantes (1:0,5; m/v) sobre a produção de L-asparaginase em FES por <i>A. niveus</i> utilizando a mistura M1 como substrato.....	60
<b>Figura 12.</b> Influência de diferentes agentes umectantes (1:0,5; m/v) sobre a produção de L-asparaginase em FES por <i>A. niveus</i> utilizando a mistura M2 como substrato.....	61
<b>Figura 13.</b> Influência da proporção de sais Czapek Dox, em relação ao uso da mistura M1 como substrato, sobre a produção de L-asparaginase por <i>A. niveus</i> em FES. ....	63
<b>Figura 14.</b> Influência de diferentes proporções dos componentes farelo de trigo, soja moída e casca de laranja, utilizados na mistura M1, sobre a produção de L-asparaginase pelo fungo <i>A. niveus</i> em FES umidificada com sais Czapek Dox (1:0,5; m/v).. ....	65

<b>Figura 15.</b> Influência do tempo de cultivo sobre a produção de L-asparaginase pelo fungo <i>A. niveus</i> em FES utilizando a mistura M1 (1:1:1; m/m/m) umedecida com sais Czapek Dox (1:0,5; m/v).....	67
<b>Figura 16.</b> Influência do pH na atividade da enzima L-asparaginase obtida de <i>A. niveus</i> em FES .....	69
<b>Figura 17.</b> Influência da temperatura na atividade da enzima L-asparaginase obtida do cultivo de <i>A. niveus</i> em FES.....	71
<b>Figura 18.</b> Estabilidade ao pH (A) e térmica (B) da L-asparaginase produzida por <i>A. niveus</i> em FES .....	73

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Índices de hidrólises (IH) obtidos em meio solidificado contendo L-asparagina (1%) para diferentes espécies de fungos filamentosos. ....	50
<b>Tabela 2.</b> Influência de diferentes sais na atividade enzimática da L-asparaginase obtida do cultivo de <i>A. niveus</i> em FES.....	75
<b>Tabela 3.</b> Influência de diferentes compostos na atividade enzimática da L-asparaginase obtida do cultivo de <i>A. niveus</i> em FES .....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius	nm – nanômetros
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária	PDB – Protein Data Bank
atm – atmosfera	PEG – Peguilada
$a_w$ – atividade de água	pH – potencial hidrogeniônico
BDA – Batata Dextrose Ágar	q.s.p. – quantidade suficiente para
BSA – Albumina Soro Bovino	rpm – rotações por minuto
BTB – azul de bromotimol	SDS - dodecil sulfato de sódio
EC – Enzyme Commission	SOBOPE – Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético	TCA – ácido tricloroacético
FB – Fermentação por Biofilmes	U – unidade de atividade enzimática
FES – Fermentação em Estado Sólido	USD – Dólar americano
FSbm – Fermentação Submersa	v/v – volume por volume
$g$ – aceleração da gravidade	var. – variedade
$g$ – grama	$V_{m\acute{a}x}$ – velocidade máxima
gds – gramas de substrato seco	$\mu\text{g}$ – micrograma
h- horas	$\mu\text{L}$ – microlitro
IH – Índice de Hidrólise	$\mu\text{mol}$ – micromol
INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde	
kDa – mil Daltons	
$K_m$ – constante de Michaelis-Menten	
L – litro	
LLA – Leucemia Linfóide Aguda	
M – Molar	
m/m/m – massa por massa por massa	
m/v – massa por volume	
mg – miligrama	
min – minutos	
mL – mililitro	
$\text{mmol L}^{-1}$ – milimol/Litro	

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	22
<b>1.1</b>	<b>L-asparaginase</b>	22
1.1.1	Estrutura molecular da L-asparaginase	23
1.1.2	Utilização da L-asparaginase na indústria farmacêutica	25
1.1.2.1	Contexto da L-asparaginase no mercado farmacêutico brasileiro	28
1.1.3	Utilização da L-asparaginase na indústria alimentícia	30
<b>1.2</b>	<b>Fungos filamentosos</b>	33
1.2.1	Produção de L-asparaginase por fungos filamentosos	34
<b>1.3</b>	<b>Processos fermentativos para a obtenção de enzimas</b>	35
1.3.1	Fermentação em Estado Sólido (FES)	35
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	38
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b>	38
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	38
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	39
<b>3.1</b>	<b>Microrganismos e manutenção das linhagens em laboratório</b>	39
<b>3.2</b>	<b>Rastreamento em meio solidificado em placa para fungos produtores de L-asparaginase</b>	40
3.2.1	Composição do meio Czapek Dox modificado	40
<b>3.3</b>	<b>Rastreamento em meio líquido para fungos produtores de L-asparaginase</b>	41
<b>3.4</b>	<b>Preparo da suspensão de esporos</b>	41
<b>3.5</b>	<b>Fermentação em Estado Sólido (FES)</b>	42
3.5.1	Seleção do substrato	42
3.5.2	Influência do agente umectante na produção enzimática	42
3.5.3	Influência do tempo de cultivo na produção enzimática	43
3.5.4	Influência da proporção dos componentes da mistura de substratos na produção enzimática	43
3.5.5	Extração enzimática e obtenção do filtrado extracelular	43
<b>3.6</b>	<b>Fermentação Submersa (FSbm)</b>	44
3.6.1	Utilização de etapa pré-fermentativa na FSbm	44
3.6.2	Influência da composição de diferentes meios de cultivo na produção enzimática em FSbm	45
3.6.3	Obtenção da enzima extracelular	47
3.6.4	Obtenção da enzima intracelular	47
<b>3.7</b>	<b>Determinação da atividade enzimática da L-asparaginase</b>	47
<b>3.8</b>	<b>Quantificação de proteínas</b>	48

<b>3.9</b>	<b>Caracterização da atividade da L-asparaginase presente no extrato bruto</b> .....	48
3.9.1	Influência do pH na atividade e na estabilidade enzimática .....	48
3.9.2	Influência da temperatura na atividade e na estabilidade enzimática .....	49
3.9.3	Efeito de diferentes compostos na atividade L-asparaginásica.....	49
<b>3.10</b>	<b>Análise dos experimentos</b> .....	49
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	50
<b>4.1</b>	<b>Rastreamento em meio solidificado em placa para fungos produtores de L-asparaginase</b> .....	50
<b>4.2</b>	<b>Rastreamento em meio líquido para fungos produtores de L-asparaginase</b> .....	51
<b>4.3</b>	<b>Produção de L-asparaginase em FSbm</b> .....	53
<b>4.4</b>	<b>Produção de L-asparaginase em FES</b> .....	54
<b>4.5</b>	<b>Influência de diferentes agentes umectantes na produção de L-asparaginase em FES</b> .....	58
<b>4.6</b>	<b>Influência de diferentes proporções dos componentes da mistura M1 na produção de L-asparaginase em FES</b> .....	64
<b>4.7</b>	<b>Influência do tempo de cultivo na produção de L-asparaginase em FES</b> .....	66
<b>4.8</b>	<b>Caracterização da atividade da L-asparaginase presente no extrato bruto</b> .....	68
4.8.1	Influência do pH e da temperatura na reação enzimática .....	68
4.8.2	Estabilidade ao pH e a temperatura .....	72
4.8.3	Influência de diferentes compostos na atividade enzimática .....	74
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	77
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	79

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 L-asparaginase

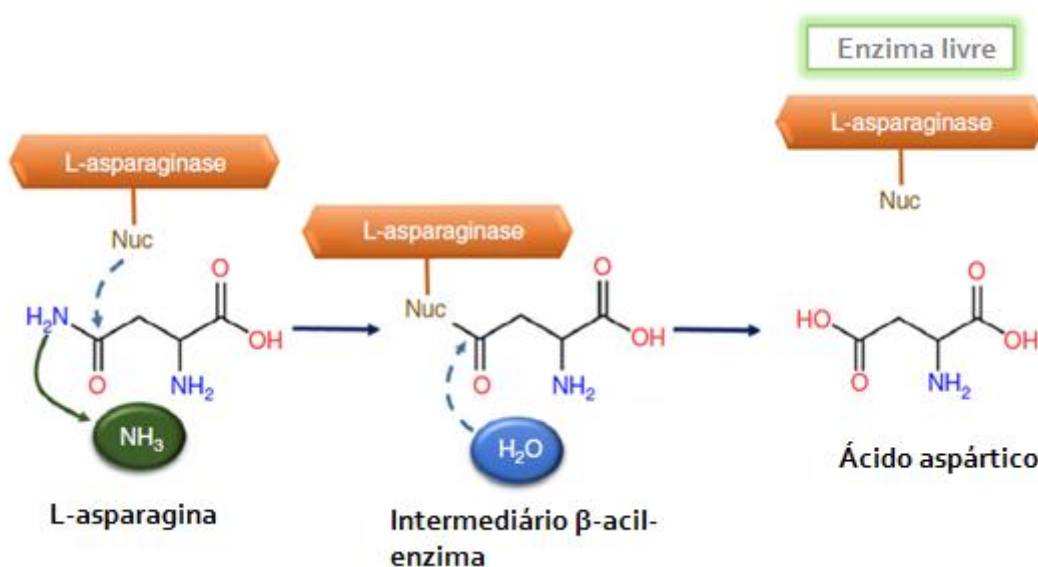
A L-asparaginase (L-asparagina amidohidrolase, EC 3.5.1.1) é uma enzima com significativa importância na área médica, farmacêutica e alimentícia. Pertencente ao grupo das amidases, sua principal ação consiste na hidrólise da L-asparagina em ácido L-aspártico e amônia. Porém, a L-asparaginase também pode hidrolisar a L-glutamina em ácido L-glutâmico e amônia. (SARQUIS et al., 2004). Esta enzima tem sido encontrada em plantas, como *Capsicum annuum* L (SHANMUGAPRAKASH et al., 2015) e *Withania somnifera* L. (OZA et al., 2009), alguns animais, como porquinhos da Índia (SHRIVASTAVA et al., 2016), em bactérias como *Escherichia coli*, *Erwinia chrysanthemi* e *Bacillus cereus* (FENG et al., 2019), em leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* (COSTA et al., 2016) e *Candida utilis* (RAJA et al., 2016), e em fungos filamentosos como *Aspergillus terreus* (BALASUBRAMANIAN et al., 2012), *Aspergillus niger* (ZIA et al., 2013; DIAS et al., 2015), *Rhizomucor miehei* (HUANG et al., 2014) e *Aspergillus oryzae* (DIAS et al., 2017). Foi a primeira enzima terapêutica com propriedades antineoplásicas a ser extensivamente estudada ao redor do mundo (BATOOL et al., 2016). As investigações sobre as propriedades terapêuticas da L-asparaginase tiveram início em 1953, quando Kidd constatou que a injeção de soro de porquinhos-da-Índia tinha a capacidade de causar a regressão de linfomas em camundongos. Mas foi somente em 1961 que Broome comprovou que a propriedade antitumoral do soro de porquinho-da-Índia era devido à presença da L-asparaginase (BATOOL et al., 2016).

Além da sua função antitumoral, também desempenha importante papel na indústria alimentícia, pois hidrolisa a acrilamida, um composto produzido quando alguns alimentos são submetidos a altas temperaturas de processamento, trazendo riscos à saúde (CIESAROVÁ; KISS; BOEGL, 2006).

O mecanismo de ação da L-asparaginase, ilustrado na Figura 1, ocorre em duas etapas. Na primeira, o alvo é o carbono amida da L-asparagina, o qual sofre um ataque do resíduo nucleofílico da enzima, ativado por uma base forte. É gerado então, um intermediário  $\beta$ -acil-enzima. Na segunda etapa da reação, o ataque ocorre no carbono éster, desta vez, feito por um nucleófilo ativado por uma molécula de água (CACHUMBA et al., 2016; SOLER, 2015).

Este mecanismo de ação se assemelha ao mecanismo clássico das serina-proteases, visto que suas atividades dependem de um grupo de aminoácidos conhecidos como tríade catalítica. Esta tríade catalítica é composta por um aminoácido nucleofílico, serina (Ser), um aminoácido de característica básica, histidina (His) e um aminoácido com caráter ácido, ácido aspártico (Asp), todos conectados por ligações de hidrogênio (CACHUMBA et al., 2016; SOLER, 2015).

**Figura 1.** Mecanismo de ação da L-asparaginase.



Fonte: adaptado de Cachumba et al., 2016.

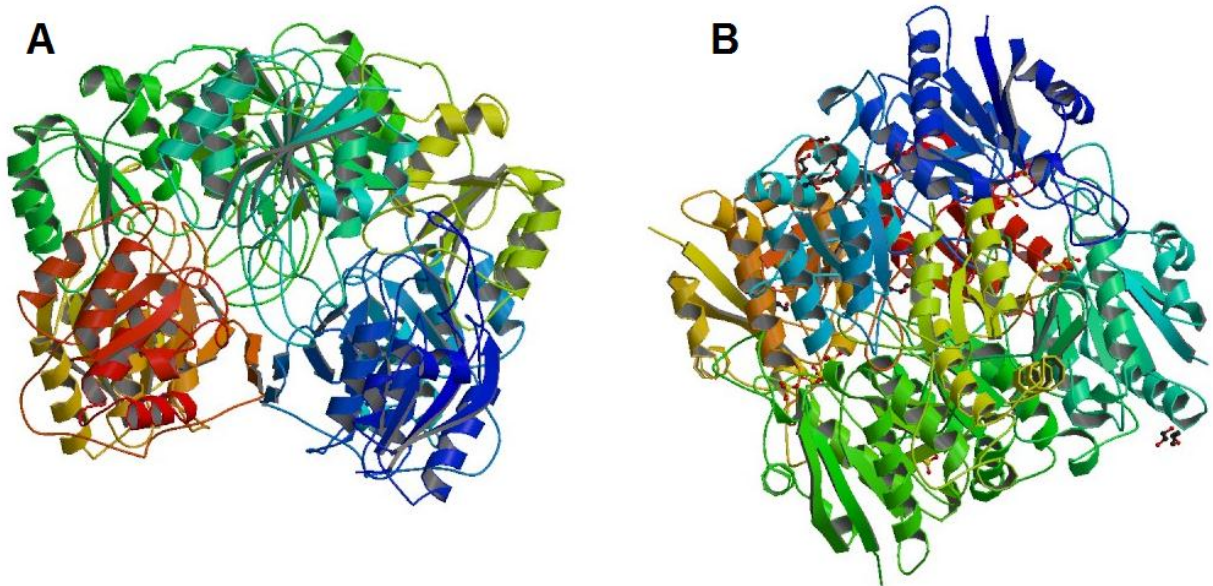
### 1.1.1 Estrutura molecular da L-asparaginase

As L-asparaginases obtidas de *Escherichia coli* e de *Erwinia chrysanthemi* já têm suas estruturas moleculares bem estabelecidas, devido ao fato de já terem sido estudadas extensivamente. A L-asparaginase pode apresentar-se de diversas formas, tais como hexaméricas, diméricas e monoméricas, dependendo da fonte da qual a enzima foi obtida (BATOOL et al., 2016). Entretanto, o tetrâmero de subunidades idênticas é a forma na qual a enzima funcional é encontrada, sendo sua massa molecular em torno de 140-160 kDa. Cada sítio ativo está localizado entre os domínios N-terminal e C-terminal de dois monômeros adjacentes. Portanto, a L-asparaginase pode ser considerada um dímero de dímeros (KOTZIA; LABROU,



2007). Na Figura 2 é possível observar as estruturas das L-asparaginases produzidas por *Escherichia coli* (A) e *Erwinia chrysanthemi* (B).

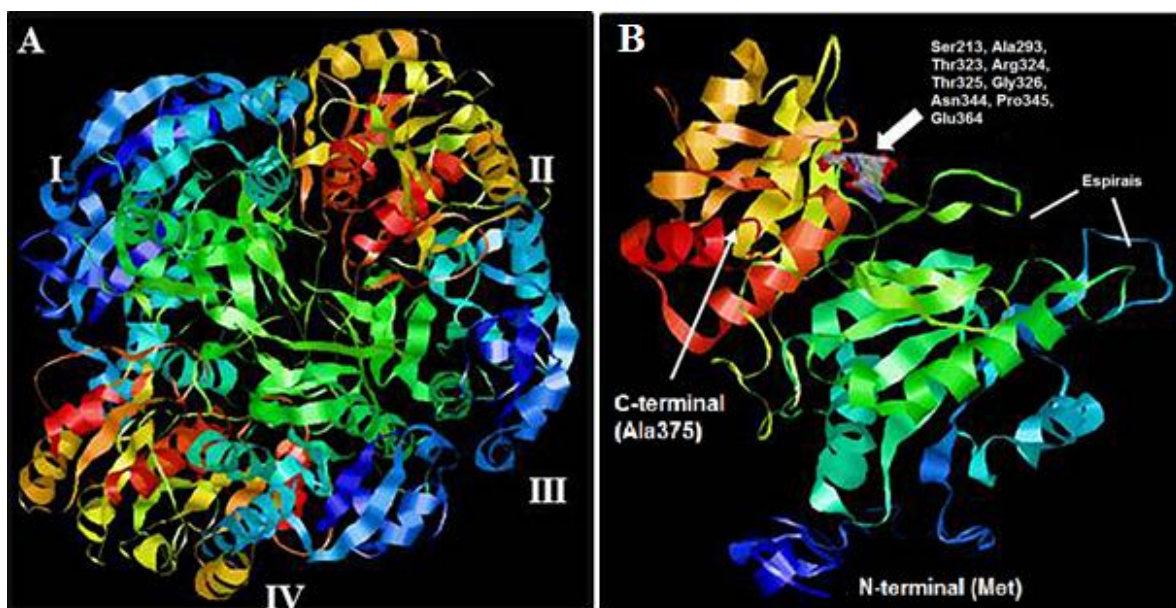
**Figura 2.** Estrutura da L-asparaginase II periplasmática de *Escherichia coli* (A) e estrutura da L-asparaginase de *Erwinia chrysanthemi* (B).



Fonte: (A) Swain et al., 1993 (código PDB 3 ECA) e (B) Lubkowski et al., 2002 (código PDB 1O7J).

Já na Figura 3 é apresentada a estrutura da L-asparaginase produzida por *Aspergillus terreus*. Saeed e colaboradores (2018) observaram que a enzima possui um total de 376 aminoácidos e uma massa molecular estimada em 42 kDa. A estrutura da L-asparaginase de *A. terreus* pode ser descrita como um homotetrâmero com quatro monômeros idênticos, semelhante a de *E. coli* e a de *Erwinia chrysanthemi*.

**Figura 3.** Estrutura 3D prevista de L-asparaginase recombinante de *Aspergillus terreus*. (A) estrutura homo tetramérica, (B) resíduos do sítio de ligação da ASN (asparagina).



Fonte: adaptado de Saeed et al., 2018.

A estrutura primária da L-asparaginase de *A. terreus*, também permitiu aos autores concluírem que a enzima possui resíduos de aminoácidos catalíticos conservados para o substrato L-asparagina, sendo eles Thr60, Tyr74, Thr141, Asp142 e Lys214. Resíduos catalíticos também foram encontrados para a L-glutamina, o que explica o fato da L-asparaginase também ser capaz de hidrolisar a L-glutamina (SAEED et al., 2018).

Através de análises filogenéticas Saeed e colaboradores (2018) constataram, com relação aos aminoácidos e nucleotídeos, que a L-asparaginase obtida de *A. terreus*, possui grande similaridade com outras L-asparaginases produzidas por *Aspergillus* sp.. Com relação as L-asparaginases bacterianas foi constatado que estas possuem uma linha evolutiva diferente das enzimas fúngicas.

### 1.1.2 Utilização da L-asparaginase na indústria farmacêutica

O mercado global de enzimas de aplicação industrial foi avaliado em \$ 4,61 bilhões em 2016, e estima-se que chegará em \$ 6,30 bilhões em 2022 (MARKETS AND MARKETS, 2016). O interesse econômico nestas proteínas cresce cada vez mais, devido a processos de produção mais baratos, de novas aplicações e descobertas de novas enzimas (VIMAL; KUMAR, 2019).

A aplicação de enzimas para fins farmacêuticos teve início há mais ou menos cinco décadas. São duas as razões pelas quais a utilização de enzimas na indústria farmacêutica é um sucesso: sua ação catalítica na conversão de inúmeras moléculas-alvo no produto desejado e sua alta especificidade pelo substrato (VIMAL; KUMAR, 2019). Atualmente, enzimas têm sido aplicadas na remoção de pele morta, em queimaduras (enzimas proteolíticas), no rebotamento de coágulos (enzimas fibrinolíticas) e na produção do L-DOPA, precursor da dopamina utilizada no tratamento da doença de Parkinson (tirosinase) (SINGH et al., 2016). Algumas destas enzimas ainda podem ser usadas no tratamento de câncer. É previsto que nas duas próximas décadas, a ocorrência de câncer no mundo aumente em 70% (FERNANDES et al., 2016), o que reforça a importância de enzimas como a glutaminase e a L-asparaginase.

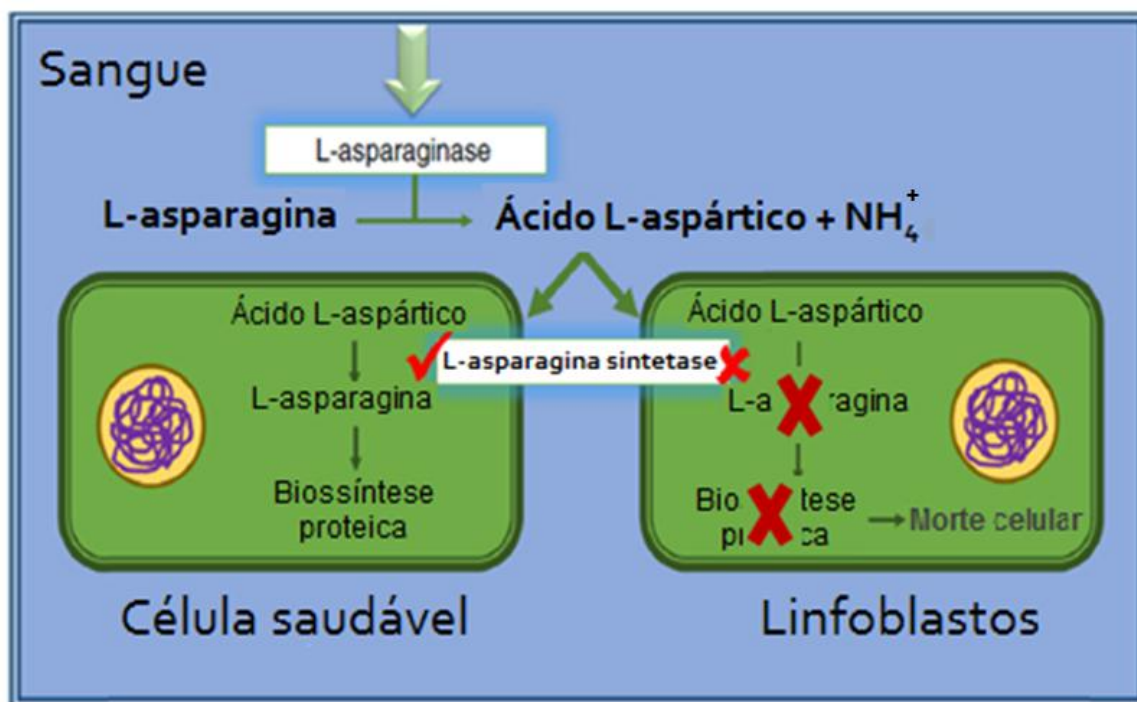
Atualmente, a L-asparaginase de utilização terapêutica provem das bactérias *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*. São variados os efeitos adversos do tratamento com a L-asparaginase disponível no mercado, como anafilaxia, hiperglicemia, trombose, disfunção hepática, pancreatite, distúrbios de coagulação e disfunção cerebral, entre outros. As principais causas desses efeitos adversos são a produção de anticorpos anti-asparaginase e a atividade glutaminásica da L-asparaginase (DORIYA; KUMAR, 2016; VAN DEN BERG, 2011).

A produção de anticorpos se dá devido ao fato de que quanto maior e mais complexa for uma proteína/enzima, maior imunogenicidade ela poderá causar em outro organismo. Neste caso, a L-asparaginase utilizada clinicamente, de origem bacteriana, possui uma massa molecular de 140 kDa ou mais, e sua estrutura é complexa, sendo formada por quatro subunidades idênticas. Isso aumenta a possibilidade de a enzima ser reconhecida como estranha ao organismo e ativar o sistema imune para a produção de anticorpos (MÜLLER; BOSS, 1998). Este processo agrava a degradação da enzima, o que aumenta sua inativação e diminuição da atividade do fármaco. Quando há reação imunológica contra o medicamento, uma alternativa é trocar a droga utilizada, mas este método nem sempre funciona (DORIYA; KUMAR, 2016; VAN DEN BERG, 2011). Quanto à atividade glutaminásica da L-asparaginase, esta se dá devido à semelhança estrutural dos aminoácidos asparagina e glutamina, que faz com que suas hidrólises sejam semelhantes (CACHUMBA et al., 2016).

Observa-se ainda que, as formulações contendo L-asparaginase, comercializadas atualmente, são compostas de amidohidrolases e, não apenas, de L-asparaginase. A presença de glutaminase e urease nestas preparações leva à hidrólise da glutamina e ureia presentes no sangue, causando toxicidade. Neste sentido, estudos buscam L-asparaginases com maior afinidade pela L-asparagina, além da ausência de atividade de glutaminase e urease, com o intuito de produzir um medicamento com um índice terapêutico maior (DORIYA; KUMAR, 2016; CACHUMBA et al., 2016).

A L-asparaginase tem sido empregada no tratamento do câncer, principalmente de leucemias, como a leucemia linfóide aguda (LLA) infanto-juvenil. Esta enzima, como pode ser observado na Figura 4, hidrolisa toda a asparagina presente na circulação sanguínea em ácido aspártico e amônia, o que causa uma depleção na síntese proteica das células tumorais, prejudicando a proliferação das mesmas. Isto porque estas células necessitam de grande quantidade de asparagina para manter seu ritmo de crescimento, porém, não possuem, ou possuem em baixa quantidade, a enzima L-asparagina sintetase, capaz de sintetizar este aminoácido, sendo dependentes da L-asparagina presente na corrente sanguínea (CACHUMBA et al., 2016; DORIYA; KUMAR, 2016). As células saudáveis, por sua vez, não sofrem danos, visto que demandam baixa quantidade de L-asparagina, que é suprida pela enzima asparagina sintetase (VERMA et al., 2007; KOTZIA; LABROU, 2007).

**Figura 4.** Atuação da L-asparaginase na corrente sanguínea no tratamento da LLA.



Fonte: adaptado de Cachumba et al., 2016.

### 1.1.2.1 Contexto da L-asparaginase no mercado farmacêutico brasileiro

Sendo a L-asparaginase uma enzima de importância tanto na indústria farmacêutica, quanto na alimentícia, seu mercado global vem crescendo ao longo dos anos e é liderado pela América do Norte, seguida da Europa Ocidental (Transparency Market Research).

A L-asparaginase vem ocupando espaço na mídia brasileira há algum tempo, devido aos problemas encontrados para sua aquisição pelos hospitais. Até 2012, a L-asparaginase era adquirida do laboratório Bagó, que detinha o registro no Brasil, com o nome comercial de Elspar. Porém, em dezembro de 2012, a Bagó perdeu o registro sanitário do Elspar na ANVISA, e em março de 2013 a mesma empresa solicitou o registro de outro medicamento, o Aginasa/Medac, nunca antes utilizado no Brasil. A SOBOPE (Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica), já vinha alertando, desde janeiro de 2013, para a dificuldade de adquirir a L-asparaginase, sendo que esta já estava em falta em diversos hospitais do país. Devido a este caráter emergencial, a ANVISA liberou, mesmo sem o registro sanitário, a

importação da Aginasa/Medac, fornecida pela Bagó, para abastecer os hospitais até dezembro de 2014. Já em maio de 2015, a ANVISA negou o pedido de registro do Aginasa/Medac, dois anos após sua solicitação, devido a pendências como, falta de certificado de boas práticas, registro no país de origem e ausência de relatórios dos estudos clínicos. Então, uma licitação foi aberta e o medicamento Leuginase, fornecido pelo laboratório Beijing/Xetley, foi selecionado. Além de mais barato, possui todos os documentos exigidos para a sua importação. A diferença entre os preços é gigantesca. Enquanto o preço do Leuginase é USD 38 a unidade, o Medac/Bagó custa USD 582,17 e o da Sigma-Tau/Baxter (PEG-asparaginase) USD 1.619,10 a unidade. Desta maneira, o Ministério da Saúde importou, em janeiro de 2017, o Leuginase (GADELHA, 2017).

A partir deste momento, a atenção da mídia se voltou para a L-asparaginase, já que havia críticas ao medicamento por parte de hospitais como o Boldrini, principalmente pelo fato de não existirem estudos clínicos do mesmo. Entretanto, o medicamento utilizado anteriormente também não possuía estudos clínicos, e a própria SOBOPE dispensa os estudos clínicos e consolida a eficácia da L-asparaginase, baseada em dados da literatura nacional e internacional. Diversas reportagens surgiram na mídia, na tentativa de invalidar o uso do medicamento chinês, com acusações quanto à sua qualidade. Todavia, a análise do Leuginase por 6 diferentes laboratórios, dentre eles INCQS/Fiocruz, não demonstrou a presença de contaminantes que possam causar danos aos pacientes e a ação enzimática está dentro do esperado para o tratamento de câncer (GADELHA, 2017).

Como pode ser observado, questionamentos vêm sendo levantados a respeito da L-asparaginase em uso no Brasil. Além disso, a baixa produção destes medicamentos não supre sua demanda, o que causa aumento nos custos e reforça a necessidade de melhorar as condições de produção desta enzima (VIMAL; KUMAR, 2017). No mercado estão disponíveis até o momento três tipos de L-asparaginase: L-asparaginase nativa, L-asparaginase peguilada (PEG-asparaginase), ambas obtidas de *Escherichia coli* e a L-asparaginase proveniente de *Erwinia chrysanthemi* (Crisantaspase) (KAWEDIA; RYTTING, 2014). Como citado acima, o valor da L-asparaginase é alto, devido ao elevado custo de sua produção. Sendo assim, diminuir os custos para a produção desta enzima é algo muito positivo para viabilizar a produção da mesma no Brasil, para que no futuro não seja necessária a sua importação.

Neste sentido, faz-se necessária a exploração de novas técnicas de produção de L-asparaginase, bem como novos microrganismos capazes de produzi-la, na tentativa de obterem-se maiores quantidades de enzima em um processo mais barato e eficaz.

### **1.1.3 Utilização da L-asparaginase na indústria alimentícia**

Outra aplicação das enzimas é na indústria de alimentos e bebidas, sendo esperada neste segmento, uma arrecadação de \$ 2,3 bilhões até 2020 (MARKETS AND MARKETS, 2016). Neste setor, as enzimas podem ser utilizadas na fabricação de pães, desde o aprimoramento da farinha até para manter o pão fresco por mais tempo, em laticínios, melhorando as características organolépticas do produto, e na fabricação de bebidas para a clarificação de sucos (amilases) e produção de cervejas de maior qualidade (SINGH et al., 2016).

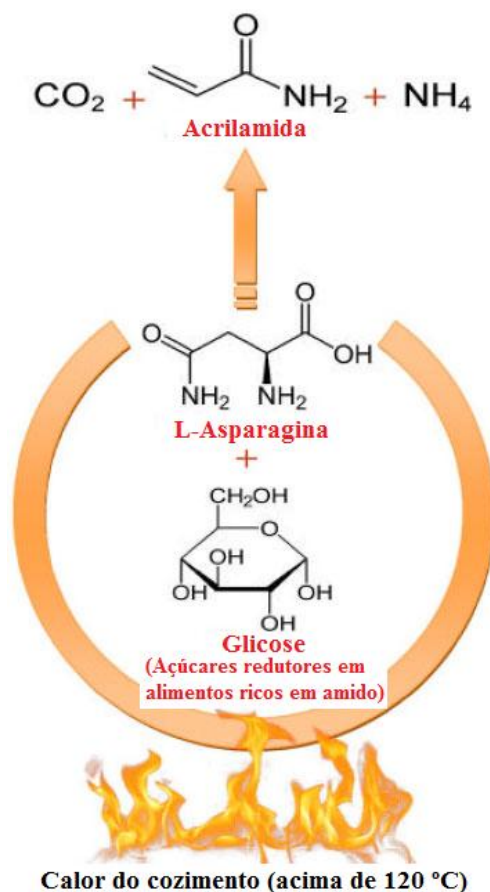
Para a indústria alimentícia, a importância da L-asparaginase é impedir a formação da acrilamida, um composto tóxico formado em alimentos submetidos a altas temperaturas e baixa umidade, devido à conversão incompleta ou aquecimento de matéria orgânica (TAREKE et al., 2002). A L-asparaginase hidrolisa a L-asparagina naturalmente presente em alimentos ricos em amido, minimizando a formação de acrilamida, sem afetar outros aminoácidos, o que, geralmente, mantém intactas as características e qualidade do alimento (DORIYA; KUMAR, 2016). Mais detalhadamente, o aminoácido L-asparagina é o precursor da Reação de Maillard (Figura 5), reação esta que proporciona as características de coloração marrom e crocância aos alimentos fritos e assados. Todavia, a acrilamida também é formada neste processo, a partir da reação da L-asparagina com açúcares redutores. Sendo assim, a aplicação da L-asparaginase em alimentos ricos em amido, antes de serem assados, grelhados ou fritos, diminui significativamente a formação de acrilamida, sem interferir nas características sensoriais desejáveis dos alimentos (EL-NAGGAR; EL-EWASY; EL-SHWEIHY, 2014).

Apesar da diminuição dos níveis de asparagina ter um impacto favorável em minimizar a formação de acrilamida, as quantidades relativas dos precursores também influenciam. Ou seja, se a quantidade de açúcares redutores totais for superior à quantidade de asparagina em um alimento, eliminar a asparagina terá um efeito mais vantajoso para impedir a formação de acrilamida e vice-versa. Desta



maneira, trabalhos abordam que em batatas, a formação de acrilamida é proporcional à quantidade de açúcares redutores. Já para alguns cereais, a formação de acrilamida depende da concentração de asparagina presente (XU; ORUNA-CONCHA; ELMORE, 2016).

**Figura 5.** Formação da acrilamida na reação de Maillard.



Fonte: adaptado de El-Naggar; El-Ewasy; El-Shweihy, 2014.

A formação de acrilamida é uma preocupação para a indústria de alimentos, visto que a mesma apresenta efeito neurotóxico e carcinogênico (ROSÉN; HELLENÄS, 2002; TAREKE et al., 2002; CIESAROVÁ; KISS; BOEGL, 2006). Sendo assim, a indústria alimentícia tem usado há anos a L-asparaginase recombinante obtida de *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* para reduzir a formação de acrilamida em alimentos (PEDRESCHI et al., 2011). Estão disponíveis no mercado duas L-asparaginases utilizadas na indústria de alimentos. A primeira, lançada em 2007, foi a PreventAse™, da empresa DSM. A segunda é o Acrylaway®, da empresa



Novozymes. O PreventAse™ é composto de L-asparaginase recombinante de *Aspergillus niger*, a qual possui pH ótimo ácido, na faixa de 4 – 5, e temperatura ótima de 50°C. Já o Acrylaway® é composto por L-asparaginase recombinante proveniente de *Aspergillus oryzae*, a qual tem atividade ótima em pH 7,0 e temperatura de 37°C (XU; ORUNA-CONCHA; ELMORE, 2016).

Utilizar a L-asparaginase como pré-tratamento em alimentos mostrou-se uma maneira efetiva de mitigar a formação de acrilamida. Pedreschi, Kaack e Granby (2008) observaram que as batatas incubadas durante 20 min a 40°C com a enzima (antes de serem fritas) obtiveram redução de 30% de acrilamida. Em contrapartida, quando as batatas foram submetidas à técnica de branqueamento e só depois incubadas com a enzima, a redução dos níveis de acrilamida nas batatas fritas foi de 60% (PEDRESCHI; KAACK; GRANBY, 2008). A técnica do branqueamento consiste em cozinhar as batatas em água à alta temperatura, por um curto período de tempo (em torno de 3 min). O fato de a utilização do branqueamento antes da aplicação da enzima, ser mais efetivo em reduzir a formação de acrilamida em batatas, gera a hipótese de que o branqueamento altera a microestrutura do tecido da batata, o que facilita a interação da L-asparaginase com o aminoácido L-asparagina (PEDRESCHI et al., 2011).

Dias et al. (2017) aplicaram L-asparaginase nativa de *A. oryzae* em batatas, antes destas serem fritas, e obtiveram uma redução de 72% na formação de acrilamida, enquanto que a L-asparaginase recombinante disponível no mercado, promoveu redução de 92%. Por outro lado, a L-asparaginase nativa não apresentou atividade L-glutaminásica, enquanto que a recombinante diminuiu 25% os níveis de L-glutamina. Ademais, Meghavarnam e Janakiraman (2017) aplicaram L-asparaginase proveniente do fungo *Fusarium culmorum* (ASP-87) em batatas, antes de serem fritas, e pão doce, obtendo redução na formação de acrilamida de 94% e 86%, respectivamente. Em outro trabalho, Huang et al. (2014) obtiveram L-asparaginase produzida pelo fungo *Rhizomucor miehei* e realizaram a clonagem do gene que codifica a produção da enzima neste fungo e expressaram em *E. coli*. Esta L-asparaginase foi capaz de minimizar a formação de acrilamida em biscoitos e pães em 81,6% e 94,2%, respectivamente.

A L-asparaginase também vem sendo utilizada na indústria do café, o qual é um alimento amplamente utilizado no mundo (AKILLIOGLU; GÖKMEN, 2014). A L-asparaginase pode ser aplicada no café antes da torrefação dos grãos, para mitigar

a formação de acrilamida. Hendriksen, Budolfsen e Baumann (2013) utilizaram o Acrylaway<sup>®</sup> para analisar sua eficiência em minimizar a formação de acrilamida em café, sendo obtida redução de 70 – 80%.

## **1.2 Fungos filamentosos**

Os fungos filamentosos são microrganismos eucariotos, multicelulares e quimio-heterotróficos, que necessitam de matéria orgânica para obter energia e fonte de carbono para se desenvolverem (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Muito da biologia de suas células é comum em animais, plantas e protistas, pois estes também são organismos eucariotos (WATKINSON; BODDY; MONEY, 2016).

Os fungos filamentosos são formados por longos filamentos de várias células conectadas, chamados de hifas. As hifas podem ser septadas, contendo paredes cruzadas que separam a hifa em unidades celulares uninucleadas, ou cenocíticas, sem septos. O alongamento das extremidades promove o crescimento das hifas, até o momento em que estas se tornam visíveis a olho nu, formando o que chamamos de micélio. Existem ainda hifas especializadas na obtenção de nutrientes, as chamadas hifas vegetativas, e aquelas responsáveis pela reprodução do fungo, que são as hifas aéreas ou reprodutivas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Já é vastamente conhecida e difundida na literatura a importância dos fungos filamentosos na produção de compostos de interesse econômico e tão necessários para o bem estar do ser humano (como antibióticos e enzimas). Estes microrganismos desempenham papel importante na indústria alimentícia, farmacêutica, têxtil, de papel e de biocombustível. Além disso, são superiores às bactérias e leveduras no que diz respeito à versatilidade metabólica e capacidade secretora. Desta maneira, apesar de já serem vastamente estudados, os fungos filamentosos possuem uma diversidade de mais de 6 milhões de espécies, o que significa que ainda há muito o que aprender sobre eles e sua capacidade metabólica, o que pode sinalizar para novas aplicações e processos mais sustentáveis (MEYER et al., 2016). Dentre as moléculas produzidas por estes microrganismos, as enzimas estão entre as de maior interesse econômico e biotecnológico.

### 1.2.1 Produção de L-asparaginase por fungos filamentosos

Apesar da importância da L-asparaginase tanto na indústria farmacêutica quanto na alimentícia, sua produção em larga escala ainda enfrenta desafios para suprir a demanda do mercado (VIMAL; KUMAR, 2017). No cenário médico, diversas pesquisas buscam obter L-asparaginase a partir de microrganismos eucariotos, com o intuito de produzir uma enzima com maior especificidade e, portanto, com menos efeitos adversos (CACHUMBA et al., 2016). Além disso, procuram-se desenvolver novos métodos de produção e purificação, para minimizar as impurezas que podem causar reações de hipersensibilidade ao medicamento (SARQUIS et al., 2004).

Tal busca deve-se ao fato de que as células humanas se assemelham mais às células fúngicas do que às células bacterianas (BATOOL et al., 2016). Encontra-se na literatura relatos de que os fungos filamentosos tais como *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. e *Mucor* sp. são capazes de produzir L-asparaginase, além de leveduras como *Candida utilis* (RAJA et al., 2016; SARQUIS et al., 2004). Há ainda relatos de outros fungos capazes de produzir L-asparaginase. Por exemplo, *Trichoderma viride* Pers: SF Grey foi capaz de produzir L-asparaginase em FSbm em um tempo de cultivo de 72 h (LINCOLN; NIYONZIMA; MORE, 2015). Em outro trabalho foi utilizado *Cladosporium* sp. para produzir L-asparaginase em FES, utilizando farelo de trigo como substrato, em um tempo de cultivo de 120 h (MOHAN KUMAR; MANONMANI, 2013). Por outro lado, Huang et al. (2014) obtiveram sucesso na produção de L-asparaginase através da clonagem e expressão do gene que codifica esta enzima no fungo *Rhizomucor miehei*, em *Escherichia coli*.

Doriya e Kumar (2016) descreveram em seu trabalho a produção de L-asparaginase por diversos fungos provenientes do solo. O isolado de maior destaque foi o C7, pertencente ao gênero *Aspergillus*, sendo a maior atividade enzimática obtida utilizando glicose como fonte de carbono e asparagina como fonte de nitrogênio. A L-asparaginase produzida pelo isolado C7 foi livre de atividade de L-glutaminase e urease. Há ainda estudos que obtiveram resultados interessantes na produção de L-asparaginase utilizando fungos endofíticos dos gêneros *Colletotrichum*, *Eupenicillium* e *Talaromyces*, além de fungos isolados de ambientes marinhos (CACHUMBA et al., 2016). Balasubramanian et al. (2012) descreveram a produção de L-asparaginase por *Aspergillus terreus* em FSbm, sendo 96 h, o tempo de cultivo que proporcionou maior produção enzimática. Já Zia et al. (2013)

descreveram produção de L-asparaginase pelo fungo *Aspergillus niger*, utilizando sub produtos agroindustriais em FSbm e um tempo de cultivo de 96 h. Em outro estudo, utilizando o fungo *Aspergillus niger* em FES, a máxima produção de L-asparaginase, foi obtida utilizando-se uma mistura dos subprodutos farelo de soja, farelo de trigo e farelo de semente de algodão (DIAS et al., 2015).

De acordo com o exposto, fica claro que os fungos filamentosos são fontes promissoras de L-asparaginases, as quais podem apresentar as características buscadas para uma efetiva aplicação farmacêutica, bem como na indústria de alimentos.

### **1.3 Processos fermentativos para a obtenção de enzimas**

As enzimas provenientes de microrganismos são obtidas através do processo que chamamos de fermentação. Os métodos de fermentação mais comuns são a Fermentação em Estado Sólido (FES) e a Fermentação Submersa (FSbm). A principal diferença entre eles é a quantidade de água livre, visto que na FES não há água livre no processo, o que o torna mais adequado para o cultivo de fungos filamentosos. Já na FSbm o microrganismo cresce solto em um meio líquido, sendo este processo, portanto, mais adequado para o cultivo de bactérias e leveduras, mas também muito utilizado para fungos filamentosos (MANAN; WEBB, 2017). Outro tipo de fermentação, ainda pouco estudada, é a Fermentação por Biofilme (FB), a qual é utilizada para o cultivo de fungos filamentosos. A FB alia características tanto da FES quanto da FSbm, pois utiliza um suporte inerte para a aderência fúngica e também um meio líquido para fornecer os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento (GUTIÉRREZ-CORREA et al., 2012).

#### **1.3.1 Fermentação em Estado Sólido (FES)**

A fermentação em estado sólido (FES) vem sendo utilizada há anos na obtenção de produtos microbianos, geralmente de origem fúngica, e tem como vantagem a utilização de subprodutos agroindustriais como substrato, sendo uma alternativa sustentável para o reaproveitamento de um produto sub ou não utilizado, substituindo produtos químicos mais caros (PANDEY, 2003; RANI, SUNDARAM, VASANTHA, 2012).

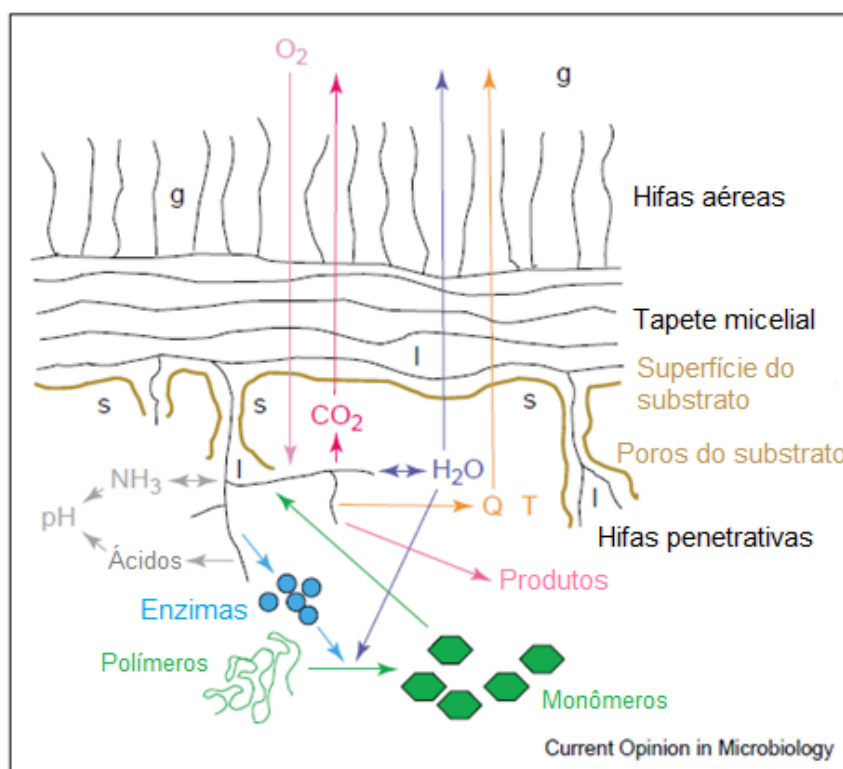
São diversos os fatores que tornam a FES uma alternativa viável para a produção de compostos de interesse industrial. Em seu artigo de revisão, Manan e Webb (2017) separaram as vantagens proporcionadas pela FES em 4 tipos: biológicas, de processamento, ambientais e econômicas. Sobre as vantagens biológicas, a FES suporta maiores concentrações de substrato, pois é menos suscetível à inibição por este, proporcionando, conseqüentemente, maiores volumes do produto. Há também maior produção, ausência de repressão catabólica, os produtos gerados são mais estáveis e utiliza menos água, o que minimiza as chances de contaminação por bactérias. Não obstante, as vantagens de processamento englobam os biorreatores, que são mais simples e compactos do que os utilizados em FSbm, além dos substratos serem de origem natural e necessitarem de um pré-tratamento simples. Quanto às vantagens ambientais, Manan e Webb (2017) citam uma menor produção de água residual, além de gerar menos compostos poluentes para o meio ambiente. Isto porque, de acordo com Yazid e colaboradores (2017), o depósito de subprodutos agroindustriais teve um drástico aumento ao longo dos anos, pois apesar de uma parte destes produtos ser utilizada para alimentação de animais, ainda há muita sobra, que acaba sendo incinerada ou depositada em aterros sanitários. O problema da incineração é que, além de ser um processo caro, causa poluição do ar. Por outro lado, o depósito destes subprodutos em aterros sanitários também é problemático, pois a degradação desta matéria orgânica por microrganismos produz o chorume, que penetra no solo, causando poluição dos lençóis freáticos. Por fim, as vantagens econômicas apresentadas por Manan e Webb (2017) são a utilização de substratos naturais, abundantes e baratos, por exemplo, o farelo de trigo (custo de R\$ 3,00/Kg, no mercado local de Ribeirão Preto) e a soja (R\$ 5,00/Kg, no mercado local de Ribeirão Preto), como utilizados neste projeto. Além disso, os biorreatores também são de baixo custo e fáceis de usar.

Por outro lado, o difícil controle das condições de cultivo da FES, como temperatura, umidade, transferência de oxigênio e o acesso aos nutrientes, entre outros, devido à baixa quantidade de água, é uma desvantagem que limita a utilização deste tipo de fermentação, principalmente pensando na produção em larga escala (HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004; PANDEY, 2003). Pensando na produção de enzimas, uma alternativa para driblar estas desvantagens é utilizar a FES como uma maneira de selecionar enzimas mais específicas e estáveis e utilizar métodos de

clonagem para expressar o gene que codifica a produção da enzima em hospedeiros heterólogos, capazes de produzi-la em FSbm, facilitando o controle das condições de cultivo.

Ao contrário da FSbm, na FES os fungos apresentam comportamento fisiológico diferente, o que pode levar a uma maior eficiência na produção. As condições utilizadas na FES (substrato sólido e pouca umidade) mimetizam o habitat natural dos fungos filamentosos, visto que estes têm uma tendência natural de crescerem aderidos a uma superfície (HÖLKER; LENZ, 2005). Na Figura 6 é possível observar como ocorre a colonização de um substrato por um fungo filamentoso.

**Figura 6.** Esquema de alguns processos que ocorrem durante a Fermentação em Estado Sólido. g: fase gasosa; s: substrato; l: líquido; Q: calor gerado; T: temperatura.



Fonte: adaptado de Hölker; Lenz, 2005.

Nota-se na Figura 6 a complexidade dos processos que ocorrem para que o fungo seja capaz de utilizar uma matéria orgânica como fonte de nutrientes. Para tanto, seus esporos devem se desenvolver em hifas até formar um tapete micelial, sendo que deste, hifas aéreas se projetam para a superfície, enquanto as hifas

penetrativas são responsáveis por adentrar o substrato. Na superfície apical destas hifas são produzidas diversas enzimas, capazes de quebrar os polímeros deste substrato em subunidades menores (monômeros), sendo então assimilados pelo fungo. Enquanto isso, outros processos estão ocorrendo, como trocas gasosas, consumo e produção de água e produção de calor, proveniente do metabolismo fúngico. Esse último é o responsável pela dificuldade existente em se controlar a temperatura durante a FES (HÖLKER; LENZ, 2005).

Assim, apesar de possuir algumas desvantagens quanto ao controle das condições do processo, a FES pode ser uma maneira muito viável para a produção de enzimas de interesse econômico, visto que utiliza substratos de baixo custo. Ainda, compreendendo-se a anátomo-fisiologia fúngica, mimetizar seu habitat natural pode aumentar a produção enzimática, além de gerar enzimas mais estáveis (MANAN; WEBB, 2017).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo geral foi a seleção de, pelo menos, uma linhagem de fungo filamentosos capaz de produzir L-asparaginase, selecionando as melhores condições de cultivo para a produção enzimática e caracterizar a atividade da enzima contida no extrato bruto.

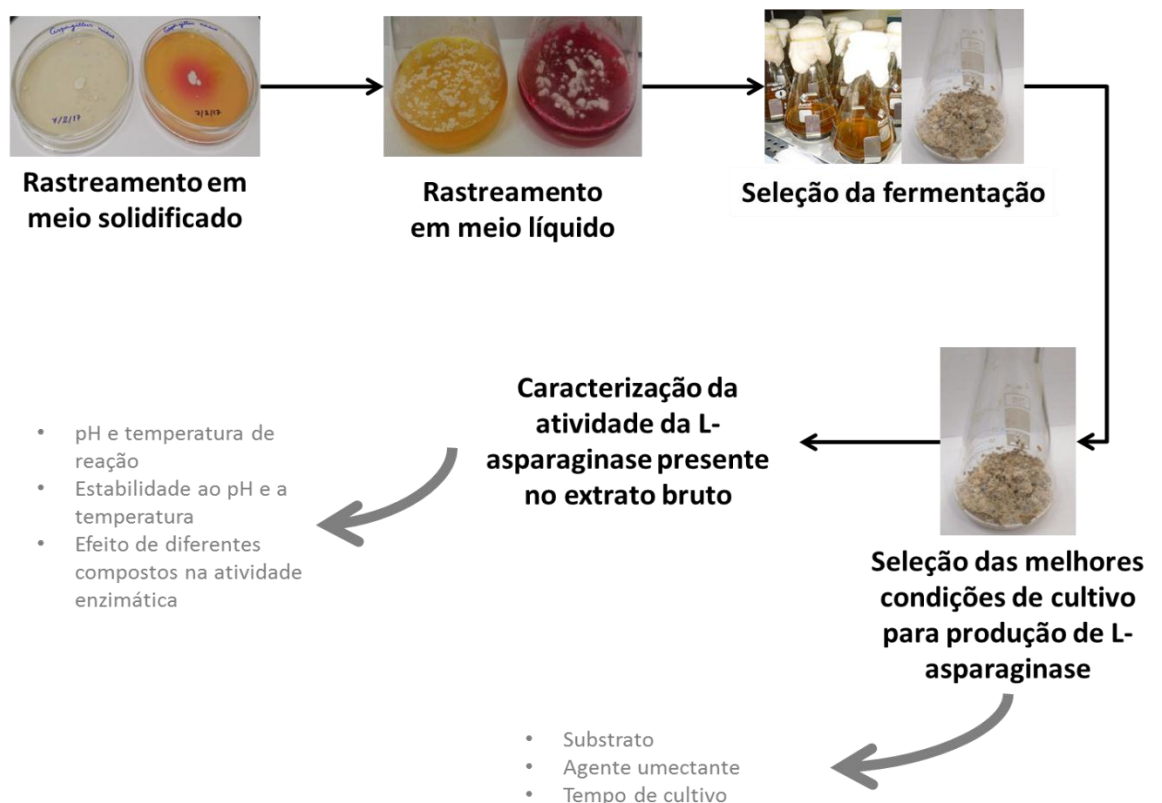
### **2.2 Objetivos específicos**

Os objetivos específicos foram: i) rastrear fungos produtores de L-asparaginase em meio sólido e líquido, ii) selecionar a linhagem de maior produção de L-asparaginase, iii) avaliar o melhor método de fermentação (fermentação em estado sólido ou submersa) para a produção da enzima, iv) selecionar a melhor condição de cultivo em FES para produção enzimática, v) caracterizar a atividade de L-asparaginase presente no extrato bruto.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos apresentados neste trabalho foram desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP- USP), sob orientação do Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães. Na Figura 7 são apresentados, simplificada, os experimentos realizados ao longo do trabalho.

**Figura 7.** Fluxograma simplificado dos experimentos realizados neste trabalho.



Fonte: autora.

#### 3.1 Microrganismos e manutenção das linhagens em laboratório

Todos os fungos utilizados neste projeto estão depositados na micoteca do Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP), Universidade de São Paulo (USP). Para o rastreamento foram utilizados os fungos *Aspergillus labruscus* (ITAL 22.223), *Aspergillus phoenicis*, *Paecilomyces variotii*, *Aspergillus caespitosus*, *Aspergillus*



*niveus*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus tamaris*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus thermomutatus*, *Fusarium lateritium*, *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* e *Metharizium anisopliae* IBCB 167.

Estas linhagens passaram por repiques periódicos em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultivo BDA (Batata Dextrose Ágar) inclinado, previamente autoclavados por 20 min (121°C; 1,5 atm) e incubados em estufa a 30°C por 3-5 dias, sendo em seguida utilizadas ou armazenadas a 4°C por até 30 dias.

### **3.2 Rastreamento em meio solidificado em placa para fungos produtores de L-asparaginase**

Inicialmente, para cada linhagem fúngica, foram preparadas duas placas de Petri (teste e controle) contendo 20 mL de meio Czapek Dox modificado (pH 6,2) em cada uma (GULATI; SAXENA; GUPTA, 1997). O ágar (2%; m/v) e o vermelho de fenol (0,009%; m/v) foram adicionados ao meio após o ajuste do pH. Nas placas controle não foram adicionados o vermelho de fenol e a L-asparagina, sendo usado NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (0,2 % m/v) como fonte de nitrogênio. Os meios foram previamente autoclavados por 30 min (121°C; 1,5 atm), vertidos em placas de Petri, deixados a temperatura ambiente para polimerização e em seguida utilizados.

Após a preparação dos meios, o inóculo foi feito depositando-se os esporos fúngicos, com o auxílio de uma alça de platina previamente esterilizada, no centro do meio contido na placa, com a mesma invertida. As placas foram incubadas a 30°C por 72 h, sendo os halos de hidrólise da L-asparagina e o diâmetro da colônia medidos a cada 24 h. Foram consideradas positivas as placas que apresentaram halo avermelhado ou rosado ao redor da colônia, indicando a ocorrência de hidrólise. O índice de hidrólise (IH) foi medido como descrito por DORIYA e KUMAR (2016):

$$\text{Índice de hidrólise} = \frac{\text{diâmetro do halo de hidrólise}}{\text{diâmetro da colônia}}$$

#### **3.2.1 Composição do meio Czapek Dox modificado**

- Glicose .....2 g
- L-asparagina ..... 10 g

- $\text{NH}_4\text{NO}_3$  .....2 g
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  .....1,52 g
- $\text{KCl}$  .....0,52 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  .....0,52 g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....0,001 g
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  .....0,001 g
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....0,001 g
- Água destilada q.s.p. ....1000 mL
- Ágar .....2%

### 3.3 Rastreamento em meio líquido para fungos produtores de L-asparaginase

Os fungos *Aspergillus niveus*, *Aspergillus thermomutatus*, *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* e *Fusarium lateritium*, para os quais foram obtidos os maiores índices de hidrólise, foram submetidos ao crescimento em caldo. A metodologia utilizada neste ensaio foi descrita por Mahajan et al. (2013). Foram utilizados 25 mL de caldo Czapek Dox modificado, como descrito anteriormente, em frascos Erlenmeyer de 125 mL. Para cada linhagem foram feitos dois cultivos, um contendo L-asparagina e outro contendo nitrato de amônio (controle), como fontes de nitrogênio. Os frascos contendo o meio foram previamente esterilizados em autoclave por 30 min (121°C; 1,5 atm). Após resfriamento dos meios, foi adicionado 1 mL da suspensão de esporos ( $10^6$  esporos/mL, para cada linhagem) e o cultivo foi mantido estático a 30°C, por 72 h.

### 3.4 Preparo da suspensão de esporos

As culturas utilizadas para o preparo da suspensão de esporos foram provenientes de repiques prévios, tendo sido armazenadas a 4°C até o momento de seu uso. No tubo contendo a cultura do fungo selecionado foram adicionados 10 mL de água destilada, previamente autoclavada (30 min, 121°C, 1,5 atm). Em seguida foi feita a raspagem da cultura com o auxílio de uma alça de platina previamente esterilizada. Após a raspagem, a suspensão contendo os esporos foi filtrada em gaze estéril e em seguida os esporos foram quantificados em contador de células

automático (BIORAD TC20). A suspensão de esporos foi utilizada para inocular os meios de fermentação.

### **3.5 Fermentação em Estado Sólido (FES)**

#### **3.5.1 Seleção do substrato**

As FES foram conduzidas utilizando diferentes subprodutos/produtos agroindustriais, isoladamente ou em misturas, como substratos. Os substratos isoladamente analisados foram o farelo de trigo, o farelo de arroz, a farinha de centeio, a soja moída, a casca de laranja, a casca de mandioca, a farinha de soja e flocos de aveia. Para tanto, em frascos Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 6 g de cada substrato separadamente e umedecidos com 3 mL de água de torneira ou solução de asparagina ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ), com exceção da soja moída que foi umedecida com 2 mL. Também foram testadas misturas de substratos, tendo como base o trabalho de Dias e colaboradores (2015). As seguintes misturas foram testadas: M1- farelo de trigo, soja moída e casca de laranja; M2- farelo de arroz, casca de laranja e soja moída; M3- casca de mandioca, farelo de trigo e soja moída; M4- farinha de soja, flocos de aveia e farelo de trigo; M5- farinha de centeio, flocos de aveia e casca de mandioca. A proporção de cada substrato na mistura foi mantida em 1:1:1 (m/m/m), totalizando 6 g em cada frasco. As misturas foram umidificadas com 3 mL de solução de L-asparagina (100 mM) ou água de torneira.

Os frascos contendo os substratos foram autoclavados por 30 min ( $121^\circ\text{C}$ ; 1,5 atm). Após resfriamento os substratos foram inoculados com  $10^7$  esporos/mL, e o cultivo foi mantido a  $30^\circ\text{C}$  por 120 h.

#### **3.5.2 Influência do agente umectante na produção enzimática**

Depois de selecionado o melhor substrato, a influência de diferentes soluções umectantes (Solução de L-asparagina  $100 \text{ mmol L}^{-1}$ , água de torneira, água destilada, sais Czapek Dox, sais SR, sais de Khanna, sais de Vogel e tampão fosfato  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) sobre a produção enzimática foi analisada. O substrato foi umedecido com 3 mL de cada solução, separadamente. Após a escolha da melhor solução umectante, foi analisada a influência da proporção desta solução na produção enzimática. Foi mantida a quantidade de 6 g de substrato, umedecidos com

diferentes proporções do agente umectante (1:0, 1:0,083, 1:0,167, 1:0,333, 1:0,5, 1:0,667, 1:0,833, 1:1, 1:1,167, 1:1,333, 1:1,5, 1:1,667, 1:1,833 e 1:2). Os frascos contendo os substratos foram autoclavados por 30 min (121°C; 1,5 atm), resfriados a temperatura ambiente e em seguida adicionados de 1 mL da suspensão de esporos ( $10^7$  esporos/mL). Os cultivos foram incubados a 30°C por 120 h.

### **3.5.3 Influência do tempo de cultivo na produção enzimática**

Para a análise da influência do tempo de cultivo na produção enzimática em FES, as culturas foram mantidas em condição estacionária em estufa com temperatura ajustada para 30°C por diferentes períodos (24 – 240 h).

### **3.5.4 Influência da proporção dos componentes da mistura de substratos na produção enzimática**

A influência de diferentes proporções dos componentes da mistura M1 (farelo de trigo, soja moída e casca de laranja), sobre a produção enzimática foi analisada. As proporções (m:m:m) usadas foram 1:1:1, 0,5:1:1, 1:0,5:1, 1:1:0,5, 2:1:1, 1:2:1 e 1:1:2, respectivamente. Em cada frasco Erlenmeyer de 125 mL, 6 g da mistura de substratos foram adicionadas, obedecendo-se as proporções estabelecidas, e umedecidas com 3 mL de solução de sais Czapek Dox. Os frascos contendo as misturas de substratos foram esterilizados em autoclave (121°C; 1,5 atm) por 30 min, resfriados a temperatura ambiente e inoculados com  $10^7$  esporos/mL. Os cultivos foram conduzidos a 30°C por 48 h.

### **3.5.5 Extração enzimática e obtenção do filtrado extracelular**

Após o período de fermentação em estado sólido, os cultivos foram adicionados de 50 mL de água destilada gelada, sob agitação a 140 rpm, a uma temperatura de 4°C, por 20 min (RANI; SUNDARAM; VASANTHA, 2012). Em seguida, os cultivos foram filtrados à vácuo para a separação do filtrado e do micélio. Os micélios foram descartados e os filtrados dialisados contra água destilada por 24 h, em câmara fria (4°C), sendo a água trocada três vezes durante este tempo. Após

a diálise, o filtrado livre de células foi utilizado para quantificar a atividade enzimática extracelular.

### **3.6 Fermentação Submersa (FSbm)**

Foram utilizados frascos Erlenmeyers de 125 mL aos quais foram adicionados 25 mL de caldo Czapek Dox modificado (descrito anteriormente), contendo L-asparagina como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono, com pH inicial ajustado para 8,5. Os frascos contendo o meio de cultivo foram autoclavados por 30 min (121°C; 1,5 atm), resfriados e adicionados da suspensão de esporos ( $10^7$  esporos/mL) do fungo selecionado. A fermentação foi mantida a 30°C, com 100 rpm de agitação, por 96 h.

Após este primeiro experimento, as influências das fontes de nitrogênio e de carbono, bem como do tempo de cultivo (24 a 240 h) sobre a produção da L-asparaginase em FSbm foram analisadas. Para a análise da influência da fonte de nitrogênio, a L-asparagina do meio Czapek Dox modificado foi substituída por L-prolina 2% (m/v). A influência da fonte de carbono na produção enzimática foi testada substituindo-se a glicose do meio por sacarose 1% (m/v), mantendo-se a L-asparagina como fonte de nitrogênio.

#### **3.6.1 Utilização de etapa pré-fermentativa na FSbm**

Para a FSbm foi também realizada uma etapa de indução do crescimento fúngico (etapa pré-fermentativa) antes da fermentação. A metodologia utilizada foi descrita por Dange e Peshwe (2015), com modificações. Para a etapa de indução do crescimento fúngico foram utilizados frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL do meio Czapek Dox modificado (descrito previamente), sendo a L-asparagina substituída por  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . O pH inicial foi ajustado para 8,0 e o inóculo de  $10^7$  esporos/mL, sendo os cultivos mantidos a uma temperatura de 30°C, com agitação de 100 rpm, por 24 h. Após o tempo de indução, o micélio foi separado do caldo por filtração à vácuo em ambiente estéril e inoculado em 25 mL do meio fermentativo Czapek Dox modificado (com L-asparagina), com pH inicial 8,5. Estes frascos foram então mantidos a uma temperatura de 30°C, com 100 rpm de agitação, por 96 h.

### 3.6.2 Influência da composição de diferentes meios de cultivo na produção enzimática em FSbm

Foi também analisada a influência da composição de diferentes meios de cultivo (Czapek, Czapek Dox Modificado, SR, Khanna e Vogel), como descritos abaixo, sobre a produção enzimática. Em frascos Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 25 mL de cada meio, separadamente, sendo o pH inicial ajustado para 6,5. A fonte de carbono utilizada foi glicose 0,2% (m/v). Os frascos contendo os meios foram autoclavados por 30 min (121°C; 1,5 atm), resfriados e adicionados de 1 mL da suspensão de esporos ( $10^7$  esporos/mL) do fungo selecionado. A fermentação foi mantida a 30°C, com 100 rpm de agitação por 72 h.

#### 3.6.2.1 Composição dos meios de cultivo

Meio Khanna (KHANNA; SUNDARI; KUMAR, 1995):

- Solução de sais de Khanna [20 x] .....5 mL
  - $\text{NH}_4\text{NO}_3$  .....2 g
  - $\text{KH}_2\text{PO}_4$  .....1,3 g
  - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....0,326 g
  - KCl .....0,098 g
  - $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  .....0,007 g
  - $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  .....0,0138 g
  - $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .....0,0066 g
  - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .....0,0062 g
  - Água destilada q.s.p. ....100 mL
- Extrato de levedura .....0,1 g
- Fonte de carbono
- Água destilada q.s.p. ....100 mL

Meio Vogel (VOGEL, 1964):

- Solução de sais de Vogel [50x] .....2 mL
  - Citrato de sódio pentahidratado .....1,5 g
  - $\text{KH}_2\text{PO}_4$  .....2,5 g
  - $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .....1,0 g
  - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....0,1 g

- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....0,05 g
- Água destilada q.s.p.....100 mL
- Solução de biotina.....20 µL
  - Biotina.....0,05 g
  - Etanol 50%.....100 mL
- Solução de traços de elementos.....0,5 mL
  - Ácido cítrico .  $\text{H}_2\text{O}$ .....5 g
  - $\text{Fe}_2(\text{NH}_4)_2 \cdot (\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .....1,0 g
  - $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....5 g
  - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .....0,25 g
  - $\text{H}_3\text{BO}_3$ .....0,05 g
  - $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .....0,05 g
  - $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....0,05 g
  - Clorofórmio.....1 mL
  - Água destilada q.s.p.....100 mL
- Fonte de carbono

Meio Czapek (WISEMAN, 1975):

- $\text{NaNO}_3$ .....2,0 g
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .....1,0 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....0,5 g
- $\text{KCl}$ .....0,5 g
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....0,01 g
- Extrato de levedura.....1,0 g
- Fonte de carbono
- Água destilada q.s.p.....1000 mL

Meio SR (RIZZATTI et al., 2001):

- Solução de sais SR [20x].....5,0 mL
  - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....0,24 g
  - $\text{KH}_2\text{PO}_4$  .....0,3 g
  - $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  .....1,0 g
  - Água destilada q.s.p. ....100 mL

- Peptona .....0,02 g
- Extrato de levedura.....0,45 g
- Fonte de carbono
- Água destilada q.s.p.....100 mL

### **3.6.3 Obtenção da enzima extracelular**

Após terem sido realizadas as fermentações, os cultivos foram filtrados à vácuo para a separação do filtrado e do micélio. Os micélios da FSbm foram utilizados para a obtenção da enzima intracelular. Os filtrados foram dialisados contra água destilada, por 24 h, em câmara fria (4°C), sendo a água trocada três vezes durante este tempo. Após a diálise, o filtrado livre de células foi utilizado para quantificar a atividade enzimática extracelular.

### **3.6.4 Obtenção da enzima intracelular**

Após os caldos fermentativos terem sido separados do micélio, estes foram submetidos à maceração, utilizando areia tratada com ácido clorídrico, para o rompimento das células, em banho de gelo. Em seguida foram adicionados 10 mL de água destilada e as amostras levadas então para a centrifugação à 4°C (12.000xg por 10 min). O sobrenadante foi utilizado como fonte da enzima intracelular e o pellet descartado.

## **3.7 Determinação da atividade enzimática da L-asparaginase**

A atividade da L-asparaginase foi avaliada descontinuamente pela formação de  $\beta$ -hidroxamato aspártico a partir de asparagina e hidroxilamina, de acordo com Drainas e colaboradores (DRAINAS; KINGHORN; PATEMAN, 1977). A mistura de reação foi constituída de 300  $\mu$ L de tampão Tris-HCl 20 mmol L<sup>-1</sup>, pH 8,0; 100  $\mu$ L de L-asparagina 100 mmol L<sup>-1</sup>; 100  $\mu$ L de hidroxilamina 1M e 500  $\mu$ L da amostra enzimática. A mistura foi incubada em banho-maria a 37°C, por 15 min, sendo a reação interrompida com adição de 250  $\mu$ L de solução constituída de HCl (2,4%), cloreto férrico (10%) e TCA (5%). O branco foi preparado como descrito acima, entretanto a amostra foi adicionada após a solução de parada (ácido clorídrico e



cloreto férrico). A reação enzimática entre o hidroxamato aspártico e cloreto férrico produz uma coloração avermelhada, cuja absorbância foi medida em espectrofotômetro a 500 nm. A curva analítica foi feita utilizando-se uma solução de  $\beta$ -hidroxamato aspártico (0,1  $\mu\text{mol/mL}$  a 3  $\mu\text{mol/mL}$ ). Uma unidade de atividade de L-asparaginase (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar um  $\mu\text{mol}$  de  $\beta$ -hidroxamato aspártico por minuto, nas condições de ensaio. A atividade específica da L-asparaginase foi expressa como  $\mu\text{mol}$  de  $\beta$ -hidroxamato aspártico formado por minuto por miligrama de proteína.

### **3.8 Quantificação de proteínas**

A quantificação de proteínas foi feita de acordo com a metodologia de Bradford (1976), a qual baseia-se na interação entre o Coomassie Brilliant Blue G-250 com aminoácidos contendo grupos aromáticos das proteínas, formando um complexo colorido que possui máxima absorção de cor na faixa de 595 nm. A curva analítica foi feita utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão, variando sua concentração de 1-20  $\mu\text{g}$ . A concentração proteica foi expressa como mg de proteína por mL de amostra.

### **3.9 Caracterização da atividade da L-asparaginase presente no extrato bruto**

#### **3.9.1 Influência do pH na atividade e na estabilidade enzimática**

Para a determinação do pH ótimo aparente de reação foi utilizada uma faixa de pH de 3 a 10, sendo todos os tampões preparados na concentração de 20  $\text{mmol L}^{-1}$ . Foram utilizados os seguintes tampões: tampão ácido cítrico (pH 3-5), tampão acetato de sódio (pH 5-7), tampão Tris-HCl (pH 7-9) e tampão glicina (pH 9-10). A reação foi realizada seguindo o protocolo descrito no item 3.7, sendo o tampão Tris-HCl, normalmente utilizado, substituído pelos tampões mencionados. Para a determinação da estabilidade ao pH da L-asparaginase, as amostras do extrato bruto foram incubadas em diferentes valores de pH (3-10), em banho de gelo, utilizando-se os mesmos tampões descritos acima na concentração de 3  $\text{mmol L}^{-1}$ . As amostras foram adicionadas na proporção 1:1 (v/v) e incubadas por diferentes

períodos (30 min, 60 min e 120 min). A atividade enzimática residual foi determinada como descrito no item 3.7.

### **3.9.2 Influência da temperatura na atividade e na estabilidade enzimática**

Para a determinação da temperatura ótima aparente de atividade, a reação enzimática foi conduzida em diferentes temperaturas, de 30°C a 80°C, com variação de 5°C. A reação foi realizada de acordo com o protocolo descrito previamente. Para a determinação da termoestabilidade da L-asparaginase, as amostras do extrato bruto foram incubadas em diferentes temperaturas (30°C, 40°C, 50°C e 65°C) por diferentes períodos (5-50 min), sendo retiradas alíquotas em 5, 10, 30 e 50 min para determinação da atividade residual como descrita no item 3.7.

### **3.9.3 Efeito de diferentes compostos na atividade L-asparaginásica**

A influência de diferentes compostos sobre a atividade enzimática foi analisada adicionando-se sais ( $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ), EDTA, ureia e  $\beta$ -mercaptoetanol na concentração final de 1 mmol L<sup>-1</sup>, detergentes (SDS concentração final de 1 mmol L<sup>-1</sup> e Tween-20 0,01% (v/v)), e solventes orgânicos (1%, v/v) (acetona, acetonitrila, butanol, etanol, isopropanol e metanol). A reação foi conduzida como descrito no item 3.7.

## **3.10 Análise dos experimentos**

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Para as análises estatísticas foi utilizado o programa BioEstat 5.0<sup>®</sup>, considerando-se três repetições. Foi feita análise de variância e teste de Tukey para a comparação das médias, com intervalo de confiança de 95%.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Rastreamento em meio solidificado em placa para fungos produtores de L-asparaginase

Como pode ser observado na Tabela 1, os fungos *Aspergillus niveus*, *Fusarium lateritium*, *Aspergillus thermomutatus* e *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* foram os que possibilitaram a obtenção dos maiores índices de hidrólise, respectivamente, considerando 72 h de crescimento, indicando seus potenciais para a produção de L-asparaginase. Em contrapartida, dos 12 fungos testados, não foram observados os crescimentos de *Aspergillus labruscus*, *Aspergillus caespitosus*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus tamaritii*, *Aspergillus parasiticus* e *Metharizium anisopliae* IBCB167. Para os fungos *Aspergillus phoenicis* e *Paecilomyces variotii*, os índices de hidrólise foram menores que 1.

**Tabela 1.** Índices de hidrólises (IH) obtidos em meio solidificado contendo L-asparagina (1%) para diferentes espécies de fungos filamentosos.

FUNGO	IH 24 h	IH 48 h	IH 72 h
<i>Aspergillus labruscus</i>	-	-	-
<i>Aspergillus phoenicis</i>	-	-	0,625
<i>Paecilomyces variotii</i>	-	0,5	0,714
<i>Aspergillus caespitosus</i>	-	-	-
<i>Aspergillus niveus</i>	1,67	2,125	<b>2,8</b>
<i>Aspergillus aculeatus</i>	-	-	-
<i>Aspergillus tamaritii</i>	-	-	-
<i>Aspergillus parasiticus</i>	-	-	-
<i>Aspergillus thermomutatus</i>	-	1,4	<b>1,5</b>
<i>Fusarium lateritium</i>	-	-	<b>1,82</b>
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	0,78	1,3	<b>1,33</b>
<i>Metharizium anisopliae</i> IBCB167	-	-	-

(-) não houve crescimento

Condições: meio Czapek Dox modificado, suplementado com vermelho de fenol 0,009%; 30°C; 72 h de cultivo.

Fonte: autora.

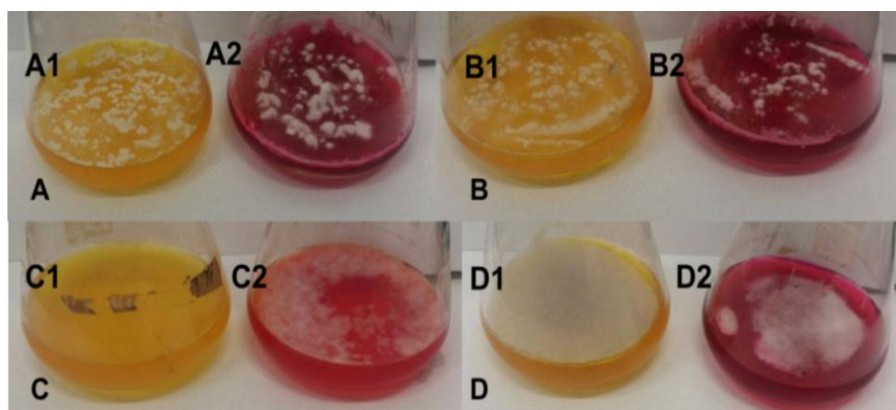
A utilização de vermelho de fenol para o rastreamento de microrganismos produtores de L-asparaginase e outras amidohidrolases (L-glutaminase e urease) é amplamente descrita na literatura. Podemos citar como exemplos os trabalhos de Sarquis et al. (2004), Shrivastava et al. (2010), Vivekanandha, Sankareswaran e Prabhavathi (2013), Rani, Sundaram e Vasantha (2012), Vipina e Chitra (2016), Bedaiwy et al. (2016), Hermanto e Ting (2016), e Vimal e Kumar (2017), os quais utilizaram o vermelho de fenol como indicador para a seleção de fungos produtores de L-asparaginase. Ainda, Raja et al. (2016) utilizaram o vermelho de fenol para a seleção de actinobactérias marinhas produtoras de L-asparaginase.

Ainda que *A. tamarii* tenha sido negativo para a produção de L-asparaginase no teste em placa (Tabela 1), já foi reportada a produção desta enzima por este fungo no trabalho de Bedaiwy et al. (2016). No trabalho de Doriya e Kumar (2016) o maior índice de hidrólise (1,56) foi obtido com o isolado *Curvularia* sp. e, conseqüentemente, a maior atividade enzimática. Já no presente estudo, o maior índice de hidrólise obtido foi de 2,8 para o fungo *A. niveus*. Isto pode ser um indício positivo para uma maior produção de L-asparaginase quando o fungo for utilizado no processo de fermentação, visto que há correlação entre o diâmetro da zona de hidrólise e a atividade enzimática (GULATI; SAXENA; GUPTA, 1997).

#### **4.2 Rastreamento em meio líquido para fungos produtores de L-asparaginase**

Considerando os maiores valores de IH obtidos, os fungos *A. niveus*, *A. thermomutatus*, *F. lateritium* e *R. microsporus* var. *microsporus* foram cultivados em caldo Czapek Dox modificado por 72 h, a 30°C em condição estacionária (Figura 8).

**Figura 8.** Rastreamento em caldo Czapek Dox modificado. A1: *A. niveus* controle; A2: *A. niveus* teste; B1: *A. thermomutatus* controle; B2: *A. thermomutatus* teste; C1: *F. lateritium* controle; C2: *F. lateritium* teste; D1: *R. microsporus* var. *microsporus* controle; D2: *R. microsporus* var. *microsporus* teste.



Fonte: autora.

A coloração vermelha observada para os cultivos apresentados na Figura 8 pode ser um indicativo de produção de L-asparaginase, a qual atua sobre a asparagina presente no meio, liberando amônia. A amônia, por sua vez, alcaliniza o meio levando a viragem do indicador (vermelho de fenol) de amarelo (pH ácido) para vermelho (pH básico). Observa-se ainda que os cultivos de *A. niveus*, *A. thermomutatus* e *R. microsporus* var. *microsporus* proporcionaram uma coloração rosa mais intensa em comparação com *F. lateritium*. Entretanto, Mahajan et al. (2013) discutiram em seu estudo a dificuldade de diferenciar, no teste em caldo, linhagens com baixa produção de L-asparaginase daquelas nas quais a produção é ausente. Isto porque, produções mais baixas da enzima levam o meio a uma coloração menos rosa, mas próxima ao vermelho/alaranjado, que pode ser facilmente confundida com a tonalidade do meio sem hidrólise de asparagina (amarelo/alaranjado). Considerando que a única fonte de nitrogênio disponível era a asparagina espera-se que, para se desenvolver, o fungo precise produzir L-asparaginase. Porém, não se pode descartar a possibilidade de outro composto, resultante do próprio metabolismo fúngico, ter causado a viragem do indicador por alcalinizar o meio.

Soler (2015) observou em seu estudo a falta de correlação entre o rastreamento em meio sólido e a quantificação enzimática em meio líquido para leveduras produtoras de L-asparaginase. Isto porque leveduras que formaram halos

no teste em placa, não produziram, em meio líquido, quantidades detectáveis de L-asparaginase pelo método da hidroxilamina. O contrário também ocorreu, já que algumas leveduras que produziram a enzima em meio líquido, não formaram halos no teste em placa.

Desta maneira, por apresentar o maior índice de hidrólise no teste em placa e uma coloração rosa intensa no rastreamento em meio líquido, o fungo *Aspergillus niveus* foi selecionado para a continuidade do estudo.

### 4.3 Produção de L-asparaginase em FSbm

Foi avaliada a produção enzimática em FSbm sob diferentes condições de cultivo, variando-se fonte de nitrogênio, fonte de carbono, meio de cultivo, com ou sem etapa pré-fermentativa. Apesar de o ensaio qualitativo em caldo ter indicado uma possível produção de L-asparaginase em meio líquido, não foi detectada atividade L-asparaginolítica extracelular a partir da FSbm, apesar do desenvolvimento fúngico nesta condição (dados não apresentados). Considerando que para a maioria dos microrganismos a produção de L-asparaginase é intracelular (CACHUMBA et al., 2016), foi avaliada a atividade enzimática em extratos intracelulares. Todavia, também não foi detectada atividade enzimática de L-asparaginase (dados não apresentados).

Uma explicação para não ter sido detectada atividade de L-asparaginase em FSbm é o fato de que o método do ácido L-aspartico  $\beta$ -hidroxamato (AHA), utilizado para a quantificação da atividade de L-asparaginase neste trabalho, subestima a atividade L-asparaginolítica. Magri et al. (2018) analisaram diferentes métodos colorimétricos para determinação da atividade da L-asparaginase, dentre eles o método AHA. Os autores constataram que o método AHA subestima a atividade enzimática para todas as concentrações de L-asparaginase analisadas. Ainda, para o método AHA, a atividade enzimática de L-asparaginase foi 67% menor do que a determinada por HPLC, através da quantificação de L-Asp. Desta maneira, o método AHA pode não ter sido capaz de detectar a atividade enzimática da L-asparaginase no filtrado obtido da FSbm, uma vez que a produção da enzima pelo fungo pode ter sido baixa.

A quantificação de L-Asp pelo método AHA depende de duas reações. Na primeira, a L-asparaginase irá hidrolisar a L-asparagina, gerando o L-Asp como produto. Na segunda, o L-Asp irá se complexar com a hidroxilamina para formar o

ácido L-aspártico  $\beta$ -hidroxamato, que então será quantificado. O problema é que estas duas reações não ocorrem na mesma razão e, como a atividade de L-asparaginase é calculada pelo tempo de reação, os valores obtidos serão inferiores aos obtidos através de outros métodos. Além disso, a L-asparaginase é capaz de utilizar o AHA como substrato, ocasionando a reação reversa, liberando L-Asp e hidroxilamina, o que levará a diminuição da atividade enzimática, visto que diminuirá os níveis de L-Asp (MAGRI et al., 2018).

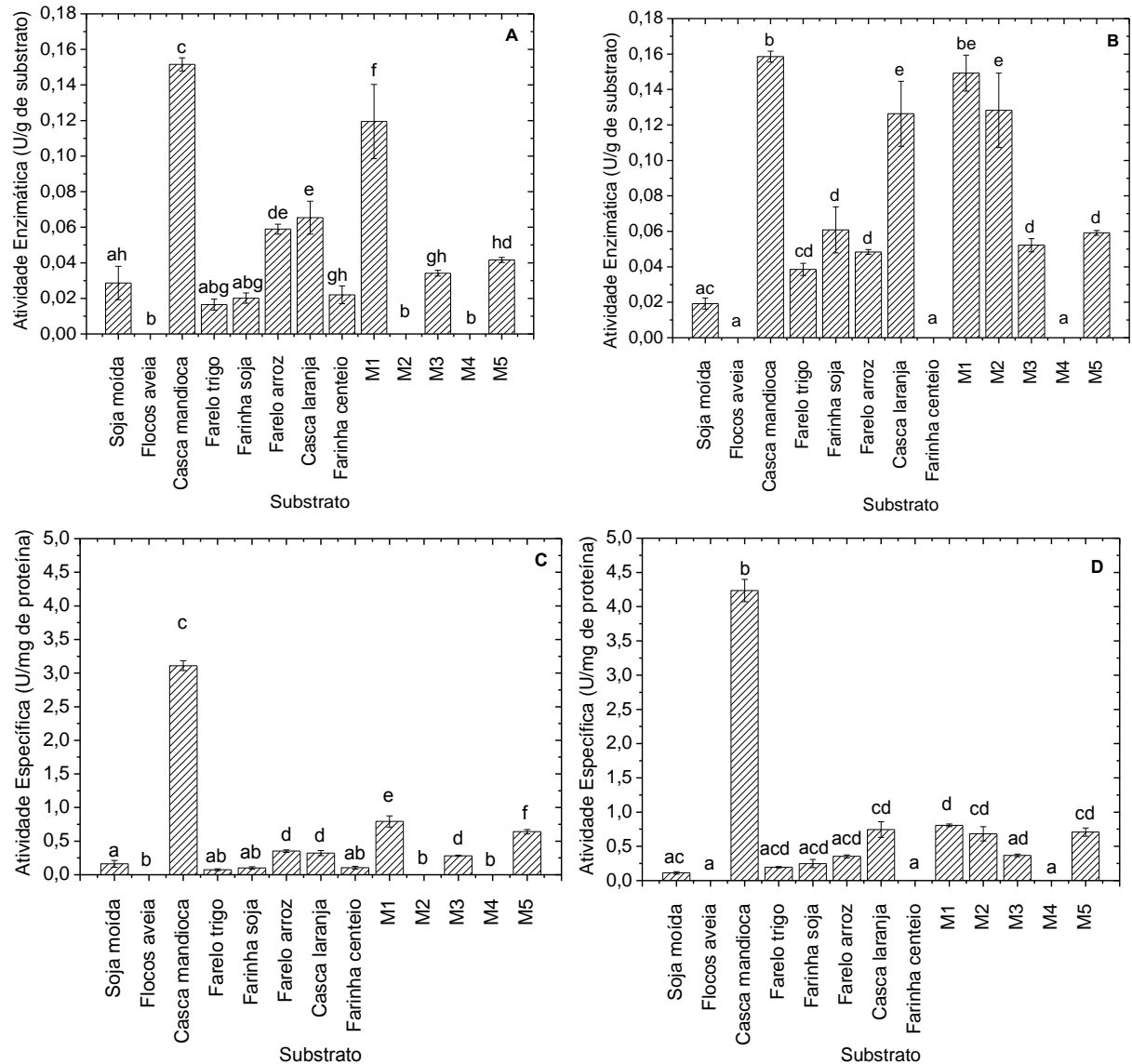
Por outro lado, Magri et al. (2018) também discutiram em seu estudo que o método AHA é ideal para a quantificação de atividade de L-asparaginase em extratos brutos, uma vez que não sofre interferência de amônia residual, ao contrário do método de Nessler.

#### **4.4 Produção de L-asparaginase em FES**

Ainda que a L-asparaginase seja produzida, na maioria das vezes, por FSbm, já é amplamente descrito na literatura as vantagens de se usar FES, pois este tipo de fermentação necessita de um baixo custo de investimento, não gera grandes quantidades de efluente de águas residuais, além de ter um maior rendimento de produção quando comparado com a FSbm (DORIYA et al., 2016). Além disso, como foi citado anteriormente, o depósito de resíduos agroindustriais vem aumentando radicalmente ao longo dos anos, sendo a FES uma alternativa ecologicamente sustentável para solucionar este problema (YAZID et al., 2017).

Sendo assim, como na FSbm não foi possível detectar atividade de L-asparaginase, diversos substratos foram testados na FES, objetivando a maior produção de L-asparaginase. Como pode ser observado na Figura 9, além de substratos isolados, foram utilizadas misturas de substratos.

**Figura 9.** Influência de diferentes subprodutos agroindustriais usados como substrato na produção de L-asparaginase por *A. niveus* em FES umidificados (1:0,5; m/v) com solução de asparagina (A e C) ou água de torneira (B e D). Os cultivos foram mantidos a 30°C por 120 h. M1- farelo de trigo, soja moída e casca de laranja; M2- farelo de arroz, casca de laranja e soja moída; M3- casca de mandioca, farelo de trigo e soja moída; M4- farinha de soja, flocos de aveia e farelo de trigo; M5- farinha de centeio, flocos de aveia e casca de mandioca. Médias seguidas por letras minúsculas iguais são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ).



Fonte: autora.

Como apresentado nas Figuras 9A e 9C, dentre os substratos umidificados com solução de asparagina destacam-se, em termos de produção enzimática, os cultivos contendo casca de mandioca (0,15 U/g de substrato e 3,11 U/mg de proteína) e a mistura M1 (0,12 U/g de substrato e 0,79 U/mg de proteína). Em contrapartida, os substratos que induziram a produção das menores quantidades de



L-asparaginase foram o farelo de trigo, a farinha de soja, a soja moída, a farinha de centeio, e as misturas M3 e M5. Já o substrato flocos de aveia e as misturas M2 e M4 não proporcionaram produção enzimática quando umidificados com solução de asparagina, indicando que tanto a composição do substrato, quanto a composição do agente umectante interferem na produção da enzima.

Destaca-se ainda que, a atividade enzimática e específica obtida com o substrato casca de mandioca, umidificado com solução de asparagina, difere estatisticamente de todas as outras. O mesmo ocorre com a atividade enzimática obtida com a mistura M1, que difere estatisticamente das demais. Por outro lado, a atividade enzimática obtida com o substrato farelo de arroz é estatisticamente igual à obtida com casca de laranja e a obtida com a mistura M5, porém, a atividade enzimática obtida com casca de laranja difere estatisticamente da obtida com a mistura M5. Já os substratos soja moída, farelo de trigo, farinha de soja, farinha de centeio, e as misturas M3 e M5, também proporcionaram médias estatisticamente iguais. Ainda, as médias obtidas com farelo de trigo e farinha de soja são também consideradas iguais às médias obtidas com o uso de flocos de aveia, e as misturas M2 e M4.

A Figura 9B por sua vez, ilustra a influência dos diferentes substratos na produção de L-asparaginase quando umidificados com água de torneira. Nesta figura é possível observar que os substratos casca de mandioca (0,16 U/g de substrato e 4,24 U/mg de proteína), as misturas M1 (0,15 U/g de substrato e 0,81 U/mg de proteína) e M2 (0,13 U/g de substrato e 0,68 U/mg de proteína) e casca de laranja (0,13 U/g de substrato e 0,74 U/mg de proteína) possibilitaram a maior produção de L-asparaginase. Ao contrário, os substratos soja moída, farelo de trigo, farinha de soja, farelo de arroz, e as misturas M3 e M5 proporcionaram as menores atividades enzimáticas quando umedecidos com água de torneira. Já os substratos flocos de aveia, farinha de centeio e a mistura M4 não possibilitaram produção de L-asparaginase quando umedecidos com água de torneira, mostrando, mais uma vez, a importância que a composição do substrato e do agente umectante desempenha na produção da enzima.

É possível observar ainda que as atividades enzimáticas obtidas com o uso de casca de mandioca e da mistura M1 são estatisticamente iguais, sendo a média obtida com a mistura M1 estatisticamente igual às médias de atividade enzimática obtidas com a mistura M2 e casca de laranja. Ainda, as atividades enzimáticas

obtidas com soja moída, farelo de trigo, farinha de soja, farelo de arroz, e as misturas M3 e M5 são estatisticamente iguais, sendo a atividade enzimática proporcionada por soja moída também estatisticamente igual às médias obtidas com flocos de aveia, farinha de centeio e a mistura M4. Assim, é possível afirmar que o substrato casca de mandioca e a mistura M1 foram os que possibilitaram a maior produção enzimática de L-asparaginase, quando umidificados com água de torneira.

Sendo assim, dentre os substratos usados, apenas casca de mandioca e as misturas M1 e M2 foram escolhidos para dar continuidade aos estudos. Apesar da atividade enzimática obtida com casca de laranja ser estatisticamente igual às obtidas com as misturas M1 e M2, este substrato produz um filtrado extracelular de coloração marrom muito escura, o que pode interferir na determinação da atividade enzimática.

Os substratos utilizados na FES servem, não só como fonte de nutrientes, fornecendo os componentes necessários para o desenvolvimento do microrganismo, mas também como suporte para o crescimento destes. Geralmente estes substratos são subprodutos agroindustriais e diferem entre si na sua composição (MANAN; WEBB, 2017). Dentre os subprodutos agroindustriais utilizados neste projeto, os farelos são ricas fontes de fibras, mas também possuem em sua composição, minerais, vitaminas, tiamina, folato e compostos fenólicos (STEVENSON et al., 2012). O farelo é a parte do grão que compreende os revestimentos externos, a camada de aleurona e remanescentes de endosperma amiláceo (MAES; DELCOUR, 2002). Por exemplo, o farelo de trigo possui em sua composição 58% de carboidratos não-amiláceos, 19% de amido, e 18% de proteína bruta (SUN et al., 2007). Os carboidratos são hidrolisados pelos fungos (e outros microrganismos) em açúcares menores, mais facilmente assimilados. Por outro lado, a soja é rica em proteínas, as quais são importantes fontes de nitrogênio, composto essencial para o crescimento dos microrganismos. Já a casca de laranja é rica em açúcares solúveis, os quais são importantes fontes de carbono, assim como os substratos amiláceos, e também facilmente assimilados pelos microrganismos (MANAN; WEBB, 2017). Por sua vez, a casca de mandioca é constituída majoritariamente de material lingocelulósico e pobre em proteínas (5,5% aproximadamente) (KORTEI; DZOGBEFIA; OBODAI, 2014; MORGAN; CHOCT, 2016) Desta maneira, a composição do substrato utilizado na FES é um fator determinante, o qual irá

interferir na produção da enzima que se almeja obter, como pôde ser observado pelos resultados apresentados até o momento.

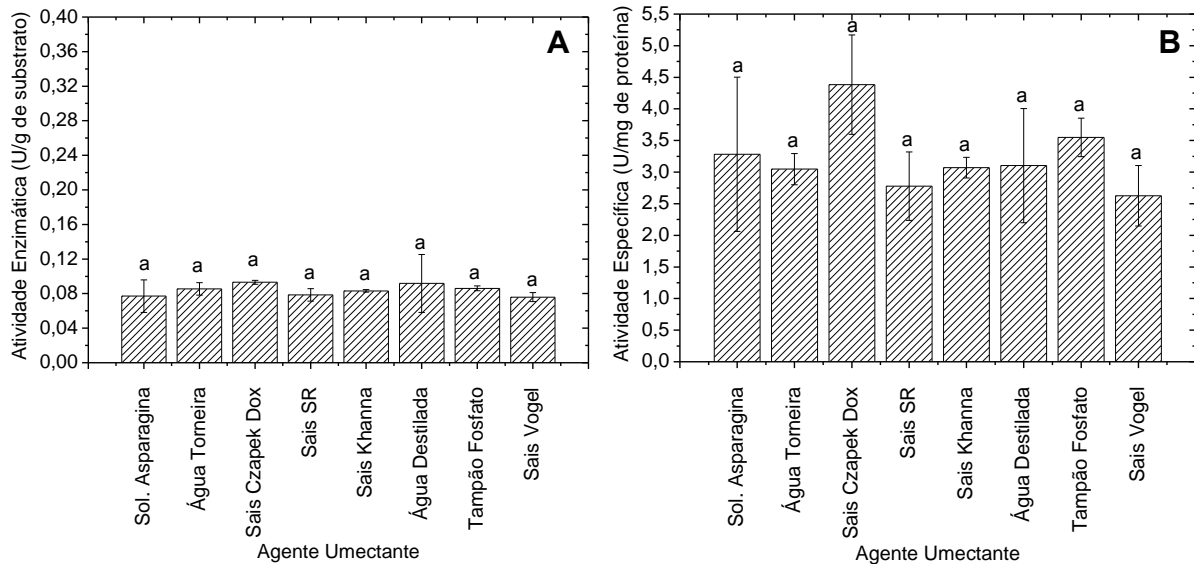
A utilização de FES para a produção de L-asparaginase já foi reportada na literatura em diversos estudos. Por exemplo, Dias et al. (2015) utilizaram uma mistura de farelo de trigo, soja moída e semente de algodão moída para o fungo *Aspergillus niger*, que resultou em uma produção de 89,22 U/g. Mohan Kumar, Ramasamy e Manonmani (2013) utilizaram farelo de trigo como substrato para *Cladosporium* sp. e obtiveram atividade específica de 83,3 U/mg de proteína, após a purificação. No trabalho de Ghosh et al. (2013) foi utilizado o substrato torta vegetal de óleo de coco para a produção de L-asparaginase pela bactéria *Serratia marcescens*, sendo obtidas 3,87 U/gds (grama de substrato seco). Doriya e Kumar (2018) por sua vez, obtiveram produção de L-asparaginase com a utilização de uma torta vegetal composta de sementes de algodão, farelo de trigo e casca de grama vermelha, com o fungo *Aspergillus* sp. Varalakshmi e Raju (2013) utilizaram farinha de semente de Bajra como substrato para o fungo *Aspergillus terreus*, obtendo uma produção de L-asparaginase de 273,3 U/gds.

#### **4.5 Influência de diferentes agentes umectantes na produção de L-asparaginase em FES**

A influência de diferentes agentes umectantes sobre a produção de L-asparaginase foi também analisada. Nas Figuras 10, 11 e 12 pode-se observar a produção de L-asparaginase obtida quando utilizados diferentes agentes umectantes para os substratos casca de mandioca, e as misturas M1 e M2, respectivamente.

A produção enzimática obtida utilizando o substrato casca de mandioca, que pode ser observada na Figura 10, foi semelhante para todos os agentes umectantes utilizados. A análise estatística confirma que a diferença entre as médias das atividades obtidas não foi significativa. Também é observado que, as atividades enzimáticas obtidas com os diferentes agentes umectantes para o substrato casca de mandioca são consideravelmente menores em relação às obtidas com o substrato M1 (Figura 10).

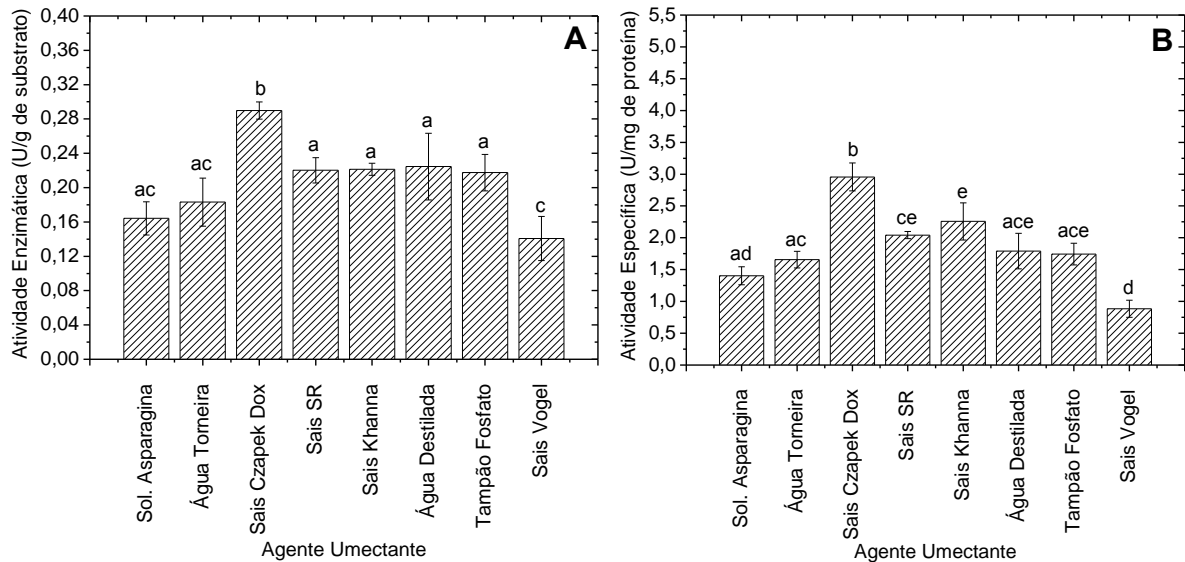
**Figura 10.** Influência de diferentes agentes umectantes (1:0,5; m/v) sobre a produção de L-asparaginase em FES, utilizando casca de mandioca como substrato, por *A. niveus*. Os cultivos foram mantidos a 30°C por 120 h. A: atividades enzimáticas; B: atividades específicas. Médias seguidas por letras minúsculas iguais são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).



Fonte: autora.

Já na Figura 11, onde se observa a produção enzimática obtida com a mistura M1, nota-se que o agente umectante sais Czapek Dox foi o que proporcionou maior atividade enzimática (0,30 U/g de substrato) e específica (3 U/mg de proteína) para este substrato. Depois dos sais Czapek Dox, os agentes umectantes sais SR (0,22 U/g de substrato e 2,04 U/mg de proteína), sais de Khanna (0,22 U/g de substrato e 2,26 U/mg de proteína), água destilada (0,22 U/g de substrato e 1,79 U/mg de proteína) e tampão fosfato (0,22 U/g de substrato e 1,74 U/mg de proteína) foram os que possibilitaram maior produção de L-asparaginase. Ademais, a menor produção enzimática foi obtida com solução de asparagina, água de torneira e sais de Vogel.

**Figura 11.** Influência de diferentes agentes umectantes (1:0,5; m/v) sobre a produção de L-asparaginase em FES por *A. niveus* utilizando a mistura M1 como substrato. Os cultivos foram mantidos a 30°C por 120 h. A: atividades enzimáticas; B: atividades específicas. Médias seguidas por letras minúsculas iguais são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

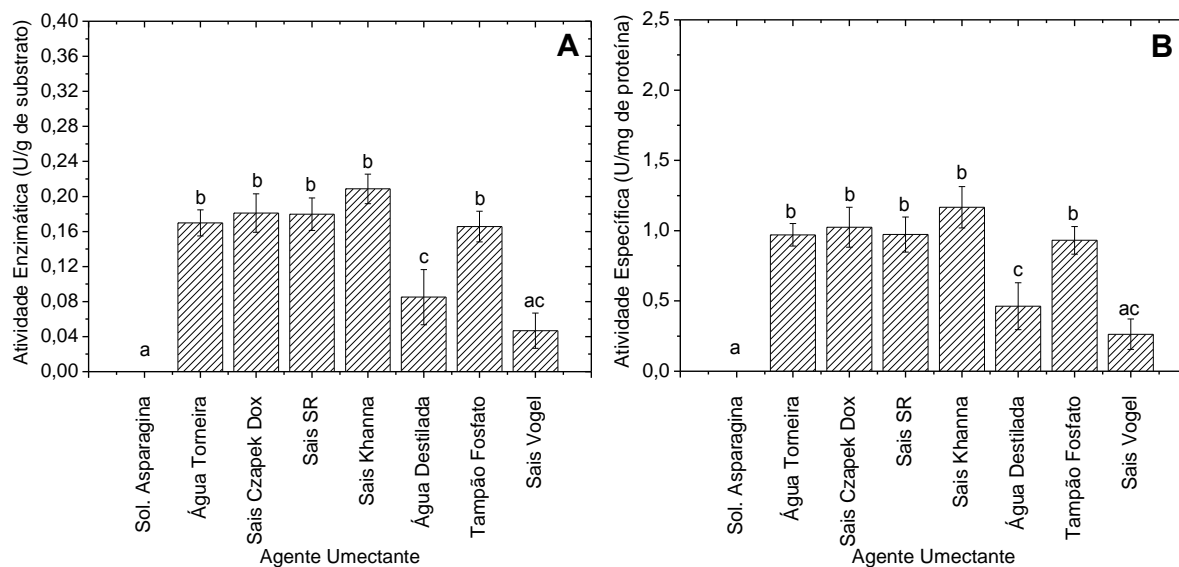


Fonte: autora.

Assim, a atividade enzimática obtida com o substrato M1 umidificado com sais Czapek Dox, foi 2 vezes maior do que a obtida com esse substrato umedecido com sais de Vogel.

Por sua vez, a Figura 12 apresenta os resultados das atividades enzimáticas e específicas obtidas com o uso da mistura M2 como substrato, umedecido com diferentes agentes umectantes. Observa-se que os agentes umectantes que proporcionaram maior produção de L-asparaginase por *A. niveus* foram, respectivamente, sais de Khanna (0,21 U/g de substrato e 1,17 U/mg de proteína), sais Czapek Dox (0,18 U/g de substrato e 1,02 U/mg de proteína), sais SR (0,18 U/g de substrato e 0,97 U/mg de proteína), água de torneira (0,17 U/g de substrato e 0,97 U/mg de proteína) e tampão fosfato (0,17 U/g de substrato e 0,93 U/mg de proteína). Já as menores produções enzimáticas foram obtidas com o uso de água destilada e sais de Vogel, sendo que a solução de asparagina não proporcionou produção de L-asparaginase nas condições testadas.

**Figura 12.** Influência de diferentes agentes umectantes (1:0,5; m/v) sobre a produção de L-asparaginase em FES por *A. niveus* utilizando a mistura M2 como substrato. Os cultivos foram mantidos a 30°C por 120 h. A: atividades enzimáticas; B: atividades específicas. Médias seguidas por letras minúsculas iguais são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).



Fonte: autora.

Após a análise dos resultados foi possível definir a solução de sais Czapek Dox como o agente umectante mais adequado para a produção de L-asparaginase em FES, pelo fungo *A. niveus*. Este foi o agente umectante que mais se destacou, em termos de produção enzimática, para os três substratos analisados (casca de mandioca, e as misturas M1 e M2). Também foi possível notar que o uso da mistura M1 como substrato proporcionou as maiores produções enzimáticas, não só com sais Czapek Dox, mas também com os outros agentes umectantes. A mistura M1, umidificada com sais Czapek Dox, propiciou produção enzimática 1,6 vezes maior que a obtida com M2 e 3 vezes maior do que a obtida com casca de mandioca, utilizando o mesmo agente umectante.

Como já comentado, os resíduos agroindustriais utilizados na FES, além de servirem como suporte para o crescimento fúngico, também fornecem nutrientes (fontes de carbono e nitrogênio) necessários para o seu desenvolvimento. Entretanto, dependendo das condições, faz-se necessário utilizar suplementos, como ferro, fósforo, zinco, magnésio, entre outros, para que todos os nutrientes sejam disponibilizados ao microrganismo (SOCCOL et al., 2017).

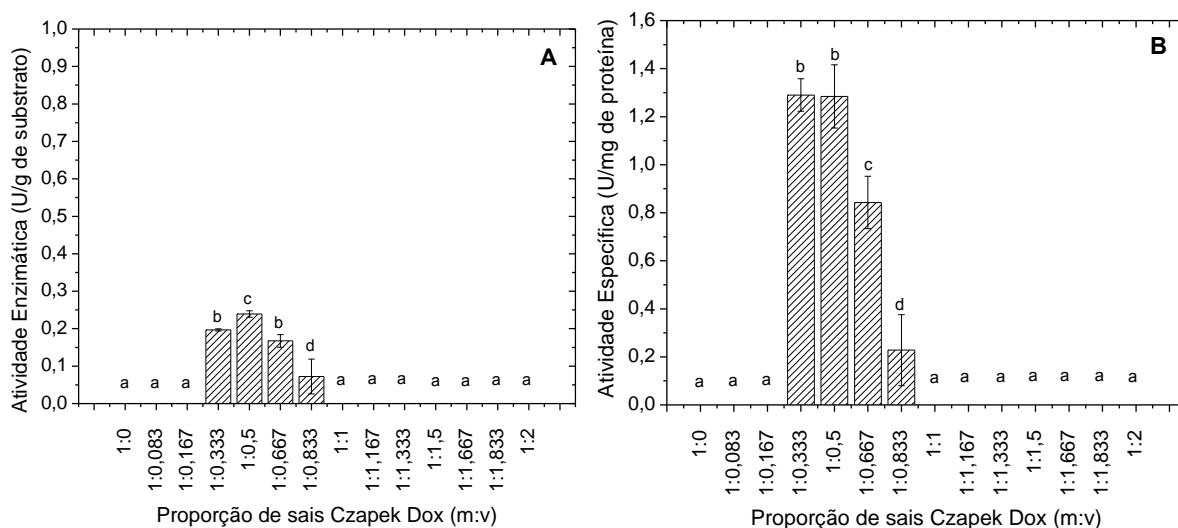
Dentre os agentes umectantes testados, sais Czapek Dox e sais de Khanna são os que possuem a maior variedade de sais, diferindo na concentração de alguns deles. Além disso, a água de torneira também é rica em diversos sais, presentes em pequenas quantidades, o que favorece o crescimento de microrganismos e sua produção enzimática (GONÇALVES; JORGE; GUIMARÃES, 2016). Isto indica, juntamente com os resultados apresentados nas Figuras 11 e 12, que não só os sais presentes na solução umectante, mas também a concentração em que estão presentes, interferem na produção enzimática.

Ademais, a composição do substrato utilizado com o agente umectante também parece desempenhar papel importante na produção enzimática, como foi discutido anteriormente, já que a única diferença entre as misturas M1 e M2 é que na M1 está presente o farelo de trigo e na M2 o farelo de arroz. Apesar de se tratarem de dois farelos e sua composição ser parecida, a concentração dos componentes constituintes pode diferir entre os dois, interferindo na produção da enzima de interesse. Então, fica claro que a combinação substrato + agente umectante atua como importante condição para a produção de enzimas de interesse.

Assim, após a análise dos resultados obtidos, foi selecionada a mistura M1 como substrato, pois esta proporcionou a maior produção enzimática com todos os agentes umectantes utilizados, comparado com a produção enzimática obtida com os mesmo agentes umectantes, para os substratos casca de laranja (Figura 10) e mistura M2 (Figura 12). Quanto ao agente umectante, os sais Czapek Dox foi o selecionado, pois propiciou a maior atividade enzimática utilizando a mistura M1 como substrato.

Então, após a seleção de sais Czapek Dox como agente umectante, a influência da sua proporção em relação ao substrato M1, sobre a produção enzimática foi analisada, como ilustrado na Figura 13. Observa-se que há grande influência da proporção do agente umectante na produção de L-asparaginase, visto que apenas 4 (1:0,333, 1:0,5, 1:0,667 e 1:0,833) das 14 proporções testadas possibilitaram a produção enzimática.

**Figura 13.** Influência da proporção de sais Czapek Dox, em relação ao uso da mistura M1 como substrato, sobre a produção de L-asparaginase por *A. niveus* em FES. Os cultivos foram mantidos a 30°C por 120 h. A: atividades enzimáticas; B: atividades específicas. Médias seguidas por letras minúsculas iguais são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ).



Fonte: autora.

De acordo com a análise estatística, a maior produção enzimática (0,24 U/g de substrato e 1,28 U/mg de proteína) foi obtida com a proporção 1:0,5 (m/v) entre substrato e agente umectante, a mesma utilizada nos experimentos anteriores. A segunda maior produção enzimática foi obtida com as proporções 1:0,333 (0,20 U/g de substrato e 1,29 U/mg de proteínas) e 1:0,667 (0,17 U/g de substrato e 0,84 U/mg de proteína), cujas médias de atividade enzimática foram consideradas estatisticamente iguais. Já a menor produção de L-asparaginase foi obtida com a proporção 1:0,833.

A proporção 1:0,5 (m/v) possibilitou produção enzimática 3,3 vezes maior do que a proporção 1:0,833 (m/v), 1,4 vezes maior do que a proporção 1:0,667 (m/v) e 1,2 vezes maior do que a proporção 1:0,333 (m/v). Por este motivo, esta foi a proporção de agente umectante selecionada para dar continuidade ao estudo. A proporção de 1:2 (m/v) foi limítrofe para caracterização da FES. Acima deste valor ocorre a presença de água livre. A FES é definida como um processo no qual o microrganismo se desenvolve com uma quantidade mínima de umidade no meio (substrato), ou seja, sem água livre (SOCCOL et al., 2017).

A determinação do nível ideal de umidade é um fator de grande importância na FES. Isto porque cada microrganismo, seja ele bactéria, fungo filamentoso ou



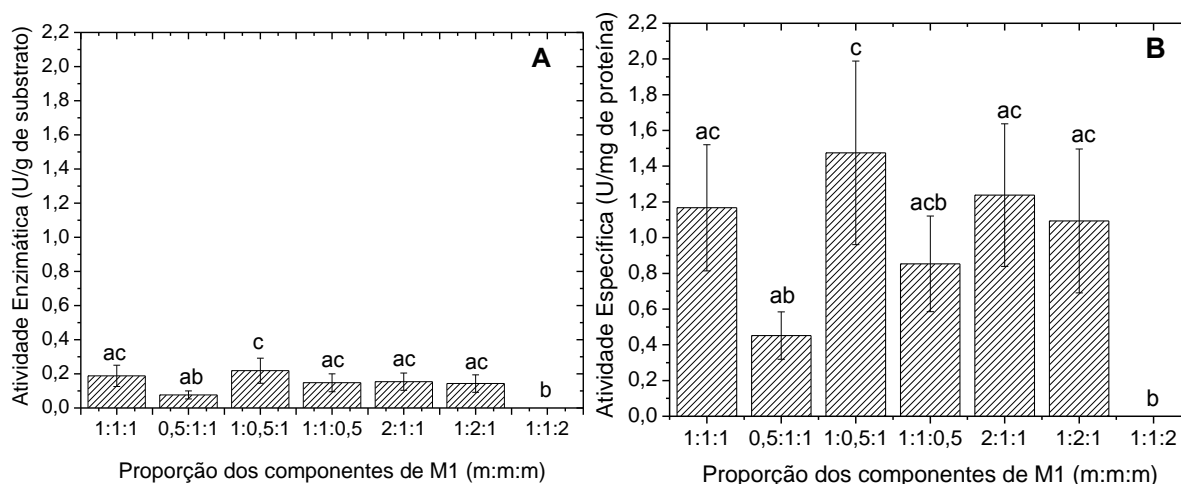
levedura possui uma necessidade diferente de umidade para se desenvolver, o que é expresso de forma quantitativa como atividade de água ( $a_w$ ). As bactérias, por exemplo, necessitam de um alto valor de  $a_w$  para se desenvolverem, enquanto que os fungos filamentosos conseguem crescer em valores mais baixos de  $a_w$ . Então, microrganismos como os fungos filamentosos, com o metabolismo adaptado a manter sua atividade em baixos valores de  $a_w$ , são ideais para serem utilizados na FES (MANAN; WEBB, 2017). Todavia, se a umidade disponível na FES for muito alta, a probabilidade de ocorrer uma contaminação por bactérias é maior.

Conquanto, a contaminação com bactérias não é o único problema a ser enfrentado quando há uma alta umidade na FES. A alta umidade facilita a agregação das partículas do substrato, o que dificulta a transferência de oxigênio no meio, podendo causar uma diminuição na produção enzimática. Por outro lado, a falta de umidade também pode ser prejudicial para o microrganismo. Se há falta de umidade no início da fermentação, o substrato pode ficar muito seco, o que atrapalhará o crescimento do microrganismo, podendo levar a uma produção enzimática diminuída (MANAN; WEBB, 2017). Assim, é de extrema importância determinar e manter o nível de umidade ideal a ser utilizado na FES, pois este é um parâmetro difícil de ser monitorado e que pode afetar a produção de metabólitos pelos microrganismos.

#### **4.6 Influência de diferentes proporções dos componentes da mistura M1 na produção de L-asparaginase em FES**

Após a análise de diferentes proporções do agente umectante, foi verificada também a influência da proporção dos componentes da mistura M1 na produção enzimática. A ordem destes componentes nas proporções (m/m/m) descritas é sempre farelo de trigo: soja moída: casca de laranja. A partir da Figura 14, pode-se observar que as proporções 1:1:1, 1:0,5:1, 1:1:0,5, 2:1:1 e 1:2:1 renderam atividades enzimáticas semelhantes, sendo a maior produção enzimática obtida com a proporção 1:0,5:1 (0,22 U/g de substrato e 1,47 U/mg de proteína), seguida da proporção 1:1:1 (0,19 U/g de substrato e 1,17 U/mg de proteína). O uso da proporção 0,5:1:1 proporcionou a menor produção enzimática. Os componentes na proporção 1:1:2, por sua vez, não propiciaram a produção de L-asparaginase, apesar do microrganismo ter se desenvolvido.

**Figura 14.** Influência de diferentes proporções dos componentes farelo de trigo, soja moída e casca de laranja, utilizados na mistura M1, sobre a produção de L-asparaginase pelo fungo *A. niveus* em FES umidificada com sais Czapek Dox (1:0,5; m/v). Os cultivos foram mantidos a 30°C, por 48 h. Médias seguidas por letras minúsculas iguais são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).



Fonte: autora.

A partir dos dados apresentados, apesar das proporções 1:1:1, 1:0,5:1, 1:1:0,5, 2:1:1 e 1:2:1 não apresentarem muita diferença quanto a produção de L-asparaginase, a proporção 1:0,5:1 (m/m/m) propiciou atividade enzimática ligeiramente maior que as demais e, visto que o objetivo é selecionar as condições de cultivo que possibilitem a maior produção enzimática, a proporção 1:0,5:1 (m/m/m) foi selecionada para dar continuidade aos estudos. Ainda é possível afirmar que a segunda maior produção enzimática foi obtida com a proporção 1:1:1 (m/m/m), a qual vinha sendo utilizada até o momento.

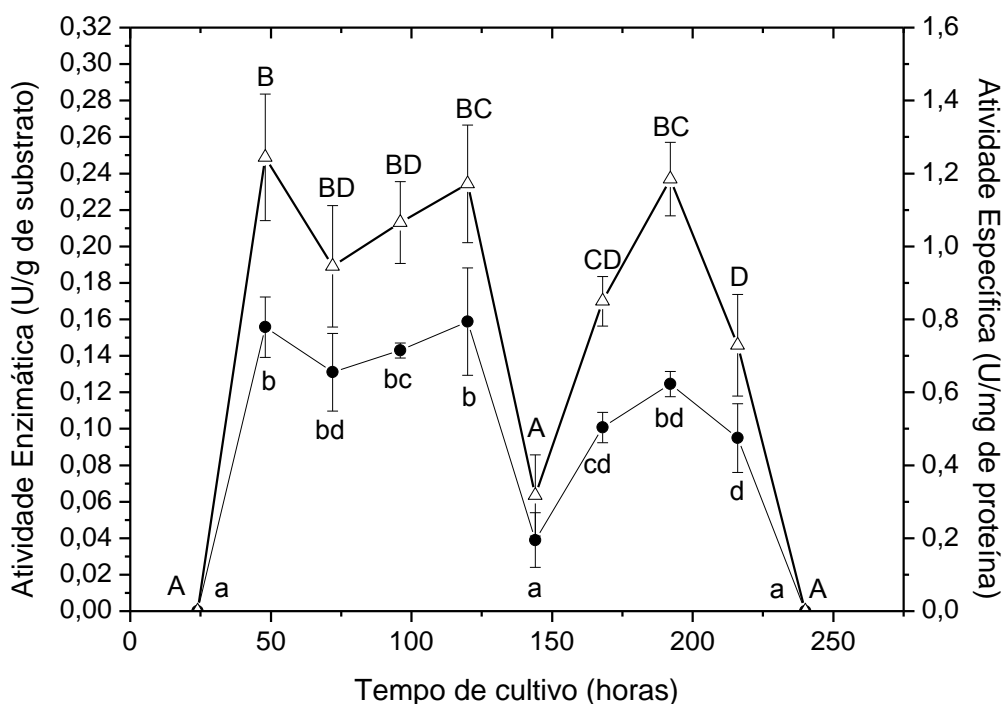
O substrato a ser utilizado em FES é uma variável que depende não só da enzima que se almeja produzir, mas principalmente do microrganismo utilizado, pois cada um tem suas próprias necessidades nutricionais. O fato de, neste estudo, a proporção 1:0,5:1 (m/m/m) ter sido a que proporcionou a maior produção de L-asparaginase, indica que o fungo utilizado *A. niveus* necessita de maiores quantidades de substratos ricos em carboidratos e açúcares solúveis, do que outros compostos. O farelo de trigo, por exemplo, possui amido em sua composição, cuja quebra resulta na liberação de açúcares simples, facilmente absorvidos por microrganismos. Além disso, já foi abordado anteriormente que o aminoácido L-asparagina está naturalmente presente em alimentos amiláceos, o que também

pode justificar a participação deste substrato da mistura na produção de L-asparaginase. A casca de laranja, presente na mistura M1, é outra potente fonte de açúcares, como comentado anteriormente. Já a soja moída, requerida em menor quantidade por *A. niveus*, é rica em proteínas, poderosas fontes de nitrogênio, o qual juntamente com o carbono, é de extrema importância na via biossintética do metabolismo de microrganismos. Além disso, a casca que reveste o grão da soja possui grandes quantidades de celulose e lignocelulose, que também podem ser degradadas para formar açúcares simples (MANAN; WEBB, 2017).

#### **4.7 Influência do tempo de cultivo na produção de L-asparaginase em FES**

Além dos parâmetros já analisados, o tempo de cultivo é outra variável de grande importância para a produção enzimática. A Figura 15 apresenta a produção enzimática em função de diferentes tempos de cultivo (24-240 h) utilizando a mistura M1 umedecida com sais de Czapek Dox. Nota-se que, de acordo com a análise estatística, a produção enzimática atingiu seu pico em 48 h de fermentação (0,16 U/g de substrato e 1,24 U/mg de proteína) e manteve-se assim até o 5º dia (120 h). Com 144 h de cultivo houve redução na produção enzimática. Contudo, novo pico de produção foi atingido em 192 h (0,12 U/g de substrato e 1,18 U/mg de proteína), com posterior redução, chegando a zero em 240 h.

**Figura 15.** Influência do tempo de cultivo sobre a produção de L-asparaginase pelo fungo *A. niveus* em FES utilizando a mistura M1 (1:1:1; m/m/m) umedecida com sais Czapek Dox (1:0,5; m/v). Os cultivos foram mantidos a 30°C. (—●—) Atividade Enzimática (U/g de substrato); (—△—) Atividade Específica (U/mg de proteína). Médias seguidas por letras minúsculas iguais são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ).



Fonte: autora.

Existem diversas explicações para a ocorrência destas duas faixas de maior produção enzimática (48 – 120 h e em 192 h). Uma hipótese é a presença de isoformas da L-asparaginase. Estas isoformas, ou isoenzimas, têm a capacidade de catalisar a mesma reação, porém, podem possuir características cinéticas diferentes, como o valor de  $V_{max}$  e  $K_m$ . Além disso, podem ser sintetizadas em condições diferentes, como por exemplo, tempos de cultivo diferentes. Apesar das isoformas terem as sequências de aminoácidos muito parecidas, elas não são idênticas (NELSON; COX, 2014).

Outro argumento seria o ritmo com que o fungo consome os substratos de acordo com sua necessidade nutricional. O fungo irá degradar os substratos disponíveis ao longo do tempo de fermentação de acordo com as necessidades fisiológicas para o seu desenvolvimento, liberando metabólitos como consequência. Então, o pico da produção enzimática pode ser considerado um momento de intenso metabolismo fúngico. Caso não haja necessidade de adquirir mais nutrientes em

determinado período, o fungo diminuirá o consumo do substrato, resultando na queda da produção de metabólitos, ou seja, queda na produção enzimática.

Na literatura é possível encontrar diferentes tempos de cultivo para a produção de L-asparaginase, dependendo do microrganismo utilizado e do tipo de fermentação. Zia et al. (2013) obtiveram em seu trabalho produção enzimática máxima em 96 h de cultivo, utilizando licor de maceração de milho como substrato para FSbm com o fungo *Aspergillus niger*. Já Gurunathan e Sahadevan (2012) constataram produção máxima de L-asparaginase em um tempo de cultivo de 58,5 h em FSbm, utilizando *Aspegillus terreus*. Por sua vez, Thakur et al. (2013) verificaram que o melhor tempo de cultivo para a produção de L-asparaginase por *Mucor hiemalis* em FSbm foi de 96 h. Foi afirmado ainda que, um tempo de cultivo menor, diminui a probabilidade da L-asparaginase ser degradada por alguma enzima proteolítica proveniente do metabolismo fúngico, ou até mesmo de sofrer inibição por outro composto (THAKUR et al., 2013).

Já em FES, produção máxima foi obtida com 6 dias de incubação utilizando grão de soja moído como substrato para *Fusarium culmorum* (ASP-87) (MEGHAVARNAM; JANAKIRAMAN, 2017). Em outro trabalho, Ghosh et al. (2013) utilizaram o período de 96 h para produzir L-asparaginase em FES, utilizando torta de óleo de coco como substrato para *Serratia marcescens* (NCIM 2919). Em contrapartida, no trabalho de Cunha et al. (2018), foi determinado que o tempo de 48 h de cultivo possibilitou a máxima produção de L-asparaginase, utilizando farinha de casca de maracujá como substrato para *Aspergillus niger* em FES.

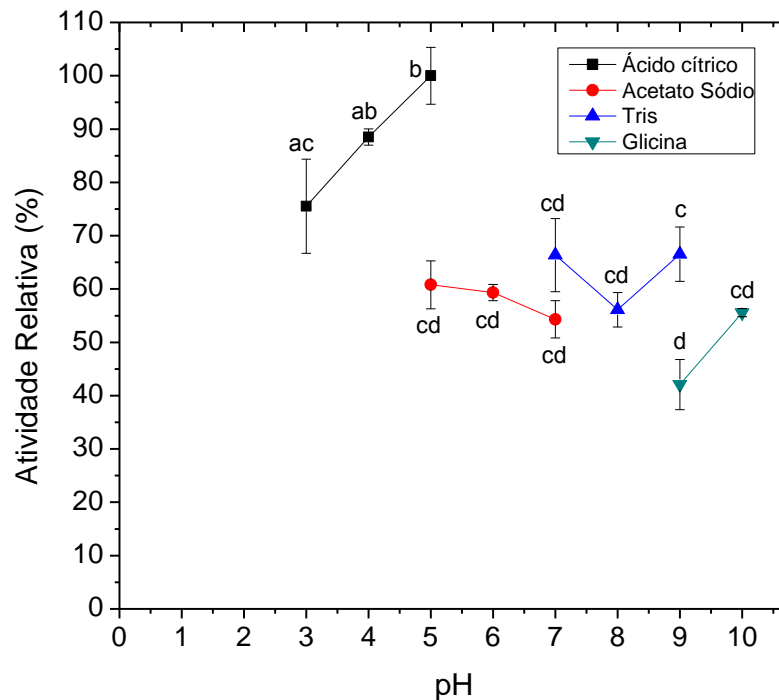
#### **4.8 Caracterização da atividade da L-asparaginase presente no extrato bruto**

##### **4.8.1 Influência do pH e da temperatura na reação enzimática**

A influência do pH na reação enzimática pode ser observada na Figura 16. A atividade enzimática da L-asparaginase foi maior em pH mais ácido, sendo o pH 5,0, utilizando o tampão ácido cítrico, o que proporcionou maior atividade. Observa-se ainda que a composição do tampão utilizado na reação interferiu na atividade enzimática, já que, para o mesmo valor de pH (5,0), o tampão ácido cítrico possibilitou maior atividade relativa do que o tampão acetato de sódio. Ainda, é possível observar novamente a influência da composição do tampão no pH 9,0, visto

que o tampão Tris-HCl neste pH, proporcionou atividade maior do que a observada em tampão glicina. Através da análise estatística foi possível comprovar que o pH ótimo para a L-asparaginase presente no extrato bruto ficou na faixa de 4,0-5,0.

**Figura 16.** Influência do pH na atividade da enzima L-asparaginase obtida de *A. niveus* em FES. 100% corresponde a 0,032 U/mL. Médias seguidas por letras minúsculas iguais são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).



Fonte: autora.

Diversos trabalhos publicados descrevem valores de pH ótimos de reação para a L-asparaginase produzida por diferentes fungos. Valor de pH ótimo de 6,3 foi obtido para a L-asparaginase produzida por *Cladosporium* sp. em FES utilizando farelo de trigo como substrato (MOHAN KUMAR; RAMASAMY; MANONMANI, 2013). Para a L-asparaginase produzida por *Aspergillus terreus*, o pH ótimo de atividade foi 5,8 após purificação (HASSAN; FARAG; BELTAGY, 2018). Já para o fungo endofítico *Talaromyces pinophilus*, cultivado em FSbm, foi obtida melhor atividade da enzima purificada em pH 8,0 (KRISHNAPURA; BELUR, 2016). Por outro lado, Dange e Pashwe (2015) determinaram que o pH ótimo de atividade para a enzima purificada obtida de *Aspergillus niger* em FSbm foi 9,0. Thakur e colaboradores (2013) por sua vez, verificaram que para a enzima produzida por *Mucor hiemalis*, cultivado em FSbm, o pH ótimo de atividade foi 7,0, mesmo valor

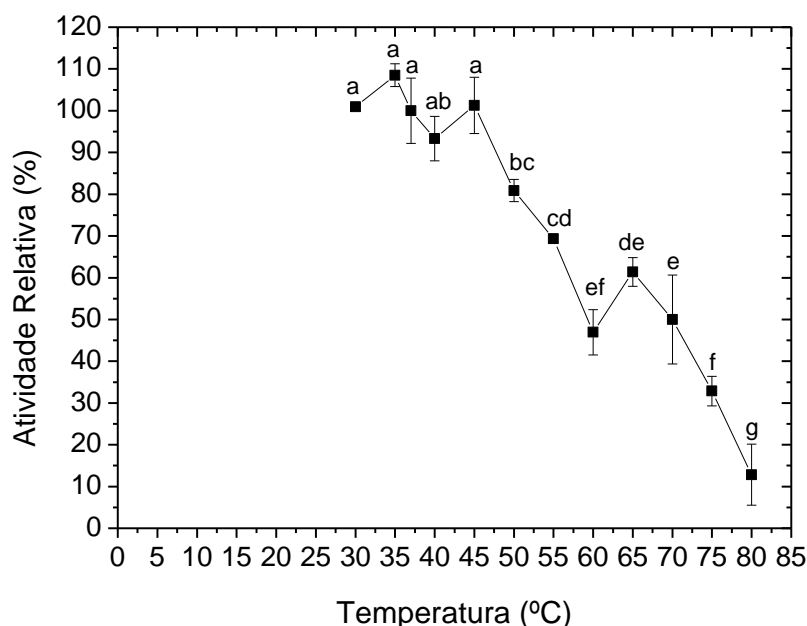
observado para a L-asparaginase do fungo *Aspergillus niger* AKV-MKBU (Vala et al., 2018).

É importante ressaltar que para o uso na indústria de alimentos, a L-asparaginase deve ser capaz de manter sua atividade alta em uma ampla faixa de pH (KRISHNAPURA; BELUR, 2016). Como foi descrito, a L-asparaginase produzida neste trabalho é capaz de atuar em uma ampla faixa de pH, favorecendo seu uso na indústria alimentícia. Ressalta-se ainda que a L-asparaginase presente no extrato bruto é capaz de manter atividade de 40-65% em pH alcalino.

Nota-se que há uma grande variação do pH ótimo para as L-asparaginases descritas por diferentes autores. Isto porque as características da enzima produzida estão intimamente relacionadas com o microrganismo que a produziu e as condições para sua produção como, por exemplo, o tipo de fermentação. Em um trabalho conduzido por Abbas Ahmed et al. (2015), o fungo endofítico marinho *Aspergillus* sp. ALAA-2000 produziu duas L-asparaginases com características diferentes. A AYA-1, exibiu máxima atividade em pH 6,0 e 47°C, enquanto que AYA-2 teve máxima atividade em pH 10,0 e 67°C. Outro ponto importante é o fato de que, a grande maioria dos trabalhos disponíveis na literatura, faz a caracterização apenas da enzima purificada, o que dificulta a comparação com os resultados obtidos neste trabalho, com o extrato bruto. Isto é explicado pelo fato de que o perfil de atividade da enzima purificada pode ser diferente do perfil da mesma no extrato bruto.

Quanto à temperatura ótima aparente de reação, os resultados podem ser observados na Figura 17.

**Figura 17.** Influência da temperatura na atividade da enzima L-asparaginase obtida do cultivo de *A. niveus* em FES. 100% corresponde a 0,033 U/mL. Médias seguidas por letras minúsculas iguais são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ( $p>0,05$ ).



Fonte: autora.

De acordo com esta figura, a faixa de temperatura que melhor favoreceu a atividade enzimática foi de 30°C a 45°C. A partir de 50°C a atividade enzimática vai reduzindo, mas atinge novo pico em 65°C, com uma atividade relativa em torno de 60%. Estes dois picos podem indicar a presença de isoformas da L-asparaginase. Resultado semelhante foi observado no trabalho de Abbas Ahmed et al. (2015), mencionado anteriormente, em que duas L-asparaginases foram produzidas pelo fungo *Aspergillus* sp. ALAA-2000, uma com temperatura ótima de 47°C e a outra de 67°C. Nota-se, ainda, que a L-asparaginase foi capaz de manter sua atividade relativa em 56% a 65°C. Desta maneira é possível constatar que a temperatura de 37°C, utilizada nas reações enzimáticas até então, está dentro da faixa de temperatura ótima aparente. A maioria dos trabalhos descreve uma temperatura ótima de atividade para as L-asparaginases na faixa de 30°C a 50°C (SOUZA et al., 2017), especialmente na temperatura de 37°C, como reportado por Thakur et al. (2013) para a enzima de *Mucor hiemalis*, Elshafei et al. (2012), para a enzima de *Penicillium brevicompactum* NRC 829 e Lincoln, Niyonzima e More (2015) para a de *Trichoderma viride*. No trabalho de Dange e Pashwe (2015), a temperatura ótima descrita foi de 40°C, para a enzima purificada de *Aspergillus niger*.

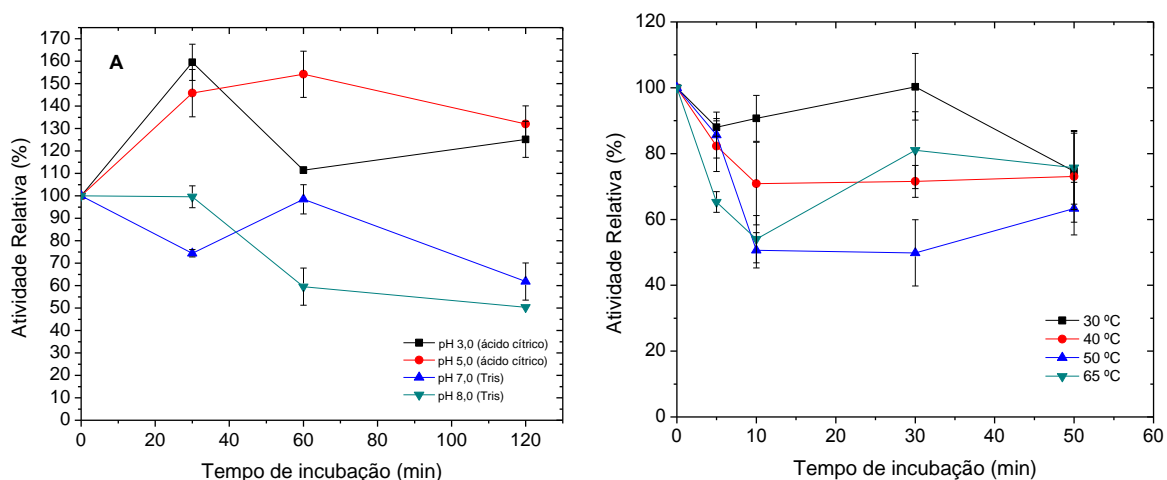


#### 4.8.2 Estabilidade ao pH e a temperatura

Na Figura 18 é possível observar o comportamento da L-asparaginase presente no extrato bruto quanto à estabilidade ao pH (A) e a temperatura (B).

Para os pH 3,0 e 5,0, a L-asparaginase sofreu ativação, tendo atividade relativa de 159% e 145%, respectivamente, em 30 min. Neste mesmo período, para o pH 7,0, a atividade relativa caiu para 74%, enquanto que para o pH 8,0 quase não houve diminuição, sendo a atividade relativa de 99%. Com 60 min de incubação, a atividade relativa para o pH 5,0 continuou aumentando, chegando a 154%. O mesmo aconteceu no pH 7,0, com atividade relativa da L-asparaginase de 98%. Já para os pH 3,0 e 8,0, no tempo de 60 min, houve queda na atividade relativa para 111% e 59% respectivamente. Com 120 min de incubação a atividade relativa apresentou queda nos pH 5,0, 7,0 e 8,0 para 132%, 61% e 50% respectivamente. Já para o pH 3,0, a atividade relativa subiu para 125%. A partir destes dados, é possível afirmar que a L-asparaginase presente no extrato bruto apresentou maior estabilidade em pH 5,0, valor ótimo para atividade enzimática. Também foi observada melhor estabilidade da L-asparaginase de *Aspergillus terreus* na faixa de pH de 4-5,8 (Hassan, Farag e Beltagy, 2018). No trabalho de Huang et al. (2014), foi observada estabilidade da L-asparaginase produzida por *Rhizomucor miehei* em uma ampla faixa de pH (4,0-8,0). O mesmo foi obtido para a L-asparaginase produzida pela planta *Capsicum annuum* L no trabalho de Shanmugaparakash et al. (2015), sendo a enzima estável em uma faixa de pH de 5,0-9,0.

**Figura 18.** Estabilidade da L-asparaginase produzida por *A. niveus* em FES em diferentes valores de pH (A) e diferentes temperaturas (B).



Fonte: autora.

Quanto à estabilidade térmica (Figura 18 B), nota-se que a L-asparaginase manteve atividades relativas de 63-76% nas temperaturas avaliadas, com 50 min de incubação. Elshafei et al. (2012) observaram que a L-asparaginase proveniente de *Penicillium brevicompactum* NRC 829 foi mais estável na faixa de temperatura de 50°C-60°C por 60 min. Outro trabalho demonstrou que a L-asparaginase de *Aspergillus terreus* foi capaz de manter-se estável até temperatura de 70°C por 60 min (HASSAN; FARAG; BELTAGY, 2018).

Para a L-asparaginase obtida de *Talaromyces pinophilus* em FSbm, foi observada melhor estabilidade na faixa de pH de 7,0-9,0, sendo que a enzima manteve alta atividade em pH 8,0 durante 8 h. Neste mesmo trabalho, a L-asparaginase demonstrou estabilidade na faixa de temperatura de 25-37°C durante 8 h (KRISHNAPURA; BELUR, 2016). Outro trabalho descreveu que a L-asparaginase produzida por *Aspergillus niger* em FSbm foi capaz de manter 100% de atividade na temperatura de 40°C por 120 min (DANGE; PASHWE, 2015). Já Vala et al. (2018) reportaram que a L-asparaginase produzida por *Aspergillus niger* de origem marinha foi mais estável em uma faixa de pH de 6,0-9,0 e em uma faixa de temperatura de 20°C-40°C.

### 4.8.3 Influência de diferentes compostos na atividade enzimática

Analisando-se a influência de diferentes compostos na atividade enzimática da L-asparaginase produzida por *A. niveus* e dialisada (Tabelas 2 e 3), é possível observar que a maioria dos compostos utilizados não interferiu na enzimática. Dentre os sais (Tabela 2), as maiores atividades relativas foram obtidas com a utilização de  $\text{CoCl}_2$  (+36%),  $\text{NaCl}$  (+31%) e  $\text{AgNO}_3$  (+23%). A ativação da L-asparaginase por  $\text{NaCl}$  indica que esta enzima não tem sua atividade catalítica impedida por este sal, portanto não será afetada pelo  $\text{NaCl}$  presente no sangue humano na concentração de 0,9% (m/v), pensando-se na aplicação farmacêutica desta enzima (KRISHNAPURA; BELUR, 2016). Outros sais não alteraram a atividade enzimática, como  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{MnSO}_4$  e  $\text{ZnSO}_4$ . Já  $\text{CuCl}_2$  proporcionou a maior redução na atividade relativa (-34%), seguido de  $\text{CuSO}_4$  (-31%). O efeito negativo do cobre sobre a atividade L-asparaginásica foi observado também por outros autores como Huang et al. (2014), Dias et al. (2016), Hassan, Farag e Beltagy (2018) e Kumar e Manonmani (2013). O íon  $\text{Cu}^{2+}$ , assim como outros íons de metais pesados, como  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Ag}^+$ , pode inibir irreversivelmente uma enzima, devido a sua capacidade de reagir com grupos sulfidril para formar mercaptonas, as quais agem como redutores das ligações dissulfeto (NELSON; COX, 2014). Pensando-se na aplicação industrial da L-asparaginase, é necessário determinar o efeito de íons metálicos nesta enzima, já que eles podem atuar aumentando ou diminuindo a atividade enzimática. Íons metálicos, como cálcio, sódio, ferro e zinco, estão presentes na corrente sanguínea, onde a L-asparaginase será administrada para o tratamento de leucemias, e em alimentos, para minimizar a formação de acrilamida (KRISHNAPURA; BELUR, 2016).

**Tabela 2.** Influência de diferentes sais na atividade enzimática da L-asparaginase obtida do cultivo de *A. niveus* em FES. 100% corresponde a 0,036 U/mL.

Sais (1 mmol L <sup>-1</sup> )	Atividade Relativa (%)
Controle	100
AgNO <sub>3</sub>	123,7 ± 2,2
BaCl <sub>2</sub>	104,3 ± 6,2
CaCl <sub>2</sub>	92,4 ± 7,6
CoCl <sub>2</sub>	136,6 ± 9,7
CuCl <sub>2</sub>	66,8 ± 4,8
CuSO <sub>4</sub>	69,5 ± 2,0
FeCl <sub>3</sub>	88 ± 3,8
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	97,8 ± 10,1
MgCl <sub>2</sub>	103,2 ± 5,9
MgSO <sub>4</sub>	110,9 ± 6,7
MnCl <sub>2</sub>	110,4 ± 6,9
MnSO <sub>4</sub>	107,6 ± 5,4
NaCl	131,3 ± 6,5
NH <sub>4</sub> Cl	117 ± 1,8
ZnSO <sub>4</sub>	108,4 ± 4,3

Fonte: autora.

Quanto aos detergentes (Tabela 3), o Tween-20 atuou como ativador da atividade da L-asparaginase (+34%), enquanto que o SDS reduziu a atividade, chegando à completa inibição. Vala et al. (2018) observaram que para a L-asparaginase produzida por *Aspergillus niger* AKV-MKBU, o SDS também atuou como forte inibidor, enquanto que Tween-80 e Triton X-100 aumentaram a atividade da enzima. No trabalho de Krishnapura e Belur (2016), o SDS também interferiu negativamente na atividade da L-asparaginase obtida de *Talaromyces pinophilus*. O SDS é um surfactante que interage com as regiões hidrofóbicas da proteína, podendo causar desnaturação, ou induzir à formação de agregados proteicos, já que interfere na estrutura terciária de proteínas (NELSON; COX, 2014; CHATURVEDI et al., 2015). Assim, já que resíduos ligados por ligações dissulfeto apresentam característica altamente hidrofóbica (NELSON, COX, 2014), a inibição por SDS sugere que as ligações dissulfeto desempenham papel importante na atividade da L-asparaginase.

Os solventes orgânicos são compostos que alteram as interações hidrofóbicas entre as cadeias laterais apolares dos aminoácidos. Além disso, os solventes solubilizam substratos hidrofóbicos, facilitando a hidrólise enzimática (DACHURI et al., 2016). Com relação aos diferentes solventes analisados (Tabela

3), apenas a acetona causou diminuição da atividade relativa (-22%). Os outros solventes, metanol (+46%), isopropanol (+46%), etanol (+42%) e butanol (+42%) atuaram como ativadores da atividade enzimática. A acetonitrila por sua vez, praticamente não interferiu na atividade enzimática. De acordo com Agrawal et al. (2018), a L-asparaginase imobilizada em pellets de óxido de alumínio, teve sua atividade aumentada na presença de acetona (+38%), enquanto que acetonitrila, etanol e metanol pouco interferiram na atividade enzimática. O etanol e metanol são comumente utilizados na precipitação da L-asparaginase (TUNDISI et al., 2017). Em seu trabalho, Mohan Kumar e Manonmani (2013) constataram que o metanol foi o melhor solvente para a precipitação da L-asparaginase produzida por *Cladosporium* sp..

Tratando-se de outros compostos, pode se observar na Tabela 3 que EDTA (+20%) e ureia (+35%) afetaram positivamente a atividade da enzima. O EDTA é conhecido por ser um agente quelante, formando complexos estáveis com íons metálicos. Estes íons metálicos podem atuar como grupos funcionais catalíticos em algumas enzimas, ativando o substrato para a reação através da formação de ligações covalentes transitórias (NELSON; COX, 2014). Assim, a ativação da L-asparaginase pelo EDTA, demonstra que a enzima produzida por *A. niveus* não é uma metaloproteína, não dependendo de íons metálicos para exercer sua atividade catalítica (HUANG et al., 2014). Trabalhos como o de Vala et al. (2018), Huang et al. (2014) e Radha, Arumugam e Gummadi (2018) relatam inibição da atividade da L-asparaginase por EDTA. Por outro lado, foi observada baixa ou nenhuma interferência do EDTA na atividade enzimática nos trabalhos de Shanmugaprakash et al. (2015), Mohan Kumar e Manonmani (2013), Krishnapura e Belur (2016), Abbas Ahmed et al. (2015) e Hassan, Farag e Beltagy (2018).

Com relação à ureia, este composto age como desnaturante, alterando a conformação nativa das proteínas (SU; DIAS, 2016). Shanmugaprakash et al. (2015) e Vala et al. (2018) relataram uma ação inibitória deste composto na atividade da L-asparaginase, ao contrário do resultado obtido neste trabalho.

Quanto ao  $\beta$ - mercaptoetanol (Tabela 3), este ocasionou diminuição na atividade da L-asparaginase (-18%), o que reforça a importância das ligações dissulfeto na atividade catalítica desta enzima (MOHAN KUMAR; MANONMANI, 2013). Isto porque o  $\beta$ - mercaptoetanol é um reagente tiol que atua como redutor das ligações dissulfeto (NELSON; COX, 2014). Foi observada a inibição, em

diferentes graus, da atividade L-asparaginásica por  $\beta$ - mercaptoetanol como descrito por Mohan Kumar e Manonmani (2013), Radha, Arumugam e Gummadi (2018), Huang et al. (2014) e Vala et al. (2018).

**Tabela 3.** Influência de diferentes compostos na atividade enzimática da L-asparaginase obtida do cultivo de *A. niveus* em FES. 100% corresponde a 0,036 U/mL.

<b>Outros Compostos</b>	<b>Atividade Relativa (%)</b>
<b>Controle</b>	100
<b>Detergentes</b>	
<b>SDS (1 mmol L<sup>-1</sup>)</b>	0
<b>Tween-20 (0,01%)</b>	134,8 ± 6,0
<b>Solventes (1%)</b>	
<b>acetona</b>	78,1 ± 10,2
<b>acetonitrila</b>	119,2 ± 6,9
<b>butanol</b>	141,8 ± 7,5
<b>etanol</b>	141,8 ± 6,7
<b>isopropanol</b>	145,7 ± 4,1
<b>metanol</b>	146 ± 5,3
<b>Outros</b>	
<b>EDTA (1 mmol L<sup>-1</sup>)</b>	119,8 ± 9,2
<b>Ureia (1 mmol L<sup>-1</sup>)</b>	134,9 ± 6,2
<b><math>\beta</math>- mercaptoetanol (1 mmol L<sup>-1</sup>)</b>	81,7 ± 1,1

Fonte: autora.

## 5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados neste trabalho é possível observar que, dentre os fungos testados, o *A. niveus* mostrou-se uma fonte promissora para a obtenção de L-asparaginase em FES, utilizando subprodutos agroindustriais como substrato, umidificados com sais de Czapek Dox, em curto período de tempo. A L-asparaginase produzida por *A. niveus* foi estável em ampla faixa de pH e temperatura. A atividade da L-asparaginase produzida por *A. niveus* não sofreu grande interferência de íons metálicos, mas foi completamente inibida por SDS e ativada por alguns solventes. Ainda, o uso de subprodutos agroindustriais mostrou-se uma alternativa para diminuir o custo da produção enzimática, agregar valor a um

material muitas vezes descartado e ainda minimizar o impacto ambiental que o acúmulo ou a destruição destes resíduos pode causar. Sendo assim, a FES apresenta-se como um método promissor para selecionar enzimas mais específicas e estáveis, as quais podem ser obtidas a partir de sistemas de expressão heterólogos na tentativa aumentando a produção enzimática para utilização da enzima na indústria farmacêutica e de alimentos.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABBAS AHMED, M. M.; NAGEH ABO DAHAB, F.; TAHER TAHA, M.; FAREED HASSAN, S. M. Production, Purification and Characterization of L-Asparaginase from Marine Endophytic *Aspergillus* sp. ALAA-2000 under Submerged and Solid State Fermentation. **Microbial & Biochemical Technology**, v. 7, n. 3, p. 165 – 172, 2015.
- AGRAWAL, S.; SHARMA, I.; PRAJAPATI, B. P.; SURYAWANSHI, R. K.; KANGO, N. Catalytic Characteristics and Application of L-Asparaginase Immobilized on Aluminum Oxide Pellets. **Biological Macromolecules**. V. 114, p. 504 – 511, 2018.
- AKILLIOGLU, H. G.; GÖKMEN, V. Mitigation of Acrylamide and Hydroxymethyl Furfural in Instant Coffee by Yeast Fermentation. **Food Research International**, v. 61, p. 252 – 256, 2014.
- ALAM, S.; AHMAD, R.; PRANAW, K.; MISHRA, P.; KHARE, S. K. Asparaginase Conjugated Magnetic Nanoparticles Used for Reducing Acrylamide Formation in Food Model System. **Bioresource Technology**, v. 269, p. 121 – 126, 2018.
- BALASUBRAMANIAN, K.; AMBIKAPATHY, V.; PANNEERSELVAM, A. Production, Isolation, and Purification of L-Asparaginase from *Aspergillus terreus* Using Submerged Fermentation. **International Journal of Advances in Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 2, p. 778 – 783, 2012.
- BATOOL, T.; MAKKY, E. A.; JALAL, M.; YUSOFF, M. M. A Comprehensive Review on L-Asparaginase and its Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 5, p. 900 – 923, 2016.
- BEDAIWY, M. Y.; AWADALLA, O. A.; ABOU-ZEID, A. M.; HAMADA, H. T. Optimal Conditions for Production of L -Asparaginase from *Aspergillus tamaritii*. **Egyptian Journal of Experimental Biology (Botany)**, v.12, n. 2, p. 229 – 237, 2016.
- 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.2, p. 248 – 54, 1976.
- CACHUMBA, J. J. M.; ANTUNES, F. A. F.; PERES, G. F. D.; BRUMANO, L. P.; SANTOS, J. C.; SILVA, S. S. Current Applications and Different Approaches for Microbial L-Asparaginase Production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 2 – 10, 2016.
- CHATURVEDI, S. K.; KHAN, J. M.; SIDDIQUI, M. K.; ALAM, P.; KHAN, R. H. Comparative Insight into Surfactants Mediated Amyloidogenesis of Lysozyme. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 83, p. 315 – 325, 2016.
- CIESAROVÁ, Z.; KISS, E.; BOEGL, P. Impact of L-Asparaginase on Acrylamide Content in Potato Products. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 45, n. 4, p. 141 – 146, 2006.
- COSTA, I. M.; SCHULTZ, L.; PEDRA, B. A. B.; LEITE, M. S. M.; FARSKY, S. H. P.;



OLIVEIRA, M. A.; PESSOA, A.; MONTEIRO, G. Recombinant L-asparaginase 1 from *Saccharomyces cerevisiae*: an Allosteric Enzyme with Antineoplastic Activity. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1 – 11, 2016.

CUNHA, M. C.; SILVA, L. C.; SATO, H. H.; CASTRO, R. J. S. Using Response Surface Methodology to Improve the L-asparaginase Production by *Aspergillus niger* under Solid-State Fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 31 – 36, 2018.

DACHURI, V.; BOYINENI, J.; CHOI, S.; CHUNG, H. S.; JANG, S. H.; LEE, C. W. Organic Solvent-tolerant, Cold-adapted Lipases PML and LipS Exhibit Increased Conformational Flexibility in Polar Organic Solvents. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.131, p. 73 – 78, 2016.

DANGE, V.; PESHWE, S. Purification and Biochemical Characterization of L-Asparaginase from *Aspergillus niger* and Evaluation of its Antineoplastic Activity. **International Journal of Science and Research**, v. 4, n. 2, p. 564 – 569, 2015.

DIAS, F. F. G.; CASTRO, R. J. S.; OHARA, A.; NISHIDE, T. G.; BAGAGLI, M. P.; SATO, H. H. Simplex Centroid Mixture Design to Improve L-Asparaginase Production in Solid-State Fermentation Using Agroindustrial Wastes. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 528 – 534, 2015.

DIAS, F. F. G.; JUNIOR, S. B.; HANTAO, L. W.; AUGUSTO, F.; SATO, H. H. Acrylamide Mitigation in French Fries Using Native L-asparaginase from *Aspergillus oryzae* CCT 3940. **LWT - Food Science and Technology**, v. 76 (Part B), p. 222 – 229, 2017.

DIAS, F. F. G.; RUIZ, A. L. T. G.; TORRE, A. D.; SATO, H. H. Purification, Characterization and Antiproliferative Activity of L-Asparaginase from *Aspergillus Oryzae* CCT 3940 with no Glutaminase Activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 9, p. 785 – 794, 2016.

DORIYA, K.; JOSE, N.; GOWDA, M.; KUMAR, D. S. Solid-State Fermentation vs Submerged Fermentation for the Production of L-asparaginase. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 78,p. 115 – 135, 2016.

DORIYA, K.; KUMAR, D. S. Isolation and Screening of L-asparaginase Free of Glutaminase and Urease from Fungal sp. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1 – 10, 2016.

DORIYA, K.; KUMAR, D. S. Optimization of Solid Substrate Mixture and Process Parameters for the Production of L-asparaginase and Scale-Up Using Tray Bioreactor. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 13, p. 244 – 250, 2018.

DRAINAS, C.; KINGHORN, J. R.; PATEMAN, J. A. Aspartic Hydroxamate Resistance and Asparaginase Regulation in the Fungus *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 493 – 501, 1977.

EL-NAGGAR, N. E.; EL-EWASY, S. M.; EL-SHWEIHY, N. M. Microbial L-asparaginase as a Potencial Therapeutic Agent for the Treatment of Acute

Lymphoblastic Leukemia: The Pros and Cons. **International Journal of Pharmacology**, v. 10, n. 4, p. 182 –199, 2014.

ELSHAFEI, A. M.; HASSAN, M. M.; ABOUZEID, M. Abd-E.; MAHMOUD, D. A.; ELGHONEMY, D. H. Purification, Characterization and Antitumor Activity of L-asparaginase from *Penicillium brevicompactum* NRC 829. **British Microbiology Research Journal**, v. 2, n. 3, p. 158 – 174, 2012.

FENG, Y.; LIU, S.; JIAO, Y.; WANG, Y.; WANG, M.; DU, G. Gene Cloning and Expression of the L-asparaginase from *Bacillus cereus* BDRD-ST26 in *Bacillus subtilis* WB600. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 127, n. 4, p. 418 – 424, 2019.

FERNANDES, H. S.; SILVA TEIXEIRA, C. S.; FERNANDES, P. A.; RAMOS, M. J.; CERQUEIRA, N. M. F. S. A. Amino Acid Deprivation Using Enzymes as a Targeted Therapy for Cancer and Viral Infections. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 27, n. 3, p. 283 – 297, 2016.

GADELHA, M. **Esclarecimentos L-Asparaginase**, 2017. Disponível em: [http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/22/2.%20b%20-%20L-ASPARAGINASE\\_CIT\\_22\\_06\\_2017.pdf](http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/22/2.%20b%20-%20L-ASPARAGINASE_CIT_22_06_2017.pdf). Acesso em: 17 dez. 2018.

GHOSH, S.; MURTHY, S.; GOVINDASAMY, S.; CHANDRASEKARAN, M. Optimization of L-asparaginase Production by *Serratia marcescens* (NCIM 2919) Under Solid State Fermentation Using Coconut Oil Cake. **Sustainable Chemical Processes**, v. 1, n. 1, p. 9, 2013.

GONÇALVES, H. B.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Production and Characterization of an Extracellular  $\beta$ -D-Fructofuranosidase from *Fusarium graminearum* During Solid-State Fermentation Using Wheat Bran as a Carbon Source. **Journal of Food Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 655 – 663, 2016.

GULATI, R.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. A Rapid Plate Assay for Screening L-asparaginase Producing Micro-organisms. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 23 – 26, 1997.

GURUNATHAN, B.; SAHADEVAN, R. Optimization of culture conditions and bench-scale production of L-asparaginase by submerged fermentation of *Aspergillus terreus* MTCC 1782. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 7, p. 923 – 929, 2012.

GUTIÉRREZ-CORREA, M.; LUDEÑA, Y.; RAMAGE, G.; VILLENA, G. K. Recent Advances on Filamentous Fungal Biofilms for Industrial Uses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 5, p. 1235 – 1253, 2012.

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.

HENDRIKSEN, H. V.; BUDOLFSEN, G.; BAUMANN, M. J. Asparaginase for Acrylamide Mitigation in Food. **Aspects of Applied Biology**, v. 116, p. 41 – 50,

2013.

HERMANTO, A.; TING, A. S. Y. Comparative Effect of L-Asparagine and Sodium Nitrate in Inducing L-Asparaginase Production by Endophytic *Fusarium* sp. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 60, n. 2, p. 145 – 150, 2016.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological Advantages of Laboratory-Scale Solid-State Fermentation with Fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175 – 186, 2004.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation — are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 301 – 306, 2005.

HUANG, L.; LIU, Y.; SUN, Y.; YAN, Q.; JIANG, Z. Biochemical Characterization of a Novel L-asparaginase with Low Glutaminase Activity from *Rhizomucor miehei* and its Application in Food Safety and Leukemia Treatment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 5, p. 1561 – 1569, 2014.

KAWEDIA, J. D.; RYTTING, M. E. Asparaginase in Acute Lymphoblastic Leukemia. **Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia**, v. 14, n. S3, p. S14 – S17, 2014.

KHANNA, P.; SUNDARI, S. S.; KUMAR, N. J. Production, Isolation and Partial Purification of Xylanases from an *Aspergillus* sp. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 242 – 243, 1995.

KORTEI, N. K.; DZOGBEFIA, V. P.; OBODAI, M. Assessing the Effect of Composting Cassava Peel Based Substrates on the Yield, Nutritional Quality, and Physical Characteristics of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kummer. **Biotechnology Research International**, v. 2014, p. 1 – 9, 2014.

KOTZIA, G. A.; LABROU, N. E. L-Asparaginase from *Erwinia Chrysanthemi* 3937: Cloning, Expression and Characterization. **Journal of Biotechnology**, v. 127, n. 4, p. 657 – 669, 2007.

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.

LINCOLN, L.; NIYONZIMA, F. N.; MORE, S. S. Purification and Properties of a Fungal L-Asparaginase From *Trichoderma viride* Pers: Sf Grey. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 4, n. 4, p. 310 – 316, 2015.

LUBKOWSKI, J.; DAUTER, M.; AGHAIYPOUR, K.; WLODAWER, A.; DAUTER, Z. Atomic Resolution Structure of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. **Acta Crystallographica**, v. 59, p. 84 – 92, 2002.

MAES, C.; DELCOUR, J. A. Structural Characterisation of Water-extractable and Water-unextractable Arabinoxylans in Wheat Bran. **Journal of Cereal Science**, v. 35, p. 315 – 316, 2002.

MAGRI, A.; SOLER, M. F.; LOPES, A. M.; CILLI, E. M.; BARBER, P. S.; PESSOA

- JR, A.; PEREIRA, J. F. B. A Critical Analysis of L-Asparaginase Activity Quantification Methods—Colorimetric Methods Versus High-Performance Liquid Chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 27, p. 6985 – 6990, 2018.
- MAHAJAN, R. V.; SARAN, S.; SAXENA, R. K; SRIVASTAVA, A. K. A Rapid, Efficient and Sensitive Plate Assay for Detection and Screening of L-Asparaginase-Producing Microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, p. 1 – 5, 2013.
- MANAN, M. A.; WEBB, C. Design Aspects of Solid State Fermentation as Applied to Microbial Bioprocessing. **Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering**, v. 4, n.1, p. 1 – 25, 2017.
- MARKETS AND MARKETS. **Industrial Enzymes Market by Type (Amylases, Cellulases, Proteases, Lipases, and Phytases), Application (Food and Beverages, Cleaning Agents, and Animal Feed), Source (Microorganism, Plant, and Animal), and Region—Global Forecast to 2022**, 2016. Disponível em: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/industrial-enzymes-market-237327836.html>. Acesso em: 17 abr. 2019.
- 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.
- MEYER, V.; ANDERSEN, M. R.; BRAKHAGE, A. A.; BRAUS, G. H.; CADDICK, M. X.; CAIRNS, T. C.; VRIES, R. P.; HAARMANN, T.; HANSEN, K.; HERTZ- FOWLER, C.; KRAPPMANN, S.; MORTENSEN, U. H.; PEÑALVA, M. A.; RAM, A. F. J.; HEAD, R. M. Current Challenges of Research on Filamentous Fungi in Relation to Human Welfare and a Sustainable Bio-Economy: A White Paper. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 6, p. 1 – 17, 2016.
- MOHAN KUMAR, N. S.; MANONMANI, H. K. Purification, Characterization and Kinetic Properties of Extracellular L-asparaginase Produced by *Cladosporium* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 577 – 587, 2013.
- MOHAN KUMAR, N. S.; RAMASAMY, R.; MANONMANI, H. K. Production and Optimization of L-asparaginase from *Cladosporium* sp. Using Agricultural Residues in Solid State Fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 43, n. 1, p. 150 – 158, 2013.
- MORGAN, N. K.; CHOCT, M. Cassava: Nutrient Composition and Nutritive Value in Poultry Diets. **Animal Nutrition**, v. 2, p. 253 – 261, 2016.
- MÜLLER, H. J.; BOOS, J. Use of L-asparaginase in Childhood ALL. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 28, n. 2, p. 97 – 113, 1998.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6º Ed. Artmed, 2014.
- OZA, V. P.; TRIVEDI, S. D.; PARMAR, P. P.; SUBRAMANIAN, R. B. *Withania somnifera* (Ashwagandha): a Novel Source of L-asparaginase. **Journal of**

**Integrative Plant Biology**, v. 51, n. 2, p. 201 – 206, 2009.

PANDEY, A. Solid-State Fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2–3, p. 81 – 84, 2003.

PEDRESCHI, F.; KAAK, K.; GRANBY, K. The Effect of Asparaginase on Acrylamide Formation in French Fries. **Food Chemistry**, v. 109, p. 386 – 392, 2008.

PEDRESCHI, F.; MARIOTTI, S.; GRANBY, K.; RISUM, J. Acrylamide Reduction in Potato Chips by Using Commercial Asparaginase in Combination with Conventional Blanching. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 6, p. 1473 – 1476, 2011.

RADHA, R.; ARUMUGAM, N.; GUMMADI, S. N. Glutaminase Free L-asparaginase from *Vibrio cholerae*: Heterologous Expression, Purification and Biochemical Characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 129 – 138, 2018.

RAJA, M. M. M.; RAJA, A.; SALIQUE, S. M.; GAJALAKSHMI, P. Comparative Studies on Effect of Carbon and Nitrogen Sources on L-asparaginase Production. **International Journal of Applied Sciences and Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 452 – 457, 2016.

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.

RIZZATTI, A. C. S.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; RECHIA, C. G. V.; POLIZELI, M. L. T. M. Purification and Properties of Thermostable Extracellular  $\alpha$ -D-xylosidase Produced by Thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 156 – 160, 2001.

ROSÉN, J.; HELLENÄS, K.-E. Analysis of Acrylamide in Cooked Foods by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **The Analyst**, v. 127, n. 7, p. 880 – 882, 2002.

SAEED, H.; ALI, H.; SOUDAN, H.; EMBABY, A.; EL-SHARKAWY, A.; FARAG, A.; HUSSEIN, A.; ATAYA, F. Molecular Cloning, Structural Modeling and Production of Recombinant *Aspergillus terreus* L. asparaginase in *Escherichia coli*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 1041 – 1051, 2018.

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

SHANMUGAPRAKASH, M.; JAYASHREE, C.; VINOTHKUMAR, V.; SENTHILKUMAR, S. N. S.; SAHABJADA, S.; RAWAT, V.; ARSHAD, M. Biochemical Characterization and Antitumor Activity of Three Phase Partitioned L-asparaginase from *Capsicum annum* L. **Separation and Purification Technology**, v. 142, p. 258 – 267, 2015.

SHRIVASTAVA, A.; KHAN, A. A.; JAIN, S. K.; SINGHAL, P. K.; JAIN, S.; MAROTTA, F.; YADAV, H. Biotechnological Advancement in Isolation of Anti-Neoplastic

Compounds from Natural Origin: A Novel Source of L-asparaginase. **Acta Biomed**, v. 81, p. 104 – 108, 2010.

SHRIVASTAVA, A.; KHAN, A. A.; KHURSHID, M.; KALAM, M. A.; JAIN, S. K.; SINGHAL, P. K. Recent Developments in L-asparaginase Discovery and its Potential as Anticancer Agent. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 100, p. 1 – 10, 2016.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K. Microbial Enzymes: Industrial Progress in 21st Century. **3 Biotech**, v. 6, n. 174, p. 1 – 15, 2016.

SOCCOL, C. R.; COSTA, E. S. F.; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. S. Recent Developments and Innovations in Solid State Fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, n. 1, p. 52 – 71, 2017.

SOLER, M. F. C. R. **Aspectos da Produção de L-asparaginase por Leveduras**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena.

SOUZA, P. M.; FREITAS, M. M.; CARDOSO, S. L.; PESSOA, A.; GUERRA, E. N. S.; MAGALHÃES, P. O. Optimization and Purification of L-Asparaginase from Fungi: A Systematic Review. **Critical Reviews in Oncology / Hematology**, v.120, p. 194 – 202, 2017.

STEVENSON, L.; PHILLIPS, F.; O'SULLIVAN, K.; WALTON, J. Wheat Bran: its Composition and Benefits to Health, a European Perspective. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 63, n. 8, p. 1001 – 1013, 2012.

SUN, X.; LIU, Z.; QU, Y.; LI, X. The Effects of Wheat Bran Composition on the Production of Biomass-Hydrolyzing Enzymes by *Penicillium decumbens*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 146, p. 119 – 128, 2008.

SU, Z.; DIAS, C. L. Molecular Interactions Accounting for Protein Denaturation by Urea. **Journal of Molecular Liquids**, v.228, p. 168 – 175, 2017.

SWAIN, A. L.; JASKÓLSKI, M.; HOUSSET, D.; RAO, J. K. M.; WLODAWER, A. Crystal Structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an Enzyme Used in Cancer Therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 1474 – 1478, 1993.

TAREKE, E.; RYDBERG, P.; KARLSSON, P.; ERIKSSON, S.; TÖRNQVIST, M. Analysis of Acrylamide, a Carcinogen Formed in Heated Foodstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 17, p. 4998 – 5006, 2002.

THAKUR, M.; LINCOLN, L.; NIYONZIMA, F. N.; MORE, S. S. Isolation, Purification and Characterization of Fungal Extracellular L-Asparaginase from *Mucor hiemalis*. **Journal of Biocatalysis & Biotransformation**, v. 2, n. 2, p. 1 – 9, 2013.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.

TUNDISI, L. L.; COELHO, D. F.; ZANCHETTA, B.; MORIEL, P.; PESSOA Jr. A.; TAMBOURGI, E. B.; SILVEIRA, E.; MAZZOLA, P. G. L-Asparaginase Purification. **Separation & Purification Reviews**, v. 46, p. 35 – 43, 2017.

VALA, A. K.; SACHANIYA, B.; DUDHAGARA, D.; PANSERIYA, H. Z.; GOSAI, H.; RAWAL, R.; DAVE, B. P. Characterization of L-asparaginase from Marine-derived *Aspergillus niger* AKV-MKBU, its Antiproliferative Activity and Bench Scale Production Using Industrial Waste. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 41 – 46, 2018.

VAN DEN BERG, H. Asparaginase Revisited. **Leukemia & Lymphoma**, v. 52, n. 2, p. 168 – 78, 2011.

VARALAKSHMI, V.; RAJU, K. Optimization of L-asparaginase Production by *Aspergillus terreus* mtcc 1782 Using Bajra Seed Flour Under Solid State Fermentation. **International Journal of Research in Engineering and Technology**, v. 2, n. 9, p. 121 – 129, 2013.

VERMA, N.; KUMAR, K.; KAUR, G.; ANAND, S. L-asparaginase: A Promising Chemotherapeutic Agent. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 45 – 62, 2007.

VIMAL, A.; KUMAR, A. *In vitro* Screening and *in silico* Validation Revealed Key Microbes for Higher Production of Significant Therapeutic Enzyme L-asparaginase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 98, p. 9 – 17, 2017.

VIMAL, A.; KUMAR, A. Transforming the Healthcare System Through Therapeutic Enzymes. In: KUDDUS, M. (Ed.). **Enzymes in Food Biotechnology**. Raipur, Academic Press, 2019, p. 603 – 625.

VIPINA, R.; CHITRA, A. V. Isolation and Screening of L-Asparaginase Producing Fungi from Kadalundi Mangrove Forest Soil. **International Journal of Scientific Research**, v.5, n. 11, p. 217 – 218, 2016.

VIVEKANANDHA, S.; SANKARESWARAN, M.; PRABHAVATHI, P. A novel Role of L-Asparaginase Enzyme Production from Fungal Species. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 3, n. 6, p. 7 – 14, 2013.

VOGEL, H. J. Distribution of Lysine Pathways Among Fungi: Evolutionary Implications. **The American Naturalist**, v. 98, n. 903, p. 43 – 446, 1964.

WATKINSON, S. C.; BODDY, L.; MONEY, N. P. **The Fungi**. 3 ed. Oxford, 2016.

WISEMAN, A. Handbook of Enzyme Biotechnology. **New York: John Wiley & Sons**, p. 148, 1975.

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.

YAZID, N. A.; BARRENA, R.; KOMILIS, D.; SÁNCHEZ, A. Solid-state fermentation as a Novel Paradigm for Organic Waste Valorization: A Review. **Sustainability**

**(Switzerland)**, v. 9, n. 2, p. 1 – 28, 2017.

ZIA, M. A.; BASHIR, R.; AHMED, I.; IFTIKHAR, T. Production of L-asparaginase from *Aspergillus niger* Using Agro Wastes By-Products in Submerged Fermentation Process. **Jurnal Teknologi (Sciences and Engineering)**, v. 62, n. 2, p. 47 – 51, 2013.